



PROSPERITAS VESTRA FINIS NOSTRA!

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“- ВАРНА  
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА  
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И КЛИНИЧНА ФАРМАКОЛОГИЯ И ТЕРАПИЯ**

**Милена Тодорова Салбашян**

**ФАРМАКОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА  
ПОВЕДЕНЧЕСКИ ЕФЕКТИ НА БИОЛОГИЧНО  
АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА ОТ РАСТИТЕЛЕН ПРОИЗХОД  
В МОДЕЛИ НА ДЕПРЕСИЯ ПРИ ОПИТНИ ЖИВОТНИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен**

**„ДОКТОР“**

**по научна специалност „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“**

**Научен ръководител: Проф. д-р Стефка Василева Вълчева-Кузманова, д.м.н.**

**Научен консултант: Проф. д-р Роман Емилов Ташев, д.м.н.**

**ВАРНА, 2022 г.**

*Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрен съвет на Катедрата по фармакология и клинична фармакология и терапия при Медицински университет – Варна, състояло се на 31.10.2022 г, и е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:*

- 1. Проф. д-р Румен Павлов Николов, д.м.*
- 2. Доц. д-р Галя Цветанова Ставрева-Маринова, д.м.*
- 3. Доц. д-р Илия Димитров Костадинов, д.м.*
- 4. Доц. д-р Мария Делчева Желязкова-Савова, д.м*
- 5. Доц. д-р Силвия Ганчева Маринова, д.м.*

*Дисертационният труд съдържа общо 177 страници, онагледен е с 41 фигури и 12 таблици. Книгописът включва 628 заглавия на латиница и 3 на кирилица.*

*Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 30.01.2023 г. от 10 ч. в онлайн платформа на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.*

*Материалите по защитата са публикувани на интернет-страницата на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.*

## Списък на често използвани съкращения

5- HT – 5-хидрокситриптамиин, серотонин

ACE – ангиотензин-конвертиращ ензим

ACTH – adrenocorticotropic hormone, адренотропичен хормон

ANP – атриален натриуретичен пептид

BDNF – brain derived neurotrophic factor, мозъчен невротрофичен фактор

BNP – мозъчен натриуретичен пептид

c.AMP – cyclic adenosine monophosphate, цикличен аденозин монофосфат

C-3-G – еквиваленти на цианидин-3-глюкозид

CE – еквиваленти на катехин;

COX-2 – циклооксигеназа-2

GDNF – невротрофният фактор получен от глиални клетки, Glial cell line-derived neurotrophic factor

CREB – cAMP response element-binding protein, ц.АМФ отговорен елемент свързващ протеин

EGCG – epigallocatechin gallate, епигалокатехин галат

eNOS – ендотелна NO-синтетаза

EPM – elevated plus maze test, тест в повдигнат кръстосан лабиринт

FST – forced swim test, тест за принудително плуване

GABA, ГАМК – гама-аминомаслена киселина

GAE – еквиваленти на галова киселина

GM-CSF – гранулоцито-макрофагеален-стимулиращ фактор

HPA – хипоталамус-хипофиза-надбъбречна ос

HPLC – high pressure liquid chromatography, високо ефективна течна хроматография

IASP – Международната Асоциация за Изследване на Болката

IkB  $\alpha$  – инхибиторен фактор капа – бета алфа

IL – интерлевкин

MAO-A – моноаминооксидаза-A

MAPK – митоген-активирана протеинова киназа

MDD – major depressive disorder, голямо депресивно разстройство

MDA – малонов диалдехид

NF  $\kappa$ B – Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, нуклеарен фактор капа – бета

NMDA – N-метил-D-аспартат

NO – азотен оксид

NR 2B – N-метил-D-аспартат субединица 2B

NR1 – N-метил-D-аспартат субединица zeta-1

NR2A – N-метил-D-аспартат субединица 2A

OFT – open field test, тест открито поле

PDGF – platelet-derived growth factor, извлечен от тромбоцити растежен фактор

P-gp – P-гликопротеин

SIT – social interaction test, тест за социално взаимодействие

SOD – супероксиддисмутаза

SSRI – селективен серотонинов реџптек инхибитор

TNF – тумор некрозис фактор

TR SSRI IS/HCL – хидроксиметил-аминометан хидрохлорид буферен разтвор

VEGF – васкуларен ендотелиален растежен фактор

VLS – вентролатерален стриатум

АДФ – аденозин дифосфат

АМПК – АМФ-активирана протеин-киназа

АТФ – аденозин трифосфат

БДЗ – бензодиазепини; бензодиазепинови

ГАМК – гамааминомаслена киселина

ГК – Галова киселина

ДМСО – диметилсулфоксид

Кв – кварцетин

КК – кафеена киселина

КОМТ – катехол-О-метилтрансфераза

МАО – моноаминооксидаза

НСПВС – нестероидно противовъзпалително лекарство

ОВ – овариектомия/овариектомирани/OVX

ОБ – булбектомия/булбектомирани/OBX

ПСАМ – плодов сок от *Aronia melanocarpa*

РКВ – реактивни кислородни видове

СТН – кортикотропин рилизинг фактора

СЧТ – стомашно чревен тракт

ТБК – тиобарбитурова киселина

ТБКРС – реагиращи с тиобарбитурова киселина субстанции

ФК – ферулова киселина

ХГК – хлорогенова киселин

## СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на често използвани съкращения .....	3
<b>I. ВЪВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>8</b>
<b>II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....</b>	<b>10</b>
<b>III. МАТЕРИАЛИ, МОДЕЛИ И МЕТОДИ .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Материали.....</b>	<b>11</b>
1.1. Експериментални животни.....	11
1.2. Експериментални вещества.....	11
1.2.1. Плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> .....	12
1.2.2. Други използвани субстанции .....	12
<b>2. Експериментални модели при опитни животни .....</b>	<b>12</b>
2.1. Експериментален модел на двустранна овариектомия у плъхов .....	12
2.2. Експериментален модел на двустранна олфакторна булбектомия (ОБ) у плъхове .....	13
<b>3. Поведенчески методи.....</b>	<b>14</b>
3.1. Метод за изследване на двигателната активност и изследователското поведение – тест открито поле (open field test, OFT) .....	14
3.2. Методи за определяне на степента обучението и запаметяването при плъхове .....	14
3.2.1. Метод за обучение с двупосочно активно избягване – shuttle box .....	14
3.2.2. Метод за обучение с еднопосочно пасивно избягване – step through.....	15
3.3. Методи за изследване на тревожността .....	16
3.3.1. Тест повдигнат кръстосан лабиринт – (elevated plus maze, EPM) .....	16
3.3.2. Тест за социално взаимодействие – (social interaction test, SIT).....	16
3.4. Метод за изследване на депресивно поведение - тест за принудително плуване (forced swim test, FST) .....	17
3.5. Метод за изследване на болкова чувствителност – тест гореща плоча (hot plate) .....	17
4. Статистически методи.....	18
<b>IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ .....</b>	<b>19</b>
<b>1. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> и хлорогенова киселина</b>	

<b>върху поведението на овариектомирани плъхове</b> .....	20
1.1. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> и хлорогенова киселина върху двигателната активност в тест открито поле .....	20
1.1.1. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> и хлорогенова киселина върху двигателната активност след 30-дневно приложение .....	20
1.1.2. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> и хлорогенова киселина върху двигателната активност след 75-дневно приложение .....	22
1.1.3. Обсъждане .....	25
1.2. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> и хлорогенова киселина върху тревожността в тест за социално взаимодействие .....	27
1.2.1. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> и хлорогенова киселина върху тревожността след 31-дневно приложение .....	27
1.2.2. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> и хлорогенова киселина върху тревожността след 76-дневно приложение .....	28
1.2.3. Обсъждане .....	30
1.3. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> и хлорогенова киселина върху депресивната симптоматика в тест за принудително плуване .....	34
1.3.1. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> и хлорогенова киселина върху депресивната симптоматика след 33-дневно приложение .....	34
1.3.2. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> и хлорогенова киселина върху депресивната симптоматика след 78-дневно приложение .....	35
1.3.3. Обсъждане .....	37
1.4. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> и хлорогенова киселина върху болковата чувствителност при овариектомирани плъхове в тест гореща плоча след 79-дневно третиране и обсъждане .....	42
<b>2. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселини върху поведението на плъхове с двустранна булбектомия</b> .....	47
2.1. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселина върху тревожността при булбектомирани плъхове в тест повдигнат кръстосан лабиринт и обсъждане .....	47

2.2. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселина върху паметта и обучението.....	55
2.2.1. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселина върху паметта и обучението в тест за еднопосочно пасивно избягване – step through.....	55
2.2.2. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселина върху паметта и обучението в тест за двупосочно активно избягване – shuttle box .....	58
2.2.3. Обсъждане.....	61
<b>V. ИЗВОДИ .....</b>	<b>65</b>
<b>VI. ПРИНОСИ .....</b>	<b>69</b>
<b>VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....</b>	<b>70</b>
<b>1. Списък на публикациите .....</b>	<b>70</b>
<b>2. Списък на участията в научни форуми .....</b>	<b>71</b>



## I. Въведение

Човек през целия еволюционен път от незапомнени времена до днес е съпътстван от природни средства за лекуване на редица болести. Медицинските растения заемат значимо място в профилактиката и лечението на болестите при човека, както самостоятелно, така и като допълнителни средства към конвенционалната терапия. Данните сочат (WHO, 2019), че близо три четвърти от населението на земята използва лечебни растения, а тенденцията е с нарастващ характер. Смята се, че над 400 000 вида растения имат лечебни свойства (Odugbemi, 2006), но все още малка част от техните активни компоненти и действия са напълно характеризирани.

С развитието на съвременното общество и уваличаване на продължителността на живота нараства честотата на хронично протичащите тревожно-депресивни разстройства и невродегенеративни заболявания.

Световната здравна организация съобщава, че за 2018 година, засегнатите от афективни разстройства хора по света са над 264 милиона (GBD, Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2018). По-нови анализи (COVID-19 Mental Disorders Collaborators; The Lancet, 2021) показват, че пандемията от COVID-19 е довела през 2020 г., до рязко нарастване на общият брой депресивни и тревожни разстройства в световен мащаб. Ръстът на тревожните разстройства се е увеличил с допълнителни 53,2 милиона случая, а броят на хората, диагностицирани с голямо депресивно разстройство (MDD), е нарастнал с допълнителни 76,2 милиона (COVID-19 Mental Disorders Collaborators; The Lancet, 2021).

Депресията е афективно разстройство с голяма значимост в здравно, икономическо и социално отношение (World Health Organization, 2020). Тя е една от водещите причина за загуба на работоспособност на хората в световен мащаб. Според СЗО депресията е втората най-честа причина за суицидът сред младите хора на възраст между 15 и 29 години (Bernaras et al., 2017).

Голямото депресивно разстройство е силно инвалидизиращо състояние, като се очаква да стане втората по честота на разпространение болест след хроничните заболявания като исхемичната болест на сърцето и захарния диабет (WHO, 2020).

Независимо от широката употреба на антидепресанти до 30% от пациентите не се повлияват от тях (Guan et al., 2016) или показват частичен отговор, съчетан с функционално увреждане, лошо качество на живот, опити за самоубийство, самонараняващо поведение и

висок процент на рецидив (Al-Harbi, 2012). Освен това, депресията често се свързва с хронични заболявания (Katon, 2011) или други разстройства на настроението (Klein, 1993) поради непълноценност на конвенционалното лечение (Birmaher et al., 1998). Известно е, че повечето антидепресанти изискват приложение няколко седмици за получаване на клиничен ефект, а употребата им е свързана с множество нежелани лекарствени реакции (Santarsieri et al., 2015). Това са едни от основните причини за търсене на нови терапевтични подходи при депресия през последните години.

От друга страна, редица невродегенеративни заболявания са често съпроводени от афективни проблеми, които влошават протичането им. Те могат да влошат социалното и функционално състояние на пациентите (Kessler et Greenberg, 2002). Zhao и съавтори (2016) съобщават, че при 40% от случаите на болест на Алцхаймер се наблюдава коморбидна клинична депресия. Висок е процентът и на пациентите, диагностицирани с болест на Паркинсон, съпътствана с тревожност, с хранителни разстройства (Kessler and Greenberg, 2002) и с болкова симптоматика – персистираща/хронична (Lee et al, 2012).

Поради всички тези причини през последните години нараства необходимостта от провеждане на нови проучвания с терапевтични източници с цел оптимизиране комплексната профилактика и лечение на депресиите, афективните и тревожни разстройства.

Откритията за преминаване на някои растителни полифеноли през кръвно-мозъчната бариера стават предпоставка за изследване на техните невропротективни и невромодулиращи действия, за проучване на ефектите им при тревожност, депресия и невродегенеративни заболявания.

Настоящият труд цели да изследва психофармакологични ефекти на биологично активни вещества от растителен произход и разкриване на бъдещи възможности за използването им при лечение на психични, невродегенеративни и други заболявания на нервната система.

## I. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Имайки предвид изследваните досега ефекти на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* и на фенолните киселини (хлорогенова, ферулова и галова), използвахме експериментални фармакологични методи и модели за изследване на непроучени до този момент активности на тези биологични активни вещества.

Поставихме си за **ЦЕЛ**:

Фармакологично проучване на ефекти на биологично активни вещества от растителен произход (плодов сок от *Aronia melanocarpa* и фенолни киселини) в експериментални модели на поведенчески нарушения при опитни животни, предизвикани чрез овариектомия и булбектомия

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

1. Да се получи експериментален модел на депресия и други поведенчески промени при плъхове, индуцирани чрез овариектомия, като се регистрират:
  - 1.1. Двигателната активност
  - 1.2. Тревожността
  - 1.3. Депресивното поведение
  - 1.4. Болковата чувствителност
2. При овариектомирани плъхове да се изследват ефектите на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху:
  - 2.1. Двигателната активност
  - 2.2. Тревожността
  - 2.3. Депресивното поведение
  - 2.4. Болковата чувствителност
3. Да се получи експериментален модел на булбектомия при плъхове, като се регистрират промените в:
  - 1.1. Тревожността
  - 1.2. Обучението и запаметяването

4. При булбектомирани плъхове да се изследват ефектите на фенолните киселини (хлорогенова, ферулова и галова) върху:
  - 4.1. Тревожността
  - 4.2. Обучението и запаметяването

## IV. МАТЕРИАЛИ, МОДЕЛИ И МЕТОДИ

### 1. Материали

#### 1.1 Експериментални животни

В опитите са използвани мъжки и женски Wistar плъхове (200–240 g), отглеждани в пластмасови клетки, в добре вентилирана стая при температура 20-25°C, 12-часов цикъл на светлина/тъмнина и при неограничен достъп до храна и вода.

