



1869

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**

**ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО  
„АКАД. К. БРАТАНОВ”**

**Секция „Имунобиология на репродукцията”**

*Веселин Петров Василев*

**Проучване механизма на действие на отровата от двата  
подвида пепелянка *Vipera ammodytes ammodytes* и *Vipera  
ammodytes meridionalis*, биохимичната активност и  
ембриотоксичността при лабораторни животни**

***АВТОРЕФЕРАТ***

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен

**„Доктор”**

по научна специалност: “ Физиология на животните и човека”

**шифър 01.06.17**

Научен ръководител: *Доц. д-р П. Рашев*

Рецензенти:

**София, 2017**

**Списък на използвани съкращения и символи на латиница**

**4HNE** – 4 – хидроксиноненал  
**Abs** – абсорбция, оптична плътност  
**ALD** – апроксималната летална доза  
**AP Buffer** – буфер за алкална фосфатаза  
**APS** – амониев персулфат  
**aPTT** – активирано парциално тромбопластиново време  
**BALb/c** – линия бели мишки  
**BСА** – бицинхонинова киселина  
**BCIP** - 5-бромо-4-хлоро-3-индолил-фосфат  
**BSA** – говежди серумен албумин  
**DAB** – диаминобензидин  
**Dir** – директна хемолиза  
**DMSO** – диметил сулфоксид  
**Fib** – фибриноген  
**FW** – молекулно тегло  
**Gerb** – джербил (**Meriones unguiculatus**)  
**Gln** – Глутамин  
**Glu** – глюкоза  
**H&E** (Hematoxylin and Eosin staining) – оцветяване с Хематоксилин – Еозин  
**Hb** – хемоглобин  
**Hbi** – хемиглобин  
**His** – Хистидин  
**Ht** – хематокрит  
**i.v.** – интравенозно  
**In** – индиректна хемолиза  
**Inh** – инхибитор  
**kDa** – килодалтона  
**LD50** – дозата причиняваща смърт при половината от опитните животни  
**MAS** – синдром на неонаталната аспирация на мекониум  
**MeCN** – ацетонитрил  
**MES** - 2-(N-морфолино) етансулфонова киселина  
**NBT** – нитроблу тетразол  
**NGF (nerve growth factor)** – Растежен фактор на нервите  
**ONB** – 4 – нитро – 3 – ( октаноилокси ) бензоена киселина  
**PAF** – фактора за агрегация на тромбоцитите  
**p-BPB** – 4-бромо-фенацилбромид  
**PLA1** - Фосфолипаза А1  
**PLA2, ФЛА2** – Фосфолипаза А2  
**PLD** – Фосфолипаза D  
**PLC** – Фосфолипаза C  
**PT** – протромбиново време  
**PVDF** - високочувствителна поливинилиден дифлуорид мембрана  
**SDS-PAGE** – полиакриламидна гел електрофореза в присъствие на натриев додецил сулфат  
**sPLA2** – цитозолна форма на фосфолипазата

**SH** – групи – Тиолови групи  
**sPLA2** – секреторна форма на ензима  
**TBS** – Трис буферен разтвор  
**TCA** - трихлорооцетна киселина  
**TEMED** – тетраметилендиамин  
**TRIS** - трис-(хидроксиметил)аминометан  
**VAA, V.A.A, V. a. a., v. a. a., V. amm. amm., V. a. ammodytes** - *Vipera ammodytes ammodytes*  
**VAM, V.A.M, V. a. m., v. a. m., V. amm. mer., V. a. meridionalis** - *Vipera ammodytes meridionalis*  
**Vipoxin** – випоксин

**Списък на използвани съкращения и символи на кирилица**

**АДФ** – Аденозиндифосфат  
**АМФ** – Аденозинмонофосфат  
**АТЕЕ** - етиловите естери на ацетилтирозина  
**АТФ** – Аденозинтрифосфат  
**ВАЕЕ** – p – бензоил – 1 – аргинин етилов естер  
**ВТЕЕ** – етиловите естери на бензоилтирозина  
**ГТФ** – гуанозинтрифосфат  
**ДИК (DIC)** – синдром – Синдром на дисеминираната интраваскуларна коагулация  
**ДНК** – Дезоксирибонуклеинова киселина  
**ЕДТА** – Етилендиаминотетраацетат  
**ИТФ** – инозинтрифосфат  
**КЗ** – коза  
**КН** – кон  
**КР** – крава  
**НАД** – Никотинамидадениндинуклеотид  
**ОБ** – Общ Белтък  
**ОВ** – овца  
**ПАВ** – повърхностно активни вещества  
**P** – ортофосфат  
**P/O** – отношение – Ниво на тъканна сатурация  
**РДС** – респираторен дистрес синдром  
**РНК** – Рибонуклеинова киселина  
**РР** – пирофосфат  
**СА** – кротоксин А  
**СВ** – кротоксин В  
**ТАМЕ** – p – толуен – сулфонил – 1 – аргинин метилов естер  
**ТТ** – тромбиново време  
**УТФ** – уридилтрифосфат  
**ФАД** – Флавинадениндинуклеотид  
**ФМН** – Флавиномононуклеотид  
**ЦНС** – Централна нервна система  
**ЦТФ** – цитидилтрифосфат

## ВЪВЕДЕНИЕ

Змийската отрова е система от биологично активни субстанции, определящи всеки един аспект от сложния механизъм на нейното действие. Основните токсикологични единици характеризиращи клиничната картина на отравянето са с белтъчна природа. Към тях се отнасят ензимни активности като протеиназите, L-аминокиселинната оксидаза, фосфолипазите и др. Сложната палитра от биологично активни токсини затруднява характеристиката на точното действие на всеки един от тях. Протеазите и тъканно-некротичните фактори вероятно определят цитотоксичното действие, което от друга страна е резултат от ензимите от семейството на фосфолипазите. L-аминокиселинните оксидази, ендо- и екзонуклеазите осъществяват негативния си ефект на макромолекулно ниво, а именно върху нуклеиновите киселини и структурите на окислителното фосфорилиране. Важен фактор в токсикогенезата при отравяне с отрова от българските подвидове на отровниците е присъствието на различни изоензими на фосфолипазата и специално на изоформата A2, която в подвида *Vipera ammodytes ammodytes* е представена от няколко активни мономера, докато в подвида *Vipera ammodytes meridionalis* основната токсикологична характеристика се основава на хетеродимера с невротоксична активност Випоксин, в основата на който е също изоензим на фосфолипазата, от силно токсичен клас, с изразено поведение на органотропизъм. Затрудненията в анализа и интерпретацията на симптомите, както и определяне на ролята на факторите, които ги причиняват се дължи на това, че различните активности имат противоположно действие. Например, фосфолипазата самостоятелно има антикоагулантно действие, докато сериновите металопротеинази осъществяват подчертан прокоагулантен ефект, водещ до ДИК - синдром. Затруднението при определяне на значимостта на всеки един от тези елементи се усложнява и от факта, че самите токсикологични активности потенцират образуването на биологично активни ендогенни субстанции, като ейкозаноидите, които осъществяват мощен системен ефект върху организма, водещи до разстройство на жовотоподдържащи функции, каквито са поддържането на кръвното налягане и съдовия тонус, устойчивостта на кръвните елементи и др.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

### 1. ЦЕЛ:

Проучване механизма на действие на отровата от двата подвида пепелянка *Vipera ammodytes ammodytes* и *Vipera ammodytes meridionalis*, биохимичната активност на основните показатели, и ембриотоксичността при лабораторни животни

### 2. ЗАДАЧИ:

1. Получаване на проби от отрова от двата подвида на пепелянката *V. ammodytes meridionalis* и *V. ammodytes ammodytes*.
2. Изследване на LD<sub>50</sub> при двата подвида – *Vipera ammodytes ammodytes* и *Vipera ammodytes meridionalis*.
3. Установяване на патоморфологичните изменения в организма след въздействие с отровите.
4. Изследване на биохимични показатели от отровата:
  - 4.1. Определяне на ОБ;
  - 4.2. Разделяне на белтъците чрез полиакриламидна гел електрофореза в присъствие на натриев додецил сулфат (SDS-PAGE) по Laemmli.
  - 4.3. Определяне на въглехидратно съдържание;
  - 4.4. Определяне на протеазна активност / неутрална и алкална /.
  - 4.5. Определяне на фосфолипазната активност;
5. Функционално изследване на някои аспекти от токсичността на отровите *in vitro*
  - 5.1. Проучване на пряката и непряка хемолитична активност на отрова от двата подвида на пепелянката при различни видове прицелни животни *in vitro*.
  - 5.2. Проучване на коагулантната и антикоагулантната активност на змийска отрова от двата подвида на пепелянката:
    - 5.2.1. Изследване на влиянието ѝ по отношение на различните пътища на активация на кръвосъсирването - ТТ, РТ и АРТТ при различни видове прицелни животни *in vitro*.
    - 5.2.2. Фибрино(гено)литична активност на змийска отрова.
6. Проучване тропизма на невротоксичната субстанция випоксин от отровата на *V. ammodytes meridionalis* в организма на опитните животни чрез имуноблот.
7. Изследване въздействието на цяла отрова от *Vipera ammodytes meridionalis* върху репродуктивните органи *in vivo*.
8. Установяване степента на плацентарни увреждания и ембриотоксичност при мишки в последния етап на бременността след въздействието с цяла отрова от *Vipera ammodytes meridionalis*.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За целта на изследванията бе използван материал от двата подвида на пепелянката (общо 48 представителя), като екземплярите бяха от различни части на страната, определяни по фенотипна принадлежност. В експериментите бяха включени като лабораторни животни бели мишки от линията BALBc, плъхове и джербили. За проучване на функционалната токсичност на отровите бяха използвани кръвни проби от представители на следните видове (получени от УОС – Враждебна към ЛТУ) - кон, крава, коза, овца, магаре, куче и човек.

Изследванията по дисертационния труд бяха проведени в лабораториите на ИБИР-БАН и Катедра по органична химия към Факултет по химия и фармация при Софийски университет „Св. Климент Охридски“.

Експерименталните подходи включваха следните методики:

- ✓ LD50 бе определена по метода на J. LICHTFIELD и F. WILCOXON;
- ✓ Рутинна хистология (оцветяване с хематоксилин и еозин) за хистопатологичен анализ;
- ✓ Определяне съдържанието на протеин по метода на Smith;
- ✓ Разделяне на белтъци и фибрино(гено)литична активност чрез полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE по Laemmli U.K.);
- ✓ Определяне съдържанието на въглехидрати чрез високочувствителен фенол – сярно киселинен колориметричен метод;
- ✓ Определяне на протеазна активност – анализ с азоказеин;
- ✓ Фотометрично определяне на фосфолипазна (PLA2) активност по кинетичен метод с използване на синтетичен, хромоген субстрат – октаноил-нитро-бензоена киселина (ONB);
- ✓ Колориметрично определяне на пряка и непряка хемолитична активност;
- ✓ Проучване на коагулационната активност чрез турбидиметричен хронометричен метод;
- ✓ Проучване тропизма на невротоксина Випоксин чрез полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE) и имуноблот.

Статистическите методи включваха:

- Описателна статистика;
- Тест за различия и стандартно отклонение;
- Тест за достоверност и вариационен анализ ( t-тест на Стюдънт)

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Резултати от експеримента за LD<sub>50</sub> при двата подвида.

Бяха установени следните стойности:

- За *Vipera ammodytes meridionalis* - 0,431 mg/kg. m

- За *Vipera ammodytes ammodytes* - 3,682 mg/kg. m.

Наблюдавана бе 8,54 пъти по силна токсичност за първия вид

Наши по-ранни изследвания установиха аналогични резултати за невротоксина и фосфолипазата, изолирана от него, а именно:

- за Випоксин - 0,4 mg/kg. m.

- за Фосфолипаза - 3,34 mg/kg. m.

Киселата компонента бе с нулева токсичност.

В свързано състояние с фосфолипазата в невротоксина, киселият компонент понижава общата ензимна активност на хетеродимера.

Установената 8,35 пъти по силна токсичност за Випоксина в сравнение със съдържащата се в него Фосфолипаза допусна предположението, че не химичната активност, проявена изолирано, а специфичните взаимоотношения на тъканно ниво са определящ момент в интоксикацията.

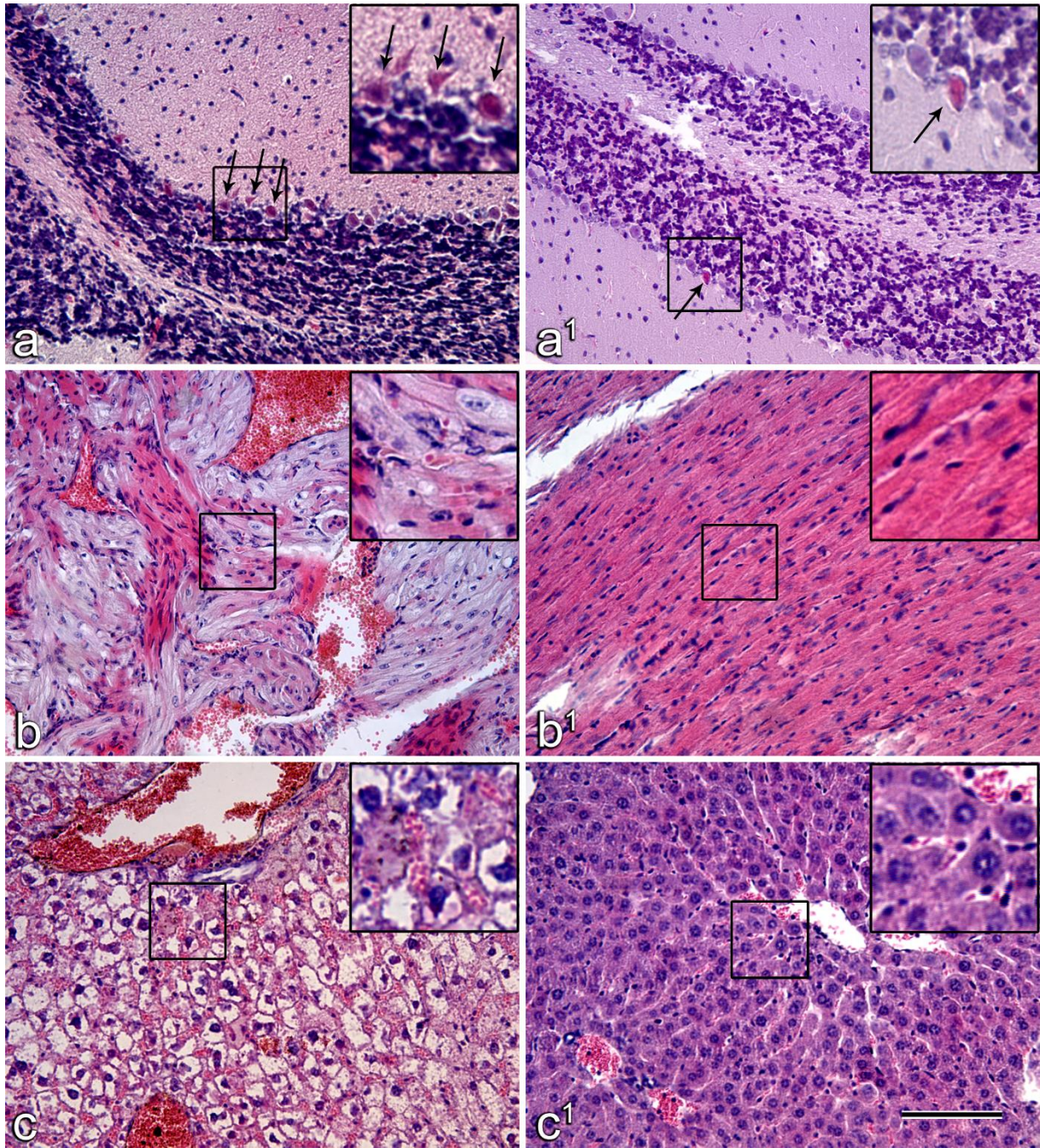
### 2. Патоморфологични изменения в организма на опитните животни след въздействие с отровите от двата подвида.

