



**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ**

**„СВ. КЛ. ОХРИДСКИ“**

**Биологически факултет,  
Катедра Зоология и Антропология**

**Елица Тодорова Денчева,**

***Роля на азотния оксид като регулатор и моду-  
латор на ацетилхолинестеразата и бутирилхоли-  
нестеразата в ЦНС при различни животни***

## **АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертация за придобиване на образователна и научна  
степен „доктор“**

**Научен ръководител  
Доц. д-р Радой И. Иванов**

**София  
2018 г.**

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛ. ОХРИДСКИ“**

**Биологически факултет,  
Катедра Зоология и Антропология**

**Елица Тодорова Денчева**

**Роля на азотния оксид като регулатор и модула-  
тор на ацетилхолинестеразата и бутирилхолинестера-  
зата в ЦНС при различни животни**

## **АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертация за придобиване на образователна и научна  
степен „доктор“**

**Професионално направление 4.3. Биологични науки (научна специ-  
алност Зоология - Зоология на безгръбначните животни)**

**Научен ръководител  
Доц. д-р Радой И. Иванов**

**София  
2018 г.**

Дисертационният труд съдържа 166 стр., онагледен е с 51 фигури, от които в раздел Резултати и обсъждане – 42 и 8 таблици. Цитирани са 154 литературни източника от които 150 на латиница и 4 на кирилица.

**Научно жури:**

Вътрешни членове:

Проф. д-р Христо Стефанов Гагов

Доц. д-р Радой Иванов Иванов

Резервен член:

Доц. д-р Мариела Чичова

Външни членове:

Проф. ДБН Игнат Борисов Минков

Проф. д-р Огнян Атанасов Димитров

Доц. д-р Тренка Аргирова

Резервен член:

**Рецензенти:**

.....

.....

Материалите свързани с дисертацията са публикувани в интернет страницата на Биологическия факултет. Те са също на разположение в писмена форма и като електронен вариант в канцеларията на Биологическия факултет - отдел докторанти и следдипломна квалификация, каб. № 235

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на ..... от .....ч. в Заседателната зала на Биологическия факултет към СУ „Св. Кл. Охридски”

## Съдържание

Използвани съкращения	5
Увод	6
Abstract	7
Основни теми в литературния обзор	7
Цели и задачи на дисертационния труд	8
Материал и методи	9
Резултати и обсъждане	10
Раздел I. I. Ензимно картиране (скрининг) на холинестеразите в различни тъкани, органи. Базови контроли	10
Раздел II. Биомониторингови критерии за оценка на влиянието на антихолинестеразни агенти върху холинестеразите при някои животни	14
Раздел III. Влияние на L-Аргинин – донор на NO, като регулатор и модулатор на активността на холинестеразите. Роля на NO като водещ фактор на тези влияния. Изследване ефектите на L-NMMA – инхибитор на активността на NOS. Влияние на L-Аргинин върху пречистени ензимни препарати, лишени от NOS	16
III. 1. Влияние на L-Аргинин като стимулатор на активността на холинестеразите и като протектор и антидот при натравяне с антихолинестеразни агенти.	17
III. 2. Азотният оксид като фактор и механизъм на контрол на активността на холинестеразите под въздействието на донори на NO	22
III. 3. Ефективност на L-Аргинин и Na-Нитропрусид върху активността на АХЕ в препарати с дефицит на NO синтетаза (NOS)	27
Раздел IV. Влияние на Na-Нитропрусид (Na-НП) върху активността на холинестеразите във фракции от различни видове животни	28
Раздел V. Влияние на К-ферицианид, К-фероцианид и KCN върху активността на АХЕ във фракции от <i>Vesputa germanica</i> и <i>Apis mellifera</i>	32
Раздел VI. Роля на L-Аргинин като реактиватор на холинестеразата, инхибирана от цианид-съдържащи съединения. Роля на азотния оксид	34
Изводи	36
Приноси	37
Публикации по темата на дисертационния труд	38
Участия в международни и национални научни форуми по темата на докторантския проект	39
Благодарности	40

## Използвани съкращения

AChE (АХЕ)	-- ацетилхолинестераза
BChE (БХЕ)	– бутирилхолинестераза
DL <sub>50</sub>	–летална доза
eNOS	– ендотелна азот-оксид синтетаза
GC	– гуанилат циклаза
iNOS	– индуцирана азот-оксид синтетаза
KCN	– калиев цианид
L-NMMA	– NG-Methyl-L-Arginine-acetate
МАРК	– митоген активирана протеинкиназа
Na-НП (Na-NP, SNP)	– натриев нитропрусид
nNOS	– невронална азот-оксид синтетаза
NO	– азотен оксид
NOS	– азот-оксид синтетаза
NOS	– азотоксид синтаза (синтетаза)
PDE5	– фосфодиестераза
АТХ	– ацетилтиохолин
АТХJ	– ацетилтиохолинйодид
АХ рецептори	– ацетилхолинови рецептори
АХЕ (AChE)	– ацетилхолинестераза
БОВ	– бойно отровни вещества
БТХJ	– бутирилтиохолинйодид
БХЕ (BChE)	– бутирилхолинестераза
ДТНБ	– 5,5'-дитио-бис-2-нитробензоена киселина
ЕДРФ	– ендотелен дериватен релаксиращ фактор
ЕДТА (EDTA)	– етилендиамид тетраацетат
ЕК	– ензимна класификация
Е-та	– хранителни добавки
ИЕК (IEC, ATC) threshold concentracion)	–инициална прагова концентрация (Activation threshold)
КЗИ <sub>50</sub> (CDI <sub>50</sub> )	– концентрационно зависимо инхибиране
К-ФЦ (KFeCN)	– калиев ферицианид
МЕИ	– максимално зависимо инхибиране
МНБ	– 2-нитро-5-меркаптобензоат)
МХР	– мускаринови холинорецептори
Нитропрусид	– (Na-Нитропрусид; (Na[Fe(CN) <sub>5</sub> NO]); Na-НП; Na-NP;
НС	– нервна система
НХР	– никотинови холинорецептори
СДХ	– сукцинатдехидрогеназа
СХ (SCh)	– сукцинилхолин
ХЕ	– холинестераза
цАМФ	– цикличен аденозинмонофосфат
цГМФ	– цикличен гуанозинмонофосфат
ЦНС	– централна нервна система

## УВОД

Холинергичната система е една от основните невромедиаторни системи, която контролира физиологичните процеси, поведението, адаптацията, здравето и живота на организмите и човека. Холинестеразите са важни компоненти на тази система.

Докторантският проект е фокусиран върху ролята на азотния оксид (NO) върху активността на холинестеразите при някои безгръбначни и гръбначни животни. За целта в експерименталната дейност бяха използвани два източника (донора) на NO – ендегенен източник L- Аргинин и екзогенен източник Na-Нитропрусид (Na-НП). Молекулната структура на тези донори освен NO съдържа различни компоненти, някои от които са силно токсични (например ферицианидни комплекси). Това наложи изследванията да се обогатят с данни за ефективността на някои цианидни радикали върху активността на тези ензими.

За ефективността на NO се съди по няколко показателя:

-равнище на ензимна активност при добавяне на L- Аргинин и в комбиниране с неселективен инхибитор на различните видове NOS (L-NMMA), което води до дефицит на NO;

-ефективност на посочените донори на NO върху холинестеразите във фракциите лишени от NOS (например пречистен и лиофилизиран препарат на АХЕ от електрическа змиорка или електрическо торпедо);

-анализ на ефективност на Na-НП върху АХЕ в присъствие на L-NMMA.

В работата е направена частично биомониторингова оценка на интоксикацията на организмите под въздействие на антихолинестеразни агенти. Въведени са някои нови критерии за оценка на невротоксикологичния статус при животните.

Обекти на изследване са два вида бозайници – бял лабораторен плъх (*Rattus rattus*) и опитомен заек (*Oryctolagus cuniculus*) и два вида безгръбначни – Европейска медоносна пчела (*Apis mellifera*) и Германска жълта оса (*Vespa germanica*). В бъдеще се предвижда разширяване на спектъра на проучваните видове.

В няколко раздела експериментално се проследява влиянието на Na-Нитропрусид върху активността на холинестеразите..Установено беше, че този препарат в норма има двуфазно действие – умерено активиране при ниски концентрации, дължащо се най-вероятно на NO и прогресивно инхибиране, паралелно с повишаване на концентрацията на препарата, дължащо се най-вероятно на ферицианидните радикали. Сложната молекулна структура на Na-Нитропрусид наложи необходимостта от изследвания на ефективността на К-ферицианид, К- ферицианид и KCN с цел разкриване на някои от механизмите на влияния на цианидите.

Изследването се провежда с идеята за разработване на технология за предпазване от антихолинестеразни токсични продукти, за био мониторингов контрол на средата, за детоксикация на организмите, за неотложни реанимационни процедури и др.

Като следствие от проведените изследвания и данни от литературата се предполага че L- Аргинин и други донори на NO могат да се използват като реактиватори на потиснатата холинестераза и като антидоти при някои специфични интоксикации.

**Ключови думи:** холинестерази; L-Аргинин, Na-Нитропрусид, антидоти, невротоксикология, биомониторинг, ферицианиди, антихолинестеразни в-ва.

# The role of nitric oxide as a regulator and modulator of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the CNS in different animals

Elitza T. Dencheva

## Abstract

The present study is devoted to some mechanisms for controlling the activity of cholinesterases (ChE) in various invertebrate and vertebrate species in normal and ecotoxic environment.

Cholinesterases, respectively, acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) occupy an important place in the cholinergic system. They control synaptic conductivity, processing, and storing information, serve as prognostic markers for major diseases and the danger of poisoning, effectively hydrolyze choline esters, very toxic products, drugs and the like.

In the dissertation, a lot of data on the role of L-Arginine as a nitric oxide (NO) donor as a stimulant of the activity of both types of ChE is applied. Part of the work also analyzed the influence of Na-Nitroprusside as a source of NO and ferricyanide radicals on ACh activity.

Objects of study are two species of mammals – white laboratory rat (*Rattus rattus*) and domesticated rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and two invertebrate species – European honey bee (*Apis mellifera*) and German yellow wasp (*Vespa germanica*).

It was found that L-Arginine in conc. 1.0 to 50 mM significantly activating AChE and BChE, as this effect is stronger on BChE.

Another important result in the dissertation is the partial or complete reactivation of inhibited AChE and BChE suppressed by anticholinesterases as well as by ferricyanide radicals. Therefore, we assume that L-Arginine can be a reliable antidote for poisoning with anticholinesterase agents, choline esters, in cases of overdose of narcotic drugs and medicinal product. This is also valid for escape bee families from unauthorized insecticide use.

By using a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor (L-NMMA), the stimulation efficiency of L-Arginine is not manifested. The reason for this is a lack of NO. Under these circumstances, reactivation of the suppressive activity of cholinesterases, both from anticholinesterase agents and ferricyanides, is not possible.

The influence of Na-NP on the activity of cholinesterases in various species and tissues is biphasic: moderate activation at low concentrations, due most likely to NO and progressive inhibition in parallel with increasing the drug concentration due most likely to ferricyanide radicals.

The influence of other analogous preparations of Na-NP such as N-ferricyanide and N-ferrocyanide, where the difference consisted of the valence of the iron atom, was investigated. Dose-dependent inhibition of ChE activity is valid only for K-ferricyanide (high level of dissociation and well-expressed toxicity) and no effect (N-ferrocyanide) - a non-toxic product.

As a consequence of our studies and literary sources, L-arginine and other donors of NO are suggested to be used as reactivators on suppressed cholinesterases and as antidotes for some specific intoxications.

## **Основни теми в литературния обзор**

**Холинестерази** – ацетилхолинестераза (разпространение; клетъчна и субклетъчна локализация; молекулярна структура; механизми на регулация на ензимната активност);

**Холинергична медиаторна система** – синтез и метаболизъм на ацетилхолина; основни компоненти.

**Холинергични невромедиаторни рецептори** – никотинови и мускаринови.

**Антихолинестеразни агенти** – пестициди, инсектициди, др.

**Азотен оксид** – ендогенни и екзогенни източници на NO; L-аргинин и Na-Нитропрусид

**Азот-оксид синтетаза**

**Биологично значение на бутирилхолинестеразата**

## **Цели и задачи на дисертационния труд**

### **Основни цели:**

Основна цел на този дисертационен труд е провеждане на комплексни изследвания на влиянието и ролята на NO от два източника на този радикал (L-Аргинин и Na-Нитропрусид) върху активността на холинестеразите в различни тъкани и видове животни (безгръбначни и гръбначни). Основно направление в експерименталните проучвания е разкриване на механизми от ефективността на тези реагенти. Проучено е влиянието на L-NMMA – широкоспектърен инхибитор на активността на NOS и синтезата на NO. Специално внимание е отделено на Na-Нитропрусид, който съдържа феррицианидни компоненти и при по-високи концентрации е токсичен.

### **Основни изследователски задачи:**

1. *Ензимен скрининг* (сканиране) на холинестеразите в различни тъкани и видове животни. Определяне на някои кинетични параметри на съответните холинестерази при различни видове животни.

2. Експериментално документиране на ролята на *холинестеразите като биомониторингови маркери* за оценка ефективността на въздействие на различни антихолинестеразни вещества и състоянието на организмите.

3. Влияние на L-*Аргинин* – донор на NO като регулатор и реактиватор на активността на холинестеразите, протектор и антидот при интоксикация на ензимите от антихолинестеразни и други агенти.

4. Роля на NO като фактор на тази ефективност. Изследване ролята на NG-Methyl-L-Arginine acetate (L-NMMA) като инхибитор на активността на NOS.

5. Влияние на L-*Аргинин* върху пречистени ензимни препарати, лишени от NOS

6. Влияние на Na-Нитропрусид (Na-НП) – източник и донор на NO върху активността на холинестеразите във фракции от различни видове животни.



Ефекти на L-NMMA върху активността на холинестеразите в присъствие на Na-HP.

7. Влияние на цианидови производни, близки по молекулна организация с Na-HP – *K-ферицианид*, *K-фероцианид* и *KCN* върху активността на холинестеразите.

8. Роля на *L-Аргинин* и *NO* като реактиватори на холинестеразата инхибирана от цианид-съдържащи съединения.

## Материал и методи

**Основните теми в раздел Материал и методи на Дисертацията са:**

1. **Приготвене на ензимни фракции** от различни тъкани и видове животни (изолиране, почистване, хомогенизиране в специални разтвори за изолиране, диференциално центрофугиране, определяне на белтъчното съдържание, съхраняване (ензимните проби за по-кратък период от време се съхраняват в пеницилинови шишенца или в ампули за еднократно ползване или в течен азот). Използваните разтвори, процедури, принципи на съответния метод са подробно описани в дисертацията, в наша статия (Иванов, Денчева, 2016), както и в оригиналните литературни източници. В работата бяха изолирани и се работеше със фракции от преден и заден мозък на бял лабораторен плъх (*R. rattus*), фракции от мозъчна кора, мозъчен ствол и малък мозък от мозък на домашен заек (*O. cuniculus*) и Европейска медоносна пчела (*Apis mellifera*) и Европейска жълта оса (*Vespula germanica*).