Проведените процедури по третирането на животните и експериментите, са извършвани стриктно в съответствие с националните закони и правила, основаващи се на Европейската директива (EU Directive 2010/63/EU for animal experiments), и в съгласие с правилата на комисията по етика при Институт по Невробиология, Българска Академия на Науките (регистрация FWA 00003059 от американското министерство на здравеопазването и човешките ресурси).

#### 1.2. Експериментални вещества

##### 1.2.1. Плодов сок от *Aronia melanocarpa* (ПСАМ)

За целите на експерименталната работа е използван плодов сок от *Aronia melanocarpa* в две различни дози. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* е приготвян от свежи плодове, чрез смилане, намачкване, изстискване и филтриране. Полученият сок е филтриран и консервиран с калиев сорбат (1.0g/l) и съхраняван при 0°C до момента на използването му.

Съставът на полифенолните компоненти в плодовия сок от *Aronia melanocarpa*, е определен от екипа на Valcheva-Kuzmananova (2014) (представен в Таблица 1 по-долу). Спектофотометричен анализ по Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965) е използван за определяне на тоталното съдържание на фенолните вещества в сока от *Aronia melanocarpa*. Абсорбцията е отчетена при 760 nm. Като стандарт е използвана галова киселина. Резултатите са представени като еквиваленти на галова киселина в 1 l сок (mg GAE/l). Направеният спектофотометричен анализ разкрива много високо съдържание на фенолни съединения (5461 mg, Таблица 1); еквивалентни на галова киселина на литър сок, който са в съответствие с данните на много други изследователи (Rop et al., 2010; Oszmianski and Lachowicz, 2016).

Използваните високоефективната течна хроматография (HPLC) и гравиметричен-анализ показват, че процианидините са групата фенолни съединения с най-висока концентрация в арониевите плодове (Oszmianski and Wojdylo, 2005), следвани от антоцианините и фенолните киселини: хлорогенова (3-О-кафеолилхининова киселина) и неохлорогенова (5-О-кафеолилхининова киселина) (Slimestad et al., 2005). Освен това в по-ниска концентрация присъстват флавоноли (гликозиди на кверцетин) (Slimestad et al., 2005) и флаван-3-оли (епикатехин) (Oszmianski и Wojdylo, 2005; Rop et al., 2010).

*Таблица 1. Съдържание на полифенолни съединения в плодов сок от Aronia melanocarpa и използван аналитичен метод; GAE-еквивалент на галова киселина; HPLC- високо ефективна течна хроматография; (по Valcheva-Кизмананова et al., 2014)*

Вещества	Съдържание	Метод
Общи Феноли	5461 mg GAE/l	Спектрофотометричен (Singleton and Rossi, 1965)
Общи проантоцианидини	3122.5 mg/l	Гравиметричен Howell et al., 2005
Цианидин-галактозид	143.7 mg/l	HPLC
Цианидин-арабинозид	61.7 mg/l	HPLC
Цианидин-глюкозид	4.4 mg/l	HPLC
Цианидин-ксилозид	11.6 mg/l	HPLC
Хлорогенова киселина	585 mg/l	HPLC
Неохлорогенова киселина	830 mg/l	HPLC

### 1.2.2. Други използвани субстанции

Използвани са хлорогенова киселина, ферулова киселина, и галова киселина на фирма Sigma-Aldrich (Германия); ketamine (Gedeon Richter, Германия); xylazin (Bioveta, Чехия).

## **2. Експериментални модели при опитни животни**

### **2.1. Експериментален модел на двустранна овариектомия (ОВ) у плъхове**

Незаменим инструмент за изучаване на етиологията и развитието на поведенческите разстройства са експерименталните модели при опитни животни. Моделът на двустранна овариектомия (ОВ) индуцира естрогенен дефицит при животните, като елиминира ролята на ендогенните овариални стероиди в контрола на нормалната мозъчна пластичност. Впоследствие се наблюдават поведенчески промени, сходни до голяма степен с постменопаузалните симптоми при жени (De Chaves et al., 2009; Li et al., 2014). Литературните данни сочат, че приложението на антидепресанти значимо редуцира депресивното поведение при овариектомирани опитни животни (Bekko & Yoshimura, 2005).

Хирургичните процедури са изпълнени по метода описан от Lasota et al. (2004). Експерименталните животни (на възраст 4<sup>ри</sup> месеца) са анестезирани интраперитонеално с Ketamine 30 mg/kg и Xylazine 30 mg/kg и после фиксирани. Козината е отстранена в областта на оперативното поле, след което то е почистено и дезинфектирано със Spiritus aethylicus 70% и Jodseptadon 10%. С помощта на хирургически скалпел е направен срединен разрез на долната коремна повърхност с дължина 3 cm. Достигайки до перитонеалната кухина, с помощта на хирургически ретрактор се откриват маточните тръби и яйчниците. Десният яйчник е внимателно изолиран извън коремната кухина чрез клампиране на маточната тръба. Овидуктът и кръвоносните му съдове са лигирани с хирургически конец. Яйчникът е отстранен със заобикалящата го мазнината с помощта на обгаряне. След това рогът на матката е репонирани в перитонеалната кухина. Същата процедура е повторена и с левия яйчник. Със стерилни конци разрезът е затворен в два слоя. Мускулният слой е защит с помощта на абсорбиращи се конци, докато кожата е затварена с неабсорбиращи се конци. Накрая, разрезът е дезинфекциран с Jodseptadon 10%.

След приключване на хирургичната интервенция на животните е осигурен 14-дневен възстановителен период, през който в продължение на 5 дни ежедневно са третирани с антибиотици – Cefazolin i.p 200 mg/kg и Neomycin spray.

### **2.2 Експериментален модел на двустранна олфакторна булбектомия (ОБ)**

Поради голямата им социална значимост в световен мащаб тревожно-депресивните заболявания са обект на много експериментални разработки. Експерименталните модели

при опитни животни са полезни за изучаването на патогенезата и лечението на тези заболявания.

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

Двустранна олфакторна булбектомия се базира на метода описан от Kelly и съавтори (1997). Експерименталните животни се анестезират с Calypsol (50 mg/kg, i.p.), след което се фиксират в стереотаксичен апарат (Stoelting Co, USA). Меките тъкани на главата се отпрепарират, периостът се премахва, след което черепните кости се пробиват с бормашина (диаметър на борчетата 2 мм) вляво и вдясно от средната линия. За определяне координатите на олфакторните булбуси, се използва атласът на Pellegrino и Cushman (1967) за плъхове порода Wistar (спрямо брегмата  $A=8.0$ ;  $L=\pm 2.0$ ). Процедурата-булбектомия се извършва, чрез аспирация на двата булбуса. За целта се използва водна помпа, прикрепена към игла от неръждаема стомана. Кръвоспиращо средство (Gelaspon) се поставя в отворите след аспирацията. На животните се осигурява 15-дневен възстановителен период след приключване на хирургичната интервенция, през който те ежедневно се третират с антибиотици – локално (с Nemybasin за 7 дни) и интраперитонеално (с Gentamycin за 5 дни). С цел адаптиране към условията на експеримента по време на възстановителния период животните са взимани на ръце (хендлирани) ежедневно за десет минути в продължение на 5 дни.

Макроскопска верификация на двустранната булбектомията се извършва след приключване на поведенческите опити. При установена непълна (< от 80%) деструкция на булбусите данните, получени от поведенческите тестове, са изключени от обработката на резултатите.



### **3. Поведенчески методи**

#### **3.1. Метод за изследване на двигателната активност и изследователското поведение чрез тест открито поле – open field test (OFT)**

Тестът е извършван в оградено със стени поле (100 x 100 x 40 cm), боядисано изцяло в бяло и разграфено с дебели 6 mm сини линии, които разделят пода на еднакви (20 x 20 cm) квадрати. Над апарата има източник на изкуствена светлина (лампа 100W), която осветява равномерно цялото поле. Животното се поставя в центъра на полето и се изследва поведението му в рамките на 5 min. Отчитат се: броят на преминатите от животното квадрати и с четирите лапи и изправанията на задните лапи. След всяко животно полето се почиства и подсушава.

#### **3.2. Методи за определяне на степента и динамиката на обучение и запаметяването при плъхове**

##### **3.2.1. Метод за обучение с активно двупосочно избягване – shuttle box**

Тестът е проведен в апарат Shuttle box по метода на Buserova and Bures (1983), модифициран от Петков и съавтори (1993). Апаратът се състои от камера (с размери 50 x 29 x 21 cm), разделена на два еднакви сектора. Централно е разположен кръгъл отвор, който служи за преминаване на плъха от единия в другия сектор. Подът на камерата е изграден от люлееща се метална решетка от стоманени пръчки с дебелина 3 mm, една от друга на 11 mm. Електрическата система на апарата е свързана с краищата на пръчките, по който се подава променлив електрически ток (0.5mA; 50Hz; 20 до 30V- регулиращ се чрез потенциометър), използван за безусловен дразнител при обучението с отрицателно подкрепление. Електрическото дразнене е пропускано по съответния отдел на камерата в продължение на 12 sec на всеки сеанс, ако преди това няма преминаване на плъха в отсрещният сектор на камерата. За да избегне електрическото дразнене, плъхът трябва да се научи да се придвижва от единия край на кутията до другия всеки път, когато се подложи на предупредителен сигнал (условен стимул). Като условен дразнител се използва изкуствена светлина (електрическа крушка от 21 W, монтирана на капака над всеки от двата сектора). Светлината се включва посменно, в този сектор на камерата, в който не се намира плъхът в края на междусеансния период. Условният дразнител (светлина) предшества прилагането на

безусловния дразнител (електрически ток) в течение на 9 sec, като продължава и във времето на действие на безусловния дразнител (общо 21 sec) за една тренировка.

Условнорефлекторно избягване – авойданс реакция (avoidance), се регистрира, когато плъхът избяга във времето на изолираното действие на светлината, т.е. през 9-те секунди преди включване на електрическия ток. Искейп реакция (eskapе) се регистрира, когато експерименталното животно премине в другия сектор на камерата, по време на действието и на безусловния дразнител (електрически ток). Неадекватна реакция (inadequate reaction) се регистрира, когато животното не премине в противоположната част на камерата по време на действието на условния и безусловния дразнител.

Shuttle box апаратът е разположен в шумоизолирано помещение. Регистрираните данни от апарата се подават в аналого-цифров преобразувател, свързан с компютър, управляван от подходяща on-line програма. Отчитането на всеки авойданс, искейп и неадекватен отговор става автоматично.

Провеждане на теста се извършва в следната последователност:

- Един ден преди опита, с цел адаптация всяко животно се поставя в камерата на апарата, след което му се прилагат 20 условнорефлекторни дразнения (светлина) за период от 6 min. По време на адаптацията не се прилага безусловният дразнител (електрически ток).
- Обучението се провежда в два последователни дни. Във всеки обучителен ден се изпълняват 50 тренировки (чрез описаното по горе комбинирано прилагане на условен и безусловен дразнител) и междутренировъчна пауза от 9 sec.
- Тестът за памет се провежда на 24 час след втория обучителен ден, като се отчитат същите показатели, както при обучението. Светлинният стимул се прилага за 9 sec, последван от електрически ток само за 2 sec (като “подсещане”) и междусеансна пауза от 9 sec.

Като показател за обученост и запаметяване се отчита броят на авойданс отговорите за всяка тренировъчна сесия (поотделно за всеки ден) и при теста за памет.

### **3.2.2. Метод за обучение за пасивно избягване – step through**

Обучението за пасивно избягване с отрицателно подкрепление е проведено по метода на Buresova and Bures (1983) чрез тест step through. Апаратът се състои от две камери, съединени с врата тип „гилотина”. Подът на апарата е метална решетка от пръчки, по които

се подава електрически ток. Размерите на вътрешната камера са 30 x 30 x 30 cm. Тя е черна с черен капак. Външната камера е бяла на цвят с бял полистиролов под. Нейният размер е 8 x 7 cm. Като безусловен дразнител се използва светлината от електрическа крушка (100 W), поставена над външната камера. Обучението се състои от еднократна тренировка.

Всяко животно се поставя на платформата в осветената камера при отворена врата. След влизане на животното в затъмненото помещение вратата се затваря и по подовата решетка се подава електрически ток (0,5 mA) с продължителност 1 sec.

Тестът за памет се провежда на 3<sup>ия</sup> и 24<sup>ия</sup> час след обучението, като всяко животно отново се поставя в осветената камера при отворена врата и престоят на плъха там се отчита в секунди. При тестването за памет не се включва електрически ток. За критерий на обученост се приема престой на животното в осветената камера за период от 180 sec.

### **3.3. Методи за изследване на тревожността**

#### **3.3.1. Тест повдигнат кръстосан лабиринт – elevated plus maze (EPM)**

Тестът повдигнат кръстосан лабиринт е въведен от Pellow and File (1986). Изследванията се провеждат в апарат, който се състои от разположени едно срещу друго две отворени (50 x 10 cm) и две затворени (50 x 10 x 40 cm) рамена, поставени в една равнина на височина 50 cm от пода. Над кръстосания лабиринт е монтиран източник на светлина, който осигурява равномерно осветяване (150 lux) на отворените и затворените рамена. Експерименталните животни се поставят в центъра на кръстосания лабиринт и се наблюдават в продължение на 5 min. Всички експерименти се провеждат по едно и също време (между 9.00 и 13.00 h). Отчитат се следните показатели: брой на влизания в отворените и затворените рамена и времето, прекарано в тях, отчетено в секунди, както и общият брой влизания в рамената и съотношението на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания. Повишеният брой влизанията в отворените рамена и увеличено време, прекарано в тях, са показател за анксиолитичен ефект на изследваното вещество. Увеличено съотношение на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания също сочи наличие на анксиолитичен ефект на веществото. Общият брой на влизанията в рамената е показателен за двигателната активност на животното.

