



ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА
НАУКИТЕ**



ПЕТЯ ВЛАШЕВА ХАДЖИБОЖЕВА

**ЕФЕКТИ И МЕХАНИЗМИ НА ДЕЙСТВИЕ НА
ПЕПТИДА АНГИОТЕНЗИН II
ВЪРХУ ВИСЦЕРАЛНИ ГЛАДКИ МУСКУЛИ В
НОРМА И ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА
ЗАХАРЕН ДИАБЕТ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**на дисертационен труд за присъждане на образователна и
научна степен «ДОКТОР»**

Научна специалност

«Физиология на животните и човека»

СОФИЯ

2015

ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ
БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

ПЕТЯ ВЛАШЕВА ХАДЖИБОЖЕВА

**ЕФЕКТИ И МЕХАНИЗМИ НА ДЕЙСТВИЕ НА
ПЕПТИДА АНГИОТЕНЗИН II
ВЪРХУ ВИСЦЕРАЛНИ ГЛАДКИ МУСКУЛИ В НОРМА
И ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА ЗАХАРЕН
ДИАБЕТ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна
степен «Доктор»

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

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Научна специалност: Физиология на животните и човека

Научни ръководители:

Проф. д-р Рени Емил Калфин, дм

Доц. д-р Анна НайденоваТолева, дм

Официални рецензенти:

Акад. д-р Радомир Георгиев Радомиров, дмн

Проф. д-р Радослав Александров Гърчев, дмн

София, 2015 година

Дисертационният труд е структуриран в VIII глави на 159 страници и е онагледен с 56 фигури и 15 таблици. Литературната справка включва 277 заглавия, от които 3 на кирилица и 274 на латиница.

Дисертационния труд е обсъден и предложен за публична защита на Научен семинар на Институт по Невробиология, БАН, проведен на 30.10.2015 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 04.02.2016 г. от 13.30 часа в Заседателната зала на Института по Невробиология – БАН, ул. “Акад. Г. Бончев”, бл. 23, ет. 2.

Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на Института по Невробиология, ул. Акад. Г. Бончев, бл. 23.

СЪДЪРЖАНИЕ:

I. ВЪВЕДЕНИЕ.	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	6
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
1. Опитни животни	8
2. Проследяване на клинично-биохимични и анатомо-физиологични параметри	9
3. Регистрация на Анг II – индуцирана съкратителна активност на препарати от висцерална гладка мускулатура на здрави или диабетни плъхове	10
4. Експериментални протоколи	12
5. Разтвори и субстанции	12
6. Анализ на данните и статистическа обработка	12
IV. РЕЗУЛТАТИ	14
Сравнение на ефекта от въздействието с 10^{-6} М Анг II върху препарати от висцерална гладка мускулатура на здрави плъхове	14
Ефекти на селективните блокери за AT1 рецепторите (Losartan) AT2 рецепторите (PD 123319) за развитието на индуцираните с Анг II съкращения на препарати от висцерална мускулатура на здрави плъхове	16
Експериментално индуциран захарен диабет	24
<i>Клинично-биохимични и анатомо-физиологични параметри</i>	24
Анг II – индуцирана съкратителна активност на препарати от висцерална гладка мускулатура на плъхове с експериментално индуциран захарен диабет	27
V. ДИСКУСИЯ	35
Анг II – индуцирана съкратителна активност на препарати от висцерална гладка мускулатура на здрави плъхове	35
Анг II рецепторна блокада: промяна в развитието на Анг II - индуцираните съкращения на препарати от висцерална гладка мускулатура при предварително приложение на селективните инхибитори PD 123319 и Losartan	41
Експериментално индуциран захарен диабет	49
Влияние на захарния диабет върху Анг II-индуцираните съкращения на висцералната гладка мускулатура	51
Краткосрочно приложение на мелатонин при експериментален модел на захарен диабет: ефект върху Анг II-стимулираната активност на висцералната гладка мускулатура	58
Краткосрочно приложение на грелин при експериментален модел на захарен диабет: ефект върху Анг II-стимулираната активност на висцералната гладка мускулатура	61
VI. ИЗВОДИ	65
VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	65
VIII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	65
IX. НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	66
X. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ДОГОВОРИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	68
XI. РЕЗЮМЕ НА АНГЛИЙСКИ ЕЗИК (SUMMARY)	68
Благодарности	71

Използвани съкращения в текста:

Анг II	Ангиотензин II
ГИ	Гастро – интестинален/и
ГМ	Гладко-мускулно/и
ГР	Грелин
ЕНС	Ентерална нервна система
ЗД	Захарен диабет
МЛТ	Мелатонин
РАС	Ренин – ангиотензинова система

ACE	Ангиотензин-конвертиращ ензим
APA	Аминопептидаза А
APN	Аминопептидаза N
cGMP	Циклически гуанозинмонофосфат
HbA _{1c}	Гликиран хемоглобин
IP ₃	Инозитол трифосфат
MLC	Лека верига на миозина
MLCK	Лека верига на миозина
MLCP	Лековерижна миозинфосфатаза
NO	Азотен оксид
ROS	Стрептозотоцин
STZ	Стрептозотоцин

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Ренин–ангиотензиновата система (РАС) е хормонална система, която участва в регулирането на кръвното налягане и водно-електролитната хомеостаза в организма. Нейният главен ефектор е пептидът Ангиотензин II (Анг II). Информацията за физиологичната роля на тази система продължава да се обогатява с установяването на множество ефекти на Анг II извън сърдечно-съдовата система и бъбреците. Откриването на локална експресия на компонентите на РАС в редица тъкани и органи показва наличие на алтернативни пътища за формиране на Анг II. Това разширява значително и променя съществуващата концепция за ренин–ангиотензиновата система. Понастоящем РАС се разглежда като многокомпонентна ендо-, пара- и интракринна система, оперираща посредством различни сигнални трансдукционни пътища и имаща голямо значение както за регулацията на физиологичните процеси в норма, така и за появата и прогресията на редица заболявания.

В съвременния свят две заболявания с много сериозна социална значимост съставят т.нар. „смъртоносен дует“: артериалната хипертония и захарния диабет. От една страна е установена неколkokратно по-висока честота на хипертония сред диабетната популация, а от друга е доказано, че диабетът се среща два пъти по-често при пациенти с хипертония, отколкото при такива с нормално кръвно налягане. Демонстрирана е също основната роля на РАС в патогенезата на артериалната хипертония при захарен диабет. Поради това понастоящем се счита, че диабетът е предпоставка за проява на сърдечно-съдово заболяване. Класическата антихипертензивна терапия, независимо дали става въпрос за диабетни или недиабетни пациенти, включва приложението на различни групи лекарствени средства. Основната част от тези средства са насочени към ренин-ангиотензиновата система и целят блокиране формирането на Анг II и на неговите ефекти. Това обаче е само „едната страна на медала“, защото много от

въздействията на Анг II, касаещи органите извън сърдечно-съдовата система, са все още в процес на проучване.

Безспорен е фактът, че Анг II има значение за съкращението на висцералната гладка мускулатура. Това поставя редица въпроси относно промяната в съкратителната активност на екстраваскуларните гладкомускулни тъкани в резултат на антихипертензивното лечение и лекарственото повлияване на образуването и/или ефектите на Анг II. В редица случаи прогресията на нелекуваното диабетно заболяване, както и лечението на артериалната хипертония с класическите антихипертензивни средства може да доведе до странични ефекти, разстройващи нормалната функция на много гладко-мускулни органи.

Ето защо изследването на ефектите и механизми на действие на Анг II върху висцералната гладка мускулатура, анализа на промените, настъпващи в Анг II – предизвиканите съкращения на гладко-мускулни препарати от сегменти на гастро-интестиналния пикочен тракт и пикочен мехур на плъхове в норма и при експериментално предизвикан захарен диабет са от особено значение.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ЦЕЛ

Целта на настоящото изследване е да се установят ефектите и механизми на действие на Ангиотензин II върху висцерални гладки мускули на плъхове при норма и експериментално индуциран захарен диабет.

ЗАДАЧИ

1. Регистрация и анализ на съкратителната активност след въздействие с Ангиотензин II върху изолирани препарати от гладки мускули от гастро-интестиналния тракт и пикочния мехур на здрави

плъхове.

- Анализ на силовите параметри на съкращенията
- Анализ на времевите параметри на съкращенията

2. Установяване ролята на субтипозите рецептори за Ангиотензин II при осъществяване на гладко-мускулното съкращение.

- Анализ на промяната в силовите и времевите параметри след въздействие със специфичен блокер на AT1 рецепторите - Losartan
- Анализ на промяната в силовите и времевите параметри след въздействие със специфичен блокер на AT2 рецепторите - PD 123319

3. Предизвикан от стрептозотоцин експериментален модел на захарен диабет. Краткосрочно третиране на животни с експериментално индуциран захарен диабет с мелатонин или грелин.

- Регистрация на настъпилите промени в кръвната захар, гликирания хемоглобин, концентрацията на С-пептид в плазмата на опитните животни.
- Регистрация на промените в телесната маса и артериалното налягане на опитните животни

4. Изследване на промените, които настъпват в отговора на диабетната гладка мускулатура на стомашно-чревния тракт и пикочния мехур към Ангиотензин II.

- Анализ на промените в силовите параметри на съкращенията
- Анализ на промените във времевите параметри на съкращенията

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Експериментите бяха проведени в Експериментална Лаборатория с Операционен Комплекс към Катедра Физиология, патофизиология и фармакология на Медицински Факултет, Тракийски университет, Стара Загора. Експерименталните програми бяха провеждани в съответствие с изискванията на Комисията по етика към животните при Тракийски Университет и в съгласие с изискванията на Националните и Европейски нормативни документи, касаещи защитата на животните, използвани за научни и експериментални цели.

1. Опитни животни

В експериментите бяха включени 72 броя половозрели, нормотензивни бели плъхове, линия Wistar, на възраст 5-7 месеца и тегло 300-350 g. Всички опитни животни бяха доставени от Вивариума към Медицински Факултет на Тракийски Университет. животните се отглеждаха при температура $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, влажност $50 \pm 10\%$, при 12:12 часа светъл-тъмен режим и неограничен достъп до храна и вода. Животните се оставяха без храна през нощта преди датата на експеримента, както и през нощта преди дните, когато предстоеше вземане на кръвни проби.

1.1. Предизвикан от стрептозотозин експериментален модел на захарен диабет

Индукцията на захарен диабет (ЗД) бе осъществена чрез еднократно интраперитонеално инжектиране на стрептозотозин (STZ) в доза 60 mg/kg. На 72-я час (3-ти ден) от апликацията на STZ беше измерено кръвно-захарното ниво на плъховете и само животни с кръвна захар над 16 mmol/l бяха счетени за диабетно болни и оставени в експеримента.

Групи опитни животни при създаване на експериментален модел на ЗД:

Група 1 (контролна група): здрави животни - плъхове, инжектирани 8 последователни дни от началото на експеримента с физиологичен разтвор.

Група 2 (диабетна група): животни с индуциран ЗД - плъхове, инжектирани еднократно в първия ден от експеримента със STZ.

Група 3 (диабетна група, третирана с МЛТ): животни с индуциран ЗД, третирани краткосрочно с мелатонин - плъхове, инжектирани еднократно в първия ден на експеримента със STZ, след което 7 последователни дни бе прилаган МЛТ в доза 10 mg/kg i.p.

Група 4 (диабетна група, третирана с ГР): животни с индуциран ЗД, третирани краткосрочно с грелин - плъхове, инжектирани еднократно в първия ден от експеримента със STZ, след което 7 последователни дни бе прилаган ГР в доза 100 µg/kg s.c.

Периодът на експериментално индуциран ЗД беше с продължителност от 42 дни. В началото (преди инжектирането на STZ) и края на експерименталния период бяха определени следните показатели на опитните животни: кръвна захар, гликиран хемоглобин, телесна маса, кръвно налягане. В края на експерименталния период бяха отчетени нивата на С-пептид в кръвните плазми от експерименталните животни.

2. Проследяване на клинико-биохимични и анатомо-физиологични параметри

2.1 Определяне на кръвна захар

Определянето на кръвната захар беше извършено чрез тест-ленти и глюкомер Medisign mm810 (Empecs Medical Device Co., Ltd., China). Кръвта се вземаше от опашната вена след предварително затопяне на опашката на животните в термостат при 38°C за 20 min.

2.2 Определяне съдържание на гликиран хемоглобин (HbA_{1c})

Гликираният хемоглобин в кръвните проби от плъхове беше определян с GLYCOHEMOGLOBIN HbA1-test (HUMAN, Germany).

Фотометрирането на пробите за определяне количеството гликиран хемоглобин беше извършено със спектрофотометър модел UV/VIS SP 8001 (Metertech Inc., Taiwan).

2.3 Определяне на С-пептид в кръвна плазма от плъхове

Определянето беше извършено чрез DRG® C-Peptide ELISA (EIA-1293), DRG International, Inc., USA. За отчитането на абсорбцията в гнездата с пробите за С-пептид беше използван ELISA-четец модел HumaReader HS (HUMAN, Germany). Стандартната крива беше идентифицирана и построена с помощта на програма KORELIA-Dynamics (Yankov, 1998a; Yankov, 1998b; Yankov, 2014).

2.4. Измерване на кръвно налягане

Кръвното налягане на плъховете беше регистрирано с помощта на система за неинвазивно измерване на кръвно налягане на малки лабораторни животни (BIOPAC Systems Inc., USA) , свързана с компютър и монитор. Кривите на кръвното налягане бяха визуализирани и записвани с помощта на компютърна програма AcqKnowledge 3.9.1 (BIOPAC Systems Inc., USA).

3. Регистрация на Анг II – индуцирана съкратителна активност на препарати от висцерална гладка мускулатура на здрави или диабетни плъхове.

3.1. Дисекция, изолиране на органите от опитните животни и изготвяне на гладко-мускулни препарати

След анестезия с Nembutal, 50 mg/kg, приложен интраперитонеално, животните бяха ексангвинирани чрез отваряне на гръдната кухина и изтегляне на максимално количество кръв от сърцето. Дисецирани бяха коремната и тазовата кухина и бързо бяха отпрепарирани стомахът, тънкото черво, дебелото черво и пикочният мехур, които непосредствено след това бяха поставени в студен разтвор на Кребс. Изолираните органи бяха внимателно почистени от кръвоносните съдове, нервните тъкани и серозата по мезентериалната им страна, в среда на студен разтвор на Кребс.

Изготвяне на препарати от стомах

По хода на циркулярния мускулен слой в областта с по-развита мускулатура (на границата между средната и дисталната части на тялото) бяха отпрепарирани гладко-мускулни ивици с ширина около 4 mm, дължина 10-12 mm и дебелина 1-2 mm. Получените стомашни тъканни ивици не съдържаха мукоза.

Изготвяне на препарати от черва

Изолираните чревни сегменти бяха промивани внимателно с разтвор на Кребс, прилаган със спринцовка в проксималния им край. От интестиналните сегменти се изготвяха препарати с дължина 10 - 12 mm, с интактни гладко-мускулни слоеве, без отстраняване на мукозата. От тънкото черво се приготвяха препарати от йеюnum и илеум. Препаратите от йеюnum (10-12 mm) бяха изолирани от проксималните участъци на органа, а препаратите от илеум (10-12 mm) – от дисталните части на тънкото черво, непосредствено до илеоцекалната клапа. От дебелото черво се приготвяха препарати от колон и ректум. Препаратите от колон (10-12 mm) произхождаха от дисталните отдели на органа, а препаратите от ректум (10-12 mm) включваха ректума без аналните сфинктери.

Изготвяне на препарати от пикочен мехур

След отстраняване на тригонума бе нанесен надлъжен разрез по предната страна на тялото, като мехурът се разтваряше и фиксираше. По дължината на детрузорния мускул бяха изрязани ивици с ширина около 4 mm и дължина 10 - 12 mm.

3.2. Подготовка на тъканните препарати и регистриране на съкратителната активност

Изолираните гладко-мускулни препарати бяха фиксирани в органични ванички тип TSZ (Experimetria Ltd, Hungary), съдържащи 5 ml разтвор на Кребс, с поддържана постоянна температура от 37°C, pH 7.4 и аериран непрекъснато с карбожен (95% O₂ и 5% CO₂). Всички препарати бяха подложени на първоначално преднатоварване от 1 g и

оставени за 90 - минутен период на адаптация.

Механичната активност на препаратите бе дигитализирана и записвана посредством компютърна програма ISOSYS-Advanced 1.0 (Experimetria Ltd., Hungary). Обработката и съхранението на данните за по-нататъшен анализ се осъществяваше със софтуер от фамилията KORELIA (Yankov, 2007; Yankov, 2010).

4. Експериментални протоколи

1. Анг II първоначално бе прилаган по не-кумулятивен начин, в концентрации 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} или 10^{-5} М - за установяване на концентрацията, предизвикваща максимален съкратителен отговор. В последствие, Анг II беше прилаган в доза от 10^{-6} М;

2. PD 123319 (селективен блокатор за AT₂ рецепторите) – в концентрация 10^{-7} М, прилаган 15 мин. преди въздействие с 10^{-6} М Анг II.

3. Losartan (селективен блокатор за AT₁ рецепторите) – в концентрация 10^{-7} М, прилаган 15 мин. преди въздействие с 10^{-6} М Анг II.