2. **Определяне на активността на АХЕ и БХЕ** (разреждане на ензимния белтък, определяне на базовата ензимна активност като универсални контроли, формиране на контролна банка от съответните ензими, др.). Ензимната активност се определя съгласно класическия метод на Elman et al. (1961). Използвани субстрати: ацетилтиохолин йодид, бутирилтиохолин йодид. Съдържанието на тиохолин като критерий за активността се измерва при  $\lambda=420$  nm. Стандартна крива за изчисляване на коефициенти за преизчисляване беше построена със съответни концентрации L-цистеин; Резултатите от изследванията са представени в ензимна активност (А), в относителни единици или в % спрямо съответната контрола

3. **Определяне съдържанието на белтък** в съответните проби и фракции се определяше съгласно класическия микрометод на Lowry et al. (1951). Стандартна крива за преизчисляване се изготвяше с лиофилизиран говежди албумин.

4. **Статистическата обработка на данните** и равнищата на достоверните различия се изчисляваха и определяха съгласно t-теста на Стюdent.

5. **Работа с животни.** Животни за изследвания се ползваха от Вивариума към Биологическия факултет, УЕБ-Драгалевци и природни източници. В работата бяха спазвани етичните норми и законодателство в Европа и България.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

## **Раздел I. Ензимно картиране (скрининг) на холинестеразите в различни тъкани, органи и различни видове животни и различни видове животни. Базови контроли**

**Въведение.** Изследователската дейност в своя алгоритъм изисква няколко важни стъпки: идея, сериозен литературен преглед, значимост на неизвестното и прогноза за решение, проект, финансов план, работен календар, постоянен анализ на постигнатото, при проблеми- промяна, краен полезен резултат или ново начало.

В този смисъл нашите първи стъпки бяха да се намерят базовите контроли за сравнение, които са опорни точки за сравнителни анализи. Когато се работи с ензими е необходимо още да се познава кинетиката на ензима и т.н. По-долу са представени конкретни експериментални данни

В наши предишни изследвания беше установено, че L-Аргинин повлиява специфично активността на различни ензимни системи (сукцинат дехидрогеназа, Na,K- АТФаза, холинестераза).

В литературата няма данни за влиянието на тази аминокиселина или на азотен оксид (NO) върху активността на холинестеразите. Тези ензими са ключови звена в една от най-важните невромедиаторни системи. Поради това ние се ориентирахме към тази група ензими – холинестеразите, които са представени от две главни групи: ацетилхолинестерази (АХЕ; АСhЕ) (ЕК 3.1.1.7.) и бутирилхолинестеразата (БХЕ; ВСhЕ) (ЕК 3.1.1.8.). Тези две групи в организмите са представени с множество изоензимни форми.

В теоретичен аспект е важен проблемът за еволюцията на холинестеразите например от най-примитивните животни до човека, или при безгръбначните и гръбначните животни. Друг проблем е свързан с процесът на коеволюцията. Най-прост пример за това е колорадския бръмбар, който доминира с адаптация към твърде токсична храна – соланоиди при сем. Картофиви, които са антихолинестерази. Поради кръстосана резистентност тези и други видове са много трудни за популационен контрол. Друг проблем е „спонсорът” – този обект, който е сравнително лесен за работа, но разкрива общовалидните закономерности. Последно, и може би най-важно, дали изследваме „примитивни” организми и модели или горили, основната мисъл е как това служи на хората. Тази философия пронизва и нашата работа.

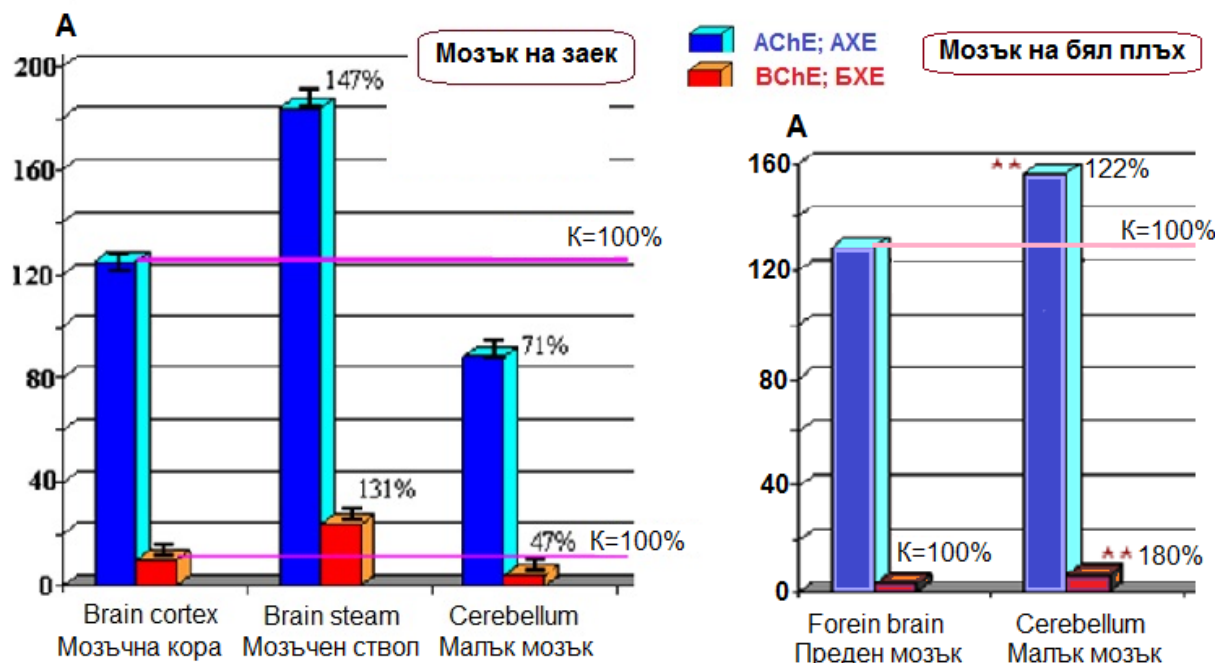
В този раздел са представени данни за базовата активност на активността на холинестеразите в различни мозъчни дялове при лабораторни плъхове и зайци, както и във фракции от медоносна пчела (*A. mellifera*) и Европейска оса (*V. germanica*). В нашата „банка” имаме материали също от колорадски бръмбар – ларви и имаго, от полски щурец и др. Последните най-вероятно ще са обект на бъдещи проекти.

Идеята за това изследване беше да се покаже наличието на тъканна и видова специфичност относно активността на холинестеразите в зависимост от наличието в съответната топографска област или в тялото на хоринергични, холинрецептивни, холинергични и рецептивни неврони, холинергични ефектори и др. Така например скелетните мускули при гръбначни животни са типични холинрецептивни, невроните в мозъчна кора на бозайници са предимно холинрецеп-

тивни. Отделено е и специално място на БХЕ, която е характерна за всички тъкани, включително и в ЦНС, но дълги години беше неглежирана от изследователите.

В работата се анализира различната роля на двата типа холинестерази – АХЕ и БХЕ. БХЕ се оценява като защитник на цялото вътрешно стопанство от холинови естери, наркотични агенти, отрови и др. и пази ЦНС от вредоносни химични агенти.

Данните от фиг. 1 насочват вниманието към съществените различия в базовата (контролна) активност на АХЕ и БХЕ в различни мозъчни зони при плъх и заек. За равнище за сравнения в мозък на заек например е взета мозъчната кора, а в мозък на плъх – предния мозък.



**Фиг. 1. Активност на АХЕ и БХЕ във различни фракции от мозък на заек и плъх (мембранно-митохондриална фракция)**

В автореферата в таблична форма ще бъдат посочени и някои числови стойности за базовата активност ХЕ и ефективността на използваните реагенти и критериите на достоверност. В дисертационния труд са подробно илюстрирани.

Анализът на данните и зависимостите от тази фигура показват, че най-висока е активността на АХЕ (респективно и на БХЕ) в мозъчния ствол на заек (с 47% по-висока спрямо мозъчната кора за АХЕ и съответно с 31% за БХЕ). В тази зона (мозъчен ствол са съсредоточени десетки ядра, системи, проекции и др. с холинергична природа. В мозък на бял плъх активността на АХЕ е с 22% по-висока от тази на предния мозък. При тези обекти активността на БХЕ в малкия мозък е с около 80% по-висока от тази в предния мозък.

Друг важен момент от изследването е значителното присъствие на БХЕ (сравнено с активностите на АХЕ) в мозъчната тъкан. В литературния обзор и по-долу в обсъждане ролята на този ензим са посочени много данни за протекторната роля на БХЕ срещу голям брой токсични продукти – холинови естери, наркотици, лекарствени средства (например диазепам или аспирин) както в ЦНС, така и във всички вътрешни органи.

Тези данни, посочени по-горе, както и резултатите от базовата активност на АХЕ при медоносна пчела и жълта оса (активността на АХЕ при пчелите е два пъти по-висока от тази при осите) е основание за формулиране на няколко логични извода, които са синтетично обединени (вж. по-долу).

*Разработена е методология за ензимно картиране на определени ензимни системи и за тяхната оценка в норма и патология, и в резултат на влияние на средата.*

*Равнищата на активност на ХЕ при безгръбначни и гръбначни и тъканно и видово специфична и зависи от топологичната локализация на различни групи холинергични неврони в ЦНС, НС и холинорецептивните ефектори и тъкани.*

*БХЕ изпълнява функции, различни от тези на АХЕ – защита на НС от различни токсични химични продукти.*

*Допълнена е биомониторингова методологична система за охарактеризиране състоянието на холинергичната система и организма като цяло в норма и патология.*

По-долу са приведени други данни, които са в потвърждение на тези изводи.

Преди това предлагаме таблични данни за реалните стойности на активността на холинестеразите и някои сравнителни данни.

Таблица 1.

Равнища на активността на АХЕ и БХЕ при различни животни и мозъчни зони. Съотношения между АХЕ и БХЕ в тези фракции

(мозък на заек)			(мозък на бял плъх)		
Мозъчна кора	Мозъчен ствол	Малък мозък	←→	Преден мозък	Малък мозък
124,88	183,77	88,13		128,30	156,09 А; АChE
100%	147%	71%		100%	122% % (K=100%)
10,11	23,43	4,51		3,67	6,60 А; BChE
100%	131%	47%		100%	180% % (K=100%)
Условна контрола (K)				Условна контрола (K)	
Активност на БХЕ (в % спрямо съответната активност на АХЕ=100%)				Активност на БХЕ (в % спрямо съответната активност на АХЕ=100%)	
8,10%	12,70%	5,12%		2,86%	4,22%

А – ензимна активност ( $\mu\text{g}$  хидролизиран АХ/ $\text{mg}$  белтък/ $\text{min}$ ); % - процент спрямо съответните контроли; n= 8-12, вж. също фиг.1.

От фиг. 1 и табл.1. е видно наличието на БХЕ в мозъка на бозайници, например около 5-10% спрямо активността на АХЕ в същата зона. Този ензим предпазва ЦНС от вредни въздействия. Има литературни данни, че БХЕ се среща дори в синаптичната област и най-вече в невроглиалните клетки. Този ензим хидролизира също около 95% редица наркотици като хероин и кокаин. В клиниките вече е налична специфична терапия с обогатена БХЕ. Наши изследвания показват, че активността на този ензим може да бъде повишена например с около 8 пъти от L-Аргинин (респективно с NO).

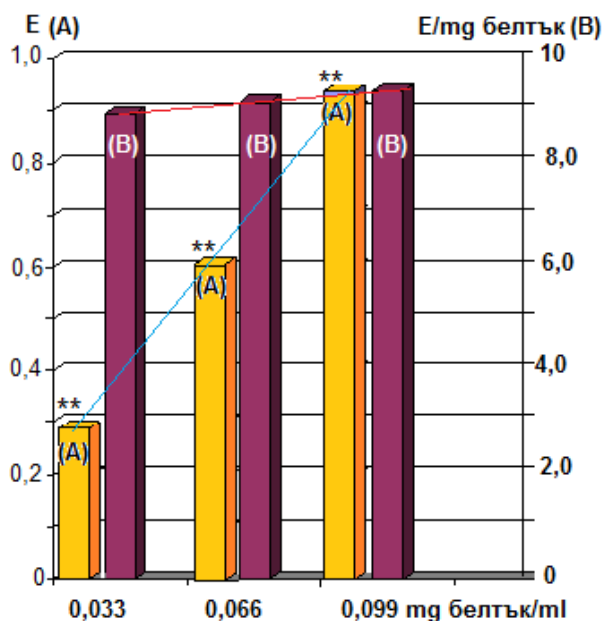
Тези данни са показани по-долу. На тази тема беше посветено едно наше съобщение на Международния биомедицински конгрес – София през 2016 г.

Научно-приложната значимост на това е, че ако притежаваме естествен продукт или субстанции с ниска токсичност, които повишават значително активността на БХЕ (при гръбначни) терапията при натравяния с холинови естери, наркотици, някои лекарства, в условия на БХЕ-дефицит и др. ще бъде бърза и

ефективна. По-долу са показани данни за почти осемкратно повишаване на активността на БХЕ в мозъчна тъкан. Интересно е такава ефективност да се установи и в кръвната плазма или серум в кръвта на човек.

Ясно е, че основен активен компонент на L-Аргинин (респективно други донори на NO – Na-НП, различни нитрити и нитрати, нитроглицерин, амитал нитрат и др. е NO, който се отделя в някои случаи чрез системата на азот оксид синтетазата (от английски наричана от някои синтаза) – NOS.

На фиг. 2. е показана зависимостта между ензимната активност и белтъчното съдържание в пробите. Тук данните са за активността на АХЕ при *A. mellifera*. В предварителни проучвания беше установено, че най-подходящи концентрации на белтъка в пробите е от порядъка на 0,035-0,045 mg/ml. Това е важно, понеже при различните видове ензимното белтъчно съдържание е различно в общата белтъчна фракция.



**Фиг. 2. Зависимости между активността на АХЕ във фракции от *A. mellifera* в зависимост от белтъчното съдържание в пробите**

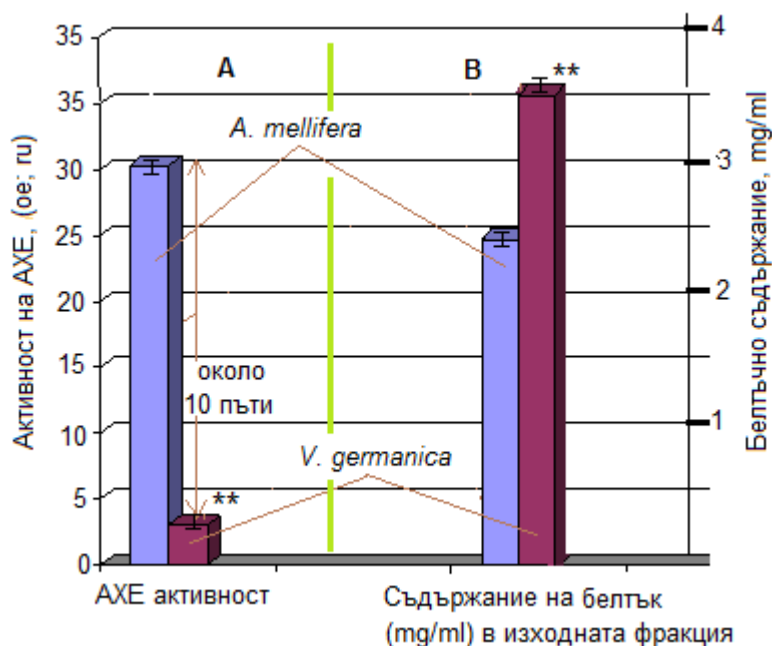
Е – ензимна активност (о.е.) при различно съдържание на белтък; В – ензимна активност спрямо белтъчното съдържание в пробите (Е/мг белтък/ml). Конкретните данни ( $M \pm m$ ) са посочени в съпътстваща таблица.  $**p \leq 0,001$

Резултатите от това изследване сочат, че е налице пропорционалност между белтъчно съдържание и ензимна активност (реакции от първи порядък).