### **3.3.2. Тест за социално взаимодействие – social interaction test (SIT)**

Тестът се провежда по метода на File and Hyde (1978). Животните се поставят по двойки (за време от 5 min) в непозната за тях среда – апарат за тест открито поле, който представлява оградено със стени, боядисано изцяло в бяло и разграфено на квадрати поле (100 x 100 x 40 cm). Полето е равномерно осветено навсякъде от изкуствен източник на светлина – електрическа лампа (100 W). Всяко едно животно е заедно с непознат тестов партньор, за да се създаде безпокойство в тях. Двете животни трябва да са с приблизително еднакви тегла (разликата между теглата им не трябва да е повече от 10 g). Отчита се времето, прекарано в душене, следване, покачване върху или пълзене под партньора. Продължителният активен контакт между опитните животни е показател за анксиолитичен ефект.

### **3.4. Методи за изследване на депресивно поведение**

#### **3.4.1. Тест за принудително плуване – forced swim test (FST)**

Тестът се провежда по метода на Porsolt et al. (1977). При него се използва времето на неподвижност на животното като мярка за депресивно-подобно поведение. Всяко животно се поставя за 5 min в стъклен цилиндър (17 cm диаметър и 60 cm висок), пълен до 30 cm с вода с температура  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ . Животното не трябва да се подpira с лапи или опашка в дъното на цилиндъра. Тестът се извършва в две сесии, с интервал между тях от 24 часа. Първата сесия е тренировъчна и затова се записват резултатите само от втората сесия. Плуването и неподвижността (имобилност) на животното се разглеждат като взаимно изключващи се поведенчески състояния. Плуването се определя като движение, т.е. активност на животното. Неподвижността се определя като липса на движение и безнадежност, т.е. депресивно-подобно поведение на животното. Тогава животното стои във водата почти неподвижно, като единствените движения са, за да поддържа главата си над водата. Измерва се времето на неподвижност на животното в секунди.

### **3.5. Метод за изследване на болковата чувствителност**

#### **3.5.1. Тест с изпитване върху гореща плоча – hot plate**

Тестът гореща плоча (hot plate) е един от основните поведенчески модели на ноцицепция при експериментални животни. Тестът се провежда по метода описан от Eddy

and Leimbach (1953) в апарат Ugo Basile S.R.L., Italy. Използва се прозрачен стъклен цилиндър с височина 26 cm и диаметър 24 cm, за да се поддържа животното върху нагрятата повърхност на плочата. Температурата на горещата плоча се настройва и калибрира на  $51 \pm 1^\circ\text{C}$ . Максималното време на престой на животните върху плочата (cut-off time) е 45 секунди, за да се избегне увреждане на тъканите. Отчита се латентното време (в секунди), дефинирано като периода между момента на поставяне на животното върху повърхността на горещата плоча и момента, в който животното облича една от задните си лапи, направи опит за изкачане от цилиндъра или е налице вокализация. Това се повтаря три последователни пъти на интервали от два часа, като се изчислява средната стойност за всяко животно и се разглежда като индекс за чувствителност към болка. Критерий за аналгетично действие е удължаване на латентното време.

## **5. Статистически методи**

Резултатите от изследванията са обработени статистически чрез еднофакторен вариационен анализ (one-way ANOVA), последван от Dunnett's Multiple Comparison Post Test. Сравняване на резултатите на две независими групи е проведено чрез Student's *t*-test. Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM. Статистическа достоверност се приема при  $p < 0.05$ . Използван е статистически пакет GraphPad Prism (Version 5.00, GraphPad Software, Inc.).

## V. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху поведението на овариектомирани плъхове

Проведени са изследвания върху 70 женски плъха порода Wistar, разделени в пет групи по 14 животни, означени като: Контрола (ФО), ОВ, ОВ+ПСАМ5, ОВ+ПСАМ10 и ОВ+ХГК. Плъховете от ОВ, ОВ+ПСАМ5, ОВ+ПСАМ10 и ОВ+ХГК са овариектомирани, контролните животните са фалшиво оперирани. След 14-дневно възтановяване след операцията, животните са третираны еднократно дневно чрез твърда орогастрална сонда. Контролата (ФО) и ОВ са получавали дестилирана вода в доза 10 ml/kg. ПСАМ е прилаган в доза от 5 ml/kg, разреден с дестилирана вода до 10 ml/kg (за ОВ+ПСАМ5 група) и 10 ml/kg (за ОВ+ПСАМ10 група), а хлорогеновата киселина (за ОВ+ХГК група) в доза 20 mg/kg под формата на разтвор в обем 10 ml/kg.

Поведенческите тестове са проведени след 30<sup>ия</sup> и 75<sup>ия</sup> ден от началото на третирането.

Тестовите след 30<sup>ия</sup> ден са проведени в следната последователност:

- Ден 30: проведен е тест открито поле 60 минути след последното третиране в интервала между 8 и 16 часа
- Ден 31: проведен е тест за социално взаимодействие 60 минути след последното третиране в интервала между 8 и 16 часа
- Ден 32: проведена е тренировъчна сесия на тест за принудително плуване 60 минути след последното третиране между 8 и 16 часа;
- Ден 33: проведен е тест за принудително плуване 60 минути след последното третиране в интервала между 8 и 16 часа.

Последователността на тестовите след 75-дневно третиране е следната:

- Ден 75: проведен е тест открито поле 60 минути след последното третиране в интервала между 8 и 16 часа
- Ден 76: проведен е тест за социално взаимодействие 60 минути след последното третиране в интервала между 8 и 16 часа
- Ден 77: проведена е тренировъчна сесия на тест за принудително плуване 60 минути след последното третиране между 8 и 16 часа;

- Ден 78: проведен е тест за принудително плуване 60 минути след последното третиране в интервала между 8 и 16 часа;
- Ден 79: проведен е тест върху гореща плоча 60 минути след последното третиране в интервала между 8 и 16 часа;

## **1.1. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху двигателна активност в тест открито поле**

### **1.1.1 Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху двигателна активност след 30-дневно приложение**

Двигателната активност се изследва в тест открито поле. На 30<sup>ия</sup> ден от началото на третирането всяко животно се поставя за пет минутен период от време в откритата арена на апарата, през който се отчитат следните двигателни параметри: хоризонтална активност (брой прекосени линии с четирите лапи) и вертикална активност (брой изправяния на задни лапи).

Резултатите по отношение на двигателната активност на експерименталните животни са представени в Таблица 2, Фигура 1 и Фигура 2. Те показват, че хоризонталната и вертикалната активност на ОВ плъхове е понижена, но незначимо в сравнение с тези от Контролната (ФО) група.

Хоризонталната активност, намалена при ОВ, още повече намалява от ПСАМ. При животните от група ОВ+ПСАМ5 хоризонталната активност е значимо намалена в сравнение с Контролата (ФО) ( $p < 0.001$ ) и ОВ група ( $p < 0.01$ ) (Фигура 1). При животните от група ОВ+ПСАМ10 хоризонталната активност е значимо по-ниска от тази на Контролата (ФО) ( $p < 0.01$ ) и ОВ група ( $p < 0.05$ ) (Фигура 1). Хоризонталната активност на група ОВ+ХГК е значимо по-ниска от тази на Контролата (ФО) ( $p < 0.05$ ) и не се различава от ОВ група (Фигура 1).

Вертикалната активност на ОВ плъхове е намалена, но не значимо в сравнение с тези от Контролната (ФО) група. Вертикалната активност, намалена при ОВ, още повече намалява от ПСАМ в доза 10 ml/kg, като се различава значимо от Контролата (ФО) ( $p < 0.05$ ), но без да достига статистическа значимост спрямо тази на ОВ група. При животните от група ОВ+ПСАМ5 вертикалната активност не се различава значимо от Контролата и ОВ група (Фигура 2). Вертикалната активност на ОВ+ХГК група не се различава значимо от

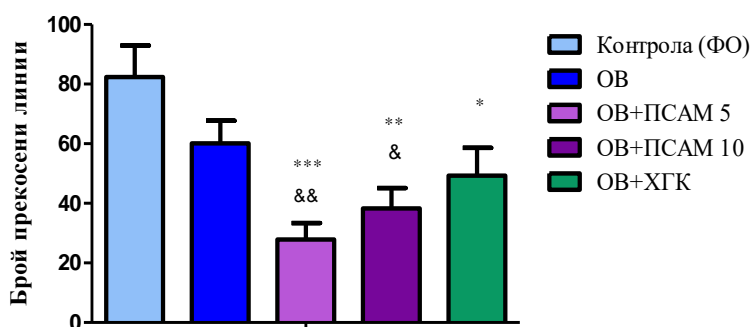
тези на Контролата (ФО) и ОВ животни (Фигура 2). Резултатаите показват, че след 30-дневно приложение плодовият сок от *Aronia melanocarpa* в дози от 5 ml/kg и 10 ml/kg значимо намалява двигателната активност на овариектомираните след, вероятно вследствие на седативен ефект. Хлорогеновата киселина в доза 20 mg/kg след 30-дневно приложение потиска двигателната активност на овариектомираните животни до степен, че тя е значимо по-ниска от тази на фалшиво оперираните животни

Таблица 2. *Хоризонтална и вертикална активност на овариектомирани плъхове, третираны за период от 30 дни с дестилирана вода (Контрола ФО и ОВ) или с ПСАМ в дози 5 ml/kg (ОВ+ПСАМ5), 10 ml/kg (ОВ+ПСАМ10), или ХГК в доза 20 mg/kg (ОВ+ХГК група); резултатите са представени като средна стойност±SEM; n=14*  
*\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 в сравнение с Контролата (ФО); &p<0.05; &&p<0.01 спрямо група ОВ*

Показател Група	Хоризонтална активност (Брой прекосени линии)	Вертикална активност (Брой изправния)
Контрола (ФО)	82.4±10.57	24.3±2.25
ОВ	60.1±7.59	22.00±1.195
ОВ+ПСАМ5	27.9±5.49 *** &&	18.29±2.96
ОВ+ПСАМ10	38.3±6.84 ** &	17.69±2.02 *
ОВ+ХГК	49.3±9.29 *	18.93±2.80

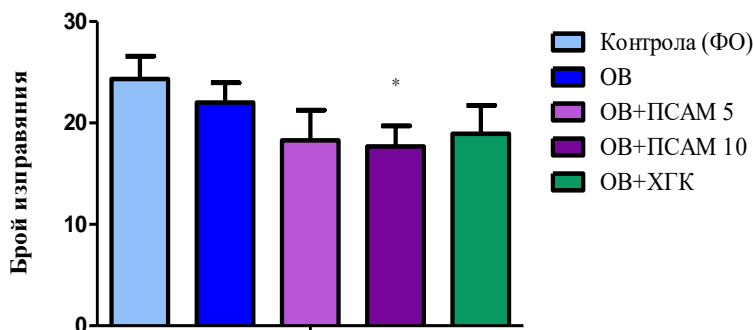


### 30-дневно третиране



Фигура 1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* (в дози 5 и 10 ml/kg) и хлорогенова киселина (в доза 20 mg/kg), върху броя прекосени линии (хоризонтална активност) на овариектомирани плъхове в тест открито поле след 30-дневно третиране; резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM;  $n=14$ ; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  в сравнение с Контролата (ФО); & $p<0.05$ ; && $p<0.01$  спрямо група ОВ

### 30-дневно третиране



Фигура 2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* (в дози 5 и 10 ml/kg) и хлорогенова киселина (в доза 20 mg/kg), върху броя изправления на задни лапи (вертикална активност) на овариектомирани плъхове в тест открито поле след 30-дневно третиране; Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM;  $n=14$ ; \* $p<0.05$  в сравнение с Контролата (ФО)

### 1.1.2. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху двигателна активност след 75-дневно приложение

Двигателна активност на експерименталните животни е изследвана в тест открито поле на 75<sup>ия</sup> ден от началото на третирането. Отчитат се същите параметри за локомоция.

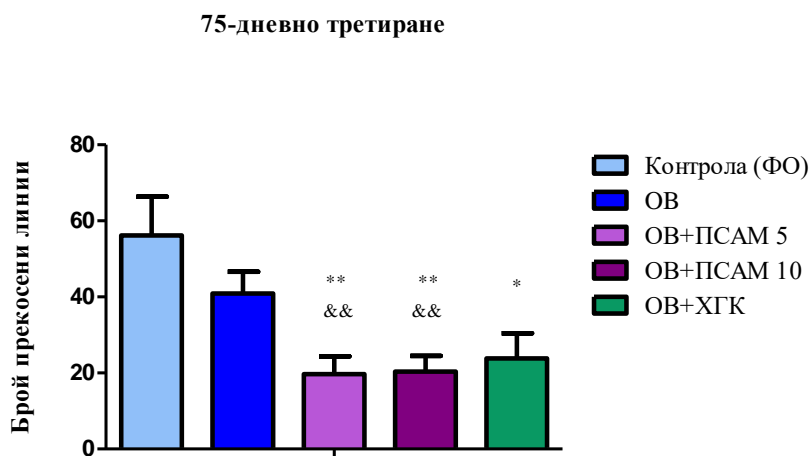
Регистрираните по време на теста резултати са предсатвени в Таблица 3, Фигура 3 и Фигура 4. Те показват, че хоризонталната и вертикалната активност на ОВ плъхове е понижена, но не значимо в сравнение с тези от Контролната (ФО) група.

Хоризонталната активност, намалена при ОВ, още повече намалява от ПСАМ. При животните от група ОВ+ПСАМ5 хоризонталната активност е значимо намалена в сравнение с Контролата (ФО) ( $p<0.01$ ) и ОВ група ( $p<0.01$ ) (Фигура 3). Хоризонталната активност на група ОВ+ПСАМ10 е значимо по-ниска от тази от Контролата (ФО) ( $p<0.01$ ) и ОВ група ( $p<0.01$ ) (Фигура 3). Хлорогеновата киселина намалява значимо хоризонталната активност на животните от група ОВ+ХГК в сравнение с Контролата (ФО) ( $p<0.05$ ) и не се различава значимо от ОВ група (Фиг. 3).