5. Разтвори и субстанции

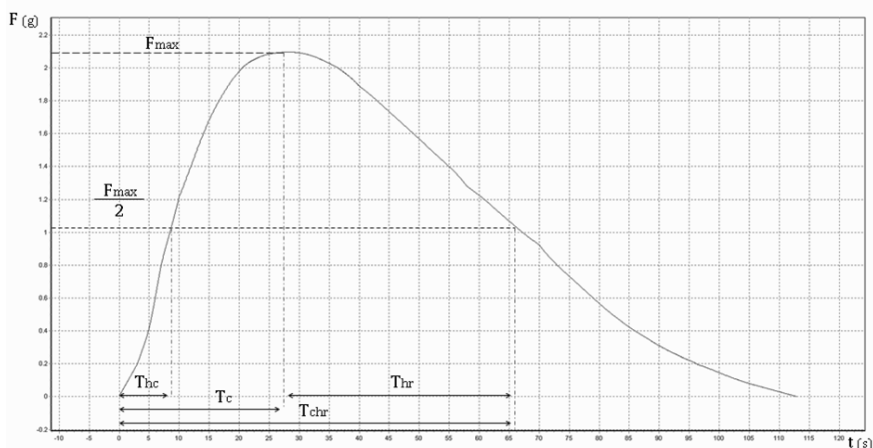
В експерименталната работа бе използван разтвор на Кребс със следния състав (в mM): NaCl 118.00, KCl 4.75, NaHCO₃ 25.00, KH₂PO₄ 1.20, MgSO₄ 1.20, CaCl₂ 2.00 и глюкоза 11.

МЛТ, прилаганият за индукция на експериментален диабет STZ, както и всички субстанции за изготвянето на разтвора на Кребс, бяха закупени Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany. ГР беше закупен от PolyPeptide Group, Sweden.

6. Анализ на данните и статистическа обработка

Записаните криви сила/време позволиха определянето на амплитудата и интегралната сила на съкращението (последната представена чрез площта под кривата - AUC). С оглед еднообразно изчисляване на различните по продължителност Анг II - индуцирани

гладко-мускулни съкращения бе определен интервал за анализ, обхващащ времето от поява на контракцията, до момента, в който амплитудата на съкращението спаднаше до 50% от максимума. Различните фази от провокираните гладко-мускулни съкращения бяха характеризирани и анализирани посредством метод на определяне на времеви параметри на съкращението, по подобие на използваните в проучванията на Radomirov (1976a; 1976b) и Raikova & Alajov (2004). В настоящото изследване бяха дефинирани и анализирани следните времеви параметри на гладко-мускулната контракция (Фиг.1): T_{hc} , T_c , T_{hr} , T_{chr} , препоръчани в Yankov (2011).



Фигура 1. Времеви параметри на гладко-мускулната контракция.

F_{max} – максимална амплитуда; $\frac{F_{max}}{2}$ – половината от максималната амплитуда;

T_{hc} (s) – първо време на полуконтракция: времеви интервал между началото на съкращението и момента в който се достигне половината от максимума му;

T_c (s) – време на контракция: времеви интервал между началото на съкращението и момента на достигане на максималната амплитуда;

T_{hr} (s) – време на полурелаксация: времеви интервал между момента на максималния отговор и момента, в който съкращението се редуцира до половината от максимума си;

T_{chr} (s) – време на контракция плюс полурелаксация: времето между началото на съкращението и края на T_{hr} ;

Изчисляването им бе извършено с програма KORELIA-Dynamics (Yankov, 2012). Програмата предлага средства за интерполация и графична визуализация на експерименталните данни с кубичен сплайн.

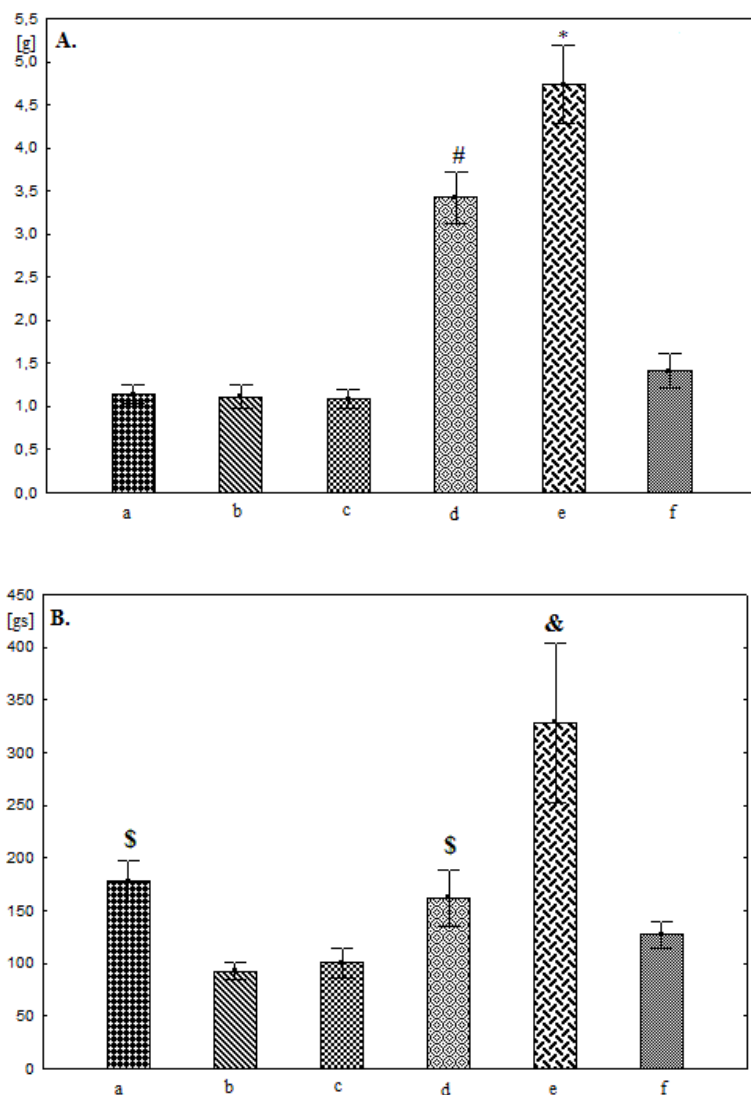
Всички получени резултати бяха обработени чрез компютърна статистическа програма STATISTICA, Version 8 (StaSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Данните са представяни като средни стойности и стандартна грешка ($\text{mean} \pm \text{SEM}$), като с n бе означаван броят на изследваните препарати от една група. Получените стойности бяха сравнени чрез Student t -test. Разликите се приемаха за достоверни при ниво на значимост $P < 0.05$.

IV. РЕЗУЛТАТИ

Сравнение на ефекта от въздействието с 10^{-6} М Анг II върху препарати от висцерална гладка мускулатура на здрави плъхове

Амплитудите на Анг II-провокираните съкращения при препаратите от стомах (1.14 ± 0.11 g), тънко черво (йеюnum: 1.11 ± 0.14 g и илеум: 1.09 ± 0.11 g) и пикочен мехур (1.37 ± 0.19 g) бяха сходни (Фиг.4.1-A). Сравнителният анализ не показваше достоверни разлики между горепосочените стойности ($P > 0.05$). Амплитудата на съкращение на препаратите от дебело черво под влияние на Анг II обаче, беше значително ($P < 0.05$) по-голяма от тази на предходните препарати. При препаратите от ректум тя беше най-висока (4.74 ± 0.46 g) и достоверно ($P < 0.05$) по-голяма от тази на препаратите от колон (3.43 ± 0.30 g) (Фиг.4.7-A).

Измерената интегралната сила на стомашното съкращение беше по-голяма (178.09 ± 19.63 gs, $P < 0.05$) от тези на препаратите от тънко черво (йеюnum 92.33 ± 8.01 gs и илеум 100.75 ± 14.07 gs) и пикочен мехур (120.61 ± 13.36 gs), и еднакво мощна с доказаната при препаратите от колон (162.25 ± 26.60 gs, $P > 0.05$). Сегментите от ректум развиха най-мощна интегрална сила на съкращение под въздействието на Анг II (328.43 ± 75.23 gs) (Фиг.4.1-B)



Фигура 4.1. Амплитуда (А.) и интегрална сила (В.) на съкращения на препарати от стомах (а), йеюnum (b), илеум (с), колон (d), ректум (е) и пикочен мехур (f) при въздействие с $10^{-6}M$ Анг II ($n=9-11$).

* $P < 0.05$ спрямо амплитудите на съкращение на останалите препарати

$P < 0.05$ спрямо амплитудите на съкращение на останалите препарати

\$ $P < 0.05$ спрямо AUC на препарати b,c,e и f

& $P < 0.05$ спрямо AUC на съкращенията на останалите препарати

Представените времеви параметри на съкращенията (Табл.4.1) разкриват по-дълъг интервал от време за развитие на стомашния отговор към Анг II. Всички времеви параметри на стомашното съкращение бяха достоверно по-дълги ($P<0.05$) в сравнение със същите, регистрирани при съкращенията на препаратите от черва и пикочен мехур. Интересно за отбелязване е, че резултатите по времеви параметри на съкращенията на препаратите от чревни сегменти и пикочен мехур показаха сходство без статически значима разлика. Изключение беше наблюдавано единствено при съкращенията на препаратите от илеум, чиито T_{hr} и T_{chr} бяха по-продължителни от останалите ($P<0.05$).

Таблица 4.1. Времеви параметри на Анг II - индуцирани съкращения на препарати от висцерална гладка мускулатура на здрави плъхове ($n=9-11$).

	T_{hc}	T_c	T_{hr}	T_{chr}
Стомах	$29.09 \pm 1.83^*$	$78.18 \pm 5.12^\#$	$146.73 \pm 11.18^\&$	$224.91 \pm 18.45^\epsilon$
Йеюнум	16.67 ± 2.13	35.50 ± 3.57	54.67 ± 5.47	90.17 ± 8.45
Илеум	12.42 ± 2.31	34.75 ± 5.44	106.33 ± 9.89^s	$141.08 \pm 9.48^\@$
Колон	13.38 ± 1.02	34.12 ± 1.94	37.75 ± 5.84	71.87 ± 7.54
Ректум	10.88 ± 1.65	39.43 ± 3.53	48.43 ± 4.78	87.86 ± 4.76
Пикочен мехур	11.92 ± 1.36	34.54 ± 2.01	56.01 ± 5.83	84.92 ± 6.73

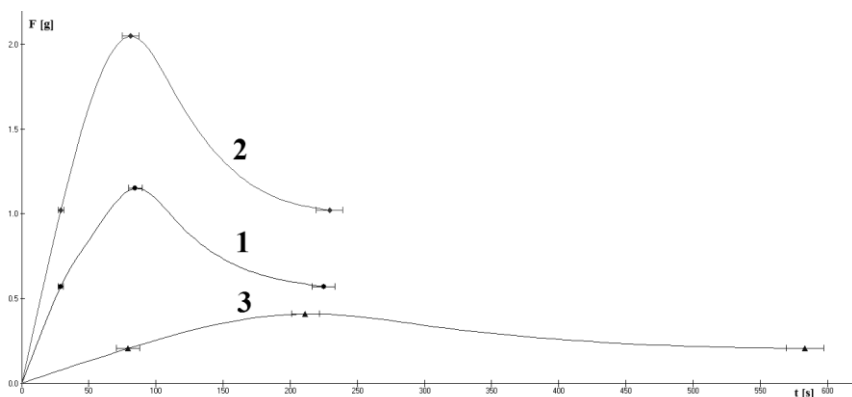
$^*P < 0.05$ спрямо T_{hc} на останалите съкращения $^\#P < 0.05$ спрямо T_c на останалите съкращения $^\&P < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите съкращения $^sP < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите съкращения $^\epsilon P < 0.05$ спрямо T_{chr} на останалите съкращения $^\@P < 0.05$ спрямо T_{chr} на останалите съкращения

Ефекти на селективните блокери за AT1 рецепторите (Losartan) AT2 рецепторите (PD 123319) за развитието на индуцираните с Анг II съкращения на препарати от висцерална мускулатура на здрави плъхове

Препарати от стомах

В присъствието на PD 123319, Анг II-индуцираните съкращения на препаратите от стомах показаха достоверно ($P<0.05$) увеличена амплитуда (2.03 ± 0.37 g) и интегрална сила (349.23 ± 42.95 gs) в сравнение с Анг II-стимулираните съкращения на стомашните препарати, които се отличаваха

с по-ниски стойности (1.14 ± 0.13 g и 178.09 ± 19.63 gs). Предварителното приложение на Losartan значително редуцираше амплитудата и интегралната сила на стомашните Анг II – предизвикани съкращения (0.41 ± 0.07 g и 94.44 ± 18.08 gs) (Фиг.4.2).



Фигура 4.2. Графични изображения на модели съкратителна активност на ГМ препарати от **стомах**, под въздействие на Анг II (1), Анг II при предварително блокиране на AT2 рецепторите (2); с Анг II при предварително блокиране на AT1 рецепторите (3);

При анализа на времевите параметри (Табл.4.2) на стомашните съкращения, предизвикани само с Анг II и тези, с предварително приложен AT2 блокер, не бе установена статистически значима разлика. При препаратите от стомах с предварително извършена блокада на AT1 рецепторите се отчиташе значително по-продължителен отговор към Анг II, изразено в съществено ($P < 0.05$) удължение на всички времеви параметри на ГМ съкращения (Табл.4.2 и Фиг.4.12).

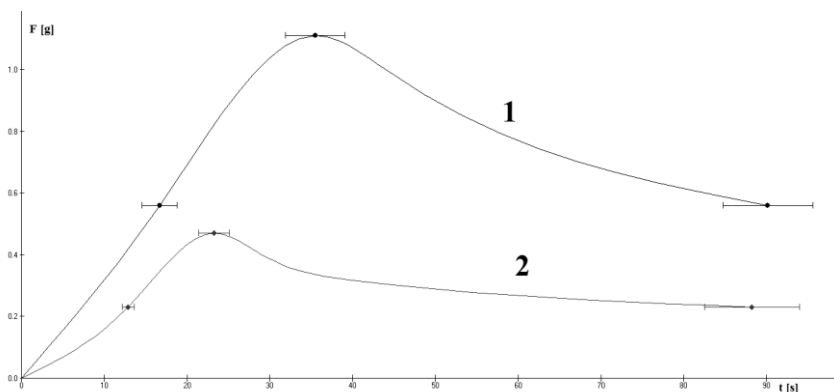
Таблица 4.2. Времеви параметри на съкращения на ГМ препарати от **стомах**, индуцирани с Анг II (1); с Анг II при предварително блокиране на AT2 рецепторите (2); с Анг II при предварително блокиране на AT1 рецепторите (3);

	T_{hc} (s)	T_c (s)	T_{hr} (s)	T_{chr} (s)
1	29.09 ± 1.83	78.18 ± 5.12	146.73 ± 11.18	224.91 ± 18.45
2	29.14 ± 2.19	89.43 ± 6.29	144.67 ± 11.04	229.33 ± 19.91
3	$79.33 \pm 8.66^*$	$211.34 \pm 10.16^\#$	$372.00 \pm 12.54^\&$	$583.31 \pm 13.89^\$$

$P < 0.05$ спрямо T_{hc} на останалите групи $^\#P < 0.05$ спрямо T_c на останалите групи $^\&P < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите групи $^\$P < 0.05$ спрямо T_{chr} на останалите групи

Препарати от йеюнум

Приложението на AT2 блокера PD 123319 значително понижаваше амплитудата и AUC на йеюналните Анг II-предизвикани отговори съответно от 1.11 ± 0.14 g и 92.33 ± 8.02 gs до 0.47 ± 0.08 g и 24.05 ± 2.42 gs (Фиг.4.3). В присъствието на 10^{-7} M Losartan, отговор на препаратите от йеюнум към Анг II не беше регистриран. Съпоставката по времеви параметри (Табл.4.3) на съкращенията, индуцирани с Анг II и с Анг II на фона на предварително приложен PD 123319, не показва статистически значими разлики ($P > 0.05$), с изключение на T_c , който при съкращенията на препаратите с предварително приложен AT2 блокер беше значително скъсен.



Фигура 4.3. Графични изображения на модели съкратителна активност на препарати от йеюнум, под въздействие на Анг II (1), Анг II при предварително блокиране на AT2 рецепторите (2);

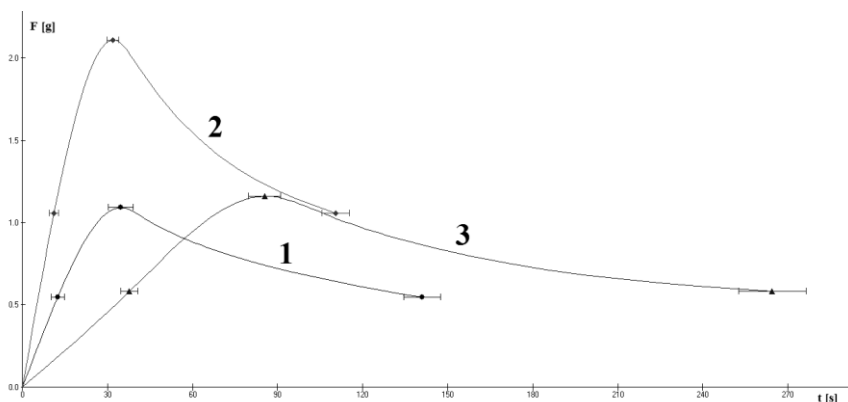
Таблица 4.3. Времеви параметри на Анг II-индуцираните съкращения на препаратите от йеюнум (1) и Анг II - индуцирани контракции при блокиране на AT2 рецепторите за Анг II (2).

	T_{hc} (s)	T_c (s)	T_{hr} (s)	T_{chr} (s)
1	16.67 ± 2.13	35.50 ± 3.57	54.67 ± 5.47	90.17 ± 8.45
2	12.87 ± 0.74	$23.28 \pm 1.85^*$	57.12 ± 5.41	88.25 ± 8.74
3	Без отговор			

* $P < 0.05$ спрямо T_c на групата, третирана само с Анг II

Препарати от илеум

При препаратите от илеум, приложеният 15 мин. след PD 123319 Анг II, предизвикваше значително увеличени по амплитуда отговори (2.11 ± 0.16 g). В присъствието на 10^{-7} M Losartan, амплитудата на Анг II–предизвиканите отговори (1.16 ± 0.09 g) не се различаваше достоверно ($P > 0.05$), спрямо тази на съкращенията, индуцирани само от Анг II (1.09 ± 0.16 g) (Фиг.4.4). Интегралната сила на Анг II–предизвиканото съкращение беше значително увеличена, както в присъствие на PD 123319 (165.22 ± 9.32 gs), така и на Losartan (191.76 ± 18.03 gs) и статистически ($P < 0.05$) по-голяма от интегралната сила на отговорите, предизвикани само с Анг II (100.75 ± 14.07 gs) (Фиг. 4.3).



