

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОУЧВАНИЯ ЗА РОЛЯТА
НА МОЗЪЧНИ КАНАБИНОИДИ И НЕВРОПЕПТИДИ
В МОДУЛИРАНЕ НА ОБУЧЕНИЕТО И ПАМЕТТА**

доц. д-р Роман Емилов Ташев, дм

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане
на научна степен „ДОКТОР НА НАУКИТЕ“
по научна специалност „Патофизиология“



2018 г.

Дисертационният труд обхваща 269 страници, съдържа 9 схеми, 54 фигури и 5 таблици. Библиографията обхваща 762 литературни източника, от които 2 на кирилица и 760 на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на2018 г. от часа в Медицински университет - Плевен. Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на Медицински университет – Плевен.

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОУЧВАНИЯ ЗА РОЛЯТА
НА МОЗЪЧНИ КАНАБИНОИДИ И НЕВРОПЕПТИДИ
В МОДУЛИРАНЕ НА ОБУЧЕНИЕТО И ПАМЕТТА**

доц. д-р Роман Емилов Ташев, дм

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане
на научна степен „ДОКТОР НА НАУКИТЕ“
по научна специалност „Патофизиология“

Официални рецензенти:

Акад. проф. д-р Радомир Радомиров, д.м.н.

Чл. кор. проф. д-р Стефан Костянев, д.м.н.

Доц. д-р Анелия Димитрова, д.м.

2018 г.

Дисертационният труд е обсъден на разширено научно заседание на катедрен съвет на Катедрата по физиология и патологична физиология при Медицински университет – Плевен, състояло се на 30.03.2018 г. и е насочен за защита пред научно жури.

Дисертационният труд е насрочен за защита пред **Научно Жури** в състав:

акад. проф. д-р Радомир Георгиев Радомиров, дм, дмн – външен

чл. кор. проф. д-р Стефан Стоилов Костянев, дм, дмн – външен

чл. кор. проф. д-р Мила Василева Власковска, дм, дмн – външен

проф. д-р Ганка Йорданова Бежарова, дм, дмн – външен

проф. д-р Благой Иванов Маринов, дм – външен

доц. д-р Анелия Александрова Димитрова, дм – вътрешен

доц. д-р Галя Цветанова Ставрева, дм – вътрешен

Резервни членове:

проф. д-р Божида Димитров Колев, дм, дмн – външен

доц. д-р Боряна Крумова Русева, дм – вътрешен

СЪДЪРЖАНИЕ

ВЪВЕДЕНИЕ	7
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	11
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	14
1. Експериментален модел на депресия	14
1.1. Експериментални животни	14
1.2. Стереотаксична техника и използвани хирургични процедури	14
1.2.1. Двустранна олфакторна булбектомия у плъхове (OBX) - експериментален модел на депресия	14
1.2.2. Имплантиране на канюли в мозъчни структури на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)	14
1.3. Поведенчески методи	15
1.3.1. Метод за определяне на промените в експлораторното поведение	15
1.3.2. Методи за определяне на степента и динамиката на обучението и запаметяването	15
1.3.2.1. Метод за обучение за активно двупосочно избягване – shuttle box	15
1.3.2.2. Метод за обучение за пасивно избягване – step through	15
1.4. Въвеждане на вещества на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)	16
2. Експериментален модел на синдром на Турет	17
2.1. Имплантиране на канюли в мозъчни структури на плъх при синдром на Турет	17
2.2. Дизайн на опитите за създаване на модел на синдром на Турет	17
2.3. Поведенчески изследвания	18
2.4. Имунохистохимични изследвания	19
2.5. Електрофизиологични изследвания	19
3. Верификация	20
4. Статистическа обработка на резултатите	20
5. Използвани фармакологични средства	20
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНИЯ	21
1. Промени в експлораторното поведение на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)	21
2. Промени в обучението и запаметяването на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)	22
3. Участие на мозъчните канабиноидни CB1 рецептори в паметови функции на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)	23
3.1. Промени в експлораторното поведение след i.c.v. въвеждане на селективния агонист HU 210 и селективния антагонист SR 141716A на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)	24
3.2. Промени в обучението и запаметяването след i.c.v. въвеждане на селективния агонист HU 210 и селективния антагонист SR 141716A на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)	25
4. Участие на мозъчни неuropeптиди в паметови функции на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)	27
4.1. Участие на хипокампаалния вазоактивен интестинален пептид	27

4.1.1. Промени в обучението и паметта след двустранно или едностранно въвеждане на VIP, VIP ₆₋₂₈ и VIP на фона на инхибирани VPAC рецептори (VIP6–28) в CA1 полето на хипокампа на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)	28
4.2. Участие на хипокампа на ангиотензин	34
4.2.1. Промени в обучението и запаметяването след двустранно или едностранно въвеждане на ангиотензин IV в CA1 полето на хипокампа	34
4.2.2. Промени в обучението и запаметяването след двустранно или едностранно въвеждане на ангиотензин II и лосартан в CA1 полето на хипокампа на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)	36
4.3. Участие на амигдалния ангиотензин II и AT1 рецепторите	40
4.3.1. Промени в експлораторното поведение след двустранно или едностранно въвеждане на ангиотензин II и лосартан в централното ядро на амигдала (CeA) на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)	40
4.3.2. Промени в обучението и запаметяването след двустранно или едностранно въвеждане на ангиотензин II и лосартан в централното ядро на амигдала (CeA)	43
4.3.3. Промени в обучението и запаметяването след двустранно или едностранно въвеждане на ангиотензин II и лосартан в централното ядро на амигдала (CeA) на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)	46
5. Проучване на клетъчно-молекулните механизми на амфетамин-индуцираното стереотипно поведение (експериментален модел на синдром на Турет)	50
5.1. Проучване ефектите на субстрат прихващаща изоформа на STEP - TAT-STEP(C-S), въведена във вентролатералния стриатум (VLS) върху индуцираните от амфетамин поведенчески стереотипии	51
5.1.1. Имунохистохимични изследвания	51
5.2. Поведенчески изследвания	51
5.3. Поведенчески изследвания на STEP knockout мишки	54
5.4. Проучване ефектите на TAT-STEP(C-S) върху амплитудата на EPSP (възбуждащ постсинаптичен потенциал) след високочестотно стимулиране на кортико-стриатални срезове	55
ОБОБЩЕНО ОБСЪЖДАНЕ	59
ИЗВОДИ	86
ПРИНОСИ	89
Списък на статиите, включени в докторската дисертация	91
Списък на публикуваните резюмета, включени в докторската дисертация	94
Цитати на статии, включени в докторската дисертация	97

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АС – аденилатциклаза
Ach – ацетил холин (acetyl choline)
АСТН – адренкортикотропен хормон
Ang II – ангиотензин II
Ang IV – ангиотензин IV
ARBs – ангиотензинови рецепторни блокери
АОЛ – акцесорна обонятелна луковица
BDNF – Brain derived neurotrophic factor
СА – Амонов рог (cornu Ammonii)
ССК – холецистокинин (Cholecystokinin)
CRH – кортикотропин-рилизинг хормон (corticotropin-releasing hormone)
DA – допамин
GABA – гама аминомаслена киселина (Gamma Amino Butyric Acid)
GLP – glucagon-like peptide
Glu – глутамат
GRF – somatotropin-releasing hormone
Gai – G протеин, инхибиращ цАМФ сигнален път
Gaq – G протеин, активиращ Фофолипаза C
Gas – G протеин, активиращ цАМФ сигнален път
HPA – hypothalamic-pituitary-adrenal axis
i.c.v. – въвеждане в мозъчните вентрикули
i.t. – интра-текално въвеждане
IRAP – цикличен инсулин-регулиращ аминокиселинна рецептор/AT4
IUPHAR – международен съюз по фармакология (International Union of Pharmacology)
LTD – дългосрочна депресия (long-term depression)
LTP – дълготрайна потенциация (long-term potentiation)
МАР киназа – Митоген Активираща Протеин киназа
NMDA – N-метил D-аспартат
NPY – невропептид Y
PACAP – pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PHI – Пептид с хистидин в N-края и изолевцин в C-края
PHM – Пептид с хистидин в N-края и метионин в C-края
PKC – протеин киназа C
PKC – протеинкиназа C
PRP-PACAP – related peptide
STEP – Striatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase
TAT-STEP46(C-S) – синтезирана субстрат прихващаща изоформа на STEP
VIP – Вазоактивен Интестинален Пептид
АДФ – аденозиндифосфат
АСЕ – ангиотензин-конвертиращ ензим (Angiotensin Converting Enzyme)
ВНО – вомероназален орган
ГОЛ – главна обонятелна луковица
ЕЕГ – електроенцефалограма
ЕК – енторинална кора

иРНК – информационна рибонуклеинова киселина
ОВХ – двустранна олфакторна булбектомия
РАС – ренин-ангиотензинова система
РК – протеинкиназа
СВО – циркумвентрикулен орган (organum circumventricularis)
СХЯ – супрахиазматично ядро
ХФ – хипокампална формация
цАМФ – цикличен аденозин монофосфат
ЦНС – централна нервна система
 Δ^9 -THC – delta9-тетрахидроканабинол
5-HT – серотонин (5 hydroxytryptamine)

Забележка: Номерата на фигурите в автореферата съответсват на номерата в дисертационния труд.

**"НАУКАТА НЕ Е НИЩО ДРУГО ОСВЕН СЕРИЯ ОТ
ВЪПРОСИ, КОИТО ВОДЯТ ДО ПОВЕЧЕ ВЪПРОСИ"**

Terry Pratchett & Stephen Baxter

ВЪВЕДЕНИЕ

Едни от най-сериозните нарушения при редица невропсихични заболявания са паметовите увреждания и паметовите дефицити. В широкия смисъл на понятието памет се включват три сложни мозъчни процеса: обучение, което се състои във формирането на следи от достигащата до мозъка информация; запамятаване, т.е. запазване, съхраняване на получената и междувременно обработена в мозъка информация; и припомняне, иначе казано, освобождаване и използване на комплекси от натрупаната преработена информация, съответстваща на изискванията на нови ситуации. Нарушенията на паметта могат да засегнат всяка една от тези нейни основни функции (Петков, 1998).

Изследването на невробиологичните механизми на заучаването и паметта, се определя от факта, че процесите, които водят до запазване на получената информация и до нейното адекватно използване при конкретни изисквания, са от основно значение за съществуването на всички животински организми. За изясняване на механизмите на когнитивните функции в норма и патология е намирането на подходящи експериментални модели на обучение и памет – подбирането на такива животни, които предлагат не само по-опростени модели на човешките паметови системи, но и позволяват количествени оценки. Получаваната с помощта на тези модели информация е от изключително значение специално при решаването на задачи, свързани с изясняване на нервноморфологичните, неврофизиологичните и неврохимичните основи както на нормалната памет, така и на видовете патологични процеси, които могат да предизвикат паметови дефицити и амнезия.

Все още, обаче е трудно да приемем, че например са създадени безспорни модели върху лабораторни животни на човешки депресии, шизофрения, болест на Алцхаймер или нарушения на вниманието. Ето защо принципите и идеите, които произтичат от паметовите изследвания у животни, са от голямо значение за напредъка на нашите знания, особено за невербалните човешки паметови възможности и за неврофизиологичните и неврохимичните механизми, които са основата им.

Един от най-значимите здравни и социални проблеми на съвременното са деменциите, символично квалифицирани като „епидемия“. Деменцията е синдром, който се характеризира с упадък на множество когнитивни функции, достатъчно значим, за да наруши ежедневните дейности на болните. С напредването на деменцията, когнитивните и поведенчески нарушения водят до прогресивна загуба на самостоятелността на болните. Това състояние на прогресираща загуба на интелекта и автономията на болните засяга не само все по-голям брой възрастни хора, но променя качеството на живота на техните близки.

Проведените през последните години проучвания установяват, че 24 милиона души страдат от деменция и че този брой ще се удвоява на всеки 20 години, до 42 милиона през 2020 и 81 милиона през 2040 (Ferri et al, 2005). Деменциите могат да бъдат групирани по различен начин, в зависимост от избрания критерии. Най-широко разпространение намира етиологичната класификация, която включва: дегенеративни

заболявания (болест на Алцхаймер, фронто-темпорална деменция, болест на дифузни телца на Леви, болест на Паркинсон, болест на Хънтингтон и др.), съдови заболявания (мулти-инфарктна деменция, подкорова съдова деменция), деменции свързани с депресия, инфекциозни, травматични, токсични и други типове деменции (Трайков, 2012).

Дементно болните в нашата страна са около 100 хиляди като около 50 хиляди са болните от Алцхаймерова деменция; болестта на Паркинсон е второто най-често срещано невродегенеративно заболяване след болестта на Алцхаймер като около 40-70% от пациентите развиват изразени когнитивни нарушения и деменция (Трайков, 2012).

Депресията е широко разпространена социално-значима болест, която според данни на СЗО е водещата причина за продължителна нетрудоспособност. Негативното влияние на депресията върху качеството на живота е равно или по-голямо от това на хронични заболявания като исхемичната болест на сърцето и захарния диабет. По прогнозни данни на СЗО до 2020 г. депресията ще се нареди на второ място сред причините за инвалидност в световен мащаб, изпреварвана само от сърдечно-съдовите заболявания.

Понастоящем в международните класификации на психичните болести се използва понятието голям депресивен епизод или голяма депресия. Депресивните разстройства засягат както емоционалното състояние на индивида и неговата мотивация, така и когнитивните му функции. Нарушенията в когнитивните функции и паметовите дефицити са често срещани сериозни здравословни проблеми, влошаващи качеството на живот.

Изследванията, насочени към разкриване на етиопатогенезата на депресията продължават вече десетилетия, но конкретните патогенетични механизми остават неизяснени. Интензивно се проучват неврохимичните фактори и сигнални пътища, участващи в патофизиологията на депресивните разстройства, както и влиянието на генетичните фактори, стреса и тяхното взаимодействие за определяне на предразположение към развитие на депресия. Напоследък се откриват промени в редица мозъчни структури, като хипокамп, амигдала, префронтални и фронтални области на мозъчната кора.

През последните години се приема, че двустранната олфакторната булбектомия на плъхове е моделът, който би могъл да се екстраполира с голямата депресия при хора, водеща и до когнитивни нарушения. Този модел е не само най-подходящият модел за изучаване механизмите на депресията и ефективността на антидепресантите (Kelly et al., 1997), но тъй като той е уникален сред всички останали модели с развитието на невродегенеративни процеси в мозъка, се приема и за модел на болестта на Алцхаймер.

В последните години се натрупаха данни за ендоканабиноидната система и ключовата ѝ роля в медиацията и/или модулацията на поведенчески, неврохимични, невроендокринни, невроимунни и молекулярни отговори при различни въздействия (Finn, 2010; Finn et al., 2012). Главен физиологичен ефект на канабиноидите е да регулират невротрансмисията чрез активация на пресинаптичните CB1-рецептори, локализирани върху аксоналните терминали на различни неврони в мозъка. Това предполага, че ендоканабиноидната система е модулатор на широк кръг от неврологични функции. Отдавна са познати предизвикваните от пушене на канабис нарушения в паметта, а при опитни животни са установени смущения в паметовите процеси, предизвиквани от ендогенни канабиноиди и от синтетични агонисти и

антагонисти на канабиноидните CB1 рецептори. Нарушенията в ендоканабиноидната система обуславят отключването, развитието и обострянето на редица невропсихични заболявания, сред които тревожност, депресия, шизофрения и т.н. Последни проучвания показват, че канабисът може да разруши сигналните пътища на глутамата, при чести потребители. Съвременните данни също така показват по-ниски нива на глутамат в различни мозъчни области, особено в средната префронтална кора при пациенти с шизофрения. Глутаматергичните аномалии могат да повлияят на когнитивните увреждания, наблюдавани при ползвателите на канабис и имат известно значение за прогресирането на невропсихичните заболявания (Rigucci et al., 2018).

Невропротективният ефект на канабиноидите е проучен при различни експериментални условия: активирането на рецепторите води до протекция на хипокампа и мозъчните неврони от ексцитотоксичност (Hampson and Grimaldi, 2001), както и от хипогликемия и хипоксия (Nagayama et al., 1999). Канабиноидите намаляват загубата на неврони в хипокампа след мозъчна исхемия (Nagayama et al., 1999) и остри мозъчни травми (Panikashvili et al., 2001) и осигуряват невропротекция при невродегенеративни процеси, развиващи се по време на болестта на Алцхаймер (Ramirez et al., 2005) на болестта Паркинсон (Lastres-Becker and Fernandez-Ruiz, 2006), множествена склероза, хореята на Хънтингтон, синдром на Турет, епилепсия, инсулт, деменции от различен произход. За обяснение на невропротективното действие на канабиноидите се допускат различни механизми, като модулиране на невромедиацията и калциевата хомеостаза, активиране на протеинкиназата, антиоксидатна активност и други (Drysdale and Platt, 2003; van der Stelt and Di Marzo, 2005). Тези данни предполагат, че в регулацията на когнитивните процеси участват и ендогенните канабиноиди.

Една от областите, в която науките за мозъка постигнаха изключителен напредък през последните десетилетия беше откриването и изучаването на свойствата и механизма на действие на голям брой произвеждани в мозъка биологично активни вещества, в това число и неuropeптидите.

Един от актуалните въпроси, отнасящ се за неuropeптидите е изясняването на тяхната функционална роля и механизмите, чрез които те участват в регулацията на невроналните мозъчни процеси. Актуалността на проблема се определя и от факта, че неuropeптидите като регулатори на различни физиологични процеси, имат изключително важно значение, както за физиологията и патофизиологията, така и за медицинската практика. Нови изследвания разкриват значимата роля на неuropeптидите в патогенезата на депресиите, афективните и тревожните разстройства и възможността за евентуалното им приложение като терапевтични средства.

През последните години се натрупаха редица доказателства за участието на неuropeптидите и в частност на вазоактивния интестинален пептид (VIP) и ангиотензин II (Ang II) в неврохимичните механизми на когнитивните функции и по-специално в процесите на обучение и памет. По сложен и многофункционален модел, VIP и Ang II осъществяват и регулират поведението на експерименталните животни. Предполага се, че VIP и Ang II участват в предаването на информация от хипокампа и други мозъчни области към амигдала и префронтална кора, области свързани с регулацията на т.нар. комплексно поведение. Някои автори допускат участието им в етиопатогенезата на някои неврологични и психични заболявания, като болестта на Алцхаймер, хореята на Хънтингтон, болестта на Паркинсон, както и в депресивни състояния и деменции от различен произход.

Въпреки данните за модулиращо влияние на VIP и Ang II и тяхните рецептори върху хипокампалната невронална активност, все още остава неизяснена тяхната роля в когнитивните процеси, както и въвличането им в променените активности на хипокампа и амигдала, съпровождащи депресивните състояния.

През последните години все по-голяма актуалност придобива въпросът за ролята на неuropeптите в латерализираните поведенчески отговори. Същевременно обаче е намерено, че невромедиаторите и неuropeптите по различен начин участват в неврохимичните механизми на поведенческите реакции, в зависимост от естеството на стимула, водещ до поведенческата реакция, от локализацията на дадения невромедиатор или неuropeпид в една или друга мозъчна структура и особено от взаимодействието им с различните рецепторни подвидове.

Все повече се увеличават доказателствата, че двете полукълба на мозъка на плъх са функционално, анатомично и неврохимично асиметрични. Много неuropeптиди бяха открити в различни мозъчни области, считани за важни в много процеси, напр. изследователско поведение, локомоторна активност, болка, тревожност, обучение и памет. Има данни, които подкрепят асиметрична организация на Ang II, холецистокинин-8, VIP и соматостатин в мозъка. Установено е, че микроинжектирането на холецистокинин-8 в нуклеус акумбенс, амигдала или хипокампалното CA1 поле, соматостатин в неостриатум, вазоактивен интестинален пептид и Ang II в CA1 полето на хипокампа води до поведенческа асиметрия (в изследователското поведение, двигателната активност, състоянието на тревожност, ноцицепцията), в зависимост от страната на инжектиране (Belcheva et al., 1994; 1997; 2000; Tashev et al., 2001; 2004; Tashev and Ivanova, 2015; Ivanova et al., 2008; 2009).

През последните години се проучва активно взаимовръзката между хемисферната мозъчна асиметрия и депресията, установен е съпровождащ заболяването функционален дефицит на двете хемисфери, който се повлиява от антидепресантна терапия.

Въпреки данните за модулиращо влияние на неuropeптите VIP и Ang II върху хипокампалната невронална активност, все още остава неизяснена както тяхната роля, така и на техните рецептори в когнитивните процеси, както и въвличането им в променените активности на хипокампа и амигдала, съпровождащи депресивните състояния. Няма проучвания върху хемисферни разлики в поведенческите отговори след локалното едностранно въвеждане на Ang II в амигдала и едностранното инхибиране на AT1 рецепторите при експериментален модел на депресия.

Турет синдромът е рядко заболяване с честота около 0.05 % или 1 на 2000. Характеризира се с множествени и генерализирани двигателни тикове плюс вокални тикове – покашляне, ръмжене, звуци, провикване, копролални вокализации – извикване на цинична дума. С този синдром често са свързани импулсивност, трудност в задържане на вниманието, натрапливи мисли и действия, личностови проблеми. Понякога тикове имат агресивен или сексуален компонент. Обсесивно – компулсивно разстройство и дефицит на вниманието и хиперактивност (ADHD), когнитивни увреждания и нарушения на съня често се наблюдават при синдрома на Турет. При някои пациенти могат да се появят и сериозни емоционални проблеми, включително и депресия.

Понастоящем, все още не е известен патофизиологичният механизъм, лежащ в основата на синдром на Турет. Много различни системи, мозъчни структури и невронални мрежи се считат за вероятни кандидати. Най-актуалните проучвания,

свързват синдрома на Турет с аномалии в базалните ганглии и нарушен кортико-базален път (Yael et al., 2016).

Независимо от научно-познавателната значимост на Турет синдрома, далеч от пълното изясняване са както механизмите, които обуславят отклоненията в поведенческите реакции при синдром на Турет, така и възможностите за фармакологичното им коригиране.

През последното десетилетие се натрупаха доказателства за участието на канабиноидите и невропептидите в когнитивните процеси, както и за въвличането им в механизмите на невропсихични заболявания като болестта на Алцхаймер, болестта на Паркинсон, депресивни състояния, афективни, тревожни разстройства и др. Все още тези нови факти не са интегрирани в цялостното разбиране за ролята на канабиноидите и невропептидите, както в обучителните и паметовите процеси, така и в патофизиологичните механизми на паметовите увреждания и паметовите дефицити при невродегенеративни или психични заболявания.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Един от актуалните въпроси, отнасящ се за канабиноидите и невропептидите е изясняването на тяхната функционална роля и механизмите, чрез които те участват в регулацията на невроналните мозъчни процеси. Актуалността на проблема се определя и от факта, че както канабиноидите, така и невропептидите като регулатори на различни физиологични процеси, имат изключително важно значение както за физиологията и патофизиологията, така и за медицинската практика. Нови изследвания разкриват значимата роля на канабиноидите и на невропептидите в патогенезата на депресиите, болестта на Алцхаймер, болестта на Паркинсон, синдром на Турет, афективните и тревожните разстройства, и възможността за евентуалното им приложение като терапевтични средства.

Твърде оскъдни са данните за участието на невропептидите в латерализираните поведенчески реакции и механизмите на действие на невропептиди на ниво субкортикални мозъчни структури в обучението и паметта при депресивни състояния, при които дадена структура има ключово значение.

С оглед на това си поставихме за **ЦЕЛ**:

- Да се проучи ролята на мозъчните канабиноидни CB1 рецептори и на невропептидите VIP и Ang II в обучението и паметта при депресивно-подобно състояние (експериментален модел на депресия – двустранна олфакторна булбектомия).
- Да се проучи хемисферната асиметрия в процесите на обучение и памет при депресивно-подобно състояние (експериментален модел на депресия – двустранна олфакторна булбектомия) след локално въвеждане на невропептидите VIP, Ang II и техни рецепторни агонисти и антагонисти в хипокамп или амигдала.
- Да се проучат клетъчно-молекулните механизми на амфетамин-индуцираното стереотипно поведение при поведенческа сенсибилизация (експериментален модел на синдром на Турет).

За постигане на тази цел си поставихме следните **ЗАДАЧИ**:

1. Проучване участието на **селективните CB1 лиганди** (HU 210 - рецепторен агонист и SR 141716A - рецепторен антагонист) след i.c.v. въвеждане **на фона на развито депресивно-подобно състояние**, в резултат на олфакторна булбектомия (14 дни след OBX), върху **експлораторното поведение, обучението и паметта**.
2. Проучване участието на **VIP** и на VPAC рецепторите в **експлораторното поведение, обучението и паметта** след микроинжектиране на VIP и VIP₆₋₂₈ (неспецифичен антагонист на VPAC рецепторите) в **CA1 полето на хипокампа** на плъхове с **развито депресивно-подобно състояние** (14 дни след OBX).
3. Проучване участието на **Ang II** и на **AT1 рецепторите** в **експлораторното поведение, обучението и паметта** след микроинжектиране на Ang II и лосартан (AT1 рецепторен антагонист) в **CA1 полето на хипокампа** на плъхове с **развито депресивно-подобно състояние** (14 дни след OBX).
4. Проучване участието на **Ang II** и на **AT1 рецепторите** в **експлораторното поведение, обучението и паметта** след микроинжектиране на Ang II и лосартан (AT1 рецепторен антагонист) в **централното ядро на амигдала (CeA)** на плъхове с **развито депресивно-подобно състояние** (14 дни след OBX).
5. Да се проучат **хемисферните разлики** в **експлораторното поведение, обучителните и паметови процеси** на неuropeптидите **VIP и Ang II** и съответно техните **VPAC и AT1 рецептори** след унилатерално въвеждане на VIP, VIP₆₋₂₈ (неспецифичен антагонист на VPAC рецепторите), на Ang II и лосартан (AT1 рецепторен антагонист) в **CA1 полето на хипокампа** на плъхове с **развито депресивно-подобно състояние** (14 дни след OBX).
6. Да се проучат **хемисферните разлики** в **експлораторното поведение, обучителните и паметови процеси** на **Ang II и AT1 рецепторите** след унилатерално въвеждане Ang II и лосартан (AT1 рецепторен антагонист) в **централното ядро на амигдала (CeA)** на плъхове с **развито депресивно-подобно състояние** (14 дни след OBX).
7. Да се проучат ефектите на **TAT-STEP46(C-S)** (синтезирана субстрат прихващаща изоформа на STEP), въведена във **вентролатералния стриатум (VLS)** и кортекс върху **амфетамин-индуцираните поведенчески стереотипии** (експериментален модел на синдром на Турет).

8. Чрез имунохистохимични изследвания да се установи дали **TAT-STEP46(C-S)**, навлиза в клетките на мястото на инфузиране.
9. Да се проучат поведенческите ефекти на амфетамин върху **STEP knockout мишки**.
10. Да се проучат ефектите на **TAT-STEP46(C-S)** върху амплитудата на възбуждащия постсинаптичен потенциал (EPSP) след високочестотно стимулиране на кортикостриатални срезове

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА ДЕПРЕСИЯ

1.1. Експериментални животни

Опитите бяха проведени върху 368 мъжки Wistar плъхове (220 – 250 g по време на операциите). Животните бяха отглеждани в полипропиленови клетки със свободен достъп до вода и храна (гранулирана, стандартна) при постоянна стайна температура $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, с регулиран цикъл на осветление: 12 часа светлина / 12 часа тъмнина. Поведенческите експерименти се провеждаха между 10:00 и 13:00 часа.

Експериментите се провеждаха съгласно правилата на Етичната Комисия на Институт по Невробиология, БАН и на Комисията за научна етика към Медицинския университет, София (KENIMUS).

1.2. Стереотаксична техника и използвани хирургични процедури

1.2.1. Двустранна олфакторна булбектомия у плъхове (OBX) - експериментален модел на депресия

Двустранна олфакторна булбектомия се провежда по метода описан от Kelly и съавтори (1997). След анестезия с Calypsol (50 mg/kg, i.p.), експерименталните животни се фиксират в стереотаксичен апарат (Stoelting Co, USA.). След отпрепарирание на меките тъкани на главата и премахване на периоста, черепните кости се пробиват с бормашина (диаметър на борчетата 2 mm) в ляво и в дясно от средната линия. Координатите на bulbus olfactorius се определят според атласа на Pellegrino и Cushman (1967) за плъхове порода Wistar (спрямо брегмата $A = 8.0$; $L = \pm 2.0$). Булбектомията се извършва като двата bulbus olfactorius се аспирират чрез игла от неръждаема стомана, прикрепена към водна помпа. След аспирацията, като кръвоспиращо средство в отворите се поставя Gelaspon. След операцията на животните се осигурява 7-дневен възстановителен период, през който те ежедневно се третират с антибиотици - локално (Nemibacin) и интраперитонеално (Gentamycin) в продължение на 5 дни и се “хендлират”, с цел адаптиране към експерименталните условия.

1.2.2. Имплантиране на канюли в мозъчни структури на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)

На седмия ден след олфакторната булбектомия, след анестезия с Calypsol (50 mg/kg, i.p.) експерименталните животни (мъжки Wistar плъхове) бяха фиксирани в стереотаксичен апарат (Stoelting Co, USA.). След отпрепарирание на меките тъкани на главата и премахване на периоста, черепните кости бяха пробивани с бормашина в ляво и в дясно от средната линия и водещите канюли от неръждаема стомана, бяха имплантирани двустранно в мозъчните структури според атласа на Pellegrino и Cushman (1967) за CA1 полето на хипокампа спрямо брегмата ($P = 4.5$; $L = \pm 2.5$ и височина $h = -2.0$); за централното ядро на амигдала (CeA) спрямо брегмата ($P = 0.6$ mm; $L = \pm 4.5$ mm; $h = -7.5$ mm) и едностранно за десния ventriculus ventrolateralis ($P = 0.9$ mm; $L = \pm 1.6$ mm; $h = -3.0$ mm).

Канюли, с височина 11 mm, се поставят вертикално на съответните дълбочина. С предпазна цел, около водещите канюли, със зъботехнически дуракрил се монтира пластмасов пръстен, с височина 1 cm. Мандрени от неръждаема стомана се поставят във водещите канюли.

След имплантиране на канюлите, преди започване на поведенческите експерименти, животните бяха оставяни за възстановителен период от 7 дни. През този период животните бяха ежедневно "хендлирани". Изследваните субстанции бяха разтворяни "ex tempore" във физ. р-р и микроинжектирани в лявата, дясната или в двете структури, посредством инжекционна канюла, 1 mm по-дълга от водещата. Изследваните вещества (рН 7.4) се инжектираха в обем, съобразен с големината на мозъчната структура в продължение на 1 мин, като инжекционната канюла бе оставяна на мястото си за още 30 секунди.

1.3. Поведенчески методи

Наши проучвания (Moura, Venkitaramani, Tashev et al., 2011) върху ефекта от транспортирането на животните от експерименталната зала до вивариума показват, че за укрепване на паметовите следи, животните не трябва да се преместват в нова среда до 3 часа след тестовете за памет, тъй като развиват ретроградна амнезия и води до нарушаване на дългосрочната памет. Тези амнестични ефекти са свързани с биохимични промени в мозъчните области, свързани с процесите на паметта. За активирането на NMDA и AMPA рецепторите след тренировъчната сесия е необходимо време: СА1 полето на хипокампа (30 мин), амигдала (30 мин), енториналният (60 мин) и париеталният кортекс (90 мин). Тези данни подчертават, че поведенческите изследвания, включващи паметта при плъхове, трябва да се вземат под внимание (не рядко игнорирани лабораторни процедури), тъй като те могат значително да се намесят в експерименталните резултати (Moura, Venkitaramani, Tashev et al., 2011).

1.3.1. Метод за определяне на промените в експлораторното поведение

Промените в изследователското поведение се проследяват в апарат Opto Varimex (Columbus Instruments, USA), свързан с компютър. Избирателното отчитане на броя на хоризонталните и вертикалните движения на експерименталните животни се извършва чрез фотоклетки за определен период от време. Автоматично се записват данните, получени на всяка минута от наблюдението.

1.3.2. Методи за определяне на степента и динамиката на обучението и запаметяването

1.3.2.1. Метод за обучение за активно двупосочно избягване – shuttle box

Обучението за активно двупосочно избягване чрез отрицателно подкрепление (електрически ток) се осъществява в shuttle-box апарат, свързан с компютър и подходяща програма. Обучението се състои от тренировъчна сесия, по време на която на експерименталното животно се подават условен (светлина) и безусловен (ел. ток) дразнители, като условният дразнител предхожда прилагането на безусловния. Регистрират се следните поведенчески реакции: условно избягване - авойданс (avoidance, Av), безусловно избягване - искейп (escape, Es) и неадекватни реакции (inadequate reaction, IR). Обучението се провежда в 2 последователни дни. Тестът за памет се провежда на 24-ия час след 2-ия обучителен ден. Като показател за обученост и запаметяване се отчита броя на авойдансите и броя на неадекватните реакции.

1.3.2.2. Метод за обучение за пасивно избягване – step through

Обучението за пасивно избягване с отрицателно подкрепление се провежда чрез апарат step through. Апаратът се състои от две камери: външна (по-малка, бяла) и

вътрешна (по-голяма, черна) съединени с врата тип „гилотина“. Обучението се състои от еднократна тренировка. Всяко животно се поставя на платформата в осветената камера при отворена врата. След влизане на животното в затъмненото помещение, вратата се затваря и по подовата решетка се подава електрически ток (50 V, АС). Тестът за памет се провежда на 3-ия и 24-ия час след обучението, като всяко животно отново се поставя в осветената камера при отворена врата и престоя на плъха там се отчита в секунди. При тестирането за памет не се включва електрически ток. За критерий на обученост се приема престой на животните в осветената камера за период от 180 секунди.

1.4. Въвеждане на вещества на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)

Изследваните вещества (канабиноидните лиганди – HU 210 и SR 141716A; VIP; VIP₆₋₂₈; Ang II; лосартан,) бяха разтваряни “*ex tempore*” във физ. р-р и микроинжектирани посредством инжекционна канюла с 1 mm по-дълга от водещата. Субстанциите с pH = 7.4 бяха въвеждани в: СА1 полето на хипокампа в обем 1 µl в продължение на 1 минута, като инжекционната канюла бе оставяна на мястото си за още 30 секунди; в CeA в обем 0.3 µl в продължение на 2 минута и инжекционната канюла бе оставяна на мястото си още за 1 мин; в десния ventriculus ventrolateralis в обем 1 µl в продължение на 1 минута, като инжекционната канюла бе оставяна на мястото си за още 30 секунди.

При метода за изследване на експлораторното поведение един и същи плъх беше микроинжектиран “*at random*” в лявата, в дясната или в двете страни на избраната мозъчна структура с изследваното вещество или с физ. р-р всеки трети ден, докато при методите за обучение и памет shuttle box и step through, веществата се въвеждаха на различни животни разделени в 6 групи: 3 контролни групи, инжектирани с физ. р-р (само в лявата, само в дясната или двустранно в мозъчната структура) и 3 експериментални групи, инжектирани с изследваното вещество (само в лявата, само в дясната или двустранно).

При метода shuttle box веществата бяха въвеждани 5 мин преди обучителните сесии и преди теста за памет, а при метода step through - 5 мин преди началото на обучението и не са прилагани преди тестовете за памет (на 3-ия и 24-ия час след обучението).

Дизайн на опитите при модел на депресия (олфакторна булбектомия - OBX):



2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА СИНДРОМ НА ТУРЕТ

Опитите бяха проведени върху 72 мъжки Sprague Dawley плъхове (250 – 280g по време на операциите) и 66 **STEP knockout** мишки (КО-STEP). Животните бяха отглеждани в полипропиленови клетки със свободен достъп до вода и храна (гранулирана, стандартна) при постоянна стайна температура $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, с регулиран цикъл на осветление: 12 часа светлина/12 часа тъмнина.

Експериментите се провеждаха съгласно правилата на Етичната Комисия на *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Experimental Animals and approved by the Yale University Animal Care and Use Committee*.

2.1. Имплантиране на канюли в мозъчни структури на плъх при синдром на Турет

След анестезия с Equithesin (4.5 ml/kg i.p.) Sprague Dawley плъховете бяха фиксирани в стереотаксичен апарат - Stoelting Co, USA. След отпрепарирание на меките тъкани на главата и премахване на периоста, черепните кости бяха пробивани с бормашина в ляво и в дясно от средната линия и водещите канюли от неръждаема стомана бяха имплантирани двустранно в вентролатерален стриатум (ventrolateral striatum – VLS) по координати спрямо брегмата ($A = 0.7 \text{ mm}$; $L = \pm 4 \text{ mm}$ и $h = - 5.5 \text{ mm}$) според атласа на Swanson (1992).

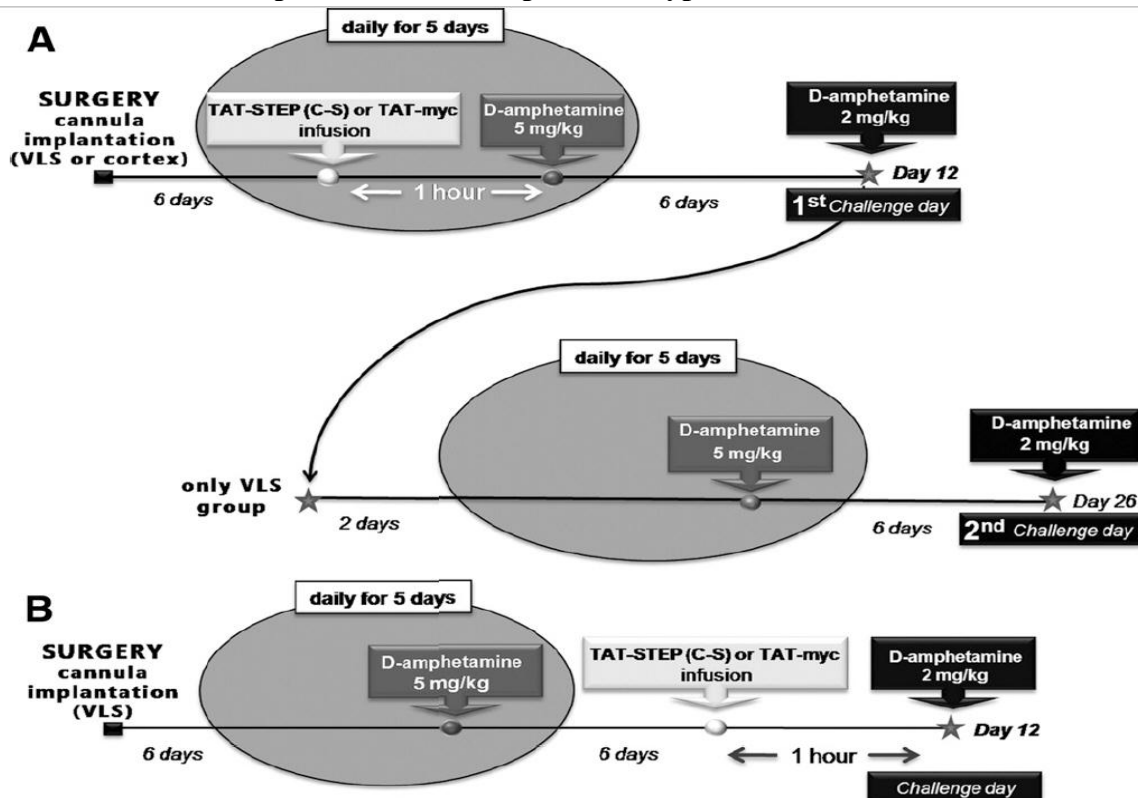
Водещите канюли, бяха поставяни вертикално на съответната дълбочина в ventrolateral striatum и бяха фиксирани с дуракрил. Мандрени от неръждаема стомана бяха поставяни във водещите канюли. След операцията, преди започване на поведенческите експерименти, животните бяха оставяни за възстановителен период от 7 до 10 дни. През този период животните бяха ежедневно "хендлирани".