Специфични промени, характерни за мозъчната тъкан бяха наблюдавани главно в малкия мозък (Фиг. 1a), отразяващи нарушенията в органа при животни третирани с отрова от *Vipera ammodytes meridionalis*. Типични патологични прояви се отчетоха в ганглиевия слой на кората, където бе регистрирано масирано наличие на т. нар. червени неврони, като засегнати са главно на клетките на Пуркиние (крушовидните неврони), което определя факта за силностепенни процеси на исхемия, хипоксия и некроза в тъканта.

В малък мозък при мишки третирани с отрова от *Vipera ammodytes ammodytes* (Фиг. 1a<sup>1</sup>) не бяха наблюдавани нарушения, освен единични червени неврони.

При сърдечната тъкан (Фиг. 1b) бе установена загуба на напречната набразденост, хиалиноподобно избледняване на влакната, загуба на цялостния рисунък характерен за дадения орган, както и наличието на полинуклеарни формирувания в миоцитите. Клетките демонстрират кондензация на хроматина, кариопикноза и хомогенизиране на цитоплазмата. В съдовете беше отчетена силна хемостаза. Описаната патологична находка беше открита както в камерите, така и в предсърдията.

Освен загуба на напречна набразденост, други промени не бяха отразени в препаратата (Фиг. 1b<sup>1</sup>), приготвен от животни третирани с отрова от *Vipera ammodytes ammodytes*, като не се установиха сериозни нарушения в нормалната сърдечна тъкан.



**Фиг. 1.** Малък мозък (**a**), сърце (**b**) и черен дроб (**c**) при мишки след въздействие с отрова от *Vipera ammodytes meridionalis* и малък мозък (**a<sup>1</sup>**), сърце (**b<sup>1</sup>**) и черен дроб (**c<sup>1</sup>**); при мишки, третирани с отрова от *Vipera ammodytes ammodytes*. В ганглиевия слой на кората (**a**) се регистрира масирано наличие на червени неврони, като засегнати са главно на клетките на Пуркиние (стрелки). В сърдечната тъкан (**b**) се установяват загуба на напречната набразденост, хиалиноподобно избледняване на влакната, и наличието на полинуклеарни формирувания в миоцитите. В черния дроб (**c**) се наблюдава силна некроза с дегенеративна вакуолизация, дистрофия на хепатоцитите и нарушаване структурата на жлъчните каналчета. В малкия мозък на опитни животни, третирани с отрова от *Vipera ammodytes ammodytes* (**a<sup>1</sup>**) се наблюдават единични червени неврони (стрелка), в другите органи (**b<sup>1</sup>**) и (**c<sup>1</sup>**), липсват изразени хистотоксични изменения. (Hematoxylin and Eosin staining – H&E). (бар-100µm).

В черния дроб (Фиг. 1с) бе наблюдавана силната некроза с дегенеративна вакуолизация, наподобяваща масирана мастна дистрофия на хепатоцитите, пролиферация на моноклеарни клетки, дезинтеграция на тъканта и нарушаване структурата на жлъчните каналчета при мишките отровени с отрова от *Vipera ammodytes meridionalis*. В синусоидните ампули бе отчетено силно акумулиране на кръв и се установиха елементи на интраваскуларна коагулация.

Описаните промени липсваха при опитните животни третирани с отрова от *Vipera ammodytes ammodytes* (Фиг. 1с<sup>1</sup>), а органа бе с нормална структура и слабо кръвонапълване.

Въпреки, че и при опитните животни отровени с *Vipera ammodytes meridionalis* и тези третирани с отрова от *Vipera ammodytes ammodytes*, бяха наблюдавани сходни промени, по - сериозни морфологични нарушения се установиха при първите, като при тях (Фиг. 2а) бе отчетено увеличаване междуклетъчните пространства, дезинтегриране и набъбване на клетъчните структури. Присъствието на еритроцитни маси определи интерцелуларна диapedеза, особено в гломерула. Установено бе отлюспване на капсулата на Бауман – Шумлянски.

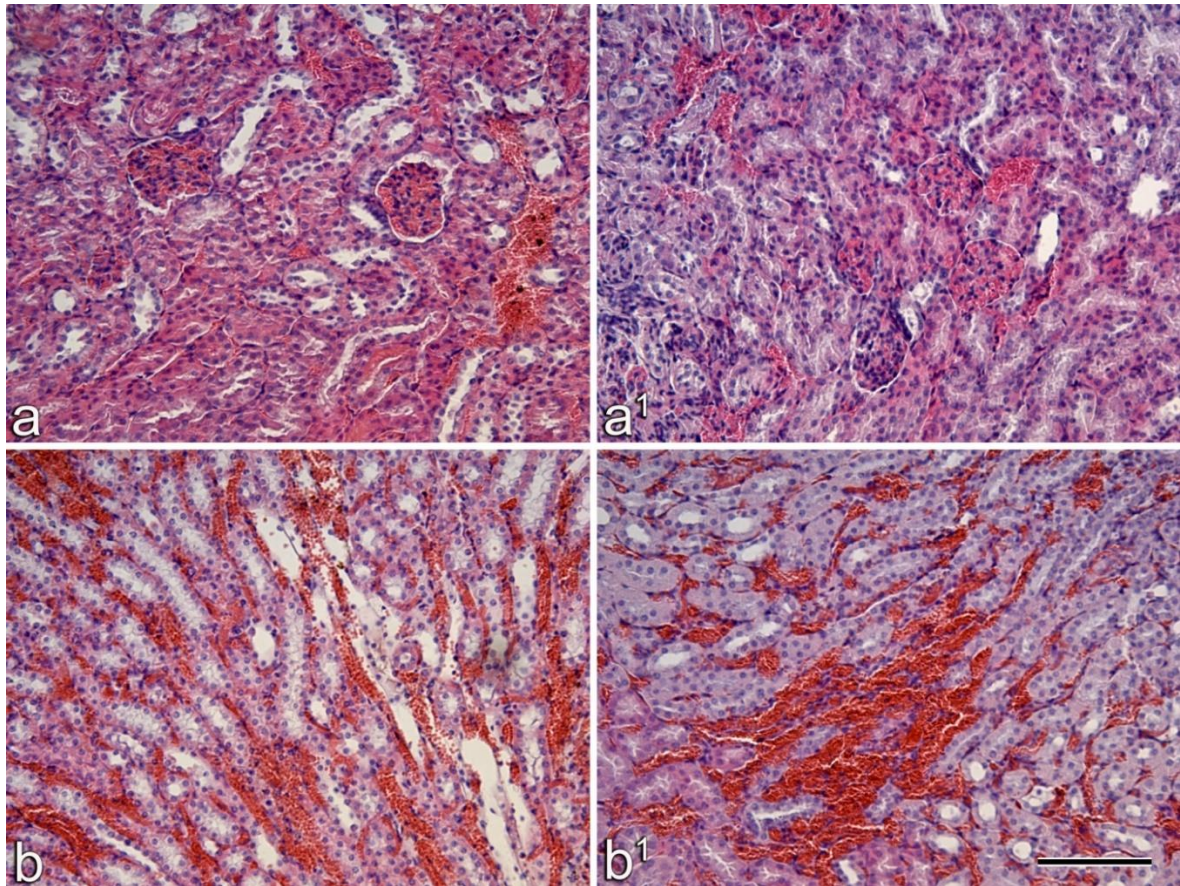
При бъбречния кортекс (Фиг. 2а<sup>1</sup>), от орган на мишки третирани с отровата на *Vipera ammodytes ammodytes*, патологоанатомичната находка показва, че клетките са запазили своята плътност, контурираност и компактност. Кръвоизливи отсъстваха, като еритроцитните маси в съдовете бяха резултат главно от хемодинамични смущения и хемостаза.

Аналогична бе и морфохистологичната картината и в сърцевината на бъбрека. При *vasa recta* на препаратата от мишки отровени с *Vipera ammodytes meridionalis* (Фиг. 2b) отново беше отчетена структурната дезинтеграция на клетъчните елементи, набъбване епитела на тубулите и характеристики на хеморагични процеси с развиващи се процеси на целуларна некроза и некробиоза.

Същите морфологични структури в препаратата на опитни животни третирани с отрова от *Vipera ammodytes ammodytes* (Фиг. 2b<sup>1</sup>) показаха значително кръвонапълване на съдовете, при запазване целостта и морфометричните показатели на епителните клетки, структурираността и архитектурата органа.

Наблюдаваните промени в бъбречната тъкан са неспецифични и отразяват разстройството на бъбречната функция като резултат главно от хемодинамични промени причинени от отровата.



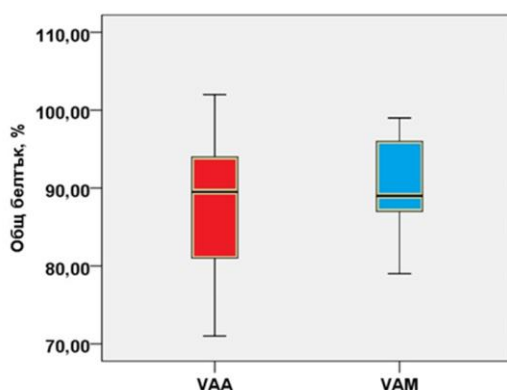


**Фиг. 2.** Кортекс (**a**) и медула (**b**) от бъбрек при мишки, третирани с отрова от *Vipera ammodytes merionalis* и кортекс (**a<sup>1</sup>**) и медула (**b<sup>1</sup>**) от бъбрек; при мишки след въздействие с отрова от *Vipera ammodytes ammodytes*. При опитни животни, обработени с отрова от VAM се установява се увеличаване междуклетъчните пространства в кортекса (**a**). Наблюдават се еритроцитни маси, израз на интерцелуларна диapedеза, с отлюспване на капсулата на Бауман – Шумлянски в гломерула. В сърцевината, при *vasa recta* (**b**), се забелязва набъбване епитела на тубулите, наличие на хеморагични процеси и елементи на структурната дезинтеграция на тъканта. При мишки, подложени на въздействието на отрова от VAA, в кортекса (**a<sup>1</sup>**), клетките са запазили своята плътност, контурираност и компактност. В медулата (**b<sup>1</sup>**) отсъстват кръвоизливи, като еритроцитните маси в съдовете са резултат главно от кръвонасищане. (H&E). (бар-100µm).

На препаратите отчетливо се наблюдава специфичната локализация на тъканен ефект на компонентите от отровата на *Vipera ammodytes merionalis*.

### 3. Биохимичен анализ

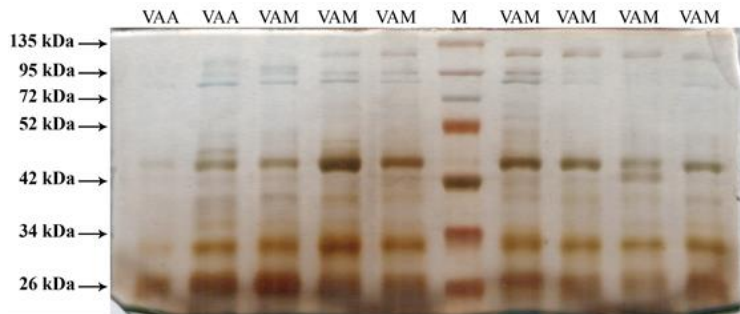
#### 3.1. Съдържание на протеин, установено по метода на Smith.



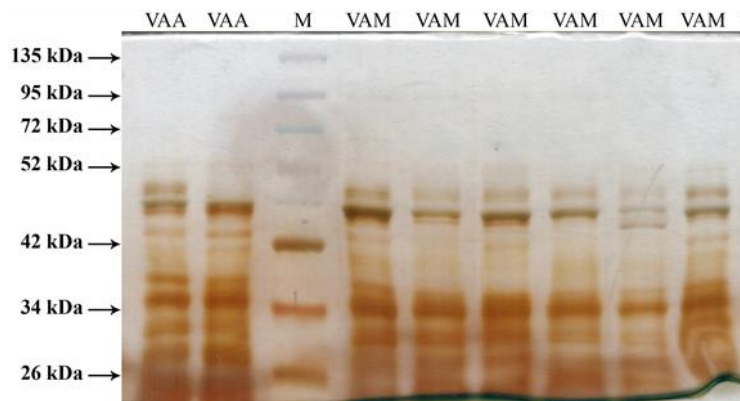
**Фиг. 3.** Не бяха установени статистически достоверни различия в количеството протеин между отровите на двата подвита ( $P=0,557$ ).

### 3.2. Електрофоретичен профил на белтъчните компоненти на отровата

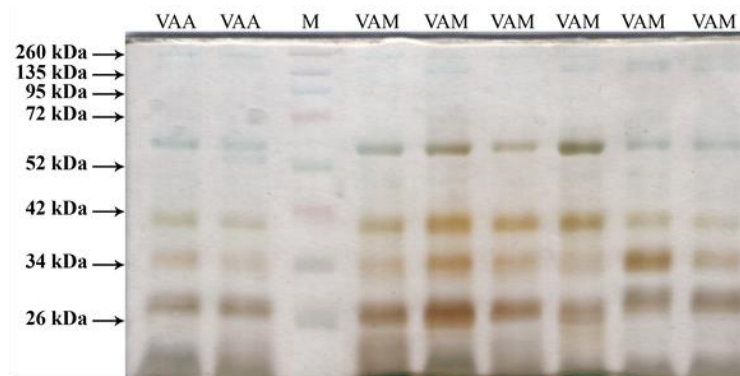
Както при биохимичното изследване на белтъчното съдържание на двата подвида, така и при проучване на електрофоретичното поведение на отровите при нередуциращи (Фиг. 4 и 6) и редуциращи (Фиг. 5 и 7) условия не бяха установени съществени различия в профила на белтъчните фракции.



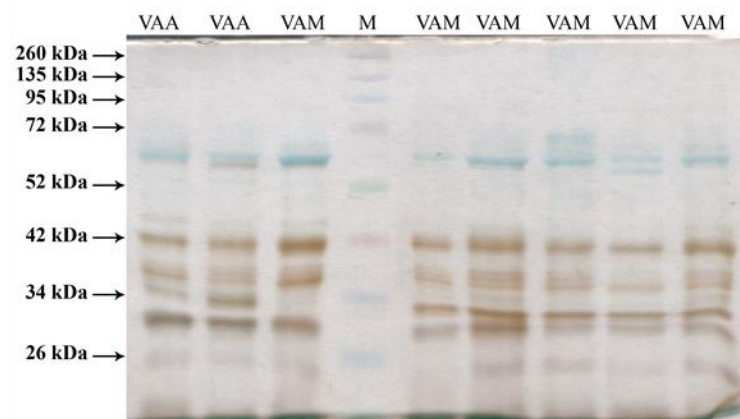
**Фиг. 4.** Електрофоретичен анализ на белтъчно съдържание при 12% полиакриламиден гел (VAA – *Vipera ammodytes ammodytes*; VAM– *Vipera ammodytes meridionalis*; М - маркер). Не се установяват значими различия между двата подвида.



**Фиг. 5.** Електрофоретичен анализ на белтъчно съдържание при 12% полиакриламиден гел при обработване на пробите с  $\beta$ -меркаптоетанол. (VAA – *Vipera ammodytes ammodytes*; VAM – *Vipera ammodytes meridionalis*; М - маркер). Не се установяват значими различия между двата подвида.

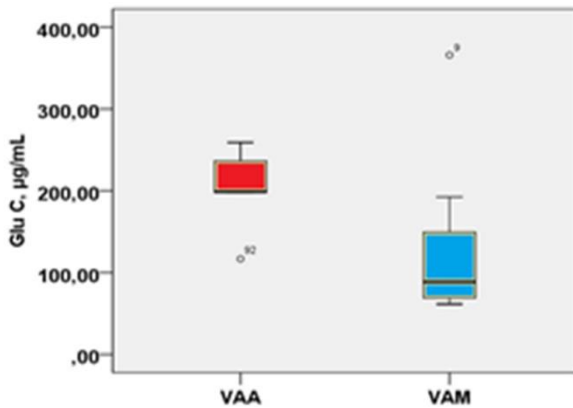


**Фиг. 6.** Електрофоретичен анализ на белтъчно съдържание при 15% полиакриламиден гел. (VAA – *Vipera ammodytes ammodytes*; VAM – *Vipera ammodytes meridionalis*; М - маркер). Не се установяват значими различия между двата подвида.