Фигура 4.4. Графични изображения на модели съкратителна активност на ГМ препарати от илеум, под въздействие на: Анг II (1); Анг II при предварително блокиране на AT2 рецепторите (2); Анг II при предварително блокиране на AT1 рецепторите (3);

По подобие на съкращенията на препаратите от стомах и пикочен мехур, приложението на Losartan при препаратите от илеум значително удължаваше всички времеви параметри на Анг II–предизвиканите отговори (Табл.4.4). От друга страна, в присъствието на PD 123319 Анг II–предизвиканите съкращения на препаратите от илеум се характеризираха с по-бързо развитие на фазата на релаксация .

Таблица 4.4. Времеви параметри на съкращения на препарати от **илеум**, индуцирани с: Анг II (1); Анг II при предварително блокиране на AT2 рецепторите (2); Анг II при предварително блокиране на AT1 рецепторите (3);

	T_{hc} (s)	T_c (s)	T_{hr} (s)	T_{chr} (s)
1	12.42 ± 2.31	34.75 ± 5.44	106.33 ± 9.89	141.08 ± 9.48
2	11.13 ± 1.56	31.87 ± 2.12	$78.62 \pm 3.97^{\$}$	$110.50 \pm 4.80^{\$}$
3	$37.75 \pm 2.96^*$	$85.50 \pm 5.67^{\#}$	$179.00 \pm 16.67^{\&}$	$264.50 \pm 21.88^@$

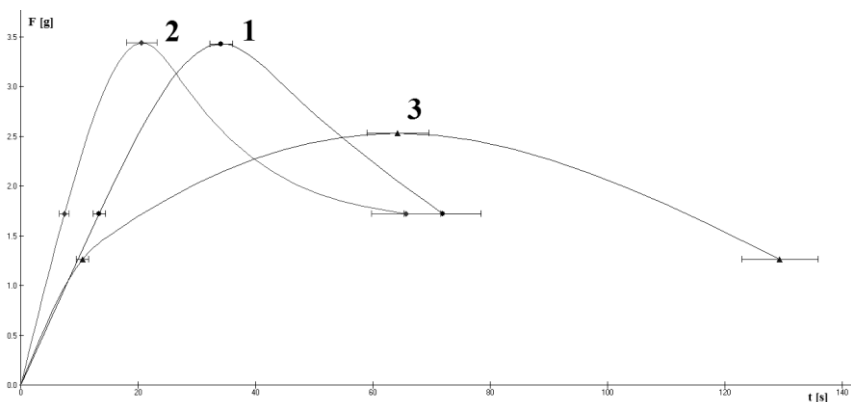
* $P < 0.05$ спрямо T_{hc} на останалите групи $^{\#}P < 0.05$ спрямо T_c на останалите групи

$^{\$}P < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите групи $^{\&}P < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите групи

$^{\$}P < 0.05$ спрямо T_{chr} на останалите групи $^@P < 0.05$ спрямо T_{chr} на останалите групи.

Препарати от колон

При препаратите от колон, приложението на Losartan значително редуцираше амплитудата на Анг II–индуцираните съкращения до 2.53 ± 0.12 g. Статистически значима разлика в амплитудата на съкращенията след самостоятелно приложение на Анг II (3.44 ± 0.32 g) и тези, с предварително добавен AT2 блокер (3.43 ± 0.33 g) обаче, не се наблюдаваше (Фиг.4.5).



Фигура 4.5. Графични изображения на модели съкратителна активност на препарати от **колон**, под въздействие на: Анг II (1); Анг II при предварително блокиране на AT2 рецепторите (2); Анг II при предварително блокиране на AT1 рецепторите (3);

По отношение интегралната сила на съкращение, статистическа разлика ($P < 0.05$) беше отчетена между самостоятелно индуцираните с Анг II съкращения и тези с предварително приложен блокер на AT1 рецепторите (Фиг. 4.5). Блокадата на AT2 рецепторите статистически значимо скъсяваше параметрите, характеризиращи съкратителната фаза на Анг II–предизвиканите отговори на препаратите от колон (Табл.4.5). В присъствието на Losartan, Анг II–предизвикания отговор на препаратите от колон се удължаваше: достигането на параметрите T_c , T_{hr} и T_{chr} беше значително забавено.

Таблица 4.5. Времеви параметри на съкращения на препарати от колон, индуцирани с: Анг II (1); Анг II при предварително блокиране на AT2 рецепторите (2); Анг II при предварително блокиране на AT1 рецепторите (3);

	T_{hc} (s)	T_c (s)	T_{hr} (s)	T_{chr} (s)
1	13.38 ± 1.02	34.12 ± 1.94	37.75 ± 5.84	71.87 ± 7.54
2	$7.43 \pm 0.84^*$	$20.57 \pm 2.59^\#$	45.14 ± 7.17	65.71 ± 5.89
3	10.50 ± 1.08	$64.25 \pm 7.26^\$$	$66.00 \pm 5.38^\&$	$129.37 \pm 6.48^\S$

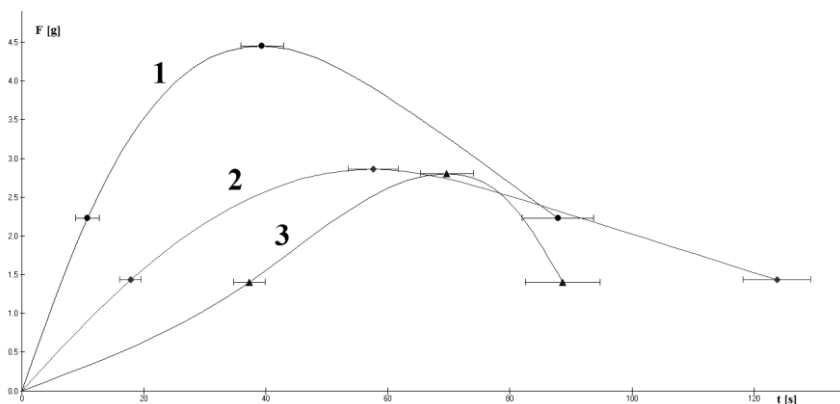
* $P < 0.05$ спрямо T_{hc} на останалите групи $^\# P < 0.05$ спрямо T_c на останалите групи

$^\$ P < 0.05$ спрямо T_c на останалите групи $^\& P < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите групи

$^\S P < 0.05$ спрямо T_{chr} на останалите групи

Препарати от ректум

Анг II–предизвиканите съкращения на препаратите от ректум показваха значително висока амплитуда: 4.74 ± 0.44 g, в сравнение с тези, предизвикани с Анг II при предварително приложени блокери на рецепторите: 2.86 ± 0.48 g (PD 123319 + Анг II) и 2.79 ± 0.37 g (Losartan + Анг II) (Фиг.4.6). В присъствието на 10^{-7} M Losartan, Анг II–стимулираните съкращения на ректалните препарати се отличаваха със значително редуцирана интегрална сила (129.27 ± 21.14 gs), в сравнение с интегралната сила на ректалните съкращения, индуцирани само с Анг II (328.43 ± 75.23 gs) и тези, индуцирани с Анг II при предварително приложен PD 123319 (248.99 ± 33.76 gs) (Фиг.4.6).



Фигура 4.6. Графични изображения на модели съкратителна активност на препарати от **ректум**, под въздействие на: Анг II (1); Анг II при предварително блокиране на AT2 рецепторите (2); Анг II при предварително блокиране на AT1 рецепторите (3);

При препаратите от ректум, Анг II–индуцираните съкращения на фона на предварително приложен AT2 блокер бяха със значително удължени времеви параметри (Табл.4.6). При AT1 рецепторната блокада достигането на параметрите T_{hc} и T_c също беше забавено, но бе регистрирано развитие на много бърза и рязка релаксация (Фиг.4.6), изразяваща се в статистически значимо по-кратък T_{hr} (Табл.4.6).

Таблица 4.6. Времеви параметри на съкращения на препарати от **ректум**, индуцирани с: Анг II (1); Анг II при предварително блокиране на AT2 рецепторите (2); Анг II при предварително блокиране на AT1 рецепторите (3);

	T_{hc} (s)	T_c (s)	T_{hr} (s)	T_{chr} (s)
1	10.88 ± 1.65	39.43 ± 3.53	48.43 ± 4.78	87.86 ± 4.76
2	$17.87 \pm 1.77^*$	$57.62 \pm 5.12^{\$}$	$66.12 \pm 5.00^{\$}$	$123.75 \pm 6.52^{\text{¥}}$
3	$37.33 \pm 3.53^{\#}$	$69.83 \pm 2.62^{\&}$	$19.01 \pm 1.32^@$	88.67 ± 6.44

* $P < 0.05$ спрямо T_{hc} на останалите групи $^{\#}P < 0.05$ спрямо T_{hc} на останалите групи

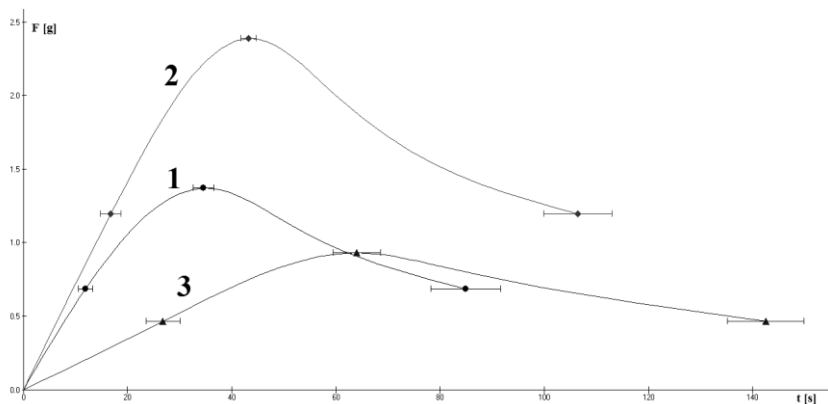
$^{\$}P < 0.05$ спрямо T_c на останалите групи $^{\&}P < 0.05$ спрямо T_c на останалите групи

$^{\$}P < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите групи $^@P < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите групи

$^{\text{¥}}P < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите групи

Препарати от пикочен мехур

При предварително приложен блокер на AT₂ рецепторите, амплитудата на Анг II–индуцираните съкращения на препаратите от пикочния мехур значително се увеличаваше (2.39 ± 0.45 g) в сравнение със съкращенията, предизвикани само с Анг II (1.37 ± 0.19 g). Достоверно ($P < 0.05$) по-голяма беше и интегралната сила на Анг II–индуцираните съкращения в присъствие на PD 123319 (172.09 ± 17.07 gs) (Фиг.4.7).



*Фигура 4.7. Графични изображения на модели съкратителна активност на препарати от **пикочен мехур**, под въздействие на Анг II (1), Анг II при предварително блокиране на AT₂ рецепторите (2); с Анг II при предварително блокиране на AT₁ рецепторите (3);*

Приложението на блокера Losartan водеше до значително намаление на амплитудата на Анг II–предизвиканите съкращения (0.90 ± 0.13 g), без статистически значими различия в интегралната сила на съкращение, сравнено със съкращенията, индуцирани само с Анг II (Фиг.4.7).

При блокиране на AT₁ рецепторите, отговорът на препаратите от пикочен мехур към Анг II се развиваше за по-дълъг интервал от време, за което свидетелстваха всички статистически значимо удължени времеви параметри на съкращението (Табл.4.7). Интересно беше, че времеви параметри на гладко-мускулните съкращения при блокиране на AT₂ рецепторите, не се различаваха съществено от тези на отговорите, предизвикани само с Анг II (Фиг.4.7,Табл.4.7). Изключение

правеше само T_c , който поради значителното си увеличение водеше до едно по-продължително време на цялостното съкращение (T_{chr}).

Таблица 4.7. Времеви параметри на съкращения на ГМ препарати от **пикочен мехур**, индуцирани с Анг II (1); с Анг II при предварително блокиране на AT2 рецепторите (2); с Анг II при предварително блокиране на AT1 рецепторите (3).

	T_{hc} (s)	T_c (s)	T_{hr} (s)	T_{chr} (s)
1	11.92 ± 1.36	34.54 ± 2.01	56.01 ± 5.83	84.92 ± 6.73
2	16.78 ± 2.00	$43.22 \pm 1.46^{\#}$	58.83 ± 4.92	$106.44 \pm 7.55^{\oplus}$
3	$26.83 \pm 3.24^*$	$64.00 \pm 6.59^{\$}$	$78.50 \pm 6.78^{\&}$	$142.51 \pm 10.32^{\$}$

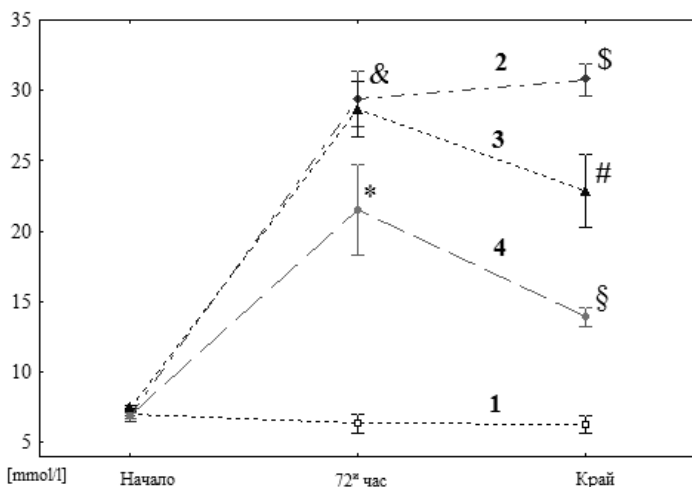
* $P < 0.05$ спрямо T_{hc} на останалите съкращения $^{\#}P < 0.05$ спрямо T_c на останалите съкращения $^{\$}P < 0.05$ спрямо T_c на останалите съкращения $^{\&}P < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите съкращения $^{\oplus}P < 0.05$ спрямо T_{chr} на останалите съкращения $^{\$}P < 0.05$ спрямо T_{chr} на останалите съкращения

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ИНДУЦИРАН ЗАХАРЕН ДИАБЕТ

Клинико-биохимични и анатомо-физиологични параметри

При отчитане на нивата на кръвната захар и гликирания хемоглобин (HbA_{1c}) в началото и в края на експерименталния период, се установиха значителни разлики ($P < 0.05$) между стойностите при различните експериментални групи. Нивата на кръвната захар (21.52 ± 3.19 mmol/l) на 72-я час от началото на експеримента на групата диабетни животни, третираны допълнително с ГР бяха статистически значимо по-ниски, в сравнение с групата диабетни животни, третираны допълнително с МЛТ (28.67 ± 1.94 mmol/l) и групата на животните с експериментално индуциран диабет без протекция (29.4 ± 1.99 mmol/l) (Фиг.4.8). В края на експерименталния период, нивата на кръвната захар на диабетните животни, третираны допълнително с ГР (13.92 ± 0.70 mmol/l) бяха достоверно ($P < 0.05$) по-ниски, спрямо измерените на останалите две диабетни групи: 22.87 ± 3.87 mmol/l (диабетни животни, повлияни с МЛТ) и 30.76 ± 1.10 mmol/l (диабетни животни).

Въпреки изразената тенденция за понижаване на плазмените нива на глюкоза и при двете диабетни групи с протекция, тези нива се оказваха далеч по-високи от тези на здравите животни (6.52 ± 0.34 mmol/l) (Фиг.4.8).



Фигура 4.8. Отчетени нива на кръвна захар в началото, на 72^а час и в края на експерименталния период на плъхове от контролната група (1), плъхове с индуциран ЗД (2), плъхове с индуциран ЗД, третиран допълнително с МЛТ (3), плъхове с индуциран ЗД, третиран допълнително с ГР (4).

* $P < 0.05$ спрямо отчетените на 72^а час кръвно-захарни нива на останалите групи

& $P < 0.05$ спрямо отчетените на 72^а час кръвно-захарни нива на групи 1 и 4 § $P < 0.05$ спрямо отчетените в края на експеримента кръвно-захарни нива на останалите групи # $P < 0.05$ спрямо отчетените в края на експеримента кръвно-захарни нива на останалите групи § $P < 0.05$ спрямо отчетените в края на експеримента кръвно-захарни нива на останалите групи

Горепосочените резултати кореспондираха с измерените нива на HbA_{1c} в кръвта на експерименталните животни - групите на диабетните животни, третиран допълнително с ГР или МЛТ имаха значително по-ниски нива на HbA_{1c} в сравнение с диабетната група, но оставаха по-високи от тези на контролата (Табл.4.8).

Нивата на С-пептид в края на експерименталния период също се различаваха съществено. Групата с експериментално индуциран ЗД беше с най-ниски стойности на този показател, докато при останалите две диабетни групи те бяха приблизително еднакви, но по-високи от установените в контролната група животни (Табл.4.8).

Таблица 4.8. Отчетени телесна маса и гликиран хемоглобин(HbA_{1c}) в началото и края на експерименталния период при плъхове от контролната група (1), плъхове с индуциран ЗД (2), плъхове с индуциран ЗД, третирани допълнително с МЛТ (3), плъхове с индуциран ЗД, третирани допълнително с ГР (4).