2.2. Дизайн на опитите за създаване на модел на синдром на Турет

D-amphetamine sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) беше разтворен в 0.9% физ. р-р. Животните бяха инжектирани i.p. с еднократна дневна доза (5mg/kg) в продължение на 5 дни. 6 дни след това бяха инжектирани с 2 mg/kg D-amphetamine sulfate на тестващ ден 1.

TAT-MYC беше инфузиран за контрола. TAT-STEP46(C-S) и TAT-MYC бяха инфузирани билатерално с 10 μl "Hamilton" спринцовка на инфузионна помпа с 0.25 $\mu\text{l}/\text{мин.}$, като инжекционната канюла беше оставяна на мястото още за 30 секунди след приключване на инфузията.

Дизайн на опитите при модел на синдрома на Турет:



A. Шест дни след билатерално имплантиране на канюли във вентролатерален стриатум (VLS) или в кортекс, плъховете бяха инфузирани със STEP протеин, TAT-STEP(C-S), или TAT-мус 1 час преди инжектирането им с amphetamine (5 mg/kg), и това беше повтаряно 5 дена. Първият "challenge day" се извърши след 6 дена почивка като се инжектираше само еднократно amphetamine в доза 2 mg/kg (12^{-ти} ден).

В следващата част на този експеримент плъховете бяха отново инжектирани с amphetamine (5 mg/kg) за 5 поредни дни, но този път без инфузирането на STEP протеин, TAT-STEP(C-S) или TAT-мус. След още 6 дена животните бяха инжектирани с ниска доза amphetamine 2 mg/kg (26-ти ден).

B. Шест дни след билатерално имплантиране на канюли във вентролатерален стриатум (VLS), плъховете бяха инжектирани с amphetamine (5 mg/kg) за 5 поредни дни. На 12-тия ден им беше инжектирана ниска доза amphetamine (2 mg/kg) 1 час преди да им бъде инфузиран TAT-STEP(C-S) or TAT-мус.

2.3. Поведенчески изследвания

Поведението на плъховете беше оценявано по модифицирана скала на Creese and Iversen, с допълнително отчитане на движенията на главата (нагоре и надолу); броене на вертикалните и хоризонталните движения (показател за локомоторната активност). Всички опити бяха записвани с видеокамера и отчитани на запис. Поведението беше отчитано по поведенчески индекс по следната скала: 1- заспал; 2- нормална активност; 3 - повишена активност; 4 - тичащ с резки движения; 5 - бавна експлораторна активност; 6 - непродължително стереотипно душене с бърза повтаряща се експлорация; 7 - продължително стереотипно душене с вертикални изправяния; 8- продължително фокусирано стереотипно душене в една област.

Поведенческият индекс беше отчитан на всеки 5 мин. в продължение на 30 минути. Броят на движенията на главата (нагоре и надолу) и броят на вертикалните и хоризонталните движения се отчитаха за целия 30-минутен период на наблюдение.

2.4. Имунохистохимични изследвания

Имунохистохимичният анализ определя продължителността на времетраенето на откриването на TAT-STEP(C-S) – заместващия протеин след инфузии и степента на неговата дифузия. Плъховете с имплантирани канюли във VLS бяха инфузирани с TAT-STEP(C-S). Плъховете бяха анестезирани на 30-та, 60-та и 360-та минута след инфузията и перфузирани интракардиално с леденостуден 4% параформалдехид в 0.1 M фосфатен буфер. Мозъците бяха обработени за имуноцитохимия, а криостатните слайдове (10 μm) бяха оцветени с анти-мус антитяло, за да се определи дифузионния модел на TAT-STEP(C-S). Тъканните срезове бяха инкубирани с Alexa Fluor 488 анти-*mouse* вторично антитяло (1: 250, Molecular Probes, Eugene, OR) в продължение на 1 час при стайна температура, преди да бъдат подложени за наблюдение с помощта на флуоресцентен микроскоп (Carl Zeiss Axiovert 2000). Попаденията на канюлите бяха верифицирани чрез оцветяване с *Crestyl violet* (върховете на канюлите трябва да са на 0.5 mm разстояние една от друга).

2.5. Електрофизиологични изследвания

Короналните срезове (200-300 μm), отрязани с вибратором, първо бяха инкубирани (1 час) в присъствието на TAT-STEP(CS) (300 nmol / L) или TAT-мус (300 nmol след това бяха прехвърлени в камерата за запис, потопена в непрекъснато течаща изкуствена цереброспинална течност (ACSF) (33°C, 2-3 mL/min), обогатена с 95% кислород и 5% въглероден диоксид. Съставът на разтвора в банята беше (в mmol/l): 126 натриев хлорид, 2.5 калиев хлорид, 1.2 магнезиев хлорид, 1.2 натриев дихидроген фосфат, 2.4 калциев хлорид, 11 глюкоза, 25 натриев хидрогенкарбонат. При някои експерименти TAT-STEP(C-S) или TAT-мус бяха прилагани по време на електрофизиологичните записи за 30-40 минути след индуцирането на кортикостриаталната LTP. При други експерименти, амфетамин (10 mol/l; 10 min) беше прилаган върху стриатални срезове, третирани предварително с TAT-мус или TAT-STEP(C-S). Сигналите бяха записвани с помощта на Axoclamp 2A усилвател, на отделен осцилоскоп и съхранявани и анализирани на цифрова система (pClamp 8, Axon Instruments, Union City, California).

За синаптичната стимулация бяха използвани биполярни електроди. Те бяха локализиращи в бялото вещество между кората и стриатума, за да активират кортикостриаталните влакна. Възбудимите постсинаптични потенциали (EPSPs) бяха предизвиквани при 0.1 Hz в присъствието на 10 mol/l бикикулин до блокиране на предаването, медирано от GABA-A рецепторите.

Беше използвана високочестотна стимулация (HFS) за индуциране на кортикостриаталната синаптична пластичност (продължителност 3 секунди, честота 100 Hz, интервал от 20 секунди) и LFS (2 Hz 10 min) на кортикостриаталните влакна. Дълготрайното потенциране (LTP) се индуцираше в отговор на HFS след отстраняването на магнезиевите йони от разтвора, докато дълготрайната депресия (LTD) се индуцираше от HFS при наличие на физиологични концентрации на магнезий (1.2 mmol/l). Алтернативната форма на LTD от LFS беше изследвана в разтвор без магнезий.

Количествените данни за модификациите на EPSP бяха изразявани като процент от контролите, като последните представляват средната стойност на отговорите, записани по време на стабилен период (5-10 мин) преди повтарящата се (HFS или LFS) синаптична стимулация. Резултатите бяха обработени с ANOVA и t-тест.

3. Верификация

След приключване на поведенческите опити беше провеждана анатомична верификация. Булбектомията беше верифицирана макроскопски, чрез сравняване с булбусите на интактни животни. При установена непълна деструкция на булбусите (< от 80%), данните получени от поведенческите тестове, бяха изключени от обработката на резултатите.

Верификацията на стереотаксичните попадения беше осъществена чрез микроинжектиране на 2% Fast green непосредствено преди декапитирането, следвано от хистологичен анализ на коронарни мозъчни срезове през областа на хипокампа, амигдала или вентролатералния стриатум (VLS). Експерименталните данни, получени от животни, при които изследваните вещества са били неточно или несиметрично инжектирани бяха изключени от обработката на резултатите.

4. Статистическа обработка на резултатите

Получените експериментални данни са обработени с еднофакторен, двуфакторен или трифакторен ANOVA.

Резултатите получени от step through теста са обработени с χ^2 .

За определяне на достоверността на разликите между групите, като *post hoc* са използвани Student-Newman-Keuls (SNK) и t-тест, при минимална достоверност $P \leq 0.05$.

5. Използвани фармакологични средства:

Angiotensin II (Tocris); Angiotensin IV (Tocris); D-amphetamine sulfate (Sigma-Aldrich); HU 210 (Tocris); Losartan (Tocris); SR 141716A;
Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) (Sigma); VIP₆₋₂₈ (Tocris)

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНИЯ

1. Промени в експлораторното поведение на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)

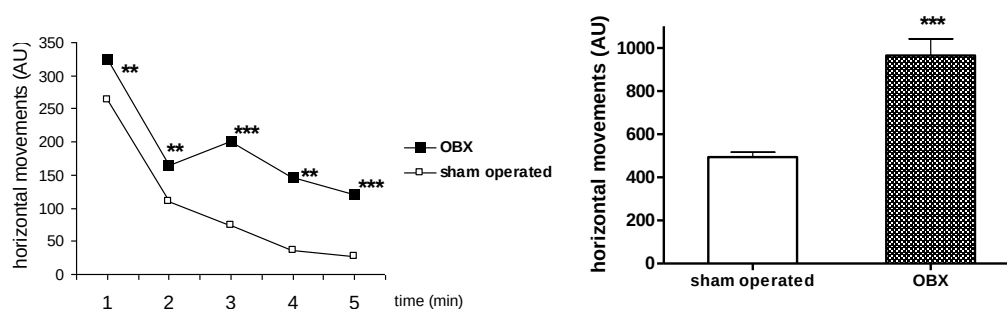
Две-три седмици след двустранната олфакторна булбектомия (OBX) се проявява съвкупност от поведенчески, морфологични, ендокринни, имунни и невротрансмитерни промени, голяма част от които наподобяват промените при пациенти с депресия. Най-характерният белег на OBX е повишената двигателна активност в нова среда (open field) (van Riezen and Leonard, 1990). Експлораторната и нощната двигателна активност на OBX-животните са повишени (Giardina and Radek, 1991; Vinkers et al., 2009), а хабитуацията към нова среда е нарушена (Sieck, 1972; Primeaux and Holmes, 1999).

OBX моделът е уникален сред всички останали модели с развитието на невродегенеративни процеси в мозъка. Корелацията между структурните, функционалните и биохимичните промени в мозъка на плъхове и пациенти с депресия е причина олфакторната булбектомия да се използва като модел за проследяване на нарушените взаимовръзки между системите, участващи в патологията на депресията, както и за изучаване механизмите на невродегенеративните мозъчни процеси.

Депресията при пациенти се съпътства от промени в мозъчни структури като хипокамп, амигдала, префронтални и фронтални области на мозъчната кора (Bremner, 2002; Drevets et al., 2008), които са сходни с измененията наблюдавани при OBX-плъхове (Wrynn et al., 2000).

Експлораторното поведение се разглежда като най-всеобща от всички форми на обучение (Platel and Porsolt, 1982).

Нашите изследвания показаха, че след 15 дни, двустранното премахване на *bulbi olfactorii* статистически достоверно активира изследователското поведение на OBX-плъховете в сравнение с sham-оперираните контроли. Броят на хоризонталните и вертикални движения не намалява постепенно, а се активира след 2-рата мин., т.е. хабитуацията е нарушена (Фиг. 1).



Фиг.1. Ефект на двустранната олфакторна булбектомия (OBX) върху броя на хоризонталните движения за всяка минута поотделно и общия брой на хоризонталните движения за период от 5 минути. $n = 10$ $**P \leq 0.01$; $***P \leq 0.001$ – достоверност спрямо съответните sham-оперирани контроли ($\pm$ S.E.M.).

Високата двигателна активност на OBX-плъховете в нова среда се обяснява с повишената чувствителност и реактивност или с нарушената хабитуация на животните към заобикалящата ги стресираща среда (van Riesen and Leonard, 1990). Според Mar и

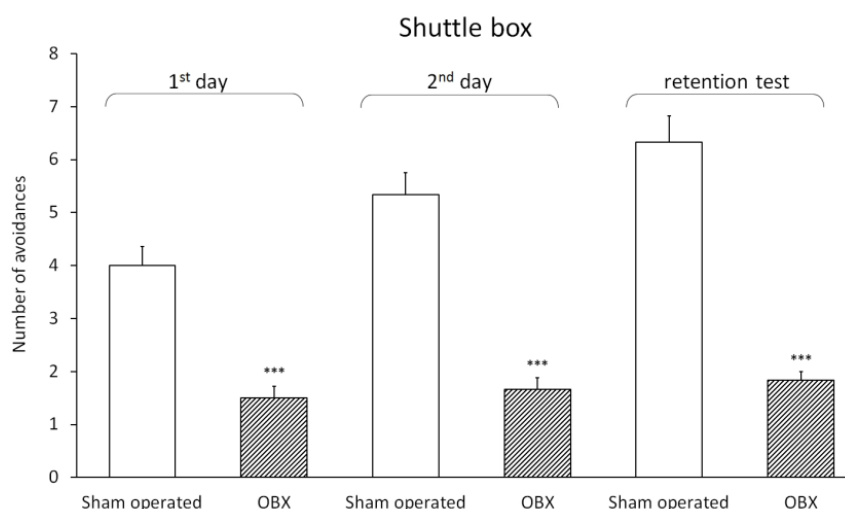
сътр. (2002) в основата на повишената двигателна активност, а и на други поведенчески реакции на OBX-животните, стои невъзможността им за адаптация към променящите се условия, в които са поставени. Затруднената адаптация към ежедневния стрес е характерна черта и за депресивните състояния (Ravindran et al., 1995).

2. Промени в обучението и запаметяването на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)

Shuttle box method

Двустранното премахване на *bulbi olfaktorii* (OBX) води до влошаване на обучителните и паметовите процеси.

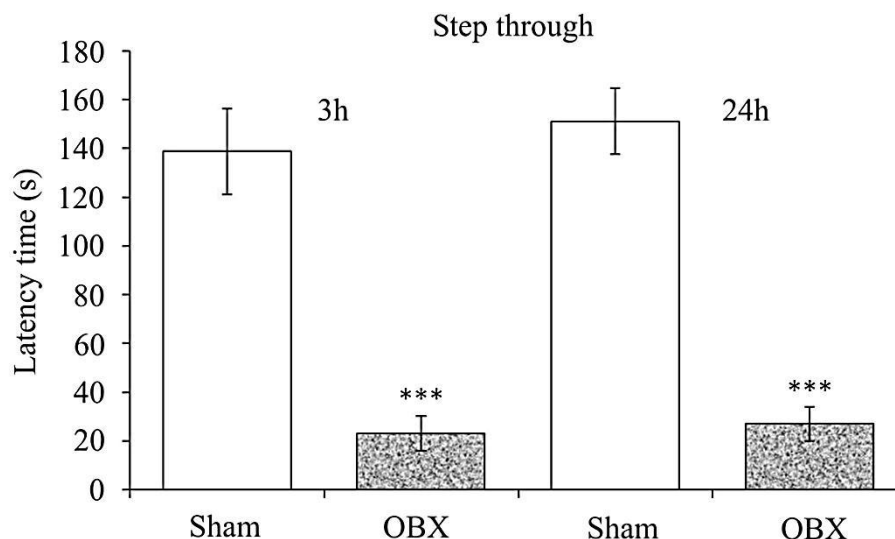
Post hoc сравненията показаха, че при OBX-плъховете в сравнение с sham-оперираните контроли броя на авойдансите е достоверно намален както по-време на обучението през I-ви ден ($P \leq 0.001$) и II-ри ден ($P \leq 0.001$), така и при теста за памет ($P \leq 0.001$) (Фиг. 3).



Фиг. 3. Ефект на двустранната олфакторна булбектомия (OBX) върху броя „авойданси” по време на 1-ви и 2-ри обучителен ден и теста за ретенция (на 24-ия час след 2-ри обучителен ден) (*shuttle box*). $n = 10$ *** $P \leq 0.001$ – достоверност спрямо съответните sham-оперирани контроли ($\pm$ S.E.M.).

Step through method

OBX предизвика достоверно намаляване на латентното време при тестове за ретенция на 3-ия час ($P \leq 0.001$) и на 24-ия час ($P \leq 0.001$) и драстично намаляване (до 0 % на 3-ия и 24-ия час) на процента на плъховете, които достигат критерия на обученост в сравнение с sham-оперираните плъхове ($\chi^2 = 9.643$, $P \leq 0.001$) (Фиг. 4).



Фиг. 4. Ефект на двустранната олфакторна булбектомия (OBX) върху латентното време при тестовите за ретенция на 3-ти и 24-и час (*step through*). *** $P \leq 0.001$ - достоверност спрямо съответните sham оперирани контроли ($\pm$ S.E.M.).

Резултатите показват, че олфакторната булбектомия влошава обучението и запаметяването. Според редица изследвания, нарушенията в обучението и паметта на OBX- плъховете не се обуславят от липсата на обонятелни сигнали, а са пряко следствие от нарушената хипокампадна функция (Nesterova et al., 2008). OBX предизвиква промени в глутаматергичната и холинергичната системи, които осъществяват сложно взаимодействие помежду си и оказват модулиращо влияние върху паметовите процеси в хипокампа (Jafari-Sabet, 2006). След OBX е регистрирана намалена плътност на NMDA (N-метил D-аспартат) рецепторите в церебрална кора и амигдала (Ho et al., 2001), а в голям брой мозъчни области функцията им е нарушена (Tadano et al., 2004). В хипокампа се установява дисбаланс на метаботропните глутаматни рецептори (Wierońska et al., 2008). Нарушенията на холинергичната система в мозъчни структури, сред които е и хипокампа, имат доказана роля в увредената паметова функция при този модел на депресия (Hozumi et al., 2003; Hallam et al., 2004).

3. Участие на мозъчните канабиноидни CB1 рецептори в паметови функции на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)

Сложната функция на ендоканабиноидната система включва координация на движението, процеси на паметта, контрол на апетита, болката и невропротекция. От значение са ефектите на канабиноидите, включващи успокояване на болката, мускулна релаксация, противовъзпалителни и антиалергични ефекти, стимулиране на апетита, бронходилатация, невропротекция и други (Grotenhermen, 2005; Hazekamp and Grotenhermen, 2010).

Знае се със сигурност, че действието на канабиноидите се медира поне от 2 подтипа специфични рецептора на канабиноидите (Devane et al., 1988, 1992; Matsuda et al., 1990). Тези рецептори не се свързват с други биологично-активни вещества (невромедиатори, хормони, пептиди), но голям афинитет към тях проявяват природните или синтетичните канабиноиди.

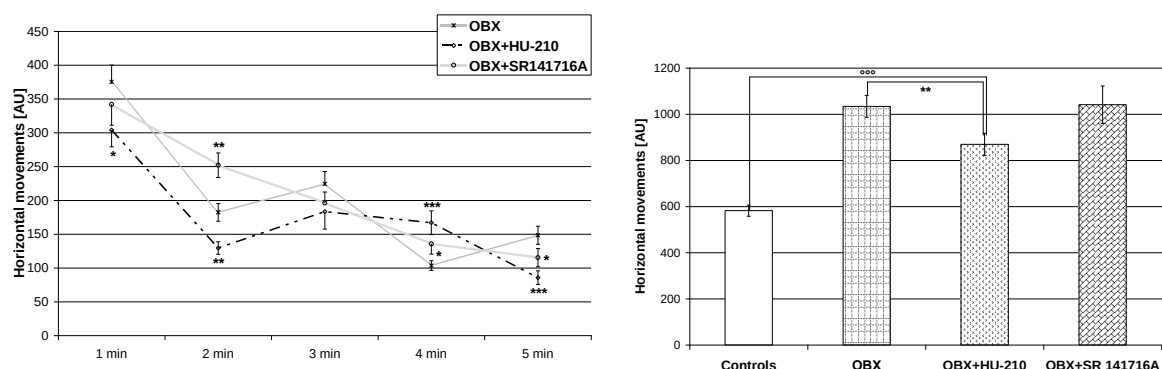
Един от най-силните, селективни агонисти на CB₁R е синтетичния HU 210. Най-мощният известен CB₁R-антагонист е SR 141716A (Rinaldi-Carmona et al., 1994), който блокира *in vitro* и *in vivo* действието на канабиноидните агонисти.

3.1. Промени в експлораторното поведение след *i.c.v.* въвеждане на селективния агонист HU 210 и селективния антагонист SR 141716A на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)

Известно е, че ендоканабиноидната система, със своята модулаторна роля в ЦНС, повлиява настроението и тревожността и има важно значение в патогенезата на депресивните разстройства (Vinod and Hungund, 2006). Това ни даде основание да проучим участието на мозъчните канабиноидни CB₁ рецептори при депресивни състояния.

Бяха проследени ефектите върху експлораторното поведение на агониста HU 210 (5 µg/1µl) и антагониста SR 141716A (3 µg/1µl) на CB₁ рецепторите, въведени *i.c.v.* на фона на развита депресия (OBX).

Анализът на броя на хоризонталните движения за всяка минута поотделно за 5-минутния период на отчитане показва, че HU 210 на фона на развита депресия достоверно намалява броя на хоризонталните движения: на 1-ва ($P \leq 0.05$) и 2-ра мин. ($P \leq 0.01$), а на 4-та ги повишава ($P \leq 0.001$), след което отново ги намалява на 5-та мин. ($P \leq 0.001$), т.е. HU 210 от 1-ва до 3-та мин. не повлиява нарушената при OBX плъхове хабитуация, а след 3-тата мин. проявява тенденция към нормализиране на хабитуацията (Фиг. 7).



Фиг. 7. Ефекти на HU 210 (5 µg) и SR 141716A (3 µg), въведени *i.c.v.*, върху броя на хоризонталните движения на плъхове с двустранна олфакторна булбектомия (OBX) за всяка минута поотделно и общия брой на хоризонталните движения за период от 5 мин. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо OBX плъховете; ^{ooo} $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо контролите с физ. р-р. ($\pm$ S.E.M).

SR 141716A, на фона на развита депресия, достоверно повишава броя на хоризонталните движения в сравнение с OBX-плъховете и sham контролите (повишава на 2-ра ($P \leq 0.01$) и 4-та мин. ($P \leq 0.05$) и ги намалява на 5-та мин. ($P \leq 0.05$) (Фиг. 7).

Post hoc тестът показва, че HU 210 ($P \leq 0.01$) достоверно понижава общия брой на хоризонталните движения ($P \leq 0.001$) в сравнение с OBX плъховете, но той остава значимо по-висок от този на контролите, третиран с физ. р-р (Фиг. 7).

SR 141716A не променя значимо общия брой на хоризонталните движения на OBX-плъховете за целия 5-минутен период (Фиг. 7).

Стимулирането на CB1 рецепторите (HU 210) на OBX-плъховете, води до потискане на повишеното експлораторното поведение, като възстановява нарушената хабитуация. Най-общо, би могло да се допусне, че стимулирането на CB1 рецепторите при депресия проявява тенденция към премахване на депресивно-подобното състояние.

Инхибирането на CB1 рецепторите (SR 141716A) не повлиява съществено повишената след OBX двигателна активност на плъховете, т.е. блокирането на CB1 рецепторите най-вероятно не повлиява депресивно-подобното състояние.

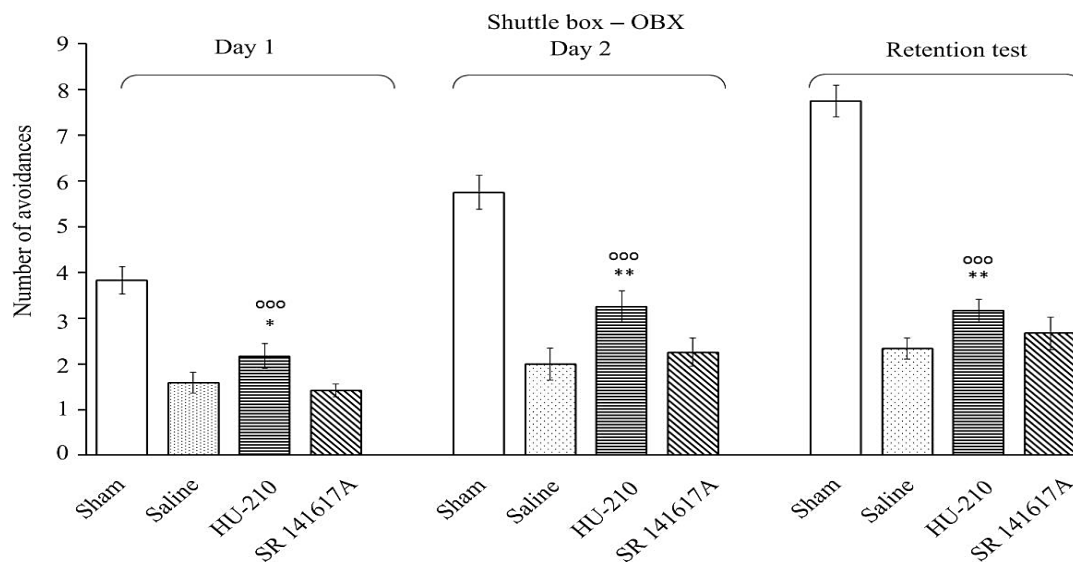
3.2. Промени в обучението и запаметяването след i.c.v. въвеждане на селективния агонист HU 210 и селективния антагонист SR 141716A на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)

Shuttle box method

Бяха проследени ефектите на HU 210 (5 µg/1µl) и SR 141716A (3 µg/1µl), въведени i.c.v. на фона на развита депресия след олфакторна булбектомия (OBX) върху обучението и паметта.

Post-hoc тестът показва, че HU 210 подобрява обучението и запаметяването, т.е. достоверно повишава броя на авойдансите на микроинжектираните OBX плъхове на I-вия ($P \leq 0.05$) и на II-ия обучителен ден ($P \leq 0.01$) и при теста за ретенция ($P \leq 0.01$) в сравнение с OBX контролите, инжектирани с физ. р-р. Сравнявайки обаче, ефектите на HU 210, въведен на фона на развита депресия с sham оперираните животни, се установява достоверно понижение на броя на авойдансите на I-ия ($P \leq 0.001$) и на II-ия обучителен ден ($P \leq 0.001$), т.е. HU 210, не може да компенсира увредените от булбектомията обучителни процеси (Фиг. 10).

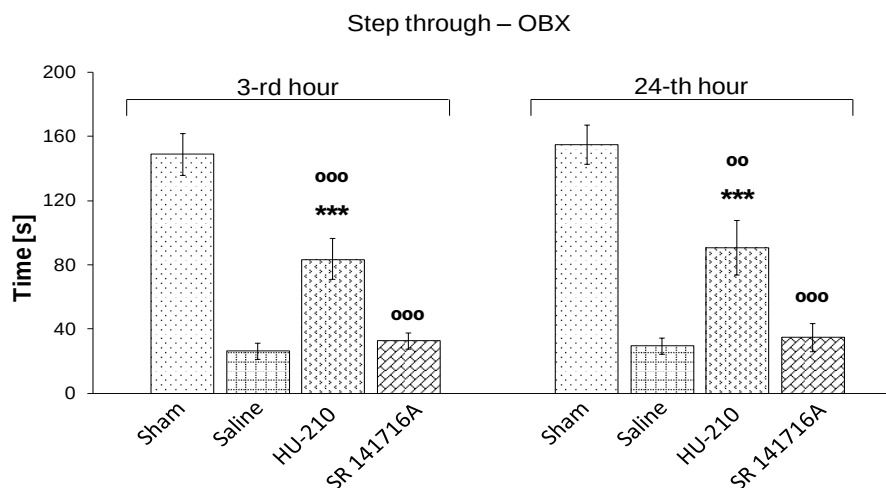
SR 141716A не променя значимо показателите на I-вия ($P = NS$) и на II-ия обучителен ден и при теста за ретенция ($P = NS$) в сравнение с OBX контролите, но в сравнение с sham оперираните животни броя на авойдансите на I-ия ($P \leq 0.001$) и на II-ия обучителен ден ($P \leq 0.001$) остава достоверно понижен (Фиг. 10). При сравняване ефектите на HU 210 и SR 141716A с sham оперираните животни се установи, че при теста за ретенция и двете съединения не могат да компенсират паметовия дефицит, предизвикан от депресивното състояние ($P \leq 0.001$ и $P \leq 0.001$, съотв.) (Фиг. 10).



Фиг. 10. Ефекти на HU 210 (5 μ g) и SR141716A (3 μ g), въведени i.c.v. на фона на развита депресия (OBX), върху броя авойданси на I-ви и II-ри обучителен ден и теста за ретенция (shuttle box). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ – достоверност на разликата спрямо OBX плъховете; ^{ooo} $P \leq 0.01$ – достоверност на разликата спрямо sham-оперираните плъхове ($\pm$ S.E.M.).

Step through method

Post hoc тестът показва, че HU 210, въведен на фона на развито депресивно-подобно състояние, удължава статистически значимо латентното време при теста за ретенция на 3-ия час ($P \leq 0.001$) и на 24-ия час ($P \leq 0.001$) и повишава процента на плъховете (от 10 % на 3-ия час до 20 % на 24-ия час), които достигат критерия на обученост в сравнение с OBX контролните плъхове (0 % и при двата теста) ($\chi^2 = 1.053$, $P = \text{NS}$).



Фиг. 12. Ефекти на HU 210 (5 μ g) и SR141716A (3 μ g), микроинжектирани i.c.v. на OBX плъхове върху латентното време при тестовите за памет на 3-ия и 24-ия час (step through). *** $P \leq 0.001$ – достоверност спрямо OBX контролите; ^{oo} $P \leq 0.01$; ^{ooo} $P \leq 0.001$ – достоверност спрямо sham оперираните плъхове ($\pm$ S.E.M.).

Сравнението с sham оперираните плъхове обаче показва, че латентните времена на 3-ия час ($P \leq 0.001$) и на 24-ия час ($P \leq 0.01$) са достоверно скъсени (Фиг.12).

Прилагането на SR 141716A на OBX плъхове не води до съществено различие от контролната OBX група: 3-ия час ($P = NS$) и на 24-ия час ($P = NS$), а критерия на обученост е 0 % на 3-ия и на 24-ия час ($\chi^2 = 0.0$, $P = NS$) (Фиг.12).

Нашите резултати показаха, че CB1 рецепторния агонист HU 210, въведен i.c.v., подобрява увредените когнитивни функции само на OBX плъхове, но не е в състояние да ги преодолее напълно и да достигне до показателите за обучение и запаметяване на sham оперираните контроли. CB1 рецепторният антагонист SR 141716A не повлиява когнитивните дисфункции, развили се при депресията, вследствие на олфакторната булбектомия (OBX).

Най общо казано, данните за ефектите на HU 210 и SR 141716A, въведени на фона на развита депресия след OBX са оригинални и говорят, че най-вероятно CB1 рецепторите са въввлечени в депресията. Предполагайки, че ендоканабиноидната система е въввлечена в депресията, ние допускаме, че CB₁R-лигандите биха могли да се използват в клиничната практика за терапията на депресивните състояния.

4. Участие на мозъчни неuropeптиди в паметови функции на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)

Основната част от проведените изследвания представлява опит за характеризиране ролята на неuropeптидите VIP и Ang II във формиране на когнитивните функции на плъхове с модел на депресия – двустранна олфакторна булбектомия (OBX), както и участието им в депресивните състояния.

4.1. Участие на хипокампалния вазоактивен интестинален пептид

В ЦНС вазоактивният интестинален пептид (VIP) действа като невротрансмитер, невромодулятор, невротрофичен и неuropeпротективен фактор (Rosselin et al. 1982; Brenneman and Gozes 1996; Brenneman et al. 1999). VIP и VIP рецепторите са експресирани в мозъчни структури, за които се смята, че участват в когнитивните функции, включващи хипокамп, кора и амигдала (Said and Rosenberg 1976; Loren et al., 1979).

Плътността на VIP свързващи места в тези области, показват ролята на VIP в регулирането на сигналната активност в хипокампалната формация и нейните ефекти върху когнитивната функция.

Хипокампът играе ключова роля в процесите на паметта и обучението, пространствената ориентация, вниманието и бодърстването. Дълги години хипокампът беше свързван предимно с механизмите на паметта и с пространствената ориентация. Днес се появяват все повече данни за участие на хипокампа в регулацията на настроението, емоциите и когнитивните процеси (Small et al., 2011).

Структурните и функционални промени в хипокампа се свързват със заболявания като болест на Алцхаймер, темпорална епилепсия, депресия, шизофрения, тревожни състояния и др. Безспорен факт е, че промените в хипокампа допринасят за влошаването на обучението и паметта при депресивните състояния (Duman, 2004). Някои други симптоми при депресивните разстройства също биха могли да са свързани с нарушената хипокампална функция.

Най общо казано, хипокампът е и една от структурите, чиято нарушена функция обуславя когнитивните разстройства съпровождащи депресията, а наред с това концентрация на VIP и VIP рецепторите там е висока.

4.1.1. Промени в обучението и паметта след двустранно или едностранно въвеждане на VIP, VIP 6-28 и VIP на фона на инхибирани VPAC рецептори (VIP6–28) в CA1 полето на хипокампа на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)

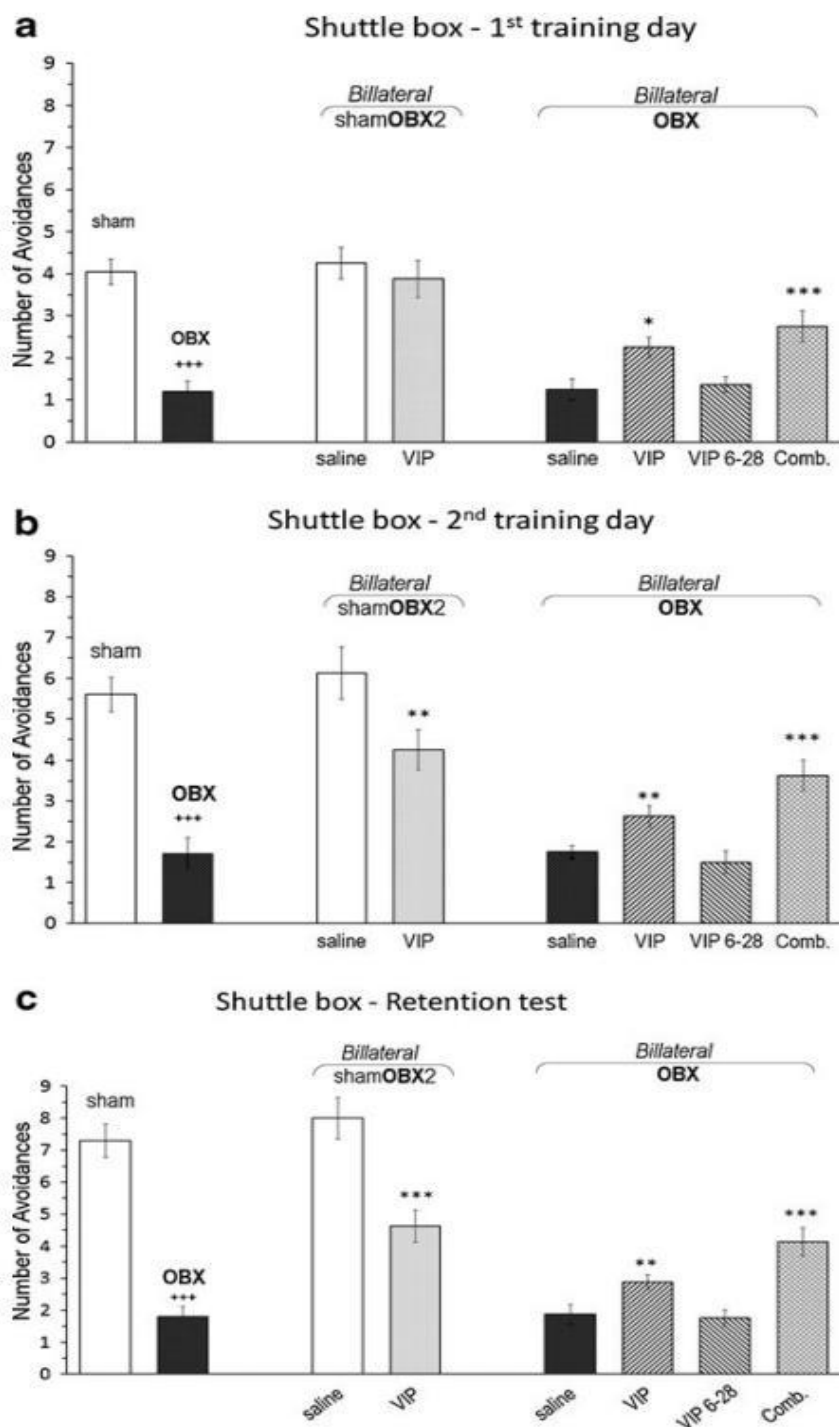
В литературата липсват данни за ефекта на VIP върху влошените паметови процеси при депресивни състояния, предизвикани от дустранната олфакторната булбектомия. Това ни мотивира да изследваме ефектите на VIP след въвеждането му в хипокампа на CA1 поле на плъхове с модел на депресия (OBX) върху обучителните и паметовите процеси.

Ние проучихме ефектите на VIP (50 ng), на VIP₆₋₂₈ (неселективен антагонист на VPAC рецепторите – 10 ng) и на комбинацията (VIP₆₋₂₈ + VIP), след микроинжектиране в CA1 полето на хипокампа, върху процесите на обучение и запаметяване на OBX-плъхове. VIP, VIP₆₋₂₈ или комбинацията (VIP₆₋₂₈ + VIP), бяха микроинжестрирани 15 минути преди обучителните сесии и преди теста за памет.

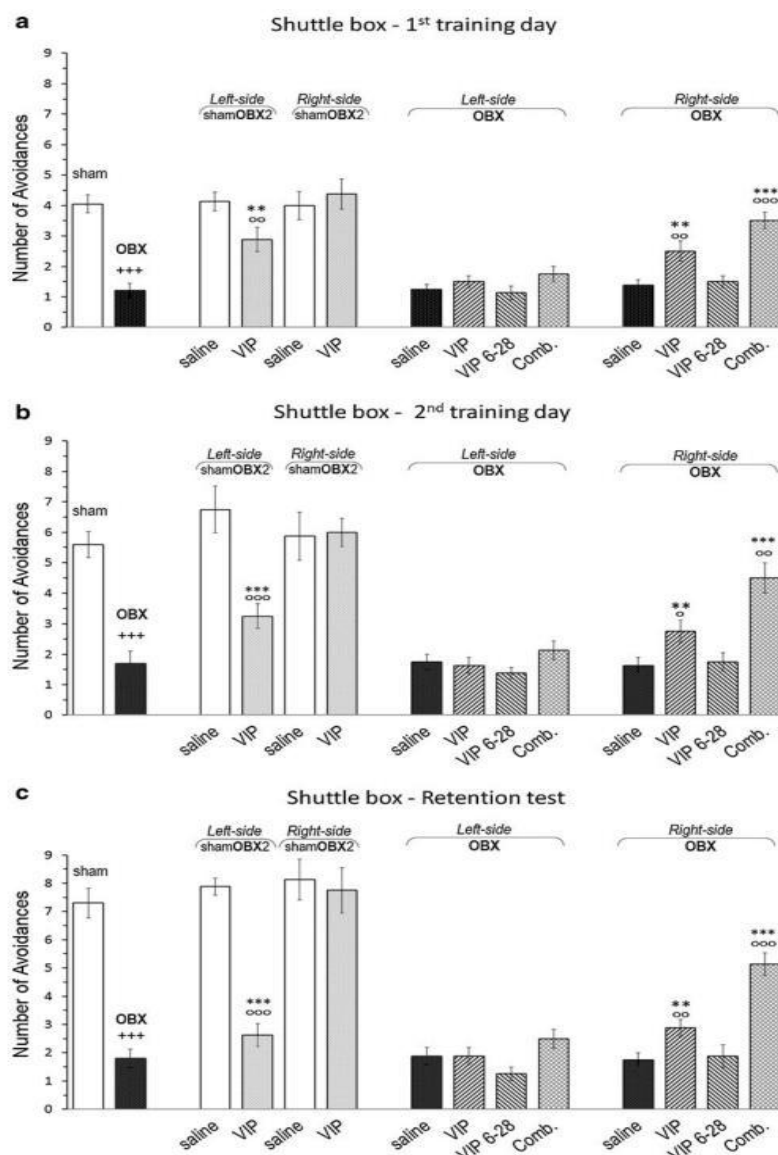
Shuttle box метод

VIP (50 ng), *самостоятелно* микроинжестриран *двустранно* и в *лявото* CA1 поле на sham-OBX плъховете достоверно води до нарушаване на обучението и паметта в сравнение със съответните, инфузирани с физ. р-р sham-OBX плъхове. *Двустранното* микроинжестриране на VIP намалява броя на авойдансите на II-ия обучителен ден ($P \leq 0.01$) и при теста за ретенция ($P \leq 0.001$) (Фиг. 19 а, b, c). VIP, въведен в *лявата* страна, намалява броя на авойдансите на I-ия обучителен ден ($P \leq 0.02$), на II-ия обучителен ден ($P \leq 0.001$) и при теста за ретенция ($P \leq 0.001$). VIP, въведен в *дясното* CA1 поле не повлиява съществено броя на авойданс реакциите в сравнение със съответните sham-OBX контроли (Фиг. 20 а, b, c).