**Фиг. 7.** Електрофоретичен анализ на белтъчно съдържание при 15% полиакриламиден гел при обработване на пробите с  $\beta$ -меркаптоетанол. (VAA – *Vipera ammodytes ammodytes*; VAM – *Vipera ammodytes meridionalis*; М - маркер). Не се установяват значими различия между двата подвида.

### 3.3. Резултати от проучване въглехидратното съдържание.

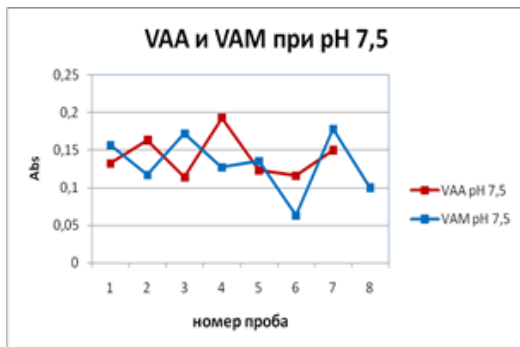


**Фиг. 8.** Присъствието на въглехидрати в отровите е твърде разнообразно и за двата подвида

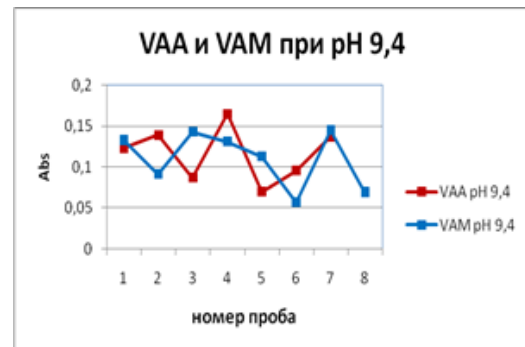
Не бяха отчетени статистически достоверни разлики между отровите на двата подвида ( $P=0,181$ ).

### 3.4. Установена протеазна активност при анализ с азоказеин.

Получените стойности на протеазните активности от двата подвида, графично съпоставени при рН – 7,5 (Фиг. 9) и рН – 9,4 (Фиг. 10), позволиха да се допусне, че както неутралните, така и алкалните протеолитични потенциации не показват видими различия при двата подвида.

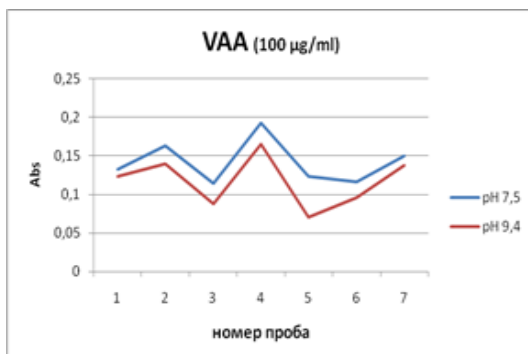


**Фиг. 9.** Графика за протеазната активност при двата подвида при стойности на рН 7,5 (abs-абсорбция). Установяват се аналогични, за двата подвида, резултати.

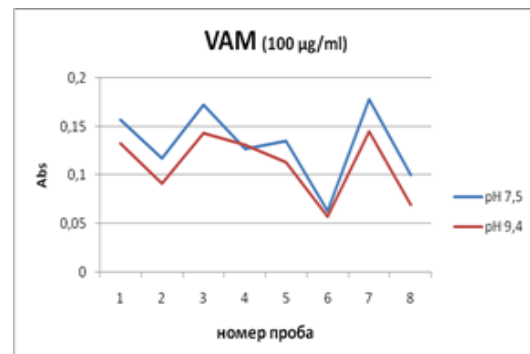


**Фиг. 10.** Графика за протеазната активност при двата подвида при стойности на рН 9,4 (abs-абсорбция). Установяват се аналогични, за двата подвида, резултати.

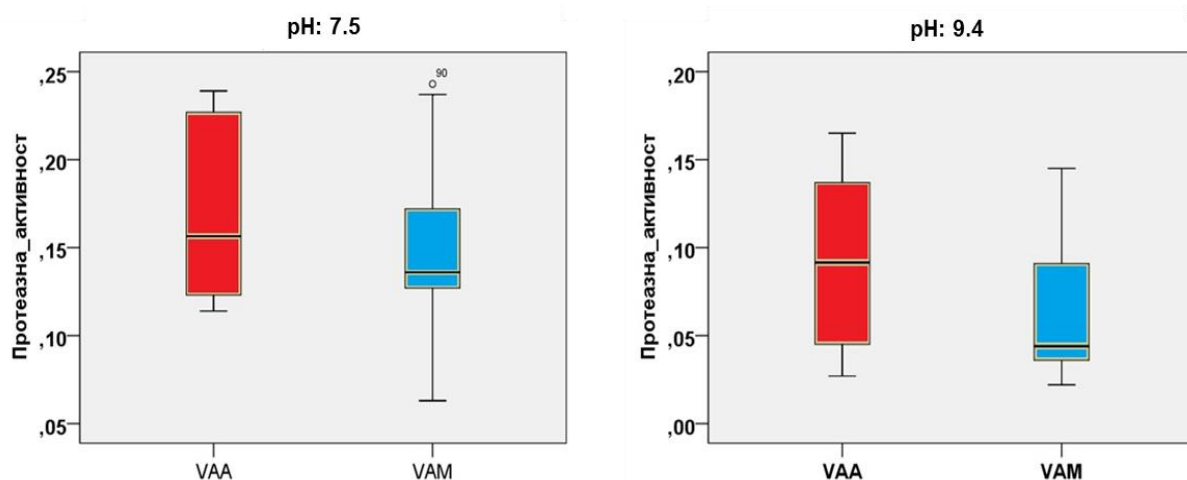
При сравняване стойностите на всеки подвида спрямо собствените му активности при различно рН (Фиг. 11 и 12) се отчита, че неутралните протеази показват, макар и слабо, по-изявена активност.



**Фиг. 11.** Графика за протеазната активност при VAA при двете стойности на рН (abs-абсорбция). Наблюдава се слаб превес на неутралната PLA<sub>2</sub> активност.



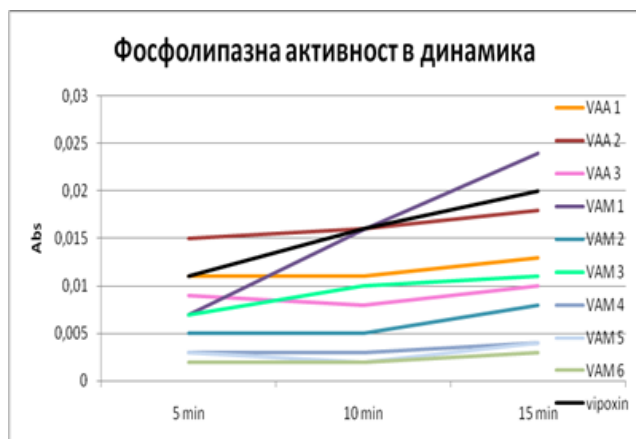
**Фиг. 12.** Графика за протеазната активност при VAM при двете стойности на рН (abs-абсорбция). Наблюдава се слаб превес на неутралната PLA<sub>2</sub> активност



**Фиг. 13.** Статистически анализ на протеазната активност на двата подвида. Не бяха установени статистически достоверни различия между отровите на двата подвида (за рН 7,5  $p=0,214$ ; за рН 9,4  $p=0,123$ ).

### 3.5. Резултати от определянето на фосфолипазната активност.

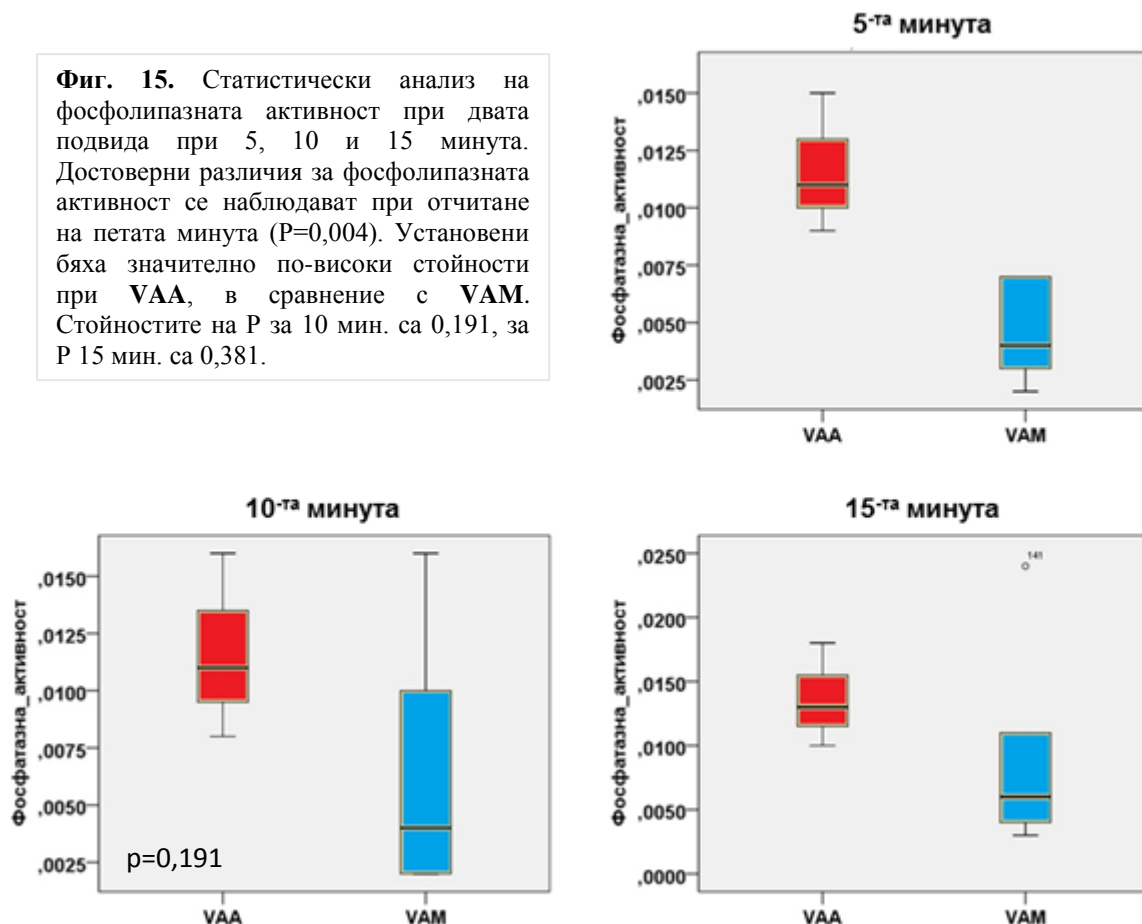
При проследяване на ензимната активност в динамика в експеримента бяха включени представители от двата подвида и една проба, съдържаща випоксин, за съпоставяне на резултатите от наличната в него фосфолипаза с целите отрови на опитните животни. Данните бяха регистрирани на 5-та, 10-та и 15-та минути, като получените числени стойности са представени в графичен вид (Фиг. 14). При проследяване на ензимното действие в динамика, беше установено нарастване на активността на PLA2 с течение на времето, като тенденцията се запазваше, както при двата подвида, така и при випоксина, като при него бе най - убедителна.



**Фиг. 14.** Графика за фосфолипазна активност при двата подвида и випоксин в динамика (abs-абсорбция). Установява се повишаване на активността с течение на времето.

Според статистическия анализ направен за експеримента, отразяващ интензитета на ензимна активност в динамика при двата подвида (Фиг. 15), бе направено заключението, че най-отчетливи различия по отношение на фосфолипазната активност се наблюдават при отчитане на петата минута. Тези различия са статистически достоверни. Установени бяха значително по-високи стойности при VAA, в сравнение с VAM.

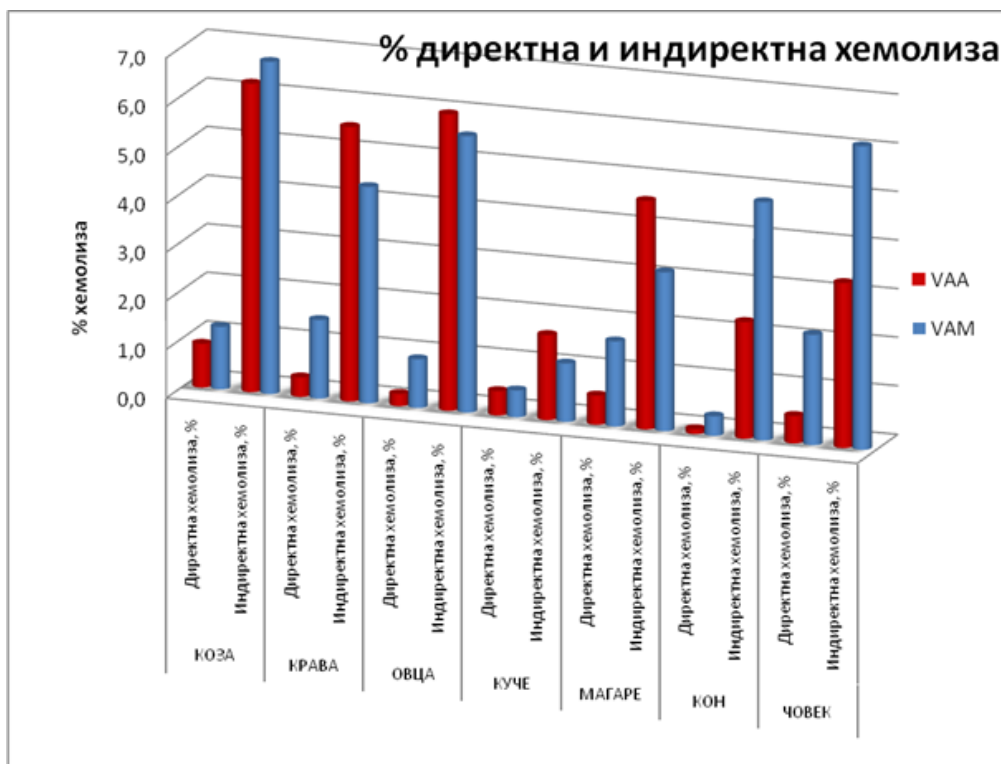
**Фиг. 15.** Статистически анализ на фосфолипазната активност при двата подвида при 5, 10 и 15 минута. Достоверни различия за фосфолипазната активност се наблюдават при отчитане на петата минута ( $P=0,004$ ). Установени бяха значително по-високи стойности при VAA, в сравнение с VAM. Стойностите на P за 10 мин. са 0,191, за P 15 мин. са 0,381.



#### 4. Резултати от функционално изследване на токсичността на отровите *in vitro*.

##### 4.1. Стойности на пряката и непряка хемолитична активност на отрова от двата подвида на пепелянката при различни видове прицелни животни *in vitro*

Графичния модел (Фиг. 16), бе изготвен с цел, не само да даде яснота по отношение директното и индиректното действие на двата подвида върху червените кръвни клетки и представа за специфичната характеристика на действието отровите, но и да онагледи индивидуалната реакция на всеки животински вид. Наложено бе заключението, че директното въздействие на отровите е много слабо при всички изследвани животни (по-малко от 2%), като незначително по - интинзивно е при VAM. Разликата между индиректната и директната хемолиза бе най – силно проявена при преживните животни, най – слаба е при кучето и със средни стойности отново при кон, магаре и човек. След анализ на индиректната активност на двата подвида при кон и човек бе установено, че тази на подвида VAM е почти два пъти по голяма в сравнение с тази на VAA.



**Фиг. 16.** Схема за степента на директна и индиректна хемолиза при различни биологични видове при въздействие с отрова от двата подвида. Индиректната хемолиза е чувствително по-силно изразена, като при кравите, овцете, кучето и магарето е в полза на VAA.

Статистическият анализ (Фиг. 17 и Фиг. 18) показва, че при сравняване на директна с индиректна хемолиза при всички видове животни има достоверни различия. Наблюдавани бяха значително по-високи стойности при индиректната. Изключение правеха показателите (т.е липсат достоверни различия между директна и индиректна хемолиза) на VAA при кучето ( $p=0,155$ ) и VAM при магарето ( $p=0,059$  – като тук коефициента, почти на границата, позволи да се допуснат различия и в този случай).