Група	Тегло начало (g)	Тегло край (g)	HbA _{1c} Начало (%)	HbA _{1c} Край (%)	С - пептид (ng/ml)
1	335,00±7,85	375,20±19,80	2,22±0,15	2,11±0,14	3,16± 0,25
2	345,00±5,89	270.56±12,92*	2,04±0,15	4,74±0,39[#]	1,83±0,17^{\$}
3	322,83±6,17	328,17 ±19,50	2,09±0,27	3,40±0,15^{\$}	4,51±0,39^{&}
4	331,43±9,56	331,00 ±23,55	2,28±0,16	3,46±0,24^{\$}	4,99±0,45^{&}

*P < 0.05 спрямо отчетената телесна маса в края на експерименталния период на останалите групи

[#]P < 0.05 спрямо % на HbA_{1c} на останалите групи ^{\$}P < 0.05 спрямо % на HbA_{1c} на групи 1 и 2

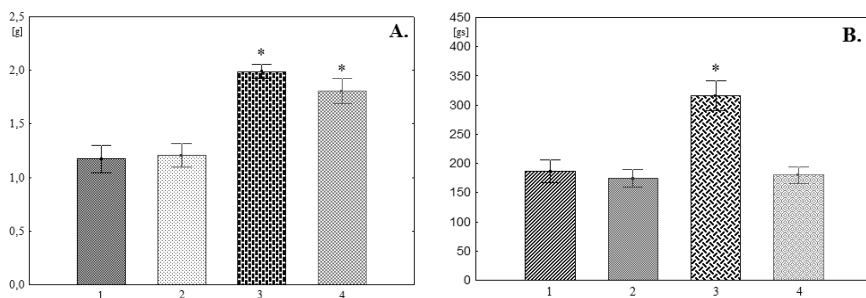
[§]P < 0.05 спрямо отчетените нива на С-пептид на останалите групи [&]P < 0.05 спрямо отчетените нива на С-пептид на групи 1 и 2

Промяната в телесната маса беше най-силно изразена при групата с експериментално индуциран ЗД: за 6-седмичния период на експеримента, теглото на животните от тази група сериозно се редуцираше, с около 22% от първоначалното. В контраст с това, животните от останалите две диабетни групи запазиха телесната си маса (Табл.4.8).

Анг II – индуцирана съкратителна активност на препарати от висцерална гладка мускулатура на плъхове с експериментално индуциран захарен диабет

Препарати от стомах

Съпоставката по силови параметри на Анг II-индуцираните съкращения на препаратите от стомах (Фиг.4.9) показваше, че най-високо амплитуден и силен е отговорът на група 3 (амплитуда и AUC на съкращението съответно 1.91 ± 0.07 g и 315.65 ± 25.50 gs). Интегралната сила на съкращение на препаратите от стомах на останалите три групи не се различаваше статистически ($P > 0.05$) (Фиг.4.9-B). Анг II-предизвиканите съкращения на препаратите от стомах на диабетната група животни не се отличаваха по силови параметри от тези на контролната група (Фиг.4.9).



Фигура 4.9. Амплитуда (А.) и интегрална сила (В.) на Анг II - индуцирани съкращения на препарати от **стомах** на: здрави животни (1); животни с експериментално индуциран ЗД (2); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с МЛТ (3); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с ГР (4);

A. * $P < 0.05$ спрямо амплитудата на съкращение на препаратите от група 1 и група 2

B. * $P < 0.05$ спрямо AUC на съкращенията на останалите групи препарати

При анализа на съкращенията по времеви параметри се откриха съществени разлики в съкратителния процес на препаратите от тези две групи. Отговорът към Анг II на препаратите от диабетната група се развиваше по-бързо, като всички параметри бяха значително скъсени в сравнение с контролата, с изключение на T_c . Подобна тенденция за

съксяване на отделните времеви интервали се установяваше и при съкращението на препаратите от стомах на диабетната група, третирана допълнително с ГР – времеви параметри бяха значимо най-кратки, в сравнение със съкращенията на препаратите от останалите групи (Табл.4.9).

Таблица 4.9. Времеви параметри на Анг II – индуцирани съкращения на препарати от **стомах** на: здрави животни (1); животни с индуциран ЗД (2); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с МЛТ (3); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с ГР (4);

Група	T _{hc} (s)	T _c (s)	T _{hr} (s)	T _{chr} (s)
1	28.69 ± 2.53	79.98 ± 3.35	148.47 ± 9.84	231.20 ± 11.64
2	18.00 ± 0.96*	77.75 ± 1.69	105.50 ± 5.18 ^{&}	183.25 ± 4.98 ^{\$}
3	17.20 ± 1.02*	66.00 ± 0.71 ^{\$}	157.01 ± 1.41	222.81 ± 2.11
4	27.33 ± 4.84	63.66 ± 6.97 ^{\$}	94.00 ± 7.10 [#]	157.67 ± 4.59 [@]

* $P < 0.05$ спрямо T_{hc} на групи 1 и 4 ^{\$} $P < 0.05$ спрямо T_c на групи 1 и 2

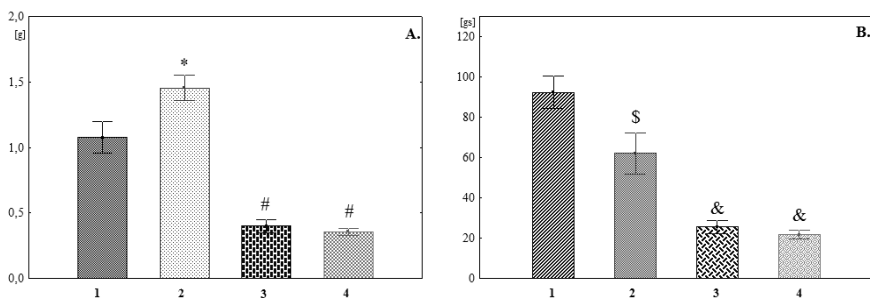
[#] $P < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите групи [&] $P < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите групи

^{\$} $P < 0.05$ спрямо T_{chr} на останалите групи [@] $P < 0.05$ спрямо T_{chr} на останалите групи

Препарати от йеюну

Препаратите от йеюну на групи 3 и 4 показаха сходство в силовите характеристики на съкратителния си отговор към Анг II (Фиг.4.10). Препаратите от диабетните животни (група 2) развиваха най-високо амплитудно съкращение под въздействието на Анг II (1.46±0.10 g), но със значително ($P<0.05$) по-ниска интегрална сила (62.13±10.25 gs), спрямо контролната група (91.59±8.00 gs) (Фиг.4.10).

Въпреки съществените разлики в силовите характеристики на съкращенията на препаратите от йеюну на групи 1 и 3, времеви им характеристики бяха близки. Анализът по времеви параметри (Табл.4.10) показваше еднаквост, както във времето за достигане на всеки един от времеви параметри на Анг II-предизвикания отговор, така и сходство в пропорциите на фазите на съкращение и релаксация.



Фигура 4.10. Амплитуда (А.) и интегрална сила (В.) на Анг II - индуцирани съкращения на препарати от **йеюну**м на: здрави животни (1); животни с експериментално индуциран ЗД (2); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с МЛТ (3); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с ГР (4);

А. * $P < 0.05$ спрямо амплитудата на съкращение на останалите групи препарати # $P < 0.05$ спрямо амплитудата на съкращение на групи 1 и 2

В. \$ $P < 0.05$ спрямо AUC на съкращенията на останалите групи препарати & $P < 0.05$ спрямо AUC на съкращенията на групи 1 и 2

Таблица 4.10. Времеви параметри на Анг II – индуцирани съкращения на препарати от **йеюну**м на: здрави животни (1); животни с индуциран ЗД (2); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с МЛТ (3); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с ГР (4);

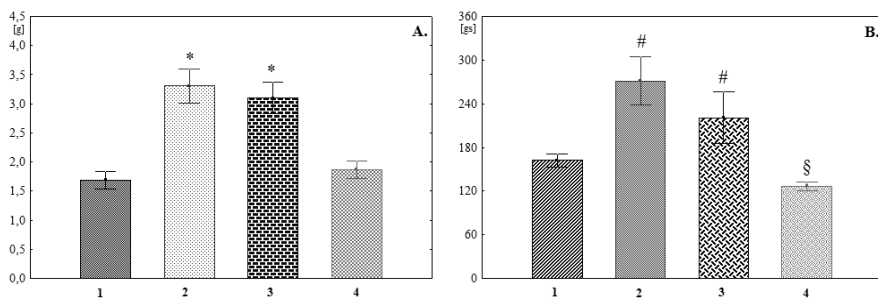
Група	T_{hc} (s)	T_c (s)	T_{hr} (s)	T_{chr} (s)
1	$17.67 \pm 1.95^*$	37.50 ± 7.73	62.00 ± 7.70^s	$99.50 \pm 10.45^{\#}$
2	13.17 ± 0.75	32.33 ± 1.58	35.83 ± 3.03	68.17 ± 3.91
3	$18.00 \pm 2.41^*$	35.00 ± 4.22	62.10 ± 6.70^s	$97.00 \pm 3.37^{\#}$
4	13.18 ± 1.25	31.17 ± 3.13	39.17 ± 1.01	70.33 ± 4.04

* $P < 0.05$ спрямо T_{hc} на групи 2 и 4 $^sP < 0.05$ спрямо T_{hr} на групи 2 и 4

$^{\#}P < 0.05$ спрямо T_{chr} на групи 2 и 4

Препарати от илеум

Анализът на отговора към Анг II на препаратите от илеум показваше двустранна симетрия. Съкращенията на препаратите от група 2 и група 3 бяха с достоверно по-високи силови характеристики: амплитуда съответно 3.31 ± 0.29 g и 3.10 ± 0.27 g и AUC 271.41 ± 33.05 gs и 220.74 ± 35.43 gs (Фиг.4.11).



Фигура 4.11. Амплитуда (А.) и интегрална сила (В.) на Анг II - индуцирани съкращения на препарати от **илеум** на: здрави животни (1); животни с експериментално индуциран ЗД (2); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с МЛТ (3); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с ГР (4);

А. * $P < 0.05$ спрямо амплитудата на съкращение на групи 1 и 4

В. # $P < 0.05$ спрямо AUC на контракциите на групи 1 и 4 § $P < 0.05$ спрямо AUC на контракциите на останалите групи препарати

При съпоставката с абсолютните времеви параметри също беше констатирана симетрия в отговора към Анг II. За разлика от сравнението по предходните параметри, на Табл.4.11 ясно се демонстрира сходството в достигане на всички времеви интервали при контракциите на препаратите от групи 3 и 4. Аналогично съответствие по абсолютни времеви параметри беше доказано и за контракциите на препаратите от групи 1 и 2.

Таблица 4.11. Времеви параметри на Анг II – индуцирани съкращения на препарати от **илеум** на: здрави животни (1); животни с индуциран ЗД (2); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с МЛТ (3); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с ГР (4);

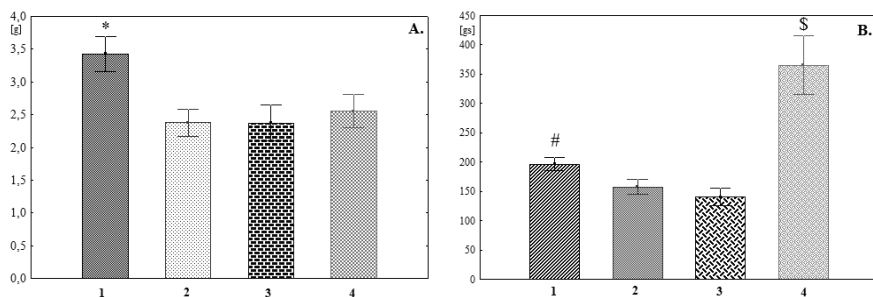
Група	T_{hc} (s)	T_c (s)	T_{hr} (s)	T_{chr} (s)
1	13.24 ± 1.62	37.35 ± 3.10	104.24 ± 7.82	142.11 ± 9.30
2	13.00 ± 1.76	45.80 ± 4.71	94.60 ± 7.27	138.40 ± 10.61
3	$8.17 \pm 1.40^*$	31.17 ± 3.12	$67.67 \pm 5.02^{\#}$	$98.83 \pm 6.37^{\S}$
4	$8.08 \pm 1.16^*$	$22.83 \pm 2.39^{\S}$	$64.17 \pm 5.22^{\#}$	$87.00 \pm 5.99^{\S}$

* $P < 0.05$ спрямо T_{hc} на групи 1 и 2 § $P < 0.05$ спрямо T_c на останалите групи

$^{\#}P < 0.05$ спрямо T_{hr} на групи 1 и 2 $^{\S}P < 0.05$ спрямо T_{chr} на групи 1 и 2

Препарати от колон

При препаратите от колон и в трите групи диабетни животни, Анг II индуцираше съкращения с амплитуди без статистически различия между тях, съответно: 2.38 ± 0.29 g (група 2), 2.37 ± 0.27 g (група 3) и 2.55 ± 0.25 g (група 4). Най-високо амплитудно беше съкращението на препаратите от контролната група – 3.45 ± 0.27 g (Фиг.4.12-А). Правеше впечатление значително по-високата интегрална сила на съкращение на препаратите от група 4: 365.39 ± 49.55 gs (Фиг.4.12-В).



Фигура 4.12. Амплитуда (А.) и интегрална сила (В.) на Анг II - индуцирани съкращения на препарати от колон на: здрави животни (1); животни с експериментално индуциран ЗД (2); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с МЛТ (3); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с ГР (4);

*А. *P < 0.05 спрямо амплитудата на съкращение на останалите групи препарати*

В. #P < 0.05 спрямо AUC на съкращенията на останалите групи препарати \$P < 0.05 спрямо AUC на съкращенията на останалите групи препарати

Проследяването на хода на Анг II–предизвикания съкратителен процес във времето (Табл.4.12), подчертаваше еднаквостта в параметрите T_{hr} и T_{chr} на съкращенията при три от групите: контролната, животните с индуциран диабет и диабетните животни, повлияни с МЛТ. От друга страна, същите тези параметри бяха значително забавени при Анг II–предизвиканите съкращения на препаратите от колон на животните от група 4.

Таблица 4.12. Времеви параметри на Анг II – индуцирани съкращения на препарати от **колон** на: здрави животни (1); животни с индуциран ЗД (2); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с МЛТ (3); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с ГР (4);

Група	T_{hc} (s)	T_c (s)	T_{hr} (s)	T_{chr} (s)
1	$13.36 \pm 1.02^*$	34.13 ± 2.01	37.88 ± 3.83	74.79 ± 5.64
2	$4.50 \pm 0.42^{\S}$	$20.13 \pm 1.03^{\#}$	53.87 ± 5.58	74.01 ± 5.12
3	7.25 ± 0.48	$25.50 \pm 1.50^{\&}$	45.75 ± 3.97	71.25 ± 5.31
4	8.50 ± 1.56	38.42 ± 2.70	$180.92 \pm 11.15^{\$}$	$219.33 \pm 11.85^{\P}$

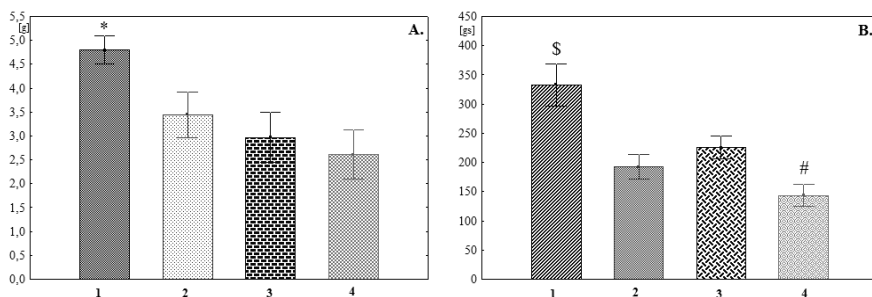
* $P < 0.05$ спрямо T_{hc} на останалите групи $^{\S}P < 0.05$ спрямо T_{hc} на останалите групи

$^{\#}P < 0.05$ спрямо T_c на останалите групи $^{\&}P < 0.05$ спрямо T_c на останалите групи

$^{\$}P < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите групи $^{\P}P < 0.05$ спрямо T_{chr} на останалите групи

Препарати от ректум

По подобие на препаратите от колон, при тези от ректум и на трите диабетни групи животни, регистрираните съкращения при въздействие с Анг II бяха със сходна, но значително по-малка амплитуда от регистрираната при съкращенията на препаратите от контролната група животни (Фиг.4.13-А).



Фигура 4.13. Амплитуда (А.) и интегрална сила (В.) на Анг II - индуцирани съкращения на препарати от **ректум** на: здрави животни (1); животни с експериментално индуциран ЗД (2); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с МЛТ (3); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с ГР (4);

А.* $P < 0.05$ спрямо амплитудата на съкращение на останалите групи препарати

В. $^{\$}P < 0.05$ спрямо AUC на съкращенията на останалите групи препарати $^{\#}P < 0.05$ спрямо AUC на съкращенията на останалите групи препарати

Препаратите от контролната група развиваха най-мощна интегрална сила на съкращение (332.71 ± 35.78 gs), докато съкращенията на препаратите от група 4 бяха със значително редуцирана AUC (143.17 ± 18.69 gs) (Фиг.4.13-В). При анализа по времеви параметри (Табл.4.13) не беше установена съществена разлика между отделните параметри на съкращенията на препаратите от здравите животни (група 1) и от групата с експериментално индуциран ЗД (група 2). Съкращенията на препаратите от група 3 имаха сходни параметри T_{hc} и T_c с отговорите на препаратите от група 1, докато T_{hr} и T_{chr} на съкращенията на препаратите от група 4 бяха близки до същите, регистрирани в контролната група.