Инфузирането на VIP в *лявата* страна води до значително намаляване на броя на авойдансите в сравнение с *дясната* страна на I-ия ($P \leq 0.01$) и II-ия ($P \leq 0.001$) обучителен ден и при теста за ретенция ($P \leq 0.001$) (Фиг. 20 а, b, c).



Фиг. 19. Ефекти на VIP (50 ng), VIP₆₋₂₈ (10 ng) и комбинацията /VIP₆₋₂₈ (10 ng) + VIP (50 ng)/, микроинжектирани двустранно в хипокампалното CA1 поле на OBX-плъхове върху броя «авойданси» (*shuttle box*) по време на 1-ви **(a)** и 2-ри **(b)** обучителен ден и при теста за ретенция **(c)**. +++P ≤ 0.001 - достоверност OBX спрямо shamOBX; **P ≤ 0.01; ***P ≤ 0.002 – достоверност спрямо съответните OBX контроли, третирани с физ. р-р. ShamOBX2 групи - sham-оперирани плъхове с имплантирани канюли и микроинжектирани с VIP или физ. р-р (Bill, L и R). (±S.E.M.).



Фиг. 20. Ефекти на VIP (50 ng), VIP₆₋₂₈ (10 ng) и комбинацията /VIP₆₋₂₈ (10 ng) + VIP (50 ng)/, микроинжектирани *едностранно* (ляво или дясно) в хипокампалното CA1 полето на OBX-плъхове върху броя «авойданси» (*shuttle box*) по време на 1-ви (a) и 2-ри (b) обучителен ден и при теста за ретенция (c). ⁺⁺⁺P ≤ 0.001 - достоверност OBX спрямо shamOBX; ^{**}P ≤ 0.01; ^{***}P ≤ 0.002 – достоверност спрямо съответните OBX контроли, третирани с физ. р-р; [°]P ≤ 0.05; ^{°°}P ≤ 0.01 - достоверност на разликата между левостранното и десностранно инжектиране на веществата. Sham OBX2 групи - sham-оперирани плъхове с имплантирани канюли и микроинжектирани с VIP или физ. р-р (Bill, L и R) (±S.E.M.).

При въвеждането на VIP (50 ng) на фона на развита депресия (OBX) post hoc SNK тестът показва, че VIP подобрява обучението, т.е. достоверно повишава броя на авойдансите на OBX плъховете на: I-ия и II-ия обучителен ден и при теста за ретенция в сравнение със съответните OBX-контроли след като е инфузиран *двустранно* (съотв. P ≤ 0.05; P ≤ 0.01; P ≤ 0.01) (Фиг. 19 a, b, c) или само в *дясното* хипокампално CA1 поле (съотв. P ≤ 0.01; P ≤ 0.01; P ≤ 0.01) (Фиг. 20 a, b, c). Ефектът на VIP, въведен в *лявото* CA1 поле не се различава от този на OBX-плъховете (Фиг. 20 a, b, c). Сравнявайки ефектите на VIP, след въвеждането му в *дясното* и в *лявото* CA1 поле на OBX плъховете се установи, че VIP инжектиран в *дясното* CA1 поле, повишава достоверно броя на авойдансите на

I-ия ($P \leq 0.01$) и на II-ия обучителен ден ($P \leq 0.05$) и при теста за ретенция ($P \leq 0.05$) (Фиг. 20 а, б, с).

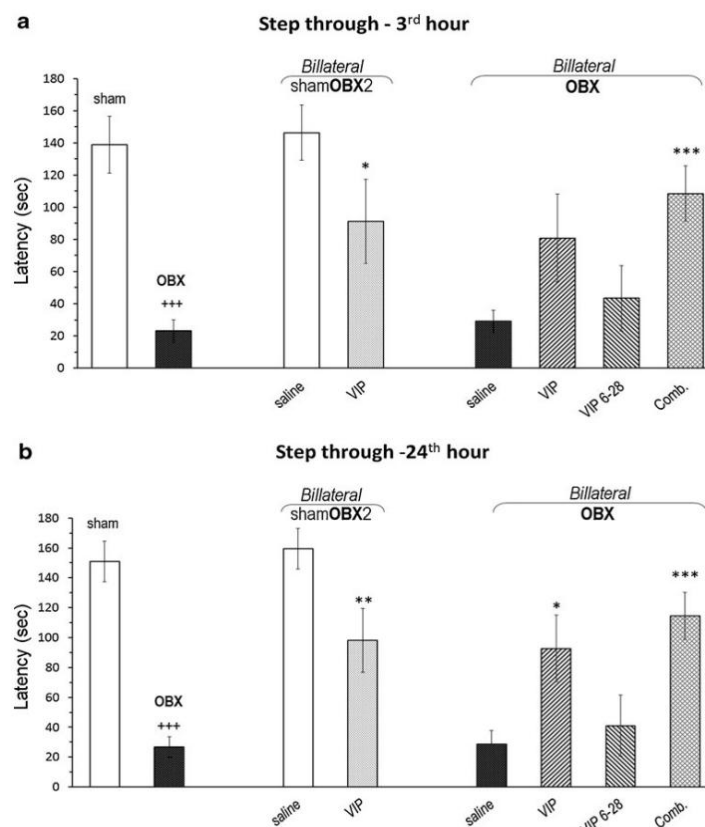
Post-hoc SNK сравненията показаха, че нито *едностранните*, нито *двустранните* микроинжектирания на VIP₆₋₂₈ (10 ng) в хипокампащото CA1 поле на *плъховете с развита депресия (ОВХ)* не водят до достоверни промени в броя на авойдансите на I-ия и II-ия обучителен ден, и при теста за ретенция спрямо съответните ОВХ контроли, третирани с физ. р-р (Фиг. 19 а, б, с и Фиг. 20 а, б, с).

Комбинацията /VIP₆₋₂₈ (10 ng) + VIP (50 ng)/, въведена на *фона на развита депресия (ОВХ)* достоверно повишава броя на авойдансите на I-ия и на II -ия обучителен ден и при теста за ретенция, след *двустранното* (съотв. $P \leq 0.001$; $P \leq 0.001$; $P \leq 0.001$) и *десностранното* ѝ въвеждане (съотв. $P \leq 0.001$; $P \leq 0.001$; $P \leq 0.001$) (Фиг. 19 а, б, с и Фиг. 20 а, б, с). Ефектът на комбинацията (VIP₆₋₂₈ + VIP) след въвеждането ѝ в *лявото* CA1 поле не се различава от съответните, инжектирани с физ. р-р ОВХ контроли на I-ия и II-ия обучителен ден, и при теста за ретенция (Фиг. 20 а, б, с).

Получените данни показаха, че инжектирането на VIP на фона на инхибирани рецептори от VIP₆₋₂₈ в *дясното* CA1 поле достоверно повишава броя на авойданс отговорите в сравнение с инжектирането му в *ляво* на I-ия ($P \leq 0.001$) и II-ия ($P \leq 0.01$) обучителни дни, и при теста за ретенция ($P \leq 0.001$) (Фиг. 20 а, б, с).

Step through method

При двустранно и едностранно въвеждане на VIP (50 ng) в CA1 поле на хипокампа на ОВХ-плъховете, установихме подобряващ паметовите процеси ефект, по-ясно изразен в дясното CA1 поле. VIP, въведен двустранно в CA1 полето на хипокампа, на фона на развито депресивно-подобно състояние, удължи латентното време при теста за ретенция на 24-ия час ($P \leq 0.05$) и повиши процента на плъховете, които достигат критерия на обученост в сравнение с ОВХ-плъховете (Фиг. 21 и 22).



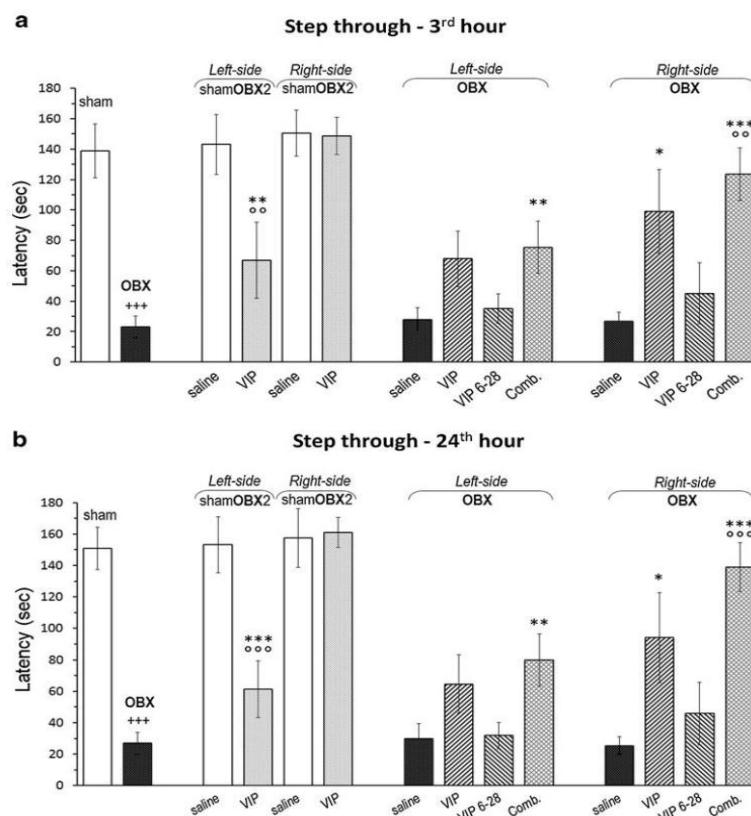
Фиг. 21. Ефекти на VIP (50 ng), VIP₆₋₂₈ (10 ng) и комбинацията /VIP₆₋₂₈ (10 ng) + VIP (50 ng)/, микроинжектирани *двустранно* (Bill) в хипокампащото СА1 поле на OBX-плъхове върху латентното време при тестовите за ретенция на 3-ти **(а)** и 24-и час **(в)** (*step through*) ⁺⁺⁺ $P \leq 0.001$ - достоверност на OBX спрямо sham-оперираните контроли; ^{*} $P \leq 0.05$; ^{**} $P \leq 0.01$; ^{***} $P \leq 0.001$ - достоверност на разликата между VIP, VIP₆₋₂₈ или комбинацията (Comb) спрямо съответните OBX контроли, третирани с физ. р-р ($\pm$ S.E.M.).

При микроинжектиране на VIP в *дясното* СА1 поле на OBX-плъховете, се наблюдава удължаване на латентното време при тестовите за ретенция на 3-ия час ($P \leq 0.05$) и на 24-ия час ($P \leq 0.05$) и повишаване на процента на плъховете, които достигат критерия за обученост (Фиг. 22). Ефектът на VIP, въведен в *лявото* СА1 поле не се различаваше съществено от контролната OBX- група (Фиг. 22)

Антагонистът VIP₆₋₂₈ (10 ng), микроинжектиран *едностранно* в хипокампащото СА1 поле на OBX- плъхове не показва разлики в сравнение със съответните инжектирани с физ. р-р OBX-контроли, независимо от страната на въвеждането му.

Не се установиха и разлики между *левостранно* и *десностранно* третирани с VIP или VIP₆₋₂₈ OBX плъхове (Фиг. 22 a,b).

Комбинацията (VIP₆₋₂₈ + VIP), въведена *билатерално* в СА1 полето на OBX плъховете, удължава латентното време при тестовите за ретенция на 3-ия час ($P \leq 0.001$) и на 24-ия час ($P \leq 0.001$) в сравнение със съответните, третирани с физ. р-р OBX плъхове (Фиг. 21 a,b).



Фиг. 22. Ефекти на VIP (50 ng), VIP₆₋₂₈ (10 ng) и комбинацията /VIP₆₋₂₈ (10 ng) + VIP (50 ng)/, микроинжектирани *едностранно* (*L*-ляво или *R*-дясно) в хипокампазното CA1 поле на OBX-плъхове върху латентното време при тестовите за ретенция на **(a)** 3-ти и **(b)** 24-и час (*step through*) ⁺⁺⁺ $P \leq 0.001$ - достоверност на OBX спрямо sham-оперираните контроли; $*P \leq 0.05$; $**P \leq 0.01$; $***P \leq 0.001$ - достоверност на разликата между VIP, VIP₆₋₂₈ или комбинацията (Comb) спрямо съответните OBX контроли, третираните с физ. р-р; $^{\circ}P \leq 0.01$; $^{\circ\circ}P \leq 0.001$ - достоверност на разликата между левостранното и десностранно инжектиране на веществата ($\pm$ S.E.M.).

Микроинжектирането на комбинацията (VIP₆₋₂₈ + VIP) в *лявото* CA1 поле на OBX плъховете достоверно удължава латентното време при тестовите за ретенция на 3-ия час ($P \leq 0.02$) и на 24-ия час ($P \leq 0.02$) в сравнение със съответните OBX контроли (Фиг. 22 a,b). Приложена в *дясната* страна на CA1 полето на OBX плъховете комбинацията (VIP₆₋₂₈ + VIP) удължава латентното време при тестовите за ретенция на 3-ия час ($P \leq 0.001$) и на 24-ия час ($P \leq 0.001$) и достоверно повишава процента на плъховете, достигнали критерия за обученост и на 24-ия час ($P \leq 0.05$) в сравнение с *десностранно* третираните с физ. р-р OBX контроли (Фиг. 22 a,b).

Сравнявайки ефектите на *десностранно* с *левостранно* приложената комбинация, се установи, че ефектът ѝ е по-силно изразен след като е въведена в *дясното* CA1 поле на OBX плъховете (достоверно удължава латентното време на 3-ия час ($P \leq 0.02$) и на 24-ия час ($P \leq 0.001$) в сравнение с *дясното* (Фиг. 22 a,b).

Проведените опити по методите за обучение и памет демонстрират латерализиран положителен ефект на VIP върху обучителните и паметовите процеси на OBX-плъхове, в зависимост от страната на въвеждане. Важно е да отбележим, че на фона на развита депресия, VIP подобрява обучението и краткотрайната памет на OBX-плъховете при въвеждане в *дясното* CA1 поле. Имаме основание да направим извода, че предимно *дясното* CA1 поле участва в изявата на антиамнестичните ефекти на VIP при депресивни състояния.

Проведените от нас опити по методите за обучение за активно избягване (*shuttle*

box) и пасивно избягване (*step through*) демонстрират латерализиран положителен ефект на VIP (50 ng) върху обучителните и паметовите процеси на OBX-плъхове и при двата метода, в зависимост от страната на въвеждане. Микроинжектирането на VIP *двустранно* и в *дясното* CA1 поле на хипокампа при метода *shuttle box* повишава броя на авойдансите през двата обучителни дни и при теста за памет. Микроинжектирането на VIP *двустранно* и в *дясното* CA1 поле (метод *step through*), удължава латентното време при теста за ретенция на 24-ия час след обучението, (а въвеждането в *дясното* CA1 поле и при теста за ретенция на 3-ия час) и повишава процента на плъховете, които достигат критерия на обученост в сравнение с контролните OBX-животни. Въвеждането на VIP в *лявото* CA1 поле не повлиява изследваните процеси в сравнение с OBX-контролите и при двата метода. Сравняването на ефектите от *унилатералните* въвеждания на VIP при метода *shuttle box* показва, че VIP, инжектиран в *дясното* CA1 поле повишава достоверно броя на авойдансите през двата обучителни дни и при теста за ретенция в сравнение с *левостранните* инжектирания, докато при метода *step through* такава разлика не се установява.

Данните ни относно латерализирания, подобряващ обучението и паметта ефект на VIP след микроинжектирането му в CA1 полето на хипокампа на плъхове с OBX модел на депресия са единствени в литературата.

Антагонистът на VPAC рецепторите VIP₆₋₂₈ не повлиява значимо латентното време и авойданс-реакциите на OBX-плъховете при използваните методи за обучение. Това насочва нашите предположения към възможно участие на PAC1 рецептора в изявата на ефектите на VIP, още повече, че хипокампът е структура с висока концентрация и на трите вида рецептори.

4.2. Участие на хипокампалния ангиотензин

През последните години, актуалност придобива и въпросът за ролята на ангиотензин II (Ang II) и неговите рецептори в неврохимичните механизми на когнитивните функции, при депресивни състояния.

В мозъка Ang II е експресиран във всички структури на лимбичната система и на хипоталамо-хипофизно-надбъбречната ос. Това предполага участие в обработването на автономна, ендокрина, сетивно-двигателна информация, както и в механизмите на поведенческите реакции, когнитивните процеси емоциите и мотивацията. Многобройни данни показват, че участието на Ang II в процесите на обучение и памет е свързано с активирането на AT1 и/или AT4 рецепторните подвидове (Wright and Harding, 1995, 2008, 2011).

Въпреки данните за модулиращо влияние на Ang II и неговите AT1 и AT4 рецептори върху хипокампалната невронална активност, все още остава неизяснена тяхната физиологична роля в когнитивните процеси, както и въвличането им в променените активности на хипокампа и амигдала, съпровождащи депресивните състояния.

4.2.1. Промени в обучението и запаметяването след двустранно или едностранно въвеждане на ангиотензин IV в CA1 полето на хипокампа

Ангиотензин IV (ангиотензин 3-8) е производно на мощния вазоконстрикторен ангиотензин II и е доказано, че подобрява обучението паметта, при животински модели за памет и обучение, приложен централно или периферно, като се свързва специфично с мозъчните AT4 рецепторите (Paris et al., 2013). Хипокампалните AT4 рецептори са

важни за обучението и паметта, като медиатират пространствената и асоциативна памет (Chai et al., 2004; 2008).

Установеният хипокампаден латерализиран ефект на Ang II върху обучителните и паметовите процеси стимулира интереса ни да проучим дали този ефект се дължи на различното разпределение на AT4 рецепторите в хипокама.

Shuttle box метод

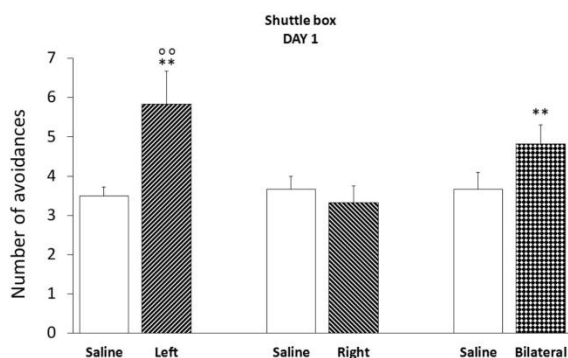
По shuttle box метода, проучихме ефектите на Ang IV (0.1 nmol), след *едностранно* и *двустранно* микроинжектиране в СА1 полето на хипокампа.

Post hoc сравненията показаха, че ефектът на Ang IV е достоверно по-силен, когато е инжектиран *двустранно* ($P \leq 0.01$) и само в *лявото* СА1 ($P \leq 0.01$) поле в сравнение с *дясното* поле на хипокампа на: I-вия ($P \leq 0.01$) (Фиг. 28 А) и на II-ия обучителен ден ($P \leq 0.01$) (Фиг. 28 В). Достоверен подобряващ паметта ефект на Ang IV беше наблюдаван и при теста за ретенция (Фиг. 28 С).

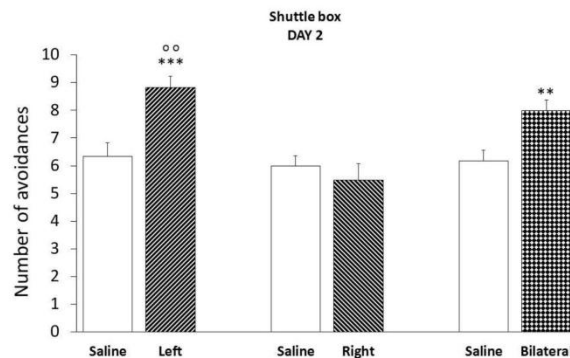
Ляво ($P \leq 0.01$) и *двустранно* ($P \leq 0.01$) въведеният Ang IV повишава броя на авойдансите в сравнение със съответните контроли. *Ляво* инжектираният Ang IV води до достоверно по-голям брой авойданс реакции в сравнение с инжектирането му в *дясно* ($P \leq 0.01$) (Фиг. 28 С).

Данните показват, че микроинжектирането на Ang IV *двустранно* или само в *лявото* СА1 хипокампадно поле значително подобрява обучението и паметта, докато инфузията му само в *дясното* СА1 няма ефект върху тези процеси в сравнение със съответните контроли третирани с физ. р-р.

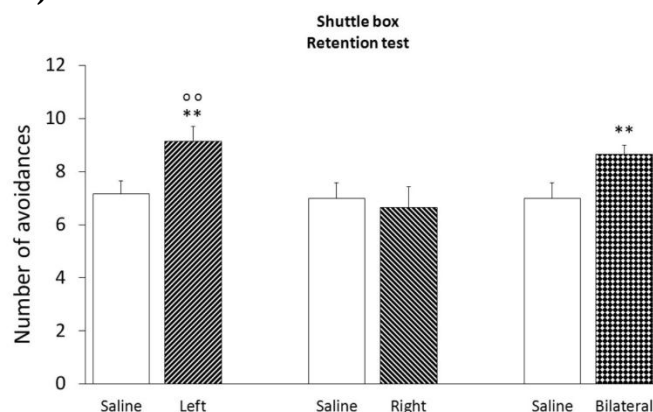
A)



B)



C)



Фиг. 28. Ефекти на Ang IV (0.1 pmol), микроинжектиран *двустранно* или *едостранно* (L-ляво или R-дясно) в хипокампащото CA1 поле върху броя „авойданси” (shuttle box) по време на 1-ви (A) и 2-ри (B) обучителен ден и при теста за ретенция (C). $n = 6$. ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$ – достоверност спрямо съответните контроли; $^{00}P \leq 0.01$ – достоверност на разликата между левостранното и десностранно въвеждане ($\pm$ S.E.M.).

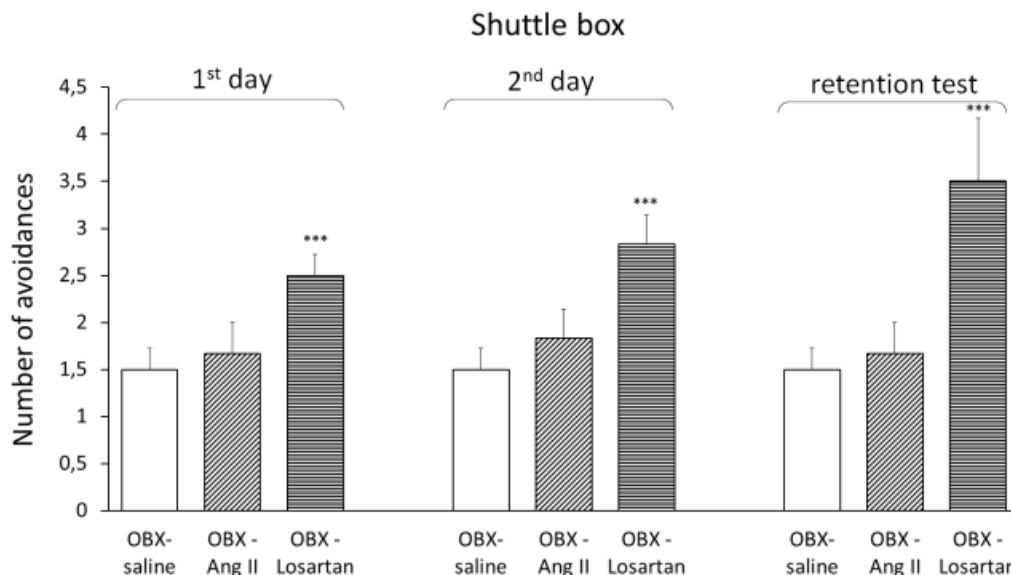
4.2.2. Промени в обучението и запаметяването след двустранно или едностранно въвеждане на ангиотензин II и лосартан в CA1 полето на хипокампа на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)

Ние проучихме ефектите на Ang II и лосартан (AT1 рецепторен антагонист) върху процесите на обучение и памет на плъхове с *модел на депресия (OBX)* по методите за обучение за активно избягване (shuttle-box) и за пасивно избягване (step through).

Shuttle box метод

Ang II (0.5 μ g) и лосартан (100 μ g) бяха въвеждани уни- или билатерално в CA1 полето на хипокампа на фона на развита депресия (15 дни след OBX). Веществата бяха микроинжектирани 5 мин. преди всяка обучителна сесия (два последователни дни), както и преди теста за памет.

Получените резултати показаха, че лосартан, въведен *билатерално* в CA1 полето достоверно повишава авойдансите на 1-ия ($P \leq 0.005$) и 2-ия ($P \leq 0.005$) ден, и при теста за ретенция ($P \leq 0.001$) в сравнение с третираните с физ. р-р OBX контроли, докато Ang II не води до съществени промени (Фиг. 29).



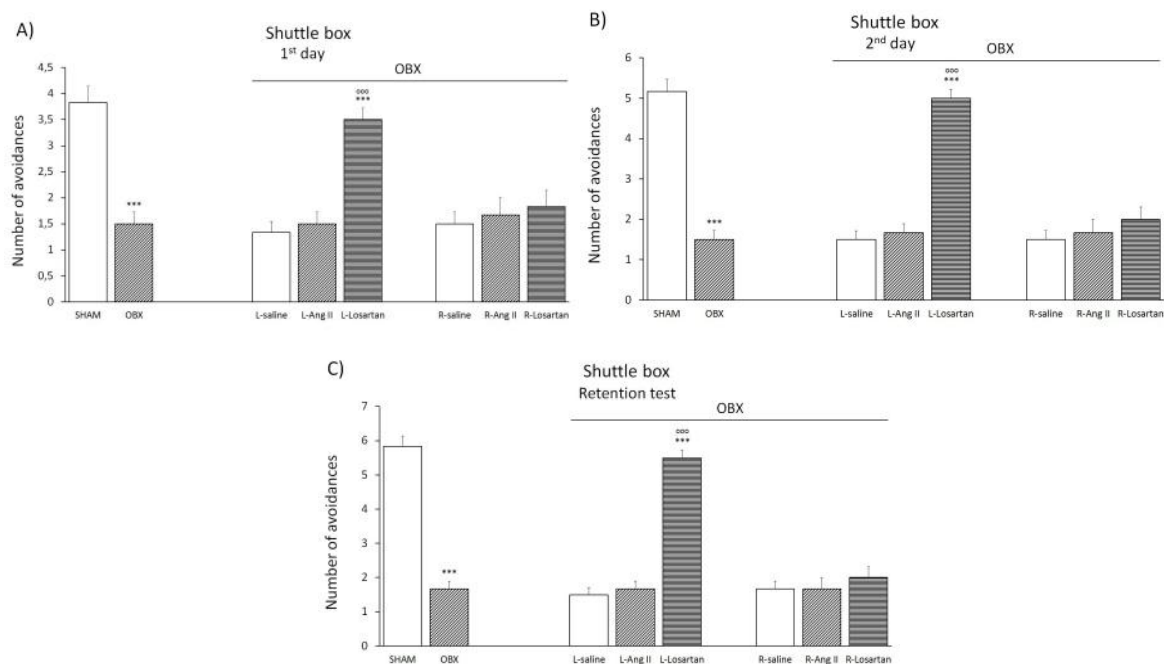
Фиг. 29. Ефекти на Ang II (0.5 μ g) и лосартан (100 μ g), микроинжектирани *двустранно* в хипокампалното CA1 поле на OBX плъхове върху броя «авойданси» (*shuttle box*) по време на 1-ви и 2-ри обучителен ден и при теста за ретенция. $n = 6$; *** $P \leq 0.001$ – достоверност спрямо съответните OBX контроли, третирани с физ. р-р ($\pm$ S.E.M.).

Лосартан, микроинжектиран в *лявото* CA1 поле на OBX плъховете, предизвиква статистически достоверно по-голям брой авойданси на 1-ия ($P \leq 0.001$), 2-ия ($P \leq 0.001$) ден и при теста за ретенция ($P \leq 0.001$) (Фиг. 30 А,В,С) докато, въведен в *дясното* CA1 поле, не води до съществени промени по време на целия експериментален период, спрямо съответните OBX контроли (Фиг. 30 А,В,С).

Ang II, инфузиран както само в *лявото*, така и само в *дясното* CA1 поле на OBX плъховете не променя съществено броя на авойданс отговорите (Фиг. 30 А,В,С).

Сравнявайки ефектите на лосартан *ляво/дясно* се установи, че ефекта му в *лявото* CA1 поле е много по-ясно изразен ($P \leq 0.001$) (Фиг. 30 А,В,С).

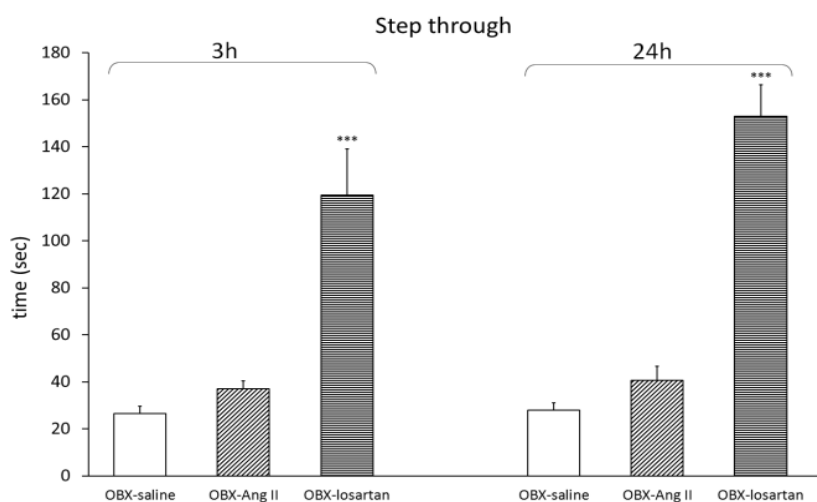
Така, лосартан проявява ясно изразен, латерализиран, подобряващ обучението и паметта ефект на плъхове с депресивен синдром.



Фиг. 30. Ефекти на Ang II (0.5 μ g) и лосартан (100 μ g), микроинжектирани *едностранно* (L-ляво или R-дясно) в хипокампащото CA1 поле на OBX плъхове върху броя «авойданси» (*shuttle box*) по време на 1-ви (A) и 2-ри (B) обучителен ден и при теста за ретенция (C) $n = 6$. *** $P \leq 0.001$ – достоверност спрямо съответните OBX контроли, третиран с физ. р-р. ⁰⁰⁰ $P \leq 0.001$ - достоверност на разликата между левостранното и десностранно въвеждане ($\pm$ S.E.M.).

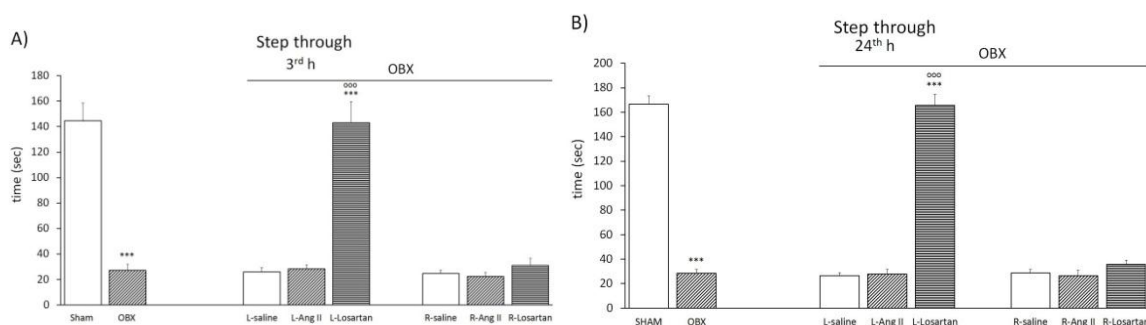
Step through method

При *step through* метода, се установи, че лосартанът, микроинжектиран *двустранно* в хипокампащото CA1 поле на OBX плъхове подобрява паметовите функции на OBX плъховете, като удължава латентното време на 3-ия ($P \leq 0.04$) и 24-ия час ($P \leq 0.001$) и повишава процента на плъховете, достигнали критерия на обученост на 3-ия (38% - $\chi^2 = 5.333$; $P \leq 0.02$) и 24-ия час (63% - $\chi^2 = 7.237$; $P \leq 0.01$) в сравнение със OBX контролите, третиран с физ. р-р. Ang II, не води до промени в паметовите процеси на OBX плъховете (Фиг. 31).



Фиг. 31. Ефекти на Ang II (0.5 μ g) и лосартан (100 μ g), микроинжектирани *двустранно* в хипокампащото CA1 поле на OBX плъхове върху латентното време при тестове за ретенция на 3-ия и 24-ия час (*step through*) ($n=8$). *** $P \leq 0.01$ - достоверност спрямо OBX контролите, третиран с физ. р-р ($\pm$ S.E.M.).

След *унилатералното* въвеждане на Ang II и лосартан в *хипокампаалното* CA1 поле на OBX плъховете *post hoc* тестът показва, че лосартан, микроинжектиран в *лявото* CA1 поле удължава латентното време на 3-ия ($P \leq 0.001$) и на 24-ия час ($P \leq 0.001$) и повишава процента на плъховете, достигнали критерия на обученост с 50% на 3-ия и с 63% на 24-ия час, за разлика от въвеждането му в *дясното* CA1 поле, където ефектите му не се различават от съответната контрола (Фиг. 32 A,B). Ефектите на Ang II, приложен както в *лявото*, така и в *дясното* CA1 поле на OBX плъхове върху паметта не се различават достоверно от съответните OBX контроли (Фиг. 32 A,B).



Фиг. 32. Ефекти на Ang II (0.5 μ g) и лосартан (100 μ g), микроинжектирани *едностранно* (L-ляво или R-дясно) в хипокампаалното CA1 поле на OBX плъхове върху латентното време при тестовите за ретенция на (A) 3-ия и (B) 24-ия час (*step through*) ($n=8$). *** $P \leq 0.001$ – достоверност спрямо съответните OBX контроли, третирани с физ. р-р. ⁰⁰⁰ $P \leq 0.001$ - достоверност на разликата между левостранното и десностранно въвеждане ($\pm$ S.E.M.).

Нашите данни и от двата метода показват латерализиран, подобряващ паметовия дефицит на OBX плъховете, ефект на антагониста на AT1 рецепторите лосартан. Има много съобщения за благоприятните ефекти на AT1 блокерите при различни експериментални модели на увредена памет. DeNoble и съавт. (1991) установяват, че при i.c.v. прилагане на ренин, нарушените обучителни и паметови процеси, при обучение за пасивно избягване, могат да бъдат компенсирани с ACE-инхибитори или чрез прилагане на AT1 рецепторните антагонисти. Inaba и съавт. (2009) при опити върху ренин /ангиотензиноген трансгенни мишки показват, че блокера на AT1 рецепторите олмесартан подобрява когнитивните процеси (*shuttle box*) и предполагат, че непрекъснатото активиране на мозъчната PAC уврежда когнитивните функции чрез стимулиране на AT1 рецепторите.

Клинични проучвания с антагонисти на Ang II подкрепят това схващане. Доказано е, че лосартан, подобрява когнитивните функции както при пациенти с хипертония, така и при нормотензивни възрастни (Tedesco al., 1999; Fogari et al., 2003). Получените от нас резултати са в съгласие със съобщенията за подобряващите обучителните и паметови ефектите на AT1 блокерите, като за първи път дават информация, че инхибирането на AT1 рецептори в лявото CA1 хипокампаално поле води до подобряване на обучението и паметта на плъхове с депресивно-подобно състояние. Проведените от нас опити не позволяват да се прецени, дали това е резултат на инхибиране ефекта на мозъчния Ang II или се дължи на невропротективни, противовъзпалителни и антиоксидантни ефекти на лосартан.

4.3. Участие на амигдалния ангиотензин II и AT1 рецепторите

Амигдала има основна роля в осъществяването на поведенчески реакции, свързани с паметта, обучението, състоянието на тревожност, ноцицепцията, стресовите въздействия. Тя е и една от структурите, чиято нарушена функция обуславя редица разстройства, съпровождащи депресията, а заедно с това, концентрацията на Ang II и ангиотензиновите рецепторите там е висока. Установено е, че както в хипокампа, така и в латералната амигдала Ang II чрез AT1 рецепторите повлиява дълготрайната потенция (long-term potentiation - LTP) (Tchekalarova and Albrecht, 2007).

Изборът на амигдала и по-специално централното ядро на амигдала (CeA) в тези изследвания, се базира на доказаната му ключова роля в поведенчески реакции свързани с обучителните, паметовите и адаптивните процеси, обработката на информацията, с настроението и емоциите (Bohus et al., 1996; Saha, 2005; Watanabe et al., 2010). В CeA са идентифицирани най-малко 16 различни неuropeптиди, между които и компонентите на ренин-ангиотензиновата система (РАС) – Ang II, ангиотензин-конвертиращ ензим, AT1 и AT2 рецептори (Song et al., 1992; von Bohlen und Halbach and Albrecht, 1998a,b; 2006; Marinzalda et al., 2014). Показано е, че Ang II е ключов невротрансмитер в CeA, участващ в регулацията на симпатикови и хемодинамични отговори (Watanabe et al., 2010). Ангиотензинергичната система играе роля в обучителните и паметови механизми чрез въздействието си върху амигдалата (Winnicka et al., 1988; Barnes et al., 1992; von Bohlen und Halbach and Albrecht, 1997, 2006).

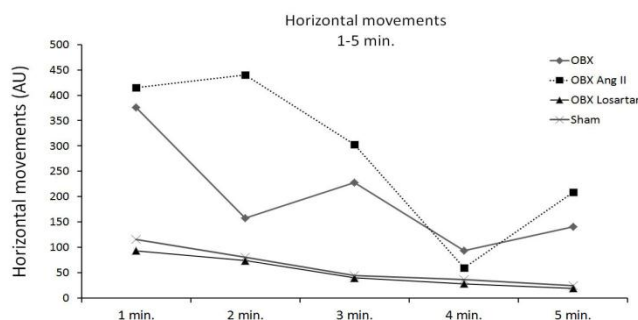
Тези наблюдения подчертават важността на CeA при модулиране хемодинамичните, поведенческите реакции и когнитивните функции.

4.3.1. Промени в експлораторното поведение след двустранно или едностранно въвеждане на ангиотензин II и лосартан в централното ядро на амигдала (CeA) на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)

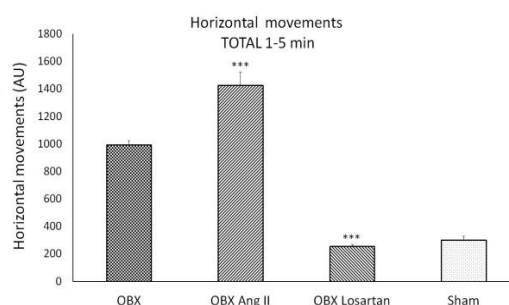
Бяха проучени ефектите на Ang II (0.5 µg) и лосартан (100 µg), въведени *двустранно* и *едностранно* (ляво или дясно) в централното ядро на амигдала (CeA) върху експлораторното поведение на плъхове с модел на депресия (OBX).