Вертикалната активност на ОВ плъхове е намалена, но не значимо в сравнение с тези от Контролната (ФО) група. Вертикалната активност, намалена при ОВ, още повече намалява от ПСАМ в доза 10 ml/kg, като се различава значимо от Контролата (ФО) ( $p<0.01$ ) и от ОВ група ( $p<0.01$ ) (Фигура 4). При животните от група ОВ+ПСАМ5 вертикалната активност не се различава значимо от Контролата и ОВ група (Фигура 4). Вертикалната активност на ОВ+ХГК група е значимо по-ниска от тези на Контролата (ФО) ( $p<0.05$ ) и не се различава значимо от тези на ОВ (Фигура 4). Проведеното изследване показва, че след 75-дневно приложение плодовият сок от *Aronia melanocarpa* в дози от 5 ml/kg и 10 ml/kg значимо намалява двигателната активност на овариектомираните, вероятно вследствие на седативен ефект. Хлорогеновата киселина в доза 20 mg/kg след 75-дневно приложение потиска двигателната активност на овариектомираните животни до степен, че тя е значимо по-ниска от тази на фалшиво оперираните животни.

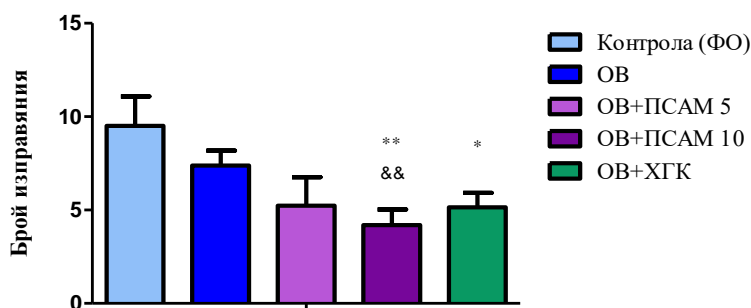
Таблица 3. Хоризонтална и вертикална активност на овариектомирани плъхове, третирани за период от 75 дни с дестилирана вода (Контрола  $\Phi O$ ) и  $OB$  или с ПСАМ в дози 5 ml/kg ( $OB+ПСАМ5$ ), 10 ml/kg ( $OB+ПСАМ10$ ), или с ХГК в доза 20 mg/kg ( $OB+ХГК$  група); резултатите са представени, като средна стойност $\pm SEM$ ; n=14  
 $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ , в сравнение с Контролата ( $\Phi O$ );  $\&\&p<0.01$  спрямо група  $OB$

Група \ Показател	Хоризонтална активност (Брой прекосени линии)	Вертикална активност (Брой изправния)
Контрола ( $\Phi O$ )	56.1 $\pm$ 10.25	9.5 $\pm$ 1.57
$OB$	40.9 $\pm$ 5.72	7.4 $\pm$ 0.79
$OB+ПСАМ5$	19.7 $\pm$ 4.65 $**\&\&$	5.2 $\pm$ 1.52
$OB+ПСАМ10$	20.4 $\pm$ 4.10 $**\&\&$	4.2 $\pm$ 0.83 $**\&\&$
$OB+ХГК$	28.9 $\pm$ 6.58 $*$	5.1 $\pm$ 0.78 $*$



Фигура 3. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* (в дози 5 и 10 ml/kg) и хлорогенова киселина (в доза 20 mg/kg), върху броя прекосени линии (хоризонтална активност) на овариектомирани плъхове в тест открито поле след 75-дневно третиране; резултатите са представени, като средна стойност  $\pm SEM$ ; n=14;  $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ , в сравнение с Контролата ( $\Phi O$ );  $\&\&p<0.01$  спрямо група  $OB$

### 75-дневно третиране



Фигура 4. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* (в дози 5 и 10 ml/kg) и хлорогенова киселина (в доза 20 mg/kg), върху броя изправяния на задни лапи (вертикална активност) на овариектомирани плъхове в тест открито поле след 75-дневно третиране; Резултатите са представени като средна стойност ± SEM; n=14; \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  спрямо Контролата (ФО); & $p<0.05$  в сравнение група ОВ

### 1.1.3. Обсъждане

Половите хормони упражняват широк спектър от ефекти в човешкото тяло, като ролята им не се ограничава само до регулиране на репродуктивното поведение. Ключово е участието на естрогенните хормони в процесите на сексуална диференциация, емоциите, паметта, невроналното оцеляване, както и в перцепцията на соматосензорните стимули (Amandusson and Blomqvist, 2013; Frizell and Dumas, 2018). Моделът на двустранна овариектомия (ОВ) индуцира естрогенен дефицит при животните, като елиминира ролята на ендогенните овариални стероиди в контрола на нормалната мозъчна пластичност. Впоследствие се наблюдават поведенчески промени, сходни до голяма степен с постменопаузалните симптоми при жени (Diaz Brinton, 2012; Li et al., 2014).

Настоящото изследване има за цел да се тестват ефектите на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху двигателната активност на плъхове с овариектомия-индуциран естрогенен дефицит в тест открито поле.

Тестът открито поле е утвърден метод за определяне на двигателната активност и изследователското поведение на гризачи в условията на непозната среда (Gould et al., 2009). Обичайното поведение на животните е в началото да изследват новата обстановка и впоследствие да привикнат (хабитуация) към средата (Bolivar et al., 2000). Като

изследователско (експлораторно) поведение се определя активно проучване (например движение), което може да доведе до получаване от животното на информация за неговата среда (Lynn and Brown, 2009). Активността за кратък период от време показва изследователското поведение (Gould et al., 2009). Двигателната активност в теста се отчита чрез оценка на броя на преминалите полета (хоризонтална активност) и изправяния на задни лапи. (вертикална активност) (Walsh and Cummin, 1976).

Настоящото проучване показва, че плодовият сок от *Aronia melanocarpa*, приложен в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg за период от 30 и 75 дни намалява значимо хоризонталната двигателна активност на овариектомираните плъхове. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* в доза 10 ml/kg, след 75-дневно приложение, статистически достоверно намалява броя на вертикалните движения на ОВ животни. Хлорогеновата киселина понижава хоризонтална активност при овариектомираните животни след 30 и 75 дневно третиране и вертикална активност след 75-дневно приложение, но без да се достига до статистическа значимост спрямо ОВ група. Проведеното изследване показва, че след 30- и 75-дневно приложение плодовият сок от *Aronia melanocarpa* намалява локомоторната активност на овариектомираните плъхове, което най-вероятно се дължи на седативен ефект. Подобен ефект е установен и от екипа на Valcheva-Kuzmanova (2014) при здрави плъхове, третирани с плодов сок от *Aronia melanocarpa* в доза 10 ml/kg за период по-дълъг от три седмици.

Наблюдаваните ефекти на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* вероятно са резултат от действието на съдържащите се в него биологично активни полифенолни съединения – флавоноиди предимно от субклас антоцианини, процианидини и фенолни киселини (Valcheva-Kuzmanova, 2014). Понижаването на спонтанната двигателна активност (ходене и изправяне) може да е резултат от намалена възбудимост на ЦНС и седация (Prut & Belzung, 2003). Известно е, че мозъчната GABA-ергичната система е отговорна за седацията (Gottesmann, 2002). Лигандите, които действат върху GABA-A рецептори, притежаващи  $\alpha 2$  и/или  $\alpha 3$  субединици, могат да медиат анксиолитичен ефект, докато седативно-сънотворният е резултат от активация на  $\alpha 1$  субединицата на GABA-A рецепторите (Rudolph and Möhler, 2006). Седативният ефект на плодовия сок от *Aronia melanocarpa*, наблюдаван в настоящия експеримент е установен и при предишни изследвания (Efimov et al., 2013). Вероятно е да се дължи на повлияване на GABA-A рецепторите, съдържащи  $\alpha 1$  субединица, вследствие на натрупване на полифенолите в ЦНС при продължителен прием на сока.

За редица флавоноиди е установено частично алостерично модулаторно действие върху GABA-A рецепторния комплекс (Fernandez et al., 2009). Литературните данни показват, че природни екстракти, съдържащи процианидини, фенолни киселини и други полифеноли притежават афинитет да се свързват с GABA-A рецепторите (Fernandez et al., 2009; Wang et al., 2008) и могат да предизвикат седативен, анксиолитичен и противогърчов ефект (Jäger and Saaby, 2011; Wasowski and Marder, 2012). Според проучване на Tu и колеги (2012) феруловата киселина, която присъства в състава на ПСАМ, доза-зависимо ( $\pm 15\text{mg/kg}$ ) потиска двигателната активност и причинява седация на интактни мишки. Наблюдаваният седативно-хипнотичен ефект на феруловата киселина се потвърждава и при други изследвания (Deng et al., 2018) и най-вероятно се дължи на влиянието на киселината върху централната GABA невротрансмисията.

Установено е, че флавоноидите могат да имат анксиолитичен и седативен ефект чрез свързване с БДЗ-рецептори или на места, различни от рецепторите за бензодиазепини (de Carvalho et al., 2011). Седативен ефект, свързан с активация на БДЗ-рецептори, демонстрират галовата киселина и кварцетина (Mansouri et al., 2014). За кварцетина може да се предположи и активация на опиоидните рецептори (Anjaneyulu and Chopra, 2003). Според настоящият експеримент хлорогеновата киселина в доза  $20\text{ mg/kg}$  след 30- и 75-дневно приложение, потиска двигателната активност на овариетомираните животни до степен, че тя е значимо по-ниска от тази на фалшиво оперираните животни. Направеният литературен анализ разкрива разнопосочни ефекти на хлорогеновата киселина върху локомоторната активност в поведенчески тестове при опитни животни. Прилагана субхронично при здрави плухове, хлорогеновата киселина в доза  $20\text{ mg/kg}$  потиска двигателната активност (Georgieva et al., 2017). Има данни, които посочват, че приложението на хлорогенова киселина в доза  $2.8\text{ mmol/kg}$  води до изразена локомоторна активация в мишки 10 до 60 минути след приложението ѝ (Ohnishi et al., 2006). Възможно е разнопосочните ефекти да се дължат не само на дозата, но и на продължителността на приложението, експерименталните модели, както на видовете тествани животни.

## **1.2. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху тревожността в тест за социално взаимодействие**

### **1.2.1. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху тревожността след 31-дневно приложение**

Чрез тест за социално взаимодействие поведенческите промени са проследени след 31-дневно третиране. На едновременно поставени в апарата два непознати плъха се предоставят пет минути за опознаване. За всяко животно се отчита времето на движенията, които са свързани с активно взаимодействие между непознатите партньори. Удължаване на времето на социален контакт между опитните животни се приема като показател за анксиолитичен ефект.

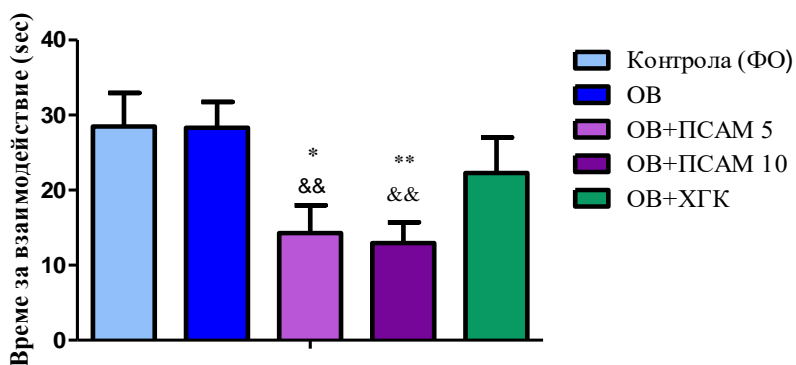
Резултатите от теста (Таблица 4, Фигура 5) показват, че след 31-дневно третиране времето на социално взаимодействие при ОВ животни не се различава значимо от това на Контролната (ФО) група. ОВ не предизвиква тревожност при 31-дневно приложение. Времето на социално взаимодействие на ОВ+ПСАМ5 и ОВ+ПСАМ10 е значимо по-кратко в сравнение с това на Контролната (ФО) ( $p < 0.05$ ) и ОВ групи ( $p < 0.01$ ) (Фигура 5). Времето на социално взаимодействие на ОВ+ХГК група не се различава значимо от това на Контролната (ФО) и ОВ група животни (Фигура 5).

Проведеното изследване показва, че в теста за социално взаимодействие, проведен на 31 ден, когато не се отчита развитие на тревожно поведение при овариектомирани животни, ПСАМ в дози от 5 ml/ kg и 10 ml/ kg понижава времето на активните социални контакти. Този ефект може да се дължи на намалената обща двигателна активност на тези животни, която е демонстрирана в теста открито поле.