Проектът изискваше също да се направи сравнителен анализ между белтъчното съдържание и ензимната активност при *A. mellifera* и *V. germanica*.

Данни за това са показани на фиг. 3.

Данните за белтъчното съдържание (*mg белтък/mg ж. тегло*) при двата вида показват по-високо съдържание на белтък (с около 45%) в фракциите от *V. germanica*, докато ензимната активност на АХЕ при *A. mellifera* е многократно по-висока от тази при Европейска оса. Това логично означава малко повече белтъчна маса в тялото на Европейска оса, но значително по-малко белтъци с АХЕ активност (нервна система и холинрецептивни неврони или ефектори) в сравнение с медоносната пчела. В тялото на *A. Mellifera* има около 1 млн. неврона и многократно повече невроглиални клетки



Фиг. 3. Сравнителен преглед на активността на АХЕ във фракции от *A. mellifera* и *V. germanica* (Е/mg белтък/min/ml) (А) и изходно съдържание на белтък в съответните фракции (mg/ml) (В)

Тези примерни данни дори и за един вид представляват неговите „паспортни“ чипове, които го охарактеризират в една или друга област.

## Раздел II. Биомониторингови критерии за оценка на влиянието на антихолинестеразни агенти върху холинестеразите при някои животни

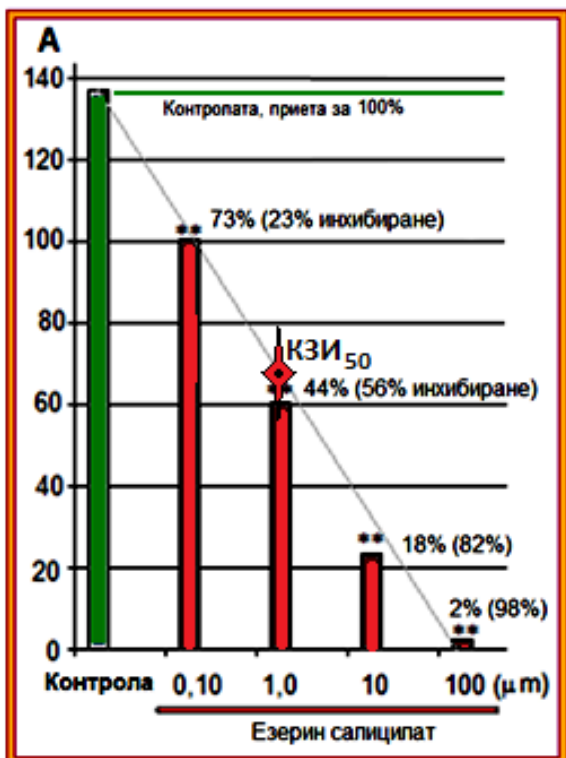
През 40-50 години на миналия век бяха синтезирани две групи пестициди, които намериха място в селскостопанската практика като мощни инсектициди с инхибиращ ефект върху холинестеразите (органофосфати и карбамати). По-късно бяха създадени други поколения пестициди, инсектициди, бойно отровни вещества. Масовото приложение на тези продукти в селскостопанската практика доведоха и до много неблагоприятни странични ефекти, безконтролно унищожаване на организми, замърсяване на околната среда, унищожаване на хиляди и милиони пчелни семейства и много други, включително натравяне на хора, използвани за престъпна дейност и т.н.

Като частен случай и в интерес на докторанския проект беше направен опит за допълване на методологичните подходи за биомониторинг на състоянието на организмите в норма и в условия на еко токсична среда.

Холинестеразите са чудесен биомониторингов обект при натравяне с антихолинестеразни вещества или други подобни.

На тази тема в дисертацията са отделени поне десетина страници.

Анализите на първо място започват с влиянието на характерен представител на карбаматните производни – специфичен антихолинестеразен агент (фиг. 4).



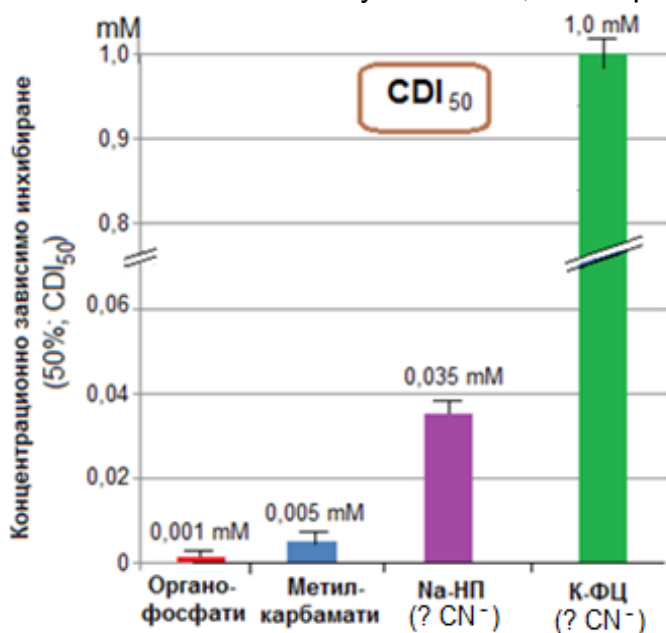
Фиг. 4. Влияние на Езерин салицилат (0,1-100 µM) върху активността на АХЕ във фракции от мозъчна кора на мозък от заек (графиката вляво)

А – активност на ензима в µg хидролизиран АХ/мг белтък/мин; КЗИ<sub>50</sub> – концентрационно зависимо инхибиране (от порядъка на 1,0 µM; n=10; ±m=3,50-5,50; \*\*p< 0,001

В случая като биомониторингов обект е холинестераза от мозъчна кора на заек. Характерът на влиянието на Езерин салицилат е концентрационно зависимо инхибиране (КЗИ<sub>50</sub>; CDI<sub>50</sub>). Чрез този критерий (50% инхибиране) се установява чувствителността (афинитет) на ензима към съответния реагент.

Числените стойности отразяват равнището на ефективност, т.е. колкото стойностите са по-ниски, толкова ефективността (например токсичността) е по-висока. В случая КЗИ<sub>50</sub>; за езерина е 1,0 µM. За някои други реагенти тези стойности са 0,001 µM, за други 1,0 или 10 mM.

Друг пример за биомониторингови критерии са данните за КЗИ<sub>50</sub> при обект фракции от *V. germanica* по отношение на паратион езерин, Na-НП и К-Ферицианид (фиг. 5).



Фиг. 5. Коефициенти на концентрационно зависимо инхибиране на активността на АХЕ (CDI<sub>50</sub>) като критерий за чувствителността на ацетилхолинестеразата във фракции от *Vespa germanica* под въздействието на различни инхибитори (паратион, езерин салицилат, Na-Нитропрусид и К-Ферицианид (най-вероятно CN-за Na-НП и К-ФЦ)

Данните категорично сочат равнището на токсичност на различни агенти с антихолинестеразно действие – на първо място паратион (органофосфат) и на последно – К-ферицианид (фери-нитро-цианидно съединение). Ако преизчислим коефициентите за К-ферицианид

и Na-НП (1,0:0,035=28,5) е видно, въпреки химичното родство между тях, токсичността на Na-НП е около 30 пъти по-голяма от тази на К-ферицианид.

Друг показател (индикатор; индекс; коефициент е „Инициалната (прагова) ефективна концентрация” (ИЕК) – тази концентрация на съответния агент, при която се проявява начална минимална ефективност. Като пример за това представяме една наша таблица за ефективността на L-Аргинин като стимулатор на АХЕ в различни мозъчни зони при плъх.

Таблица . 2.

Влияние на L-Аргинин в различни концентрации върху активността на АХЕ в различни части на главен мозък на бял плъх – % спрямо контролата (С=100%)

L-Аргинин, mM	10	20	30	40	50
Преден мозък	11%	45%	63%	92%	130%
Прагова конц.	Около 1 mM	→	→	→	→
Заден мозък	0	0	8%	32%	48%
Прагова конц.			Около 25 mM	→	→

В таблицата има информация от две категории: равнища на стимулиране на ензимната активност на различните структури от L-Аргинин (10-50 mM) и праговата концентрация за различните мозъчни зони например около 1,0 mM за преден мозък и около 25 mM за малък мозък. Тези стойности отразяват афинитетната чувствителност на биологичния материал. Колкото числовите стойности на този индекс са по-малки, толкова чувствителността на реагента е по-висока. Следователно в случая, предният мозък на бял плъх е с по-голяма чувствителност към L-Аргинин в сравнение с малкия мозък.

Друг биомониторингов критерий е „максимална ефективност” (МЕ) при определени равни концентрации на реагента. Този индикатор може да бъде илюстриран например със следния резултат: „L-Аргинин (50 mM) стимулира активността на АХЕ и БХЕ във фракции от преден мозък на плъх съответно с 130% и 840%” или „Стимулацията ефект на L-Аргинин (50 mM) върху активността на АХЕ във фракции от *A. mellifera* *V. germanica* е съответно с 180% и 10%”. Фразите са взети от дисертационния труд.

Друг общоприет критерии за биомониторингова оценка е леталната доза, т.е. % смъртност на организмите при определено равнище на интоксикация – DL<sub>50</sub> (най-често използван), но се среща и във варианти DL<sub>25-100</sub>.

В нашата работа нямаме експериментални данни за този показател, но той може да бъде намерен в съответните справочници.

**Раздел III. Влияние на L-Аргинин – донор на NO, като регулатор и модулатор на активността на холинестеразите. Роля на NO като водещ фактор на тези влияния. Изследване ефектите на L-NMMA – инхибитор на активността на NOS. Влияние на L-Аргинин върху пречистени ензимни препарати, лишени от NOS**



Този раздел е ключов в докторанския проект. Според заглавието тук ще бъдат анализирани 3 важни проблема:

1. Равнища на стимулиране от *L-Аргинин* на активността на холинестеразите в различни тъкани, структури и видове животни с акцент към научно-приложна значимост, като реактиватор на потисната активност от специфични антихолинестеразни агенти и други фактори. Този проблем е свързан също със замърсяване на природната среда, която лесно става екотоксична (вода, въздух, земя, дрехи, напитки и т.н. Като краен резултат от изследванията стигнахме до убеждението, че дори един фактор може да доведе до спасение. *L-Аргинин* не е единствен. Регулаторните механизми върху един ензим или един физиологичен процес са десетки и стотици. Дори и лекарствените средства, колкото и груби да са те, са също регулаторни фактори.
2. В каква степен азотният оксид може да се счита като водещ фактор в реализацията на определени функции В нашия случай това са активността на холинестеразите. Азотният оксид беше открит преди повече от 20 години. Откривателите на този радикал и неговата роля при сърдечно съдови заболявания бяха наградени с Нобелова награда. Нашето предположение за активиращата ефективност на *L-Arginine* беше, че това е NO (или един от многобройните фактори. Първите изследвания показаха обаче, че сумарният резултат от влиянието на *L-Arginine* и Na-Нитропрусид са противоположни – активиране и инхибиране. По късно беше показано за липсата на противоречие (вж. раздел IV) – активирацията ефект на NO се припокрива от мощната инхибираща ефективност на цианидни продукти. Един от подходите за разкриване на ролята на NO е използване на *NG-Methyl-L-Arginine acetate (L-NMMA)* като инхибитор на активността на NOS. В раздел IV и V е показано, че секрецията на NO от някои донори на този радикал не зависи от NOS.
3. Друг методологичен подход чрез който се показва ролята на NO в управление на функциите на АХЕ е прилагане на *L-Arginine* и Na-Нитропрусид върху пречистен ензимен препарат от електрическа змиорка или електрическо торпедо. Тези препарати са лишени от NOS, респективно и от NO.

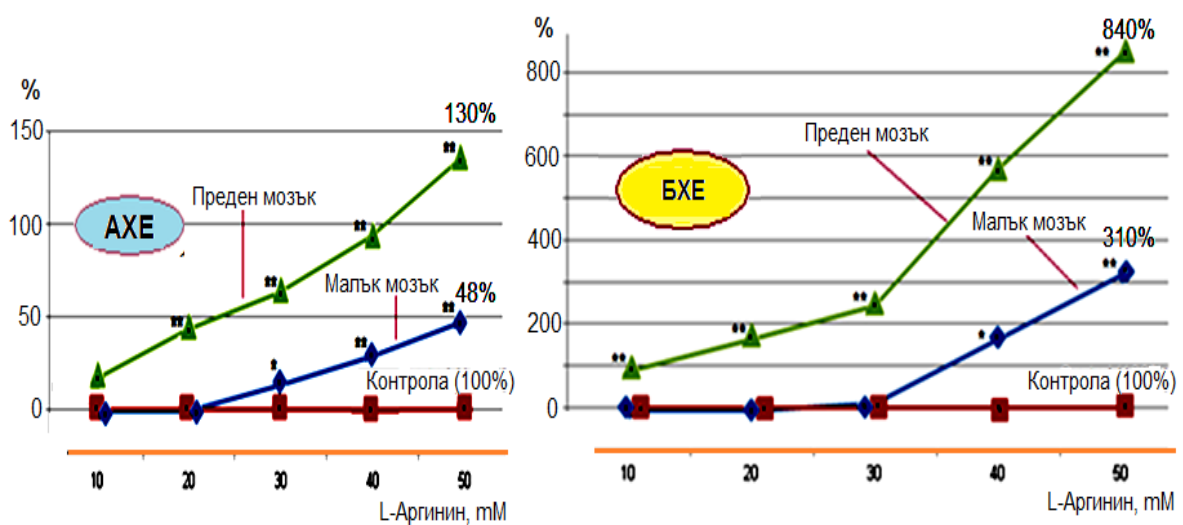
### **III. 1. Влияние на *L-Аргинин* като стимулатор на активността на холинестеразите и като протектор и антидот при натравяне с антихолинестеразни агенти.**

За пръв път е установено, че *L-Аргинин* в по-големи, но физиологично допустими концентрации (1,0-50 mM) стимулира значително активността на холинестеразите във фракции от гръбначни и безгръбначни животни. Тази ефективност е изключително полезна при натравяне на организмите с различни вещества със специфично действие към тази система (антихолинестеразни пестициди, инсектициди и други от този тип, например неоникотиноиди), с химични агенти (най-вече естери), които се разграждат от холинестеразите (например наркотици от групата на хероина, кокаина, дизайнерски наркотици, при предозиране на ле-

карствени препарати, например диазепам, Нитропрусид, дори аспирин и парацетамол и много други. Както е известно, БХЕ хидролизира много от токсичните продукти преди да достигнат нервната система. Например 95% от постъпилите в организма кокаин или хероин се разграждат от този ензим. Ако например неговата активност се повиши 8 пъти (такива данни има в нашето изследване) купирани на свръх дози препарати ще продължи само минути. По този начин могат да бъдат облекчени тежки вегетативни неврози. С еднократно есенно и зимно подхранване на пчелните семейства с дозиран и специализиран захарен разтвор могат да бъдат спасени хиляди пчелни семейства.

По-долу в няколко страници са показани конкретни данни в този аспект. В дисертационния труд тази тема заема десетки страници.