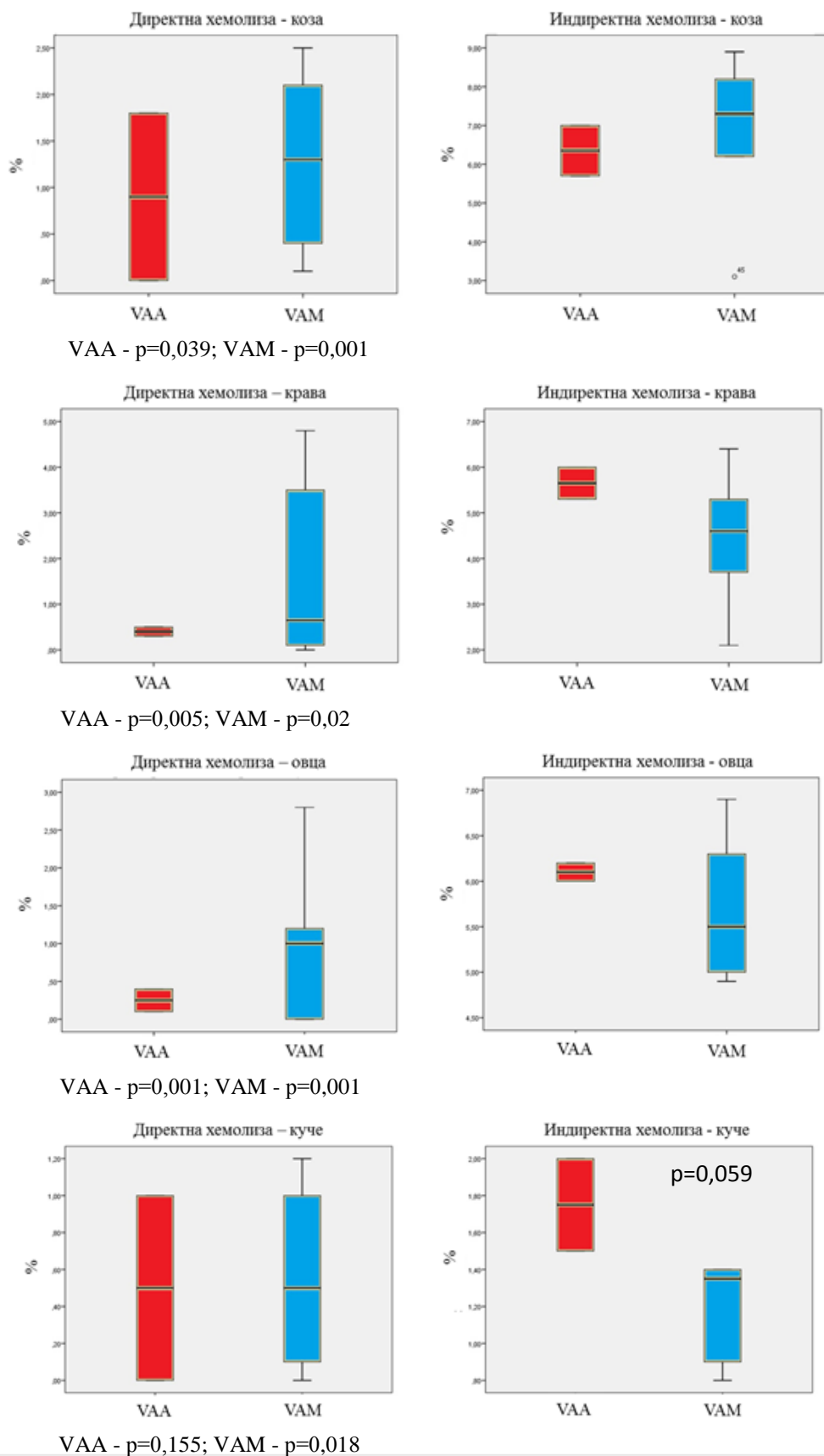
При сравнение на хемолизата между двата подвида, достоверни разлики между отровите на двата подвида бяха наблюдавани при:

- Кон –  $p = 0,016$  при директната хемолиза и  $p = 0,035$  при индиректната хемолиза. Значително по-високи стойности при VAM

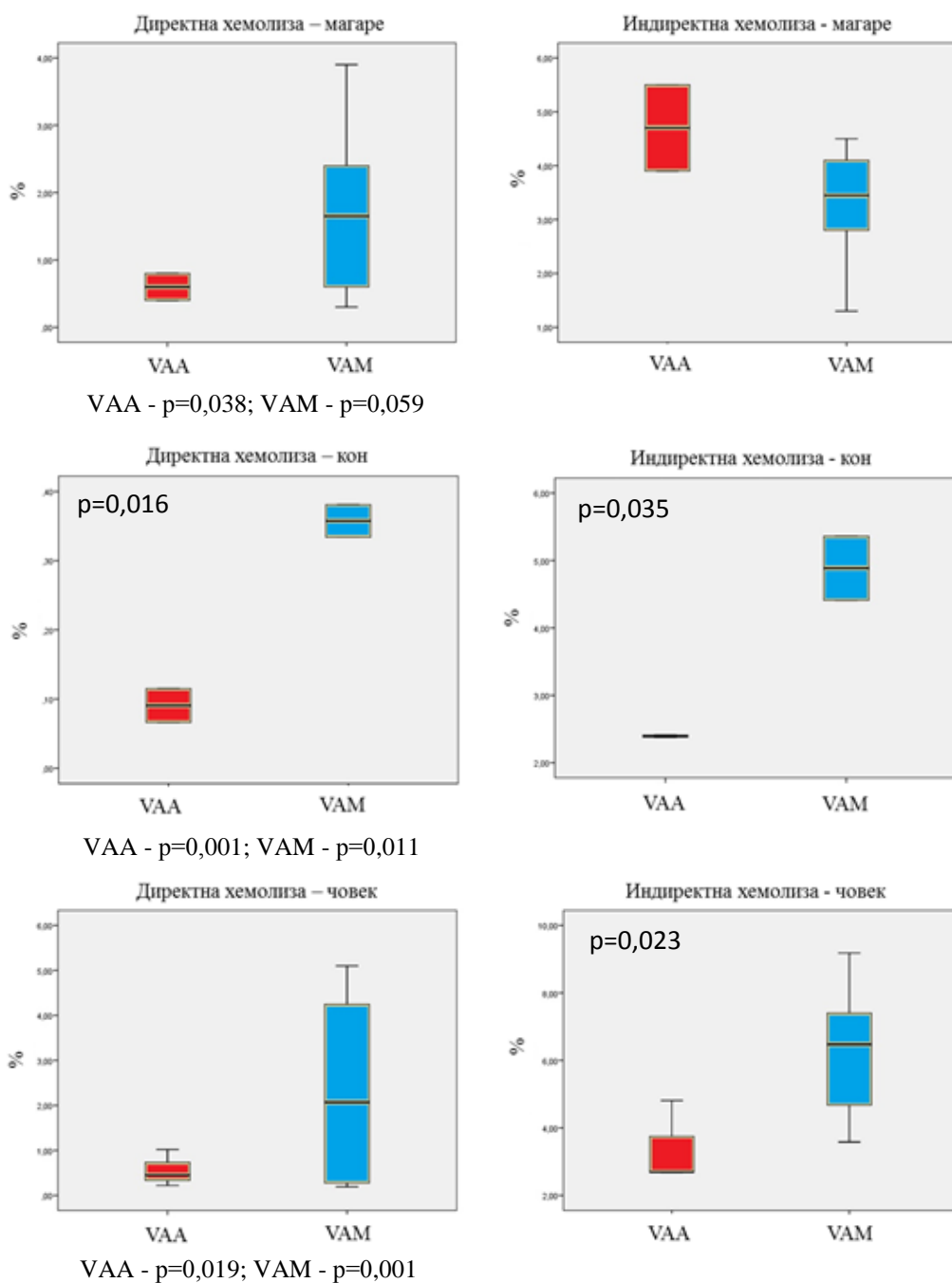
- Куче – само по отношение на индиректната хемолиза –  $p = 0,059$ , като тук, въпреки че „ $p$ ” коефициента е  $> 0,05$ , е много близо до статистическа достоверност, и позволява да се коментират различията – по-ниски стойности при VAM

- Човек, само по отношение на индиректната хемолиза –  $p = 0,023$ . Значително по-високи стойности при VAM

Бе установено, че в най високите си стойности хемолизата не надвишава 10 %, което налага твърдението, че не тя е водещия мотив в интоксикацията.



**Фиг. 17.** Сравнителна статистика на директна и индиректна хемолизата при коза, крава, овца и куче след въздействие с отрова от VAA (червено стълбче) и VAM (синьо стълбче). Индиректната хемоллиза показва статистически достоверни разлики при всички видове (освен за куче при VAA). Под фигурите са нанесени съответните коефициенти за достоверност за дадения вид отрова между директната и индиректната хемоллиза. Неотбелязаните на фигурите „p“ са със стойности по-големи от 0,05.



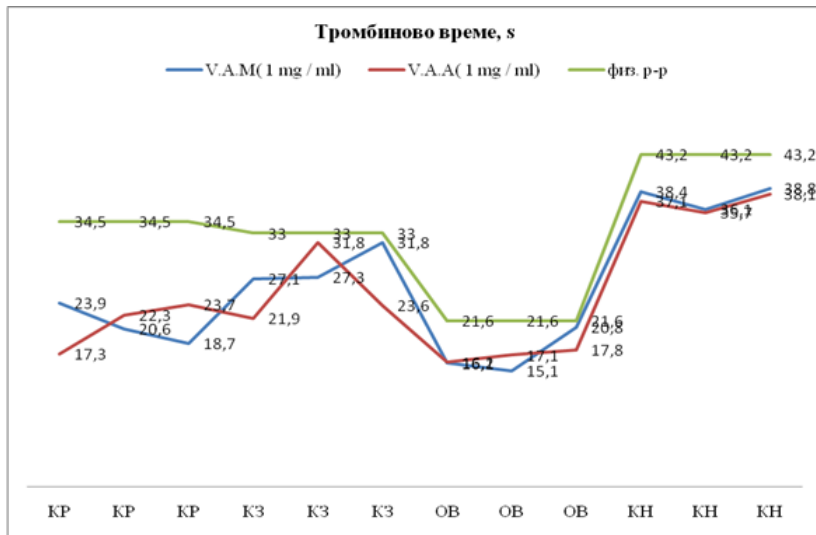
**Фиг. 18.** Сравнителна статистика на директна и индиректна хемолизата при магаре, кон и човек след въздействие с отрова от VAA (червено стълбче) и VAM (синьо стълбче). Индиректната хемолиза показва статистически достоверни разлики при всички видове (освен за магаре при VAM). Под фигурите са нанесени съответните коефициенти за достоверност за дадения вид отрова между директната и индиректната хемолиза. Насенените във самите фигури „p“ е за случаите на достоверни разлики между двата подвида за съответния вид хемолиза. Неотбелязаните на фигурите „p“ са със стойности по-големи от 0,05.



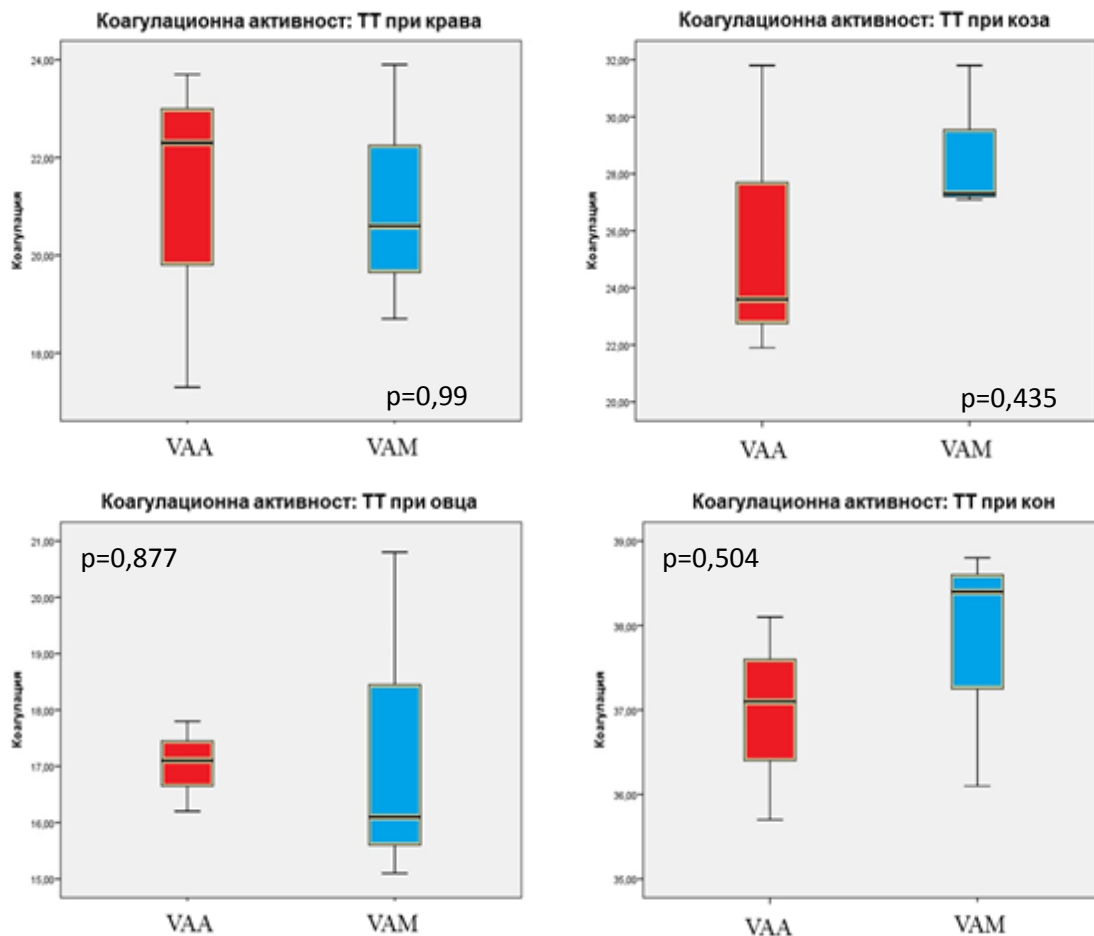
## 4.2. Повлияване на коагулационна и антикоагулантната активност

### 4.2.1. Повлияване на тромбиново време (ТТ)

Проследявайки тромбиновото време след провокация *in vitro* с отровата от подвидовете на пепелянката (Фиг. 19) се наблюдаваха изменения, посочващи слабо скъсяване на времето на кръвосъсирване. Отклоненията от нормата, в случая бяха незначителни и самият фактор, определящ общия път на коагулация бе засегнат слабо.



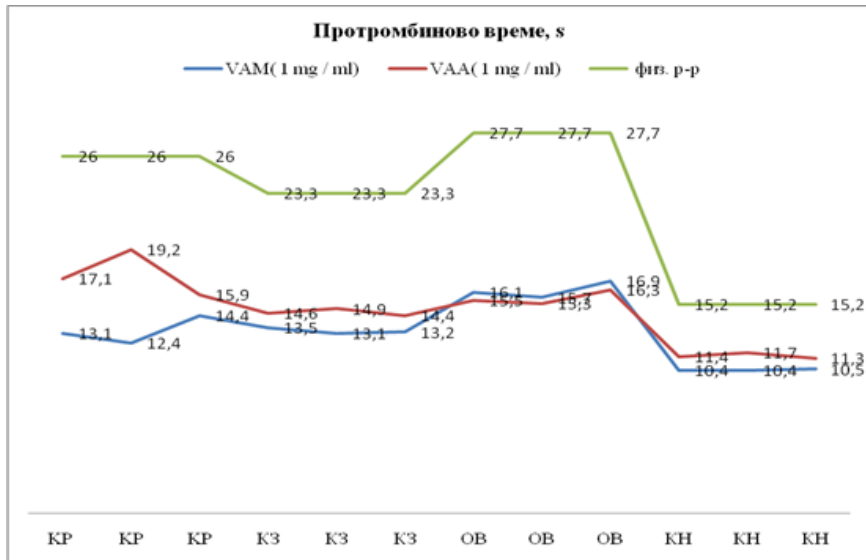
**Фиг. 19.** Графика на коагулацията при провокиране на ТТ (КР – крава; КЗ – коза; ОВ – овца; КН – кон). Отчита се скъсяване времето на коагулация при опитните животни. По – сериозно повлияване в степента на въздействие бе регистрирано при говедото.