Таблица 4. Време за социално взаимодействие (sec) при овариектомирани плъхове, третирани за период от 31 дни с дестилирана вода (Контрола ФО) и ОВ или с ПСАМ в дози 5 ml/kg (ОВ+ПСАМ5), 10 ml/kg (ОВ+ПСАМ10), или с ХГК в доза 20 mg/kg (ОВ+ХГК група); резултатите са представени, като средна стойност±SEM; n=14  
\*p<0.05; \*\*p<0.01 в сравнение с Контролата (ФО), &&p<0.01 в сравнение с ОВ група

Групи животни	Време на социално взаимодействие (sec)
Контрола (ФО)	28.47±4.46
ОВ	28.31±3.45
ОВ+ПСАМ5	14.29±3.68 * &&
ОВ+ПСАМ10	12.94±2.77 ** &&
ОВ+ХГК	22.27±4.74

#### 31-дневно третиране



Фигура 5. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* (в дози 5 и 10 ml/kg) и хлорогенова киселина (в доза 20 mg/kg) върху времето на социално взаимодействие при овариектомирани плъхове след 31-дневно третиране. Стойностите са средна±SEM; n = 14; \*p<0.05, \*\*p<0.01 в сравнение с Контролата (ФО), &&p<0.01 в сравнение с ОВ група

#### 1.2.2. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху тревожността след 76-дневно приложение

Резултатите от теста (Таблица 5, Фигура 6) показват, че след 76-дневно третиране времето на социално взаимодействие на ОВ група е скъсено значимо в сравнение с



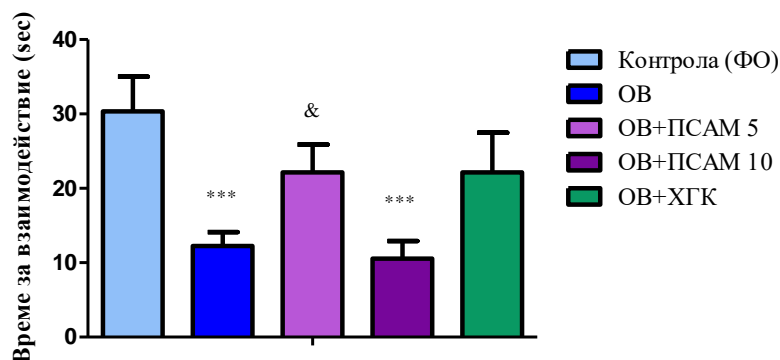
Контролата (ФО) ( $p < 0.001$ ). От където можем да заключим, че ОВ индуцира тревожно-подобно поведение. Времето на социално взаимодействие на ОВ+ПСАМ5 не се различава значимо от Контролната (ФО) група и е удължено сигнификантно в сравнение на ОВ група ( $p < 0.05$ ). ПСАМ в доза 5 ml/kg увеличава времето на активните социални контакти, вероятно поради анксиолитично-подобно действие. Времето на социално взаимодействие на ОВ+ПСАМ10 е скъсено значимо от това на Контролата (ФО) ( $p < 0.001$ ) и не се различава от ОВ група. Липсата на ефект на ПСАМ в доза 10 ml/kg може да е резултат на по-изразено намаление на двигателна активност, отчетено в тест открито поле. Времето на социално взаимодействие на ОВ+ХГК е незначимо удължено в сравнение с това на ОВ група и не се различава от това на Контролата (ФО), което ни дава основание да приемем, че ХГК противодейства на ОВ-индуцираната тревожност.

*Таблица 5. Време за социално взаимодействие (sec) при овариектомирани плъхове, третирани за период от 76 дни с дестилирана вода (Контрола SO и ОВ) или с ПСАМ в дози 5 ml/kg (ОВ+ПСАМ5), 10 ml/kg (ОВ+ПСАМ10), или с ХГК в доза 20 mg/kg (ОВ+ХГК група); резултатите са представени, като средна стойност $\pm$ SEM; n=14*

*\*\*\* $p < 0.001$  в сравнение с Контролата (ФО);  $^{\&}p < 0.05$  спрямо група ОВ група*

Групи животни	Време на социално взаимодействие (sec)
Контрола (ФО)	30.36 $\pm$ 4.64
ОВ	12.25 $\pm$ 1.86***
ОВ+ПСАМ5	22.15 $\pm$ 3.72 $^{\&}$
ОВ+ПСАМ10	10.56 $\pm$ 2.33***
ОВ+ХГК	22.14 $\pm$ 5.32

### 76-дневно третиране



Фигура 6. Ефект на плодов сок от *Aconia melanosarpa* (в дози 5 и 10 ml/kg) и хлорогенова киселина (в доза 20 mg/kg) върху времето на социалното взаимодействие при овариектомирани плъхове, след 76-дневно третиране. Стойностите са средна±SEM; n=14; \*\*\*p<0.001 в сравнение с Контролата (ФО); &p<0.05 спрямо група ОВ група

### 1.2.3. Обсъждане

Взаимосвързаните системи от хормони и невротрансмитери, невротрофични фактори и цитокини са основни регулаторни механизми, контролиращи нормалната мозъчна пластичност. Дисфункцията на тези системи е основата за развитие на мозъчни патологии, включително психични заболявания. Флуктуациите на женските полови хормони по време на пременопаузния период, постпартума и перименопаузата могат да окажат въздействие върху неврохимичните пътища, контролиращи тревожността и депресията (Stahl, 2001), както и процесите на обучение и памет (Fedotova et al., 2017; Mc Ewen, 2013). Хормоналните промени могат да увеличат или намалят експресията на специфичните подтипове естрогенни рецептори, като това корелира с анксиогенни или анксиолитични ефекти (Borow & Handa, 2017). От физиологичен аспект, тревожността има адаптивна функция и е нормален емоционален отговор към заплаха или потенциална заплаха (Bouayed et al., 2009). Тревожността се класифицира като патологично състояние, когато е постоянна и екстремна (Croos et al., 2004). Редица литературни данни разкриват връзка между естрогенния дефицит и повишената тревожност при овариектомирани животни (Ter et al., 2009).

Настоящото изследване има за цел да се тестват ефектите на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху тревожността на плъхове с овариектомия-индуциран хормонален дефицит в тест за социално взаимодействие.

Тестът за социално взаимодействие се провежда в условия на ярка светлина, непозната арена и непознат тест партньор, за да се създаде високо ниво на тревожност (File and Hyde, 1978). Анксиолитично-подобно поведение се наблюдава, когато времето за социално общуване се повиши, докато общата двигателна активност остава непроменена.

Проведеното изследване показва, че в теста за социално взаимодействие, проведен на 31 ден, когато не се отчита развитие на тревожно поведение при овариектомирани животни, плодовият сок *Aronia melanocarpa* в дози от 5 ml/kg и 10 ml/kg понижава времето на активните социални контакти. Този ефект може да се дължи на намалената обща двигателна активност, демонстрирана при същите животни в теста открито поле.

Прилаган в продължение на 76 дни, плодовият сок от *Aronia melanocarpa* в доза 5 ml/kg удължава времето на социално взаимодействие между тестовите ОВ животни. Тези данни показват, че плодовият сок от *Aronia melanocarpa* има анксиолитично-подобен ефект при ОВ плъхове. Липсата на ефект на плодовия сок *Aronia melanocarpa* във висока доза при ОВ+ПСАМ10 група, може да е резултат на по-изразено намаление на двигателната активност отчетено в тест открито поле, вероятно вследствие понижена възбудимост на ЦНС и на седация. Подобна намалена локомоторна активност, е установена при интактни плъхове, третирани с плодов сок от *Aronia melanocarpa* в доза 10 ml/kg за период по-дълъг от три седмици в тест открито поле (Valcheva-Kuzmanova et al., 2014). Времето на социално взаимодействие на ОВ група, третирана 76 дни с хлорогенова киселина, е удължено в сравнение с това на ОВ група и не се различава от това на Контролната (ФО). Хлорогеновата киселина след 76-дневно приложение предотвратява ОВ-индуцираната тревожност.

Известно е, че мозъчната GABA-ергичната система е отговорна за седацията (Gottesmann, 2002). Седативният ефект на плодовия сок от *Aronia melanocarpa*, наблюдаван в настоящия експеримент, може да се дължи на повлияване на GABA-A рецепторите, съдържащи  $\alpha 1$  субединица, вследствие на натрупване на полифенолите в ЦНС при продължителен прием на сока.

Анксиолитично-подобен ефект се наблюдава след 76-дневно третиране с плодовия сок от *Aronia melanocarpa* в доза от 5 ml/kg. Възможно е в по-ниската доза на плодовия сок

от *Aronia melanocarpa* и с удължаване периода на третиране да се постига комбинация от механизми на действие, включващи стимулиране на ГАВА-ергичната тевротрансмисия, намаляване на оксидативния стрес и невротрофично действие и др. Анксиолитично-подобният ефект на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* се дължи вероятно на комплексен механизъм на действие на полифенолите, които са основните биологично активни вещества в сока и които имат способността да преминават през хемато-енцефалната бариера. Тези резултати са в съответствие с други проучвания, доказващи, че флавоноидите (Vignes et al., 2016), включително антоцианините (Kumar et al., 2008) имат анксиолитично действие при животни.

Патологичната хронична тревожност и депресия се свързват с повишен оксидативен стрес в мозъчната тъкан. Реактивните кислородни видове (ROS) – супероксидни аниони ( $O_2^-$ ), хидроксилни радикали ( $OH^\cdot$ ), пероксидни радикали ( $RO_2$ ), хипохлорна киселина ( $HOCl$ ), пероксинитрит ( $ONOO^-$ ), причиняват оксидативен стрес, липидна пероксидация, окисляване на протеини и възможно увреждане на ДНК на нервните клетки (Bouayed et al., 2009). Антиоксидантната активност на полифенолите се дължи главно на техните редокс свойства. Като донори на електрони или Н атоми полифенолите неутрализират реактивните кислородни видове (ROS). Счита се, че антоцианините намаляват оксидативния стрес на невроналната ДНК. Така те проявяват невронална защита, която се приема, че е отговорна за анксиолитичния им ефект (Barros et al., 2006). Установено е още, че инхибират моноаминооксидазите (MAO-A, MAO-B) антоцианините, противодействат на намаляването на невроналните нива на серотонин, норадреналин и допамин. Това са невротрансмитери, замесени в патогенезата на тревожните разстройства и разстройства на настроението. (Dreiseitel et al., 2009).

Хроничният стрес води до свръхпродукция на цитокини, която променя синтеза на растежни фактори, намалява неврогенезата и синаптичната пластичност в региони на мозъка, участващи в поведението и познанието (Calabrese et al., 2014 Kim et al., 2016). Намаляването на про-възпалителните цитокини би могло да допринесе за анксиолитично-подобния ефект на плодовия сок от *Aronia melanocarpa*. В тази връзка феруловата киселина, която е компонент от състава на сока, значително инхибира производството на  $TNF-\alpha$ ,  $IL-6$ ,  $IL-1\beta$  и  $NO$ , и намален  $COX-2$  и  $iNOS$  (Wu et al., 2015)

Известно е, че редица полифеноли дължат анксиолитичните си свойства на модулация на GABA-A и GABA-C рецепторите (Fernandez et al., 2009; Goutman et al., 2003). Съобщава се, че флавоноидът епигалокатехин-3-галат (EGCG) води до поведенчески отговори, които се описват като бензодиазепин-подобни. Приема се, че EGCG взаимодейства с GABA-A рецепторите и на това се дължат анксиолитично-подобните му свойства (Vignes et al., 2006).

Серотонинергичните неврони се проектират широко в различни мозъчни региони и участват в регулацията на много аспекти на мозъчните функции, например реактивността на автономната нервна система, настроението, агресията, паметта и обучението (Rudolph et al., 2016). Съществуват множество данни за ролята на серотониновия дисбаланс в тревожното и депресивно-подобно поведение при хора и в експериментални животински модели (Hiroi et al., 2006; Nelson and Bulun, 2001). 5-HT<sub>1A</sub> рецепторите за серотонин (5-хидрокситриптамин) активират G i/o/z протеини, които са с инхибиторна сигнална функция (Barnes and Sharp, 1999). За тези рецептори е известно, че участват в модулацията на изследователското и свързаното със страх поведение, като тяхното потискане е свързано с увеличена тревожност (Stiedl et al., 2015). Данните сочат, че при плъхове, галовата киселина проявява анксиолитично-подобен ефект, сходен с този на 5-HT<sub>1A</sub> рецепторния агонист Buspirone, който се блокира при използване на 5-HT<sub>1A</sub> рецепторен антагонист (Mansouri et al., 2014).

Друг вероятен механизъм, допринасящ за анксиолитично-подобният ефект на плодовия сок от *Aronia melanocarpa*, е увеличаване на нивата на BDNF. Този невротрофичен фактор е ключова молекула, ангажирана в невроналното оцеляване, диференциация и синаптична пластичност (Patki et al., 2013). При експериментите на Liu et al. (2017), феруловата киселина, която е полифенолно съединение в плодовия сок от *Aronia melanocarpa*, повишава нивата на BDNF в хипокампуса и префронталния кортекс, както и инхибира микроглиалната активация, експресията на про-възпалителните цитокини и NF κB сигнализацията.

При опити със здрави плъхове, сокът от *Aronia melanocarpa* проявява анксиолитично-подобен ефект както при еднократно (Valcheva-Kuzmanova et al., 2009), така и при субхронично прилижение (Efftimov et al., 2013; Valcheva-Kuzmanova et al., 2016). При

еднократно приложение този ефект не е съпроводен със седация и нарушаване на работната памет (Valcheva-Kuzmanova et al., 2009).

Според настоящият експеримент хлорогеновата киселина в доза 20 mg/kg след 31-дневно приложение не променя значимо времето на социално взаимодействие на овариектомираните плъхове, при които за този период не се развива тревожно поведение. Хлорогеновата киселина в доза 20 mg/kg след 76-дневно приложение, предотвратява овариектимия-индуцираната тревожност, като повишава времето на активните социални контакти до стойности, които не се различават значимо от тези на фалшиво оперираните плъхове. Ефектът на хлорогеновата киселина установен след 76-дневно приложение най-вероятно е с комплексен механизъм и включва: намаляване на оксидативния стрес, стимулиране на невроналния растеж и диференциация, поддържане на невропластичността, както и възможно повлияване на GABA-ергичната невротрансмисия. Това са механизми дискутирани от редица автори при проучване на анксиолитичния ефект на хлорогеновата киселина при експериментални условия (Bouayed et al., 2007; Rammal et al., 2008; Saitou et al., 2018). Направеният литературен анализ разкрива положителни ефекти на хлорогеновата киселина върху тревожността в поведенчески тестове при опитни животни. В модел при мишки, хлорогеновата киселина демонстрира анксиолитичен ефект, изследван в тест светла/тъмна кутия и в тест повдигнат кръстосан лабиринт (Bouayed et al., 2007). При опит със здрави плъхове хлорогеновата киселина проявява анксиолитично-подобен ефект при субхронично приложение (Georgieva et al., 2016).