Ang II микроинжектиран *двустранно* в CeA на плъховете с OBX повлиява достоверно броя на хоризонталните движения в сравнение с двустранно микроинжектираните OBX плъхове с физ. р-р и микроинжектираните с физ. р-р sham-оперирани плъхове. Ang II повишава хоризонталната активност само спрямо sham-оперирани плъхове, третирани с физ. р-р на 1-ва мин. ($P \leq 0.001$); на 2-ра мин. (съотв. $P \leq 0.001$; $P \leq 0.001$); на 3-та минута (съотв. $P \leq 0.03$; $P \leq 0.001$) и на 5-та мин (съотв. $P \leq 0.001$; $P \leq 0.001$), докато на 4-та минута те се потискат в сравнение с OBX плъхове, третирани с физ. р-р ($P \leq 0.03$), но се повишават в сравнение с sham-оперирани плъхове, третирани с физ.р-р ($P \leq 0.01$) (Фиг. 37 А). Анализът на промените в броя на хоризонталните движения за всяка минута поотделно след двустранните микроинжектирания на Ang II показва, че хабитуацията е нарушена (Фиг. 37 А).

A)



B)



Фиг. 37. Ефекти на Ang II (0.5 μ g) и лосартан (100 μ g), микроинжектирани *двустранно* в CeA на OBX плъхове върху броя на хоризонталните движения, **(A)** - за всяка минута поотделно в продължение на 5-минутно наблюдение (1 - 5 мин): **(B)** – върху общия брой на хоризонталните движения за целия 5-минутен период. $n = 6$. *** $P \leq 0.001$ – достоверност спрямо OBX контролите ($\pm$ S.E.M.).

Ang II, инфузиран *двустранно* в CeA на OBX плъхове повишава общия брой хоризонтални движения в сравнение с OBX плъховете, третиран с физ. р-р ($P \leq 0.003$) и в сравнение с sham опеипаните плъхове, третиран с физ. р-р ($P \leq 0.001$) (Фиг. 37 B).

Лосартан, микроинжектиран *двустранно* в CeA на OBX плъхове, намалява броя на хоризонталните движения в сравнение с двустранно микроинжектираните OBX плъхове с физ. р-р на: 1-ва мин. ($P \leq 0.001$); на 2-ра мин. ($P \leq 0.001$), на 3-та мин. ($P \leq 0.001$), на 4-та мин. ($P \leq 0.001$) и на 5-та мин. ($P \leq 0.001$). Анализът на промените в броя на хоризонталните движения за всяка минута поотделно след *двустранните* микроинжектирания на лосартан показва, че хабитуацията не е нарушена (Фиг. 37 A). SNK сравненията демонстрираха, че лосартан, микроинжектиран *двустранно* в CeA намалява общия брой на хоризонталните движения в сравнение със съответните OBX плъхове, инфузиран с физ. р-р ($P \leq 0.001$) (Фиг. 37 B).

Едностранным микроинжектиране на Ang II в *дясното* CeA на OBX плъхове достоверно увеличава броя на хоризонталните движения на 1-ва мин. ($P \leq 0.01$) и на 4-та мин. ($P \leq 0.05$) и не ги повлиява на 2-ра; 3-та и 5-та мин. в сравнение с *дясно* инжектираните с физ. р-р OBX плъхове (Фиг. 39 A). Анализът на промените в броя на хоризонталните движения за всяка минута поотделно след *десностранна* инфузия на Ang II показва, че хабитуацията е нарушена (Фиг. 39 A). Ang II, въведен в *лявото* CeA не повлиява достоверно броя на хоризонталните движения в сравнение с *левостранно* инжектираните с физ. р-р OBX плъхове. Хабитуацията е нарушена и не се различава от тази на OBX плъховете (Фиг. 39 A).

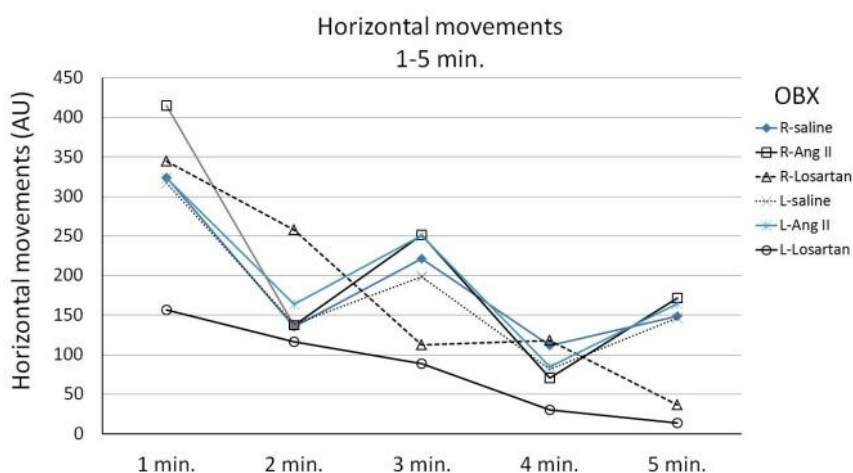
Анализът за ефекта на лосартана показва, че *десностранните* инфузии в CeA значително стимулират хоризонталната активност на OBX плъхове през 2-та минута ($P \leq 0.006$) и я инхибират на 3-та ($P \leq 0.006$) и 5-та минута ($P \leq 0.001$), т.е. хабитуацията също е нарушена (Фиг. 39 A).

Post hoc SNK сравненията демонстрират, че прилагането на лосартан в *лявото* CeA на OBX плъхове достоверно потиска хоризонталните движения в сравнение със съответните инжектирани с физ. р-р OBX плъхове на 1-та ($P \leq 0.001$); 2-та ($P \leq 0.01$); 4-та ($P \leq 0.001$) и 5-та мин. ($P \leq 0.007$) (Фиг. 39 A). Анализът на промените в броя на хоризонталните движения за всяка минута отделно след микроинжектирането на лосартан показва, че хабитуацията на OBX плъховете не е нарушена (Фиг. 39 A).

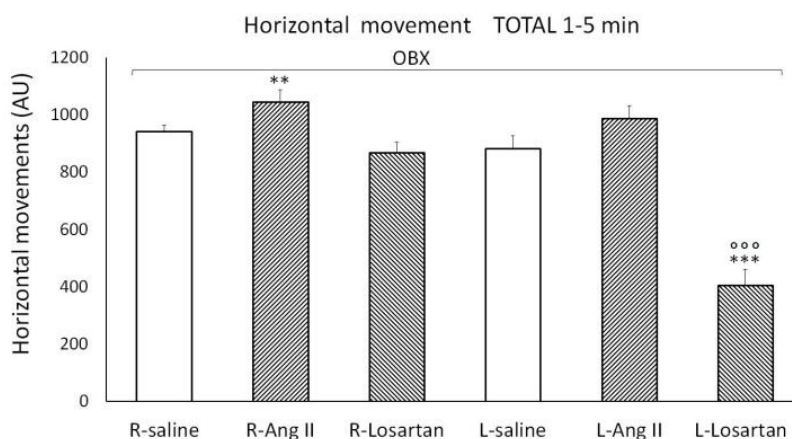
Post hoc SNK сравненията показват също, че микроинжектирането на лосартан в *лявото* CeA на OBX плъховете води до значително по-малък брой на хоризонталните движения в сравнение с *дясното* CeA на OBX плъховете на всяка минута, за периода на наблюдение (1-5 минута) ($P \leq 0.01$) (Фиг. 39 А).

Ang II, приложен в *дясното* CeA на OBX плъхове, повишава общия брой хоризонтални ($P \leq 0.02$) движения, докато *десните* микроинжектирания на лосартан не ги променят съществено ($P = NS$). Лосартан, инфузиран в *лявото* CeA на OBX плъхове, значително намалява общия брой хоризонтални ($P \leq 0.001$) движения в сравнение със съответните OBX контроли, третирани с физ. р-р (Фиг. 39 В).

А)



В)



Фиг. 39. Ефекти на Ang II (0.5 μg) и лосартан (100 μg), микроинжектирани *едностранно* (*L-ляво* или *R-дясно*) в CeA на OBX-плъхове върху броя на хоризонталните движения **(А)** - за всяка минута поотделно в продължение на 5-минутно наблюдение (1 - 5 мин); **(В)** – върху общия брой на хоризонталните движения за целия 5-минутен период. $n = 6$. ** $P \leq 0.02$; *** $P \leq 0.001$ – достоверност спрямо съответните OBX контроли. $^{ooo}P \leq 0.001$ – достоверност на разликата между левостранното и десностранно инжектиране на веществата ($\pm S.E.M.$).

Ang II (0.5 μg), микроинжектиран в *лявата* амигдала, повишава броя на хоризонталните движения при OBX плъховете, докато лосартан (100 μg), инфузиран в *лявото*, но не в *дясното* CeA, потиска броя на хоризонталните движения при плъхове с OBX, в сравнение с OBX контролите.

Настоящото изследване за първи път демонстрира ефектите на Ang II и лосартан, инфузирани *двустранно* и *едностранно* в CeA върху индуцираното от OBX изследователско поведение.

Така, Ang II, микроинжектиран *двустранно* и в *дясното* CeA допълнително стимулира повишената експлораторна активност, отразена в броя на хоризонталните и вертикални движения, т.е. повишава хиперактивността на OBX плъховете и влошава депресивното състояние. Лосартан, инфузиран *двустранно* или *едностранно* в *лявото* CeA потиска експлораторната активност, докато инфузиран в *дясното* CeA не я повлиява. Най-общо казано лосартан потиска хиперактивното поведение на OBX плъховете и намалява депресията.

Получните данни говорят за различно въвличане на амигдалния Ang II и AT1 рецептори в изследователското поведение на OBX плъхове, различно разпределение на AT1 рецепторите в *лявото* и *дясното* централно ядро на амигдалата и предполагат различни механизми, лежащи в основата на депресивно поведение.

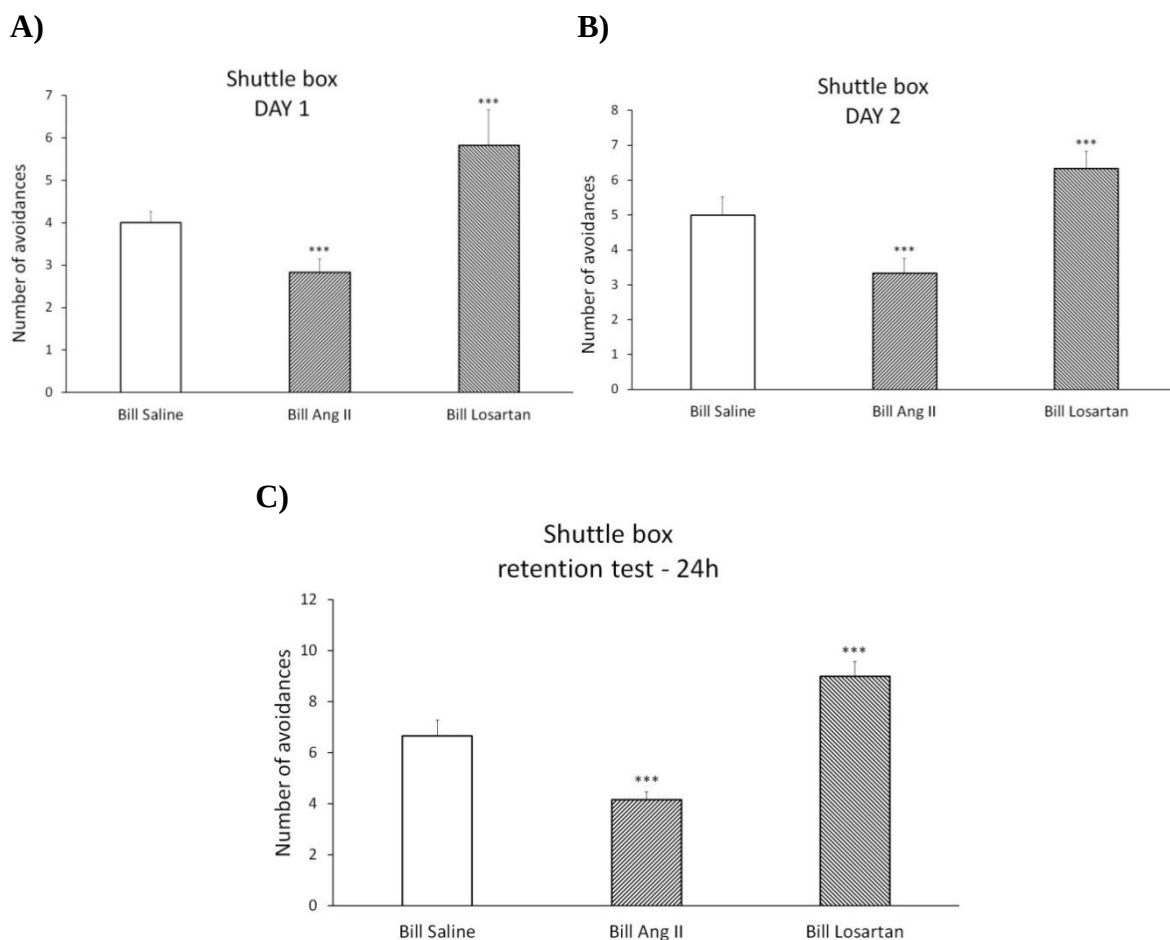
4.3.2. Промени в обучението и запаметяването след двустранно или едностранно въвеждане на ангиотензин II и лосартан в централното ядро на амигдала (CeA)

Имайки предвид, доказаната ключова роля на амигдала и по-специално централното ядро на амигдала (CeA) в поведенчески реакции свързани с обучителните, паметовите и адаптивните процеси, обработката на информацията, с настроението и емоциите (Bohus et al., 1996; Saha, 2005; Watanabe et al., 2010), ние проведохме серия от експерименти - от една страна, да проучим ролята на амигдалния Ang II и AT1 рецепторите при увредени обучителни и паметови процеси, развили се след OBX, а от друга, да проучим дали съществува асиметрия в паметовите ефекти на Ang II и лосартан при депресивно-подобно състояние.

Първоначално, ние проучихме ефектите на Ang II (0.5 µg) и лосартан (100 µg), *самостоятелно* въведени *едностранно* и *двустранно* в CeA на плъхове върху обучението и запаметяването.

Shuttle box method

Получените резултати показаха, че лосартан подобрява обучението и запаметяването, т.е. достоверно повишава броя на авойдансите на I-ия, на II-рия обучителен ден (съотв. $P \leq 0.03$; $P \leq 0.05$) и при теста за памет ($P \leq 0.01$), докато Ang II достоверно влошава както обучението на I-ви ($P \leq 0.008$) и на II-ри обучителен ден ($P \leq 0.01$), така и паметта ($P \leq 0.002$) (Фиг. 41 A,B,C).

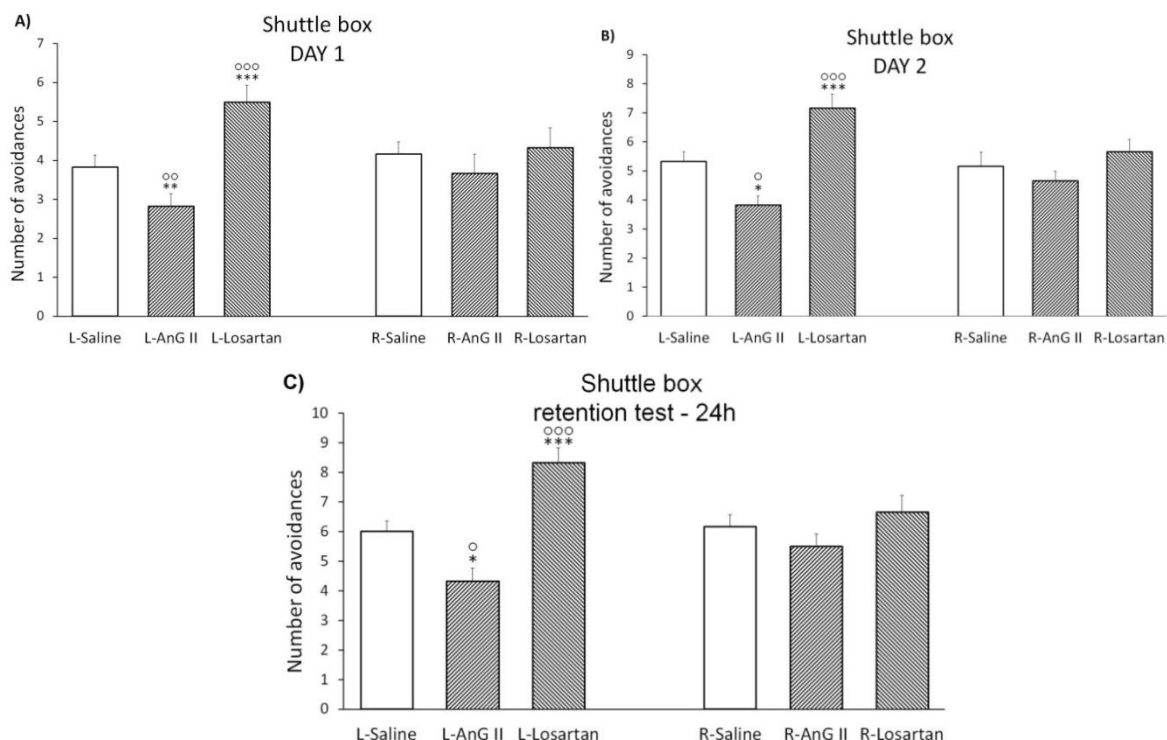


Фиг. 41. Ефекти на Ang II (0.5 μ g) и лосартан (100 μ g), микроинжектирани *двустранно* в централното ядро на амигдала (CeA) върху броя „авойданси” (*shuttle box*) по време на (A) 1-ви и (B) 2-ри обучителен ден и (C) при теста за ретенция. $n = 6$. *** $P \leq 0.001$ – достоверност спрямо съответните контроли, третирани с физ. р-р ($\pm$ S.E.M.).

Ang II, въведен *в лявото* CeA намали броя на авойдансите на I-вия обучителен ден ($P \leq 0.02$), на II-рия обучителен ден ($P \leq 0.004$) и при теста за ретенция ($P \leq 0.001$), в сравнение със съответните контроли (Фиг. 42 A,B,C). Въведен *в дясното* CeA не предизвика достоверни промени в броя на авойдансите при експерименталните изследвания, в сравнение със съответните *дясно*-третирани с физ. р-р контроли (Фиг. 42 A,B,C).

При сравняване на *едностранните* инфузии на Ang II (*ляво* спрямо *дясно*) резултатите показаха, че *ляво* въведеният Ang II води до достоверно по-малък брой авойданси, в сравнение с *дясно* въведения на I-вия и II-рия ден (съотв. $P \leq 0.01$; $P \leq 0.05$) и при теста за памет ($P \leq 0.05$) (Фиг. 42 A,B,C). Получените резултати показват, че Ang II въведен в *лявото* CeA влошава обучителните и паметовите процеси на плъхове, за разлика от въвеждането му в *дясното* CeA поле, където те не се различават от контролната група.

Post-hoc тестът показва, че лосартан въведен в *лявото* CeA подобрява обучението, т.е. достоверно повишава броя на авойдансите на I-ия ($P \leq 0.005$), на II-рия ($P \leq 0.005$) обучителен ден и при теста за памет ($P \leq 0.02$) в сравнение със съответните контроли. Ефектът на лосартан, въведен в *дясно* CeA не се различава от този на контролите (Фиг. 42 A,B,C).



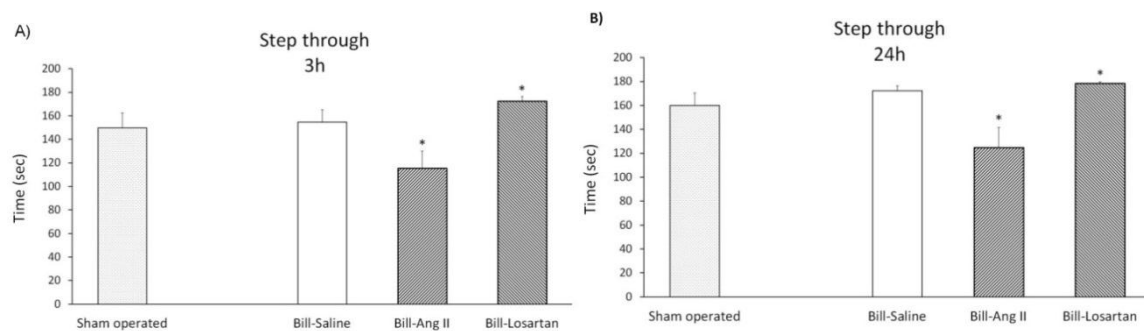
Фиг. 42. Ефекти на Ang II (0.5 μ g) и лосартан (100 μ g), микроинжектирани едностранно (L-ляво или R-дясно) в централното ядро на амигдала (CeA) върху броя «авойданси» (shuttle box) по време на (A) 1-ви и (B) 2-ри обучителен ден и (C) при теста за ретенция. $n = 6$; $**P \leq 0.02$; $***P \leq 0.001$ – достоверност спрямо съответните контроли, третиран с физ. р-р; $^0P \leq 0.05$; $^{00}P \leq 0.01$; $^{000}P \leq 0.001$ – достоверност на разликата между левостранното и десностранно инжектиране на веществата ($\pm$ S.E.M.).

При сравняване ефектите на лосартан, при въвеждането му в лявото и в дясното CeA се установи, че лосартан микроинжектиран в лявото CeA, повишава достоверно броя на авойдансите на I-ия ($P \leq 0.01$) и на II-рия ($P \leq 0.05$) обучителен ден и при теста за памет ($P \leq 0.03$) (Фиг. 42 A,B,C).

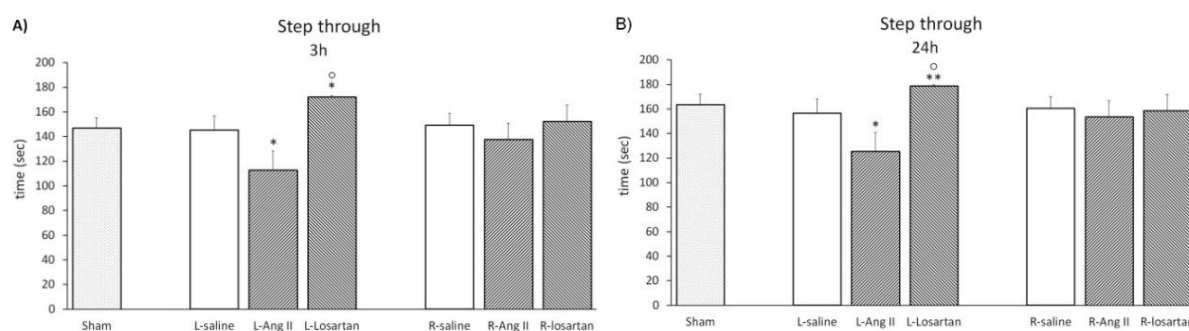
Step through method

Ang II, микроинжектиран двустранно или в лявото CeA уврежда паметта както на 3-ия, така и на 24-ия час, като скъси латентното време при теста за ретенция на 3-тия (съотв. $P \leq 0.05$; $P \leq 0.05$) и на 24-тия час (съотв. $P \leq 0.05$; $P \leq 0.05$) и понижи процента на плъховете, които достигат критерия на обученост на 24-тия час (съотв. с 25% и с 38%, $\chi^2 = 3.826$), в сравнение с контролите, третиран с физ. р-р. Инфузиите на Ang II в дясното CeA не оказват влияние върху критериите за обученост (Фиг. 43 A, B и Фиг. 44 A, B).

Лосартан, микроинжектиран двустранно или в лявото CeA, подобрява обучението и паметта, като удължи латентното време при теста за ретенция на 3-тия (съотв. $P \leq 0.05$; $P \leq 0.04$) и на 24-тия час (съотв. $P \leq 0.01$; $P \leq 0.04$) и повиши процента на плъховете, които достигат критерия на обученост на 24-тия час (съотв. с 12% и с 13%), докато приложен в дясното CeA не го повлиява в сравнение със съответните контроли (Фиг. 43 A,B и Фиг. 44 A,B).



Фиг. 43. Ефекти на Ang II (0.5 μ g) и лосартан (100 μ g), микроинжектирани *двустрочно* в централното ядро на амигдала (CeA) върху латентното време при тестовите за ретенция на (A) 3-ия и (B) 24-ия час (*step through*) $n=8$. * $P \leq 0.05$ - достоверност спрямо контролите, третирани с физ. р-р ($\pm$ S.E.M.).



Фиг. 44. Ефекти на Ang II (0.5 μ g) и лосартан (100 μ g), микроинжектирани *едностранно* (L-ляво или R-дясно) в централното ядро на амигдала (CeA) върху латентното време при тестовите за ретенция на (A) 3-ия и (B) 24-ия час (*step through*) $n=8$ * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ - достоверност спрямо контролите, третирани с физ. р-р; $^0P \leq 0.05$ – достоверност на разликата между левостранното и десностранно инжектиране на веществата ($\pm$ S.E.M.).

4.3.3. Промени в обучението и запаметяването след двустрочно или едностранно въвеждане на ангиотензин II и лосартан в централното ядро на амигдала (CeA) на плъхове с експериментален модел на депресия (OBX)

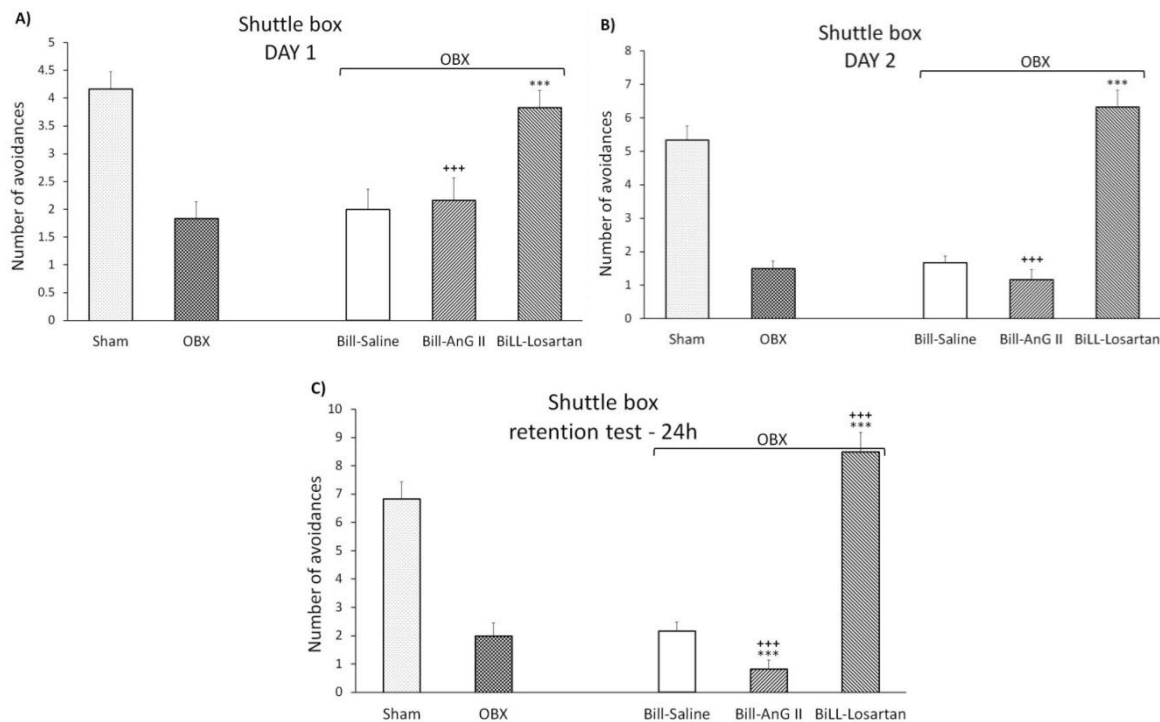
Shuttle box method

Post hoc SNK тестът показва, че лосартан подобрява обучението и паметта на OBX-плъховете, т.е. достоверно повишава броя на авойдансите на OBX-плъховете на: I-вия ($P \leq 0.001$) и на II-рия ($P \leq 0.001$) обучителен ден и при паметовия тест ($P \leq 0.001$) в сравнение с OBX контролите, а в сравнение с sham-оперираните плъхове само при теста за памет ($P \leq 0.001$) (Фиг. 45 A,B,C).

Ang II достоверно понижава броя на авойдансите на OBX-плъховете при теста за памет ($P \leq 0.01$) в сравнение с OBX контролите, както и в сравнение с sham-оперираните плъхове на: I-вия ($P \leq 0.001$) и на II-рия ($P \leq 0.001$) обучителен ден и при

теста за памет ($P \leq 0.001$), т.е. Ang II задълбочава когнитивните дефицити на OBX-плъховете (Фиг. 45 A,B,C).

SNK тестът показва, че лосартан, въведен в *лявото* CeA подобрява обучението на OBX-плъховете на: I-ия ($P \leq 0.001$), II-рия ($P \leq 0.001$) обучителен ден и при теста за памет ($P \leq 0.001$) в сравнение с OBX-плъховете, а в сравнение с sham-оперираните плъхове само при теста за памет ($P \leq 0.05$) (Фиг. 46 A,B,C). Ефектът на лосартан, въведен в *дясното* CeA не се различава от този на OBX-плъховете (Фиг. 46 A,B,C).

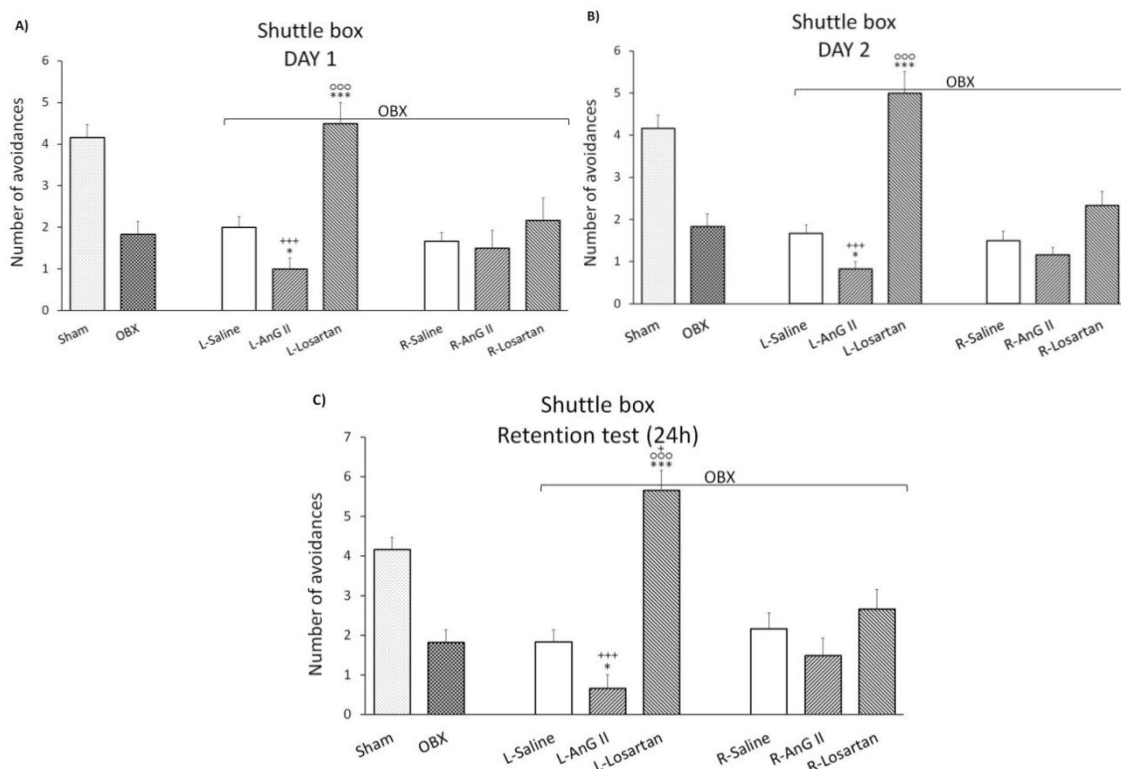


Фиг. 45. Ефекти на Ang II ($0.5 \mu\text{g}$) и лосартан ($100 \mu\text{g}$), микроинжектирани *двустранно* в централното ядро на амигдала (CeA) на OBX плъхове върху броя „авойданси” (*shuttle box*) по време на 1-ви (A) и 2-ри (B) обучителен ден и (C) при теста за ретенция. $n = 6$. *** $P \leq 0.001$ – достоверност спрямо съответните OBX контроли, третираны с физ. р-р; +++ $P \leq 0.001$ – достоверност спрямо sham ($\pm$ S.E.M.).

При сравняване ефектите на лосартан, при въвеждането му в *лявото* и *дясното* CeA на OBX-плъховете се установи, че лосартан инжектиран в *ляво*, повишава достоверно броя на авойдансите на I-ия ($P \leq 0.001$), на II-рия ($P \leq 0.001$) обучителен ден и при теста за ретенция ($P \leq 0.001$) (Фиг. 46 A,B,C).

Ang II, въведен в *лявото* CeA влошава обучението и паметта на OBX-плъховете на: I-ия ($P \leq 0.05$), II-рия ($P \leq 0.05$) обучителен ден и при теста за памет ($P \leq 0.01$), както в сравнение с OBX-плъховете, така и в сравнение с sham-оперираните при всички тестове ($P \leq 0.001$) (Фиг. 46 A,B,C). Ефектът на Ang II, въведен в *дясното* CeA не се различава от този на OBX-плъховете (Фиг. 46 A,B,C).

Сравнявайки ефектите на Ang II, след въвеждането му в *лявото* и в *дясното* CeA на OBX-плъховете се установи, че Ang II инфузиран в *лявото* CeA, понижава достоверно броя на авойдансите само при теста за памет ($P \leq 0.05$) (Фиг. 46 A,B,C).

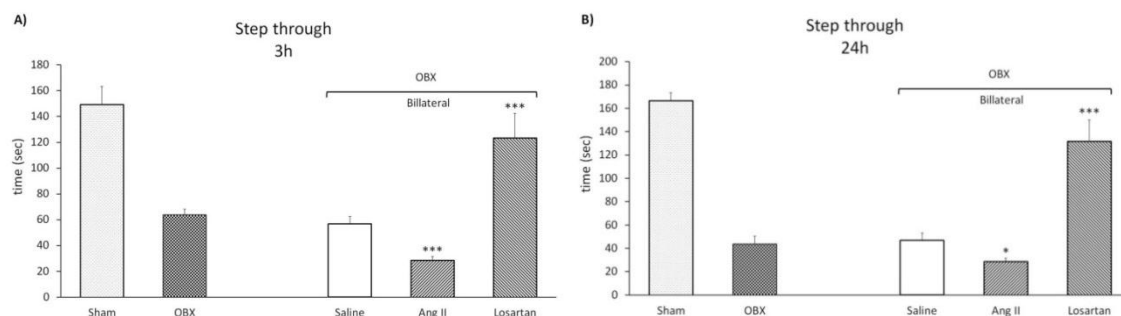


Фиг. 46. Ефекти на Ang II (0.5 μ g) и лосартан (100 μ g), микроинжектирани *едностранно* (L-ляво или R-дясно) в централното ядро на амигдала (CeA) на OBX плъхове върху броя «авойданси» (*shuttle box*) по време на (A) 1-ви и (B) 2-ри обучителен ден и (C) при теста за ретенция. $n = 6$. * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$ – достоверност спрямо съответните OBX контроли, третирани с физ. р-р; $^{000}P \leq 0.001$ – достоверност на разликата между левостранното и десностранно инжектиране на веществата. $^+P \leq 0.05$; $^{+++}P \leq 0.001$ - достоверност спрямо sham ($\pm$ S.E.M.)

Step through method

Проследихме и ефектите на Ang II и лосартан, микроинжектирани билатерално и унилатерално в CeA на фона на развита депресия (OBX плъхове) върху обучението и паметта чрез метод за пасивно избягване (*step through*).

Лосартан, въведен *двустранно* на фона на развито депресивно-подобно състояние, подобрява паметовите процеси - удължи латентното време при теста за ретенция на 3-ия час ($P \leq 0.001$) и на 24-ия час ($P \leq 0.001$) и повиши процента на плъховете (съотв. 25% - $\chi^2 = 5.333$, $P \leq 0.02$, с 50% - $\chi^2 = 7.273$) достигнали критерия на обученост в сравнение с OBX-плъховете (Фиг. 47 A,B).



Фиг. 47. Ефекти на Ang II (0.5 μ g) и лосартан (100 μ g), микроинжектирани *двустранно* в централното ядро на амигдала (CeA) на OBX плъхове върху латентното време при тестовите за ретенция на (A) 3-ия и (B) 24-ия час (*step through*). $n=8$. * $P \leq 0.02$; *** $P \leq 0.01$ - достоверност спрямо OBX контролите, третирани с физ. р-р ($\pm$ S.E.M.).

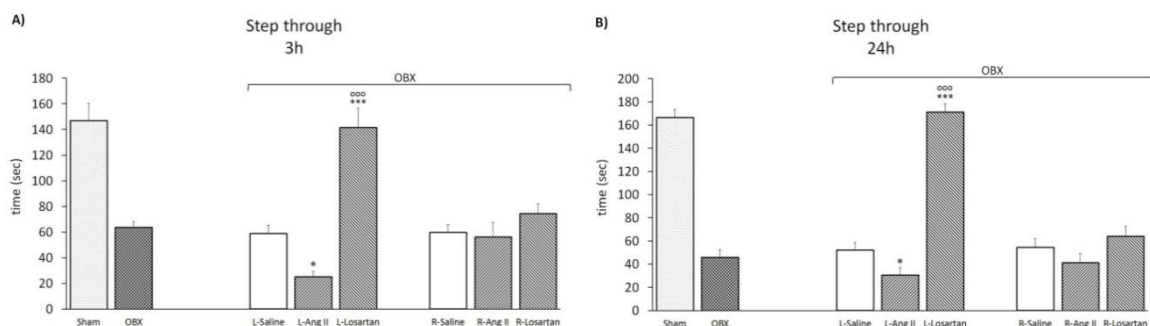
Подобряващият паметта ефект на лосартан е много по-ясно изразен след инфузирането му само в *лявото* CeA на OBX-плъховете: удължава латентното време на 3-ия час ($P \leq 0.001$) и на 24-ия час ($P \leq 0.001$) и повишава процента на плъховете, достигнали критерия на обученост в сравнение със съответните OBX контроли (съотв. с 38% - $\chi^2 = 5.333$, $P \leq 0.02$) и 63% - $\chi^2 = 7.7273$, $P \leq 0.001$) (Фиг. 48 А, В). Въведен, само в *дясното* CeA, лосартанът не показва разлики в сравнение със съответните инжектирани с физ. р-р OBX-контроли (Фиг. 48 А, В).

Двустранното микроинжектиране на Ang II в CeA на OBX плъховете, води до влошаване на паметта, като достоверно скъсява латентното време при теста на 3-ия час ($P \leq 0.001$) и на 24-ия час ($P \leq 0.02$) и намалява процента на плъховете, достигнали критерия на обученост в сравнение с OBX-плъховете (Фиг. 47 А, В).

При микроинжектиране на Ang II *едностранно*, в *лявото* CeA, се наблюдава скъсяване на латентното време при тестовите за ретенция на 3-ия час ($P \leq 0.05$) и на 24-ия час ($P \leq 0.05$) и намаляване на процента на плъховете, които достигат критерия за обученост Фиг. 48 А, В).

При сравняване ефектите на лосартан, при въвеждането му в *лявото* и в *дясното* CeA на OBX-плъховете се установи, че лосартан инжектиран в *ляво*, удължава латентното време на 3-ия час ($P \leq 0.001$) и на 24-ия час ($P \leq 0.001$). Фиг. 48 А, В).

Ефектът на Ang II, въведен в *дясното* CeA не се различаваше съществено от OBX контролата Фиг. 48 А, В).



Фиг. 48. Ефекти на Ang II (0.5 μ g) и лосартан (100 μ g), микроинжектирани *едностранно* (L-ляво или R-дясно) в централното ядро на амигдала (CeA) на OBX плъхове върху латентното време при тестовите за ретенция на (A) 3-ия и (B) 24-ия час (*step through*). $n=8$. * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$ - достоверност спрямо OBX контролите, третирани с физ. р-р; **** $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата между левостранното и десностранно инжектиране на веществата ($\pm$ S.E.M.).