На фиг. 6. са представени данни за ефективността на *L*-Аргинин като стимулатор на активността на холинестеразите



Фиг. 6. Влияние на *L*-Аргинин (% спрямо контролите) върху активността на АХЕ и БХЕ в мембранно-митохондриална фракция в преден и малък мозък на бял пълх. Начална (прагова) ефективна концентрация на тази аминокиселина

Дори и от тази фигура е видно, че *L*-Аргинин в концентрационен интервал от 10 до 50 mM (в определен интервал) концентрационно зависимо активира ензимната активност на холинестеразите (АХЕ и БХЕ) и в двата мозъчни дяла на мозък от бял пълх (преден и малък мозък). Това активиране е най-добре изразено при конц. на *L*-Аргинин от 50 mM. Друга важна закономерност е, че ефективността на *L*-Аргинин (50 mM) (стимулиране) е много по-силно проявена върху активността на БХЕ както в предния мозък (около осемкратно), така и в малкия мозък (около трикратно).

Един от изводите е, че активиращата ефективност на *L*-Аргинин е много по-силно проявен върху активността на холинестеразите в предния мозък. Друг извод е, че активиращата ефективност на *L*-Аргинин е толкова по-голяма, колкото базовата активност на съответния ензим е по-ниска.

Други интересни данни характеризират, че всеки реагент има специфични критерии за оценка. Такъв индекс е например инициативната (прагова) ефективна концентрация (ИЕК). Така например този критерий за повлияване на активността на АХЕ при преден мозък на бял пълх се проявява още при конц. на *L*-Аргинин от 10 mM (16%) с пропорционално нарастване до 43%, 63% и 136% с

повишаване на аргининовата концентрация, съответно в порядъка от 20, 30 и 50 mM. ИЕК на L-Аргинин върху активността на АХЕ при фракции от малък мозък се проявява при 30 mM на тази аминокиселина.

Многократно беше споменавана протектората функция на БХЕ. В контекста на работата всяко значително терапевтично повишаване на активността на този ензим води до бърз положителен резултат (овладяване на вегетативни неврони, извеждане от състояние на свръх дози, в помощ при невлологични операции, спасение при натравяне от много и най-различни продукти и др.). Друг аспект е защита и резистентност към пестициди и инсектициди. Стимулиране на активността на АХЕ води към други физиологични и биологични категории. Някои от тях са: ускоряване на синаптичните цикли, което води до повишаване на количеството обработена информация, потискане на ваготоничните синдроми, промени в поведението и др.

Подобна е картината за влиянието на L-Аргинин върху активността на холинестеразите в мозък на заек (Табл. 3.).

Таблица 3.

**Основна (базова) ензимна активност на АХЕ и БХЕ и влияние на L-Аргинин при фракции от различни мозъчни структури на заек**

Мозък на заек			
Мозъчна кора	Мозъчен ствол	Малък мозък	Мозъчни структури
124,88 (K1; K2)	183,77 (K2)	88,13 (K2)	A; АХЕ (M±m) (±m=5-15)
<b>100% (K1)</b>	147% **	71% **	% спрямо контрола (K1)
177,50	197	113	<b>L-Аргинин, mM</b> (50 mM); A; АХЕ
142% **	107% *	128% **	% спрямо контрола (K2)
10,11 (K1; K2)	23,43 (K2)	4,51 (K2)	A; БХЕ (M±m) (±m=0,65-0,90)
<b>100% (K1)</b>	131% **	47% **	% спрямо Контрола (K1)
27,29	32,70	4,95	<b>L-Аргинин, mM</b> (50 mM); A; БХЕ
270% **	140% **	110%	% спрямо контрола (K2)

A – ензимна активност (µg хидролизиран АХ/mg белтък/min); n= 8-12; \*p < 0.05; \*\*p < 0.001. На таблицата и фигурата са показани данни само за ефектите на L-Аргинин при конц. 50 mM.

По-долу са представени данни за ефективността на L-Аргинин върху активността на АХЕ във фракции от

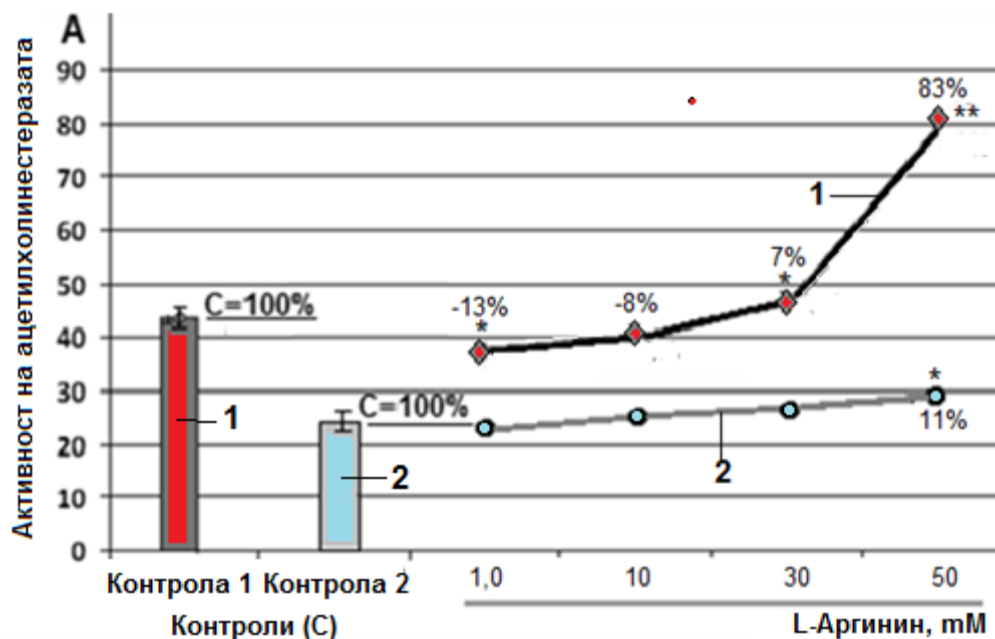


Fig. 7. Влияние на L-Аргинин (1,0-50 mM) върху активността на АХЕ във фракции от *A. mellifera* (1) и *V. germanica* (2)

Резултатите са представени в реални стойности на ензимна активност и % спрямо съответните контроли; А – ензимна активност в µg хидролизиран АХ/mg белтък/min; n = 8-10; p <0.001

Данните от тази серия показват, че L-Аргинин не повлиява активността на АХЕ във фракции от *V. germanica*. Най-вероятно това се среща и при други видове, но ние не разполагаме с информация за това. Едно от обясненията в случая е, че при този вид активността на NOS е твърде ниска или присъствието на източници на NO е ограничено.

В противовес на това L-Аргинин (30-50 mM) стимулира активността на АХЕ във фракции от *A. mellifera* с около 80% спрямо контролата (L-Аргинин, 50 mM).

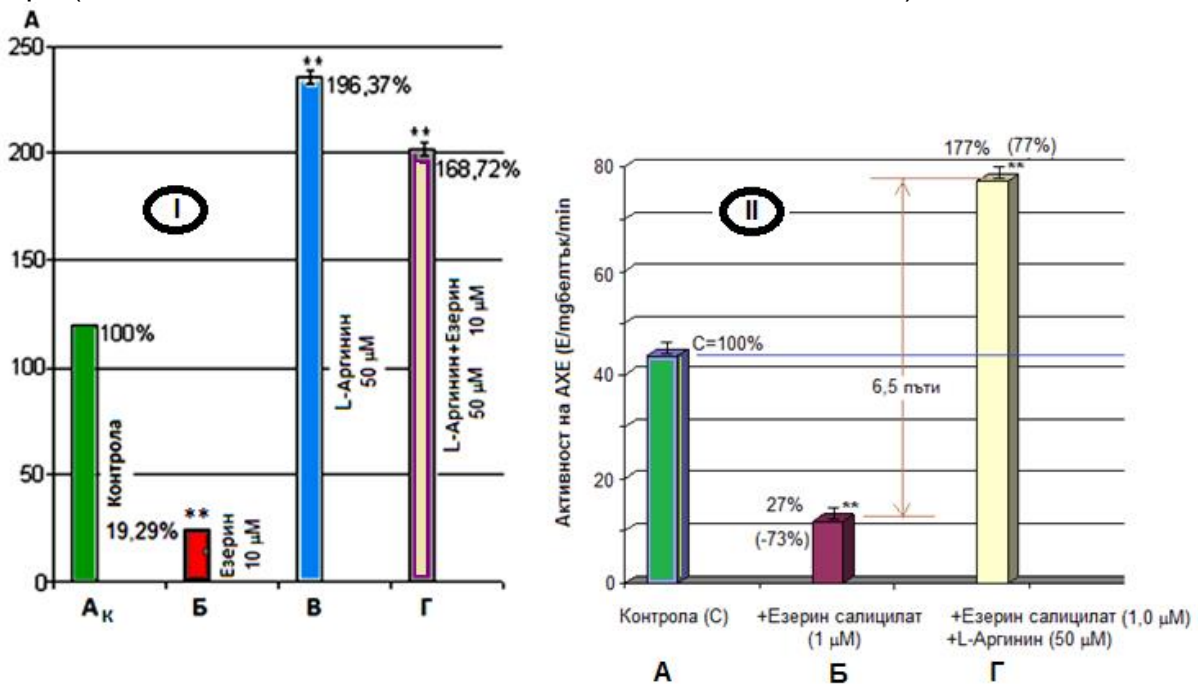
**L-Аргинин като реактиватор на активността на холинестеразите и антидот при интоксикация на организмите (и човек).** Като следствие от данните за активизиращата ефективност на L-Аргинин върху активността на холинестеразите възникна проблема за ролята на тази аминокиселина като частност, възможно е да има и много други с подобно действие, които чрез насочено действие към холинестеразите (а защо не и към хилядите разновидности ензими), с което да се решават не само превантивни и терапевтични проблеми, но да се контролира оптималното състояние и творчески капацитет например при човека.

Ние възнамеряваме в бъдеще да отделим нужното внимание за контрол на поведението чрез програмиране на отделни компоненти от холинергичната система.

По-долу е представена една обединена фигура, където без никакво съмнение става ясно, че L-Аргинин реактивират инхибираната активност на ХЕ. Интересното тук е, че този реактиватор проявява по-силна ефективност когато съответната ХЕ е потисната от специфични (и други) инхибитори.

За това ние имаме няколко предположения, които подлежат на продължителна експериментална проверка. Едно от тях е: когато холинестеразата е подложена на някакво сериозно въздействие в молекулната организация на ензима

и неговото обкръжение настъпват сериозни конформационни (структурни) промени в третичната структура на белтъка. В този случай този ензим става лесна мишена за странични влияния, които могат да доведат до положителни и отрицателни ефекти. Такива конформационни промени са описани от Ivanov и савтори (Ivanov et al., 2001; Ivanov et al., 2003; Vukova et al., 2005).



**Фиг. 8.** Влияние на Езерин салицилат (10 µM) (Б), L-Arginine (50 mM) (В) и комбинация L-Arginine (50 mM) и Eserine (10 µM) (Г) върху активността на АХЕ във фракции от мозъчна кора на мозък от заек (I) и *A. mellifera* (II)

А – активност на ензима в µg хидролизиран АХ/mg белтък/min; n=8-10; ±m=4,0-5,50; \*\*p<0,001; сборна фигура.

Control	Таблични данни за мозъчна кора на заек			
	Eserine, 10 µM	L-Arginine, 50 µM	L-Arginine + Eserine (50 µM)	L-Arginine + Eserine (10 µM)
120	23,15	235,64	02,462	A
100%	19,29%	196,37%	168,72%	%

Контрола (С)	Таблични данни за <i>A. mellifera</i>			
	+L-Аргинин 1,0	10	30	50 mM
43,67±1,21 (100%)	38,18±1,06	40,12±0,90	46,50±0,76	79,94±3,64
% спрямо С	87%	92%	107%	183%
+Езери н	42,06±0,90	29,85±1,20	22,18±1,20	10,15±0,08
Езерин	0,1 µM	1,0 µM	10 µM	100 µM

Данните в тази фигура и приложените таблични данни са също от категория ключови.

Основният смисъл на публикуваните резултати е, че L-Аргинин в конц. от 50 mM сменя напълно инхибирането предизвикано от специфичен антихолинестеразен агент – Езерин салицилат при биологични обекти от бозайници и насекоми.

Така например около 80% инхибиране на активността на АХЕ от Езерин (физостигмин) (мозъчна кора от заек) се реактивира не само напълно спрямо

контролата (базова активност в норма), но и с превишение (стимулиране) с около 70% спрямо базовата контрола.

Подобна е картината на реактивиране на АХЕ. Езерин в кон от 1,0  $\mu\text{M}$  инхибира активността на АХЕ във фракция от *A. mellifera* от порядъка на 70%. В пробите с комбинация L-Аргинин – 50 mM и езерин – 1,0  $\mu\text{M}$  инхибираната ензимна активност се реактивира с около 70% спрямо базовата нормална контрола.

Такива серии бяха проведени и с други обекти. Тук се обсъжда влиянието върху ХЕ от специфични антихолинестеразни средства. В раздел V и VI обаче се обсъжда и инхибиране на активността на ХЕ например от ферицианидни съединения. Показани са данни, че чрез L-Аргинин може частично да се реактивира АХЕ (възможно и на БХЕ) инхибирана от ферицианиди.

В раздел III. 2. е направен експериментален опит за разкриване на някои от механизмите на влияние на химически вещества, които биха отдали NO-радикали чрез системата NOS или други начини на секреция на азотен оксид.

### **III. 2. Азотният оксид като фактор и механизъм на контрол на активността на холинестеразите под въздействието на донори на NO**

Всички данни приведени до тук сочат, че в повечето от случаите L-Аргинин стимулира значително холинестеразите в различни фракции от гръбначни и безгръбначни животни. Единствено такова стимулиране не беше установено при *V. germanica*. Споменато беше, че това се дължи най-вече на ниска активност на NOS, на ограничено присъствие на ендогенни източници на NO и др.

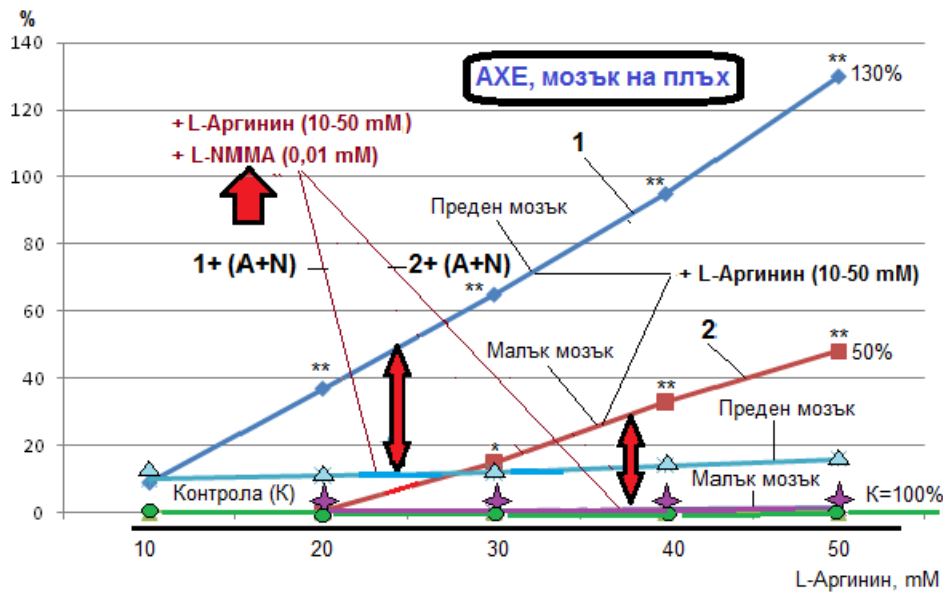
Във всички останали случаи, добавянето в съответните опитни серии на **L-NMMA** предизвиква рязко намаляване на стимулиращия ефект на L-Аргинин. Тук са посочени някои характерни случаи при гръбначни и безгръбначни.