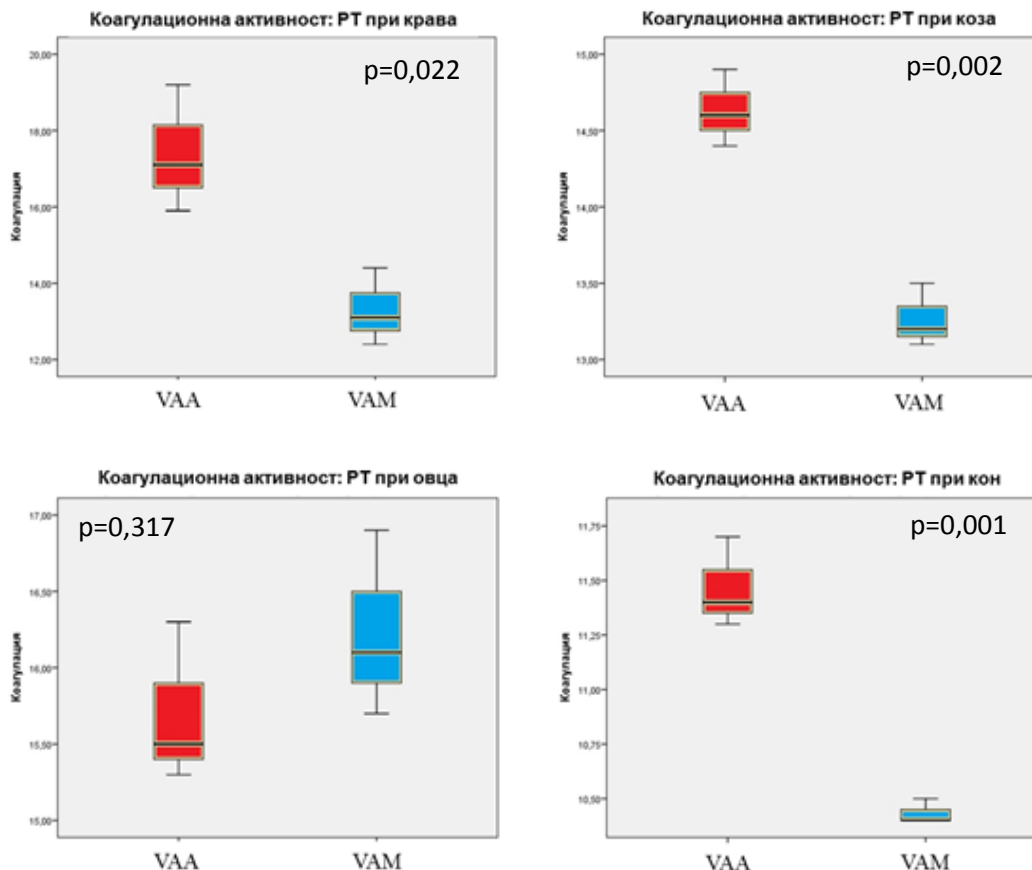
**Фиг. 20.** Статистически анализ на показателят ТТ при различните животни. Не се установяват достоверни различия между отровите на двата подвита и при 4-те вида изследвани животни – коза (p=0,435), кон (p=0,504), крава (p=0,990), овца (p=0,877). Коагулацията (ордината) е измерена в секунди.

#### 4.2.2. Повлияване на протромбиново време (РТ).

При протромбиновото време бяха наблюдавани по - значими отклонения от нормата (Фиг. 21). Всички видове, с изключение на коня, отразяваха чувствителен отговор спрямо влиянието на отровата, с тенденция за скъсяване на времето за коагулация с почти два пъти. Най-сериозна реакция бе отчетена при преживните животни, като се установи по изявен отговор спрямо подвида VAM



**Фиг. 21.** Графика на коагулацията при провокиране на РТ (КР – крава; КЗ – коза; ОВ – овца; КН – кон). Протромбиновото време е повлияно по силно от тромбиновото, като при кравата е скъсено с почти два пъти.



**Фиг. 22.** Статистически анализ на показателя РТ при различните животни. Достоверни различия между отровите на двата подвида при РТ бяха наблюдавани при коза ( $p=0,002$ ), кон ( $p=0,001$ ) и крава ( $p=0,022$ ) – значително по-ниски стойности при VAM. Коагулацията (ордината) е измерена в секунди.

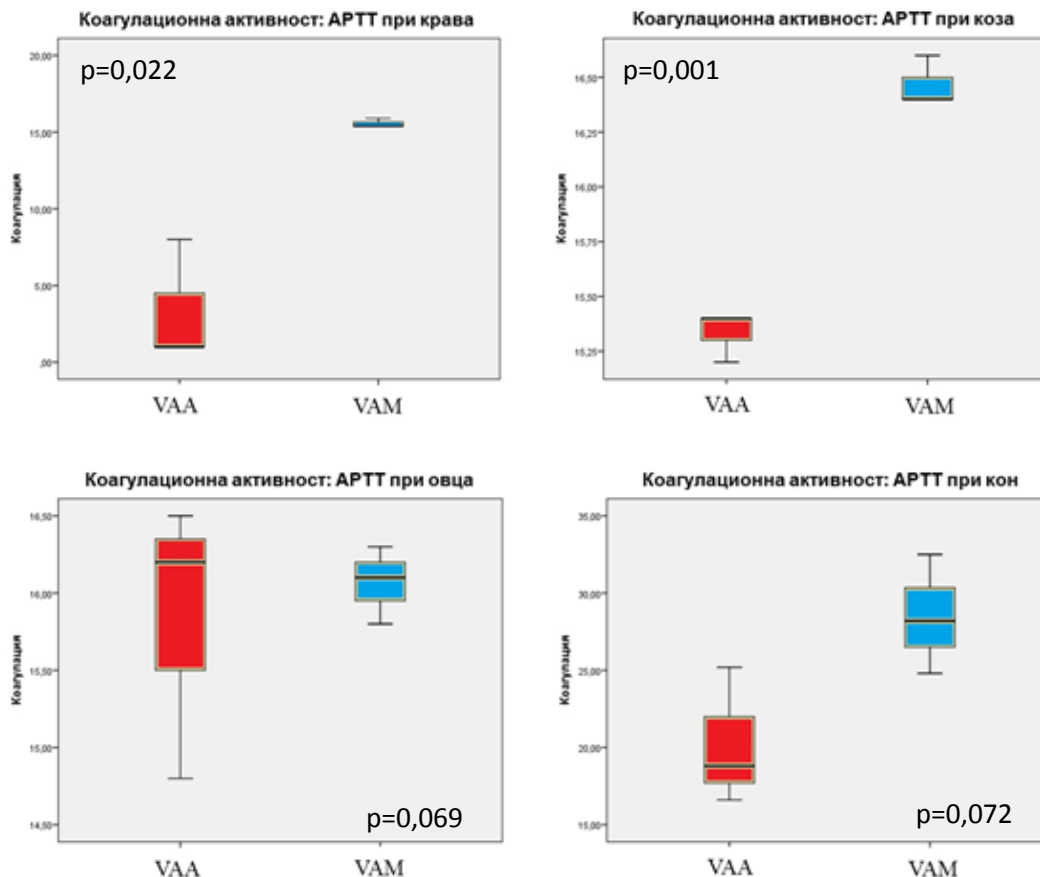
В заключение, може да се приеме, че VAM въздейства върху РТ по-убедително отколкото VAA.

#### 4.2.3. Повлияване на активираното парциално тромбoplastиново време (aPTT).

Активираното парциално тромбoplastиново време е фактора, който бе най-значително засегнат (Фиг. 23). Отново най-сериозните отклонения бяха отчетени при говедото, като коагулацията бе с 12 пъти по-ускорена от нормалното. При другите животни скъсяването на АРТТ бе също значително – 2 до 3 пъти по-бързо от референтните стойности.



**Фиг. 23.** Графика на коагулацията при провокиране на aPTT (КР – кравата; КЗ – коза; ОВ – овца; КН – кон). Показателят, характеризиращ вътрешния път на кръвосъсирване – aPTT, е най-силно повлиян. Наблюдава се скъсяване до 12 пъти на времето за кръвосъсирване при кравата



**Фиг. 24.** Статистически анализ на показателя АРТТ при различните животни. Статистическа достоверност между отровите на двата подвида бе наблюдавана при коза (p=0,001) и кравата (p=0,022) – значително по-силно активност при VAA. Коагулацията (ордината) е измерена в секунди.

## VAA повлиява АРТТ значително по – силно отколкото VAM.

Обобщено за коагулационната активност по трите показателя може да се каже, че достоверни различия между отровите на двата подвида бяха наблюдават при:

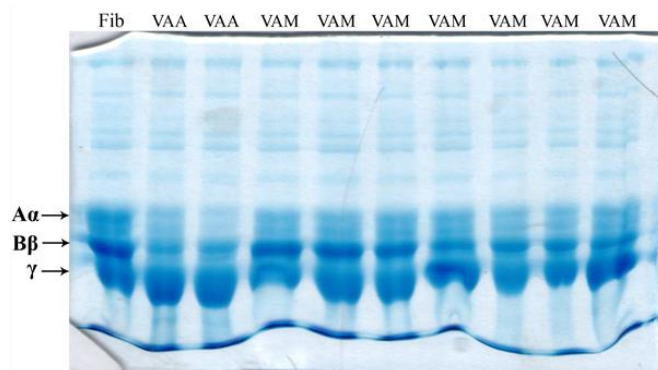
- Коза – по отношение на АРТТ ( $p < 0,001$ ) и РТ ( $p = 0,002$ ) – значително по-високи стойности при VAM за АРТТ и при VAA за РТ
- Кон – по отношение на РТ ( $p = 0,001$ ) - по-ниски стойности при VAM
- Крава – по отношение на АРТТ ( $p = 0,006$ ) и РТ ( $p = 0,022$ ) – значително по-високи стойности при VAM за АРТТ и при VAA за РТ

По-ниските стойности означават по силен ефект.

## VAA повлиява предимно АРТТ, а VAM – РТ.

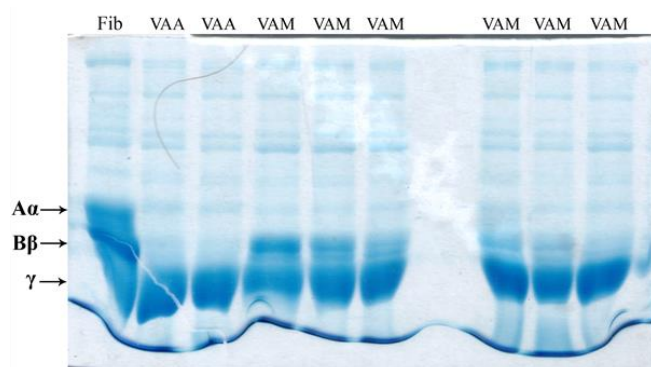
4.2.4. Проследяване промените при фибрино(гено)литичната активност на двата подвида чрез гел-електрофореза

Установи се, че всички изследвани отрови взаимодействат с А $\alpha$ -веригата на фибриногена (Фиг. 25), която всъщност е най-тежката верига от трите му вериги. Отчетено бе, че отровата от *Vipera ammodytes ammodytes* преимуществено разрушава В $\beta$ -веригата на фибриногена, докато при отровата от *Vipera ammodytes meridionalis* тази верига почти не бе повлияна. И при двата подвида  $\gamma$ -веригата оставаше незасегната.



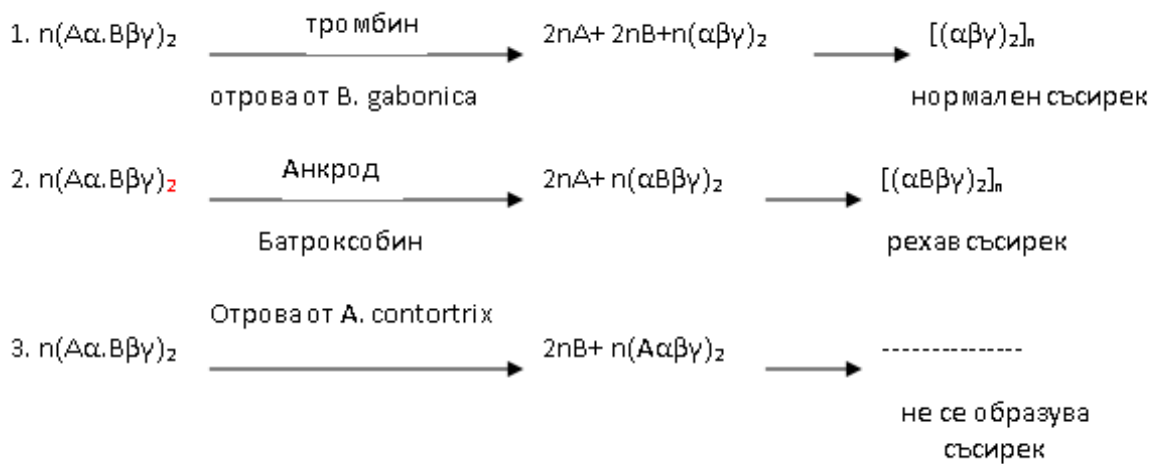
**Фиг. 25.** Електрофоретичен профил на фибриногеннолитичната активност при двата подвида в 12 % полиакриламиден гел (Fib-фибриноген - стандарт, А $\alpha$ -верига на фибриногена, В $\beta$ -верига на фибриногена,  $\gamma$ -верига на фибриногена; VAA - *Vipera ammodytes ammodytes*, VAM - *Vipera ammodytes meridionalis*). Отровата от VAM разрушава и А $\alpha$ - и В $\beta$ -веригите на фибриногена, докато тази от VAA въздейства предимно на А $\alpha$ -

При обработените с ЕДТА отрови (Фиг. 26) А $\alpha$ -веригата на фибриногена практически изчезва, което е признак за пълното ѝ разкъсване. При отровите от *Vipera ammodytes ammodytes* същото се случва и с В $\beta$ -веригата на фибриногена, като при отровите от *Vipera ammodytes meridionalis* тази верига бе засегната, но само частично.



**Фиг. 26.** Електрофоретичен профил на фибриногеннолитичната активност при двата подвида в 12 % полиакриламиден гел при обработка на пробите с ЕДТА (Fib-фибриноген-стандарт, А $\alpha$ -верига на фибриногена, В $\beta$ -верига на фибриногена,  $\gamma$ -верига на фибриногена; VAA- *Vipera ammodytes ammodytes*, VAM - *Vipera ammodytes meridionalis*). VAM разгражда предимно А $\alpha$ -верига на фибриногена, докато VAA лизира и А $\alpha$ - и В $\beta$ -пептидите. Прилагането на хелатиращи агенти не повлиява ензимната фибрино(гено)литична активност на отровите.

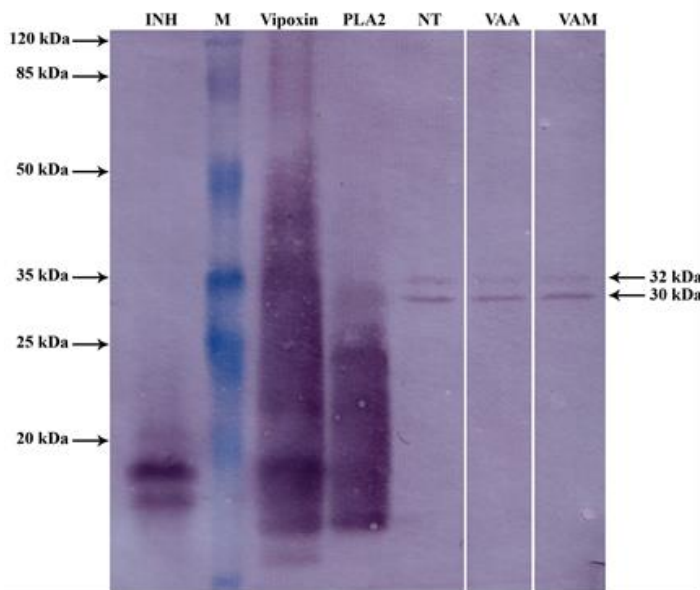
Повечето от коагулиращите протеази на змийските отрови откъсват от фибриногена само 2 фибринопептида (вместо 4), което води до образуването на нездрав (неплътен) съсирек, който трудно се подлага на ретракция.