Получените резултати и при двата метода за обучение и памет (*shuttle box* и *step through*) показаха, че Ang II, инфузиран *билатерално* или само в *лявото* CeA на фона развито депресивно-подобно състояние (OBX) влошава паметовите процеси, докато лосартан, инфузиран *двустранно* или в *ляво*, подобрява паметта на OBX плъховете в сравнение със съответните OBX контроли. Паметта се подобрява след инхибиране на AT1 рецепторите в лявата амигдала в сравнение с дясната амигдала. Установено е, че лосартан обръща паметовите дефицити, предизвикани от олфакторната булбектомия, за разлика от Ang II, който ги задълбочава.

Получените данните говорят за един латерализиран, модулиращ ефект на лосартан, инфузиран в CeA, върху паметовите дефицити при плъхове с депресивно-подобен

синдром. В положителния паметов ефект на лосартана е въввлечено предимно *лявото* СеА, което предполага неравномерното разпределение на АТ1 рецепторите в двете хемисфери, а от там и различната им роля при депресивните състояния.

5. Проучване на клетъчно-молекулните механизми на амфетамин-индуцираното стереотипно поведение (експериментален модел на синдром на Турет)

Повтарящата се експозиция на психостимулиращи средства, такива като амфетамин, кокаин или марихуана засилват поведенческите отговори, феномен известен като сензитация.

При гризачи, поведенческата сензитация се характеризира с прогресивно повишаване на стереотипите и локомоторната активност след повтарящо се (следвано от периоди на прекъсване) третиране с психостимуланти (Kalivas and Stewart, 1991; Robinson and Becker, 1996). Поведенческата сензитация е дълготрайна и може да бъде наблюдавана след повторно въвеждане на по-ниски дози от веществата даже месеци по-късно след последния прием (Robinson and Berridge, 1993; Vanderschuren and Kalivas, 2000). Пристрастяването към психостимулиращи лекарства е невроадаптивно разстройство, характеризиращо се с нарушаване на регулацията на допаминавата кортиколимбична система за възнаграждение, която обхваща вентралната тегментална област (VTA), амигдала, стриатума и префронталната и орбитофронталната кора (Nestler et al., 1996; Camí and Farré, 2003).

Психостимуланти като кокаин, амфетамин и морфин, повишават екстрацелуларните нива на допамин, индуцирайки незабавно ранна генна експресия, която предизвиква стереотипно поведение (Everitt and Wolf 2002; Choe et al., 2002; Rothman and Baumann, 2003; Valjent et al., 2005; Shi and McGinty, 2006; 2007).

Проучвания, изследващи молекулярните механизми, лежащи в основата на индуцираната от лекарства сензитация, показват, че психостимулантите имат многофункционални ефекти върху кортиколимбичните мозъчни региони и подобряват експресията и/или активирането на няколко протеина, които изискват функционални допамин 1 рецептори (D1Rs) и *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) рецептори.

Екстрацелуларната сигнал-регулираща киназа 1/2 (ERK1/2) също играе важна роля в поведенческата сензитация. Остро въведеният амфетамин активира ERK1/2 в striatum, nucleus accumbens, ventro tegmental area и prefrontal cortex на мишки и плъхове, повишавайки ранната генна експресия (Choe et al., 2002; Valjent et al., 2005; Shi and McGinty, 2006, 2007; Rajadhyaksha et al., 2004; Pascoli et al., 2005; Choe and Wang, 2002). Тези данни подчертават значението, както на допамин и глутамат/NMDAR медираната синаптична трансмисия, последвана от активиране на ERK1/2 пътя, така и на незабавното индуциране на ранни гени в развитието на стереотипии, предизвикани от психостимуланти.

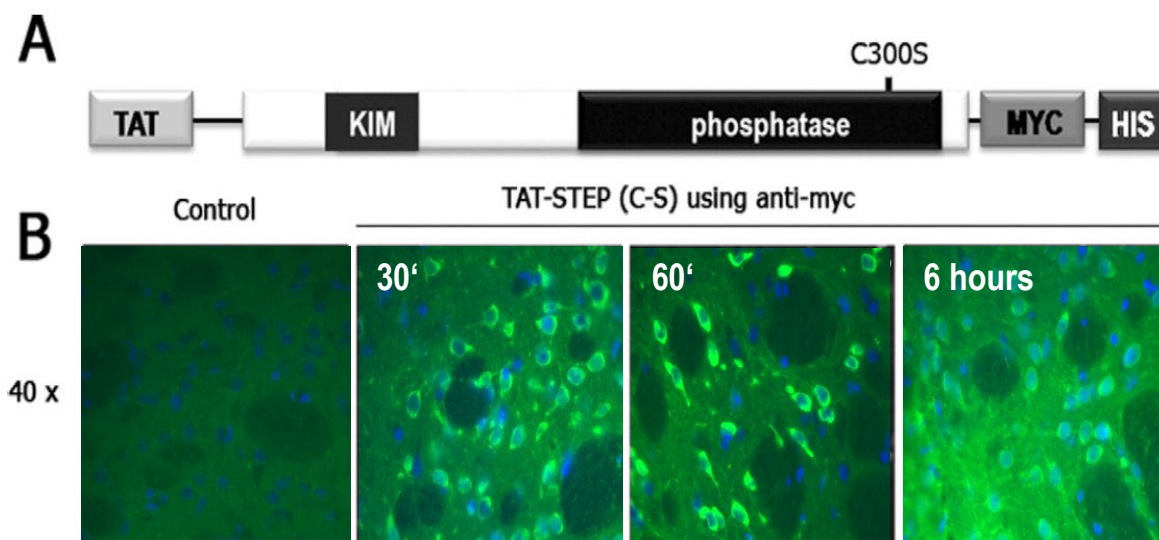
Стриаталната протеин тирозин фосфатаза (STEP) е мозъчно-специфична тирозин фосфатаза, която най-вероятно е въввлечена в този процес чрез регулиране на синаптичните протеини, необходими за развитието на синаптичното укрепване (synaptic strengthening) (Paul et al., 2003; Muñoz et al., 2003).

Имайки предвид, горе споменатите данни, както и факта, че един от експерименталните модели на синдрома на Турет са стереотипите, предизвикани от хроничното въвеждане на амфетамин, ние проучихме дали синтезирания субстрат-прихващащ протеин TAT-STEP(C-S) може да наруши развитието на амфетамин-индуцираните стереотипии.

5.1. Проучване ефектите на субстрат прихващаща изоформа на STEP - TAT-STEP(C-S), въведена във вентролатералния стриатум (VLS) върху индуцираните от амфетамин поведенчески стереотипии

5.1.1. Имунохистохимични изследвания

За да се изследва ролята на STEP като регулатор на амфетамин индуцирани стереотипии, най напред ние използвахме синтезираната субстрат-прихващаща TAT-STEP46, при която основния цистеинов участък в каталитичния домен, бе заменен със серин (Pelkey et al., 2002) (Фиг. 49 A). Първо установихме, че TAT-STEP(C-S) е проникнал в клетките на мястото на инжектиране. Оцветяването с *anti-myc* антитяло се открива само при инжектирани с TAT-STEP(C-S) животни, а не при неинфузирани животни и продължава до 6 часа след инфузията (Фиг. 49 B).



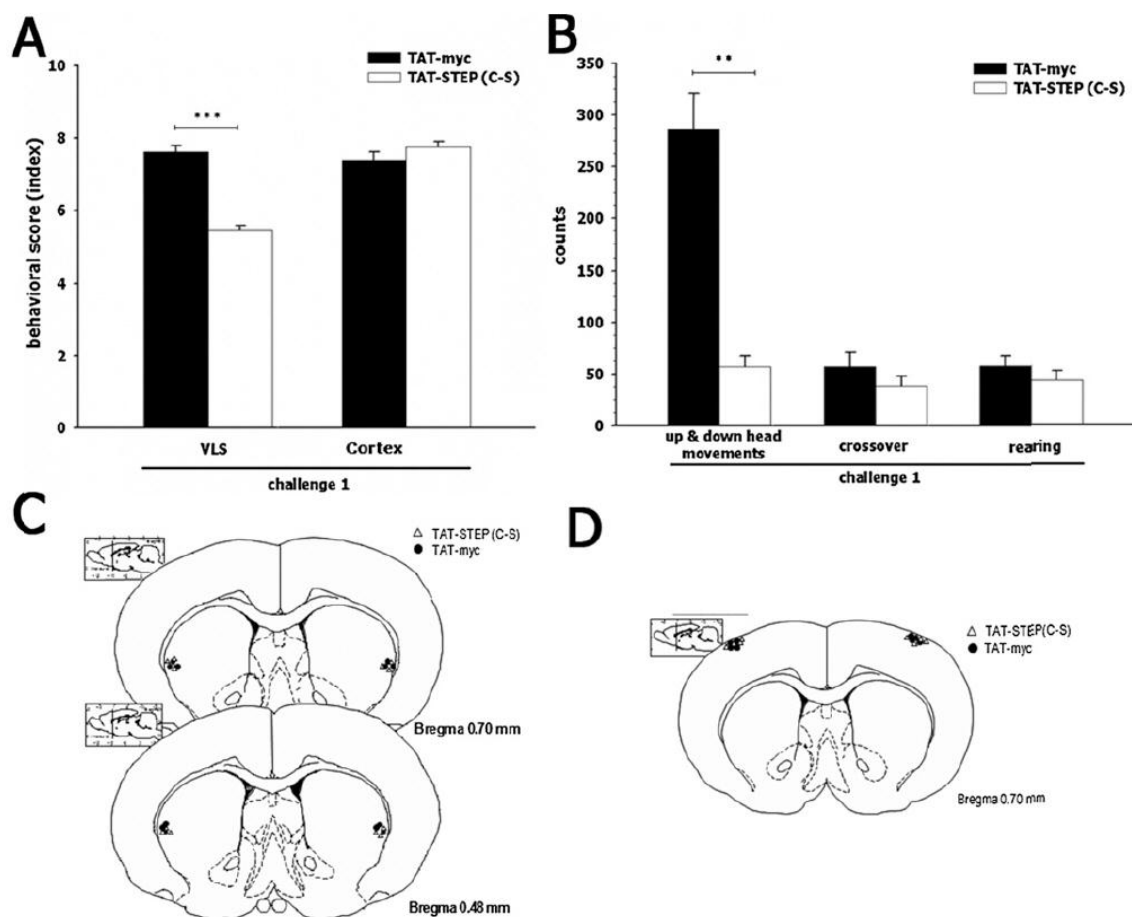
5.2. Поведенчески изследвания

След това проучихме инфузията на TAT-STEP(C-S) в VLS дали ще намали индуцирането на стереотипиите след повтарящо се, в различни интервали, инжектиране на амфетамин, като се отчиташе стереотипното поведение и локомоторна активност.

Post hoc Tukey анализът на поведенческите промени показва, че плъховете, инфузирани с TAT-STEP(C-S), показват значително потискане на стереотипното поведение в сравнение с тези, инфузирани с TAT-мус. [ANOVA два фактора: мозъчна област и пептидни ефекти $F_{1,12} = 26,150$; $P \leq 0.001$] (Фиг. 51 A). Въвеждането на TAT-STEP(C-S) в кортекс (структура използвана за контрола) не намалява стереотипното поведение в сравнение с TAT-мус контролите (Фиг. 50 A).

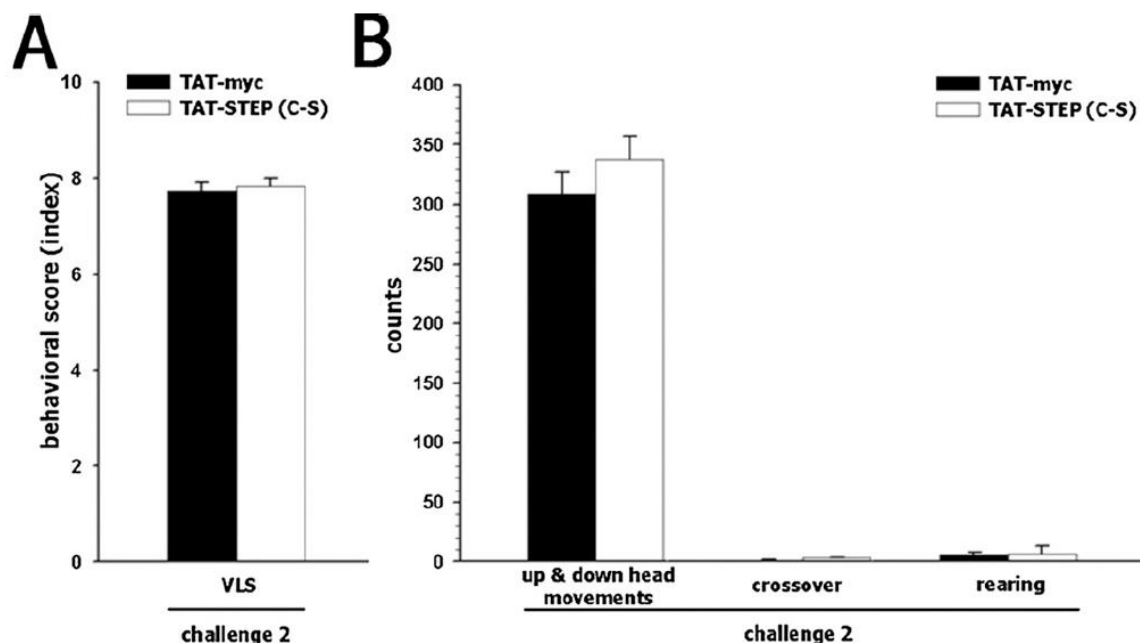
Животните, инфузирани с TAT-STEP(C-S) във VLS, показват значително понижаване на движенията на главата нагоре и надолу в сравнение с животните, инфузирани с TAT-мус.

При отчитане на стереотипната активност (движения на главата нагоре и надолу) и локомоторната активност, ние установихме, че въвеждането на TAT-STEP(C-S) по време на хронично третиране с амфетамин блокира развитието на стереотипиите [ANOVA два фактора: мозъчна област и пептидни ефекти $F_{1,12} = 10.396$; $P \leq 0.005$] (Фиг. 50 B).



Фиг. 50. (А) Инфузирането на TAT-STEP(C-S) в VLS блокира развитието на амфетаминовата стереотипия. **А.** "Challenge day 1" (поведенческа скала). Плъховете бяха инфузирани с TAT-STEP (C-S) ($n = 6$) или TAT-мус (контрол; $n = 6$) в VLS 1 час преди инжектирането на амфетамин (5 mg/kg) за 5 поредни дни. След 6 дневна почивка (за плъховете) животните бяха инжектирани с ниската доза амфетамин (2 mg/kg). **(В)** При стереотипните движения на главата (душене нагоре и надолу) имаше достоверна разлика. Преминаването на средната линия (crossovers) и повдигането на задните лапи (rearing) не бяха достоверни. (А) и (В) S.E.M. $^{**}p \leq 0.005$, $^{***}p \leq 0.0001$. **(С)** Хистологична верификация на имплантирането на канюлите при плъхове инфузирани с TAT-STEP (C-S) или TAT-мус (контрол) в VLS. **(D)** Хистологична верификация на имплантирането в кортекс.

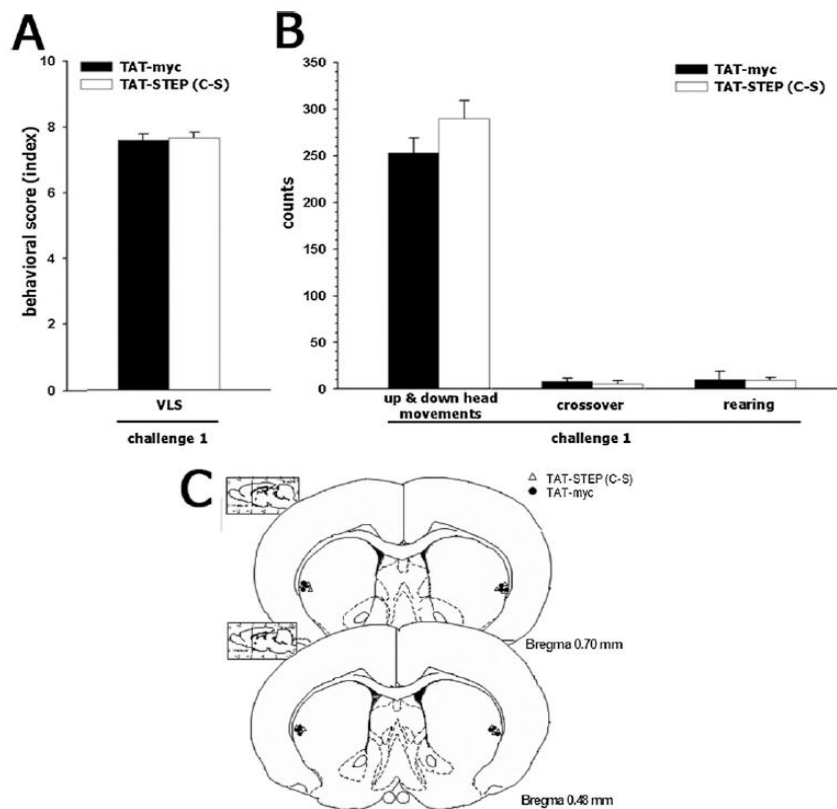
След това, проверихме дали повтарящите се инфузии във VLS могат да причинят трайни мозъчни увреждания. Плъховете предварително третирани с TAT-STEP(C-S) в продължение на 5 последователни дни, бяха отново инжектирани с амфетамин (5 mg/kg). Шест дни по-късно, плъховете бяха инжектирани с единична доза амфетамин (2 mg/kg). Животните, които предварително са били инфузирани с TAT-STEP(CS) или с TAT-мус, не показват значителни разлики в стереотипното поведение и локомоторното (rearing) поведение (ANOVA – NS) (Фиг. 51). Разгледани заедно, погорните данни показват, че потискането на поведенческите стереотипии след инфузията на TAT-STEP(C-S) в VLS не се дължат на увреждания в VLS.



Фиг. 51. Инфузирането на TAT-STEP не предизвиква трайни промени в VLS. **(A)** Поведенческа скала. Плъховете с предхождащото инфузиране на TAT-STEP(C-S) или TAT-мус и с последващо инжектиране на amphetamine (5 mg/kg) за 5 дни, но този път без паралелното инфузиране на TAT-STEP(C-S) или TAT-мус. **(B)** Стереотипни движения и двигателна активност.

След това проучихме дали инфузията на TAT-STEP(C-S), по време на тествания ден 1, сама по себе си може да блокира възникването на стереотипии.

Нови групи плъхове бяха инжектирани в продължение на 5 дни само с амфетамин (5 mg/kg i.p.). На тествания ден 1 животните бяха инфузирани с TAT-STEP(C-S) или TAT-мус 1 час преди да се инжектира 2 mg/kg i.p. амфетамин. Установено бе, че остро прилагане на TAT-STEP(C-S) в VLS на фона на амфетаминовата сензитация не повлиява възникналото стереотипно поведение (one-way ANOVA, $P \leq 0.75$; $p \leq 0.18$; $P \leq 0.87$; $P \leq 0.60$, съотв.) (Фиг. 52 A, B).



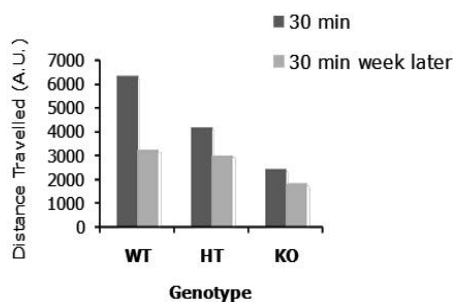
Фиг. 52. Ефект на TAT-STEP (C-S) при остро въвеждане в VLS в деня на тестване 1h преди амфетамин 2 mg/kg (challenge day 1) на фона на амфетаминова сензитация след 5 дневно третиране с 5 mg/kg амфетамин). **(A)** Поведенческа скала; **(B)** Стереотипни движения и двигателна активност. **(C)** Хистологична верификация на имплантирането на канюлите в VLS.

5.3. Поведенчески изследвания на STEP knockout мишки

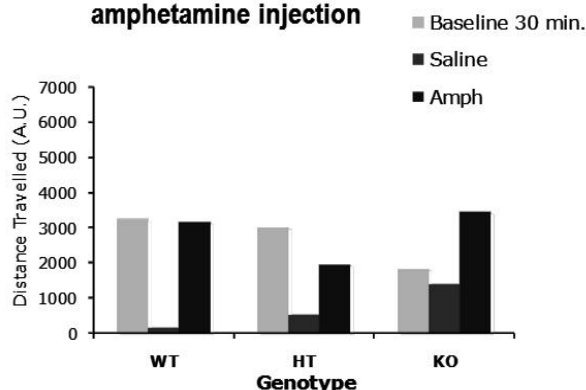
Опитите бяха проведени на 24 *STEP knockout* мишки, порода C57. Локомоторната активност се отчиташе в апарат open-field. На първия тестов ден животните бяха поставени в open-field за 30 мин. След 1 седмица те отново бяха поставени за 30 мин, след което инжектирани с амфетамин или физ. р-р и отново сложени за 30 мин. в open field апарат.



A. Open field baseline activity



B. Open field activity after amphetamine injection



Фиг. 53. Двигателна активност на STEP KO мишки в "open field": (A) - за период от 30 мин с интервал от 7 дни (baseline); (B) - за период от 30 мин. след инжектиране на амфетамин 2.5 mg/kg.

Получените резултати показаха, че *STEP knockout* мишките имат по-ниска локомоторна активност и са по-чувствителни към амфетамин в сравнение с *wild type* мишките.

В заключение, получените резултати показват, че инфузирането на субстрат-прихващата изоформа на STEP (TAT-STEP(C-S)) във вентролатералния стриатум блокира амфетамин-индуцираните стереотипни движения. Самостоятелно въведен TAT-STEP(C-S) на тествания ден във вентролатералния стриатум и в кортикалните области не блокира стереотипите. Следователно тези ефекти не са резултат от неспецифичното повлияване на TAT-STEP(C-S) върху мозъчната функция.

5.4. Проучване ефектите на TAT-STEP(C-S) върху амплитудата на EPSP (възбуждащ постсинаптичен потенциал) след високочестотно стимулиране на кортико-стриатални срезове

Известно е, че хроничната експозиция на стимуланти променя синаптичното предаване в кортико-стриаталните синапси, което повишава вероятността, че необичайна синаптична пластичност е в основата на някои от поведенческите ефекти на психостимулиращата зависимост (Cen-tonze et al., 2006).

Така, ние решихме да изследвахме *in vitro* в кортикостриатални срезове ефекта на TAT-STEP(C-S) върху електрофизиологичните отговори. Установихме че, високочестотната стимулация (HFS) на контролните срезове, предварително инкубирани с TAT-мус, води до постоянно увеличаване на амплитуда на възбуждащия постсинаптичен потенциал - EPSP (LTP) за целия период на изследването ($p \leq 0.01$ при 5, 10, 20 и 30 минути след HFS) в по-голямата част от проучените стриатални неврони (9 от 11). Обратно, приложението на TAT-STEP(CS) преди стимулирането с HFS напълно блокира увеличаването на амплитудата на EPSP, наблюдавана при TAT-мус контролите ($p \pm 0.01$ на 5, 10, 20 и 30 минути след HFS) във всички тествани неврони (12 от 12) (Фиг. 53 A).

TAT-STEP(C-S) също е способен да предотврати LTP кортико-стриаталната амплитуда на EPSP, когато HFS стимулация е извършена на срезове, измити в присъствието на амфетамин (10 $\mu\text{mol/l}$, приложен 10 минути преди HFS). Съответно,

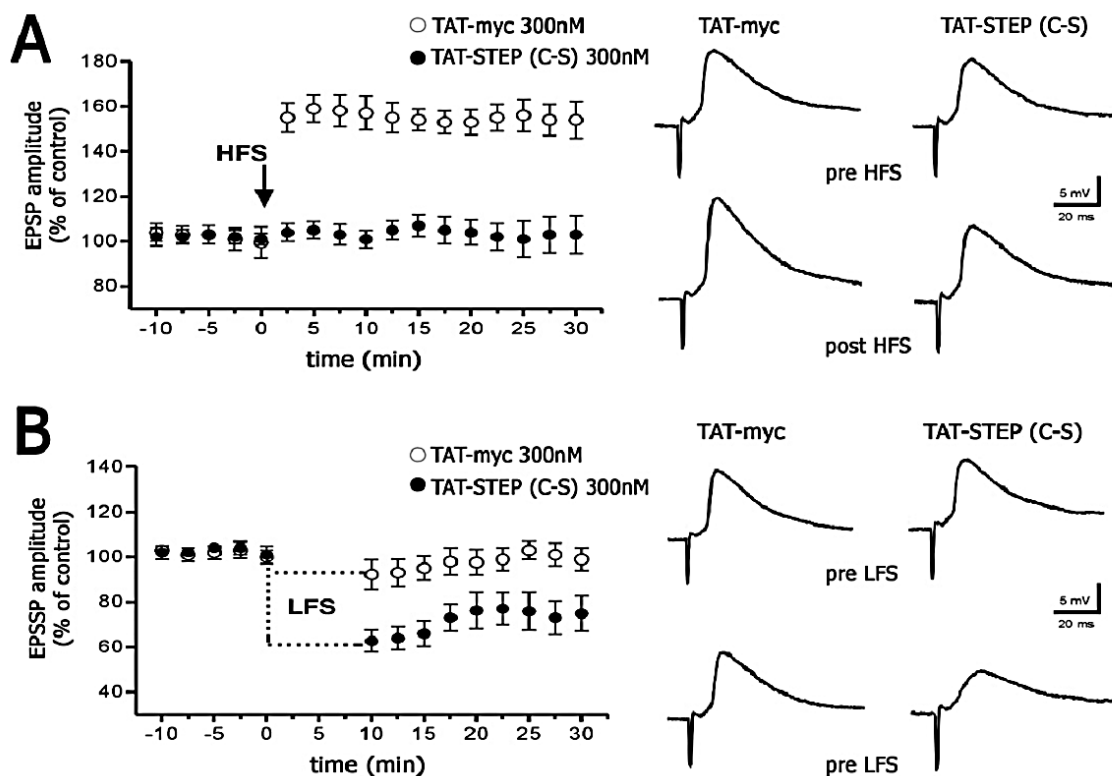
амплитудата на EPSP, записана 30 минути след HFS е $152 \pm 4\%$ от стойностите, предшестващи HFS стимулацията ($P \leq 0.01$), в срезове, третирани с TAT-мус плюс амфетамин и $103 \pm 4\%$ при срезове, третирани с TAT-STEP(C-S) плюс амфетамин ($P \leq 0.05$) при двете условия. При три неврона ние приложихме TAT-STEP(C-S) 10 минути след HFS протокола, за да видим дали това третиране е в състояние да повлияе на поддържащата кортико-стриатална фаза на LTP. Прилагането на TAT-STEP(CS) след HFS не обръща кортико-стриатална LTP, защото амплитудата на EPSP е около 150% от стойностите преди HFS през целия експериментален период ($P \leq 0.01$ на 20, 30 и 40 минути след HFS).

Също така, изследвахме ефектите на TAT-мус ($n = 4$) и на TAT-STEP(C-S) ($n = 4$) върху HFS-индуцирана кортикостриатална дълготрайна депресия (HFS-LTD), алтернативна форма на синаптичната пластичност, която не зависи от стимулирането на допамин D1 рецепторите (Centonze et al., 2003). Установихме, че нито едно от третиранятия не е въввлечено в индуцирането на HFS-LTD.

Зависимата LFS форма на LTD също е описана при кортикостриаталните синапси (Roseni and Lovinger, 2005). Освен това, LFS е особено ефективна при подтискащата глутаматна стриятална трансмисия, когато е извършена след индуцирането на LTP (Picconi et al., 2003; Centonze et al., 2006). Така, ние проверихме дали TAT-STEP(C-S) може да смекчи психостимулиращите ефекти, улеснявайки LFS-зависимата LTD. За да тестваме тази възможност ние приложихме LFS на срезове предварително потопени в TAT-STEP(C-S) и TAT-мус. В контролните срезове, при невроните третирани с TAT-мус, LFS не успя да индуцира персистиращата депресия на кортикостриаталната EPSPs ($n=8$ от 8). Обратно, LFS индуцира стабилна LTD при невроните потопени в TAT-STEP(C-S) ($n=8$ от 8) (Фиг. 53 B).

Получените резултати показват, че TAT-STEP(C-S) демаскира LFS-зависимата форма на кортикостриатална LTD, което предполага, че STEP играе важна роля за понижаване на прага на синаптична стимулация, необходима за индуциране на LTD.

Разрушителните ефекти на TAT-STEP(C-S) върху кортикостриаталната LTP и благоприятното му влияние върху депресията на EPSP, предизвикана от LFS, са важни за блокадата на амфетамин предизвиканите стереотипии, тъй като поведенческите ефекти на хроничното третиране с психостимуланти, поне отчасти се основава на нормалната индукция на кортикостриаталната LTP чрез HFS, но намалява чувствителността на кортикостриаталните синапси към LFS-индуцираната депотенциация (Centonze et al., 2006).



Фиг. 53. Ефекти на STEP и TAP-STEP върху кортикостриаталната пластичност. **(А)** Предварително инкубираните с TAT-STEP стриатални срезове (C-S) (300 pmol/l), блокират дълготрайното потенциране (LTP), предизвикано от високочестотна стимулация (HFS), в стриаталните неврони. Индукцията на LTP не се повлиява от TAT-мус (300 pmol/l). В дясно са примери за възбуждащи постсинаптични потенциали (EPSPs), записани преди (горната) и 10 минути след HFS (по-ниска) от неврони, третирани с TAT-мус и TAT-STEP(C-S). **(В)** Нискочестотна стимулация (LFS) не провокира дълготрайни промени в кортикостриаталното предаване при срезове потопени в TAT-мус, за разлика от LTD в срезове, предварително инкубирани с TAT-STEP(C-S). В дясно са примери за EPSP, записани преди и 10 минути след края на LFS.

Има няколко възможни механизма, които биха обяснили тези резултати. TAT-STEP(C-S) се свързва с ERK1/2 и блокира транслокацията му в ядрото както и ERK1/2 медираната транскрипционна активация (Paul et al., 2003). Известно е, че дълготрайните поведенчески промени предизвикани от амфетамин включват активацията на ERK1/2 чрез стимулация на допамин/D1Rs в дорзалния стриатум (Valjent et al., 2004; 2005; Corbille et al., 2007).

Стимулацията на допамин/D1Rs също води до активация на ендогенния STEP чрез активиране на протеин киназа A (PKA) и фосфорилиране на серин в домена на киназа-свързващия мотив (KIM) на STEP. Фосфорилирането на този домейн предотвратява свързването на STEP с ERK1/2 и така удължава действието на активността на ERK1/2 (Paul et al., 2003; Venkitaramani et al., 2007).

Стимулацията на NMDAR е също необходима при активацията на ERK1/2 от амфетамин (Valjent et al., 2005). В предишни работи на Lombroso P. и сътр. е показано,

че STEP намалява активността на NMDAR чрез дефосфорилация на регулаторния тирозин (tyr1472) на NR2B субединицата от NMDAR (Snyder et al., 2005). Авторите установяват че бета-амилоида води до активация на STEP, който от своя страна дефосфорилира (tyr1472) в NR2B субединицата и инициира интернализацията на NMDAR комплекса. Следователно освен, че STEP регулира пътя на ERK1/2, също може и да нарушава мигрирането на NMDAR. Така, най-вероятно е, че TAT-STEP4(C-S) блокира амфетамин предизвиканите стереотипии чрез регулиране на ERK1/2, NMDAR или някои друг неидентифициран субстрат на STEP.

Нашите резултати са в съгласие с предишни изследвания, при които TAT-STEP(C-S) блокира консолидацията на паметта (Paul et al., 2007).

STEP е установен и в други мозъчни области свързани с индуцираната пластичност (striatum, hippocampus, cortex, amygdala) и вероятно участва в други форми на обучение в които са въввлечени тези мозъчни структури. Резултатите от тези изследвания са в подкрепа на схващането, че STEP намалява развитието на мозъчната пластичност чрез способността си да индуцира интернализацията на глутаматните рецептори и да инактивира протеините отговорни за сигналното предаване, намиращи се в синапсите. Все още обаче използването на субстрат-прихващатата форма на STEP (TAT-STEP₄₆(C-S)) не може напълно да обясни ролята на ендогенния STEP.

Бъдещи изследвания на *STEP knockout* мишки са необходими, за да се покаже дали липсата на STEP потенцира синаптичните връзки. Ако това е така, то инхибитори на STEP биха могли да се използват терапевтично, подпомагайки когнитивните процеси.

ОБОБЩЕНО ОБСЪЖДАНЕ

Значимостта на проблема за паметта от приложна гледна точка проличава от факта, че едно от най-сериозните нарушения при редица невропсихични заболявания са паметовите увреждания и честата поява на паметови дефицити.

Засега най-продуктивната изследователска стратегия при проучване на неврохимичните основи на обучението и паметта е намирането на подходящи модели на заболявания - подбиране на такива видове организми, при които могат да се наблюдават дадени форми на обучение и запаметяване, така че получените данни, да могат да се екстраполират при хората, развили паметови дефицити. Важно е да се отбележи, че са създадени модели върху лабораторни животни на заболявания като болестта на Паркинсон, болестта на Алцхаймер, депресии, епилепсия и т.н., като получената с помоща на тези модели информация, допринася за изясняване на неврофизиологичните, неврохимичните и невроморфологичните основи на нормалната памет и на видовете патологични процеси, които могат да предизвикат амнезия. В експерименталните невронауки въпросите относно амнезията често се фокусират на клетъчно и молекулно ниво – проучват се промените, които настъпват в синапсите при формирането на паметта. За разбиране механизмите на паметта е изучаването и на клетъчната и молекулна биология на пластичността на индивидуалните неврони и техните синапси, където са записани промените, които представляват депонираната информация, т.е. паметта.

Депресивните разстройства са социално значими заболявания, които засягат както емоционалното състояние на индивида и неговата мотивация, така и когнитивните му функции.

Изследванията, насочени към разкриване на етиопатогенезата на депресията продължават вече десетилетия, но конкретните патогенетични механизми остават неизяснени. Интензивно се проучват неврохимичните фактори и сигнални пътища, участващи в патофизиологията на депресивните разстройства, както и влиянието на генетичните фактори, стреса и тяхното взаимодействие за определяне на предразположение към развитие на депресия.

Натрупах се и доказателства за участие на канабиноидите и неuropeптидите в осъществяването на различни поведенчески реакции, както и за въвличането им в механизмите на психични заболявания като депресивни, афективни, тревожни разстройства и др. Все още обаче тези нови факти не са интегрирани в цялостното разбиране за ролята на канабиноидите и неuropeптидите в нормалните мозъчни функции и в развитието на неврологични или психични болестни състояния.

Благоприятните ефекти на канабиноидите са описани за широк диапазон от психични разстройства, включително тревожност, психоза и депресия. Механизмите, отговорни за тези ефекти, обаче все още са слабо разбрани. Подобно на антидепресантите или атипичните антипсихотични лекарствени средства, използвани в клиниката, последни данни ясно показват, че ендоканабиноидната система е въвличена в тези състояния. Механизмът на действие на канабиноидите остава спорен и все още неизяснен.

Ние проучихме участието на мозъчните CB1 канабиноидни рецептори в изследователското поведение, обучението и паметта на плъхове с депресивно подобно състояние (OBX).

Нашите данни показаха, че агониста на CB1 рецепторите HU 210, приложен самостоятелно i.c.v. потиска, докато антагониста SR141716A (i.c.v.) повишава

експлораторната активност, без да нарушават хабитуацията на интактните животни, въпреки разнопосочното си действие. Това подсказва, че остроото прилагане на лиганди на CB1 рецепторите при плъхове не би нарушило значимо когнитивните възможности и приспособимостта им при попадане в непозната среда. HU 210 е класически синтетичен канабиноид, който показва фармакологични характеристики, наподобяващи тези на делта9-тетрахидроканабинол (Δ^9 THC) (Otani и Giuliani, 2001; Vardakou et al., 2010). Нашите резултати са в съгласие с проучвания, показващи, че остроото приложение на Δ^9 THC, както и на синтетични канабиноидни агонисти (WIN,55,212-2 или AM-411) при възрастни плъхове, намаляват както хоризонталната, така и вертикалната двигателна активност при теста open field (Jarbe et al., 2002; 2004; 2006; Pandolfo et al., 2007). Fox и сътр. (2009) демонстрират, че поведенческите ефекти на канабиноидните агонисти при плъхове зависят от дозата, възрастта и продължителността на експозицията. В проучване на Arevalo et al., (2001) е показано, че активирането на канабиноидните рецептори от CP55,940 (неспецифичен агонист на CB рецепторите) модулира по дозо-зависим начин изследователско поведение и състоянието на тревожност, независимо едно от друго. Използвайки различни дози те установяват потискане на изследователното поведение при доза, която не повлиява двигателната активност и тревожността. Резултатите ни за стимулиращият изследователското поведение ефект на SR 141716A е в съответствие с тези на Compton и сътр. (1996). Доказано е, че канабиноидите инхибират както възбуждащите, така и инхибиторните синапси, но инхибиторните синапси общо взето имат по-високи нива на CB1 рецептори, отколкото възбуждащите синапси. Докладваният увреждащ ефект на CB1 рецепторните агонисти върху синхронизацията на хипокампаалните неврони, за кратко време може да се отрази върху локомоторна активност на животните (Kano et al., 2009; Robbe and Buzsáki, 2009).

Нашите данни са в съгласие и с данните на Bosier и сътр. (2010), които установяват, че прилагането на агонисти на CB1 рецепторите при гризачи предизвиква развитие на т.нар. канабиноидна тетрада, включваща понижена локомоторна активност, хипоалгезия, хипотермия и каталепсия, които изчезват при блокиране на CB1 рецепторите. Ендоканабиноидната система има важна модулираща роля върху освобождаването на невротрансмитери в двигателните зони на мозъчната кора и базалните ганглии и е основен участник в осъществяването на синаптична пластичност чрез задръжните и активиращите интерневрони в тях (Rodríguez et al., 2005). Polissidis и сътр. (2013) регистрират освобождаване на глутамат и допамин в префронталния кортекс и базалните ганглии, което зависи както от дозата на CB1 рецепторния агонист WIN55,212-2, така и от мястото на въвеждане. Тези автори, също установяват и двуфазни, доза-зависими промени в изследователското поведение и двигателната активност – ниските дози ги стимулират и могат да нарушат хабитуацията, а високите дози понижават двигателната активност и експлораторното поведение. Не е установена, обаче корелация между освободените невромедиатори и промените в изследователската активност. Прилагането на CB1 рецепторния антагонист SR 141716A, едновременно с WIN55,212-2 блокира описаните ефекти (Polissidis et al., 2013), което показва участието на CB1 рецепторите.

В ЦНС CB1 рецепторите са разположени предимно пресинаптично и модулират освобождаването на други невротрансмитери, като по този начин участват в кратковременната синаптична пластичност (Ohno-Shosaku and Kano, 2014). Ендоканабиноид-медираната синаптична пластичност обхваща различни части от

системата за регулация на движенията при гръбначните, включително мрежи от неврони в центровете, отговорни за планиране и изпълнение на движенията в мозъчната кора, базалните ганглии, малкия мозък и мозъчния ствол (El Manira and Kyriakatos, 2010). Експериментални данни показват, че ендоканабиноидната система, със своята модулаторна роля в ЦНС, повлиява настроението и тревожността и има важно значение в патогенезата на депресивните разстройства (Vinod and Hungund, 2006; Pudell et al., 2014).

Ние установихме, че агониста на CB1 рецепторите HU210 влошава обучителните и паметови процеси при интактни животни, както при теста за активно, така и при теста за пасивно избягване, за разлика от антагониста SR 141716A, който съществено подобрява обучението и паметта.