### **1.3. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху депресивната симптоматика в тест за принудително плуване**

#### **1.3.1. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху депресивната симптоматика след 33-дневно приложение**

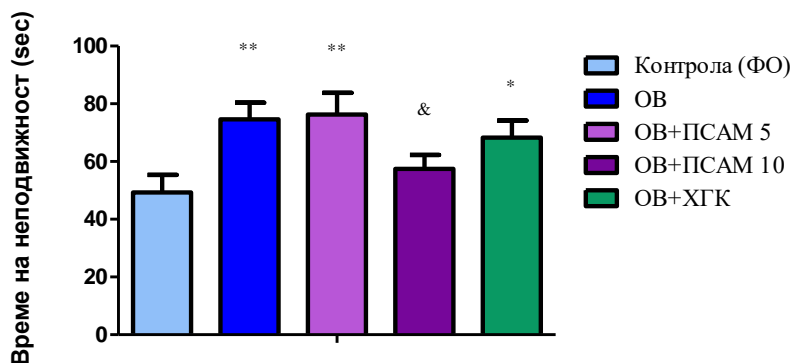
Чрез тест за принудително плуване поведенческите промени са проследени след 33<sup>ия</sup> ден от началото на третирането. Плуването и неподвижността (имобилност) на животното се разглеждат като взаимно изключващи се поведенчески състояния. Плуването се определя като движение, т.е. активност на животното. Неподвижността се определя като липса на движение и безнадежност, т.е. депресивно подобно поведение на животното. Намаляване времето на имобилност се приема за антидепресивен показател.

Резултатаите от третирането с ПСАМ и ХГК в тест за принудително плуване са представени на Фигура 7 и Таблица 6. При 33-дневно приложение времето на неподвижност на ОВ плъхове е удължено сигнификантно ( $p < 0.01$ ) в сравнение с Контролната (ФО) група животни. Третирането с ПСАМ в ниска доза 5 ml/kg няма значим ефект върху времето на неподвижност. Времето на неподвижност на ОВ плъхове, третирани с ПСАМ в доза 10 ml/kg, е значимо ( $p < 0.05$ ) по-кратко от това на ОВ група и не се различава значимо от ФО. ХГК няма значим ефект върху времето на неподвижност на ОВ плъхове в сравнение с Контролната (ФО) група животни. Тези резултати показват, че ПСАМ проявява доза-зависим ефект в доза 10 ml/kg и понижава депресивната симптоматика в модел на депресия при овариектомирани плъхове.

*Таблица 6. Време на неподвижност (sec) в тест за принудително плуване (FST) на овариектомирани плъхове, третирани за период от 33 дни с дестилирана вода (Контрола SO) и ОВ или с ПСАМ в дози 5 ml/kg (ОВ+ПСАМ5), 10 ml/kg (ОВ+ПСАМ10), или с ХГК в доза 20 mg/kg (ОВ+ХГК група); резултатите са представени като средна стойност $\pm$ SEM;  $n=14$ ; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  в сравнение с Контролата (ФО);  $\&p < 0.05$  спрямо група ОВ*

Групи животни	Време на неподвижност (sec)
Контрола (ФО)	49.33 $\pm$ 6.00
ОВ	74.63 $\pm$ 5.71 **
ОВ $\pm$ ПСАМ5	76.29 $\pm$ 7.49 **
ОВ $\pm$ ПСАМ10	54.44 $\pm$ 4.84 $\&$
ОВ $\pm$ ХГК	68.27 $\pm$ 5.94 *

### 33-дневно третиране



Фигура 7. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* (в дози 5 и 10 ml/kg) и хлорогенова киселина (в доза 20 mg/kg), прилагани еднократно дневно за период от 33 дни, върху времето на неподвижност в тест за принудително плуване на овариектомирани плъхове; резултатите са представени като средна стойност $\pm$ SEM; n=14

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  в сравнение с Контролата (ФО); & $p < 0.05$  спрямо група ОВ

### 1.3.2. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху депресивната симптоматика след 78-дневно приложение

Резултатите от третирането с ПСАМ и ХГК в тест за принудително плуване са представени на Фигура 8 и Таблица 7.

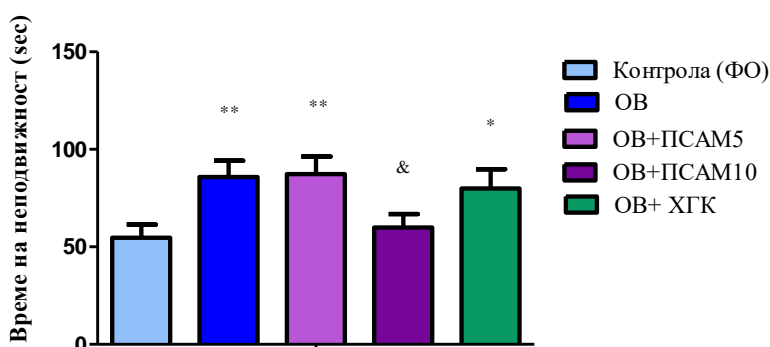
При 78-дневно приложение, времето на неподвижност на ОВ плъхове е удължено сигнификантно ( $p < 0.01$ ) в сравнение с Контролата (ФО) животни. Третирането с ПСАМ в ниска доза 5 ml/kg няма значим ефект върху времето на неподвижност. Времето на неподвижност на ОВ плъхове, третирани с ПСАМ в доза 10 ml/kg, е достоверно значимо ( $p < 0.05$ ) по-кратко от това на ОВ група. Хлорогенова киселина няма значим ефект върху времето на неподвижност. Тези резултати показват, че ПСАМ в доза 10 ml/kg приложен хронично, проявява антидепривно-подобен ефект в модел на депресия при овариектомирани плъхове.



Таблица 7. Време на неподвижност (sec) в тест за принудително плуване на овариектомирани плъхове, третирани за период от 78 дни с дестилирана вода (Контрола SO) и ОВ или с ПСАМ в дози 5 ml/kg (ОВ+ПСАМ5), 10 ml/kg (ОВ+ПСАМ10), или с ХГК в доза 20 mg/kg (ОВ+ХГК група); резултатите са представени, като средна стойност±SEM; n=14; \*p<0.05; \*\*p<0.01 в сравнение с Контролата (ФO); &p<0.05 спрямо група ОВ

Групи животни	Време на неподвижност (sec)
Контрола (SO)	54.71±6.77
ОВ	85.81±8.43 **
ОВ±ПСАМ5	87.31±9.00 **
ОВ±ПСАМ10	59.94±6.88 &
ОВ±ХГК	79.93±9.94 *

#### 78-дневно третиране



Фигура 8. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* (в дози 5 и 10 ml/kg) и хлорогенова киселина (в доза 20 mg/kg), прилагани еднократно дневно за период от 78 дни, върху времето на неподвижност в тест за принудително плуване на овариектомирани плъхове; n=14; резултатите са представени, като средна стойност±SEM;

\*p<0.05; \*\*p<0.01 в сравнение с Контролата (ФO) животни; &p < 0.05 спрямо група ОВ

### 1.3.3. Обсъждане

Депресивните разстройства засягат както емоционалното състояние на индивида, така също водят до функционални промени. Клиничните прояви на депресията могат да варират значително, от леки състояния, граничещи с нормата, до тежки разстройства с халюцинации и налудни идеи. Наличието на паметови дефицити и познавателни нарушения, са често срещани сериозни здравословни усложнения на това заболяване, които влошават качеството на живот. Голямото депресивно разстройство, е силно инвалидизиращо заболяване, като се очаква до 2030 г. да стане първата по честота на разпространение болест, след хронични заболявания, като исхемичната болест на сърцето и захарния диабет (Malhi and Mann, 2018).

Депресията има многофакторна етиология, произтичаща от взаимно свързани психосоциални, генетични, епигенетични и невроендокринни процеси (De la Torre et al., 2018). Въпреки десетилетията изследователски усилия, конкретните патогенетични механизми остават все още ненапълно изяснени. Понастоящем водеща е интеграционната значимост на моноамините, невроендокринните и невротрофични фактори в патогенезата на депресивните разстройства. Серотонинергични и норадренергични дисфункции отдавна се свързват с депресията. Има данни, че кортикалният и лимбичен дефицит в нивата или функциите на серотонина (5-НТ), норадреналина (NA) и допамина (DA) е причина за развитие на депресия (Delgado and Moreno, 2000). Серотонинът и/или норадреналинът са прицелните молекули, които участват в механизма на действие на повечето антидепресанти.

Данните сочат, че жените са два-три пъти по-често засегнати от депресивни разстройства в сравнение с мъжете (WHO, 2020). Естрогените чрез различни механизми участват в сложната и многофакторна регулация на поведението, емоциите и когнитивните функции. Всички те могат да бъдат засегнати по време на менопаузата, когато нивата на естрогени започват да намаляват.

Редица литературни данни са в подкрепа на тезата, че флукуациите на женските полови хормони по време на пременопаузния период, постпартума и перименопаузата могат да окажат въздействие върху неврохимичните пътища, контролиращи тревожността и депресията (Stahl, 2001), както и процесите на обучение и памет (Fedotova et al., 2017). Хормоналните промени могат да увеличат или намалят експресията на специфичните подтипове естрогенни рецептори, като това корелира с анксиогенни или анксиолитични

ефекти (Borrow & Handa, 2017). Известно е, че нарушенията в настроението са два пъти по често срещани при жени с ниски плазмени нива на естрадиол, отколкото при мъжете (Dalla et al., 2005). Рискът от тревожно-депресивни разстройства нараства от два до шест пъти по време на менопаузата (Frizell & Dumas, 2018).

Според проучените научни данни овариалните стероидни хормони и редица невротрансмитери споделят общи пътища и рецептори в мозъка на гризачи, маймуни и хора. Тези пътища са разположени в области, отговорни за основни функции на нервната система като емоции, поведение, обучение и памет – хипокампадна формация, амигдала, церебрален кортекс (Almeu et al., 2015; Frizell & Dumas, 2018). Овариалните стероиди влияят върху много неврорегулаторни системи, включени в патофизиологията на афективните и когнитивни разстройства (Dotlic et al., 2020).

Проучвания при животни показват, че половите хормони регулират базалната и стимулираната функция на хипоталамус-хипофиза-надбъбречната ос. Изследвания сочат, че въвеждането на естрадиол намалява производството на mPFC на глюкокортикоидния рецептор в тимуса и хипофизата (Protopopescu et al., 2008). Освен това, естрадиолът влияе върху серотонинергичната регулация на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбречна жлеза, като променя функцията на 5-HT<sub>1A</sub> и 5-HT<sub>2</sub> рецепторните системи в кората и хипокампуса.

Директната хипокампусна активация на естрогенните рецептори предизвиква антидепресивни и анксиолитично-подобни ефекти (Vandegrift et al., 2017). Активирането на естрогенните рецептори подобрява клетъчната пролиферация (McEwen et al., 1997), която повишава експресията на BDNF при овариектомирани плъхове в модел на постинсултна депресия (Su et al., 2016). Многобройни предишни изследвания показват, че естрогените и BDNF стимулират неврогенезата в хипокампуса (Rossi et al., 2006) и участват в синаптичната модификация (Cui et al., 2013) за подобряване процесите на учене и памет (Savitz et al., 2009).

Други литературни източници съобщават, че естрогенното сигнализиране засяга невротрансмитерните системи (серотонин-, норадреналин-, допамин- и глутаматергична), участващи в патогенезата на психичните разстройства (Bosse & Di Paolo, 1996; Dalla et al., 2005).

Съществуват множество данни за ролята на серотониновия дисбаланс в тревожното и депресивно-подобно поведение при хора и в експериментални животински модели (Hiroi

& McDevitt, 2006; Nelson & Bulun, 2001). Естрогенът увеличава серотониновите (5-НТ) постсинаптични ефекти (Halbreich et al., 1995), улеснява синтеза на 5-НТ (Dotlic et al., 2020), като повишава експресията на триптофан хидроксилазата и тирозин хидроксилазата, и намалява активността на моноаминооксидазата (Chakravorty & Halbreich, 1997).

Естрадиолът реагира чрез множество механизми в мозъчните области, замесени в регулирането на настроението. Frey et al. (2004) установяват, значимо намаляване на депресивното поведение при опитните животни, след директно инжектиране на естрадиол в амигдалата. Промените в хипокампуса поради изчерпване на нивата на естроген по време на менопаузалния преход могат да бъдат забавени или предотвратени с екзогенно приложение на естроген (Protopopescu et al., 2008).

Настоящото изследване има за цел да се тестват ефектите на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху депресивно-подобното поведение на плъхове с овариектомия-индуциран хормонален дефицит в тест за принудително плуване. Това е метод, който дава възможност да се оцени поведението на животните в обстановка на безпомощност, от която няма как да се спасят. Повишеното време на неподвижност се свързва с депресивно-подобно поведение.

Резултатите от тестирането на 33<sup>ия</sup> и 78<sup>ия</sup> ден показват, че плодовият сок от *Aronia melanocarpa*, прилаган в доза 10 ml/kg, значимо намалява времето на неподвижност на овариектомираните плъхове. Третирането с плодовия сок от *Aronia melanocarpa*, в доза 5 ml/kg и хлорогенова киселина няма значим ефект върху времето на неподвижност на ОВ животни. Това показва, че сокът от *Aronia melanocarpa* проявява доза-зависим ефект и понижава депресивната симптоматика при приложение в доза 10 ml/kg в модел на депресия при овариектомирани плъхове. При предишни изследвания екипът на Valcheva-Kuzmanova установява, че сокът от *Aronia melanocarpa* понижава депресивната симптоматика както при здрави плъхове, така и при индуцирано от алкохол и социална изолация тревожно-депресивно поведение (Eftimov et al, 2013; Ефтимов et al., 2015; Valcheva-Kuzmanova et al., 2013, Valcheva-Kuzmanova et al., 2014).

Възможно е наблюдаваният антидепресивно-подобен ефект в настоящия опит да се дължи на фармакологичните свойства на полифеноли, съдържащи се в сока от *Aronia melanocarpa*. Вероятно, в по-високата доза на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* да се

постига комбинация от механизми на действие на биологично активните вещества от сока, допринасяща за наблюдавания ефект.

Природните полифеноли, открити в множество растителни продукти, показват защитен ефект при различни неврологични и психични разстройства. Счита се, че полифенолите могат да участват в модулирането на различни сигнални пътища и по този начин да въздействат върху съдбата на клетките (Đuračkova Z, 2010), включително и върху оцеляването, регенерацията, развитието или смъртта на невроналните клетки (Spencer, 2005).

Антидепресивното полифенолно сигнализиране се асоциира най-вероятно със следните невробиологични субстрати: хипокампусна и префронтална неврогенеза, сигнализиране чрез BDNF, моноаминна невротрансмисия, оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек, повлияване синтеза на инфламаторни медиатори.