На фиг. . е видно, че L-Аргинин в концентрации от 10 до 50 mM дозозависимо активира АХЕ както във фракции от преден мозък (130% при конц. на L-Аргинин от 50 mM, а във малък мозък – около 50% при същите условия.

Пробите в съответните комбинации на L-Аргинин и L-NMMA снемат почти напълно активиращото действие на L-Аргинин и различията между опитните и контролни стойности не са достоверни.

Подобна е картината на влияние на L-NMMA и върху активността на АХЕ във фракции от *A. mellifera*. (фиг. 10).

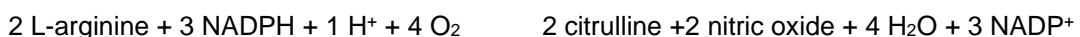
Няколко седмичният труд в тази област води до един много кратък извод: *L-NMMA в конц. сменя активиращото влияние на L-Аргинин върху холинестеразите в различни структури и видове животни. Този извод е валиден и за други подобни случаи от изследването.* Това е закономерност, която предполага, е общовалидна.



Фиг. 9. Влияние на L-Аргинин (10-50 mM) върху активността на АХЕ в мембранно-митохондриална фракция в преден (1) и малък мозък (2) на бял плъх. Ефективност на L-NMMA (инхибитор на активността на NOS) в комбинация с L-Аргинин (1+L-NMMA г.г 2+L-NMMA)

n = 8-10; p < 0.001. Вж. също фиг. 6 и табл. 3.

Азотният оксид синтетаза (NOS) (EC 1.14.13.39) е ензим, който катализира секрецията на NO от L-Аргинин. NO е важна клетъчна сигнална молекула (радикал), която модулира много клетъчни процеси – съдов тонус, секрецията на някои хормон, синаптично провеждане, невронна пластичност, редица неврологични заболявания, контрол на имунните и автоимунните реакции, активира гуанилатциклазата и повишава съдържанието на цГМФ, потиска навлизане на Ca<sup>2+</sup> в клетките (релаксиране на гладката мускулатура), активира K<sup>+</sup> канали, което води до клетъчна хиперполяризация и потискане на активността, активира цГМФ-зависима протеинкиназа, което води до активиране на леката верига на миозин (свързано с мускулната релаксация) и много други (Liu, Y., Feng, Q., 2012. NO in the heart: role of nitric oxide synthase-3 in heart development". *Differentiation*. **84** (1): 54–61}; Stuehr, D. J., 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta*. **1411** (2–3): 217–230.



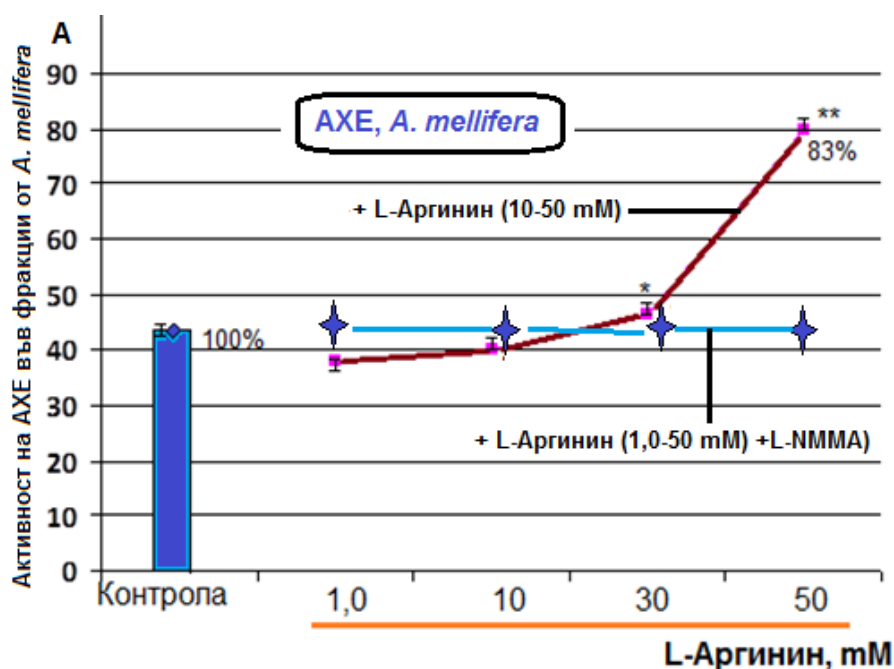
NOS се среща тъканите на бозайници, риби, птици, безтръбначни, дори и при бактериите. (Liu, Q., Gross, S. S. (1996). Binding sites of nitric oxide synthases. *Meth. Enzymol.* **268**: 311–324).

В организмите се срещат 4 типа NOS: невронна (nNOS), имуногенна (iNOS), ендотелна (eNOS) и бактериална (bNOS) (Taylor, B.S., Kim, Y. M., Wang, Q., Shapiro, R. A., Billiar, T. R., Geller, D. A., 1997. Nitric oxide down-regulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression. *Arch Surg*. **132** (11): 1177–1183).

Тези допълнителни данни, заедно с тези в литературния обзор, разкриват само част от спектъра на значимост на NO в биологията на организмите.

До тук е ясно, че този радикал, освен посоченото активиране ензимната активност на холинестеразите и това влияние може да бъде предотвратено или ограничено от инхибитори на NOS, какъвто е L-NMMA. За съжаление този препарат е много скъп и ние не можахме да разгнем докрай изследователските задачи

(пълнен спектър на концентрациите, паралелизъм между концентрациите на L-Аргинин и L-NMMA, прилагане на други инхибитори на NOS, др.



Таблични данни:

Контрола	43,67±1,21 (100%)			
+L-Аргинин	1,0	10	30	50 mM
	38,18±1,06	40,12±0,90	46,50±0,76	79,94±3,64
% спрямо С	87%	92%	107%	183%

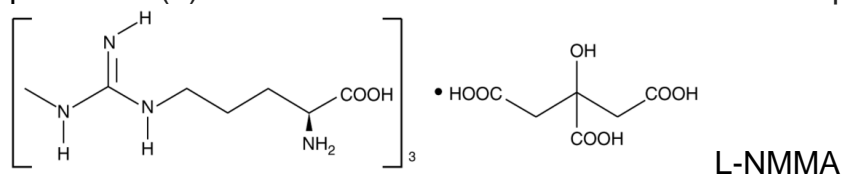
В присъствието на L-NMMA всички данни са много близки до контролата.  
 Други данни: n=8; \* p≤ 0,05; \*\* p≤ 0,001

По-долу са представени още няколко аргумента като доказателство на ролята на NO като активатори на активността на холинестеразите. В предходния раздел е показано, че L-Аргинин играе ролята на реактиватор на потиснатата активност на XE като антидот при натравяне с някои токсични продукти.

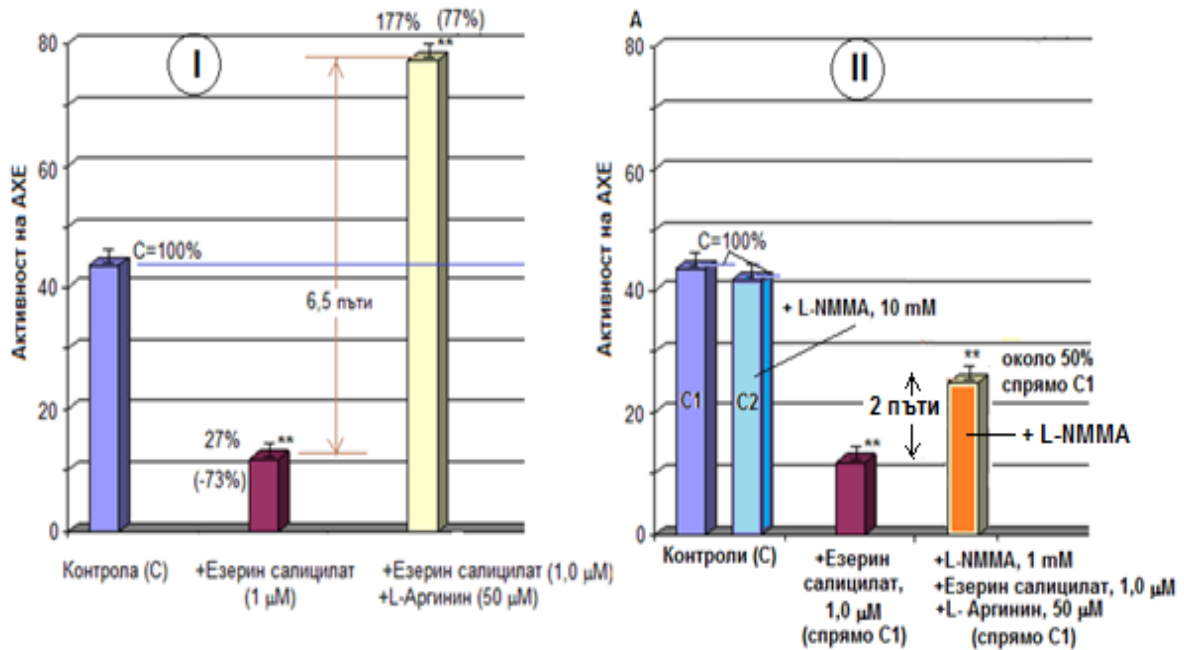
На фиг. . са посочени две комбинирани фигури, където е показано почти пълното снемане на реактивиращата ефективност на L-Аргинин при използване на L-NMMA във фракции от бозайници и насекоми.

За по-лесен сравнителен анализ фигурите са представени по двойки – реактивиращата ефективност на L-Аргинин и ограничаване на това влияние в проби с L-NMMA.

Както е описано в раздел II, L-Аргинин реактивира напълно и със значителен превес, потиснатата от 1,0 μM езерин (I). Използването на L-NMMA като инхибитор на NOS (II) сменя напълно или частично това инхибиране (фиг. -).







**Фиг. 11. Роля на L-Аргинин (50 mM) като антидот и реактиватор на AXE (I) и роля на L-NMMA като инхибитор на NOS във фракции от *A. mellifera***

Други данни: n=8; \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,001, вж. същофиг. 8.

**Таблични данни** към фигурата, които се отнасят и към други фигури от дисертацията.

Контрола (C1)	43,67±1,21 (100%); контрола (C2) - + L-NMMA	41,6 ±1,50
+L-Аргинин	1,0	10
	30	50 mM
	38,18±1,06	40,12±0,90
	46,50±0,76	79,94±3,64
% спрямо C	87%	92%
	107%	183%
+Езерин	42,06±0,90	29,85±1,20
	22,18±1,20	10,15±0,08
	(-5%)	(68%)
	(50%)	(77%)
	(в скоби – инхибиране на ензима – % спрямо контролата)	
Езерин	0,1 μM	1,0 μM
	10 μM	100 μM
+L-NMMA		10 μM

Zhou L, Zhu DY2009 Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. Nitric Oxide. 20(4):223-230.

Griffith, O.W., and Kilbourn, R.G.1996. Nitric oxide synthase inhibitors: Amino acids. Methods in Enzymology 268, 375-392

Nitric oxide synthases: regulation and function European Heart Journal. 2012 Apr; 33(7)829

Други инхибитори на NOS: 7-NI (00240), L-NMMA (00241), L-NIL (00242), L-NIO (00243).

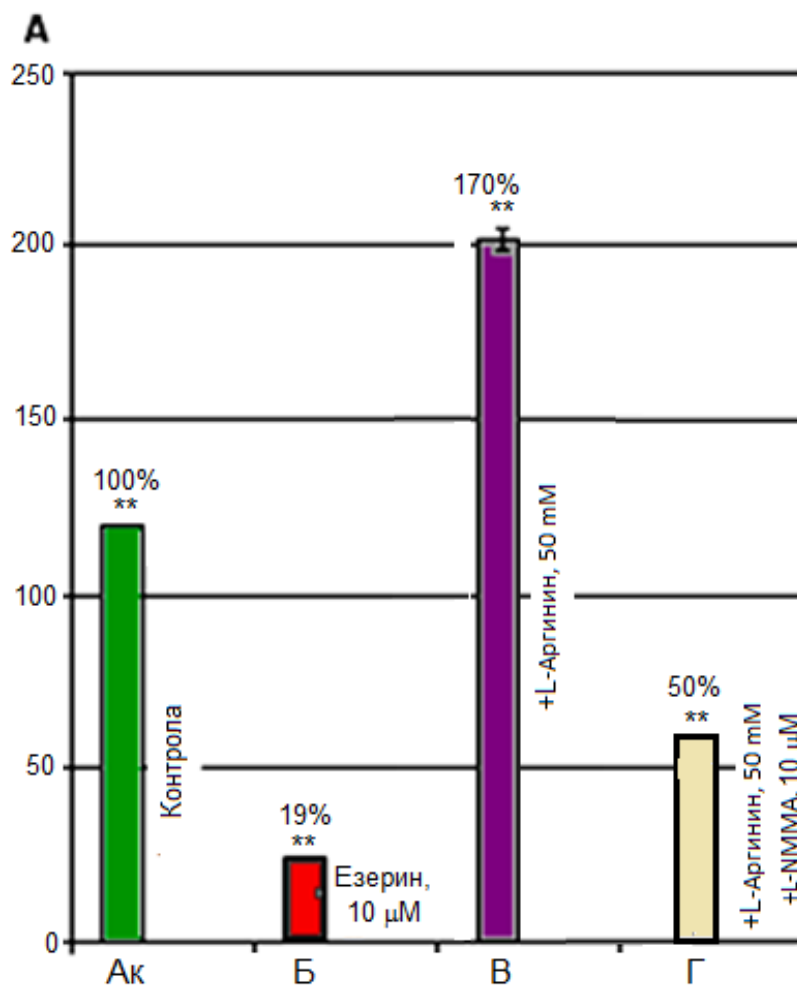
Други данни за L-NMMA (съответствие между mg и μM):

5 mg L-NMMA разтворен в 20 ml=1,0 mM. Ефективност като инхибитор на NOS – 5-10 μM.

Графичният материал и табличните данни показват ефективността на L-NMMA като инхибитор на NOS и дефицит на NO. Като следствие от това е изводът:

Изследванията категорично показват, че активизиращата ефективност на L-Аргинин върху активността на холинестеразите в различни тъкани, структури, системи и видове животни зависи предимно от секрецията на NO от ендогенни и/или екзогенни източници на NO чрез системата на NOS.

Това е демонстрирано и на следващата фигура (фиг. 12), където ролята на L-Аргинин като реактиватор на инхибирана активност на АХЕ и антидот в случаи на интоксикация при мозъчна кора на заек. Важен елемент от тази серия е, че L-NMMA (10  $\mu$ M) сменя в по-голямата си част това реактивиране на ензима. Причината е ясна- блокиране на секреция на NO от специфичния блокер на NOS.