Таблица 4.13. Времеви параметри на Анг II – индуцирани съкращения на препарати от **ректум** на: здрави животни (1); животни с индуциран ЗД (2); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с МЛТ (3); животни с индуциран ЗД, третирани допълнително с ГР (4);

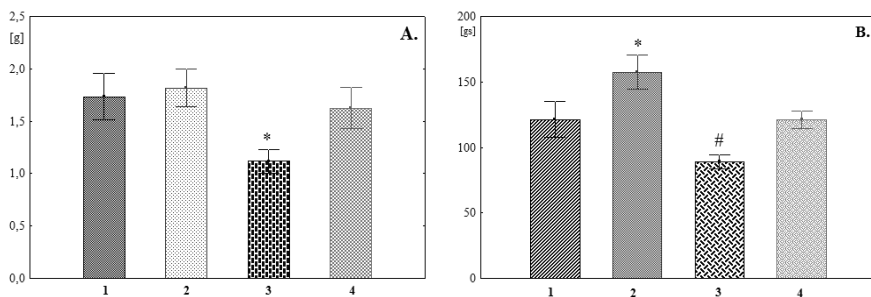
Група	T_{hc} (s)	T_c (s)	T_{hr} (s)	T_{chr} (s)
1	9.58 ± 1.52	39.74 ± 3.23	47.29 ± 5.74	88.64 ± 7.83
2	13.50 ± 0.92	44.33 ± 4.83	50.50 ± 4.14	94.83 ± 5.73
3	12.17 ± 1.40	42.32 ± 3.95	$72.67 \pm 2.01^{\#}$	$115.02 \pm 5.77^{\$}$
4	$8.33 \pm 0.76^*$	$29.00 \pm 2.98^{\$}$	53.17 ± 5.66	82.17 ± 6.44

* $P < 0.05$ спрямо T_{hc} на останалите групи $^{\$}P < 0.05$ спрямо T_c на останалите групи

$^{\#} P < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите групи $^{\$} P < 0.05$ спрямо T_{chr} на останалите групи

Препарати от пикочен мехур

Приложението на Анг II върху препаратите от пикочен мехур на животните от контролната група и група 4 предизвикваше сходни по силови параметри отговори с амплитуда съответно 1.74 ± 0.22 g и 1.63 ± 0.19 g и AUC съответно 121.13 ± 13.73 gs и 121.11 ± 6.96 gs. Амплитудата на Анг II-предизвиканите съкращения на препаратите от група 2 (1.81 ± 0.18 g) не се различаваше статистически от горепосочените, но интегралната сила беше значително по-висока (157.43 ± 13.13 gs). Препаратите от група 3 реагираха най-слабо на Анг II (амплитуда 1.12 ± 0.11 g и AUC 88.93 ± 5.40 gs) (Фиг.4.14).



Фигура 4.14. Амплитуда (А.) и интегрална сила (В.) на Анг II - индуцирани съкращения на препарати от **пикочен мехур** на: здрави животни (1); животни с експериментално индуциран ЗД (2); животни с индуциран ЗД, третиран допълнително с МЛТ (3); животни с индуциран ЗД, третиран допълнително с ГР (4);

А.* $P < 0.05$ спрямо амплитудата на съкращение на останалите групи препарати

В. * $P < 0.05$ спрямо AUC на съкращенията на останалите групи препарати
$P < 0.05$ спрямо AUC на съкращенията на останалите групи препарати

При сравняване на съкращенията по времеви параметри (Табл. 4.14)

се вижда, че Анг II-предизвиканите отговори и на четирите групи препарати имат сходство в достигане на показателя T_{hc} . Достигането на показателите T_c и T_{chr} обаче, беше значително забавено при съкращенията на препаратите от група 2 и група 4. Правеше впечатление изключително краткото време за достигане на T_{hr} при съкращението на препаратите от група 3.

Таблица 4.14. Времеви параметри на Анг II – индуцирани съкращения на препарати от **пикочен мехур** на: здрави животни (1); животни с индуциран ЗД (2); животни с индуциран ЗД, третиран допълнително с МЛТ (3); животни с индуциран ЗД, третиран допълнително с ГР (4);

Група	T_{hc} (s)	T_c (s)	T_{hr} (s)	T_{chr} (s)
1	13.28 ± 1.69	33.00 ± 3.14	50.28 ± 5.14	83.00 ± 6.95
2	14.00 ± 2.78	$60.71 \pm 8.46^*$	61.71 ± 6.58	122.43 ± 7.89
3	13.33 ± 1.45	39.67 ± 4.59	30.60 ± 2.66^s	$67.33 \pm 3.88^{\#}$
4	19.50 ± 4.88	$51.67 \pm 7.14^*$	63.67 ± 4.94	115.33 ± 7.98

* $P < 0.05$ спрямо T_c на останалите групи $^sP < 0.05$ спрямо T_{hr} на останалите групи $^{\#}P < 0.05$ спрямо T_{chr} на останалите групи

V. ДИСКУСИЯ

Анг II – индуцирана съкратителна активност на препарати от висцерална гладка мускулатура на здрави плъхове

В проведените експерименти, включващи въздействие с Анг II, прилаган по не-кумулятивен начин върху препарати от висцерална гладка мускулатура, се установи различен по степен съкратителен отговор към пептида, в зависимост от изследвания препарат и прилаганите концентрации. Този резултат е в съгласие с изследователите, които съобщават за реакция на гладко-мускулната тъкан към Анг II по начин, който зависи от концентрацията (Leung et al., 1993; Andersson & Arner, 2004; Fan et al., 2002; Ewert et al., 2006).

Често в проучването на Анг II-индуцираните ГМ съкращения се използват т.нар. криви концентрация-отговор, получени на база кумулативно приложение на пептида върху изследваните тъкани (Hawcock & Barnes, 1993; Leung et al., 1993; Shimuta et al., 1999; Fan et al., 2002; Ewert et al., 2006). Този метод на установяване на максималния отговор към Анг II показва известно неудобство, свързано с развитието на тахифилаксия на изолираните ГМ тъкани към Анг II. Това би трябвало да се има предвид при изучаване ефектите на Анг II, когато се извършват чести въздействия с различни концентрации на пептида.

За да избегнем десенситизация към Анг II, ние предпочетохме да въздействаме еднократно на всеки препарат с определена концентрация от пептида. По този начин целяхме да установим предизвикващата максимален или близък до максималния отговор концентрация на Анг II, която да бъде прилагана в следващите изследвания. В хода на направените от нас експерименти с концентрации от 10^{-8} до 10^{-5} М Анг II, установихме развитие на максимален по амплитуда отговор след приложение на 10^{-6} М от пептида. Получените резултати са в съгласие с данните от наличната към момента литература, касаещи максималната ефективна концентрация на Анг II.

Сравнение на ефектите на 10^{-6} М Анг II върху отделни видове препарати от висцерална гладка мускулатура

При проведените от нас експерименти с прилагане на 10^{-6} М Анг II върху изолирани препарати от здрави плъхове, се потвърдиха наличните в литературата данни за съкратителния ефект, който притежава този пептид върху висцералната гладка мускулатура (Shimuta et al., 1999; Andersson & Agner, 2004). Многостранните действия на Анг II са медирирани посредством сложни, интрацелуларни сигнални пътища, които се включват след като пептидът се свърже със специфичния си рецептор. Сложността в ефектите на Анг II се състои също и в това, че Анг II осъществява действията си както по директен път чрез специфичните си рецептори, така също индиректно посредством освобождаване на други фактори и чрез взаимодействие с вътреклетъчните сигнални пътища на други вазоактивни агенти, растежни фактори и цитокини (Touyz & Berry, 2002). Времевите и пространствени характеристики на включените сигнални пътища от Анг II са вероятно определящи за съответния функционален отговор в дадената тъкан. Установено е, че активирането на различни сигнални трансдукционни вериги от Анг II зависи от времето, като най-бързо е включването на G-протеин зависимите сигнални пътища и генерирането на IP_3 . Нещо повече, структурни модификации в рецепторите за Анг II и локалният характер на тъканите изглежда също имат значение за крайните ефекти на Анг II-сигнализацията (Mehta & Griendling, 2007).

По данни на Shimuta и сътр. (1999), дори в препарати от различните ГМ слоеве (циркуларен и лонгитудинален) на един и същ орган (илеум) отговорът към Анг II е бил различен. Същите автори изказват хипотезата, че сигналните механизми, въввлечени в отговорите към Анг II са разнообразни и че във всеки един вид гладка мускулатура пътищата за мобилизиране на Ca^{2+} са различни. В проучване на Fan и сътр. (2002) са разгледани детайлно ефектите на Анг II върху ГМ циркуларни препарати, изолирани от различни отдели на ГИ тракт на плъх, опосум и заек.

Авторите заключават, че реакцията към Анг II е не само видово, но и тъканно специфична.

При проведените от нас експерименти с изолирани препарати от стомах, черва и пикочен мехур на плъхове, също бяха установени разлики в отговора към Анг II. Въпреки че изследваната висцерална мускулатура беше от сравнително немалък брой органи (общо 6), и въз основа на гореизложеното, фактът, че работихме с лонгитудинални препарати, изолирани от органите на един животински вид вероятно обяснява малката вариация в отговора към пептида. На практика, при сравняване на Анг II (10^{-6} M)-предизвиканите ГМ съкращения беше установено разделение на две групи, ясно различаващи се както по силови, така и по времеви параметри. По отношение на силовите характеристики (амплитуда и AUC), се оформиха групите: 1) по-слаби съкращения на препарати от тънко черво и пикочен мехур; 2) по-силни съкращения на препарати от дебело черво. Установените разлики биха могли да се обяснят с различната функция, която изпълняват изследваните органи: тънкото черво и пикочният мехур изтласкват течностна маса, докато дебелото черво – обособена по-твърда маса. Интересно беше, че Анг II-предизвиканите отговори на препаратите от стомах по амплитуда бяха сходни с тези на групата тънко черво-пикочен мехур, а по AUC - с тези на групата на дебелото черво. Тези наблюдавани разлики в силовите отговори са в съгласие с разсъжденията на Fan и сътр. (2002) и Cat & Touyz (2011), относно съществуването на множество вътреклетъчни сигнални пътища активирани от Анг II, което предполага различни алтернативни клетъчни механизми за развитие и поддържане на ГМ съкращения. Може би всеки сигнален път изпълнява някаква роля за медиацията на Анг II-индуцираната активност, като вероятно един е основният трансдукционен механизъм и според съществуващото взаимодействие между него и останалите, е и съответният гладко-мускулен отговор в препаратите от различните области.

Проведеното от нас задълбочено изучаване на предизвиканите с Анг II съкращения, касаещо анализ по времеви параметри, разкри много интересни резултати. Отговорите на ГМ препарати отново се разделиха на две групи: 1) по-бързи съкращения на препарати от черва и пикочен мехур; 2) по-бавни съкращения на препарати от стомах. За отбелязване е, че и по тези критерии на сравнение, двигателната активност на препаратите от стомах отново показва по-различна характеристика. Установеното бавно протичащо стомашно съкращение е във връзка със силовите параметри и обяснява наблюдавания от нас асинхрон: голяма интегрална сила/малката амплитуда на съкращенията на препаратите от този орган. Увеличената AUC при отговора на препаратите от стомах явно се дължи на по-продължителното протичане на съкращението във времето и по-бавното му отшумяване. Тези особености на Анг II–медираното съкращение на стомаха отчасти биха могли да се обяснят и с факта, че при изработването на препаратите в нашата експериментална лаборатория съгласно утвърдена методика, препаратите от стомах се изготвяха без да бъде достиган мукозния слой на органа. На практика, изолираните препарати от стомаха бяха единствените от изследваните, които не съдържаха лигавица. Установено е, че рецептори за Анг II са експресирани и в мукозата на ГИ тракт. Съществува информация, че тяхната функция е свързана с повлияване на резорбцията на Na^+ и вода, секреция на бикарбонат в тънките черва, главно посредством продукция на NO (De Gasparo et al., 2000; Ewert et al., 2003; Fändriks, 2010). Въпреки че към настоящия момент няма доказателства в подкрепа на тази хипотеза, би могло да се спекулира, че е възможно липсата на мукоза в стомашните препарати, да ги „лишава“ от действието на Анг II върху тази част от стената на органа и от локална продукция на NO, затова релаксацията е затруднена и съкращението, особено във фазата на релаксация (отчетена в значително увеличения параметър T_{hr}), да протича толкова бавно.

В този аспект трябва да отбележим, че и реакцията на препаратите от илеум също се отличаваше със забавена релаксация (T_{hr}) и оттам – забавено цялостно време (T_{chr}) за развитието на Анг II -индуцираното гладко-мускулно съкращение. Препаратите от илеум обаче, както и всички останали чревни препарати, бяха дисецирани така, че съдържаха интактна мукоза. Ето защо горенаправените разсъждения относно релаксацията на стомашните препарати, не биха могли да бъдат съотнесени към реакцията на препаратите от илеум. Регистрираното от нас характерно протичане на Анг II-предизвиканото съкращение на препаратите от илеум е в съгласие със Silva и сътр. (1999), които съобщават за двуфазен съкратителен отговор на илеума към Анг II - бързо и преходно увеличение на тонуса (фазичен компонент), последвано от частична релаксация на тъканта до поддържане на едно ниво на тонуса (тоничен компонент). Според Leung и сътр. (1993), съкратителните отговори към Анг II на лонгитудиналния мускулен слой на илеума са резултат както от директно действие на пептида върху рецептори на ГМ клетки, така и от включване на холинергичен компонент – активиране на рецептори от холинергичните терминали на миентеричния плексус. Същите автори подкрепят хипотезата си с това, че в присъствие на атропин, индуцираните с Анг II съкращения са били с по-бавно развитие в началото. Silva и сътр. (1999) предполагат, че отговорът на илеума към Анг II е резултат от баланс между активираните/инхибираните от пептида волтаж-зависими канали.

При анализа на механизмите на действие на Анг II върху висцералната гладка мускулатура не бива да се пропуска становището, че този пептид участва в модулирането на различни йонни потоци, в резултат на което настъпват промени в мембрания потенциал. Това включва комплексни механизми, замесващи както различни сигнални пътища, така и няколко вида йонни канали. Йонните канали в гладката мускулатура изпълняват две важни функции: първо, контролират мембрания потенциал и второ, позволявайки преминаването на някои йони, директно са

въвлечени както в съкратителния процес, така и в контрола на активността на някои протеини и ензими (Chorvatova et al., 1996).

Данните, касаещи ефекта на Анг II върху калиевите потоци в различните ГМ клетки, са противоречиви. Получените от нас резултати по отношение съкратителния отговор към Анг II на препаратите от илеум, предполага по-скоро блокиране, отколкото активиране на K^{+} -каналите. Това би било възможно, като се има предвид наличната до момента информация за противоположното действие на Анг II върху различните видове K^{+} -каналите. Тези разлики показват голямата сложност на сигналната трансдукционна система, активирана от този пептид, която най-вероятно е различна в съдовата и висцералната гладка мускулатура, а също е и видово специфична. Лу и сътр. (2011) установяват, че в стомаха Анг II може да блокира закъсняващите изправителни K^{+} -каналите, което предизвиква удължаване на деполяризацията и е въвлечено в потенцирането на ГМ съкращение. Тези данни са в съгласие с регистрирания от нас продължителен отговор, наблюдаван при Анг II-стимулирани препарати от стомах. Получените от нас резултати за стомашната контракция намират потвърждение и от установената важна контролна роля на закъсняващите изправителни K^{+} -каналите за релаксацията на предварително съкратената стомашна гладка мускулатура (Curgò, 2014).

Не на последно място трябва да се подчертае, че активирането на сигналните пътища и модулирането на йонните потоци от Анг II, е следствие от свързването на пептида със специфичните за него рецептори – AT1 и AT2. Ето защо силата на отговора към Анг II в дадената тъкан зависи от съотношението и от експресията им. За да установим ролята на всеки от субтипозите рецептори при осъществяване на Анг II-индуцираните контракции, в следващия етап от нашето изследване, ние извършихме поотделно блокада на AT1 и AT2 рецепторите и сравнихме получените отговори към Анг II.

Анг II рецепторна блокада: промяна в развитието на Анг II - индуцираните съкращения на препарати от висцерална гладка мускулатура при предварително приложение на селективните инхибитори PD 123319 и Losartan

Болшинството от авторите приписват ефектите на Анг II, касаещи стимулирането на съкратителната активност на гладката мускулатура, на свързването му с AT1 рецепторите, които медиат главно възбудни явления (Hawcock & Barnes, 1993; Fan et al., 2002; Fändriks, 2010). От друга страна се предполага, че активацията на AT2 рецепторите противодейства на повечето от ефектите, предизвикани от Анг II посредством AT1 рецепторите (De Godoy & De Oliveira, 2002; Rattan et al., 2003; De Godoy et al., 2004). Ето защо, когато AT1 рецепторите са блокирани и AT2 са свободни да взаимодействат с Анг II, AT2-медираните ефекти стават доминиращи (Rattan et al., 2003; De Godoy et al. 2004) и биха могли да се проявят и изследват. Тъй като Анг II проявява еднакъв афинитет на свързване както с AT1, така и с AT2, то реакцията на дадената тъкан към този пептид в голяма степен се определя от отговора и на двата типа рецептори (Nouet & Nahmias 2000).

Стомах и пикочен мехур

Интересно за отбелязване е, че промяната в отговора към Анг II на препаратите от стомах и пикочен мехур след блокирането на единия или другия тип рецептори беше сходна: AT2 рецепторната блокада водеше до развитие на значителни по сила съкращения, докато AT1 блокадата ги потискаше в голяма степен. Тези резултати са в съгласие с наличните до момента данни за стомах и пикочен мехур, и потвърждават водещата роля на AT1 рецепторите за развитието на Анг II-индуцираните отговори в тези органи. В проучване от 1993 г. на Leung и сътр., категорично се изказва заключението, че AT2 рецепторите нямат функционална роля за храносмилателния тракт. В същото проучване авторите установяват, че

съкратителният отговор към Анг II при препарати от стомашен фундус се осъществява директно от AT1 рецепторите, разположени в ГМ клетки и не включва участието на ЕНС. В експерименти с препарати от пикочен мехур на възрастни хора и деца, Lam и сътр. (2000) не установяват зависимости от възрастта разлики в отговора към Анг II, както и не установяват наличие и участие на AT2 рецептори в този отговор. Andersson & Arner (2004) обобщават, че в препарати от човешки детрузор, отговорите към Анг II са били антагонизирани от Losartan, но не и от PD 123319, което показва взаимодействие на пептида само с AT1 рецепторите.