Разкъсването на веригите на фибриногена от отровата на VAA и VAM е процес, при който се ангажират структурите на пептида в непълноценна форма, с образуване на рехав съсирек и заедно със съпътстващото ускоряване на процесите на хемостаза е един от основните патофизиологични механизми при отавяне с VAA и VAM.

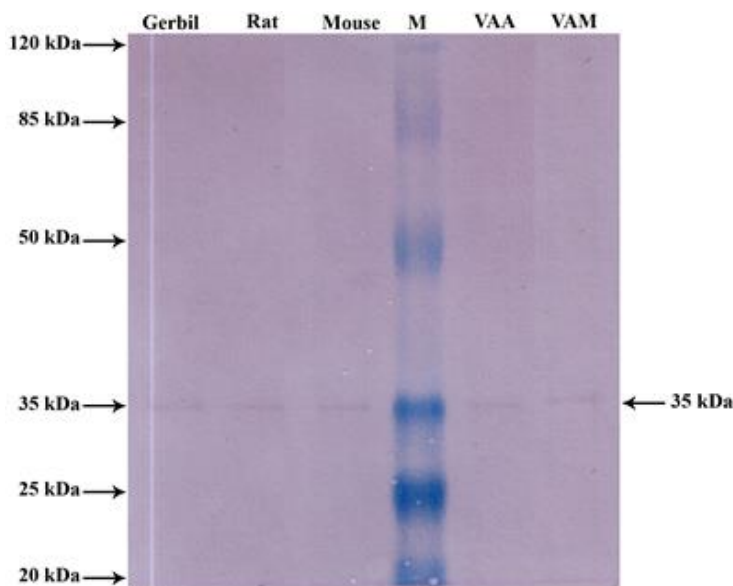
**5. Резултати от проучване на тропизма на невротоксичната субстанция ВИПОКСИН от отровата на *V. ammodytes meridionalis* в организма на опитните животни**

Експериментите се проведоха, като в стартовете бяха приложени лизати от мозък от мишки третиран с отрова от двата подвида, контролни, а също и нативни субстанции от фосфолипаза, кисел компонент и Випоксин. Концентрация на белтък в пробите бе 5 mg/ml. Наличието на структури, разпознавани от използваното антитяло, с молекулна маса около 30 kDa, присъстваше във всяка една от мозъчните проби, включително при контролните животни и тези, третиран с отрова от *Vipera ammodytes ammodytes* (Фиг. 27).



**Фиг. 27.** Имуноблот на мозък от контролни и опитни животни третиран с отрова от двата подвида пепелянка (**Inh**-кисела субединица на vipoxin, **M** – маркер, vipoxin – невротоксин от VAM, **PLA2** – фосфолипаза A<sub>2</sub>, **NT** – нетретирано животно, **VAA** – *Vipera ammodytes ammodytes*, **VAM** – *Vipera ammodytes meridionalis*). Реакция се установява в мозъка при всички животни – при нетретиран (NT) и обработени с отровата на VAA и VAM, на ниво ~ 30 kDa, каквато е масата на випоксина.

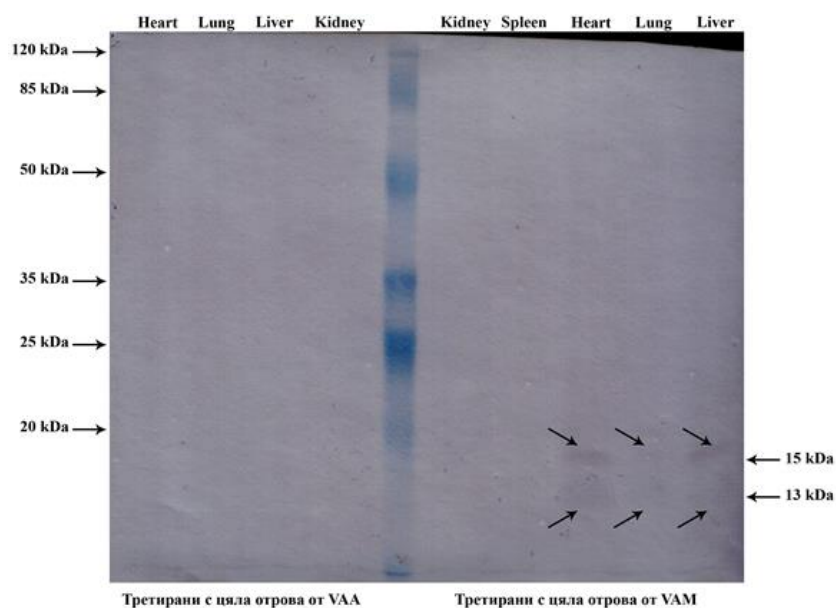
В стартовете с препаратите от мозъци на плъх и джербил също бе установено наличието на белтък (Фиг. 28), разпознаван от антитялото на ниво 30 kDa.



**Фиг. 28.** Имуноблот на мозък от джербил, плъх и контролни мишки, необработвани с отрова и от опитни животни третиран с отрова от двата подвида пепелянка (**Gerbil** – лизат от мозък на джербил, нетретиран; **Rat** – лизат от мозък на плъх, нетретиран; **Mouse** – лизат от мозък на контролна мишка, нетретирана; **M** – маркер; **VAA** – лизат от мозък на мишка, третирана с VAA; **VAM** – лизат от мозък на мишка, третирана с VAM). Във всички проби се установява наличие на ивици на ниво 30 kDa, вкл. и при добавените препарати от мозъци от плъх и джербил.

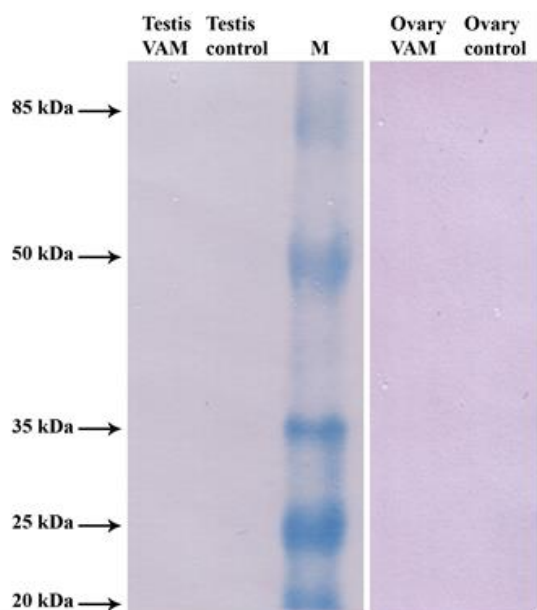
**В мозъка съществуват нормални структури, реагиращи имунологично с антитялото срещу Випоксин.**

За доказване компонентите на випоксина, за анализ бяха включени проби от вътрешни органи на мишки, третирани с отровата на VAA и VAM. Гелът бе с концентрация на пробите по отношение на белтъчното съдържание 5 mg/ml. В стартовете, в които бяха разположени хомогенати от сърце, черен и бял дроб, получени от опитни животни, на които е въздействано с отрова от *Vipera ammodytes meridionalis* (Фиг. 29) се визуализираха ивици (стрелки), с тегло на белтъчната молекула около 14 – 15 kDa и с електрофоретично поведение като това на субединиците на випоксина, регистрирано на стартовете от предишен гел, прилаган в тях като нативна субстанция. При стартовете с хомогенати от бъбрек и далак от същия подвид, както и при всички препарати получени от мишки, третирани с отровата на подвида *Vipera ammodytes ammodytes*, реакция не бе отчетена.



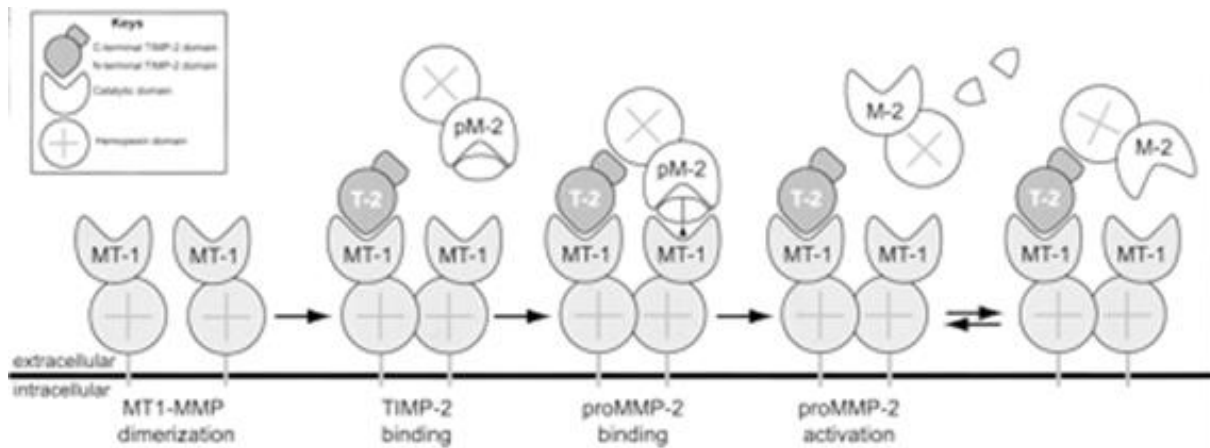
**Фиг. 29** Вътрешни органи от опитни животни третирани с отрова от VAA и VAM (**Heart** – сърце; **Lung** – бял дроб; **Liver** – черен дроб; **Kidney** – бъбрек; **Spleen** – далак). Реакция в пробите с вътрешни органи се установява само при опитните мишки, третирани с отрова от VAM, на ниво 13 – 15 kDa, отговарящо на молекулните тегла на компонентите на випоксина и то единствено при сърце, бял и черен дроб (стрелки).

На мембраната за проследяване разпределението на компонентите на випоксина в тъканта на тестисите и яйчниците не бе установено наличието на реакция (Фиг. 30).



**Фиг. 30.** Имуноблот с проби от тестиси и яйчници при контролни и опитни животни третирани с отрова от подвида VAM (**Testis VAM** – тестис от третирано с VAM животно; **Testis control** – тестис от нетретирано животно, **M** – маркер; **Ovary VAM** – яйчник от третирано с VAM животно; **Ovary Control** – яйчник от нетретирано животно). Не се установяват структури в изследваните органи, имащи имунологично отношение към използваното от нас анти тяло.

Факта, че в препаратите от мозък на третираните с VAM опитни животни не се установяват ивици на ниво ~14 kDa, налага заключението, че функционалната структура на Випоксина, в условията на мозъчната тъкан, е димерната му форма, а не просто химичната активност на съдържащата се в него Фосфолипаза, като киселата субединица е от значение за междумолекулните взаимоотношения и определя лиганд-опосредствени механизми с рецепторния апарат на нервните клетки, отключващи специфичен маниер на клетъчна сигнализация, вероятно по начин, предложен за действието на матриксните металопотеинази.

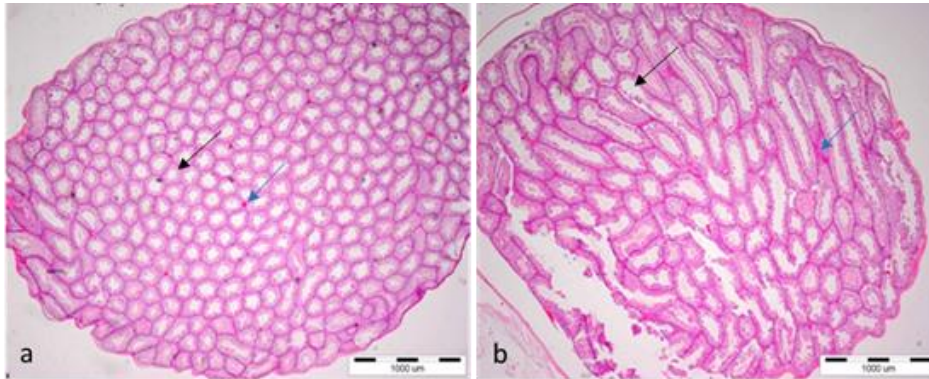




## **6. Патологоанатомичен анализ на репродуктивните органи след въздействието с цяла отрова от *Vipera ammodytes meridionalis***

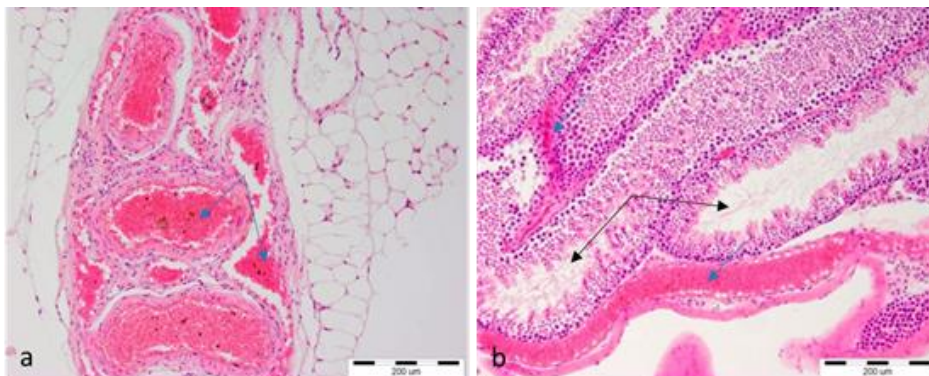
### **6.1. Патоморфологични нарушения при тестис**

Тъканта от тестис при най-малкото увеличение (Фиг 31а) демонстрира нормален общ рисунък, с характерната за органа архитектура. Съдовете са плътни и компактни. Общата му структура при индивид третиран с отрова (Фиг.31б) показва силното кръвонапълване, което е признак за нарушена хемостаза. Съдовете бяха разширени и пространството между семенните каналчета бе увеличено в сравнение с контролата, с процеси на дезинтеграция.