Резултатите ни са в съответствие с констатациите, че Δ^9 -THC нарушава пространствената памет, като това увреждане се обръща от CB1 рецепторния антагонист SR 141716A (Mishima et al., 2001). Нещо по-вече, синтетичните канабиноидни рецепторни агонисти CP55,940 и WIN55,212-2 влошават обучителните и паметови процеси в радиален лабиринт (radial maze) (Lichtman et al., 1995) за разлика от антагониста SR 141716A, който приложен самостоятелно подобрява пространствената памет (Lichtman, 2000; Pertwee, 2005). В допълнение, Δ^9 -THC и агонистите на канабиноидните рецептори нарушават LTP в хипокампа на плъхове (Nowicky et al., 1987; Collins et al., 1995; Terranova et al., 1995; Varvel et al., 2007; Abush and Akirav, 2010). Счита се, че инхибиторният ефект на канабиноидите върху LTP е свързано с инхибирането на освобождаването на глутамат чрез пресинаптични CB1 канабиноидни рецептори (Schlicker and Kathmann, 2001). Така че, освен допаминергичната, GABA-ергичната, най-вероятно и глутаматергичната невромедиаторна система е въввлечена в CB1 индуцираното увреждане на паметта (Fujiwara and Egashira, 2004; Szabo and Schlicker, 2005; Pertwee, 2005). Тъй като CB1 рецепторите са пресинаптично разположени върху GABA-ергични интерневрони и глутаматергични неврони, те действат като ретроградна feedback система и по този начин, биха допринесли за модулиращите им когнитивните функции ефекти

Резултатите ни са в съответствие с констатациите за увреждащия ефект на синтетичните канабиноидни агонисти върху хипокампалната LTP (Lichtman et al., 1995; Hoffman et al., 2007). Varvel и сътр. (2007) предполагат, че инхибиторите на деградацията на ендоканабиноидите и директните агонисти на CB1 рецепторите могат да имат различни ефекти по отношение на обучението и паметта, наблюдение, което може да има важни генетични последици. Данните ни обаче, са в противоречие с констатациите на Wise и сътр. (2009), които съобщават за отслабване на паметта, след интрахипокампадно въвеждане на CB1 рецепторния антагонист SR 141716A (римонабант).

От всичко споменато по-горе, става ясно, че литературните данни относно паметовите ефекти на канабиноидите са противоречиви. Някои проучвания за ефекта от продължителната употребата на канабис върху когнитивните функции на човека, отчитат паметови дефицити, въпреки че други не предоставят убедителни данни (Riedel and Davies, 2005; Montgomery et al., 2012). Трудността да се постигнат надеждни резултати при хората се дължи на недостатъчния брой участници, включени в изпитванията, липсата на прецизни методи, необходими за разкриване на различията между дългосрочните пушачи на марихуана и контролите, като и фактът, че голяма част от изследваните пациенти използват и други лекарства.

В последните години, редица проучвания показват, че ендоканабиноидната система участва в патогенезата на депресивните разстройства (Rodriguez et al., 2005).

Представените резултати за експлораторното поведение на OBX плъхове показаха, че прилагането на HU 210 (i.c.v.) на фона на развита депресия потиска експлораторната активност и показва тенденция към подобряване на нарушената след OBX хабитуация на животните, докато SR 141716A не я повлиява съществено и нама ефект върху нарушената хабитуация. Eisenstein и сътр. (2010) свързват повишената експлораторна двигателна активност и нарушената хабитуация на OBX плъховете с понижените нива на анандамид и 2-AG във вентралния стриатум, при запазена гъстота на CB1 рецепторите. Според тях, ниските нива на ендоканабиноидите може би са последица от дисфункция на ендоканабиноидната система вследствие на булбектомията (Eisenstein et al., 2010). Установената от нас намалена експлораторна активност (намалени вертикалните и хоризонтални движения) и тенденция за нормализиране на хабитуацията при въвеждане на агониста на CB1 рецепторите HU 210 е в подкрепа на горепосоченото изследване.

В нашето проучване, ние показахме, че CB1 рецепторният агонист HU 210, инжектиран i.c.v., само отчасти премахва обучителните и паметови дефицити на OBX плъховете, т.е. HU 210 не е в състояние да достигне степенята на обученост на sham-оперирани плъхове. CB1 рецепторният антагонист SR 141716A не повлиява обучението и запаметяването на плъховете с депресивно-подобно състояние. Нашите резултати са първите които показват, че стимулирането на мозъчните CB1 рецептори на плъховете с модел на депресия, подобряват когнитивните им функции. Moriguchi и сътр. (2006) съобщават, че при OBX мишки LTP е нарушена. Представени са данни, че хроничното третиране с канабиноидния с CB1/CB2 рецепторен агонист WIN55,212-2 подобрява пространствената памет и облекчава LTP (Marsicano and Lafenêtre, 2009). Нещо повече, данните подсказват, че съществува връзка между нарушената функция на ендоканабиноидната система и паметовите дефицитите, наблюдавани при модел на хроничен стрес (Abush and Akirav, 2013). Имайки предвид горепосочените данни, можем да предположим, макар и спекулативно, че стимулирането на CB1 рецепторите (HU 210), най вероятно са въввлечени в модулирането на възбуждащо и инхибиторно синаптично предаване, а от тук и в хипокампалната LTP. Нашите предположения се подкрепят и от данните, че ендоканабиноидите модулират дейността на невронните мрежи, участващи в регулирането и дерегулирането на настроението и безпокойството (Witkin et al., 2005; Tzavara and Witkin, 2008; Marsicano and Lafenêtre, 2009). Наблюдаваният от нас ефект на антагониста на CB1 рецепторите SR 141716A е възможно да се дължи на превалиране на процеса на “деполяризационно-зависимото потискане на задържането” от ендоканабиноидната система в GABA-интерневроните в мозъчната кора и стриатума, над този на “деполяризационно-зависимото потискане на стимулацията”, характерен за глутаматергичните интерневрони. Друг възможен механизъм за намаляване на експлораторната двигателната активност е анксиолитичното действие на SR 141716A, който се явява антагонист/обратен агонист на CB1 рецепторите (Patel et al., 2006; Lafenêtre et al., 2009; Bluett et al., 2014).

Няколко са проучванията, които разглеждат ефектите на канабиноидите при хронични модели на тревожност, депресия и когнитивно увреждане (напр. непредсказуем стрес), които са придружени от намалени нива на невротрофини (BDNF и други важни за оцеляването на невроните), увредена хипокампадна неврогенеза, дегенерация на дендридите и невровъзпалителен отговор (микроглиоза и астроглиоза)

(Farooq et al., 2012, Campos et al., 2012; 2013; 2017). Установено е, че прилагането на канабиноиди противодейства на поведенческите и невропластичните последици от непредсказуемия стрес при възрастни мишки чрез сложно взаимодействие на различни механизми (Campos et al., 2013; 2017). Jiang и сътр. (2005) докладват, че хронично въвеждане HU 210 засилва неврогенезата при плъхове. Wolf и сътр. (2010), изследвайки ефекта на 6 седмичното прилагане на канабиноиди с диетата на мишки, съобщават за повишен брой положителни клетки за тимидин (аналог на бромодеооксиуридин) в хипокампа, отразявайки повишена невронална пролиферация на прогениторни клетки. Това улесняване на хипокампалната неврогенеза най-вероятно зависи от CB1 рецепторите, тъй като тя липсва при животни, които нямат този канабиноиден рецептор. Друг доклад показва, че повторното прилагане на канабиноиди предотвратява намаляването на неврогенезата в миши модел на болестта на Алцхаймер чрез PPAR γ -зависим механизъм (Esposito et al., 2011). За да обяснят тези данни Demiraksa и сътр. (2011), предполагат, че невропротективните ефекти на канабиноидите, се осъществяват чрез механизъм, който улеснява хипокампалната неврогенеза. Въпреки това, ролята на неврогенезата в ефектите на канабиноидите е сложна и може да зависи от нивото на стрес или депресия (Schiavon et al., 2014; 2016). В допълнение, канабиноидите могат да модулират вътреклетъчните сигнални пътища, които са пряко свързани със синаптично ремоделиране, като ERK1/2 и Akt (McAllister et al., 2011, Solinas et al., 2013; Elmes et al., 2015). Техните специфични ефекти в различни области на мозъка, обаче, все още са неясни. Например, повторното прилагане на канабиноиди подобрява контекстуално обусловените реакции на страх и намалява нивата на фосфорилираните форми на ERK1/2 в префронтален кортекс (ElBatsh et al., 2012).

Така, че за сега многобройни сигнални пътища са предложени като кандидати за медиране на невропластичните ефекти на канабиноидите (Izzo et al., 2009; Fernández-Ruiz et al., 2013). Наскоро бяха предложени и други възможни таргети на действието на канабиноидите (Ibeas Bih et al., 2015; Ligresti et al., 2016), които също трябва да се имат предвид. Например, те могат директно или индиректно да регулират активността на гама рецептора на пероксизомния пролифератор (PPAR γ), серотониновите 5HT1A рецептори, аденозиновите транспортери, групата на ванилоидните рецептори (TRPV) и на възможен CB3 рецептор (GPR55 рецептор) (Iannotti et al., 2014; Ligresti et al., 2016; Campos et al., 2012; 2016; 2017).

За разкриване механизмите на канабиноидите при депресивно-подобни състояния са необходими повече проучвания. Освен това, все още са оскъдни данните и за участието на бързо пластичните промени, като синаптичното ремоделиране, което настъпва при остро прилагане на канабиноиди.

Дори ако броят на проучванията, изследващи тези ефекти на канабиноидите, все още са редки, е ясно, че нито един от механизмите не е в състояние да обясни необикновения им фармакологичен профил.

През последните години все по-голяма актуалност придобива въпросът за ролята на невромедиаторите и невропептидите в когнитивните дефицити. Същевременно е намерено, че невромедиаторите и невропептидите по различен начин участват в неврохимичните механизми на паметта, в зависимост от естеството на стимула, от локализацията на дадения невромедиатор или невропептид в една или друга мозъчна структура и особено от взаимодействието им с различните рецепторни подвидове.

Един от актуалните въпроси, отнасящ се за невропептидите, е изясняването на

тяхната функционална роля и механизмите, чрез които те участват в регулацията на невроналните мозъчни процеси. Актуалността на проблема се определя и от факта, че неuropeптите като регулатори на различни физиологични процеси, имат изключително важно значение както за физиологията и патофизиологията, така и за медицинската практика. Нови изследвания разкриват значимата роля на неuropeптите в патогенезата на депресиите, афективните и тревожните разстройства и възможността за евентуалното им приложение като терапевтични средства.

Основната част от проведените изследвания представлява опит за охарактеризиране ролята на хипокампалните неuropeптиди (VIP и Ang II) при дементни състояния, предизвикани от двустранна олфакторна булбектомия на плъхове (OBX модел на депресия). В литературата данните за участието на VIP и Ang II в депресивните състояния са оскъдни, а системни експериментални проучвания при животни липсват.

Тъй като, изследователското поведение на плъха и хабитуацията му към новата среда се разглеждат като интегрален индекс на нивото на висшата нервна дейност и се приема, че те директно се отнасят до обучението и паметта (Silverman, 1978; Platel and Porsolt, 1982), ние проучихме ефектите на VIP и Ang II, въведени в СА1 полето на хипокампа, на фона на развита депресия (OBX) върху експлораторното поведение.

При нашите изследвания бяха отчетени характерните за модела OBX промени в експлораторната активност на животните. Установихме, че двустранното премахване на bulbi olfactorii статистически достоверно активира изследователското поведение на OBX-плъховете в сравнение с sham-оперирани контроли. Броят на хоризонталните и вертикални движения не намалява постепенно, а се активира след 2-рата мин., т.е. хабитуацията е нарушена. Утвърдено е схващането, че нарушената хабитуация на OBX-плъховете се дължи на повишена реактивност на животните към новата среда и невъзможност за приспособяване към евентуални въздействия на средата (Mar at al., 2000). Счита се, че OBX синдромът е резултат от дисфункция в мозъчния ствол и лимбичните области, включваща различни неврохимични и неврофармакологични промени (Kelly et al., 1997).

Получените резултати показват, че уни- и билатералното въвеждане на VIP в хипокампалното СА1 поле води до промени в изследователското поведение на OBX-животните. VIP, микроинжектиран двустранно в СА1 полето, допълнително стимулира повишената експлораторна активност.

При проведените експерименти се наблюдава изразен *латерализиран* ефект на VIP върху експлораторното поведение на плъхове с експериментален модел на депресия, като различията са в зависимост от дозата и страната на въвеждане. Статистически значими различия при сравняване на инжектираните в лявото и дясното СА1 полета се установяват и при двете дози VIP (10 и 100 ng). Трябва да се отбележи, че VIP (100 ng), въведен в дясното СА1 поле потиска изследователското поведение в 5-минутния период и нормализира нарушената вследствие на OBX хабитуация.

Може да се предположи, че дегенерацията на лимбичната система в резултат на булбектомията и последвалата я компенсаторна невронална реорганизация може да допринесе за латерализираните ефекти на VIP върху изследователската активност на OBX плъховете.

В предишни проучвания, установихме, че VIP, микроинжектиран в СА1 полето на хипокампа, проявява латерализиран, доза-зависим ефект, върху изследователското

поведение - инхибиторен, когато VIP е инжектиран в лявото CA1 и стимулиращ ефект в дясното хипокампадно CA1 поле (Ivanova et al., 2008).

Сравнявайки ефектите на VIP, въведен в CA1 полето на плъхове с ефектите на VIP при плъхове с модел на депресия върху изследователското поведение и хабитуацията, прави впечатление *смяната на латерализацията* след олфакторната булбектомия. Повишената експлораторна активност, отчетена при инжектиране на VIP (100 ng) в *дясното* CA1 поле на плъхове, при OBX-плъховете се проявява при инжектиране в *лявото* CA1 поле, и обратно - потискащият ефект е по-изразен след въвеждане в *дясното* CA1 поле. Резултатите ни открояват противоположната роля на лявото и дясно хипокампадно CA1 полето в изявата на ефектите на VIP върху експлораторната активност при OBX модел на депресия.

На този етап не бихме могли да дадем обяснение на дисоциацията в ефекта на VIP в зависимост от страната на локалното му прилагане в хипокампа и предположенията ни са само спекулативни.

Микродиализни изследвания, намиращи връзка между повишеното освобождаване на допамин в стриатума и високата двигателна активност (Hooks et al., 1992), дават основание на Masini и сътр. (2004) да допуснат, че наличието на повишени допамининови нива в стриатума на OBX-плъхове е причина за тяхната свръхактивност. Възможно е, повишената експлораторна двигателна активност при въвеждане на VIP в лявото CA1 поле при OBX да е резултат от способността на VIP да стимулира допаминовия метаболизъм (Itoh et al., 1988).

Ако вземем предвид фактите, че VIP е колокализиран в хипокампачните интерневрони заедно с CCK (Somogyi and Klausberger, 2005) и че CCK и VIP проявяват антагонистично действие върху двигателната активност при интактни и декортикирани животни (Katsuura and Itoh, 1985), възможно е дисбаланс в тяхната експресия да повлияе на хиперактивността при OBX.

Има сведения, че серотонинергичната и холинергичната системи в хипокампа повлияват експлораторното поведение и двигателната активност и (Buhot and Naili, 1995; Thiel et al., 1998). Модулиращият ефект на VIP върху тези невротрансмитерни системи (Rostene, 1983; Masuo et al., 1993) е друго вероятно обяснение на наблюдаваните от нас поведенчески промени. Данните на Belcheva и сътр. (1994; 1997), че инхибирането на 5-HT_{1A} рецепторите в дясното хипокампадно CA1 поле потиска двигателната активност, а активирането им в лявото CA1 поле я стимулира, също насочват към възможно взаимодействие на VIP със серотонинергичната система.

Данните в литературата показват, че хипокампът е пряко свързан с преработване на разнообразни сетивни сигнали, постъпващи от околната среда (Schmajuk, 1984). За осъществяването на нормално експлораторно поведение е необходимо функционирането на добре балансирани невронални мрежи в хипокампа (van Abeelen, 1979). Морфологичните и функционални особености на хипокампа се характеризират с асиметрия, тъй като пасивната или активна изява на поведенческите реакции корелира с промени в асиметрията на междухемисферните невронални взаимодействия. Има съобщения за корелация на експлораторното поведение на зайци с десностранна доминантност, а неподвижната реакция при заплашващ стимул - с левостранно доминиране (Pavlova and Venetsian, 2007).

При олфакторната булбектомия наред с невродегенеративните промени се наблюдава дисбаланс на невротрансмитерни системи в хипокампа (Kelly et al., 1997; Pope and Wilson, 2007), но проучвания за нивата на VIP и плътността на VIP рецепторите при

ОВХ липсват. Ние допускаме, че установеният от нас латерализиран ефект на VIP върху експлаторната локомоторна активност на ОВХ-плъхове би могъл да се дължи на неравномерното разпределение на VIP интерневроните и/или рецепторите в двете хемисфери, промяна в афинитета на рецепторите, както и на асиметрични промени в невротрансмитерните системи, с които VIP взаимодейства.

В подкрепа на нашите резултати за промяна в поведенческата асиметрия след ОВХ засега има едно единствено изследване на Bobkova и сътр. (2008), при което се регистрира асиметрия на тета-ритъма на ЕЕГ-активността в дясна фронтална и лява окципитална корова области и отслабена или липсваща асиметрия на бета-активността в дясна фронтална корова област.

Все още се знае много малко за участието на подвидовете VIP рецептори в поведенческите реакции, а данни за рецепторите, медиращи тези ефекти на пептида въобще липсват. Поради това, явната дисоциация в ефекта на VIP в зависимост от страната на локалното му прилагане може да бъде предмет само на спекулативни обяснения.

Ролята на хипокампа в когнитивните процеси е добре известна. В целия хипокамп е установена плътност на VIP-свързващи места, която е особено висока в молекулярния слой на *girus dentatus* и *cornu Amonii* (Usdin et al., 1994). VIP-рецепторната плътност в тези региони, заедно с широкото взаимодействие на VIP-невроните с GABA-ергичните системи, показват голямата роля на VIP в регулацията на електрическата активност на хипокампа и ефектите му върху когнитивните процеси (Papp et al., 1999).

Изследванията, обаче се ограничават предимно до тестовете за обучение с пасивно избягване и за пространствена памет. Наред с това има съобщения, че по време на обучение по метода *shuttle box* се наблюдават промени в хипокампалната активност (Ramirez and Carrer, 1989; Nikolaev et al., 1992; Saha and Datta, 2005). Предишни наши проучвания (*shuttle box*) показват, че VIP (50 ng), въведен *самостоятелно* в СА1 полето на хипокампа на плъхове, влошава обучението и паметта в зависимост от страната на въвеждане. VIP, микроинжектиран *двустранно и в лявото* СА1 поле нарушава обучителните и паметовите процеси, за разлика от въвеждането му в *дясното* СА1 поле, където ефектът му не се различава от съответните контроли (Ivanova et al., 2009).

След олфакторна булбектомия са установени дегенеративни промени в хипокамп, амигдала, префронтална кора и други мозъчни области (Carlsen et al., 1982). Тези структури не само участват в развитието на депресия, но и допринасят за паметовия дефицит (Giordano, 2005). Според редица изследвания, нарушенията в обучението и паметта на ОВХ-плъховете не се обуславят от липсата на обонятелни сигнали, а са пряко следствие от нарушената функция на хипокампа и амигдала (Nesterova et al., 2008). Олфакторната булбектомия предизвиква и съществени промени в мозъчните невротрансмитерни системи. Основно нивата на катехоламините и серотонина (Jancsar and Leonard, 1984; Van der Stelt et al., 2005) са намалени след булбектомията, придружавани от дисбаланс на холинергичната (Yoshimura et al., 1974; Bobkova et al., 2001), глутамат и аспартат (Collins, 1984; Scholfield et al., 1983), глицин (Harvey et al., 1975) и GABA невротрансмитерни системи (Jancsar and Leonard 1984).

Промените в обучението и паметта на ОВХ-плъхове са изследвани чрез различни методи. В литературата има данни, че е нарушена пространствената памет (Redmond et al., 1994; van Rijzingen et al., 1995), влошени са обучителните и паметовите процеси, проучени по методите за пасивно избягване “*step down*” (Joly and Sanger,

1986) и “step through” (Hozumi et al., 2003). Данните обаче, при методите за обучение за активно избягване са противоречиви.

Ние установихме, че двустранното премахване на *bulbi olfaktorii* влошава обучителните и паметовите процеси, проследени чрез два метода за обучение и памет – за активно избягване (*shuttle box*) и за пасивно избягване (*step through*). Данните за промените в обучението на OBX-плъхове, изследвани по метода *shuttle box*, са противоречиви (Sieck, 1972; King and Cairncross, 1974). Нашите резултати подкрепят наблюденията на King and Cairncross (1974) за влошени обучителни и паметови процеси и противоречат на съобщенията за подобряване на обучението (Sieck, 1972). Допускаме, че различията най-вероятно се дължат на особеностите в използваните методи.

Според редица изследвания, нарушенията в обучението и паметта на OBX - плъховете са пряко следствие от нарушената хипокампална функция (Nesterova et al., 2008). OBX предизвиква промени в глутаматергичната и холинергичната системи, които оказват модулиращо влияние върху паметовите процеси в хипокампа (Jafari-Sabet, 2006), намалява плътността на NMDA рецепторите в церебрална кора и амигдала (Ho et al., 2001), в голям брой мозъчни области функцията им е нарушена (Tadano et al., 2004). Нарушенията на холинергичната система в мозъчни структури, сред които е и хипокампа, имат доказана роля в увредената паметова функция при този модел на депресия (Hozumi et al., 2003; Hallam et al., 2004).

При OBX наред с невродегенеративните промени се наблюдава дисбаланс на невротрансмитерни системи в хипокампа (Kelly et al., 1997; Pope and Wilson, 2007), но проучвания за експресията на VIP и плътността на VIP рецепторите в мозъчни структури след OBX липсват.

Установихме, че на фона на депресивно-подобното състояние VIP, микроинжектиран *билатерално* и само в *дясното* хипокампално CA1 поле, повишава броя на авойдансите през двата обучителни дни и при теста за памет (*shuttle box*), а въвеждането на VIP в *лявото* CA1 поле не ги променя в сравнение с OBX-контролите. Микроинжектирането на VIP *двустранно* и в *дясното* CA1 поле (*step through*), удължава латентното време при теста за ретенция на 24-ия час след обучението, а въвеждането му в *дясното* CA1 поле удължава латентното време и при теста за ретенция на 3-ия час в сравнение с контролните OBX-животни. Въвеждането на VIP в *лявото* CA1 поле не повлиява изследваните процеси в сравнение с OBX-контролите.

Сравняването на ефектите от *унилатералните* въвеждания на VIP показва, че VIP, инжектиран в *дясното* CA1 поле на фона на развита депресия, повишава достоверно броя на авойдансите през двата обучителни дни и при теста за ретенция (*shuttle box*) в сравнение с *левостранните* инжектирания, докато при *step through* такава разлика не се установява.

Важно е да отбележим, че VIP подобрява обучението и краткотрайната памет на OBX - плъховете при въвеждане в *дясното* CA1 поле и при двата метода за обучение. Това ни дава основание да направим извода, че предимно *дясното* CA1 поле участва в изиявата на антиамнестичните ефекти на VIP при модела OBX.

Нарушената памет при метода за пасивно избягване е характерен компонент на поведенческия синдром, съпътстващ булбектомията, а прилагането на антидепресанти възстановява паметта (Kelly et al. 1997). Микроинжектирането на VIP в *дясното* CA1 поле не нормализира показателите на OBX-животните, но показва статистически значим положителен ефект върху паметовите процеси. Доколкото отстраняването на паметовия дефицит при метода за пасивно избягване се счита като проява на

антидепресивна активност, бихме могли да интерпретираме получените резултати само като тенденция за проява на антидепресивно действие на VIP в *дясното* CA1 поле.

Подобряващият паметта ефект на VIP при OBX-плъхове не беше неочакван за нас. В литературата могат да се намерят и други данни за противоположни ефекти на VIP, в зависимост от това дали е въведен на интактни животни, или на такива с увредена памет. Itoh и сътр. (1994) съобщават, че VIP, прилаган i.c.v. преди обучителната процедура влошава пространствената памет, докато според Yamaguchi и Kobayashi (1994) VIP подобрява пространствения паметов дефицит, предизвикан от скополамин, независимо от пътя на въвеждане. Предположенията ни по какви механизми се осъществява положителният ефект на VIP върху обучението на OBX-плъховете на този етап са само спекулативни.

След олфакторната булбектомия е намалено усвояването на глюкозата в мозъка (Skelin et al., 2008), като сред засегнатите области е и вентралният хипокамп. Известно е, че невроните в хипокампа имат много високи енергийни нужди (LaManna and Harik, 1985). Възможно е положителните ефекти на VIP върху паметовите процеси да са опосредствани от регулиращото му влияние върху астроцитния глюкозен метаболизъм (Magistretti et al., 1993) и способността да стимулира глюкозната утилизация и невроналната активност при локално въвеждане в мозъчни структури (McCulloch and Kelly, 1983).

В хипокампа NMDA рецепторите участват в механизмите на дълготрайната потенция (LTP) и сензомоторната активност. Индуцирането на трайни промени в синаптичната трансмисия в хипокампа, като LTP, стоящи в основата на паметовите процеси, се опосредства от активиране на NMDA рецепторите. Според Roesler и сътр. (1998), NMDA рецепторите са пряко въввлечени в механизма на ретенцията на паметовите следи при метода shuttle box. По-нови проучвания потвърждават, че увредената функция на NMDA рецепторите е причина за нарушенията в обучението с пасивно избягване и нарушената LTP в хипокампалната CA1 област при OBX-мишки (Tadano et al., 2004; Moriguchi et al., 2006). Стимулиращият ефект на VIP върху хипокампалните NMDA рецептори (Yang et al., 2009), както и способността на VIP да усилва спонтанното освобождаване на ацетилхолин от пресинаптичните окончания в хипокампа (Masuo et al., 1993) биха могли да допринесат за положителния ефект на пептида върху обучението и паметта при OBX-плъхове.

В улесняването на дълготрайната потенция (LTP) в CA1 полето на хипокампа участват както възходящи моноаминергични влакна, активирани при реакциите на бодърстване и внимание, така и локално освободени от нервните окончания неuropeптиди (Haug and Storm, 2000). Възможно е индуцираната от булбектомията дегенерация на серотонинергичните аферентни влакна от nucleus raphe dorsalis към хипокампа (Nesterova et al., 1997), които инервират и VIP интерневроните, да доведе до отпадане на модулиращото влияние върху индукцията на LTP в CA1 полето, нарушавайки по този начин паметовите процеси.

Така, ние предполагаме, че ефектът на VIP върху хипокампалната синаптична трансмисия може да „споделя“ някои от механизмите на LTP и по този начин да допринесе за увреждането на обучението и паметта (Ivanova et al., 2009).

Cottrell и сътр. (1984) изказват предположението за възможно взаимодействие между серотонинергичната система и VIP в хипокампа, оказващо регулиращо влияние върху проявата на “страх - мотивираното поведение”. Ние сме съобщили за преобладаващото участие на дясното CA1 поле в изявата на ефектите на 5-HT1A рецепторни агонисти и

антагонисти върху обучението и паметта при метода “shuttle box” (Belcheva et al., 2007). Ако вземем пред вид споменатите факти и доказаното *in vitro* модулиращо влияние на VIP върху 5-HT_{1A} рецепторите в хипокампа (Rostene et al., 1983), допускаме, че е възможно подобряващото паметта действие на VIP при OBX-плъховете да е свързано с взаимодействието му с 5-HT_{1A} рецепторите.

Латерализация в обучителните и паметовите процеси сме установили при въвеждане в CA1 полето на хипокампа на 5-HT_{1A} рецепторен агонист и антагонист (Belcheva et al., 2007). Микроинжектирането на 5-HT_{1A} рецепторния агонист 8-OH-DPAT в ляво или дясно CA1 полето причинява влошаване на обучението и паметта (shuttle box), докато 5-HT_{1A} рецепторният антагонист NAN190 подобрява тези процеси. И при двете вещества ефектът е по-изразен в дясното CA1 поле в сравнение с лявото. При аналогично въвеждане на холецистокинин (ССК-8) и ангиотензин II, Belcheva и сътр. (1994; 2000, 2004, 2004a) установяват подобряващи паметта и обучението ефекти, които са по-силно изразени в дясното CA1 поле при въвеждане на ССК-8, и в лявото CA1 поле при въвеждане на ангиотензин II.

Има доказателства за функционална асиметрия при LTP, показващи, че излагането на плъховете в ранния период от живота им в нова среда води до селективно повишаване на LTP в дясното CA1 поле в късния период, докато в левия хипокамп разлики няма (Tang, 2003).

В мозък на плъх беше докладвана ляво-доминираща асиметрия, която се дължи вероятно на разлики в броя на невроните в двете хемисфери (Lister et al., 2006).

Така, комбинирайки нашите и тези на другите автори изследвания, ние подкрепяме схващането, че хипокампът може да бъде асиметричен по структура и функция.

Молекулярната основа на ляво-дясната (L-R) асиметрия в мозъчните структури и тяхната функция интензивно се изследва. Изследванията върху значението на хипокампалната L-R асиметрия върху мозъчни функции от по-висок клас, използвайки мишки с "разделен мозък", показват, че десния хипокамп подобрява точността на пространствената памет, докато изпълнението на други задачи, зависими от хипокампа (страхови състояния), не се влияят от латерализацията на хипокампа (Shinohara et al., 2012). Kronmüller и сътр. (2009) съобщават за асиметрия в обема на левия и десния хипокамп след първия епизод на тежка депресия при мъже.

Липсват данни за разпределението на VIP в двете хемисфери, не е изследвана и асиметрия в невродегенеративните промени в мозъчните структури след булбектомия. Има данни за асиметрични ефекти на невропептиди както при интактни животни, така и при животни с мозъчни лезии (Bakalkin, 1989; Kruglikov et al., 1992).

Няма проучвания за експресията на VIP в мозъчни структури при OBX, но промяната на VIP нивата и/или рецепторите е твърде възможна, имайки пред вид данните за дегенерация на нервните влакна от септума и nucleus raphe dorsalis (Han et al., 2008, Nesterova et al., 1997), които инервират VIP интерневроните в хипокампа. Установено е, че VIP чрез G-протеин свързан рецептор стимулира аденилатциклазната активност и повишава нивата на cAMP в хипокампа (Etgen and Browning, 1983). След OBX, аденилатциклазната активност в хипокампа не е намалена, за разлика от други лимбични структури (Wann et al., 2009), но съотношението Gai/Gas е двукратно увеличено, което би могло да се отрази на отслабената сигнална трансдукция и намалена чувствителност към VIP. Ние предполагахме, че увреждащият обучението и паметта ефект на VIP в плъхове би могъл да се дължи на свръх стимулация на нервни

мрежи, които нормално участват в механизмите на споменатите процеси, докато въвеждането на VIP при OBX-плъхове би могло да компенсира евентуалната затруднена сигнална трансдукция на VIP и да подобри нарушената памет на OBX-животните. В подкрепа на това предположение са данните на Karganov и сътр. (1991) за нарушено обучение с активно двупосочно избягване след фронталната лобектомия на плъхове и неговото нормализиране при хронично въвеждане на VIP в латералния вентрикул.

Въз основа на тези данни ние предполагаме, че латерализираният ефект на VIP върху обучението и паметта при OBX плъхове може да се дължи на хемисферна асиметрия в броя на VIP интерневроните и /или в броя на хипокампалните VIP рецептори или на асиметрични проекции от хипокампа до други мозъчни структури, участващи в паметовите процеси или в невротрансмитерните системи, с които VIP взаимодейства.

Има доказателства, че активирането на VPAC1, VPAC2 и PAC1 рецепторите е необходимо за проявите на свързаното с VIP поведение. В хипокампа VIP повишава синаптичното предаване към CA1 пирамидалните клетки, чрез въвличането на VPAC1 и VPAC2 рецепторите (Cunha-Reis et al., 2005).

Липсата на ефект от прилагането на VIP₆₋₂₈ (антагонист на VPAC рецепторите) върху обучителните и паметовите процеси на OBX-плъховете и при двата използвани метода, насочва нашите предположения към възможно участие на PAC1 рецептора в опосредстване ефектите на VIP, още повече, че хипокампът е структура с висока концентрация и на трите вида рецептори.

Що се отнася до VIP рецепторните антагонисти, които са пептидни производни, включващи големи участъци от оригиналната VIP молекула, то възможно е VIP₆₋₂₈ да е предизвикал някои вътреклетъчни промени, които биха могли да доведат до повишаване на невронната възбудимост.

Известно е, че VIP и PACAP активират редица G-протеин свързани рецептори, които стимулират редица вторични „messenger“ надолу по веригата, които на свой ред регулират невронната възбудимост.

Има съобщения, които показват, че PAC1 рецепторът претърпява бърза десензация чрез активиране на пътя на протеин киназа C (PKC) (Shintani et al., 2000; Niewiadomski et al. 2002), обаче данни за сензацията на PAC рецепторите липсват. Някои процеси като интернализация на рецептора или свързване с вторите „messenger“ могат също да бъдат модулирани чрез взаимодействие с рецептори, модифициращи протеините (Sexton et al., 2006).

Разнообразието от VPAC/PAC рецепторни варианти и пластичността на сигналните пътища, които те могат да активират, в зависимост от типа клетка, в която са експресирани (Dickson and Finlayson, 2009), би могло да обясни нашите очевидно противоречиви резултати.

Ролята на VPAC рецепторите, в сравнение с тази на PAC1 е слабо проучена. Установено е, че VIP оказва модулиращо въздействие върху NMDA рецепторите в хипокампа чрез VPAC рецепторите, а във високи концентрации и посредством PAC1 рецептора (Yang et al., 2009). Структурно сходният на VIP неuropeпид PACAP активира както VPAC рецепторите, така и специфичния за него PAC1 рецептор. При въвеждане в латералния вентрикул, PACAP подобрява обучението и паметта, изследвани с методите за обучение за пасивно и активно избягване (Telegdy and Kokavszky, 2000; Adamik and Telegdy, 2005). След съобщенията за участие на PACAP и

PAC1 рецептора в механизмите на LTP на мъховидните влакна в хипокампа (Roberto et al., 2001; Otto et al., 2001), експериментите с генно-модифицирани мишки с дефектен PACAP ген или липсващ PAC1 ген (Matsuyama et al., 2003) открояват по-значимата роля PACAP, а не на PAC1 рецептора в индукцията на LTP в gyrus dentatus. Sauvage и сътр. (2000) също потвърждават, че липсата на PAC1 рецептора при генно-модифицирани мишки се отразява много слабо върху паметовите процеси, изследвани чрез различни тестове за памет.

Известно е, че в паметовите процеси (Kandel and Abel, 1995), дълготрайната потенция (LTP) на хипокампаалните CA1 неврони е въввлечен и cAMP/РКА пътя (Soderling and Derkach, 2000). PACAP и VIP регулират невронната възбудимост и синаптичната ефективност в CA1 полето, предизвиквайки, чрез пътя cAMP/РКА противоположни постсинаптични ефекти (Ciranna and Cavallaro, 2003). PACAP-медираното синаптично предаване, участва в регулирането на LTP в невроните на CA1 полето (Roberto et al., 2001) и в хипокамп зависимата асоциативна памет (Otto et al., 2001).

Ние предполагаме, че в ефектите на VIP върху хипокампаалната синаптична трансмисия може би участват някои от механизмите на LTP и по този начин да допринесат за влошаването на обучителните и паметовите процеси.

Важно е да отбележим, че VIP е въвеждан в CA1 полето в концентрации, по-високи от Kd стойността за пептида, което създава възможност за бионаличността му и в области извън CA1 полето. По тази причина би било некоректно да се интерпретират ефектите на VIP като ограничени само в CA1 полето, тъй като е вероятно и да взаимодействат и с рецепторите в близките полета.

Атипичните поведенчески ефекти на VIP, въведен в хипокампаалното CA1 поле повдига още четири спекулативни допускания: 1) VIP₆₋₂₈ не може да се свързва специфично с VIP в централната нервна система. В наличната литература няма данни за ефекта на този VPAC антагонист в мозъчни структури. 2) Подобно на аномалиите в много невротрансмитерни системи, установени при OBX модела на депресия, дисбалансът в хипокампаалната VIP-ергична система и особено намалената експресия на VPAC рецепторите може да доведе до наблюдаваните ефекти. 3) VIP действа чрез друг, все още неидентифициран специфичен VIP рецептор, който не се разпознава от PACAP. 4) Специфичен за VIP рецептор - PAC1^{-/-}, който е охарактеризиран в червата на плъхове и мишки (Ekblad et al., 2000) и е различен от VPAC1, VPAC2 и PAC1.

Въпреки че на базата на получените резултати и наличните литературни данни не бихме могли да определим кой тип рецептори опосредства обучителните и паметови ефекти на VIP при OBX модела, много вероятно е тези ефекти да се дължат на активиране на PAC1 рецептора, но единствено прилагането на високо-специфични антагонисти на VPAC1, VPAC2 и PAC1 рецепторите би позволило прецизирането на конкретния механизъм, чрез който пептидът повлиява паметовите дефицити

Нашите изследвания за първи път предоставят информация за латерализирани когнитивни ефекти на VIP рецепторни лиганди, микроинжектирани в хипокампаалното CA1 поле и въввлечането на хипокампаални VIP рецептори (вероятно PAC1) в обучителните и паметови дефицити на плъхове с депресивно-подобно състояние. Данните ни сочат и за доминиращото участие на дясното хипокампаално CA1 поле в положителните ефекти на VIP върху обучителните и паметовите увреждания на OBX плъхове.

По настоящем, общо прието е, че мозъчната ренин-ангиотензинова система (РАС) със своите биоактивни пептиди, които включват главно Ang II, участва не само в сърдечно-съдовите функции и хомеостазата на телесната течност (Haulica et al., 2005), но и в контрола на някои висши функции, включващи регулирането на когнитивните функции (процесите на обучение и памет) (Ciobica et al., 2009; 2011), емоционалните отговори (Ciobica et al., 2011), както и ноцицепцията (Marques-Lopes et al., 2010). Ang II в ЦНС действа като невротрансмитер/невромодулатор, като осъществява физиологичните си ефекти посредством активиране на рецепторите.

Многообразните ефекти на ангиотензина се медиират от четири специфични мембранно-свързани рецептори. Ang II рецепторите (AT1, AT2 и AT4) са въввлечени в медирането на ефектите на Ang II в мозъка. Известно е, че концентрацията на Ang II и експресията на различните му рецепторни подвидове е особено висока в хипокампа (Sirett et al., 2006; von Bohlen und Halbach and Albrecht, 2006), структура, участваща в паметовите процеси (Izquierdo et al., 1997; Holscher et al., 2003; Moita et al., 2003). В СА1 полето на хипокампа Ang II директно възбужда пирамидалните неврони (Haas et al., 1980). По сложен и много-функционален модел, Ang II осъществява и регулира поведението на експерименталните животни. Предполага се, че Ang II участва в предаването на информация от хипокампа и други мозъчни области към лимбичната и префронтална кора, области свързани с регулацията на т.нар. комплексно поведение.

Тъй като, Ang II модулира кръвното налягане и стрес отговорите чрез свързване с AT1 и AT2 рецепторите, то тяхните блокери са широко използвани като антихипертензивни лекарства. Лосартанът е AT1 рецепторен антагонист медикамент, широко използван за лечение на хипертония.

Нашите резултати показаха, че инхибирането на ангиотензиновите AT1 рецептори от лосартан (селективен AT1 рецепторен антагонист) в СА1 полето на хипокампа предизвиква съществени промени в изследователското поведение. Лосартан, микроинжектиран *двустранно* и само в *лявото* СА1 поле, потиска експлораторното поведение, докато въведен в *дясно* не го повлиява. Някои автори (Braszko and Wisniewski, 1988; Braszko et al., 1987) допускат, че влиянието на Ang II върху изследователското поведение се осъществява по неспецифичен механизъм, докато други (Belcheva et al., 1997; 1998; Georgiev et al., 1989; 1991) предполагат, че това се осъществява чрез различни AT рецептори и въввлечането и на други невротрансмитерни системи. Въз основа на нашите резултати и данните на други автори, предполагаем, че AT1 рецепторите, които са широко разпространени в хипокампа, участват в изследователското поведение. Настоящите данни подкрепят важната роля на хипокампалните AT1 рецептори в медирането на ефектите му в изследователското поведение и разширяват познанията ни за асиметричните поведенчески ефекти на Ang II, микроинжектиран в различни мозъчни структури.