Като се имат предвид доказателствата в полза на AT1 рецепторите за развитието на съкращенията на стомах и пикочен мехур, то при прилагане на AT2 блокада не би следвало да има промяна на гладко-мускулния отговор към Анг II. Фактът, че ние регистрирахме повишаване на силата на съкращение в присъствие на селективния блокатор PD 123319, насочва към размисли за някакво допълнително, антагонистично участие на AT2 рецепторите или на активни метаболити на Анг II, в отговора на препаратите от стомах и пикочен мехур към този пептид. В подкрепа на тази идея за реципрочни взаимодействия между AT1 и AT2 рецепторите са съвсем нови изследвания на Mogi и сътр. (2015), в които се съобщава за повишена експресия на AT2 рецепторите в детрузор на свръхактивен пикочен мехур на плъхове, което според авторите е начин за противодействие на повишената активност на AT1 рецепторите, известна при това състояние. В изследване на Andresen и сътр. (2005) в клетъчни култури от гломеруларни съдови клетки е установено инхибиране на AT1-рецепторната сигнализация от AT2 рецепторите. Авторите посочват, че AT2 рецепторите блокират AT1-медираната активация на PLD посредством NO/cGMP-механизъм. По този начин AT2 рецепторите не действат просто като антагонисти на AT1-медираните функции, но са независими рецептори с важна съдова сигнализация.

Bosnyak и сътр. (2011) установяват, че по-късите ангиотензинови пептиди, формирани от разпадането на Анг II, могат да изпълняват роля на ендогенни лиганди за AT2 рецепторите. В проведените експерименти с клетъчни култури на бъбрек, авторите съобщават, че Ангиотензин III, Ангиотензин IV и Ангиотензин (1-7) проявяват значителна селективност към AT2 в сравнение с AT1.

Всички тези данни дават насоки към обмисляне на евентуалното участие на AT2 рецепторите или на други локално формирани активни Анг II фрагменти, за цялостния контрактилен процес на стомаха и пикочния мехур. Получените от нас резултати свидетелстват за противоположно действие на AT2 рецепторите спрямо AT1 рецепторите в развитието на съкратителния процес в тези органи.

Тънко черво

В проведените от нас експерименти, препаратите от йеюnum бяха единствените, при които блокирането на AT1 рецепторите доведе до пълно потискане на отговора към Анг II. Водещата роля на този субтип рецептори е потвърдена и при изследване на Анг II-предизвикани съкращения на препарати от йеюnum на човек, проведено от Spak и сътр. (2008). Същевременно е открита експресия и на двата субтипа рецептори в миентеричния плексус на изследваните препарати. Прилагането на холинолитици и анти-адренергични средства не понижава отговора към Анг II на йеюналната мускулатура, което показва директно взаимодействие на Анг II с AT1 рецепторите от гладко-мускулните клетки. (Spak et al., 2008). По данни на Malinauskas и сътр. (2014), в гладката мускулатура на йеюnum са експресирани всички ензими, необходими за разграждането на Анг II до Анг IV. Същите автори установяват, че Анг IV упражнява контрактилни ефекти върху препарати от йеюnum, медиирани главно посредством AT1 рецепторите.

Регистрираният от нас понижен отговор към Анг II в присъствие на PD 123319 показва, че е вероятно AT2 рецепторите да допринасят до известна степен за цялостния Анг II-медиран съкратителен процес на йеюума. По какъв начин обаче се осъществява това, към настоящия момент много трудно бихме могли да дадем обяснение. В изследвания върху препарати от йеюум на свине, Ewert и сътр. (2003) описват експресирани в мукозата AT2 рецептори, чието активиране води до локална продукция на NO. Физиологичната роля на този субтип рецептори обаче се свързва по-скоро с участие в контролирането на секреторните функции на йеюума (Ewert et al., 2003; Fändriks, 2010). По данни на Paul и сътр. (2006), плътността на рецепторите за Анг II е сравнително ниска в йеюума, в сравнение с илеума и дебелото черво. Вероятно това също трябва да се вземе предвид при търсене на обяснение за получените от нас резултати.

В опити с препарати от илеум на плъх и човек, Ewert и сътр. (2006) намират, че Анг II предизвиква съкращения посредством AT1 рецепторите, докато AT2 рецепторите не са въввлечени в съкратителния отговор. Тези данни потвърждават установеното от Hawcock & Barnes, (1993) и Shimuta и сътр. (1998), че отговорът на илеума към Анг II се дължи на AT1 рецепторите. Това обаче е в противоречие с получените в хода на нашите експерименти резултати: блокирането на AT1 рецепторите в препаратите от илеум водеше до развитие на съкращения със същата сила, с каквато бяха и тези със самостоятелно приложен Анг II. Тези резултати дават насока за спекулиране с евентуално участие на AT2 рецепторите в съкратителния процес. Интересно е, в каква насока същите рецептори повлияват цялостното Анг II-медирано съкращение, щом блокирането им води до повишена сила на контракцията? Според Fändriks (2010), AT2 рецептори не са установени в директна връзка с ГМ клетки, но от друга страна е описано наличието на такива рецептори в миентеричния плексус. Вероятно AT2 рецепторите по миентералните неврони са активни само в

пре-контрахирана мускулатура или в мускулатура с висок базален тонус, каквато е тази на сфинктерите (Fändriks, 2010). Информацията за евентуално участие на невронална мрежа в отговора към този пептид е противоречива. Като се знае, че холинергичните стимулиращи и адренергичните инхибиращи неврони регулират интестиналната мускулна активност е очаквано да се предполага, че Анг II би оказал влияние върху гладката мускулатура посредством връзка с тези неврони (Ewert et al., 2006). Hawcock & Barnes (1993) заключават, че в Анг II-медиацията съкратителен отговор на илеума участие вземат и AT1 рецептори, експресирани върху ЕНС. В своите изследвания Ewert и сътр. (2006) установяват експресия и на двата субтипа рецептори в миентеричния плексус на препарати от илеум на плъх. Същевременно, нито приложението на адренолитици, нито на холинолитици, е оказало влияние върху Анг II-медианите съкращения. Твърде вероятно е част от съкратителните отговори към Анг II да се медиират именно посредством NANC-неврони от ЕНС, експресиращи AT2 рецептори по повърхността си. Увеличената сила на отговора към Анг II при блокиране на AT2 рецепторите също насочва към размисли, свързани с взаимодействие между двата субтипа рецептори. По данни на Paul и сътр. (2006), AT1 и AT2 рецептори са установени и в лигавицата на тънкото черво, също и локална експресия на повечето от ензимите на PAC. Това дава насока за предполагане на евентуално взаимодействие между рецепторите в лигавицата, миентеричния плексус и гладката мускулатура на илеума.

Дебело черво

Интересното при блокадата на Анг II рецепторите в препаратите от колон беше, че независимо дали прилагаме самостоятелно Анг II или след предварително аплициран AT2 блокатор, разлики в силовите характеристики на регистрираните съкращения не бяха наблюдавани. Тези резултати са в съгласие с Mastropaolo и сътр. (2013), които установяват, че

приложението на PD 123319 не повлиява Анг II-индуцираните съкращения на препарати от колон на мишки. Същите автори обаче правят своето заключение на базата на регистрирани криви концентрация-отговор в присъствие/отсъствие на специфични блокатори за Анг II рецепторите и изследват получения отговор единствено чрез характеристика на амплитудата на съкращение. При направения от нас обхванат анализ по времеви параметри бяха установени различия във фазите на протичане на съкратителния процес: при блокиране на AT2 рецепторите фазата на релаксация представляваше твърде голяма част от целия процес, докато параметрите, характеризиращи фазата на съкращение (T_{hc} и T_c) бяха значително скъсени. Вероятно AT2 рецепторите имат отношение не толкова за силата, колкото за времето на развитие на Анг II-индуцираните съкращения в колона. Това предположение бе потвърдено до голяма степен при анализа на Анг II-предизвиканите отговори, получени в присъствие на Losartan: блокадата на AT1 рецепторите доведе до развитие на нискоамплитудни и продължителни във времето съкращения. Точно противоположно на Анг II-индуцираните съкращения при приложен AT2 блокатор, при тези с AT1 блокада беше забавено достигането на T_c , което беше отчетливо изразено както в абсолютните, така и в нормализираните времеви параметри.

Получените от нас резултати насочват към възможно взаимодействие между двата типа рецептори в колона, касаещо не толкова силата, колкото развитието на отговора към Анг II във времето. Твърде вероятно е в колона да съществуват конкурентни взаимоотношения между AT1 и AT2 рецепторите. За разлика от направените разсъждения относно противодействието между AT1 и AT2 в стомах и пикочен мехур, в препаратите от колон е възможно конкурентните взаимоотношения между рецепторите да са определящи за продължителността на Анг II - предизвиканите контракции в този чревен сегмент. Подобно взаимодействие е описано за адренергични неврони от мозъка, в които

степената на освободения медиатор се определя от преобладаването на единия тип рецептори спрямо другия. В крайна сметка, взаимодействието между AT1 и AT2 може да има значителна роля за физиологичните ефекти на Анг II (De Gasparo & Siragy, 1999).

За съжаление, твърде малко изследователи са насочили своя интерес към проучване на дисталните отдели от ГИ тракт и в частност на ректум. Наличните към момента литературни източници дават информация относно ефектите на Анг II и ролята на AT1 и AT2 рецепторите главно за вътрешния анален сфинктер (De Godoy et al., 2004; De Godoy & Rattan, 2006). По-рядко се срещат данни, касаещи ректума, като изследванията са проведени върху препарати от циркуларния слой (Fan et al., 2002). Въпреки липсата на информация за ролята на AT1 и AT2 рецепторите за Анг II-предизвиканите съкращения на лонгитудинални препарати от ректум, бихме могли да се позовем на част от съществуващите към момента в литературата данни за вътрешния анален сфинктер, поради близостта му с ректалната гладка мускулатура.

При блокирането на AT2 рецепторите, активни за свързване с Анг II остават само AT1. Съгласно наличните литературни данни, че тези рецептори опосредстват контрактилния ефект на Анг II върху гладката мускулатура, би следвало да има изява на много мощен Анг II-индуциран отговор. Вместо това, ние регистрирахме ниско амплитудно, показващо тенденция за намаляване на интегралната сила и със забавени времеви параметри съкращение. Възможните причини, свързани с получаването на тези резултати, вероятно са комплексни. Според изследване на De Godoy & Rattan (2006), касаещо вътрешния анален сфинктер, високите дози Анг II водят до бърза интернализация на AT1 рецепторите в цитозола, последвано от екстернализация на AT2 рецепторите в клетъчната мембрана. При предварително приложен блокатор PD 123319 обаче, няма как тези екстернализирани AT2 рецептори да участват в отговора към Анг II. В гладката мускулатура на вътрешния анален сфинктер, De Godoy и сътр.

(2004) доказват наличие на всички компоненти на PAC, в това число и ензимите ACE, APA и APN. В тази област същите автори установяват и алтернативен път за разграждане на Анг II, осъществяван от APN. Полученият фрагмент – Ангиотензин (1-7), намалява тонуса на сфинктера посредством взаимодействие с рецептор, различен от AT₂.

От друга страна, при прилагане на PD 123319, значително удължения T_{hr} на съкращенията на препаратите от ректум свидетелства за ролята на AT₂ рецепторите за релаксацията в гладко-мускулния процес. Това беше потвърдено при блокиране на AT₁ рецепторите, където регистрираните Анг II-предизвикани ректални съкращения бяха с бързо настъпваща фаза на релаксация. Според De Gasparo & Siragy (1999), AT₁ блокадата е свързана с повишен афинитет за свързване на Анг II към AT₂ рецепторите. Подобна увеличена активация на AT₂ може да бъде обяснение за установената от нас ускорена релаксация на препаратите от ректум. Това е в съгласие и с De Godoy and Rattan (2006), които установяват, че активацията на AT₂ рецепторите води до релаксация на вътрешния анален сфинктер. От друга страна, намалените силови характеристики на Анг II-предизвиканите съкращения на препаратите от ректум в присъствие на Losartan, биха могли да се дължат също на активацията на AT₂ рецепторите. В препарати от гладка мускулатура от вътрешен анален сфинктер De Godoy и сътр. (2004) установяват, че високите дози на Анг II водят до намаляване на съкратителния отговор, вероятно поради активиране на AT₂ рецепторите, тъй като този ефект е бил блокиран от предварително приложен PD 123319.

Интересно за отбелязване е, че при AT₁ блокадата, както и при AT₂ блокадата параметрите T_c и T_{hc} бяха удължени. Това предполага наличието на някакъв допълнителен път, който може би се активира при блокиране на рецепторите и води до формиране на активен пептид, невзаимодействащ нито с AT₁ нито с AT₂ рецепторите. Тъй като във вътрешния анален сфинктер са намерени всички компоненти на PAC (De Godoy et al., 2004), може да се предполага, че и в гладката мускулатура на ректума

съществуват същите ензими, разграждащи Анг II до фрагменти, осъществяващи действието си посредством други рецептори. Това значително би забавило протичането на нормалната Анг II-индуцирана съкратителна активност.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ИНДУЦИРАН ЗАХАРЕН ДИАБЕТ

В проведените експерименти от втория етап на изследването, включващи индукция на захарен диабет (ЗД), установихме съществени промени в изследваните показатели на третираните със STZ опитни животни. Промяната в телесната маса, плазмените нива на глюкозата, гликирания хемоглобин и нивата на С-пептид в кръвната плазма свидетелстват за нарушена β -клетъчна функция на панкреаса на диабетните животни. Получените от нас резултати по тези показатели при животните от група 2 са в съответствие с болшинството от изследователите, които установяват загуба на телесна маса, хипергликемия и намалени инсулинови нива при гризачи със STZ-индуциран ЗД (Vural et al., 2001; Irako et al., 2006; Guven et al., 2006; Izbéki et al., 2008; Granata et al., 2010). С краткосрочното прилагане на МЛТ (при група 3) и ГР (при група 4), веднага след индукцията на диабета, целяхме да установим наличие на евентуално протективно действие както по отношение на биохимичните и анатомо-физиологичните показатели на опитните животни, така и по отношение на Анг II-стимулираната гладко-мускулна активност.

Регистрираните от нас стойности на кръвната захар при диабетните животни, третирани допълнителни с МЛТ, са в съгласие с проучванията на Guven и сътр. (2006) и Vural и сътр. (2001), които също не установяват предотвратяване развитието на хипергликемия дори при по-продължително прилагане на МЛТ за по-дълъг период експериментален период. Въз основа на това Vural и сътр. (2001) заключават, че е твърде вероятно МЛТ да не упражнява ефект върху хипергликемията при диабетните животни. Вероятната причина за това е, че β -клетките на панкреаса вече са били

разрушени от STZ и това увреждане явно се оказва необратимо. Въпреки това, установените от авторите ниски нива на липидно перокисление при диабетните животни, третирани с МЛТ, са белег, че прилагането на МЛТ намалява образуването на ROS, независимо от персистиращата хипергликемия. По данни на Peschke и сътр. (2008), третирането с МЛТ при STZ-индуциран диабет предизвиква леко увеличение на понижения серумен инсулин и малка, частична регенерация/пролиферация на β -клетките в панкреаса. Авторите смятат, че някои от протективните действия на МЛТ могат да се изразяват посредством възпрепятстване на разрушаването на ДНК при β -клетъчното унищожение, предизвикано от STZ. Тези твърдения се подкрепят и от установените от нас по-високи стойности на С-пептид в кръвната плазма на третираните с МЛТ диабетни животни, които са свидетелство за съхранена β -клетъчна функция. Освен това, опитните животни от група 3 не показаха загуба на телесна маса и съхраниха телесното си тегло, за разлика от установеното от Vural и сътр. (2001).

Същевременно, отчетените от нас кръвно-захарни нива при диабетните животни, третирани допълнителни с ГР, се различават от тези на Irago и сътр. (2006) и Granata и сътр. (2010), които съобщават, че третирането с ГР при диабетните животни е допринесло за възстановяване на кръвната захар до нива, сходни с тези на контролните животни. Вероятната причина за този дисонанс в получените от нас и от цитираните автори резултати, се дължи на различния дизайн на експериментите и възрастта на избраните опитни животни. Авторите са проследили промените за срок от 70 дни, докато нашият експеримент продължи 42 дни. Въпреки това, отчетените при третираните с ГР животни значително по-ниски нива на кръвната захар, още на 72-я час от индукцията на диабета, както и в края на експеримента, показват тенденция към възвръщане на плазмената глюкоза до изходни стойности. Според Irago и сътр. (2006), ГР подпомага регенерацията на β -клетките при третирани със STZ новородени

плъхчета, което повишава инсулиновата експресия в панкреаса и води до нормализиране на плазмените инсулинови нива. Установените от нас по-високи стойности на С-пептид в кръвната плазма на третираните с ГР диабетни животни, свидетелстват за съхранена β -клетъчна функция, което отчасти потвърждава резултатите на Iwako и сътр. (2006). Освен това, опитните животни от група 4 съхраниха телесното си тегло, което е в съгласие с отчетеното от Granata и съавт. (2010).

Благодарение на известното протективното действие на МЛТ и ГР върху панкреаса е възможно в хода на проведените от нас експерименти, запазените β -клетки да секретират компенсаторно повече инсулин, което се изразява в отчетените от нас по-високи плазмени нива на С-пептид, в сравнение с контролите. Вероятно в резултат на това и телесната маса на диабетните животни, третирани с МЛТ или ГР, беше съхранена.