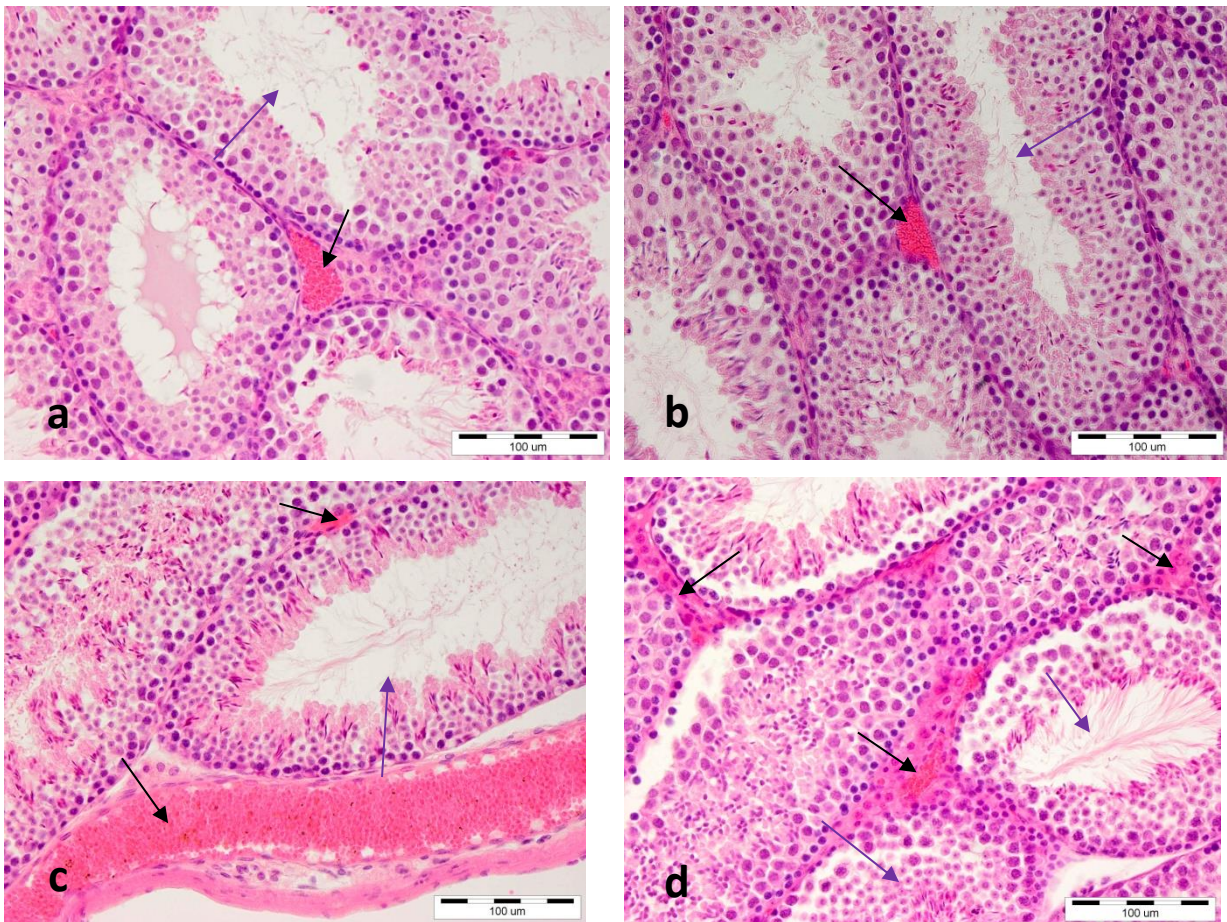
**Фиг. 31.** Тестис от контролно (а) и опитно, третирано с отрова от VAM, животно (б). Тъканта при контролите (а) демонстрира нормален общ рисунък при семенните каналчета (черна стрелка), с характерната за органа архитектура. Съдовете са плътни и компактни (синя стрелка). На препаратата от третиран с отрова от VAM мишки (б) се наблюдава разширение на кръвоносните съдове и силна хемостаза (синя стрелка). В семенните каналчета (черна стрелка) се установяват процеси на дезинтеграция с кръвонасядане и увеличаване на пространството между тях. Налице е разслояване на герминативния епител в сравнение с контролата. Н&Е. Увеличение 40X (бар - 1000  $\mu\text{m}$ ).

В кръвоносните съдове на надсеменник, при третирано животно (Фиг.32а) се установи силна хиперемия. Отчетени бяха и процеси на аглутинация на червените кръвни клетки, сочещи за високостепенни хемодинамични смущения. Промените в тестиса при по-голямо увеличение (Фиг. 32b) демонстрираха процеси на задълбочени хематологични нарушения, подчертавайки картината на еритроцитно увреждане. Наблюдавани бяха разляти кръвоизливи в интерстициума и между семенните каналчета.



**Фиг. 32.** Надсеменник (а) и тестис (б) от опитно животно, третирано с отрова от VAM. Кръвоносните съдове (сини стрелки) при надсеменника (а) показват силна хиперемия. Отчитат се и процеси на високостепенна аглутинация. При тестиса (б) се установява силна хемостаза (сини стрелки) и разляти кръвоизливи в интерстициума. В лумена на семенните каналчета (черни стрелки) се наблюдава разслояване на тъканта. Н&Е. Увеличение 200X (бар - 200  $\mu\text{m}$ ).

При най-голямото увеличение на препарата (Фиг.33а и 33b) бяха отчетени ясно различни и оформени съдове, с добре очертан рисунък на еритроцитите. Тъканта на семенните каналчета бе в норма и интерстициалните полета бяха с подреден контур. При увеличение 100µm на препарат от тестис от третирана мишка (Фиг.33c и 33d), се наблюдаваше видимо увеличение на интерстициалното пространство и разединяване на тъканта на герминативния епител в семенните каналчета, което бе белег за проява на явна хистотоксичност. Нарушен бе рисунъка на червените кръвни клетки, и се установи увреждане в целостта на кръвоносните съдове.



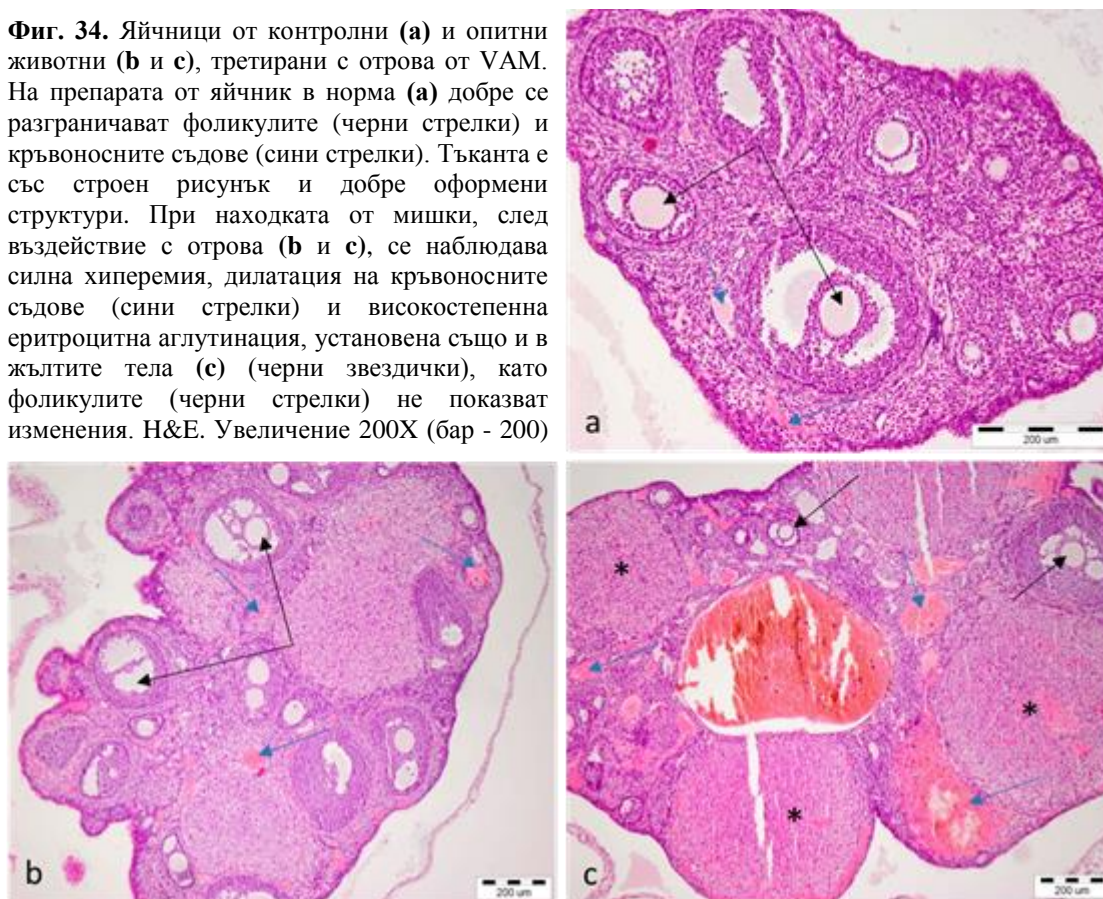
**Фиг. 33.** Тестиси от контролни (a и b) и от опитни животни (c и d), третирани с отрова от VAM. При контролите (a и b) се виждат ясно различни и оформени съдове (черна стрелка), с добре очертан рисунък на еритроцитите. Тъканта на семенните каналчета (синя стрелка) е в норма и интерстициалните полета са с подреден контур. На препарата от тестис при третирана мишка (c и d), се наблюдава разединяване на тъканта на герминативния епител в семенните каналчета (синя стрелка), с кръвонасядане и видимо увеличение на пространството между тях. Нарушена е формата на червените кръвни клетки, и се установяват увреждане в целостта на кръвоносните съдове (черна стрелка). Н&Е. Увеличение 400X (бар - 100 µm).

## 6.2. Патоморфологични нарушения при яйчник

На препаратата от яйчник в норма (Фиг. 34а) добре се разграничаваха фоликулите и кръвоносните съдове. Тъканта бе със строен рисунок и добре оформени структури. При находката от третирани животни (Фиг.34б и 34с) се наблюдаваше силна хиперемия, дилатация на кръвоносните съдове и високостепенна еритроцитна аглутинация, размиваща на препаратата обичайната форма на червените кръвни клетки.

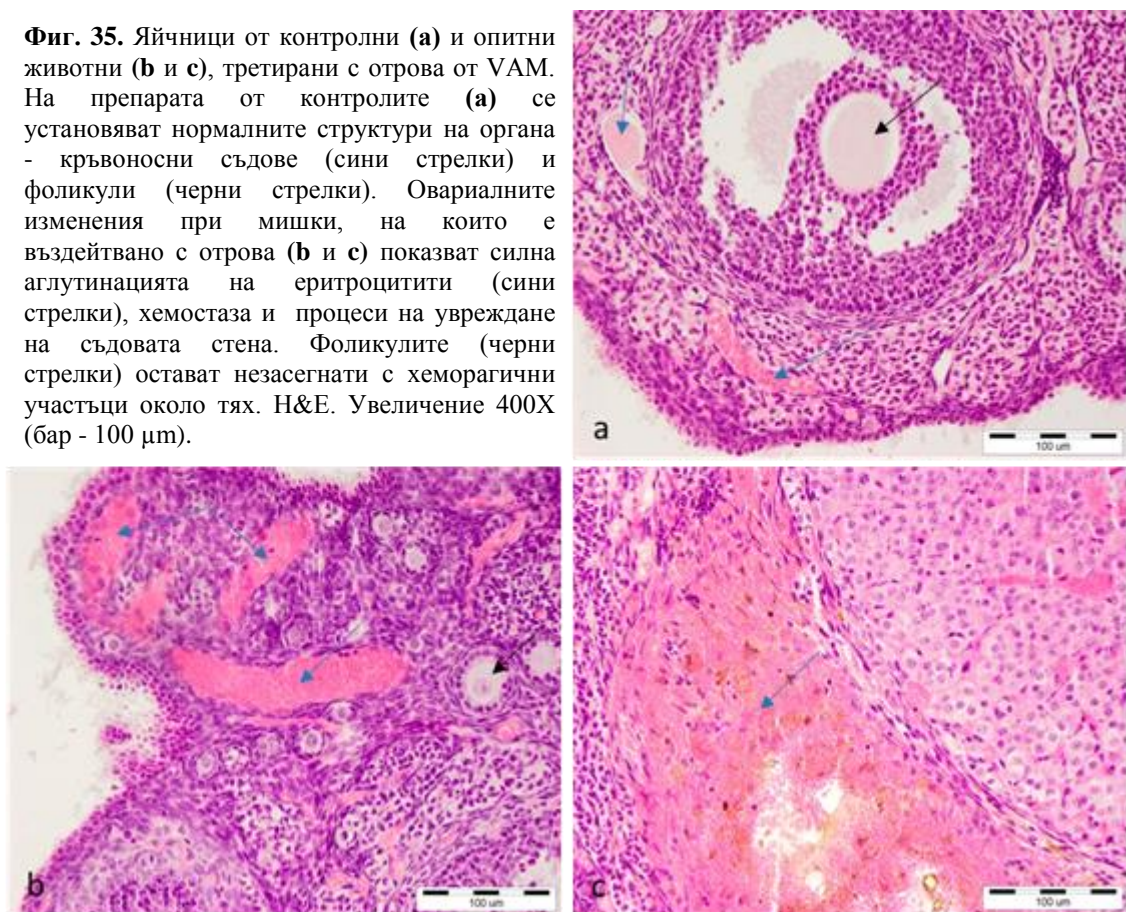
Отчетени бяха по-високостепенни промени по отношение на хемотоксичната активност на отровата в сравнение с тестисите.

**Фиг. 34.** Яйчници от контролни (а) и опитни животни (б и с), третирани с отрова от VAM. На препаратата от яйчник в норма (а) добре се разграничават фоликулите (черни стрелки) и кръвоносните съдове (сини стрелки). Тъканта е със строен рисунок и добре оформени структури. При находката от мишки, след въздействие с отрова (б и с), се наблюдава силна хиперемия, дилатация на кръвоносните съдове (сини стрелки) и високостепенна еритроцитна аглутинация, установена също и в жълтите тела (с) (черни звездички), като фоликулите (черни стрелки) не показват изменения. Н&Е. Увеличение 200Х (бар - 200)



При сравнение на тъканта на нормален (Фиг. 35а) яйчник с тази от третирани опитни животни (Фиг. 35б и 35с), при по-голямо увеличение, бяха отчетени морфологичните изменения, потвърждаващи дълбоките хемодинамични разстройства. Реологични отклонения, компрометиращи кръвоснабдяването на органа, в резултат от хемокоагулацията и аглутинацията на еритроцитите, на фона на увреждане на съдовата стена, могат да бъдат приети като причина за прогресиращи дистрофични процеси в органа.

**Фиг. 35.** Яйчници от контролни (а) и опитни животни (b и c), третирани с отрова от VAM. На препаратите от контролите (а) се установяват нормалните структури на органа - кръвоносни съдове (сини стрелки) и фоликули (черни стрелки). Овариалните изменения при мишки, на които е въздействано с отрова (b и c) показват силна аглутинацията на еритроцитите (сини стрелки), хемостаза и процеси на увреждане на съдовата стена. Фоликулите (черни стрелки) остават незасегнати с хеморагични участъци около тях. Н&Е. Увеличение 400X (бар - 100 µm).

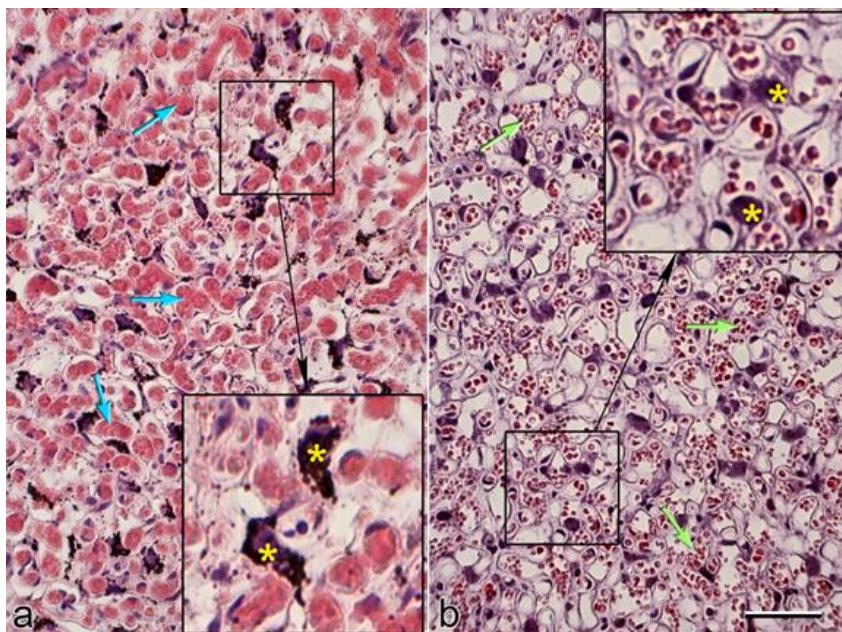


Патоморфологичните изменения в репродуктивните органи са резултат от неспецифичните, хемодинамични потенциации на отровата.