Някои полифеноли намаляват депресивното поведение чрез модулиране на невротрансмитерни системи и трофични фактори в мозъка (Li et al., 2016). В арониевите плодове кверцетинът, кверцетиновите гликозиди и епикатехинът присъстват като второстепенни компоненти. Данните сочат, че кверцетинът увеличава наличността на серотонин и норепинефрин в синаптичното пространство, която изглежда дисрегулирана при депресия (Kahraman et al., 2012). Demir и съавтори (2016) съобщават за антидепресивно-подобни ефекти на кверцетина при плъхове с индуциран диабет. При проведено изследване, Noldner и Schotz (2002) разкриват, че флавоноида рутин (кверцетин-3-О-рутинозид), е есенциален за антидепресивното действие на екстракта от растението *Hypericum perforatum*. Понастоящем жълтият кантарион е използван, като алтернатива на традиционните антидепресанти за лечение на леkestепенна депресия (Butterweck и Schmidt, 2007).

Антидепресивен ефект на проантоцианидини, които са основен активен компонент в плодовете и плодовия сок от *Aronia Melanocarpa*, при животински модели, за първи път е докладван от Xu et al., (2010). Неврохимични изследвания разкриват, че проантоцианидите увеличават нивата на серотонин, норадреналин, допамин в редица мозъчни региони, което е в съответствието с участието на моноаминната система в антидепресивната активност на тези полифенолни съединения. Установени са антидепресивни ефекти на антоцианини от червено вино в модел на депресия, предизвикана от светлинен стрес при мъжки плъхове

(Varadinova et al., 2007a) и при овариектомирани женски плъхове (Varadinova et al., 2007b). Антоцианините са едни от основните компоненти на ПСАМ.

Моноаминоксидазите (МАО) са митохондриални ензими, които катализират окислението на моноамините в много тъкани, включително в мозъка. Повишената МАО активност, участва в етиологията на депресията, тревожността и невродегенеративните заболявания. Клинично проучване показва, че по-голямата консумация на зелен чай води до по-малка честота на депресивните симптоми сред възрастните японци (Niu et al., 2009). Известно е, че полифенолите от зеления чай инхибират МАО и по този начин повишават нивото на моноамините в глиалните клетки (Mazzio et al., 1998). Това е една от причините, полифенолите в зеления чай да имат важна роля при депресивните разстройства. Проведеният *in vitro* анализ с цианидин и цианидин-3-глюкозид, показва че те инхибират МАО А и МАО В (Dreiseitel et al., 2009).

Друг възможен механизъм при подобрието на депресивната симптоматика е подпомагане невrogenезата и възстановяване невроналната функционална активност в хипокампуса и префронталния кортекс. Такъв ефект е установен от Duman and Li, (2012) при страдащи от депресия. Добре известно е, че BDNF регулира, оцеляването и диференциацията на невроните, а също така влияе върху образуването на дендритите и дендритните шипове (Licznarski & Duman, 2013). Понижените нива на невротрофините могат да бъдат увеличени при хронично лечение с антидепресивни лекарства (Castren et al., 2007). El-Marasy et al., (2014) докладват за подобни ефекти на натуралния флаванонов гликозид - хесперидин, срещан се основно в цитросовите плодове, като *Citrus aurantium*. Donato et al. (2014) установяват увеличени нива на BDNF в хипокампуса при хронично приложение на хесперидин. Тези автори приемат в заключение, че антидепресивния ефект на флаваноновия гликозид, се медира от инхибицията на L-arginine-NO-cGMP път, а също и чрез увеличаване на BDNF нивата в хипокампуса. Богатият на полифеноли екстракт от *Ginkgo biloba L.*, проявява антидепресивно-подобен ефект, дължащ се на способността му да повишава нивата на BDNF и на неговия регулиращ фактор cAMP (CREB) (Hou et al., 2010). В модел на депресия, индуцирана от хроничен непредсказуем лек стрес, пречистеният антоцианин, облекчава депресията при мишки, чрез инхибиране, активността на МАО, както и чрез стимулиране на BDNF експресията в хипокампуса, регулирайки ERK/CREB/BDNF-сигнален път (Fang et al., 2020).

Стресът е един от най-важните фактори, отговорни за депресивните разстройства. Изследванията при животни показват, че повлияването на антиоксидантния статус е важен механизъм на действие на антидепресантите. В експериментален модел на стрес-индуцирана депресия при гризачи антидепресивните лекарства повишават ендогенната ензимна антиоксидантна защита и понижават липидната пероксидация (Zafir et al., 2009).

В тази връзка, един от най-изразените и добре изследван ефект на полифенолните съединения е антиоксидантният. Поради богатото полифенолно съдържание, плодовият сок от *Aronia Melanocarpa* притежава значителна антиоксидантна активност (Valcheva-Kuzmanova et al., 2012). Известно е, че тя се дължи на редокс свойства на полифенолите, които им позволяват да действат като донори на електрони или водородни атоми, като обезвредители на реактивните кислородни видове и метални хелатори (Sandoval-Akunã et al., 2014). Полифенолите потенцират ендогенните антиоксиданти (Valcheva-Kuzmanova et al., 2012), а също инхибират експресията на молекули, като NF- $\kappa$ B и AP-1, чувствителни към оксидативния стрес (Gupta et al., 2004). Възможно е механизмът на антидепресивно-подобното действие на полифенолите да включва предпазване на ЦНС от оксидативен стрес. Невропротективни ефекти на екстракт от *Aronia melanocarpa* са демонстрирани върху клетки от хипокампуса на мишки в *in vitro* условия, където продукцията на РКВ и глутамат-индуцирана клетъчна смърт, са потиснати, съпроводени с повишаване на активността на антиоксидантните ензими глутатион пероксидаза и глутатион редуктаза (Lee et al., 2017). Цианидин-3-О-галактозидът, който е основно съединение в екстракта от *Aronia melanocarpa*, подобрява спада на когнитивните и поведенческите функции в процеса на стареене при мишки чрез повишаване на антиоксидантния капацитет и регулиране на експресията на ERK в хипокампуса на опитните животни (Tan et al., 2014). По този начин цианидин-3-О-галактозидът може да участва в невропротективния ефект на екстракта от *Aronia melanocarpa*. Потенциалът на полифенолите да оказват невропротективни ефекти, изглежда е свързан с редица механизми, включително способността им да взаимодействат с вътреклетъчното невронално и глиално сигнализиране, да влияят върху периферния и цереброваскуларен кръвен поток и да намаляват увреждането и загубата на неврони, предизвикани от невротоксини и невровъзпаления (Smolensky et al., 2018).

Известна е ролята на проинфламаторните цитокини в патогенезата на депресията. IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  взаимодействат с митохондриите и увеличават продукцията на реактивни

кислородни видове (ROS), които от своя страна повишават експресията на цитокини (Sprague and Khalil, 2009). Полифенолите понижават производството на възпалителни цитокини в ЦНС и насърчават експресията на противовъзпалителни маркери в микроглията на опитни животни (Gomez-Pinilla and Nguyen, 2012). В мозъка противовъзпалителното действие на полифенолите, води до невропротективни ефекти, които е възможно да допринасят за подобряване на депресивната симптоматика.

Установено е, че полифенолите от боровинки инхибират продукцията на NO $\cdot$ , IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  в активирани микроглиални клетки (Vauzour, 2012), а флавонолът кверцетин (1-30  $\mu$ M) (Chen et al., 2005) и катехинът епигалокатехин галат (1-50  $\mu$ M) (Li et al., 2004), отслабват микроглиалното и/или астроцит-медираното невронално възпаление (Si et al., 2016). Антоцианините от *Aronia melanocarpa* намаляват увреждането на ДНК в мозъка на стареещи мишки, чрез потискане траскрипцията на инфламаторните цитокини (COX2, TGF- $\beta$ 1, и IL-1), участващи в сигналния път на увреждане на ДНК (Wei et al., 2007). Феруловата киселина, която е компонент на плодовия сок от *Aronia Melanocarpa*, в модел на хроничен непредсказуем стрес, подобрява депресивната симптоматика, повлиявайки активирането на про-инфламаторните цитокини в префронталния кортекс (Liu et al., 2017).

#### **1.4. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху болковата чувствителност при овариоектомирани плъхове в тест гореща плоча след 79-дневно третиране и обсъждане**

Тестът гореща плоча (hot plate) е един от основните поведенчески модели на ноцицепция при опитни животни. Той е проведен след 79 дни от началото на експеримента, по метода описан от Eddy and Leimbach (1953) в апарат - Ugo Basile S.R.L., Italy. Тестваният плъх се поставя в отворен цилиндър (с височина 26 cm и диаметър 24 cm), на дъното на който има метална плоча, която се нагрява до постоянна температура (51 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C). Максималното време на престой на животните върху плочата (cut-off time) е 45 секунди, за да се избегне увреждане на тъканите. Отчита се латентното време (в секунди), дефинирано като периода между момента на поставяне на животното върху повърхността на горещата плоча и момента, в който плъхът оближе една от задните си лапи, направи опит за изкачане от цилиндъра или е налице вокализация. След третирането с изследваните вещества, тестирането на гризачите се повтаря три последователни пъти на интервали от два часа,



средна аритметична стойност се изчислява за всяко животно и се разглежда като индекс за чувствителност към болка.

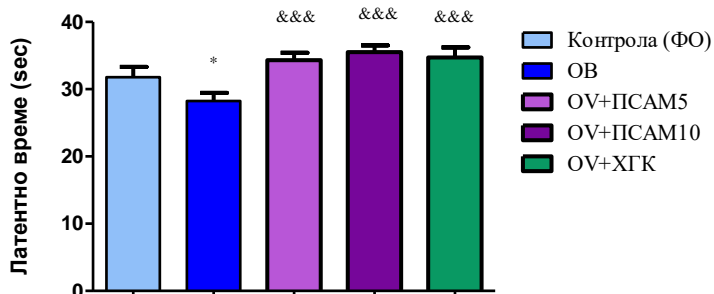
Резултатаите от третирането с ПСАМ и ХГК в тест гореща плоча са представени на Фигура 9 и Таблица 8.

Латентното време на ОВ плъхове е скъсено сигнификантно ( $p < 0.05$ ) в сравнение с контролната група животни. Латентното време на ОВ+ПСАМ5 и ОВ+ПСАМ10 групи е удължено сигнификантно ( $p < 0.001$ ) в сравнение с ОВ група животни и е незначимо различно от това на контролната група плъхове (Фигура 9). Латентното време на ОВ+ХГК група е удължено сигнификантно ( $p < 0.05$ ) в сравнение с ОВ група животни и незначимо различно от това на контролната група плъхове (Фигура 9). Третирането на ОВ плъхове с ПСАМ и ХГК намалява ноцицептивната чувствителност в тест върху гореща плоча.

Таблица 8. Латентно време (sec) в тест гореща плоча (hot plate) на овариектомирани плъхове, третирани за период от 79 дни с дестилирана вода (Контрола ФО) и ОВ или с ПСАМ в дози 5 ml/kg (ОВ+ПСАМ5), 10 ml/kg (ОВ+ПСАМ10), или с ХГК в доза 20 mg/kg (ОВ+ХГК група); резултатите са представени, като средна стойност $\pm$ SEM; \* $p < 0.05$  в сравнение с Контролата (SO); &&& $p < 0.001$  спрямо група ОВ

Грипи животни	Латентно време (sec)
Контрола (ФО)	31.79 $\pm$ 1.52
ОВ	28.26 $\pm$ 1.18 *
ОВ+ПСАМ5	34.33 $\pm$ 1.07 &&&
ОВ+ПСАМ10	35.52 $\pm$ 0.99 &&&
ОВ+ХГК	34.71 $\pm$ 1.50 &&&

#### 79-дневно третиране



Фигура 9. Ефекти на на плодов сок от *Aronia melanocarpa* (в дози 5 и 10 ml/kg) и хлорогенова киселина (в доза 20 mg/kg), прилагани еднократно дневно за период от 79 дни, върху болковата чувствителност при овариектомирани плъхове в тест върху гореща плоча; резултатите са представени, като средна стойност $\pm$ SEM; n=14  
\*  $p < 0.05$  в сравнение с Контролната (ФО) група; &&&  $p < 0.001$  спрямо група ОВ

Болката е сложно преживяване, което включва както сетивни, така и афективни измерения. Спадът на яйчниковите хормони по време менопаузата може да повлияе на соматосензорния, когнитивния и афективен отговор на организма. Яйчниковите хормони променят поведението в отговор на болката.

Данните сочат, че естрогените играят важна роля за предизвикване на антиноцицепция при експериментални животни (de Chaves et al., 2009). Възможната функция на ER в модуляцията на болката се подкрепя допълнително от факта, че естрогенните рецептори са широко разпространени в ЦНС, по-специално в няколко мозъчни области, свързани с ноцицептивната невронална система – амигдала, таламус и фронтална част на цингуларния кортекс (ACC) (Solum and Handa, 2002). Естрогените влияят на сензорната и болковата системи (Chen et al., 2021). Овариектомирани гризачи са склонни да проявяват механична и термична хипералгезия, докато третирането им с екзогенен естроген може да предотврати наблюдаваните симптоми (Chen et al., 2021). Свързаните с болката сигнални пътища вероятно се активират от лиганди по генетичен или негенетичен начин. ER $\alpha$  и ER $\beta$  рецептори взаимодействат с ноцицептивната система и модулират болката чрез

различни клетъчни сигнални пътища (MAPK/ERK; PKA; PKC и др) (Chen et al., 2021; Kiss et al., 2012). Естрогенният дефицит променя болковата перцепция, но въпреки това механизмите, чрез които ERs повлияват болката, все още са до голяма степен неизвестни. Установено е обаче, че възприемането на болката зависи от много фактори (вид на болката, нейния произход, нивото на естрогените, половата принадлежност, и др.), което значително затруднява цялостното описание на механизмите, залегнали в основата на ноцицепцията при естрогенен дефицит. Точният механизъм на този ефект изисква допълнителни изследвания. Освен това, може да има взаимодействия между различните хормони, които също трябва да бъдат взети под внимание.