Фиг. 12. Влияние на Езерин салицилат (10  $\mu$ M) (Б), L-Arginine (50 mM) (В), комбинация L-Arginine (50 mM), Eserine (10  $\mu$ M) и L-NMMA (10  $\mu$ M) (Г) върху активността на АХЕ във фракции от мозъчна кора на мозък от заек

А – активност на ензима в  $\mu$ g хидролизиран АХ/mg белтък/min; n=8-10;  $\pm$ m=4,0-5,50; \*\*p< 0,001; Ак - контрола

L-Аргинин и други подобни продукти, освен като стимулатори на активността на холинестеразите и реактиватори на потиснатата активност на такива ензими, могат да случат като антиотрови (антидоти) при натравяне с холинови

естери, при предозиране с наркотични вещества, с лекарствени препарати, с растителни и животински токсини, в условия на генетичен бутирилхолинестеразен дефицит и др. Това е основание за друг извод или принос:

*L-Аргинин и други донори на NO в научно-приложен план могат ефективно да се използват като реактиватори на потиснатите холинестерази от различни токсични продукти.*

В това изследване е важно да се видят и други механизми на действие на донорите на азотен оксид в контрола на активността на холинестеразите. Един такъв пример е Na-Нитропрусид, който е чудесно клинично лекарство средство. Азотният оксид при тази субстанция не зависи от системата на NOS. Изводът е:

*Секрецията на NO при някои донори на този радикал и неговата ефективност не зависи от системата NOS, а от други механизми - степен на хидролиза на сложната структура на молекулата, например Na-феринитроцианид (Na-Нитропрусид).*

Азотният оксид е само началото на механизмите на влияние върху активността на холинестеразите. Следващите възможни стъпки са активиране на гуанилатциклазата, образуване на цГМФ (вторичен посредник), последвалите вериги от процеси, повлияване на съдържанието на калциеви йони и т.н. Такова изследване е изключително интересно но изисква значително финансиране и време. Понякога, когато погледнем справочниците за свръх чисти химикали и техните цени, ни настръхва кожата. Се ла ви!

Друго доказателство за ролята на NO като фактор в контрола на активността на XE са изследванията за влияние на L-Аргинин върху пречистени ензимни препарати, лишени от NOS (фиг. 13).

### **III. 3. Ефективност на L-Аргинин и Na-Нитропрусид върху активността на AXE в препарати с дефицит на NO синтетазата (NOS)**

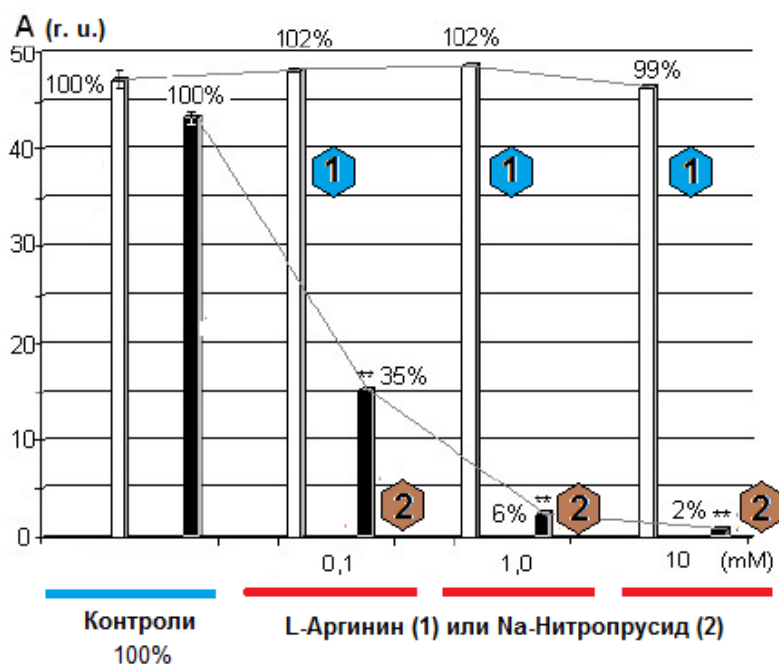
В тази част са представени данни за влиянието на два донора на NO върху активността на AXE – продажен пречистен и лиофилизиран ензимен препарат от електрическо торпедо (или от електрическа змиорка). Този препарат в резултат на няколко дневното пречистване губи голяма част от различни белтъци, в това число и азот оксид синтетазата (NOS).

Данните от тази серия са показани на фиг. 13.

Това изследване е едно от доказателствата за ролята на азотния оксид като активатор на холинестеразите.

Картината на влияние на *L-Аргинин* (0,1-10 mM) показва отсъствие на ефект върху активността на AXE при този препарат.

Следователно може да се твърди с извесна условност, че част от стимулиращата активност на L-Аргинин върху холинестеразите и тяхното реактивиране при увреждане се дължи на системата на NO.



**Фиг. 13. Влияние на L-Аргинин (1) и Na-Нитропрусид (2) в конц. от 0,1 до 10 mM върху АХЕ (печистен лиофилизиран продажен препарат) от електрически орган на *Torpedo marmorata***

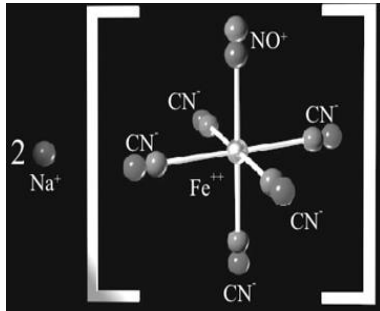
A – ензимна активност в универсални относителни единици; n=8-10;  $\pm m = 1,5-3,6$ ; \*\* -  $p < 0,001$ . Малките разлики в базовата ензимна активност се дължат на две отделни серии опити с незначителни различия в тегловните съотношения на лиофилизирания белтък.

Картината на ефективността на *Na-Нитропрусид* при този обект на изследване е коренно различна от ефектите на L-Аргинин. В рамките на концентрационен диапазон от 0,1 до 1,0 mM влиянието е концентрационно зависимо инхибиране, достигащо почти до 100% при конц. 1,0 mM и коефициент КЗИ<sub>50</sub> по-малък от 0,1 mM.

Тук не е показана активиращото на действие на Na-Нитропрусид при много по-ниски концентрации на реагента, които се дължат най-вероятно на NO. Този радикал не се секретира под въздействие на NOS, а в резултат на дисоциация на нитро-фери-цианидния комплекс на Na-НП.

Изводът от това е: *L-Аргинин* в фракции, където липсва NOS, не повлиява активността на холинестеразите (в частност на АХЕ) поради метаболитен дефицит на NO.

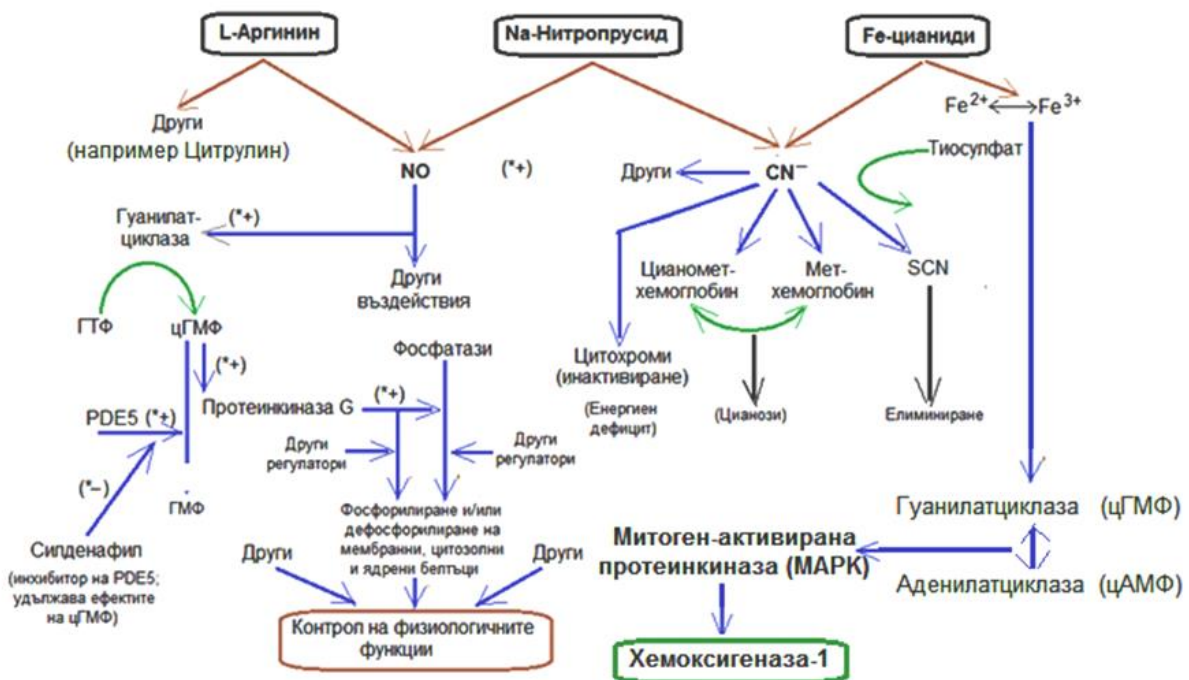
#### **Раздел IV. Влияние на Na-Нитропрусид (Na-НП) върху активността на холинестеразите във фракции от различни видове животни**



радикал.

Na-Нитропрусид ( $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ ) е фармакологична субстанция, която се използва в клиниката при екстремна хипертония. Основен компонент в молекулата на препарата е нитрозил метал-циан комплекс, съдържащ 5 цианидни радикала и 1 нитрозилов компонент. Този препарат е екзогенен донор на NO. Това ни даде основание да направим сравнителен анализ между ефектите на NO между ендогенни и екзогенни донори (източници) на този

По-долу са представени някои от метаболитните вериги на обмяна на L-Аргинин, Na-НП и Fe-цианиди



Фиг. 14. Обобщена схема за основните метаболитни пътища на L-Аргинин, Na-НП и Fe-цианиди (гръбначни животни)

Чрез тази схема се акцентира върху някои основни метаболити, които имат отношение към основната теза за ролята и механизмите на влияние на L-Аргинин и Na-Нитропрусид върху холинестеразите при различни животни. Такива са например тези от системата на L-Аргинин (цитрулин, NO, вторични посредници – цГМФ, цАМФ, фосфорилиране и дефосфорилиране на специфични белтъци, цианиди, фероцианиди, нитрофероцианиди, цитохроми и роля на феро- феро йони, тиосулфат, мет-хемоглобин, цианметхемоглобин, митоген-активирана протеин-киназа, др.

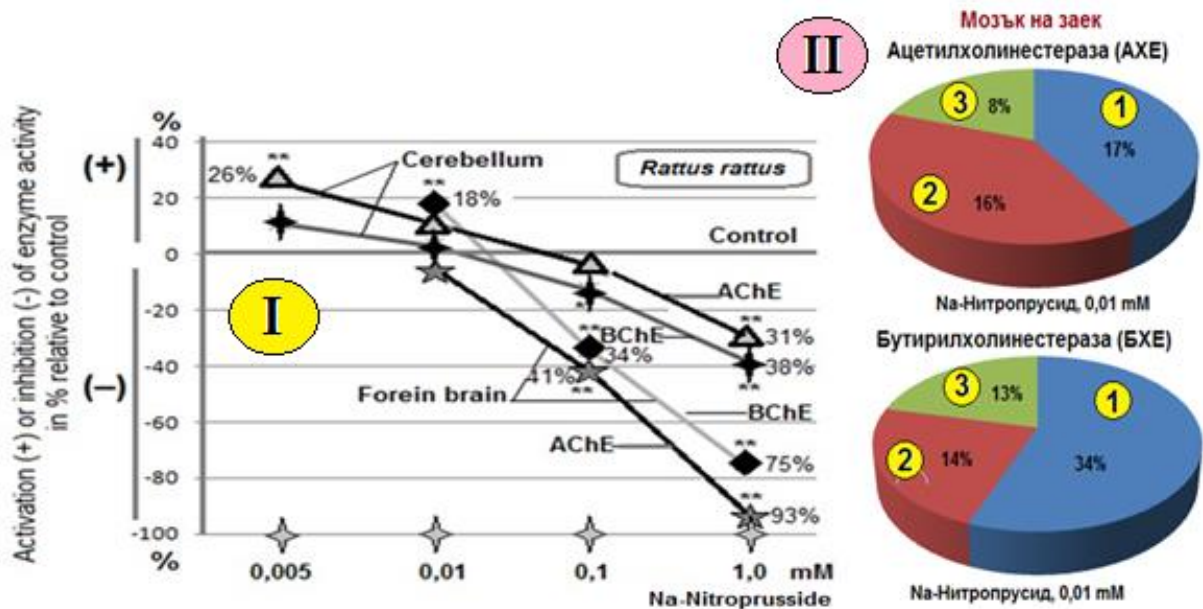
Ефективността на Na-НП върху фракции от различни тъкани и видове животни беше тестирана при концентрации 0,01-1,0 mM.

**Ефективност на Na-НП върху активността на АХ при бозайници.** На фиг. . е показано влиянието на Na-НП върху активността на АХЕ и БХЕ в различни мозъчни зони в мозък от плъх и заек.

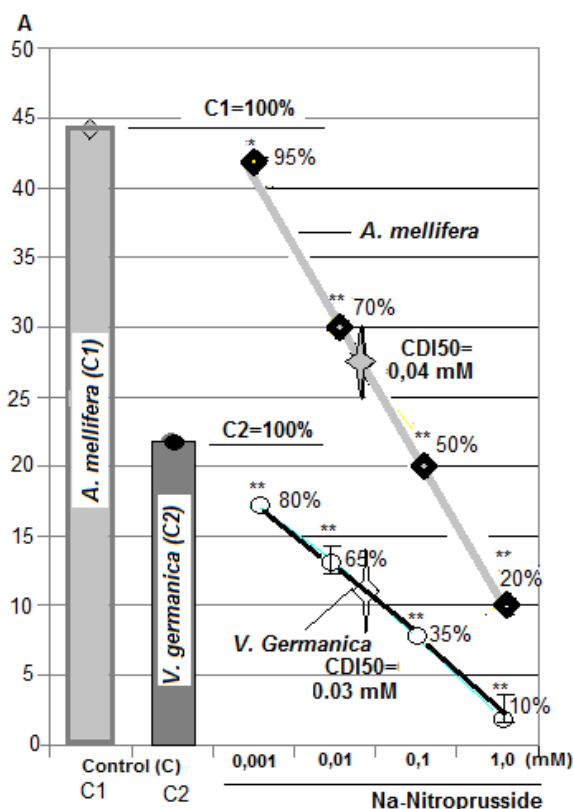
Na-Нитропрусид, повлиява **двухфазно активността** на различни мозъчни зони при плъх и заек – **незначително активиране** при ниски концентрации и **прогресивно концентрационно зависимо инхибиране** на АХЕ и БХЕ. Предполага се, че активирацията ефект се дължи на NO, а инхибирането на фероцианидния комплекс и цианидните радикали.

**Активирацията ефективност на Na-NP** е подобна на тази на L-Аргинин, но при различни концентрации – ниска **0,001-0,01 mM** за **Na-NP** и твърде висока за **L-Аргинин – 30-50 mM**. Предполага се че това зависи от NO и активността на NOS.

По аналогия с други наши изследвания беше проверена ролята на L-NMMA като инхибитор на NOS върху активирания фрагмент на кинетичната крива. Резултатът беше **отрицателен**. Това означава, че азотният оксид не се формира (и секретира) като резултат от активността на NOS, а най-вероятно в резултат на **дисоциацията** на феронитроцианидния комплекс, която за това вещество е висока, по-висока от тази при фероцианидите. Дисоциацията на фероцианидите е нищожна, както и тяхната токсичност, и поради това те намират дори хранително-вкусовата промишленост като поредно „Е”.