## **7. Установяване степента на плацентарни увреждания и ембриотоксичност при мишки в последния етап на бременността след въздействие с цяла отрова от *Vipera ammodytes meridionalis***

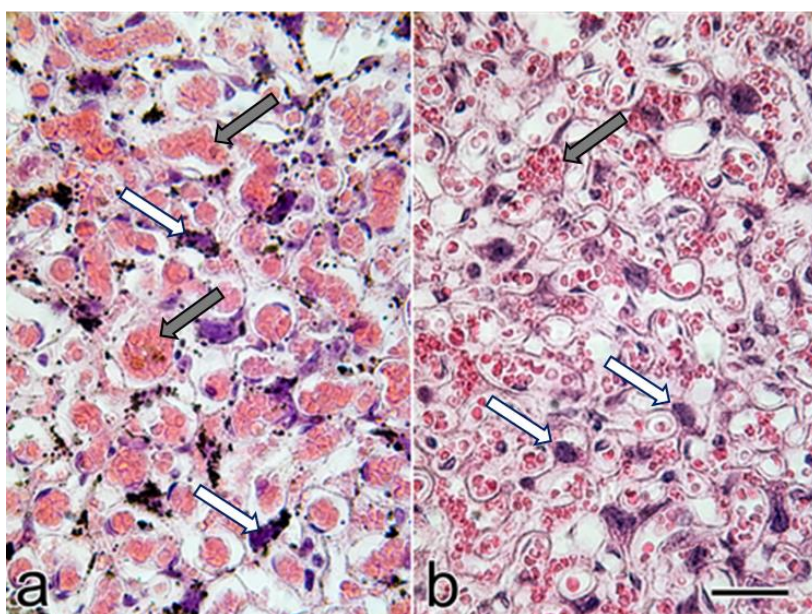
### **7.1. Хистотоксични изменения при плацентата**

Сравнявайки опитните (Фиг. 36a) и контролните групи (Фиг. 36b), поражения се установиха в областта на преплитане на структурите на ембрионалната и майчината плацента. Отчетени бяха тежки хемотоксични разстройства като венозен застой, слепване на еритроцитите, дилатация на съдовете, аморфна структура на засегнатата тъкан при третираните животни. Гигантските трофобласти бяха с дистрофични изменения и със силно сгрупване в и около тях на тъмен пигмент с неизяснен произход. Установена бе дезинтеграция на клетъчната мембрана.



**Фиг. 36.** Плаценти при третиранни (a) с отрова от VAM и контролни (b) животни. При опитните мишки (a) се установява венोजен застой, слепване на еритроцитите, дилатация на съдовете (сини стрелки), аморфна структура на засегнатата тъкан. Гигантските трофобласти (жълти звездички) са с дистрофични изменения и със силно струпване около и в тях на тъмен пигмент. Наблюдава се дезинтеграция на клетъчната мембрана. В препаратата от плацента на контролите (b) съдовете (зелени стрелки) са с правилен контур. Съдържат нормални по форма и ясно разграничими еритроцити. Гигантските трофобласти (жълтите звездички) са компактни и нормално структурирани. Н&Е. (бар -

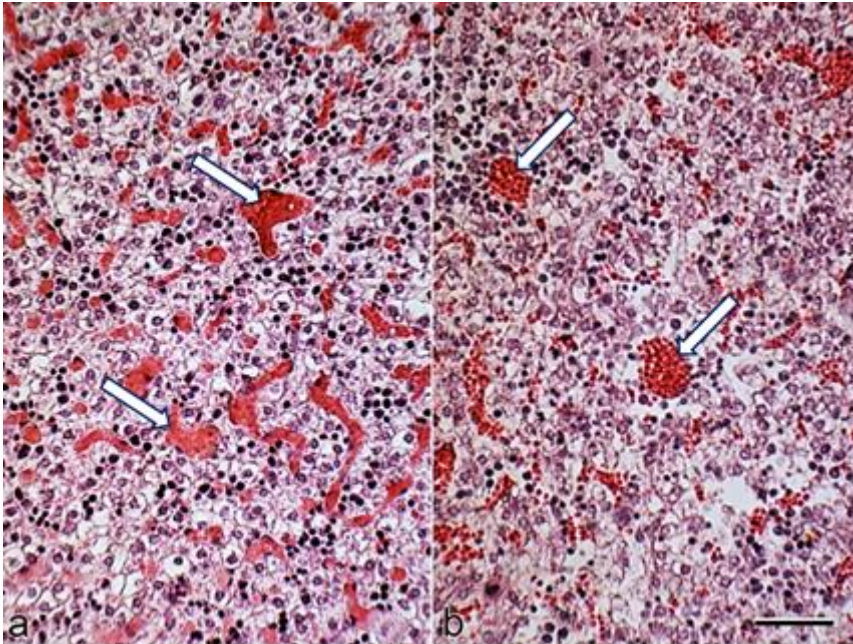
На препаратата от третирано животно (Фиг.37a) бяха наблюдавани отчетливи промени в кръвоносните съдове, препълнени с аглутиниращи еритроцити, в сравнение с нормалната плацентарна структура (Фиг.37b). Установява се разслояване на структурите в основната тъкан на плацентата, в сравнение с контролите. Отчетено бе наличието на хиперпигментирани участъци под формата на микрогранули около гигантските трофобласти на плацентата (бели стрелки).



**Фиг. 37.** Плаценти при третиранни (a) с отрова от VAM и контролни (b) животни. При опитните мишки (a) се установява еритроцитна аглутинация (сиви стрелки), хиперпигментация, в и около гигантските трофобласти (бели стрелки) и дезинтеграция на тъканта. В нормалната плацента (b) съдовете са оформени (сиви стрелки) с добре различими и с правилен контур червени кръвни клетки. Гигантските трофобласти са структурирани и компактни (бели стрелки). Н&Е. (бар – 30)

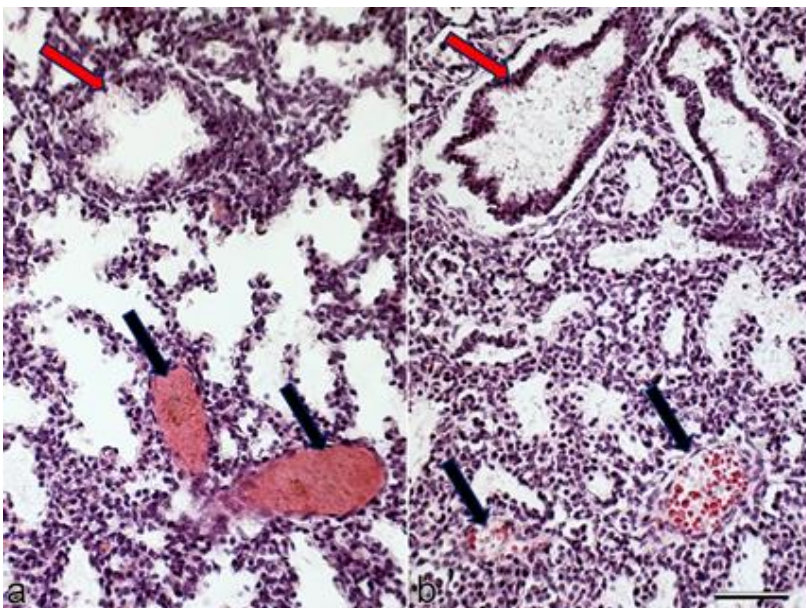
## 7. 2. Морфологични увреждания в тъканите и органите на ембрионите

При фетусите силно повлияни бяха кръвоносните съдове на черния дроб (Фиг. 38a) в сравнение с нормата (Фиг. 38b). Наблюдавана бе проява на високостепенно хемодинамично разстройство, изразено с наличието на масирана еритроцитна аглутинация, дилатация на кръвоносните съдове и венозен застои, сочещи компрометирана циркулация и увеличената съдова пропускливост, причина за усилена миграция на течност и процеси на анабиоза и дистрофия в засегнатите структури.



**Фиг. 38.** Черен дроб от ембриони, получени от опитни (a), третирани с отрова от VAM и контролни (b) животни. При фетусите от мишки, на които е въздействано с отрова (a) се наблюдава масирана еритроцитна аглутинация (бяла стрелка), венозен застои и силно кръвонасищане. На препарата от контролите (b) червените кръвни клетки (бяла стрелка) са ясно разграничими и с нормална форма. Н&Е. (бар - 50 μm).

Констатирана бе тежка аглутинация на червените кръвни клетки (Фиг. 39a), в сравнение с контролите (Фиг. 39b), дилатация и препълване на съдовете с кръв, обтурация на лумена им с еритроцитни маси. Наблюдавана бе стаза и белодробен оток. Установи се видимо разслояване на прилежащата, около кръвоносните съдове, белодробна тъкан. Отровата проявява избирателна токсичност към феталните тъкани.



**Фиг. 39.** Бял дроб от ембриони, получени от опитни (a), третирани с отрова от VAM и контролни (b) животни. При опитните (a) се наблюдава силна аглутинация на червените кръвни клетки, дилатация и препълване на лумена на кръвоносните съдове с еритроцитни маси (черна стрелка). Установява се разслояване на белодробната тъкан. В бронхите (червена стрелка) липсва сурфактант. Съдовете на нормалната тъкан (b) са изпълнени с добре оформени еритроцити (черна стрелка), структурата на органа е компактна, бронхите (червена стрелка) са изпълнени със съдържание. Н&Е. (бар - 30 μm).

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Разликите в средната токсична доза при двата подвида, в полза на VAM, обусловена от действието на випоксина под формата на димер в мозъка, както и проявата на избирателност към определени вътрешни органи от страна на субединиците на хетеродимера от отровата на посочения подвид, засягащи специфично сърце, черен и бял дроб, едновременно с нарушенията, водещи до скъсяване на хемокоагулацията и при двата представителя на пепелянката, съпътствани от силно изявиени циркулаторни и хемодинамични смущения, са факторите, определящи като основни мотиви в интоксикацията прокоагулантната, и при двата подвида, и подчертано хисто- и невротоксичната активности при VAM.

## ИЗВОДИ

1. При мишките, третирани с отрова от подвида *Vipera ammodytes meridionalis* клинични симптоми са от страна на нервната система, докато при *Vipera ammodytes ammodytes* признаците са в резултат на неспецифичното и хемотоксичното действие на отровата

2. Средната токсична доза LD<sub>50</sub> на подвида *Vipera ammodytes meridionalis* е 8,54 пъти по-висока от тази на *Vipera ammodytes ammodytes*.

3. Отровата от **VAM** проявява тропизъм и атакува специфично и избирателно мозък, сърце, черен и бял дроб.

4. Биохимичните параметри и химичната активност на изследваните ензими не се различава при двата подвида, с изключение на фосфолипазната, която отчетена в динамика, е по-висока на петата минута, при **VAA** в сравнение с **VAM**

5. Функционалното изследване на токсичността доказва, че:

- в най-високите си стойности хемолизата не надвишава **10 %**, което е показател, че изследваните отрови не съдържат компоненти с пряка, животозастрашаваща, хемолитична активност;

- цяла отрова от подвидовете **VAM** и **VAA** има подчертано прокоагулантно действие, ангажиращо предимно вътрешния път на инициация на процеса;

- отговорът при провокация на кръвосъсирването е видово обусловен (специфичен профил на фибрино съдържание, тип на кръвосъсирваща система и обща реактивност);

- Отровите на двата подвида проявяват специфичност във фибрин(оген)олитичното си действие;

- Абнормално фрагментиране на фибриногена е причина за непълноценното му структуриране и образуване на рехав съсирек.

6. В мозъка се откриват белтъчни фракции единствено на ниво 30 kDa, съответстваща на молекулната маса на димера випоксин. Функционалната структура на невротоксина в мозъка е неговата хетеродимерна форма.

7. В мозъка съществуват нормални структури, реагиращи имунологично с анти тялото срещу Випоксин.

8. Ивиците, които се установяват на мембраните на ниво 14 – 15 kDa в препаратите от сърце, черен и бял дроб при мишки третирани с отрова от вида *Vipera ammodytes meridionalis*, доказват дисоциацията на невротоксина при условията на средата в организма и органотропния ефект на PLA<sub>2</sub>.

9. В отровата на подвида *Vipera ammodytes ammodytes* липсват функционално активни компоненти характерни за отровата на подвида *Vipera ammodytes meridionalis*

10. Уврежданията в резултат от действието на **VAM** в репродуктивните органи (тестиси, яичници, плацента) са в резултат на неспецифични, циркулаторни и хемодинамични разстройства, докато при фетусите действието е органотропно – засягат се белия и черния дроб. Отровата преодолява плацентарната бариера.



## ПРИНОСИ

1. Доказано бе, че отровата на подвида *Vipera ammodytes meridionalis* е 8,54 пъти по-токсична от тази на *Vipera ammodytes ammodytes*.

2. Установен беше органоспецифичен тропизъм на випоксина (като хетеродимер в мозъка) и мономерните му форми (като субединици, атакуващи сърце, черен и бял дроб), както при възрастните индивиди, така и при фетусите.

3. Химичната активност на целите отрови по отношение протеолитичното и фосфолипазното им действие е еднаква.

4. Отровите причиняват нискостепенна хемолиза (до 10%), в резултат индиректото увреждане на еритроцитите.

5. Отровата и от двата подвида има прокоагулантен ефект, засягащ най-силно показателя активираното парциално тромбoplastиново време, като от значение са видовата принадлежност и типа реактивност на опитните животни.

6. В мозъка се откриват белтъчни фракции единствено на ниво 30 kDa, съответстваща на молекулната маса на димера випоксин, което доказва, че функционалната конформационна структура на невротоксина в мозъка е хетеродимерната му форма. Компонента на отровата преодолява кръвно-мозъчната бариера.

7. Открито бе наличието на нормално, физиологично съществуващи структури в мозъка при нетретирани опитни животни, реагиращи имунологично и аналогични на активности от змийската отрова, компетентно към които бе използваното срещу випоксин анти тяло.

8. Доказа се, че въздействието върху репродуктивните органи е резултат от хемодинамични разстройства, вследствие на нарушения в коагулацията, водещи до тежка аглутинация на еритроцитите, увреждане на съдовата стена, хеморагии и дезинтегриране на тъканта.

9. Установените нарушения при плацентата са в следствие на реологични, прокоагулантни и хистотоксични смущения, причина за които е развиващият се ДИК – синдром, проявен чрез циркулаторни увреждания и силностепенна аглутинация на червените кръвни клетки.

10. Отровата преминава плацентарната бариера.

## **ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА**

1. При изготвяне на хиперимунен серум да се имат предвид индивидуалните характеристики на отровата от всеки подвид.

2. При терапия на пациенти да се отчита водещия прокоагулантен механизъм в патогенезата на отравянето и съпътстващия го ДИК-синдром.

## **ПРЕПОРЪКИ ЗА БЪДЕЩИ ПРОУЧВАНИЯ**

1. Проучване на рецепторните взаимоотношения на ниво мембрана, конкретизиращи механизмите на клетъчна трансдукция и сигнализация, между компонентите на отровата и тъканите на организма.

2. Задълбочаване на изследванията за установяване нивото на хомоложност между компонентите на отровата и нормално съществуващите структури в мозъка, с цел повлияване на заболявания като Алцхаймер, Паркинсон и шизофрения, при които основен фактор за дистрофия на мозъчната тъкан е силнотоксичната секреторна фосфолипаза, аналогична на съдържащата се в змийската отрова такава.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Конгреси

1. **В. Василев.** XXI-ви Национален конгрес на Българското Анатомично Дружество, 31.05.-02.06. **2013**, София, участие с доклад със заглавие „Morphological changes in parenchymal organs from mice treated with venom from the two subspecies of the long-nosed viper *Vipera ammodytes ammodytes* and *Vipera ammodytes meridionalis*”
2. **В. Василев.** Юбилейната научна конференция на ФВМ - 28.11 - 30.11. **2014**, Юндола , участие с доклад на тема „ Коагулатна и хемолитична активност на отрови от двата подвида на българската пепелянка ”

### Статии във връзка с дисертационния труд

1. **В. Василев:** Сравнително проучване степента на токсичност ( $LD_{50}$ ) на отровата от двата подвида на пепелянката – *Vipera ammodytes ammodytes* и *Vipera ammodytes meridionalis*. *Екология и бъдеще*, **2014** г., Год. XIII, No.3, 81 – 89.
2. **В. Василев:** Коагулатна и хемолитична активност на отрови от двата подвида на българската пепелянка. Сборник статии от *Юбилейната научна конференция на ФВМ-ЛТУ*. **2014**.
3. **В. Василев:** С. Стойкова, Я. Горанова, В. Атанасов. Изследване на тоталните отрови на представители от семейство Viperidae – *Vipera ammodytes ammodytes* и *Vipera ammodytes meridionalis*. *Българско списание за химия*, **2015** г., Том 4, Брой 1, 1 – 10.

### Участия в проекти

**Проект BG051PO001-3.3.06-0059** за фундаментално и приложно обучение на докторанти, постдокторанти, специализанти и млади учени в интердисциплинарни биологични направления и иновационни биотехнологии, с ръководител доц. М. Мурджева (ИБИР)

## **БЛАГОДАРНОСТИ**