Влияние на захарния диабет върху Анг II-индуцираните съкращения на висцералната гладка мускулатура

Стомах

При препаратите от стомах на здравите и диабетните животни не се наблюдаваха разлики в силовите характеристики на отговорите към Анг II. Това е в съгласие с Bektaş & Öztürk (2012), които не установяват различия между холинергичните отговори на препарати от стомашен фундус на здрави плъхове и на плъхове със STZ-индуциран ЗД, продължил шест седмици. Вероятно както при пикочния мехур, така и при стомаха, 6-седмичния период след апликацията на STZ не е достатъчен, за да се появят и развият характерните промени във функцията на тези органи. Гастропарезата е едно от първите описани диабетни нарушения. Тя се определя като много забавено евакуиране на твърдите хранителни частици от стомаха, без да съществуват механични причини за това. Освен това, гастропарезата е усложнение, наблюдавано при около 30% от пациентите с напреднал ЗД (Horváth et al., 2014). Установените от нас ускорени времеви

параметри както на съкращение (T_{hc}), така и на релаксация (T_{hr}) на Анг II-индуцираната стомашна контракция на диабетните животни, свидетелстват за едно по-бързо протичане на Анг II-предизвикания съкратителен процес на стомаха при ЗД. Тези резултати са в съгласие с дискутираната от много автори ускорена стомашна евакуаторна функция при ЗД (Ebert, 2005; Szarka & Camilleri, 2010; Horváth et al., 2014). Известно е, че ЗД може да доведе до няколко различни смущения в стомашната двигателна активност. В основата на тези нарушения стоят хипергликемията и причинението от нея невропатия, увреждане на пейсмейкърните клетки, и вероятно миопатията (Szarka & Camilleri, 2010). Според Horváth и сътр. (2014), възможно е това ускорено изпразване на стомаха да е предварителна фаза от по-късно наблюдаваната забавена стомашна евакуация. По данни на He и сътр. (2014), Анг II също има участие в патогенезата на диабетната гастропатия. Авторите съобщават, че при пациентите със ЗД активността на PAC и в частност тази на Анг II, е повишена. Анг II стимулира адипоцитите да отделят лептин, което води до гастропареза. Приложението на AT1 селективен блокатор облекчава забавената стомашна евакуация, което е свързано с намаляване на серумните нива на лептина и подобряване на микроциркулацията в стомаха.

Тънко и дебело черво

Съгласно Yarandi & Srinivasan (2014), ефектите на ЗД върху мотилитета на тънкото и дебелото черво все още не са добре изучени. Общоприето е, че автономната невропатия е основният механизъм, отговорен за интестиналните усложнения при ЗД. Съществуват обаче предположения, че и други фактори, като смущения в ЕНС, в интерстициалните клетки на Cajal и в ГМ клетки, играят роля в патогенезата на диабетните GI смущения. В изследванията си Öztürk и сътр. (1996, 1997) установяват понижаване на калциевата чувствителност и намаление на нивата на калмодулин в интестиналните ГМ клетки. Авторите посочват, че тези нарушения са наблюдавани само при по-

продължително проследяване на експериментално индуцирания ЗД и не са характерни за краткосрочните модели на заболяването. Според Ebert (2005), смущенията в двигателната активност на червата и стомаха при ЗД не показват корелация помежду си. Например нарушения в тънкото черво могат да настъпят в по-късни етапи от развитието на заболяването, в сравнение с дебелото. Пасажът на хранителните маси през тънкото черво при ЗД може да бъде ускорен, нормален или забавен. Forgacs & Patel (2011) също посочват, че при ЗД няма точно установен модел на нарушена чревна съкратителна активност: някои пациенти имат забавен пасаж, докато при други той е ускорен. Авторите посочват, че етиологията за диабетната диария е мултифакторна, като основа роля има невропатията и нарушената резорбция на течности, последната вероятно свързана с нарушената адренергична сигнализация.

При проведените от нас експерименти върху препарати от чревна мускулатура на диабетни плъхове, отговорът към Анг II на тънкото черво значително се отличаваше от този на дебелото черво. Препаратите от йеюnum и илеум на диабетните животни показаха повишена реакция към пептида, докато тези от колон и ректум-намалена, в сравнение със съответните препарати от контролната група. Öztürk и сътр. (1997) също съобщават за нарушени съкратителни и релаксиращи отговори на диабетни гладки мускули от ГИ тракт. Намалени релаксиращи отговори към бета-рецепторни агонисти и намалени съкратителни отговори към серотонин в ГИ тракт са били наблюдавани като дългосрочни нарушения в резултат на заболяването. Тези промени се приписват на намаляване броя на бета-адренорецепторите и чувствителността на серотониновите рецептори в резултат на ЗД. В друго проучване, Öztürk и сътр. (1992) обобщават за наблюдавани промени в адренергичната, холинергичната, серотонинергичната и пептидергичната инервация на ГИ тракт при ЗД. Интересното е, че в нашите изследвания и препаратите от йеюnum, и тези от илеум от диабетната група животни развиха високо амплитудни

отговори към Анг II. Тези съкращения бяха по-скоростни при йеюнума, а по-мощни при илеума и свидетелстват за хиперактивност на гладката мускулатура на тези отдели от ГИ тракт към Анг II. За съжаление, към настоящия момент липсват литературни данни за проведени изследвания върху ролята на този пептид за мотилитета на тънкото черво при експериментално индуциран ЗД. Въпреки това, бихме могли да се позовем на резултатите на изследователите, които са проучили ефектите от въздействието с Анг II върху съдови ГМ клетки.

В изследвания върху гръдна аорта на STZ-третираните плъхове, Arun и сътр. (2005) наблюдават, че Анг II-индуцираните контракции се опосредстват от AT1 рецепторите и включват въвличане на екстрацелуларно навлизане на Ca^{2+} чрез активиране на L-тип Ca^{2+} -канални. Авторите подчертават, че функционалното свързване на пептида с рецептора е усилено при препаратите от диабетните животни, което вероятно е причина за наблюдаваната свръхчувствителност в отговора към Анг II. В друго изследване същият авторски колектив заключава, че хипергликемията е отговорна за увеличената сила на Анг II-медираните съкращения в съдовата мускулатура, като формирането на ROS допринася за този усилен отговор (Arun et al., 2004). В унисон са данните на Shi & Vanhoutte (2008) които съобщават, че хроничния ЗД и съпътстващия го оксидативен стрес активират продукцията на циклооксигеназно-формирани простагноиди, които от своя страна предизвикват хиперчувствителност на гладко-мускулните съдови клетки. Ето защо е твърде вероятно регистрираните от нас силни и бързи Анг II-индуцирани съкращения на тънките черва от диабетните животни да представляват своеобразен хиперреактивен гладко-мускулен отговор към Анг II, дължащ се на механизмите, описани при диабетната съдова гладка мускулатура.

Същевременно при анализа на съкращенията на препаратите от дебело черво на диабетните животни установихме точно противоположен отговор към Анг II: значително редуциране на силовите параметри на съкращенията

на препаратите от колон и ректум. Получените резултати са в съгласие с Touw и сътр. (2012), които съобщават за намалена двигателна активност на колон при диабетни мишки. В проведените от авторите изследвания е демонстрирано, че ЗД е свързан с намалено навлизане на Ca^{2+} в гладката мускулатура на колона, което води до понижено фосфорилиране на MLC и смутена съкратителна активност. Предполага се, че пътят на фосфорилиране на MLC вероятно се е десенситизирал към калциевата сигнализация или чрез активиране на MLCP или посредством инхибиране на MLCK. Основният дефект, който води до по-малко покачване на вътреклетъчната Ca^{2+} концентрация, е нарушение на L-типа Ca^{2+} -каналите, вероятно поради гликиране (Touw et al., 2012). По данни на Krishnan и сътр. (2013), механизмът на развитието на ГИ усложнения при ЗД е свързан с образуването и натрупването на крайни продукти на гликирането, които предизвикват увреждане на клетъчната ДНК. Авторите съобщават, че тези продукти са повишени в ганглиите, криптите и четковидния слой на йеюнума и илеума, както и в ганглиите на колона при животински модели на ЗД. Öztürk и сътр. (1997) също предполагат, че необратимото гликиране на калмодулина, често наблюдавано както в клинични случаи, така и при експериментално предизвикан диабет, може да доведе до дълготрайни промени в еластичността и целостта на гладката мускулатура на ГИ тракт. Това гликиране може да намали афинитета на CaM към актомиозина, което да доведе до намалени съкратителни отговори. В изследвания на Jancsó и сътр. (2015) е установено, че колонът е по-чувствителен в сравнение с тънкото черво към оксидативния стрес, причинен от ЗД. Проведената електронна микроскопия е демонстрирала наличие на тежки некрози в колона на диабетните плъхове. Въз основа на всички горепосочени твърдения, би било оправдано да предположим, че регистрираната от нас понижена активност на дебелото черво към Анг II е в резултат на настъпили сериозни, предизвикани от диабета промени в структурата на този орган.

Пикочен мехур

Подобно на препаратите от стомах, препаратите от пикочен мехур на контролната и диабетната група животни показаха сходни по амплитуда отговори към Анг II. Това е в съгласие с част от авторите, които установяват непроменена съкратителна активност към АЦХ на пикочни мехури от диабетни плъхове, в сравнение с контролите (Luheshi & Zar, 1991). По данни на Liu & Daneshgari (2014), при модели на диабет при малките гризачи, нарушенията в двигателната активност на пикочния мехур преминават от време-зависима прогресия с начална, компенсаторна хипертрофична фаза, до по-късна, декомпенсаторна или атонична фаза. Твърде вероятно е липсата на ясно установени от нас разлики в съкратителния отговор между препаратите от здрави и диабетни животни, да се дължи на все още ненастъпили или компенсирани промени в мускулатурата на пикочния мехур. Според Wang и сътр. (2009), промените в механичните характеристики на мехура по време на ЗД не се свеждат просто до повишаване на разтегливостта, но включват по-комплексни увреждания, касаещи съкратителната активност на този орган. Тъй като диабетните увреждания на мехура са резултат от комплексно тъканно реструктуриране, свързано с реорганизация на колагена, еластина и ГМ клетки по количество, ориентация и начин на взаимодействие, то тези увреждания се проявяват на по-късен етап (след 8-ма седмица) от експерименталната индукция на заболяването. Тези твърдения са в съгласие с Liu & Daneshgari (2014), които също посочват, че етиологията на смутената от диабета функция на мехура е мултифакторна, включваща нарушения в мускулатурата, автономните нерви и вероятно уротела. Контрактилните промени в пикочния мехур при ЗД са зависими от времето. При ранните етапи от индукцията на ЗД има противоречиви данни за двигателната активност на пикочния мехур: съобщава се за намалена,

непроменена или повишена активност на диабетните мехури към различни агенти, в сравнение с контролите (Liu & Daneshgari, 2014). Luheshi & Zar (1991) обясняват тези различия в отговора със състоянието на детрузора, което се определя от остротата и продължителността на експериментално индуцирания 3Д. Същите автори допускат, че холинергичните и не-холинергични компоненти при моторната трансмисия на детрузора действат в синхрон, така че ако настъпи частично отпадане на едните, се провокира компенсаторното усилване на другите.

Към момента няма проучвания, касаещи Анг II-индуцирания отговор на детрузора в условия на 3Д. В изследване на Tobu и сътр. (2012) върху STZ-индуциран 3Д при плъхове, е установена повишена експресия на AT1 рецепторите в ГМ клетки на пикочния мехур, която започва от 2-та седмица на индукцията и продължава до края на експерименталния период (8-ма седмица). Авторите смятат, че е много вероятно продължителната хипергликемия да активира локалната PAC в мехура. Как тази увеличена активност на PAC и експресията на повече AT1 рецептори допринася за съкратителната активност на пикочния мехур, не е изследвано. Фактът, че в нашите експерименти не установихме разлики в амплитудата на съкращение между препаратите от диабетни и здрави животни показва, че или такава промяна в експресията на рецептори не е настъпила, или ако има активиране на локалната PAC, то това е довело до формиране на други ангиотензинови фрагменти, които не взаимодействат с AT1 рецепторите.

Все пак, съпоставката по времеви параметри разкри различия в протичането на Анг II-индуцираните отговори при двете групи препарати. Съкращенията на препаратите от пикочен мехур на диабетните животни по-бавно достигаха времето за контракция (T_c), което водеше до по-удължено време за развитие на гладко-мускулния процес (T_{chr}) и увеличение на AUC. Тези, макар и на пръв поглед малки различия, насочват към предположения за настъпили в резултат на третирането със STZ не структурни, а функционални промени в пикочния мехур. В

подкрепя на това предположение са разсъжденията на Liu & Daneshgari (2014), според които увеличената активност на мехура при STZ-третираните животни вероятно е свързана с повишено освобождаване на медиатори, подобрена активност на Ca^{2+} -каналите или увеличена калциева чувствителност. Цитират се и други проучвания, в които е установено, че активността на йонните помпи в гладката мускулатура е нарушена при животни с експериментално индуциран ЗД (Liu & Daneshgari, 2014).

В обобщение, установихме различно влияние на експериментално предизвикания ЗД върху Анг II-индуцираната съкратителна активност на препаратите от висцерална гладка мускулатура. При препаратите от стомах и пикочен мехур на диабетните животни, регистрираните от нас промени в отговора към Анг II бяха минимални, свързани главно с времето за протичане на гладко-мускулното съкращение. Съществени изменения бяха регистрирани по отношение отговора към Анг II на препаратите от черва на диабетните животни, като най-силно повлияно от заболяването се оказва дебелото черво.

Краткосрочно приложение на мелатонин при експериментален модел на захарен диабет: ефект върху Анг II-стимулираната активност на висцералната гладка мускулатура

Препаратите от пикочен мехур на диабетните животни, третирани краткосрочно с МЛТ (група 3 от проведените експерименти), показаха различен отговор към Анг II в сравнение със същите препарати на диабетните животни (група 2) и на контролата (група 1). Фактът, че съкращенията на препаратите от група 3 не съвпадат напълно по характеристики с тези на група 1 показва, че краткосрочното приложение на МЛТ в началото на експеримента не е било достатъчно, за да повлияе изцяло благоприятно евентуалните увреждания от STZ-индуцирания диабет. От друга страна, установените различия в отговора към Анг II на препаратите от група 2 и група 3 ясно показват наличие на ефект от

приложението на МЛТ. Към настоящия момент липсват литературни данни, които да обяснят как приложението на МЛТ при експериментален модел на ЗД повлиява активността на пикочния мехур и в частност Анг II-стимулирания отговор. Изхождайки от наличната научна информация за ефектите на МЛТ при здрави и диабетни животни, бихме могли да изкажем няколко предположения.

Съгласно Хан и сътр. (2012), МЛТ намалява съкратителната активност на мехура, вероятно поради инхибиране на комплекса Ca^{2+} -калмодулин и по този начин предотвратява активирането на MLCK. Същите автори дават информация и за директно влияние на МЛТ върху йонните каналчета, отговорни за регулацията на съкращението на пикочния мехур (Han et al., 2012). Същевременно, Liu & Daneshgari (2014) обясняват увеличението контрактилитет на мехура при STZ-третираните животни с повишена активност на Ca^{2+} -каналите и увеличена калциева чувствителност. Това предполага, че механизмите на действие на двата агента (МЛТ и STZ) върху гладката мускулатура на пикочния мехур са антагонистични по характер. Възможно е в първите дни от индуцирането на ЗД инхибирането на двигателната активност от приложението МЛТ да е допринесло за развитие на промени в двигателната активност на пикочния мехур под влияние на STZ в насока, касаеща намаляване на силата и продължителността на съкратителния процес.

По отношение на стомаха, наблюдаваните разлики в отговора към Анг II на препаратите от животните с индуциран ЗД и на третираните с МЛТ диабетни животни, свидетелстват за ефект от краткосрочното приложение на МЛТ. От една страна, това се изразява в повлияване на силата на отговорите на стомаха към Анг II, защото съкращенията на препаратите от група 3 бяха със значително увеличени амплитуда и AUC, в сравнение с тези на диабетната и контролната група животни. От друга страна, времевите характеристики на съкращенията на препаратите от група 1 и 3 бяха почти еднакви. Интересно е за отбелязване, че времевите

параметри и на Анг II-индуцираните интестинални съкращения от групата на повлияните с МЛТ диабетни животни, също показваха сходство с тези на съкращенията от съответните препарати на контролната група. В същото време обаче, приложението на МЛТ при диабетните животни не може изцяло да допринесе за възстановяване на отговора към Анг II до стойности, характерни за здравите животни, тъй като силовите характеристики на съкращенията бяха почти еднакви с тези на диабетната група животни.

Получените от нас резултати трудно намират обяснение, поради липсата на литературни данни, касаещи ролята на МЛТ в развитието на ГИ смущения при ЗД. Известно е, че посредством антиоксидантното си действие, стимулиране на имунната система, подобряване на микроциркулацията и епителиалната регенерация, МЛТ защитава лигавицата в храносмилателния тракт от улцерации (Kvetnoy et al., 2002). Протективният ефект на МЛТ се приписва на силните му радикалоулавящи свойства и на способността му да намалява степента на липидната пероксидация в организма (Konturek et al., 2007). Антиоксидантното и невропротективно действие на МЛТ е доказано при животински модели със STZ-индуциран ЗД (Vural et al., 2001; Klepac et al., 2006; Espino et al., 2011). По данни на Peschke (2008), в серумите на животни със STZ-индуциран диабет е установено, че МЛТ значително е редуцирал нивата на протеиновото гликиране. Като се има предвид ролята на ROS и крайните продукти от гликирането за нарушената гладко-мускулна активност при ЗД бихме могли да предположим, че благоприятното действие, което регистрирахме по отношение продължителността на ГИ съкращения, вероятно се дължи на горепосочените свойства на МЛТ. В същото време, хиперактивният отговор към Анг II на препаратите от стомах, слабите по сила Анг II-предизвикани съкращения на препаратите от йеюnum и еднаквите с тези на диабета силови характеристики на съкращенията на останалите препарати, свидетелстват за увреждащото действие на

индуцирания ЗД. Явно е, че едноседмичното приложение на МЛТ не е било в състояние да противодейства на въведения STZ до степен да възстанови нарушенията от диабета показатели до нивото на здравите контроли.