**Фиг. 15. Влияние на Na-Нитропрусид (0,005-1,0 mM) върху активността на АХЕ и БХЕ в преден и заден мозък на плъх (I) и мембранно-митохондриална фракция от мозъчна кора (1), мозъчен ствол (2) и малък мозък (3) (II) – процент спрямо контролата = 100%**  
 Първата фигура (I) е оригинална от наша публикация.



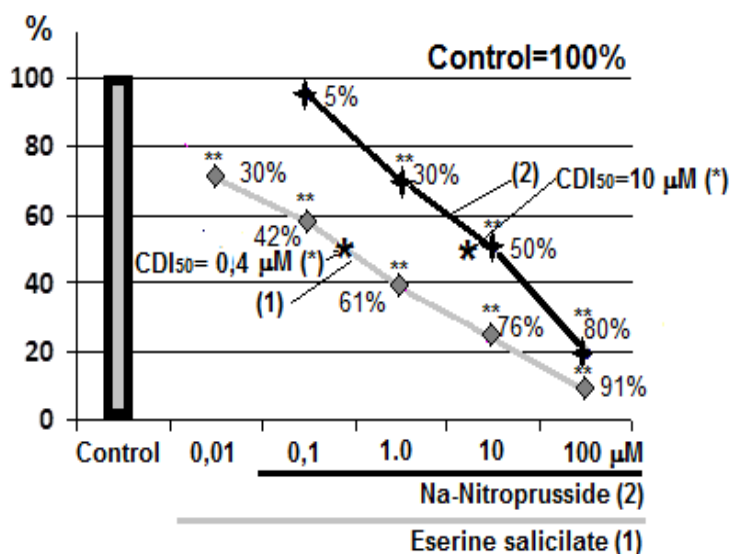
Концентрационно зависимото инхибиране на холинестеразната активност при гръбначни и безгръбначни се дължи на токсичната функция на феррицианидния комплекс и цианидните радикали. Те са с много по-силно действие от това на NO. В случая е налице кооперативен адитивен ефект.

**Влияние на Na-НП върху активността на АХЕ във фракции от *A. mellifera* и *V. germanica*.** Това влияние е показано на фиг. 16 и фиг. 17.

Фиг. 16. Сравнителен анализ на ефектите на Na-НП върху активността на АХЕ във фракции от *A. mellifera* и *V. germanica*

Ефективността и характерът на влияние на Na-НП върху фракции от медоносна пчела е Европейска оса са **подобни** на тези върху мозъчни фракции от бозайници.

Различията се състоят в това, че токсичността на Na-НП при тези видове е много висока. Друга особеност е липсата на фаза на активиране на ензимната активност. Инициативната прагова концентрация на Na-НП е ниска (по-ниска от 0,001 mM за *V. germanica*). Критерият ДЗИ<sub>50</sub> (CDI<sub>50</sub>) е от порядъка на 0,03-0,04 mM. Това означава много висока токсичност (инхибиторна ефективност) на препарата върху АХЕ при тези видове. Разбира се много по-ниска от ефектите на класическите антихолинестеразни агенти (Фиг.17).



Фиг. 17. Сравнителен анализ на ефективността на Na-НП (2) и Езерин салицилат (1) върху активността на АХЕ във фракции от *A. mellifera*

Това означава още, че циановите инсектициди биха имали ефективност в контрола на популациите при този и други видове насекоми. Цианидите, както е известно, също се използват като пестициди и инсектициди, и даже в газовите камери в нацистките концлагери като бойно отровни вещества (Циклон В).

Други зависимости са: активността на АХЕ (при равни други условия) при *V. germanica* е около два пъти по-ниска в сравнение с тази при *A. mellifera*;

Данните от фигурата показват, че токсичното действие на **Na-NP** върху АХЕ при медоносна пчела е **около 25 пъти по-слабо** в сравнение с това на специфичния антихолинестеразен агент – Езерин салицилат. Това ярко се демонстрира от стойностите на коефициента  $CDI_{50}$  – 0,04 mM за Езерин и  $CDI_{50}$  - 10 mM за Na-HP.

Критерият  $KZI_{50}$  ( $CDI_{50}$ ) за сетен път показват своята полезност при оценката на значимостта на определени влияния.

Ролята на Аргинин като реактиватор на потиснатата активност от Na-HP беше анализирана в предходен раздел.

## **Раздел V. Влияние на К-ферицианид, К-фероцианид и KCN върху активността на АХЕ във фракции от *Vespula germanica* и *Apis mellifera***

Na-Нитропрусид е нитроферицианово съединение и близък по молекулна структура с други фери- или фероцианиди.

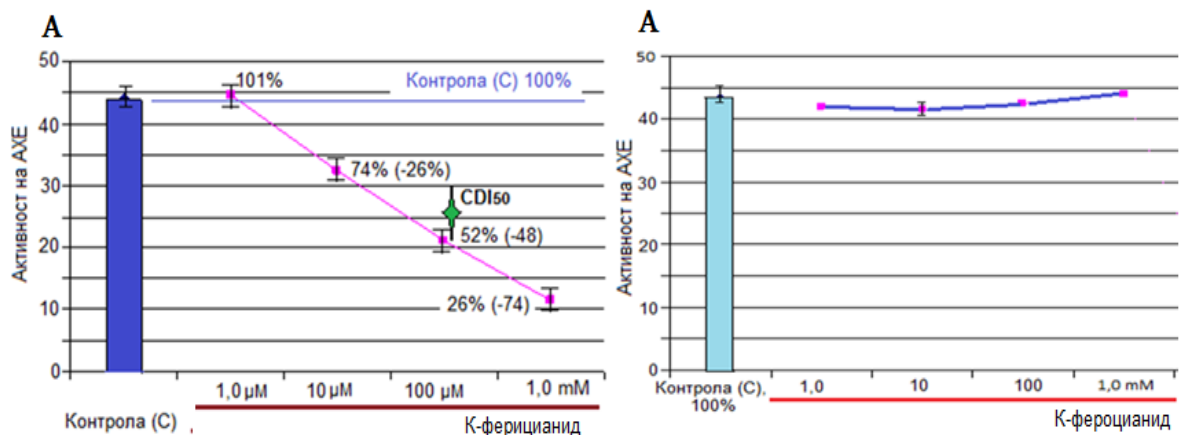
С цел търсене на механизмите на инхибиторната ефективност на Na-HP беше изследвано влиянието на К-ферицианид и К-фероцианид върху активността на АХЕ при *Vespula germanica* и *Apis mellifera*.

Различията в молекулната на К-ферицианид и Na-HP се състоят в това, че К-ферицианид не съдържа нитрозна група, но вместо 5 има 6 цианидни радикала. Валентността на желязото е една и съща. Този продукт е опасен и за животни и хора. Различията между К-ферицианид и К-фероцианид се състоят във валентността на желязния атом, който при К-ферицианид е от трета валентност (може да бъде определен като радикал), а при К-фероцианид – от втора валентност.

Тези данни, както за фероцианидите и за KCN все още не се срещат в научната литература. Това би могло да се приеме като принос – разкриване на ново лице на ефективност на цианидите върху активността на холинестеразите.

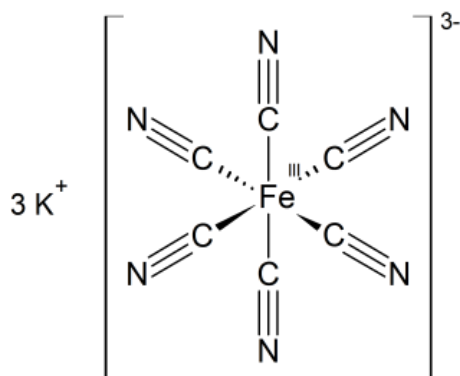
Предполагаше се, че в ефектите на Na-HP и К-ферицианид ще има някакво подобие. Това, в експерименталната работа беше доказано (фиг. 18).





Фиг. 18. Влияние на **К-ферицианид** и **К-фероцианид** върху активността на АХЕ във фракции от *A. mellifera*

Установено беше, че само **К-ферицианид** предизвиква концентрационно зависимо инхибиране на АХЕ при *A. mellifera* (подобен ефект е характерен и за *V. germanica*). Този ефект е подобен на влиянието на Na-НП. Различията се състоят в равнищата на ефективност (КЗИ<sub>50</sub>) върху активността на този ензим, която е около 7 пъти по-висока за Na-НП (около 0,06 mM) в сравнение с тази на К-Fe<sup>3+</sup>CN (около 0,4 mM).

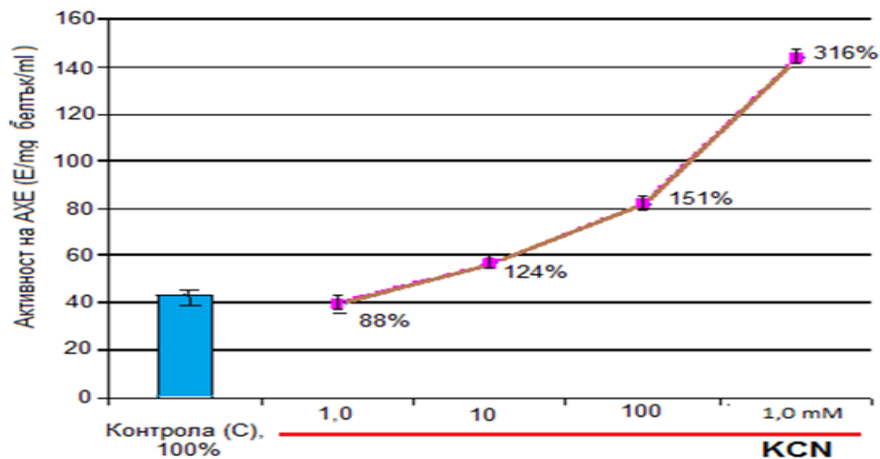


Това означава още, че токсичността на **К-ферицианид** е много по-ниска от тази на Na-НП. Възможни обяснения за това е предимно високата дисоциационна способност на Na-НП, ефективността на ферицианидните радикали и циановите производни, а не на NO, чиято ефективност се припокрива (скрива) от много по-силния ефект на ферицианидите.

Молекулна организация на К-ферицианид

К-фероцианид не повлиява активността на холинестеразите при гръбначни и безгръбначни животни. Една от причините за това е ниската дисоциационна константа на този продукт, където цианидите са в здраво свързан комплекс. Комплексиращият фактор за железните атоми във втора валентност. Поради това този продукт е с много ниска токсичност и се използва даже в хранително-вкусовата промишленост. Тук също е нужно внимание, защото в много кисела среда, въпреки ниската дисоциация, може да доведе до образуване на циановодород.

**Влияние на KCN върху активността на холинестеразите.** Като естествено следствие от изследванията в този раздел беше необходимо да се анализира влиянието на KCN върху холинестеразната активност. Някои от данните в този аспект са посочени на фиг. 19.



Фиг. 19. Влияние на KCN върху активността на АХЕ при *A. mellifera*

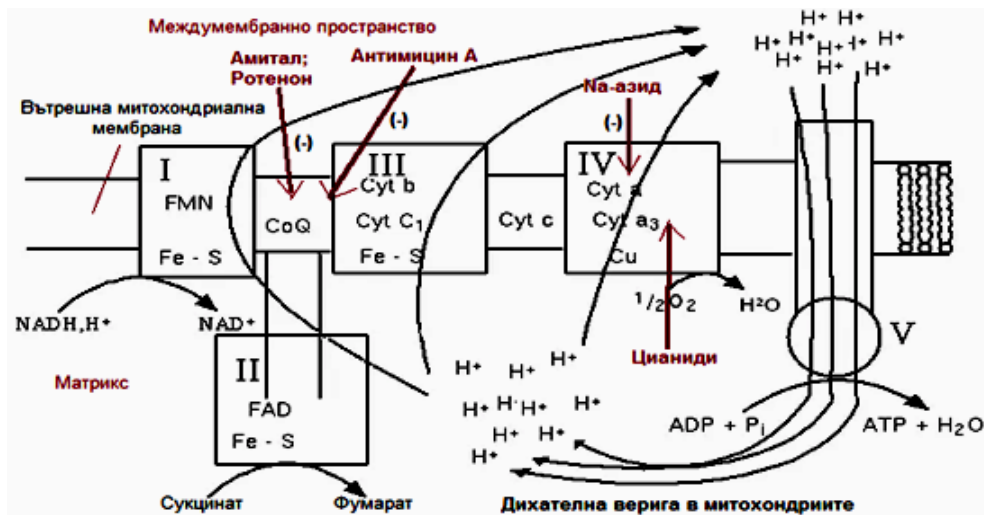
**Калиевият цианид** е позната молекула, която предизвиква смърт при човек при доза 150-300 mg. Смъртта настъпва поради енергиен метаболитен дефицит. Много са блокерите на дихателната верига в митохондриите. Сред тях KCN (по-точно циано водород) заема едни от първите места.

„Парадоксалността” в резултата идва от показаните данни. KCN в концентрации по-високи от 1 mM дозозависимо активира активността на АХЕ като при конц. 1,0 mM достига около 300%. За сега ние нямаме достатъчно експериментални факти, които да дадат отговор на механизмите на влияние на този продукт.

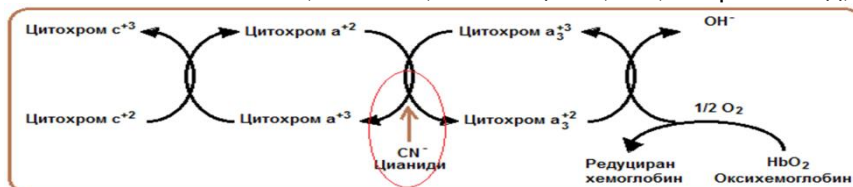
Само като теоретична илюстрация представяме няколко схеми за ролята на цианидите, едни от важните фактори в контрола на клетъчната биоенергетика. От това следва, че някои от цианидите засягат не само електронния транспорт в дихателната верига на митохондриите, но и други процеси и механизми, каквато е например холинергичната система.

## Раздел VI. Роля на L-Аргинин като реактиватор на холинестеразата инхибирана от цианид-съдържащи съединения. Роля на азотния оксид.

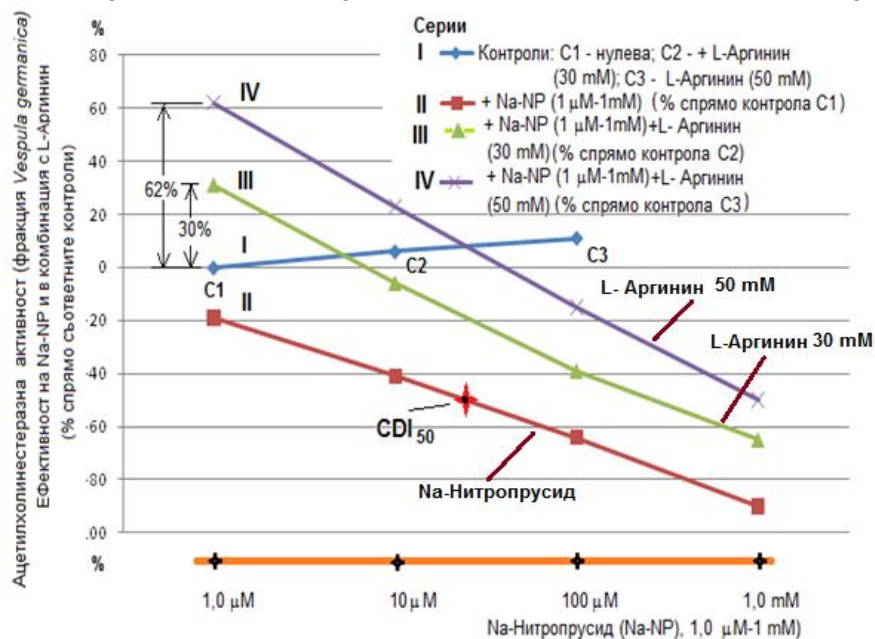
В раздел III беше показана ролята на Аргинин като реактиватор на потиснатата активност на холинестеразите от антихолинестеразни агенти при различни животни и биологичен материал. Тук ще анализираме пример за ролята на Аргинин като протектор и реактиватор на АХЕ и някои съображения относно механизмите на тази реактивация.