Многобройни данни от последните години показват, че участието на Ang II в процесите на обучение и памет е свързано с активирането на AT1 и/или AT4 рецепторните подвидове. Хипопокампът е богат не само на AT1 рецептори (von Bohlen, 1998), но особено на AT4, което е важна част от обяснението за подобрени когнитивни процеси от Ang II (Wright and Harding, 1995, 2004).

Има данни, че Ang II, приложен в хипокампа, потиска ретенцията (step through) чрез активиране на AT1 рецепторите (Lee et al., 1995).

Други проучвания са показали, че Ang II, въведен в хипокампалното СА1 поле блокирано паметовите следи чрез механизъм, включващ активиране на AT2

рецепторите (Kerr et al., 2005). Напоследък се съобщава, че орално приложен, лосартан потиска клетъчната пролиферация в птичи хипокамп (Mukuda and Sugiyama, 2007).

Проучихме ролята на хипокампалните AT1 рецепторите в обучителните и паметови процеси, като Ang II беше инфузиран билатерално и унилатерално на фона на инхибирани (лосартан) хипокампални AT1 рецептори.

Нашите резултати за първи път дават информация за подобряващия ефект на Ang II върху обучението, когато е инжектиран в *лявото* CA1 хипокампално поле, но не и когато е инжектиран в *дясното*. Най-същественото тук е, че Ang II предизвиква различен и асиметричен ефект върху обучението. На какво се дължи този ефект и защо се наблюдава само при обучението е все още неизяснено.

Данните ни, показват, че микроинжектирането на Ang II на фона на инхибирани AT1 рецептори в *левия* или в *двете* хипокампални CA1 полета значително подобрява обучението и паметта и при двата използвани метода за активно (shuttle box) и пасивно (step-through) избягване. Ефектът е по-ясно изразен след въвеждането на комбинацията (лосартан + Ang II) в *лявото* CA1 поле, за разлика от въвеждането ѝ в *дясното* CA1 поле, което показва, че ефектът е в зависимост от страната на въвеждане.

Belcheva и съавтори (2000) установяват, че Ang II подобрява обучението и паметта, когато е микроинжектиран в *лявата* CA1 хипокампална област, като предполагат, че ангиотензиновите рецептори (AT1 и/или AT4) са различно разпределени в мозъчните хемисфери. Сравнявайки обаче, данните на Belcheva и съавт. (2000) за ефектите на самостоятелно въвеждане Ang II с нашите резултати, ние установяваме, че подобряващият обучението и паметта ефект на Ang II е по-ясно изразен на фона на AT1 рецепторно инхибиране. Това може да се тълкува като доказателство, че подобряващият когнитивните функции ефект на Ang II в CA1 полето на хипокампа не се дължи на взаимодействието на пептида с AT1 рецепторите в тази област. Lee и съавт. (1995) обаче докладват, че Ang II, приложен локално двустранно в gyrus dentatus, влошава обучението, като този ефект на Ang II се премахва при претретиране с AT1 рецепторния антагонист лосартан, въведен системно, като допускат, че AT1 рецепторите са отговорни за този ефект на ангиотензина.

По отношение на синаптичната пластичност, трябва да отбележим, че Ang II блокира LTP в хипокампа (Denny et al., 1991, Armstrong et al., 1996) и в амигдала (von Bohlen and Albrecht 1998). Също така е установено, че при активиране на AT1 рецепторите от Ang II, се инхибира синаптичната LTP (Wayner et al., 1993) и дълготрайната депресия LTD (Tchekalarova and Albrecht 2007). Демонстрирано е, че хипокампалните ангиотензинови рецептори са въввлечени във волеви упражнения, предизвикани от подобряване на обучението и паметта при плъхове (Akhavan et al., 2008). Има съобщения, че Ang II редуцира N-метил-D-аспартат (NMDA) рецепторното сигнализиране чрез AT2 рецепторно-медирирани механизми (Schelman et al. 1997, Jing et al. 2004, Schelman et al. 2004). Амнестичен ефект на пептида е установен и при въвеждането на Ang II в хипокампалното CA1 поле, като авторите предполагат, че блокирането на паметта се дължи на механизъм, включващ активиране на AT2 рецептори (Kerr et al., 2005).

Докладвани са и противоречиви данни относно ефектите на рецепторните антагонисти на Ang II, лосартан и PD-123177 (селективен за рецепторите AT1 и AT2, съответно). И за двата антагониста Shepherd и сътр. (1996), използвайки два различни модела за работна памет при плъхове, не са установили ефекти върху паметовите процеси. Други проучвания показат, че гореспоменатите Ang II рецепторни

антагонисти, приложени в ниските дози, подобряват увредената от скополамин памет (Chalas и Conway 1996).

Последни проучвания показват, че прилагането на блокера на AT1 рецепторите, телмисартан, влошава обучителните и паметови процеси (воден лабиринт) при хипертонични плъхове (Sharma and Singh 2012), докато в друго проучване телмисартан, подобрява дефицита на паметта при мишки с диабет тип 1 (Du et al., 2014). При shuttle box, AT1 блокерът олмесартан намалява когнитивните промени, наблюдавани при химерни трансгенни мишки за човешки ренин и човешки ангиотензиноген, като заедно с това повишава и мозъчния кръвоток (Inaba et al., 2009). Противоположен ефект е наблюдаван в проучване, при което инхибирането на AT1 рецепторите от лосартан подобряват обучението и паметта (Gard, 2002; 2008). Също така бе съобщено, че прилагането на агонист на AT2 рецептора подобрява когнитивния дефицит, установен при модел на специфичен тип 2 диабет при мишки (Mogi et al. 2012).

Нашите данни показват, че при претретирането с AT1 рецепторния антагонист лосартан, Ang II инжектиран *двустранно* или в *лявата* CA1 хипокампа област подобрява обучението и паметта на плъхове, тествани с два различни метода за авойданс реакции, в сравнение с контролите. Тъй като ефектът на Ang II, приложен самостоятелно е сравним с този на Ang II, приложен на фона на инхибираните AT1 рецептори, ние предполагахме, че и други рецептори могат да бъдат въввлечени в медирането на тези ефекти. Блокирането на AT1 рецепторите, позволява стимулиране на AT2 рецепторите и допълнително увеличава бионаличността на Ang II за ензимно преобразуване в Ang IV (Guimond and Gallo-Payet 2012). Няколко проучвания потвърждават, че стимулирането на AT2 рецепторите активира множество сигнални пътища, които се свързват с положителни ефекти върху невроналните функции (включително възбудимост, диференциация и регенерация (Guimond and Gallo-Payet 2012). Натрупват се и данни, че терапевтичните ефекти на блокерите на ангиотензиновите рецептори (ARBs), широко използвани при пациенти с хипертония, се дължат не само на инхибирането на AT1 рецепторите, но също така и на активиране на AT2 рецепторите (Gallo-Payet et al., 2011). Например, беше докладвано, че предпазващите от инсулт ефекти на ARBs, се дължат не само на селективното блокиране на централните AT1 рецептори, но и на стимулирането от Ang II, незаети AT2 рецептори (Chrysant 2007). Освен това, задълбочени изследвания за ролята на AT2 рецепторите в когнитивните функции, дават доказателства за техния положителен ефект върху когнитивните процеси (Jing et al., 2012, Mogi et al., 2012).

Изхождайки от нашите резултати, че подобряващият обучението и паметта ефект на Ang II, въведен на фона на инхибирани AT1 хипокампа рецептори е посилен след въвеждането му в *лявото* CA1 поле, може да заключим, че ангиотензинергичната система в левия хипокамп има водеща роля при тези процеси и че те са латерализирани. Причините за тази латерализация в обучителните и паметовите ефекти на ангиотензина могат да бъдат различни. Биха могли да се обсъждат следните възможности: по-голяма плътност на AT1 и/или AT4 в лявото CA1 поле на хипокампа в сравнение с дясното, повече проекции от/към левия хипокамп към/от други мозъчни структури, участващи в обучителния и паметовия процес. И не на последно място, трябва да се има предвид, че подобряващият когнитивните процеси ефект на Ang II може да бъде свързан и със стимулиране на мозъчна допаминергична, GABA-ергична, холинергична невротрансмисия (Wisniewski and Braszko, 1984, Yonkov et al. 1986; 1987; 1989; Georgiev et al., 1988, Yonkov and Georgiev, 1990).

Тъй като, на базата на горепосочените резултати предположихме, че ефектът на Ang II би могъл да се дължи и на активиране на AT4 рецепторите (Wright et al., 1993;1995; 1997; 2004; Braszko et al., 1988; Olson et al., 2004), а в хипокампа се намират голям брой и гъсто разположени AT4 рецептори (von Bohlen, 1998, Wright and Harding, 1995; 2004), то ние проучихме участието на AT4 рецепторите в процесите на обучение и памет, като микроинжектирахме ангиотензин IV (Ang IV - 0.1 nmol) едностранно и двустранно в CA1 полето на хипокампа.

Данните ни показаха, че микроинжектираният в хипокампа CA1 поле Ang IV подобрява процесите на обучение и памет, в зависимост от страната на въвеждането му. Така, Ang IV приложен в *лявото* и в *двете* хипокампа CA1 полета значително подобрява обучението и паметта (shuttle box и step through). Нашите резултати са първите, които показват положителният ефект на Ang IV, след като е въведен в лявото, но не и в дясното CA1 поле.

Имайки предвид, че Ang IV се свързва с висок афинитет и селективност към AT4 рецепторния подтип и нашите данни, че Ang IV подобрява когнитивните процеси при *левостранна* инфузия, ние допускаме различно разпределение на AT4 рецепторите в *лявото* и *дясното* CA1 поле, както и че активирането на AT4 рецепторите в *лявата* CA1 хипокампа област, може би участва в латерализирания ефект на Ang IV. Известно е, че хипокампът участва в различни обучителни и паметови задачи. Съществуват убедителни доказателства, че Ang IV се свързва с висок афинитет към IRAP и рецептора на хепатоцитния растежен фактор (с-Met) (Chai et al., 2008; De Bundel et al., 2008; Yamamoto et al., 2010). Взаимодействието с IRAP е в основата на про-когнитивните ефекти на Ang IV (Chai et al., 2008). Освен това, Ang IV може да има множество таргети *in vivo*, тъй като неговият аналог *norleu* конкурентно инхибира с-Met рецепторите, свързвайки се с тях *ex vivo* и *in vitro* и показва активност в човешки клетки, които са лишени от IRAP (De Bundel et al., 2008; Yamamoto et al., 2010). Трябва също така да се има предвид, че улесняването на активните и пасивни авойданс реакции, след прилагането на Ang IV може да се дължи и на стимулиране на мозъчната допаминергична, GABA-ергична и холинергична невротрансмисия. Разпределението на AT4 рецепторите, както и факта, че са свързани с холинергичните неврони, с моторните и сензорните ядра в мозъка, говори, че Ang IV може би модулира паметта, централната моторна и сензорна дейност (Braszko et al., 1988; Gard, 2008). В допълнение, стимулирането на AT4 рецепторите може да потенцира в хипокампа срезове деполяризацията, предизвикана от освобождаването на ацетилхолин (Wright and Harding, 1995; Wilson et al., 2009). Подобряването на паметта от Ang IV зависи не само от холинергичната система, но и от функционалната цялост на допаминовите рецептори (Wright and Harding, 1995; 2011).

Въпреки това, все още остава въпросът за рецепторния подвид, който може би е въввлечен в медирането на ефекта, подобряващ обучението и паметта. В CA1 полето на хипокампа, Ang II директно възбужда пирамидалните неврони (Gard, 2008). Нещо повече, хипокампа Ang II и неговите метаболити Ang IV и ангиотензин-(1-7) модулират *дългосрочната потенция* (LTP), един пластичен процес, зависим от активността, който се счита за клетъчен корелат на паметта (Wright and Harding, 1995; 2011; Wayner et al., 2001; Kramar et al., 2001; De Bundel et al., 2008; Gard, 2008). Все пак обаче механизмите, чрез които Ang IV подобрява когнитивните функции, са обект на изучаване. Въпреки, че тези констатации не обезсилват заключенията от настоящите ни

данни, те подсказват, че множество механизми могат да лежат в основата на латерализирания хипокампален ефект на Ang IV върху обучението и паметта.

В последно време особено значение се отдава на участието на мозъчната РАС в етиопатогенезата на някои неврологични и психични заболявания като болестта на Алцхаймер, болестта на Паркинсон, както и в различни депресивни състояния, състояния на тревожност, деменции от различен произход, инсулти. Първоначалната идея, че може да играе важна роля при депресия идва от клинични наблюдения на пациенти с хипертония, лекувани с каптоприл (АСЕ-блокатор) (Deicken, 1986; Germain and Chouinard 1988; 1989).

Изследвания показват, че повишената активност на ангиотензин-конвертиращия ензим води до повишено образуване на Ang II, който е свързан с депресията, повишена активност на хипоталамо-хипофизарна ос и тревожност (Gard and Rusted, 2004; Kelly et al, 1997; Mucignat-Caretta et al., 2006).

При един от моделите на депресия („forced swim“), е установено, че каптоприла също, предпазва животните. Натрупват се доказателства, че мозъчната РАС участва в медиацията на реакциите на стрес и депресия (Ruiz-Ortega et al., 2001; Gard and Rusted, 2004).

В последните години, олфакторната булбектомия (ОВХ) се използва и като модел на болестта на Алцхаймер. След ОВХ са наблюдавани и повишени нива на бета-амилоиден протеин в неокортекс и хипокамп (Aleksandrova et al., 2004), водещи до някои поведенчески и биохимични фенотипове на болестта на Алцхаймер, като повишаване на локомоторната активност и когнитивните дефекти (Vinkers et al., 2009; Hozumi et al., 2004). Предполага се, че дегенерацията на хипокампа е основа за когнитивните дефицити при болестта на Алцхаймер.

Имайки предвид високата плътност на АТ1 рецепторите в хипокампа и ролята на тази лимбична структура в когнитивните процеси, ние изследвахме ефектите на Ang II и лосартан след двустранната им инфузия в хипокампащото СА1 поле върху процесите на обучение и памет при плъхове с модел на депресия (ОВХ).

Нашите резултати показват, че *двустранното* инжектиране на Ang II няма ефект върху увредените когнитивните функции на плъховете с ОВХ, докато лосартана значително подобри влошените обучителни и паметови процеси в сравнение с ОВХ контролите, микроинжектирани с физ. разтвор. Въз основа на тези данни, можем да направим само някои предположения, които да обяснят, подобряващия ефект на лосартан при паметовите дефицити, предизвикани от ОВХ, при методите за активно (shuttle box) и пасивно (step through) избягване.

В литературата, липсват данни за експресията на ангиотензинови рецептори в мозъка на плъхове с ОВХ, но невродегенеративните промени могат да бъдат придружени от аномалии в РАС в различни мозъчни области, подобно на наблюдаваните промени на АТ рецепторните подвидове при пациенти с невродегенеративни разстройства, (Ge and Barnes, 1996; Savaskan et al., 2001). Можем да предположим, че споменатите по-горе невродегенеративни промени в хипокампа, в следствие на булбектомията и последвалата я компенсаторна невронална реорганизация могат да обяснят част от ефектите на Ang II и лосартан върху обучението и паметта на ОВХ плъховете.

Подобряващият паметовите процеси ефект на лосартан при плъхове с ОВХ, може също да показва, че той е в състояние да облекчи нарушените когнитивни функции само при невродегенеративни състояния и нарушена активност на различни

невротрансмитерни системи, намалявайки оксидативния стрес и възпалението, които са в резултат на булбектомията.

Показано е, че AT1 рецепторните блокери *in vivo* имат силен невропротективен ефект, така че тяхната употреба може да бъде от полза за терапията на много мозъчни заболявания (Saavedra, 2012; Wang et al., 2014). Неотдавнашни проучвания показват, че телмисартан при мишки защитава допаминергичните неврони, инхибира отговорите на микроглията при болестта на Паркинсон на генно модифицирани МРТР мишки (Garrido-Gil et al., 2012) и намалява обучителните и паметови дефицити, в следствие на хипертония (Sharma and Singh, 2012; Kishi et al., 2012).

Възпалението на мозъка се свързва с патофизиологията на мозъчни заболявания, такива като голямата депресия, болестта на Паркинсон, болестта на Алцхаймер и травматично мозъчно увреждане. Натрупват се доказателства, подсказващи, че ARBs могат да предпазят мозъка от различни видове увреждания, които са в следствие от възпалителни на паренхима или невронални увреждания. Етиологията на индуцираната от OBX депресия също се свързва с възпаление. Отстраняването на обонятелните луковици води до продуцирането на активни форми на кислорода, насищане на антиоксидантните ензимни системи, повишена липидна пероксидация и т.н. (Tasset et al., 2010). В допълнение към оксидативния стрес, OBX синдромът включва генериране на провъзпалителни цитокини в мозъка (Myint et al., 2007; Rinwa and Kumar, 2013) и спомага за патологичните увреждания, съпътстващи възпалителните реакции (Song et al., 2009). Оксидативният стрес допринася за когнитивните нарушения и при експериментални животни (Liu et al., 2003). Съобщения показват, че оксидативният стрес в мозъка на болни от Алцхаймер и други невродегенеративни заболявания е повишен (Zhu et al., 2004). Невропротективните ефекти на ARBs могат да бъдат частично свързани с тяхната способност да намаляват оксидативния стрес. Напоследък се съобщава за сложни взаимодействия между Ang II, поведенческите процеси и невроналния оксидативен стрес. Bild и съавт. (2013) намират значими корелации между някои свързани с паметта поведенчески реакции и маркери на оксидативния стрес в хипокампа. Така, централно въведеният Ang II води до паметов дефицит при две различни когнитивни задачи и повишава оксидативния стрес в хипокампа, докато приложението на лосартан значително подобрява паметта на плъховете (Bild et al., 2013). Следвайки тази линия на разсъждения, вероятно е, противовъзпалителните и антиоксидантните ефекти на лосартан да допринасят за способността му да подобрява паметовите дефицити при OBX депресията.

Имайки предвид нашите данни, за подобряващият паметовите дефицити, ефект на лосартан след *билатералното* му въвеждане в СА1 полето на OBX плъховете, от особен интерес за нас, беше да проучим ефектите му върху когнитивните процеси, след едностранно инхибиране на хипокампалните AT1 рецепторите на фона на развита депресия (OBX).

Получените резултати показаха, че лосартан, микроинжектиран в *лявото*, но не и в *дясното* СА1 поле на хипокампа, подобрява влошените обучителни и паметови процеси на OBX плъховете, което говори за зависимост от страна на инжекцията. В допълнение, Ang II, приложен *унилатерално* (ляво или дясно) на фона на развито депресивно-подобно състояние не повлиява съществено обучението и паметта и при двата авойданс метода (shuttle box и step trough).

Сравнявайки ефектите на каптоприл (АСЕ-инхибитор) и лосартан (селективен AT1 рецепторен антагонист), при shuttle box метода, Raghavendra и сътр. (2001)

установяват, че и двете лекарства са еднакво ефективни в подобряването на паметта, когато се прилагат преди обучението. Във връзка с това беше направено и предположението, че намаляването на ендогенната активност на Ang II в мозъка, би могло да доведе до подобряване на когнитивните функции. Клиничните данни с антагонисти на Ang II са склонни да подкрепят експерименталните данни. Показано е, че лосартан подобрява когнитивните процеси не само при хипертонични пациенти, но и при нормотензивни възрастни плъхове (Tedesco et al., 1999; Fogari et al., 2003).

Както бе споменато по-горе, двустранното премахване на bulbi olfactorii, води до невродегенеративни промени в проекционните области на булбусите, като кора, амигдала и хипокамп (Song and Leonard, 2005). Въпреки че, все още липсват данни за експресирането на PAC компонентите в мозъка на OBX плъховете, то невродегенеративни промени биха могли да се дължат и на аномалии в PAC в различни мозъчни структури, подобно на наблюдаваните промени в AT рецепторите при пациенти с невродегенеративни заболявания (Ge and Barnes, 1996; Savaskan et al., 2001).

Напоследък бе съобщено за интерхемисферни разлики във функцията на хипокампалната дългосрочна памет, допускайки, че паметта в хипокампа на мишки се медира от различни в ляво и в дясно пътища (Shipton et al., 2014).

Други доказателства, разглеждащи латерализацията в експресията на различните компоненти на PAC се предоставят от изследванията на Wu и сътр. (2010), които установяват асиметрично разпределение на ангиотензиновата активност в амигдала, хипокампа и префронталната кора на плъх (Wu et al., 2010). Аминопептидазите (APs), наречени ангиотенгинази, участват в метаболизма на ангиотензиновите пептиди. Установено е, че в левия хипокамп, преобладават AlaAP, CysAP и AspAP, докато в десния преобладава GluAP (Banegas et al., 2005; Wu et al., 2010). Също така се допуска, че асиметричната активност на ангиотенгиназите в хипокампа на плъх може да бъде свързана както с посоката, така и с интензивността на поведенческата латерализация, проявена чрез предпочитаната лапа (Wu et al., 2010). Нашите резултати са в съответствие с данните за асиметрия в ефектите на вещества, които действат чрез ангиотензинови рецептори.

Въз основа на горепосочените данни, ние предполагахме, че латерализираният подобряващ обучението и паметта на плъхове с депресия, ефект на лозартан, би могъл да се дължи на хемисферна асиметрия в компонентите на хипокампалната PAC, включвайки експресията и/или активността на различни пептиди, ензими и рецептори.

Въпреки данните за модулиращо влияние на Ang II и неговите AT1 и AT4 рецептори върху хипокампалната невронална активност, все още остава неизяснена тяхната роля в когнитивните процеси, както и въвличането им в променените активности на амигдала, съпровождащи депресивните състояния.

Имайки предвид липсата на данни относно механизма на действие на Ang II в амигдала в обучителните и паметовите процеси на животни с депресивно подобни състояния, ние проучихме и участието на Ang II и AT1 рецепторите при уни- и билатерално локално въвеждане на Ang II и лосартан в централното ядро на амигдала (CeA) на плъхове с модел на депресия (OBX).

Нашите изследвания са първите, които предоставят информация за ефектите на Ang II и лосартан, инфузирани в CeA върху изследователската активност на плъхове.

Наше оригинално наблюдение е фактът, че Ang II и лосартан, микроинжектирани в централното ядро на амигдала (CeA) имат противоположни ефекти върху изследователската активност, като засягат както хоризонталните, така и

вертикалните движения. Ang II, приложен *двустранно* и в *лявото* CeA на амидала, потиска изследователска активност, докато лосартан, инфузиран *двустранно* и в *лявото* CeA я повишава. Данните показват също така, че Ang II и лосартан оказват влияние върху изследователското поведение по начин, който е зависим от страната на прилагането, подсказвайки различна роля на дясното и лявото CeA. Установено е, че двустранните електролитни лезии в кортико-медиалната и базолатералната част на амидала повишават локомоторната активност на плъх (White and Weingarten, 1976). В техния експеримент изследователските отговори са по-високи при лизираниите, отколкото при контролните плъхове. Фармакологични и невроанатомични доказателства, подкрепят важната роля на Ang II и AT рецепторите при медирането на изследователското поведение. Подобни са и установените от нас ефекти на Ang II, върху изследователското поведение, след инфузирането му в хипокампащото CA1 поле.

Микроинжектирането на Ang II в амидала на плъх, повишава скоростта на разтоварване (discharge rate) на амидалните неврони, като повишението може да бъде блокирано от AT1 рецепторни антагонисти (Albrecht et al., 2000). Въпреки това липсват данни за поведенческите ефекти на Ang II и неговите рецептори в амидала, макар че те са широко разпространени в амидала и по-специално в CeA (von Bohlen und Halbach and Albrecht, 1998a). Нещо повече, CeA участва в стресовите реакции и паметта. Наскоро, Llano-Lopez и сътр. (2012) показаха, че AT1 рецепторите в CeA участват в генерирането на тревожното състояние. Има доказателства, че Ang II улеснява отделянето на допамин през AT1 рецепторите от пресинаптичните неврони, като този ефект напълно се премахва от лосартан (Jenkins et al., 1996; Raghavendra et al., 1998). В стриатума повишената локомоторна активност се свързва с повишените нива на допамин, докато в амидала тя се свързва с анксиогенни поведенчески отговори (Jenkins et al., 1996). Получените от нас данни за понижената вертикалната активност, вследствие на инхибирането на AT1 рецепторите в лявото CeA може би е отражение и на анксиогенния ефект на лосартана. На базата на гореспоменатите констатации е възможно да се предположи, че блокирането на AT1 рецепторите в CeA би повлияло нивата на допамина.

Като се имат предвид резултатите, получени в настоящото изследване, заедно с предишните доказателства, ние предполагаме, че латерализираните ефекти на Ang II и лосартан върху изследователското поведение вероятно се дължат на неравномерното разпределение на AT1 рецепторите и взаимодействията им с други асиметрично разпределени невротрансмитерни системи в амидалата.

Хипокамп, амидала, предната част на gyrus cingulae и префронталния кортекс са ключови области, участващи в невроналните пътища на депресията. След булбектомия се наблюдава дегенерация в невроните на кортекса (Nesterova et al., 2007), хипокампа и амидала (Carlsen et al., 1982), nucleus raphe (Nesterova et al., 1997) и пириформен кортекс (Capurso et al., 1997). Доказано е също, че невротрансмитерни пътища от лимбични структури, като хипокамп, амидала, субикулум, енторинален кортекс и cingulum медираат и областите свързани с емоционалната памет (Giordano, 2005).

Централното ядро на амидала (CeA) е мястото за обработка на информация, свързана с депресията (Aggleton, 1993; Dannlowski et al, 2008).

Представените резултати за експлораторното поведение на плъховете с модел на депресия, микроинжектирани билатерално и унилатерално (ляво или дясно) в CeA на амидала показаха, че Ang II и лосартан, повлияват по различен начин

изследователското поведение и хабитуацията на ОВХ плъховете. Ang II, микроинжектиран *двустранно* и в *дясното* СеА допълнително стимулира повишената изследователска активност, която се отразява в броя на хоризонталните и вертикалните движения, т.е. засилва хиперактивността на ОВХ плъховете и влошава депресивно подобното състояние. Лосартан, приложен *двустранно* или *едностранно* само в *лявото* СеА потиска експлорацията, за разлика от въвеждането му в *дясното* СеА където не я повлиява. Така, инхибирането на AT1 рецепторите от лосартан намалява хиперактивното поведение на ОВХ плъхове и потиска депресията.

Освен това, тези данни показват, че както стимулирането на ангиотензиновите рецептори от Ang II, така и инхибирането само на AT1 рецепторите от лосартан, макар и в противоположна посока, предизвикват асиметрия в изследователското поведение на ОВХ плъховете. Тези данни подсказват за различна поведенческа латерализация във функцията на AT1 рецепторите в СеА на плъховете с депресивен синдром.

Счита се, че ОВХ синдрома е резултат от дисфункция на мозъчния ствол и лимбичните области, включващ различни неврохимични и невроанатомични промени (Kelly et al., 1997; Morales-Medina et al., 2017). Ние предполагаме, че дегенерацията на лимбичната система в резултат на булбектомията и последвалата я компенсаторна невронална реорганизация може да допринесе за различните ефекти на Ang II и лосартан върху изследователската активност на плъховете с ОВХ. Фактът, че Ang II повишава изследователската активност и същевременно нарушава хабитуацията, сочи към различни механизми, допринасящи за тези поведенчески дефицити при плъхове с ОВХ. Leonard и Tuite (1981) предполагат, че нарушената хабитуация на плъхове с ОВХ може да се дължи и на стрес, който е в резултат от поставянето на животните в нова среда. Прието е, че експлораторната двигателна активност зависи от мотивацията на животното да се придвижва от едно място на друго (Handley and Mithani, 1984). Следователно, предизвиканият стрес и съотношението между експлораторната активност и активността при стресови и страхови състояния, могат да намалят изследователското поведение, ако съществува такава мотивация. От друга страна, екстремален страх може да причини startle-реакции и да повиши локомоторната активност (особено, ако времето е краткотрайно, да наруши хабитуацията), което не може да се свързва с анксиолитичен ефект (Harro and Vasar, 1991). В нашия случай, модулаторните ефекти на Ang II и лосартан върху невроналното предаване в амигдалата може би повлияват стресовите отговори на ОВХ плъхове. Тъй като Ang II е ключов невротрансмитер в СеА, участващ в регулацията на стресовите отговори (Kalin et al., 2004; Marinzalda et al., 2014) и поставянето на плъховете в новата среда е стрес реакция, ние предполагаме, че Ang II засилва депресивното поведение, докато инхибирането на AT1 рецепторите от лосартан проявява антидепресивен ефект. От друга страна има доказателства, че активирането на AT1 рецепторите върху пресинаптичните неврони повишава нивата на извънклетъчния допамин (Brown et al., 1996) и този ефект напълно се премахва от лосартан (Raghavendra et al., 1998).

През последните години се проучва активно взаимовръзката между хемисферната мозъчна асиметрия и депресията, установен е съпровождащ заболяването функционален дефицит на двете хемисфери, който се повлиява от антидепресантна терапия.

Blieg и съавт. (1993) показват, че вътресинаптичните и екстрасинаптичните 5-HT1A рецептори в други хипокампални области (CA3) са функционално различни и

може би се свързват с трансдукционални механизми. Разбира се, не могат да не се имат пред вид редица други фактори.

В последно време особено значение се отдава на участието на ренин-ангиотензиновата система в депресивните състояния (Vian et al., 2017).

Проучихме участието на Ang II и AT1 рецепторите при локално въвеждане на Ang II и лосартан в CeA върху когнитивните дефицити на плъхове с депресивно-подобно състояние (OBX). Данните ни показаха, че ефектите на Ang II и лосартан върху процесите на обучение и запаметяване при депресивни състояния са противоположни. Така, Ang II, въведен двустранно или само в *лявото* CeA на фона развита депресия влошава паметовите процеси, докато лосартан, инфузиран *двустранно* или в *ляво*, подобрява паметта на OBX плъховете. Нашите резултати за първи път дават информация за влошаващия ефект на Ang II върху когнитивните функции на OBX плъховете, когато е инжектиран в *лявото* CeA на амигдала, но не и когато е инжектиран в *дясното*. Латерализация в обучителните и паметовите процеси, бе установена и след инхибирането на AT1 рецепторите в *лявото* CeA на амигдала.

Има изследвания, които показват латерализация на амигдалните функции в емоционалното възприятие (Wager et al., 2003; Zald, 2003). Показано е при хора, че най-вече при отрицателни емоции се активира лявата амигдала (Morris et al., 1996), но има данни, че лявата амигдала отговаря и за положителните емоции (Killgore et al., 2001). Според мета-анализа на Wager и сътр. (2003) и Zald (2003) липсва ясен патерн на амигдална латерализация за положителни стимули, тъй като в отговор на приятни стимули са намерени както двустранни, така и едностранни (вдясно или вляво) амигдални активации. В допълнение, данните на Lanteaume и сътр. (2007), ясно показват, че положителните емоции при хора са предизвикани само от стимулирането на лявата амигдала, докато отрицателните емоции са предизвикани от стимулирането на двете амигдали. В експеримент, едностранните амигдални лезии също показват, че предизвикват когнитивни дефицити в емоционалното обучение (LaBar et al., 1995; Gosselin et al., 2005; Glascher and Adolphs, 2003).

Тези данни подсказват и за различна поведенческа латерализация във функцията на AT1 рецепторите в CeA на амигдала. Несъответствието в асиметричните поведенчески отговори, предизвикани от Ang II и лосартан не е изяснено. Такива разлики могат да се дължат на разлики в моларните концентрации на използваните вещества и/или на различна организация на невроналните пътища в лявата и дясна хемисфера на OBX плъховете, отговорна за дадения поведенчески отговор. Разбира се, не могат да не се имат пред вид и редица други фактори. Тук бихме споменали установеният от Yamamoto и Freed (1984) асиметричен метаболизъм на серотонина в лимбичните структури на лявата и дясна хемисфера.

Освен това, резултатите ни говорят, че Ang II задълбочава депресивно-подобните симптоми, докато инхибирането на AT1 рецепторите в CeA води до подобряването им.

Има данни, че както в хипокампа (Denny et al., 1991; Armstrong et al., 1996), така и в амигдала Ang II потиска LTP (Albrecht et al., 2003; Kaschel et al., 2004; Drephal et al., 2006) и LTD (Tchekalarova and Albrecht, 2007) чрез AT1 рецепторите (von Bohlen und Halbach and Albrecht 1998). Имайки предвид тези данни, както и фактите, че AT1 инхибиторите и ACE блокери, намаляват напрежението и подобряват паметовите процеси на пациенти използвали ги за лечение на хипертонията (KIM et al., 2017; Royea

et al., 2017), ние допускаме, че най-вероятно AT1 рецепторите са въввлечени в когнитивните функции при депресивни състояния.

Ако, въз основа на получените от нас резултати за участието на амигдалния Ang II и AT1 рецепторите в нарушените обучителни и паметови процеси би следвало да приемем, че инхибирането на AT1 рецепторите в CeA на амигдала води до съществено подобрене на обучението и запаметяването при депресивно-подобни състояния.

Все още обаче, тези нови факти не са интегрирани в цялостното разбиране за ролята на Ang II и неговите рецептори в развитието на невродегенеративните или психичните заболявания.

Ние показахме, че инфузирането в VLS на субстрат-прихващащата мутантна форма на STEP - TAT-STEP(C-S), блокира стереотипните движения, индуцирани от амфетамин. Самостоятелното въвеждане на TAT-STEP(C-S) във VLS или в кортекса не блокира стереотипиите на 1-вия тестваш ден. Следователно, тези ефекти на TAT-STEP(C-S) най-вероятно не са резултат от неспецифично нарушаване на мозъчните функции.

В допълнение към поведенческите ефекти, TAT-STEP променя кортикостриаталната синаптична пластичност. Трябва да се отбележи, че HFS-LTP, но не и HFS-LTD, липсват при мишки лишени от допаминови D1R рецептори, което показва решаващата роля на D1 рецепторите за инициране на вътреклетъчна сигнализация при тази форма на синаптична пластичност (Centonze et al., 2003). Съобразно с това, HFS на кортикостриаталните влакна предизвиква драматично и преходно повишаване на съдържанието на ендогенния допамин в мозъчни срезове (Calabresi et al., 1995) а в резултат на това стимулацията на D1 рецепторите води до индуциране на LTP (Centonze et al., 2003). Кортикостриаталната LTP, обаче е особено нестабилна веднага след индукцията ѝ и може да бъде заличена експериментално от нискочестотна стимулация (LFS).

Стабилизирането на LTP изисква активиране на D1 рецепторите, персистиращи и след високо честотна стимулация (HFS), това обяснява защо нефизиологичното освобождаване на допамин в стриатума, установено след прилагането на психостимулант (амфетамин), е в състояние да предотврати кортикостриаталната депотенциация (Centonze et al., 2006). Ние установихме, че TAT-STEP(C-S) избирателно възпрепятства LTP, без да повлиява HFS-LTD. В съответствие с идеята, че STEP е важен ефектор надолу по веригата на D1 рецепторната стимулация, установихме, че TAT-STEP(C-S) имитира ефекта върху кортикостриаталната синаптична пластичност при липсващи D1 рецептори, тъй като TAT-STEP(C-S) избирателно възпрепятства LTP, без да повлиява HFS-LTD.

В стриатума, обратно на хипокампа (Huang and Kandel 2005; Kelleher et al., 2004), D1 рецепторите (Centonze et al., 2003) и ERK 1/2 сигнално предаване, вероятно са необходими в ранната фаза на стриаталната LTP и това може да обясни защо TAT-STEP(C-S) би могъл да блокира тази форма на синаптична пластичност от нейната индукционна фаза

Директното прилагане на D1 рецепторен агонист или кокаин, както и хроничното с психостимулант или 3,4-дихидрокси-L-фенилаланин (LDOPA) при плъхове (Picconi et al., 2003; Centonze et al., 2006) предотвратява ниско честотноиндуцираната (LFS) депотенциация на кортикостриаталната LTP. Имайки пред вид тези данни, ние проучихме дали TAT-STEP(C-S) може да благоприятства появата на LFS-зависимата форма на LTD. Данните ни, показаха, че TAT-STEP(C-S), не

замаскира LFS зависимата форма на кортикостриаталната LTD, което предполага, че STEP играе важна роля за намаляване прага на синаптичната стимулация, необходима за индукция на LTD.

Факт е, че при контролите ниско честотната стимулация (LFS) от 2Hz не е достатъчна да индуцира стабилна дълготрайна депресия (LTD), а за да се индуцира тази форма на синаптична пластичност (Picconi et al., 2003, Centonze et al., 2003) е необходима по-силна високо честота стимулация (HFS). Обратно в настоящото проучване, установихме, че ниско честотната стимулация (LFS) е в състояние да понижи кортикостриаталните възбуждащи постсинаптични потенциали (EPSPs), когато е извършена след индуциране на дълготрайната потенция (LTP). Този процес, се предотвратява от активирането на допамин D1 рецепторите (Picconi et al., 2003, Centonze et al., 2003) и улеснява от TAT-STEP(C-S). TAT-STEP(C-S) обаче, дори когато се прилага след индуциране на LTP не е в състояние да промени сам по себе си (т.е. при липса на стимулация) кортикостриаталното синаптично предаване.

Разрушителните ефекти на TAT-STEP(C-S) върху кортикостриаталната LTP и благоприятното му влияние върху индуцираната от LFS депресия на EPSPs са важни за блокирането на индуцираните от амфетамин стереотипии, тъй като след хронично прилагане на психостимуланти (амфетамин) поведенческите ефекти поне отчасти се дължат, на нормална индукция на кортикостриаталната LTP чрез HFS, но намалена чувствителност на кортикостриаталните синапси към индуцираната LFS депотенция (Centonze et al., 2006).

В потвърждение на това намираме и в резултатите, показващи, че TAT-STEP(C-S) премахва LTP в мозъчни срезове, третирани с амфетамин, тъй като правим аналогия с данните, при които е установено, че както хроничното (i.p.) инжектиране на кокаин, така и прилагането на кокаин на срезове от striatum благоприятстват предимно LTP и много по-слабо LTD.

Електрофизиологичните ни резултати са в съответствие с предишни проучвания, при които е показано, че двустранната инфузия на TAT-STEP(C-S) в амигдала, нарушава дълготрайната страхова памет (Paul et al., 2007). Установено е, че при страхови състояния (freezing behavior) обучението (acquisition) е нормално 1 час след тренировъчната сесия, докато паметта е сериозно нарушена при тестване на 24-ия час. В настоящото изследване, прилагането на TAT-STEP(C-S) към срезове на амигдала, блокира високо честотно стимулираната (HFS) индукция на LTP.

Има няколко възможни механизма, които биха могли да обяснят тези резултати. TAT-STEP(C-S) се свързва с ERK1/2 и блокира, както транслокацията в ядрото на клетката, така и ERK1/2-медираното транскрипционно активиране (Paul et al., 2003). Всъщност дълготрайните поведенчески промени, предизвикани от амфетамин, включват активиране на ERK1/2 чрез стимулиране на допамин / D1 рецепторите в дорзалния стриатум (Valjent et al., 2004, 2005; Corbille et al., 2007). Допамин/D1 рецепторното стимулиране също води до инактивиране на ендогенната STEP чрез активиране на протеин киназа A (PKA) и фосфорилиране на сериновия остатък в KIM (киназно взаимодействащ мотив) домейна на STEP. Фосфорилирането на това място предотвратява свързването на STEP с ERK1/2 и удължава активността на ERK1/2 (Paul et al. 2003; Venkitaramani et al., 2007).