Краткосрочно приложение на грелин при експериментален модел на захарен диабет: ефект върху Анг II-стимулираната активност на висцералната гладка мускулатура

В наличната към настоящия момент литература, данните за ефекта от екзогенно приложение на ГР върху нарушената от диабета съкратителна активност на висцералната гладка мускулатура са недостатъчни. Установено е, че ГР повлиява благоприятно гастропарезата, която е често срещано усложнение при прогресирането на ЗД. Освен стимулиране съкратителната активност на стомаха има данни, че ГР ускорява забавения от диабета пасаж през тънкото черво (Qiu et al., 2008a; Suzuki et al., 2010). ГР и неговите агонисти допринасят също за бързото възстановяване на стомашната лигавица, увредена от оксидативния стрес при ЗД. Тези гастропротективни свойства по всяка вероятност се дължат на установеното антиоксидантно действие на пептида (Suzuki et al., 2010). По данни на Konturek и сътр. (2006), ГР ускорява възстановяването на стомашните функции в условия на исхемия-реперфузия, което се дължи на мощния му противовъзпалителен ефект, активиране на сетивни нерви, опосредствана от NO хиперемия и увеличена ангиогенеза. В експерименти *in vitro* е установено, че ГР намалява продукцията на ROS от полиморфоядрените левкоцити (Takeda et al., 2006) и проявява антиоксидантно действие в много органи - сърце, панкреас, и бял дроб (Suzuki et al., 2010). Липсва обаче всякаква информация в литературата относно ефекта на ГР върху отговора на диабетната гладка мускулатура към Анг II.

При проведените от нас експерименти установихме разлики в Анг II – стимулираните съкращения между препаратите от диабетната група, третирана с ГР, и останалите групи. Това свидетелства за ефект от

приложението на ГР при животните с експериментално предизвикан ЗД. В подкрепа на това твърдение са регистрираните промени в биохимичните показатели и телесната маса на опитните животни от група 4. Различно изразената промяна в съкратителната активност на стомаха, червата и пикочния мехур показва разнопосочно повлияване на диабетната гладкомускулна активност от ГР. Много характерно беше регистрирането на изключително бързо протичащ във времето отговор към Анг II на препаратите от стомах и тънко черво. Тези резултати са в съгласие с Qiu и сътр. (2008a; 2008b), които в серии от експерименти с диабетни животни установяват, че третирането с ГР ускорява стомашната и тънкочревна съкратителна активност и води до увеличение на амплитудата на карбахол-предизвиканите съкращения на препарати от стомах. Авторите предполагат, че стимулираната активност на стомаха и тънкото черво се дължи на активиране на периферни холинергични пътища в ЕНС. Освен това някои автори дискутират повишението на ендогенните нива на ГР в кръвта на плъхове със STZ-индуциран диабет. Chen и сътр. (2010) съобщават, че плазмените нива на ГР са увеличени в ранните стадии от развитието на ЗД, което съответства на ускорена ГИ съкратителна активност. В експерименти, проведени върху плъхове със STZ-индуциран диабет, Ariga и сътр. (2008) установяват високи стойности на ГР в кръвната плазма на гладно и след нахранване, както и ускорена стомашна евакуаторна активност. Авторите предполагат, че повишените нива на ендогенния ГР подобряват координацията между тялото и пилора на стомаха и ускоряват евакуацията на хранителните маси в ранните стадии от ЗД. Ето защо е твърде вероятно, повишените плазмени нива на ендогенния ГР при ЗД от една страна, и екзогенното внасяне на пептида от друга, да допринасят за ускорените стомашни и тънкочревни Анг II-предизвикани съкращения, които регистрирахме в хода на нашите експерименти.

Интересно е, че голяма част от времевите характеристики на повечето от съкращенията на препаратите от група 4 се доближаваха до

тези на контролната група. Всъщност при препаратите от пикочен мехур, Анг II-стимулираните съкращения на третираната с ГР диабетна група показваха сходство както по силови, така и по нормализирани времеви параметри с тези на контролната група. Тези наши резултати показват наличие на благоприятен ефект от приложението на ГР, касаещ времето за протичане на съкратителния процес при висцералната гладка мускулатура в условия на ЗД. Дали този ефект се дължи на антиоксидантно, противовъзпалително или друго действие на ГР, към настоящия момент би било спекулативно се твърди със сигурност.

За отбелязване е, че единствено съкращенията на препаратите от колон на животните от група 4 се характеризираха с изключително продължителна фаза на релаксация – феномен, който не беше регистриран при нито един друг препарат от нито една друга група. По данни на Qiu и сътр. (2008a), приложението на ГР при мишки с индуциран диабет не е имало ефект върху забавената от заболяването съкратителна активност на колона. Интересното в нашите експерименти беше, че при препаратите от колон на диабетната група без протекция не регистрирахме забавена активност, докато такава беше налице при препаратите от групата на диабетните животни с допълнително прилаган ГР. Това недвусмислено показва наличие на ефект (но определено не положителен), от третирането с ГР на диабетните животни върху Анг II-стимулираната активност на колона. По данни на Zhao и сътр. (2006) ГР може да играе роля на про-инфламаторен пептид в дебелото черво, стимулирайки образуването на възпалителни цитокини в колона. De Smet и сътр. (2009) също показват, че нивата на ГР са увеличени при пациенти, страдащи от т.нар. синдром на раздразненото черво. Освен това, повишаване на нивата на ГР и на експресията на неговите рецептори е била установена в колон от мишки с експериментално индуциран колит, както и в биопсии от лигавицата на колон на пациенти, страдащи от синдрома на раздразненото черво. Въз основа на всички тези данни би било оправдано да предположим, че

екзогенно прилаганият ГР при животните със ЗД води до допълнително увреждане на засегнатата от диабета двигателна активност на колона. Като се имат предвид също данните на Jancsó и сътр. (2015), че в условията на повишен оксидативен стрес, характерен за ЗД, колонът е по-чувствителен и много често в него настъпват некрози, твърде вероятно е посредством седемдневното приложение на ГР върху диабетните животни да са предизвикани допълнителни възпалителни промени в този орган, които се отразяват на Анг II-стимулираната съкратителна активност. В подкрепа на това са изследванията, проведени от Liu и сътр. (2015), които установяват, че активирането на рецепторите за ГР в дебелото черво допринасят за развитието на колит, вероятно чрез повишаване на про-инфламаторните цитокини и активиране на макрофагите.

В заключение, макар и минимални, бяха регистрирани ефекти от краткосрочното приложение на ГР при животни с експериментално предизвикан ЗД. Тези ефекти се изразяваха най-вече в благоприятно повлияване на общото състояние на животните, предотвратяване загубата на телесна маса, редуциране на високите кръвно-захарни нива и частично съхраняване на панкреасната функция. По всяка вероятност причината за тези положителни действия на ГР се крие в доказаното му антиоксидантно действие и протективен ефект върху β -клетките на панкреаса. По отношение на Анг II-предизвиканата активност, приложението на ГР при експериментално индуцирания ЗД доведе до почти напълно възстановяване към нормата на съкращенията на препаратите от пикочен мехур, както и до подобряване на времевите характеристики на съкращенията на стомашните и тънкочревните препарати. Вероятната причина за тези ефекти е прокинетичното действие на ГР върху висцералната гладката мускулатура. Изразен негативен ефект установихме по отношение Анг II-предизвиканата активност на колона, изразяващ се в силно забавяне на съкратителния процес. Възможна причина за това е проинфламаторното действие на ГР, установено за този отдел от ГИ тракт.

VI. ИЗВОДИ

1. Установен е мощен контрактилен ефект на Анг II по отношение на висцералната гладка мускулатура, като амплитудите на Анг II-стимулираните съкращения се увеличават в посока към дебелото черво.

2. В гладко-мускулни препарати от стомах и илеум се наблюдават удължени времеви характеристики на Анг II-предизвиканите съкращения, които свидетелстват за включване на допълнителни механизми към основната сигнална верига.

3. Състоянието на хронична хипергликемия нарушава Анг II-предизвиканата съкратителна активност на гладко-мускулни препарати от пикочен мехур, стомах, тънко и дебело черво.

4. Седемдневното приложение на грелин или мелатонин върху плъхове с експериментално предизвикан захарен диабет подобрява състоянието на опитните животни по отношение на телесна маса, гликиран хемоглобин, кръвна захар, нива на С-пептид, оказва положителен ефект върху отделни параметри на отговора на гладко-мускулните препарати от пикочен мехур, стомах и тънко черво към Анг II и не подобрява нарушената от диабета Анг II-опосредствана съкратителна активност на дебелото черво.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Въведен е метод за анализ на данните, получени при регистрация на съкратителната активност на гладки мускули, който позволява определяне не само на величината на механичния отговор, но също така на параметрите, свързани с времето и скоростта на съкращенията.

2. Установено е, че в гладко-мускулни препарати от стомах и илеум на плъх AT2 рецепторите имат антагонистично на AT1 рецепторите

действие при участие в съкратителния процес, докато в йеюnum и ректум двата подтипа рецептори действат синергично.

3. Показано е, че AT2 рецепторите имат значение за нормалното протичане на фазата на релаксация в Ангиотензин II – предизвиканото съкращение на ректалната гладка мускулатура.

4. Демонстрирано е, че седемдневното приложение на хормоните грелин или мелатонин подобрява състоянието (телесна маса, гликиран хемоглобин, кръвна захар, функция на б-клетките на панкреаса) на плъхове с експериментално предизвикан захарен диабет.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Tolekova, A., **P. Hadzhibozheva**, R. Iliev, T. Georgiev, K. Trifonova, R. Sandeva, R. Kalfin, G. Ilieva. Participation of extracellular Ca^{2+} or ghrelin in peptide-mediated contraction of strips from rat urinary bladder, *Regulatory peptides*, 2010, 162(1-3):79-83. IF (2010) = 2.473.

2. **P. Hadzhibozheva**, A. Tolekova, T. Georgiev, G. Ilieva, R. Kalfin. Angiotensin II receptors type 2 and gastro-intestinal tract contractile activity. *Comptes Rendus - Proceedings of BAS* (Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences), 2014, Tome 67, No 8, 1091-1100. IF (2014/2015) = 0.284

3. **P. Hadzhibozheva**, A. Tolekova, S. Mihaylova, T. Georgiev. AT2 receptors and Angiotensin II-mediated contractions of gastrointestinal tract of rats. *Trakia Journal of Sciences*, 2012, Vol.10 (Suppl. 1), 161-166.

4. **P. V. Hadzhibozheva**, A. N. Tolekova & T. K. Georgiev. Angiotensin II receptors – role for the contraction of large intestine. *Bulgarian Journal of Veterinary medicine*, 2013, 16, Supp. 1, 10-18.

IX. НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- *FEPS Physiology Congress, Istanbul, Turkey, 2011.*
Time-parameters for comparison of angiotensin II – induced contractions: in vitro experiments with rat gastrointestinal segments.
Hadzhibozheva P., Georgiev Ts., Iliev R., Ilieva G., Kalfin R., Tolekova A.
- *VI Bulgarian Peptide Symposium, Panichiste, Bulgaria, 2011.*
Analysis and comparison of angiotensin II and vasopressin-provoked contractions of rat isolated tissue strips from urinary bladder and rectum.
Hadzhibozheva P., Georgiev Ts., Iliev R., Ilieva G., Kalfin R., Tolekova A.
- *7th Workshop “Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products”, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, 2012.*
Angiotensin II receptor blockade – importance for blood pressure control and some new aspects.
P. Hadzhibozheva, A. Tolekova, Ts. Georgiev
- *Юбилейна международна научна конференция „30 години висше медицинско образование в Стара Загора“, 2012.*
AT2 receptors - are they of importance for Angiotensin II - mediated contractions of gastrointestinal tract of rats?
P. Hadzhibozheva, S. Mihaylova, T. Georgiev
- *XII International Congress of Medical Sciences (ICMS), Sofia, 2013.*
Angiotensin II receptors subtypes and intestinal smooth muscle activity
P. Hadzhibozheva, Ts. Georgiev
- *International Jubilee Scientific Conference “90 Years Faculty of Veterinary Medicine and Higher Veterinary Medical Education in Republic of Bulgaria“, Stara Zagora, 2013.*
Role of Angiotensin II receptors for the contraction of large intestine.
Petya Hadzhibozheva, Anna Tolekova, Tsvetelin Georgiev
- *33rd European Peptide Symposium, Sofia, Bulgaria, 2014.*
Effects of ghrelin treatment on rats with streptozotocin-induced diabetes
P. Hadzhibozheva, T. Georgiev, R. Kalfin, G. Ilieva, A. Tolekova.
- *9th Workshop “Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products”, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, 2014.*
Angiotensin peptides - new players in the renin-angiotensin system team.
P. Hadzhibozheva, A. Tolekova, Ts. Georgiev.

Х. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ДОГОВОРИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ДОГОВОР ДДВУ 02-24/2010 МОН: Ефекти на някои потенциални антиоксиданти върху В-клетъчната функция, появата и развитието на стрептозотоцин-индуциран диабет при плъхове.

ДОГОВОР 1/2010 МФ, ТрУ: Диабет-индуцирани промени и влияние на някои регулаторни пептиди върху съкратителната активност на гладкомускулни органи в тазовата кухина при плъхове.

ДОГОВОР 24/2011 МФ, ТрУ: Проучване на Ангиотензин II-медиирани съкращения на сегменти от гастро - интестиналния тракт на плъхове.

ДОГОВОР 23/ 2013 МФ, ТрУ: Роля на ангиотензиновите пептиди за развитието на гладко-мускулната контракция на пикочен мехур и сегменти от гастро-интестиналния тракт на плъхове.

ДОГОВОР 22/ 2014 МФ, ТрУ: Дозо - зависими криви на съкращения, индуцирани с Ангиотензин II: построяване и анализ със специализирана компютърна програма.

XI. SUMMARY

The octapeptide Angiotensin II (Ang II) is the main effector of Renin-Angiotensin System (RAS) and its primary role is blood pressure regulation and electrolyte balance maintenance. Nowadays Ang II is considered to be of a great importance for the regulation of the physiological processes as well as of the onset and progression of many diseases. In the modern world two social significant diseases form so called "Lethal duet": hypertension and diabetes mellitus. Due to the proven leading role of RAS in the pathogenesis of hypertension in diabetes, today is assumed that diabetes is a precondition for cardiovascular disease. The classical antihypertensive therapy, regardless whether diabetic or non-diabetic patients are treated,

involves the application of different groups of drugs. Most of them are targeted on RAS and aim blocking of Ang II formation and its effects. However, this is only "the one side of the coin," because the significance of Ang II for the organs which are outside the cardiovascular and renal systems is still under investigation. Undoubtedly, Ang II has significance for contractions of visceral smooth muscles. This raises a number of questions about the change in the contractile activity of non-vascular smooth muscle tissues as a result of antihypertensive therapy.

The present thesis aims to determine the effects of Ang II on contractility of visceral smooth muscles from normal and diabetic rats, as well as to clarify the significance of the Ang II receptor subtypes (AT1 and AT2) for the development of the contractile process. For this purpose mature Wistar rats were used. Preparations of stomach, intestines and urinary bladder, were prepared and investigated by the method of isolated tissues. The study of smooth muscle contractions was made by a new method of analysis, characterizing in detail the various phases of the contractile process.

Our research found that Ang II exerts potent contractile effect on visceral smooth muscle, and the amplitudes of the Ang II-stimulated contractions increased gradually towards the colon. In smooth muscle preparations from rat stomach, ileum and urinary bladder AT2 receptors counteracted the effects of AT1 receptors on the contractile response to Ang II, while in the jejunum and rectum both receptor subtypes act synergistically. AT2 receptors are of importance for the relaxation phase of Ang II - induced contractile process in the rectal smooth musculature. The chronic (42 days) hyperglycemia has influence of varying degree on Ang II-mediated contractions of visceral smooth muscles. The most affected by the experimental diabetes was the response to Ang II of the colon. We demonstrated that seven-day administration of hormones melatonin or ghrelin improved the glycemic profile and body weight of rats with

experimentally induced diabetes mellitus. Simultaneously, there was a partial beneficial effect on some parameters of Ang II-induced smooth muscle responses of stomach, small intestine and urinary bladder, but the impaired by diabetes Ang II-mediated contractile activity of large intestine was not improved.

БЛАГОДАРНОСТИ

Бих искала да изкажа искрената си признателност към научните си ръководители Проф. д-р Рени Калфин и Доц. д-р Анна Толева за професионализма, напътствията и ценните съвети. Благодаря на Проф. Калфин за шанса да работим заедно, за непринуденото общуване, отделеното време и внимание към мен. Благодаря на Доц. Толева за вярата в моите способности, за непрекъснатата подкрепа и вдъхновение.

Сърдечно благодаря на Доц. д-р Станимир Йотов за приятелското отношение и оказаната помощ при написването и стиловото оформяне на дисертационния труд.

Благодаря на всички колеги от Катедрата по Физиология, патофизиология и фармакология на МФ, Тракийски Университет за това, че ме приеха безрезервно в колектива, за подадената ръка, приятелското отношение и творческа атмосфера.

Благодаря и на колегите от Института по Невробиология-БАН, за милото отношение и демонстрирания професионализъм.

Изказвам искрена благодарност на всички мои студенти-бивши и настоящи, за уважението, съвместната работа и вдъхновението.

Благодаря на приятелите си за разбирането, търпението и подкрепата, докато работех по написването на дисертационния труд.

Бих искала да изкажа специални благодарности на д-р Цветелин Георгиев за стабилното присъствие във всеки един стадий от работата по дисертационния труд. Благодаря за безценното приятелство, безкрайното доверие и разбиране, огромната помощ и професионализъм, без които този труд не би бил осъществен.

Не на последно място, благодаря на всички членове от моето семейство за вярата в мен и търпението, като специално се извинявам на племенницата си Таня за пропуснатите игри и общуване. Изказвам безкрайната си обич, признателност и благодарност на майка ми Таня и брат ми Живко за безрезервната подкрепа, окуражаването и разбирането, дори когато тръгвах в грешна посока.

Прекляням се пред светлата памет на баща ми, който ме научи на труд и упоритост.

От Петя