Други важни инхибитори на електронния транспорт дихателната верига, които възпрепятстват синтеза на АТФ са: Амитал, Ротенон, Антимицин А, СО, Натриев азид, Цианиди, др.



Фиг. 20. Роля на цианидите като ефективни блокери на електронния транспорт в дихателната верига на митохондриите и синтеза на метаболитна енергия



Фиг. 21. L-Аргинин като протектор и реактиватор на АХЕ във фракции от *V. germanica*

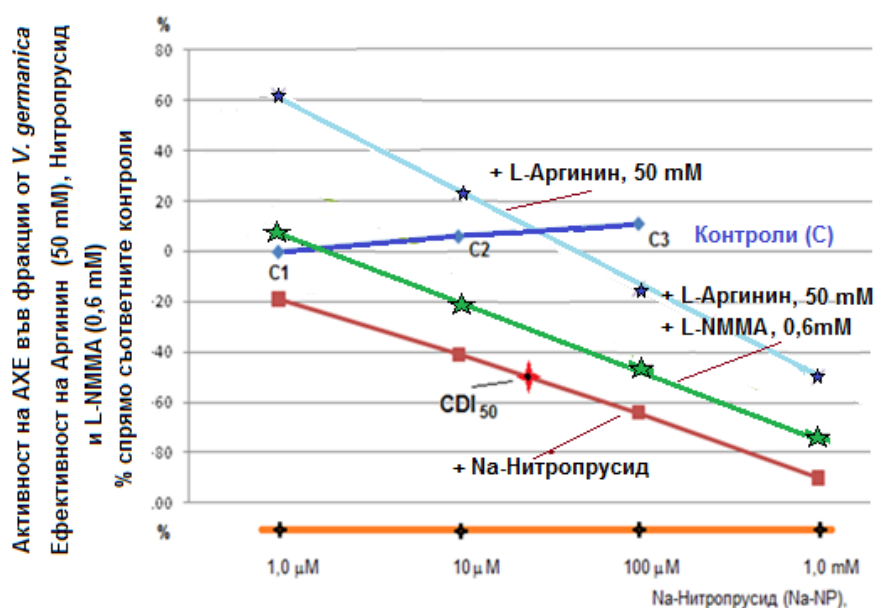
На тази фигура са представени данни, които са характерни за всички изследвани от нас фракции, които показват, че L-Аргинин реактивира инхибираната от Na-НП активност на АХЕ във фракции от Европейска оса.

Това реактивиране е много по силно при по-високата концентрация на L-Аргинин и варира от порядъка на 30-50%. Друга информация: L-Аргинин, приложен в конц. от 30 и 50 не повлиява съществено базовата активност на АХЕ при

този обект – слабо активирани, достигащо около 10%. Следователно, да се прояви реактивиращата ефективност на L-Аргинин, холинестеразите трябва да бъдат подложени на потискане както от специфични антихолинестерази, така например от цианиди. Тези промени вероятно се дължат на конформационни промени в молекулата на холинестеразите. Такива ефекти бяха установени и посочени в няколко статии (Ivanov et al., 2001; Ivanov et al., 2003; Vucova et al., 2005). Тези статии са посочени в литературния списък в дисертацията.

Съгласно данните от фиг. 18 е видно, че влиянието на L-Аргинин върху активността на АХЕ при *V. germanica* е само около 10%. Такова влияние при обект *A. melliferae* значително. При конц. на реагента от 50 mM то е около 80%. При тази серия се анализират експериментално два важни аспекта (фиг. 22).

1. Възможно ли е L-Аргинин да реактивира потиснатата активност на АХЕ (в този случай при *V. germanica*);
2. Ако отговорът е положителен – какъв е механизмът на това влияние?



Фиг. 22. Ефективност на L-NMMA (III) (L-Аргинин, 50 mM + L-NMMA, 10 μM) като инхибитор на NOS върху активността на АХЕ, инхибирана от Na-Нитропрусид

Според данните в двете фигури е ясно, че L-Аргинин е частичен реактиватор на потиснатата активност на холинестеразите в различни тъкани и видове животни. Прилагането на специфични инхибитори на NOS (L-NMMA) намалява значително тази реактивираща функция на L-Аргинин.

Изводът е:

*L-Аргинин е частичен реактиватор на потиснатата активност на холинестеразите от ферицианидни радикали в различни тъкани и видове животни. Инхибирането на активността на NOS с L-NMMA понижава значително ефективността на L-Аргинин поради дефицит на NO.*

## ИЗВОДИ

1. Реализирано е частично ензимно картиране (скрининг) на холинестеразите в главен мозък на бозайници и във фракции от насекоми. Апробирани бяха важни биомониторингови критерии (например инициална ефективна концентрация; концентрационно зависимо инхибиране; максимална ефективност и др.), чрез които се прави бърза и обективна оценка на състояние на организмите в норма и интоксикация в условия на екоотоксична среда.

2. L-Аргинин в конц. 10-50 mM активира дозозависимо активността на холинестеразите при различни животински видове. Тази аминокиселина *и други донори на NO в научно-приложен план могат ефективно да се използват като реактиватори на потиснатите холинестерази от различни токсични продукти (пестициди, инсектициди, лекарствени средства, наркотици и др.)*.

3. *Активиращата ефективност на L-Аргинин върху холинестеразите в различни тъкани, структури, системи и видове животни зависи предимно от секрецията на NO от ендогенни и/или екзогенни източници на NO чрез системата на NOS.*

4. L-Аргинин в фракции, където липсва NOS, не повлияват активността на холинестеразите (в частност на АХЕ) поради метаболитен дефицит на NO (лиофилизирани препарати от пречистена АХЕ от електрични органи на риби).

5. *L-Аргинин е частичен реактиватор на потиснатата активност на холинестеразите както от специфични антихолинестеразни агенти така и от ферицианидни радикали в различни тъкани и видове животни.*

6. Инхибирането на активността на NOS с L-NMMA понижава значително ефективността на L-Аргинин (активиране на ХЕ) и на Na-НП (инхибиране на ХЕ) поради дефицит на NO. L-NMMA ограничава значително реактивиращата ефективност на L-Аргинин при потиснатата активност на ХЕ.

7. Основната ефективност на Na-Нитропрусид (над 0,1 mM) върху активността на ХЕ във фракции от безгръбначни и гръбначни животни е прогресивно концентрационно инхибиране, паралелно с повишаване концентрацията на реагента. Този се дължи на влиянието на феринитроцианидните комплекси в молекулата на реагента.

8. Тези ефекти на Na-Нитропрусид наподобяват влиянието на специфични антихолинестеразни пестициди (карбамати и органофосфати), но с няколкократно по-ниска ефективност.

9. Влиянието на Na-Нитропрусид в много ниски концентрации (0,005-0,01 mM) се проявява като умерено стимулиране на активността на холинестеразите, което се дължи на NO. Този ефект се припокрива с концентрационно зависимо инхибиране при повишаване на концентрацията на ферицианидните компоненти.

10. К-Ферицианид, подобно на Na-Нитропрусид дозозависимо инхибира активността на АХЕ при безгръбначни животни (*A. mellifera*; *V. germanica*). Това инхибиране е по-слабо от това, предизвикано от Na-Нитропрусид и много по-слабо от това на карбаматни пестициди. Този технологичен продукт се характеризира с умерена токсичност и се нуждае от мониторингов контрол.

11. К-Фероцианид не повлиява активността на холинестеразите.

**12. Калиевият цианид, мощен метаболитен блокатор на клетъчната биоенергетика, дозозависимо стимулира активността на АХЕ при безгръбначни видове (*A. mellifera*; *V. germanica*).**

## **ПРИНОСИ**

1. С този проект за първи път в научната литература се публикуват и обсъждат данни за активиращата ефективност на L-Аргинин върху активността на АХЕ и БХЕ при гръбначни животни – клас бозайници и безгръбначни клас насекоми. Тази закономерности – повишаване на активността на ХЕ имат важно значение за биомониторинговата оценка на състоянието на организмите в зависимост от условията на средата, за неотложна помощ при някои интоксикации при хора (например предозиране с някои наркотици), за предпазване например на пчелни кошериот специфични инсектициди, при различни токсични въздействия на животни и хора.
2. За първи път е установено, че Аргинин се проявява като реактиватор на потиснатата холинестеразна активност. Това предполага възможността от използване на тази аминокиселина като антидот при интоксикации от широка гама токсични продукти.
3. В дисертацията за първи път в литературата се анализира ролята на **NO** като механизъм за активиращата ефективност на някои от донорите на този радикал върху активността на холинестеразите и ролята на системата NOS. За целта е използван широкоспектърен инхибитор на NOS – L-NMMA (NG-Methyl-L-Arginine acetate).
4. За първи път е установено, че Na-Нитропрусид при концентрации над 1,0 mM силно и специфично концентрационно зависимо инхибира активността на холинестеразите при безгръбначни и безгръбначни. Това инхибиране се дължи на ферицианидния комплекс в молекула на реагента.
5. В литературата за първи път се публикува, че К-ферицианид, подобно на антихолинестеразните агенти или на Na-НП, концентрационно зависимо инхибира холинестеразите във фракции от различни видове. Неговата токсичност трябва винаги да се има в предвид при използването му.
6. Установено е за първи път, че К-фероцианид не повлиява активността на холинестеразите. Този продукт не се счита за токсичен. Поради това той е в списъка на многобройните „Е-та“ използвани в хранително-вкусовата промишленост.
7. Разработен е частично модел за биомониторингова оценка на състоянието на организмите в зависимост от условията на средата. За целта като биомониторингов обект се използва активността на холинестеразите в различни видове организми, в това число и кръвни проби от хора, работещи с пестициди. В този модел важно място заемат инициалната ефективна концентрация (ИЕК), концентрационно зависимо инхибиране или активиране (например КЗИ<sub>50</sub>), коефициент на максимална ефективност при определена концентрация, коефициент DL50 – 50% смъртност при определен тип интоксикация и др.
8. За първи път в експерименталната практика е установено, че L- Аргинин (10-30 mM) ефективно реактивира холинестеразите, инхибирани от нитро- и ферицианидни компоненти във фракции от различни видове животни.

## Публикации по темата на дисертационния труд

1. Ivanov R., Dencheva E. 2016. The role of some endogenous and exogenous nitric oxide donors as a possible antidote at poisoning from carbamate pesticides. *Annuaire de l'Universite de Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculte de Biologie*, 101 (4), 149-163.
2. Dencheva E., Ivanov R. 2017. The Cholinesterases as biomonitoring markers in cases of poisoning of organisms in ecotoxicological environment. Seminar of Ecology with international participation. Proceedings (Сборник научни трудове), IBER, BAS, 125-134. (ISBN: 979-853-476-132-4)
3. Dencheva E., Ivanov R. 2018. Mechanisms of the action of Na-Nitroprusside and some cyanide on cholinesterases in invertebrates and vertebrates. *Annuaire de l'Universite de Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculte de Biologie*, (под печат)
4. Ivanov R., Dencheva E. 2018. L-Arginine as a reactivator to cholinesterases and antidote for intoxication by anticholinesterase agents and cyanides. *Annuaire de l'Universite de Sofia "St. Kliment Ohridski", Faculte de Biologie*, (под печат)
5. Ivanov, R. and E. Dencheva, 2018. Effectiveness of L-Arginine as reactivator and antidote against cholinesterase poisoning in invertebrates and vertebrates. *Journal of Agricultural Science (BJAS)*

## Участия в международни и национални научни форуми по темата на докторанския проект

1. Ivanov R., Dencheva E. The role of some endogenous nitric oxide donors as possible antidote at poisoning from carbamate pesticides (постер KD 61). *Youth scientific conference "Kliment's days", 18 – 20 November 2015, Sofia*
2. Dencheva E., Ivanov R. Influence of L-Arginine and other source of nitric oxide on butyrylcholinesterase (BChE) activity. Clinical and ecotoxicological aspects (постер). *International Biomedical Congress, 25 – 28 February 2016, Sofia*
3. Dencheva E., Ivanov R. The cholinesterases as biomonitoring markers in case of poisoning of organisms in ecotoxicological environment (постер). *Seminar of Ecology with international participation 21 – 22 April, Sofia*
4. Dencheva E., Ivanov R. Pesticide control of acetylcholinesterase activity in *Vespula germanica* and the role of some nitric oxide donors as an antidote in ecotoxicological environment (постер E6). *Youth scientific conference "Kliment's days", 17 – 18 November 2016, Sofia*
5. Dencheva E., Ivanov R. Mechanisms of the inhibitor action of the Na-Nitroprusside on the cholinesterases in the fraction of *Rattus rattus*, *Vespula germanica* and *Apis mellifera*. Role of ferrinitrocyanides, nitric oxide (NO) ferricyanide complex, cyanides, ferri- and ferro- ions on the enzyme activity (постер M13). *Youth scientific conference "Kliment's days", 16 – 17 November 2017, Sofia*
6. Ivanov R., Dencheva E. Comparative analysis of the effectiveness of L-Arginine on the cholinesterase activity in vertebrates and invertebrates. The role of the sources of nitric oxide as antidotes and cholinesterase reactivators in case of intoxication with anticholinesterase agents and other poisonous products (постер M43). *Youth scientific conference "Kliment's days", 16 – 17 November 2017, Sofia*

Участие в изследователски проект (Проект в подкрепа на докторанти) към ФНИ на Софийския университет „Св. Климент Охридски“, Договор №182/13. 04. 2016 г.

Тема на проекта: Роля на азотния оксид като регулатор и/или модулатор на активността на ацетилхолинестеразата и бутирилхолинестеразата в нервната система и други тъкани при различни класове и видове животни.

Ръководител на проекта: гл. ас. Милена С. Шкодрова, други участници в проекта – докторант Елица Т. Денчева и доц. Радой И. Иванов.

Отчетът по проекта и финансовата справка са приети без забележки.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

**Изразявам своята благодарност към Ръководителя на катедра по Зоология и антропология и към катедрения колектив за съпричастността и подкрепата.**

**Благодаря на всички от катедра по Физиология на животните и човека, който ме приеха и ми предоставиха изследователска лаборатория, оборудване, редки и скъпи химикали, напътствие и сътрудничество.**

**Благодаря най-сърдечно на моя научен ръководител, доц. д-р Радой Иванов, който винаги беше до мен и ме въведе в теоретичните дебати, методологията и методите, в изследователската практика и търсене на полезния резултат.**

**Благодаря на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ за финансовата помощ от ФНИ (Договор № 182/13.06.2016, Ръководител гл. ас. М Шкодрова), чрез които набавихме част от нужните химикали и апаратура.**

**Благодаря на всички!**

***Е. Денчева***



**2017 г.  
София**