За амфетамин индуцирано активиране на ERK1/2 също е необходимо стимулиране на NMDA рецепторите (Valjent et al., 2005). В предишни изследвания бе показано, че STEP отслабва активността на NMDA (Snyder et al., 2005).

В това изследване бета-амилоидът води до активиране на STEP, което на свой ред дефосфорилира tyrl472 на NR2B субединицата и подпомага интернализация на NMDA рецепторния комплекс (Snyder et al., 2005). Следователно, възможно е освен регулирането пътя на ERK1/2, TAT-STEP(C-S) също да наруши транспорта на NMDA рецепторите. Накрая STEP дефосфорилира и инактивира тирозин киназа Fyn (Nguyen et al., 2002; Xu et al., 2014). Тъй като Fyn фосфорилира tyrl472 на NR2B субединицата, която стимулира екзоцитозата на NMDA рецепторния комплекс, то TAT-STEP(C-S) може да действа по два пътя за модулиране на NMDA рецепторния транспорт. Така, вероятно е TAT-STEP(C-S) да блокира амфетамин-индуцираните стереотипии чрез регулиране на ERK1/2, NMDA рецепторите, Fyn или чрез друг неидентифициран субстрат на STEP.

Ние показахме, че мутанта на STEP - TAT-STEP(C-S), въведен в VLS, блокира развитието на амфетамин предизвиканите стереотипии. Тези резултати са в съгласие с данните на Paul и сътр. (2007), които установяват, че TAT-STEP блокира консолидацията на паметта, предизвикана при страхова ситуация.

STEP присъства и в други области на мозъка, които са въввлечени в индуцираната от опита пластичност, включително стриатум, хипокамп, кортекс и амигдала, а може би участва и в други форми на обучение, които се случват в тези области.

Резултатите от тези изследвания са в съответствие с хипотезата, че STEP нормално се противопоставя на развитието на синаптичната пластичност чрез способността ѝ да индуцира интернализация на глутаматните рецептори и да инактивира ключови сигнални протеини, намиращи се в синапси. Все още обаче, използването на мутанта TAT-STEP(C-S) не може окончателно да изясни ролята на ендогенната STEP. Необходими са изследвания с knockout STEP мишки, за да се изясни дали липсата на STEP би потенцирала синаптичното укрепване. Ако това е така, то тогава потискането на активността на STEP със специфични STEP инхибитори, би подобрило когнитивните функции, а това би било и от полза за терапията на паметови дефицити от различно естество.

Неврохимичните механизми на паметта не се изчерпват само с участието на мозъчната невромедиация. Нови данни показват, че паметта се формира от протеини, синтезиращи се в етапа на консолидацията, както и от специфични рибонуклеинови киселини. Анализът на механизмите на невроналната пластичност, които участват в обучителните и паметовите процеси е важна стъпка за разбирането на невробиологията на паметта, а оттам и на паметовите дефицити. За това е необходимо да се проучат както неврохимичните механизми и микроструктурните корелати на обучението и паметта, така и поведенческите феномени свързани с тях, при различни модели на невропсихични заболявания.

В заключение, получените данни допринасят за изясняване участието на канабиноидите и неuropeптидите в обучителните и паметови процеси в норма и патология. Това предоставя нова база за разбиране модулиращата им роля в ЦНС, както и ролята на различните мозъчни структури в обучителните и паметовите процеси на тези и други невромодулатори, с произтичащите от това възможности за целенасочено търсене на нови невротропни средства при лечението на такива заболявания като болестта на Алцхаймер, деменции от различен произход, синдрома на Турет, хорея на Хънтингтон, състояния на тревожност.

Наред с получените нови данни за съществената роля на канабиноидите и неuropeптидите (ангиотензин II и вазоактивен интестинален пептид) в когнитивните дефицити, при експериментален модел на депресия, бяха получени и конкретни данни за хемисферна асиметрия в обучението и запаметяването, след локално унилатерално (ляво или дясно) въвеждане в хипокампаалното CA1 поле и централното ядро на амигдала на горепосочените невромодулатори на фона на развито депресивно-подобно състояние. Въпреки, че механизмите за предизвикване на асиметрични поведенчески отговори остават все още неизяснени, установяването на латерализация у животните има важно практическо значение. Така например, психичните отклонения, появили се у пациенти след мозъчен инсулт в левия фронтален кортекс, предизвикващи симптоми на депресия се лекуват с трициклични антидепресанти (потискащи предимно обратното поемане на серотонина - nortriptyline), докато пациенти с аналогични увреждания в десния фронтален кортекс, при които се развива необоснована веселост или апатия, трицикличните антидепресанти нямат ефект.

Очевидно, модулирането на обучителните и паметови процеси с канабиноиди и неuropeптиди, в частност от техните рецептори, не може да бъде разбрано напълно, докато не се разбере функционалната роля на отделните рецептори, сменящи се в зависимост от тяхната локализация в различните мозъчни структури, пре- или постсинапсно, от пресинаптичното им разположение като авто- или хетерорецептори, от взаимодействието им с други мозъчни невромедиаторни системи, от разпределението им между двете хемисфери, както и на молекулярните механизми и сигнални пътища, стоящи в основата на тези процеси.

Проведените от нас изследвания обаче, не ни позволяват да вземем становище по въпроса за патофизиологичните механизми, които лежат в основата на паметовите дефицити при депресивните състояния. Създаването на нови и по-пълното охарактеризиране на утвърдени вече експериментални модели на различни паметови нарушения и особено когато тези нарушения са компонент на комплексна клинична и патофизиологична природа на различни невропсихични заболявания, би позволило да се разграничат компонентите на патофизиологичните процеси, елемент на които са когнитивните дефицити. Това би имало важно теоретично и приложно значение в невробиологията и медицината. Резултатите от изследвания в тази насока биха хвърлили светлина не само върху механизмите, лежащи в основата на паметовите увреждания, но екстраполирайки ги при човека, биха обяснили и редица психични отклонения, както и биха насочили към прецизиране и оптимизиране на терапията на паметови дефицити при някои невропсихични заболявания.

ИЗВОДИ

1. Мозъчните канабиноидни CB1 рецептори участват в механизмите на обучителните и паметовите процеси на плъхове с депресивно-подобно състояние (OBX):

1.1. Стимулирането на CB1 рецепторите (HU 210) при депресивно-подобно състояние след OBX, потиска повишеното експлораторно поведение, възстановява нарушената хабитуация и подобрява увредените обучителни и паметови процеси.

1.2. Инхибирането на CB1 рецептори (SR 141716A) при депресивно-подобно състояние след OBX, не повлиява повишената експлораторна активност, нарушената хабитуация и увредените обучителни и паметови процеси.

2. Хипокампалният VIP и хипокампалният Ang II са въввлечени в механизмите на обучителните и паметовите процеси на плъхове с депресивно-подобно състояние (OBX):

2.1. VIP, микроинжектиран двустранно в хипокампащото CA1 поле на фона на развито депресивно-подобно състояние след OBX, стимулира изследователското поведение и подобрява увредените обучителни и паметови процеси.

2.2. Двустранното инхибиране на VPAC рецепторите (VIP₆₋₂₈) в CA1 полето на хипокампа на фона на развито депресивно-подобно състояние след OBX, стимулира експлораторната активност, не повлиява увредените обучителни и паметови процеси и задълбочава депресивно-подобното състояние.

2.3. VIP, въведен двустранно на фона на инхибирани VPAC рецептори (VIP₆₋₂₈) в хипокампащото CA1 поле на плъхове с модел на депресия след OBX, не повлиява експлораторното поведение, но подобрява увредените обучителни и паметови процеси.

2.4. Ang II, микроинжектиран двустранно в хипокампащото CA1 поле на фона на развито депресивно-подобно състояние след OBX, не променя увредените обучителни и паметови процеси.

2.5. Двустранното инхибиране на AT1 рецепторите (лосартан) в CA1 полето на хипокампа на фона на развито депресивно-подобно състояние след OBX, подобрява увредените обучителни и паметови процеси.

3. Унилатералното въвеждане на VIP в CA1 полето на хипокампа води до хемисферна асиметрия в обучителните и паметови процеси на плъхове с депресивно-подобно състояние (OBX):

3.1. VIP, въведен в дясното CA1 поле на фона на развито депресивно-подобно състояние след OBX, потиска изследователското поведение, нормализира нарушената хабитуация и подобрява увредените обучителни и паметови процеси.

3.2. VIP, въведен на фона на инхибирани VPAC рецептори (VIP₆₋₂₈) в лявото CA1 поле на хипокампа след OBX, стимулира експлораторната активност, не променя нарушената хабитуация и задълбочава депресивно-подобното състояние.

4. Унилатералното въвеждане на лосартан, Ang II и Ang IV в CA1 полето на хипокампа води до ляво-доминираща хемисферна асиметрия в обучителните и паметови процеси:

4.1. Инхибирането на AT1 рецепторите (лосартан) в лявото CA1 поле на хипокампа намалява експлораторната активност и подобрява обучението и паметта.

4.2. Ang II, въведен на фона на инхибирани AT1 рецептори (лосартан) в лявото СА1 поле на хипокампа, подобрява обучението и паметта.

4.3. Ang IV, микроинжектиран в лявото СА1 поле на хипокампа, съществено подобрява обучението и паметта.

5. Унилатералното въвеждане на лосартан в СА1 полето на хипокампа води до хемисферна асиметрия в обучителните и паметови процеси на плъхове с депресивно-подобно състояние (ОВХ):

5.1. Инхибирането на AT1 рецепторите (лосартан) в лявото СА1 поле на хипокампа подобрява увредените обучителни и паметови процеси на ОВХ плъховете.

6. Амигдалният Ang II и AT1 рецепторите са въввлечени в механизмите на обучителните и паметовите процеси на плъхове:

6.1. Ang II, микроинжектиран двустранно и в лявото централно ядро на амигдала (CeA) потиска експлораторното поведение, докато инфузиран в дясното CeA, не го променя.

6.2. Инхибирането на AT1 рецепторите (лосартан) двустранно и в лявото централно ядро на амигдала (CeA) стимулира експлораторната активност и подобрява обучителните и паметови процеси, докато инхибирането им в дясното CeA не ги повлиява.

7. Амигдалният Ang II и AT1 рецепторите са въввлечени в механизмите на обучителните и паметовите процеси на плъхове с депресивно-подобно състояние (ОВХ):

7.1. Ang II, микроинжектиран двустранно и в дясното централно ядро на амигдала (CeA) на фона на развито депресивно-подобно състояние, задълбочава депресивно-подобното състояние - стимулира повишеното експлораторно поведение, не възстановява нарушената хабитуация и задълбочава обучителните и паметовите дефицити.

7.2. Инхибирането на AT1 рецепторите (лосартан) двустранно и в лявото централно ядро на амигдала (CeA) на фона на развито депресивно-подобно състояние, води до подобряване на депресивно-подобното състояние - потиска повишената експлораторната активност, възстановява нарушената хабитуация и подобрява увредените обучителни и паметови процеси.

8. TAT-STEP(C-S), въведен във вентролатералния стриатум на фона на индуцираните от амфетамин поведенчески стереотипии (модел на синдром на Турет):

- значително намалява експресията на амфетамин-индуцирана сенсибилизация.
- няма ефект върху двигателната активност.
- няма ефект върху поведенческите промени при острото му въвеждане на фона на амфетамин-индуцираната сенсибилизация.

9. TAT-STEP(C-S) предотвратява дълготрайното потенциране (LTP), индуцирано от високочестотна стимулация (HFS) и улеснява дългосрочната депресия (LTD) при нискочестотна стимулация (LFS).

10. STEP knockout мишките имат по ниска локомоторната активност и са по-чувствителни към амфетамина, отколкото „wild typ“ мишките.

11. TAT-STEP(C-S) блокира индукцията на амфетамин-индуцираната неврoпластичност във вентролатералния стриатум.

12. Установеното въвличане на мозъчните канабиноидни CB1 рецептори, амигдалния Ang II, хипокампалните неврoпептиди VIP и Ang II в обучението и паметта и проучване участието на STEP в клетъчно-молекулярните механизми на мозъчната пластичност са предпоставки за изясняване патогенезата и оптимизиране терапията на някои невродегенеративни и психични заболявания, характеризиращи се с паметови дефицити и депресивни състояния.

П Р И Н О С И

I. Приносен характер имат изследванията за ролята на мозъчните канабиноидни CB1 рецептори в механизмите на обучителните и паметови процеси на плъхове с депресивно-подобно състояние (OBX).

1. За първи път е установено, че стимулирането на мозъчните CB1 рецептори подобрява обучителните и паметовите дефицити, развили се при депресивно-подобно състояние, докато инхибирането им не ги повлиява.

II. Наш приоритет са данните, че хипокампалният VIP и хипокампалният Ang II модулират обучителните и паметови функции при депресивно-подобно състояние (OBX).

1. За първи път е установено, че VIP подобрява увредените обучителни и паметови процеси, докато инхибирането на VPAC рецепторите в CA1 полето на хипокампа не ги повлиява и задълбочава депресивно-подобното състояние.

2. Оригинални са данните, че инхибирането на AT1 рецепторите в CA1 полето на хипокампа подобрява депресивно-подобното състояние и увредените обучителни и паметови процеси, докато Ang II няма ефект върху тях.

III. Приносен характер имат данните за латерализация на обучителните и паметови процеси, предизвикана от локалното въвеждане на неuropeптиди в подкорови мозъчни структури. Установен е положителен обучителен и паметов ефект след въвеждане на Ang IV в лявото CA1 поле на хипокампа, след инхибиране на AT1 рецепторите в лявото CA1 поле на хипокампа и в лявата амигдала (CeA).

IV. Наш приоритет са данните за хемисферна асиметрия в обучителните и паметови процеси при депресивно-подобно състояние (OBX), предизвикана от локалното въвеждане на неuropeптидите VIP и Ang II в CA1 полето на хипокампа.

1. Установена е дясно-доминираща хемисферна асиметрия. Показано е, че VIP, въведен в дясното CA1 поле подобрява увредените обучителни и паметови процеси на OBX плъховете.

2. Установена е ляво-доминираща хемисферна асиметрия. Показано е, че инхибирането на AT1 рецепторите в лявото CA1 поле на хипокампа подобрява увредените обучителни и паметови процеси на OBX плъховете.

V. Оригинални са данните за амигдална асиметрия в обучителните и паметовите процеси на плъхове с депресивно-подобно състояние (OBX), предизвикана от локалното въвеждане на Ang II и лосартан в централното ядро на амигдала (CeA).

1. За първи път е установено, че амигдалният Ang II и AT1 рецепторите са въввлечени в патогенезата на депресивно-подобното състояние.

2. Приносен характер имат данните, че инхибирането на AT1 рецепторите в лявото CeA, води до подобряване на увредените обучителни и паметови функции и подобряване на депресивно-подобното състояние, докато Ang II ги влошава.

VI. Наш приоритет са данните, че субстрат прихващаща изоформа на STEP - TAT-STEP(C-S) блокира развитието на синаптичната пластичност, инактивирайки ключови сигнализиращи протеини, присъстващи в синапсите.

VII. Получените данни биха могли да допринесат за изясняване на някои механизми от патофизиологията на паметовите дефицити при депресивно-подобни състояния и синдром на Турет, както и да дадат нови насоки за терапията им.

СПИСЪК
на научните трудове на доц. д-р Роман Емилов Ташев, дм

Публикации включени в дисертационния труд за образователната и научна степен „доктор“

1. **Tashev R.**, I. Belcheva. Effects of somatostatin microinjected into striatum on exploratory behavior. C. R. Acad. Bulg. Sci., 2001, (54) 2, 117-119.
2. **Tashev R.**, S. Belcheva, K. Milenov, I. Belcheva. Antinociceptive effect of somatostatin microinjected into caudate putamen. Peptides (2001), 22 (7), 1079-1083.
IF = 2.137 IF = 0.54
3. **Tashev R.**, S. Belcheva, K. Milenov, I. Belcheva. Behavioural effects of somatostatin microinjected into caudate putamen. Neuropeptides, 35, 1-5, 2001.
IF = 1.958 IF = 0.49
4. **Tashev R.** "Поведенчески ефекти на соматостатина, микроинжектиран в неостриатум (Caudate-Putamen). Автореферат на дисертация за присъждане на образователна и научна степен "Доктор", 2002, стр.32.

Публикувани статии включени в състава на дисертационния труд за научна степен "доктор на науките"

1. Маринов М., М. Иванова, С. Белчева, И. Белчева, Н. Негрев, **Р. Ташев**, Р. Радев, И. Маринова (2014) Промени в експлораторното поведение на плъхове с олфакторна булбектомия след еднократно въвеждане на лиганди на канабиноидния CB1 рецептор. Известия на съюза на учените – Варна. Експериментална медицина. 2 /том XIX стр. 3-8.
2. **Tashev R.**, P. Moura, D. Venkitaramani, C. Prosperetti, D. Centonze, S. Paul, P.J. Lombroso (2009) A Substrate Trapping Mutant Form of the Tyrosine Phosphatase STEP Prevents Amphetamine-induced Stereotypies and Long-term Potentiation in the Striatum. Biol. Psychiatry, 15, 65(8), 637-45.
IF = 10.577 IF = 1.511
3. **Tashev R.**, M. Ivanova, T. Toromanov, M. Marinov, S. Belcheva, I. Belcheva. (2010) Olfactory bulbectomy impairs active and passive avoidance learning in rats Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., 63, 4, 617-620.
IF = 0.219 IF = 0.037
4. Ivanova M., S. Belcheva, N. Negrev, I. Belcheva **R. Tashev** (2011) Modulatory effect of vasoactive intestinal peptide on exploratory behavior of rats with a model of depression. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., 64, No9 pp.1337-1346.
IF = 0.210 IF=0.042
5. Marinov M., М. Иванова, S. Belcheva, I. Belcheva, N. Negrev, **R. Tashev** (2011) Influence of Cannabinoid CB1 Ligands on Exploratory Behaviour and Locomotor Activity in Rats. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., 64, No12 pp.1785-1792
IF = 0.210 IF = 0.035

6. Moura P.J., D.V. Venkitaramani, **R. Tashev**, P.J. Lombroso, G.F. Xavier (2011) Transport of animals between rooms: a little-noted aspect of laboratory procedure that may interfere with memory. *Behavioural Processes*, 88 (1), 12-9
IF= 1.652 IF = 0.33

7. Ivanova M., I. Belcheva, S. Belcheva, N. Negrev, **R. Tashev** (2011) Influence of vasoactive intestinal peptide on locomotor activity of rats with a model of depression after bilateral administration into hippocampal CA1 area. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 64, 7, 1059-1066.
IF = 0.210 IF = 0.042

8. Ivanova M., S. Belcheva, I. Belcheva, N. Negrev, **R. Tashev** (2012) Lateralized hippocampal effects of Vasoactive Intestinal Peptide on learning and memory in rats in a model of depression. *Psychopharmacology*, 221, 4, 561-574
IF = 4.077 IF = 0.82

9. Ivanova M., I. Belcheva, S. Belcheva, N. Negrev, **R. Tashev**. (2012) Olfactory bulbectomy induces shifts in lateralization of locomotor responses to vasoactive intestinal peptide. *Scripta Sci. Med.*, 44 (1) 59-61.

10. Marinov M., M. Ivanova, S. Belcheva, I. Belcheva, **R. Tashev** (2013) Effects of acutely applied cannabinoid CB1 ligands on learning and memory in rats with a model of depression. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 66, No 9 1331-1338
IF = 0.198 IF = 0.04

11. **Tashev R**, M. Ivanova (2014) Effects of losartan infused into hippocampal CA1 area on exploratory behaviour of rats. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 67, No 6, 871-878.
IF = 0.284 IF = 0.142

12. **Tashev R**, M. Stefanova (2015) Hippocampal asymmetry in angiotensin II modulatory effects on learning and memory in rats. *Acta Neurobiol Exp*, 75(1), 48-59.
IF = 2.244 IF = 1.122

13. **Tashev R.**, M. Ivanova (2015) Lateralized hippocampal effects of angiotensin IV on learning and memory in rats. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 68, No 10, 1309- 1316
IF = 0.233 IF = 0.117

14. **Tashev R**, M. Ivanova, S. Belcheva, I. Belcheva (2016) Differential involvement of hippocampal angiotensin 1 receptors in learning and memory processes in bulbectomized rats. *Journal of Mind and Medical Sciences: Vol. 3: Iss. 1, Article 6*. Available at: <http://scholar.valpo.edu/jmms/vol3/iss1/>

15. Marinov M., M. Ivanova, S. Belcheva, I. Belcheva, N. Negrev, **R. Tashev** (2016). CB1 ligands modulation of learning and memory of OBX rats. *Scripta Scientifica Medica*, vol. 48, No. 3, 78-83.

16. **Tashev R**, H. Nocheva, M. Tzvetkova, S. Belcheva (2017) Differential effects of angiotensin II and losartan on exploratory behaviour after microinjections into rat amygdala. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 70, No 6, 863-870.
IF=0.251 IF = 0.063
17. Ivanova M, **R. Tashev** (2017) Intrahippocampal administration of losartan improves learning and memory in rats with model of depression. *Bul. Chem. Comm., Special Edition E*, pp. 169-174.
IF = 0.349 IF = 0.175

**Списък на публикуваните резюмета
във връзка с дисертационния труд за „доктор на науките“
на доц. д-р Роман Емилов Ташев, дм**

Участия в международни форуми

1. **Tashev, R.**, S. Paul, I. Ruchkina, P.J. Lombroso. The role of the tyrosine phosphatase - step in amphetamine-induced sensitization. Society for Neuroscience 2004, San Diego, CA, Presentation Number - 632.10, Poster Board-P14, October 26, 2004.
2. **Tashev, R.**, I. Ruchkina, E. Mills, S. Paul, P. Lombroso. The role of STEP, a protein tyrosine phosphatase in amphetamine-induced sensitization. Society for Neuroscience 2005, Washington, DC. Presentation Number - 732.3, Poster Board-O7, Nov. 15, 2005.
3. **Tashev, R.**, D.V. Venkitaramani, E.A. Mills, S. Paul, P.J. Lombroso. Amphetamine-induced sensitization is modulation by striatal enriched tyrosine phosphatase. Society for Neuroscience, 2006, Atlanta, GA, Program # 632.8, Poster Board- E28, October 17, 2006.
4. Moura, P.J., D.V. Venkitaramani, **R. Tashev**, G.F. Xavier, P.J. Lombroso. Expression of Striatal enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) in social recognition memory. Society for Neuroscience, San Diego, CA. 07, November, 2007, Program # 787.17, Poster Board - H27.
5. Marinov M., M. Ivanova, I. Belcheva, S. Belcheva, N. Negrev, **R. Tashev**. Learning and memory effects of cannabinoid CB1 receptor ligands in rats with a model of depression. 18th Session of the Balkan medical days, 16-18 September, 2011, Varna, Bulgaria, Scripta Sci. Med., 43 (6), p.97.
6. Kalfin R., M. Ivanova, **R. Tashev**, S. Belcheva, I. Belcheva. Vasoactive intestinal peptide - central and peripheral effects. 33rd European Peptide Symposium. 31 August – 5 September, 2014, Sofia, Bulgaria, P215.
7. Belcheva, I. V. Georgieva, M. Ivanova, S. Belcheva, **R. Tashev**. Some neuropeptides and hemispheric lateralization in cognitive function of rats. 33rd European Peptide Symposium. 31 August – 5 September, 2014, Sofia, Bulgaria, P226, pp. 250-251.

Участия в национални конгреси с международно участие

8. **Tashev R.**, M. Ivanova, L. Yankova, S. Belcheva, I. Belcheva. Involvement of hippocampal angiotensin II type 1 receptors in locomotor activity in rats with a model of depression. Седми Български Пептиден Симпозиум с международно участие, Благоевград, България, 10.06 – 12.06. 2016, Университетски център „Бачиново”, P.23
9. Ivanova M., S. Belcheva, I. Belcheva, **R. Tashev**. Intrahippocampal administration of losartan ameliorates learning and memory deficits in bubectomized rats. Седми Български Пептиден Симпозиум с международно участие, Благоевград, България, 10.06 – 12.06. 2016, Университетски център „Бачиново”, p.25
10. **Tashev R.**, M. Ivanova, L. Yankova, S. Belcheva, I. Belcheva. Differential involvement of hippocampal angiotensin 1 receptors in learning and memory processes in bulbectomized rats. Седми Български Пептиден Симпозиум с

международно участие, Благоевград, България, 10.06 – 12.06. 2016, Университетски център „Бачиново”, p.26

11. Kalfin R., M. Lazarova, P. Mateeva, L. Yankova, S. Belcheva, **Tashev R.** Vasoactive intestinal peptide and Parkinson's disease. Седми Български Пептиден Симпозиум с международно участие, Благоевград, България, 10.06 – 12.06. 2016, Университетски център „Бачиново”, p.23
12. Sabit Z., **R. Tashev.** Effects of angiotensin II and losartan infused into amygdala on learning and memory in rats with a model of depression. Юбилейна научна конференция с международно участие посветена на 70 години от основаването на института по невробиология на тема: “Невронауки – от теорията до експеримента” 30 ноември-1 декември, 2017, София

Участия в национални конгреси и симпозиуми

13. Belcheva I., M. Ivanova, **R. Tashev**, N. Negrev, S. Belcheva. Role of hippocampal vasoactive intestinal polypeptide in behavior of rats with model of depression (olfactory bulbectomy). Bulgarian Society for Neuroscience IVth National Congress Sofia, September 26th - 27th, 2008, p. 26.
14. **Tashev**, R., S. Paul, P. Lombroso. Involvement of Striatal enriched tyrosine phosphatase (STEP) in amphetamine-induced sensitization. Bulgarian Society for Neuroscience IVth National Congress Sofia, September 26 - 27, 2008, p.28.
15. Belcheva S., M. Ivanova, **R. Tashev**, N. Negrev, I. Belcheva. Olfactory bulbectomy impairs active and passive avoidance learning in rats. VI National Congress of Pharmacology. Pharmacology – from the experiment to the clinic. Journalist Hotel, Golden Sands, 1-4, October, 2009, p.32.
16. **Tashev R**, Ivanova M., Toromanov T, Negrev N, Belcheva S., Belcheva I. Modulation of learning and memory after VIP administration in hippocampal CA1 area of olfactory bulbectomized rats. VI National Congress of Pharmacology. Pharmacology – from the experiment to the clinic. Journalist Hotel, Golden Sands, 1-4, October, 2009, p.34.
17. Ivanova M., S. Belcheva, I. Belcheva, L.Yankova, N. Negrev, **R. Tashev.** Hippocampal asymmetry in exploratory behavior to vasoactive intestinal polypeptide in olfactory bulbectomized rats. VI Български пептиден симпозиум, Октомври, 2011, p.23.
18. Ivanova M., S. Belcheva, I. Belcheva, N. Negrev, **R. Tashev.** Asymmetry in behavioral responses to vasoactive intestinal peptide microinjected into hippocampal CA1 area of rats with a model of depression. X Национален конгрес на българското дружество по физиологични науки, Варна, 9-11 Октомври, 2011, *Scripta Sci. Med.*, 43 (3), p.217.
19. Marinov M., M. Ivanova, I. Belcheva, S. Belcheva, **R. Tashev.** Influence of cannabinoid CB1 ligands on exploratory behavior and locomotor activity in rats. X Национален конгрес . X национален конгрес на българското дружество по физиологични науки, Варна, 9-11 октомври, 2011, *Scripta Sci. Med.*, 43 (3), p.223.
20. Marinov M, M. Ivanova, I. Belcheva, S. Belcheva, **R. Tashev.** Learning and memory effects of cannabinoid CB1 ligands in rats. X Национален конгрес на българското дружество по физиологични науки, Варна, 9-11 октомври, 2011, *Scripta Sci. Med.*, 43 (3), p. 224.

21. Ivanova M, Belcheva S., Belcheva I, Negrev N, **R. Tashev**. Effect of subchronically intracerebroventricularly injected CB1 receptor ligands on learning and memory in rats. VII Национален конгрес по фармакология, 17 – 19, Октомври 2014 г., МУ-Плевен, Р 5
22. Belcheva I, M. Ivanova, S. Belcheva, **R. Tashev**. Role of neuropeptides in hippocampal hemispheric asymmetry of learning and memory in rats. VII Национален конгрес по фармакология, 17–19 Октомври, 2014 г., МУ-Плевен, Р7.
23. Belcheva I, S. Belcheva, M. Ivanova, **R. Tashev**. Hippocampal lateralization in cognitive function in rats. Научната конференция "Невронауки - от теорията до експеримента", 4. 12. 2014 г., София, ИНБ, БАН.
24. **Tashev R.**, M. Stefanova, S. Belcheva, I. Belcheva. Hippocampal asymmetry in angiotensin II modulatory effects on learning and memory in rats. XI Национален конгрес по физиологични науки, Пловдив, 9 – 11 Октомври, 2015 г. <http://goo.gl/IuPL9a>
25. **Tashev R.**, M. Stefanova, S. Belcheva, I. Belcheva. Effects of losartan infused into hippocampal CA1 area on exploratory and locomotor activity of rats. XI Национален конгрес по физиологични науки, Пловдив, 9 - 11 Октомври 2015 г. <http://goo.gl/IuPL9a>
26. **Tashev R.**, M. Stefanova, S. Belcheva, I. Belcheva. Lateralized hippocampal effects of angiotensin IV on learning and memory in rats. XI Национален конгрес по физиологични науки, Пловдив, 9 - 11 Октомври 2015 год. <http://goo.gl/IuPL9a>

Ц И Т А Т И

на статии, включени в дисертацията на доц. д-р Роман Емилов Ташев, дм
за „доктор на науките“

Tashev R, Moura P, Venkitaramani D, Prosperetti C, Centonze D, Paul S, Lombroso PJ. (2009) A Substrate Trapping Mutant Form of the Tyrosine Phosphatase STEP Prevents Amphetamine-induced Stereotypies and Long-term Potentiation in the Striatum. Biol. Psychiatry, 15, 65(8), 637-45.

1. Surmeier, D.J., Shen, W., Day, M., T. Gertler, S. Chan, X.Tian, J.L. Plotkin, (2010), The role of dopamine in modulating the structure and function of striatal circuits, Ed. Bjorklund, A; Cenci, MA., Recent Advances In Parkinsons Disease: Basic Research, Book Series, Progress in Brain Research, 183, 149-167.
2. Herrold AA, (2011), mGluR5 Involvement in Methamphetamine Reward and the Co-Morbidity of Schizophrenia and Stimulant Use Disorders, PhD Thesis, Loyola University Chicago, USA, http://ecommons.luc.edu/luc_diss_2yr/3/
3. Shuto T, A. Nishi, (2011), Treatment of the Psychostimulant-Sensitized Animal Model of Schizophrenia, CNS Neuroscience & Therapeutics, 17,(2), 81–139, doi:10.1111/j.1755-5949.2010.00218.x., <http://goo.gl/kFUJzd>
4. Lerner, Talia N.; Kreitzer, Anatol C., (2011), Neuromodulatory control of striatal plasticity and behavior, Current Opinion in Neurobiology, 21, 2, 322-327.
5. Yang, Chih-Hao; Huang, Chiung-Chun; Hsu, Kuei-Sen, (2012), A Critical Role for Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type 5 in Determining Individual Susceptibility to Develop Stress-Related Cognitive and Morphological Changes, Journal of Neuroscience, 32, 22, 7550-7562.
6. Cho, In Ha; Lee, Min Jung; Kim, Dae Hwan; Bora Kim, Jeomil Bae, Kyu Yeong Choi, Seon-Myung Kim, Yun Hyun Huh, Kum Ho Lee, Chong-Hyun Kim, Woo Keun Song, (2013), SPIN90 dephosphorylation is required for cofilin-mediated actin depolymerization in NMDA-stimulated hippocampal neurons, Cellular and Molecular Life Sciences, 70, 22, 4369-4383,.
7. Cerovic, Milica, d'Isa, Raffaele, Tonini, Raffaella, R Brambilla, (2013), Molecular and cellular mechanisms of dopamine-mediated behavioral plasticity in the striatum, Neurobiology of Learning and Memory, 105, SI, 63-80.
8. Sun, Wei-Lun; Zelek-Molik, Agnieszka; McGinty, Jacqueline F., (2013), Short and long access to cocaine self-administration activates tyrosine phosphatase STEP and attenuates GluN expression but differentially regulates GluA expression in the prefrontal cortex, Psychopharmacology, 229, 4, 603-613.

9. Herrold, A.A., Persons, A.L., Napier, T.C., (2013), Cellular distribution of AMPA receptor subunits and mGlu5 following acute and repeated administration of morphine or methamphetamine, *Journal of Neurochemistry*, 126(4), 503-517, <http://goo.gl/rLA940>
10. Sánchez Tejada G, (2014), Contribución de la regulación del receptor de neurotrofinas TrkB a la muerte neuronal en isquemia cerebral, PhD Thesis, Instituto de Investigaciones Biomedicas: Alberto Sols: Madrid, Spain., <http://hdl.handle.net/10261/126089>
11. Jourdi, Hussam, Biomarkers for Differential Calpain Activation in Healthy and Diseased Brains: a Systematic Review, Eds.: Wang, KKW; Zhang, Z; Kobeissy, FH, (2015), Biomarkers of Brain Injury and Neurological Disorders, 154-218, CRC Press, Taylor and Francis Group, USA.
12. Donald Liu, Bernadette O Fernandez, Alistair Hamilton, Ninian N Lang, Julie M C Gallagher, David E Newby, Martin Feelisch, Richard B Weller, (2014), UVA Irradiation of Human Skin Vasodilates Arterial Vasculature and Lowers Blood Pressure Independently of Nitric Oxide Synthase, *Journal of Investigative Dermatology* accepted article preview, doi: 10.1038/ jid.2014.27.
13. O'Connor E, (2015), Investigations into the role of the metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in incentive learning and some behavioural and neurobiological effects of cocaine, 2011 - PhD Thesis, University of Essex, UK, <http://sro.sussex.ac.uk/6981/>
14. Hendriks W.J.A.J., Böhmer FD. (2016) Non-transmembrane PTPs in Cancer. In: Neel B., Tonks N. (Eds) Protein Tyrosine Phosphatases in Cancer. Springer, New York, NY.
15. Jedynak Jakub, Hearing Matthew, Ingebretson Anna, Stephanie R Ebner, Matthew Kelly, Rachel A Fischer, Saïd Kourrich, Mark J Thomas. (2016), Cocaine and Amphetamine Induce Overlapping but Distinct Patterns of AMPAR Plasticity in Nucleus Accumbens Medium Spiny Neurons, *Neuropsychopharmacology*, 41, 2, 464-476.
16. Yoon-Jung Kim, Young Kang, Hye-Yeon Park, Jae-Ran Lee, Dae-Yeul Yu, Takuya Murata, Yoichi Gondo, Jung Hwan Hwang, Yong-Hoon Kim, Chul-Ho Lee, Myungchull Rhee, Pyung-Lim Han, Bong-Hyun Chung, Hyun-Jun Lee, Kyoung-Shim Kim, (2016), STEP signaling pathway mediates psychomotor stimulation and morphine withdrawal symptoms, but not for reward, analgesia and tolerance, *Experimental & Molecular Medicine*, 48,e212.
17. Jianxun Xia, Allison M Meyers, Jeff A Beeler, (2017), Chronic Nicotine Alters Corticostriatal Plasticity in the Striatopallidal Pathway Mediated By NR2B-Containing Silent Synapses, *Neuropsychopharmacology*, 42, 2314–2324, doi:10.1038/npp.2017.87

Moura PJ, Venkitaramani DV, Tashev R, Lombroso PJ, Xavier GF. (2011) Transport of animals between rooms: a little-noted aspect of laboratory procedure that may interfere with memory. Behavioural Processes, 88 (1), 12-19.

18. Hurst, Keriann; Litwak, Kenneth N., (2012), Accelerative Forces Associated with Routine Inhouse Transportation of Rodent Cages, Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 51, 5, 544-547.
19. Noack Julia, Murau Rita, Engelmann Mario, (2015), Consequences of temporary inhibition of the medial amygdala on social recognition memory performance in mice, Frontiers in Neuroscience, 9, Article N,152, APR 29.
20. Perna JC, M. Engelmann, (2015), Current Topics in Behavioral Neurosciences, Recognizing Others: Rodent's Social Memories, Eds.: Geyer, M.A., Ellenbroek, B.A., Marsden, C.A., Barnes, Th.R.E., Springer, ISSN: 1866-3370.

Ivanova M, Belcheva S, Belcheva I, Negrev N, Tashev R. Lateralized hippocampal effects of Vasoactive Intestinal Peptide on learning and memory in rats in a model of depression. Psychopharmacology, 221, 4 (2012), 561-574

21. Vacas Oliva E, Receptores y vías de señalización de VIP como dianas terapéuticas en el cáncer renal, PhD Thesis, (2012), Universidad de Alcalá. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Spain, <http://hdl.handle.net/10017/17081>
22. Borbely, Eva; Scheich, Balint; Helyes, Zsuzsanna, (2013), Neuropeptides in learning and memory, Neuropeptides, 47, 6, SI, 439-450. <http://goo.gl/15NJ9j>
23. Yu, Rongjie; Yang, Yanxu; Cui, Zekai; Lijun Zhenga, Zhixing Zenga, Huahua Zhang., (2014), Novel peptide VIP-TAT with higher affinity for PAC1 inhibited scopolamine induced amnesia, Peptides, 60, 41-50, <http://goo.gl/15NJ9j>
24. Stepanichev, Mikhail; Markov, Daniil; Pasikova, Natalia; et al., (2016) Behavior and the cholinergic parameters in olfactory bulbectomized female rodents: Difference between rats and mice, Behavioural Brain Research, 297, 5-14, <http://goo.gl/15NJ9j>
25. Yu R., Zheng, L. Cui, Y. Zhang, H. Ye, (2016) Doxycycline exerted neuroprotective activity by enhancing the activation of neuropeptide GPCR PAC1, Neuropharmacology, 103, pp. 1-15., <http://goo.gl/15NJ9j>
26. Mounira Banasr, Ashley Lepack, Corey Fee, Vanja Duric, Jaime Maldonado-Aviles, Ralph DiLeone, Etienne Sibille, Ronald S. Duman, Gerard Sanacora, (2017), Characterization of GABAergic Marker Expression in the Chronic Unpredictable Stress Model of Depression, Chronic Stress, 1, 1-13, doi: 10.1177/2470547017720459.

Tashev R., M. Stefanova. Hippocampal asymmetry in angiotensin II modulatory effects on learning and memory in rats. *Acta Neurobiol Exp* 2015; 75(1), 48-59.

27. Linares, A., Couling, L.E., Carrera, E.J., Speth, R.C., (2016), Receptor Autoradiography Protocol for the Localized Visualization of Angiotensin II Receptors. *J. Vis. Exp.* (112), e53866, doi:10.3791/53866.
28. Li Ting, SU Tao, HE Ying-Ge, HE Rong-Qiao, (2016), Chronic dehydrated Dysmetabolism of Formaldehyde in Mouse Brain and Decline of Learning in The Shuttle Box, *Prog. Biochem. Biophys.*, 43(4): 429-438, doi: 10.16476/j.pibb.2016.0104
29. Deb, D., V. Nayak, L. Bairy Kurady, M.S. Rao, (2016), Ameliorative Effects of Angiotensin Receptor Blockers Against Scopolamine-Induced Memory Impairment In Rats, *Asian J Pharm Clin Res*, 9, (2), 335-341.
30. Prieto I, Segarra AB, Martinez-Canamero M, De Gasparo M, Zorad S, Ramirez-Sanchez M, (2017), Bidirectional asymmetry in the neurovisceral communication for the cardiovascular control: New insights, *Endocrine Regulations*, Vol. 51, No. 3, 157–167.
31. Sakaguchi Yukitoshi, Yoshio Sakurai, (2017), Left–right functional asymmetry of ventral hippocampus depends on aversiveness of situations, *Behavioural Brain Research*, 325, A, 25-33.