Настоящото изследване има за цел да се тестват ефектите на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху болковата чувствителност при плъхове с ОВ-индуциран естрогенен дефицит в тест върху гореща плоча. Тестът върху гореща плоча е стандартен избор за оценка на аналгетична активност, както на ново синтезирани, така и на внедрени в употреба лекарствени съединения. Използваният термичен стимул дава възможност за отdeferенциране на различни механизми и нива на действие на антиноцицепция (Barrot, 2012). Един от начините за оценка на ноцицепцията при експерименталните животни е чрез наблюдение на поведението им. Наблюдаваните при този тест поведенчески параметри: облизване на лапата, опит за изкачане и вокализация са израз на супраспинално интегрирани отговори (Deuis et al., 2017).

При тестирането върху гореща плоча ОВ животни демонстрират термична хипералгезия, което е в съответствие с други изследвания (Li et al., 2014; Sanoja and Carvero, 2008). Резултатите от настоящото изследване показват, че след 79-дневно третиране плодовият сок от *Aronia melanocarpa* в доза от 5 ml/kg и 10 ml/kg, както и хлорогеновата киселина в доза 20 mg/kg оказват антиноцицептивен ефект, удължавайки значимо латентното време на престой в сравнение с ОВ група и незначимо различно от това на контролната (ФО) група. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогеновата киселина ефективно повишават прага на чувствителност на овариектомираните животни към болка, предизвикана от топлина. Има механизми, които биха могли да бъдат предложени като обяснение на тези резултати. Съществува изобилие от доказателства, че някои провъзпалителни цитокини, като интерлевкин 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6 и фактор на туморна некроза- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), играят специфична роля в процеса на ноцицептивната сигнализация (Zhang and

Ап, 2007). Простагландините сами по себе си не предизвикват болка, но засилват болка-предизвикващия ефект на други алгогенни субстанции като кинини и 5-хидрокситриптамин (Basbaum et al., 2009).

От друга страна, съществува тясна връзка между цитокините и оксидативния стрес при индуцирането на болката. IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  могат да активират никотинамид аденин динуклеотид фосфат-(NADPH-) оксидазата, което води до производството на супероксидни аниони. На свой ред, супероксидният анион активира нуклеарен фактор карпа В (NF- $\kappa$ B) и повишава производството на цитокини (Verri et al., 2012). Вещества, които потискат простагландиновата синтеза, могат да имат не само противовъзпалителен, но и аналгетичен ефект.

От тази гледна точка, кверцетинът, който е компонент на ПСАМ, демонстрира добра способност да намалява експресията на различни интерлевкини (като IL-6 и IL-2), а също и нивата на iNOS, NF- $\kappa$ B, p38 MAPK и TNF- $\alpha$  (Caruso et al., 2017). В допълнение към това, е доказано, че кверцетинът намалява свръхчувствителността към топлинната и механичната алодиния, а също така оксидативния дисбаланс и про-ноцицептивното производство на цитокини при възпалителна болка. Установено е още, че при модел на хипералгезия, индуцирана от карцином на Ehrlich, кверцетинът проявява добра аналгетична активност, зависима и от ендогенни опиоидни механизми (Caruso et al., 2017; Calixto-Campus et al., 2015).

За епигалокатехин-3-галат (EGCG) се съобщава, че облекчава невропатичната болковата симптоматика при животински модели, проявявайки противовъзпалителна и антиоксидантна активност (Bimonte et al., 2017).

Редица автори съобщават за антиоксидантното и противовъзпалително действие на плодовия сок от *Aronia melanocarpa*, което вероятно корелира с антиноцицептивния му ефект (Jurikova et al., 2017; Vanach et al., 2020). Противовъзпалителните действия на сока могат да се дължат на влиянието му върху възпалителните и противовъзпалителни цитокини. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* има доказан противовъзпалителен ефект в модели на хистамин- и серотонин-индуцирано възпаление на задната лапа на плъх (Borissova et al., 1994). В модел на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност сокът понижава IL-6, повишава IL-10 в серума и понижава полиморфонуклеарните левкоцити в бронхо-алвеоларната лаважна течност (Valcheva-Kuzmanova et al., 2012). При ендотоксин-

индуциран увеит при плъхове, екстрактът от *Aronia melanocarpa* води до противовъзпалителен ефект, резултат на намалената продукция на азотен оксид (NO) и на простагландин E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Ohgami et al., 2005). Благоприятните ефекти на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* върху поведението на овариектомираните плъхове може да се дължат поне отчасти на фитоестрогенните свойства на някои антоцианидини (особено цианидин) и кверцетин, и двата присъстващи във висока концентрация в плодовете на *Aronia melanocarpa* (Nanashima et al., 2015; Nanashima et al., 2018).

Хлорогеновата киселина понижава болковата чувствителност в модел на възпаление (Bagdas et al., 2020). Антиноцицептивните ефекти на хлорогеновата киселина при възпалителна и невропатична болка също са свързани с инхибиторни ефекти върху освобождаването или синтеза на възпалителни медиатори, като TNF- $\alpha$ , NO и IL (Chauhan et al., 2012; dos Santos et al., 2006). Хиперполяризацията на сензорните ганглии може да бъде алтернативно обяснение за антиноцицептивните ефекти на хлорогеновата киселина при животински модели. Волтаж-зависимите калиеви канали (Kvs) са физиологични регулатори на мембранныя потенциал в сетивните неврони. Тъй като хлорогеновата киселина силно повишава активността на волтаж-зависимите калиеви канали (Kv1.4), това води до хиперполяризация и постепенно намаляване на възбудимостта на невроните, участващи в сигнализацията на невропатичната и възпалителната болка (Zhang et al., 2014). Има данни, че галовата киселина, която също е компонент на плодовия сок от *Aronia melanocarpa*, проявява антиноцицептивни ефекти при мишки, действайки като антагонист на мембранныя преходен рецепторен потенциал анкирин 1 (TRPA1), и по този начин намалява TRPA1-медирания приток на калций (Trevisan et al., 2014). Една от специфичните функции на TRPA1, включва роля в откриването, интегрирането и инициирането на сигнали за болка в периферната нервна система.

## **2. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселини върху поведението на плъхове с двустранна булбектомия**

### **2.1. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселини върху тревожността при булбектомирани плъхове в тест повдигнат кръстосан лабиринт и обсъждане**

Експериментът е проведен върху 30 мъжки плъха, порода Wistar, разделени в 5 групи по 6 животни означени като: Контрола – фалшиво оперирани (ФО), ОБ, ОБ+ХГК, ОБ+ФК и ОБ+ГК. Плъховете от ОБ, ОБ+ХГК, ОБ+ФК и ОБ+ГК групи са булбектомирани двустранно, а контролните животните са фалшиво оперирани. След 15 дневно възстановяване след операцията, за период от 14 дни, животните са третирани еднократно (във времето между 09:00-13:00 часа) чрез орогастрална сонда, както следва: Контролата (ФО) и ОБ са приемали физиологичен разтвор в доза 10 ml/kg, а групите ОБ+ХГК, ОБ+ФК и ОБ+ГК са третирани респективно: с ХГК, ФК и ГК в доза 20 mg/kg под формата на разтвор в обем 10 ml/kg. Тестът се провежда 60 min след последното третиране с ХГК, ФК и ГК или физиологичен разтвор. По време на опитната сесия с продължителност 5 min се отчитат следните показатели за всяко животно: брой на влизания в отворените и затворените рамена и времето, прекарано в тях, отчетено в секунди, както и общия брой влизания в рамената и съотношението на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания. Увеличеният брой влизания в отворените рамена и времето прекарано там се счита за индикатор за анксиолитично-подобен ефект на тестваното вещество (Pellow et al., 1986; Hritcu et al., 2012).

Резултатите, които са регистрирани по време на 5-минутната продължителност на теста са представени в Таблица 9. Двустранната булбектомия индуцира състояние на хиперактивност със значително ( $p<0,001$ ) увеличение на общия брой влизания в рамената на лабиринта на ОБ плъхове в сравнение с контролните (ФО) животни (Фигура 10). Промените в другите индекси демонстрират развитие на състояние на безпокойство. В сравнение с Контролата (ФО), ОБ животните имат значимо по-малък брой влизания в откритите рамена ( $p<0.05$ ) (Фиг. 11А) и време, прекарано там ( $p<0.01$ ) (фиг. 12А), както и значимо по-висок брой влизания в затворените рамена ( $p<0.001$ ) (фиг. 11В) и време, прекарано в тях ( $p<0.01$ ) (Фиг. 12В). При ОБ група се установяват значимо по-ниски съотношения на брой влизания в отворените рамена към общ брой влизания ( $p<0.001$ ) (Фиг. 13А) и на времето на престой в отворените рамена към общото време на престой в отворените и затворените рамена ( $p<0.01$ ) (Фигура 13В) в сравнение с Контролата (ФО) плъхове.

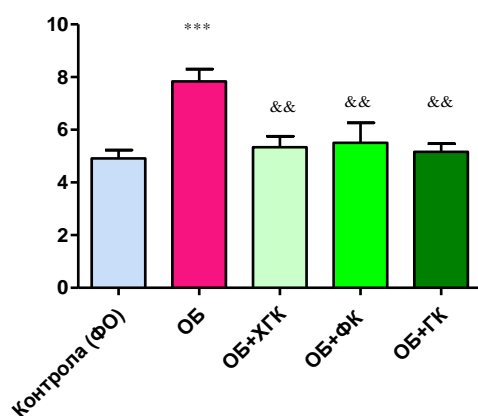
Третирането на ОБ плъхове с хлорогенова, ферулова и галова киселини антагонизира промените в поведението, предизвикани от двустранната булбектомия. Феруловата и галовата киселина водят до възстановяване на измерените индекси към стойности, които са значимо различни от тези на ОБ плъхове и не се различават от тези на Контролата (ФО) животни (Фиг. 11, Фиг. 12 и Фиг. 13). Ефектът, предизвикан от хлорогеновата киселина, е още по-висок. Хлорогеновата киселина увеличава броя на влизанията в отворените рамена и времето, прекарано там ( $p < 0.001$ ) (Фиг. 11А, Фиг. 12А), както и съотношенията: брой влизания в отворени рамена/общ брой влизания ( $p < 0.001$ ) (Фигура 13А) и времето на престой в отворени рамена/ общо време на престой в отворени и затворени рамена до стойности, които са значимо по-високи ( $p < 0.001$ ) (Фиг. 13В) не само от тези на ОБ плъхове, но също и от тези на ФО плъхове. По подобен начин, времето в затворените рамена на ОБ+ХГК плъхове е по-кратко ( $p < 0.001$ ) (Фигура 12В) от съответното време както на ОБ, така и на Контролата (ФО) плъхове. Третирането на ОБ плъхове с хлорогенова, ферулова и галова киселини предотвратява развитието на хиперактивно и тревожно-подобното поведение.

Таблица 9. Изследвани показатели в тест повдигнат кръстосан лабиринт на плъхове с двустранна олфакторна булбектомия след 14-дневно третиране с хлорогенова, ферулова и галова киселини в доза 20 mg/kg (под формата на разтвор в обем 10 ml/kg); резултатите са представени като средна стойност  $\pm S.E.M$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  в сравнение с Контролата (ФО); &p < 0.05; &&p < 0.01; &&&p < 0.001 спрямо група ОБ

Група Показател	Контрола (ФО) (n=12)	ОБ (n=12)	ОБ±ХГК (n=6)	ОБ±ФК (n=12)	ОБ±ГК (n=6)
Брой влизания в отворени рамена	1.92±0.19	1.16±0.16*	3.33±0.42**&&&	2.50±0.43&	2.50±0.22&
Време на престой в отворени рамена (sec)	1.91±0.19	1.17±0.07**	15.33±1.69***&&&	6.83±0.88	5.00±0.45
Брой влизания в затворени рамена	3.00±0.28	6.67±0.71***	2.00±3.66	3.00±0.52	2.67±0.33
Време на престой в затворени рамена (sec)	393.5±0.67	296.5±0.42**	284.4±1.69***&&&	293.2±0.87	295.0±0.44
Общ брой влизания в отворени и затворени рамена	4.92±0.31	7.83±0.47***	5.33±0.42&&	5.55±0.76&&	5.17±0.31&&
Брой влизания в отворени рамена към Общ брой влизания	0.39±0.03	0.16±0.02***	0.63±0.06**&&&	0.45±0.05&&&	0.49±0.04&&&
Време на престой в отворени рамена към Общо време на престой в отворени и затворени рамена	0.02±0.001	0.01±0.001**	0.05±0.005***&&&	0.02±0.002	0.02±0.001

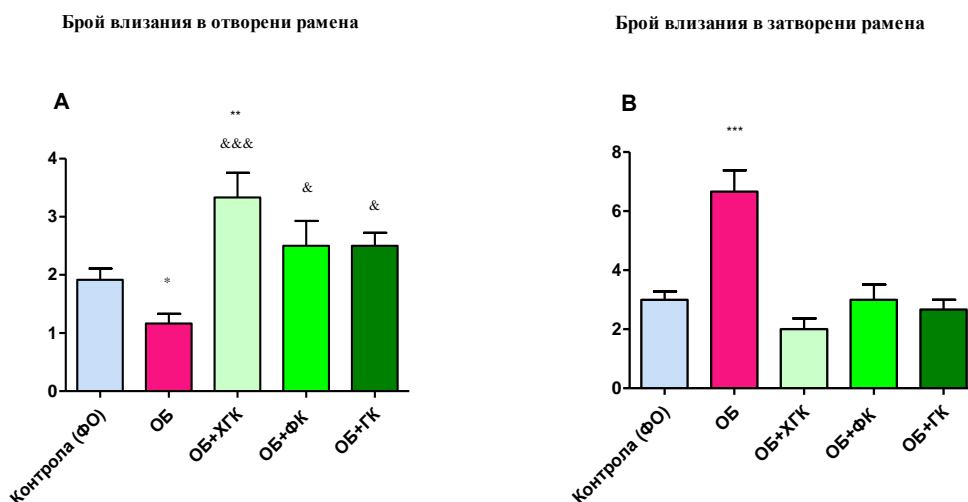


Общ брой влизания в отворени и затворени рамена



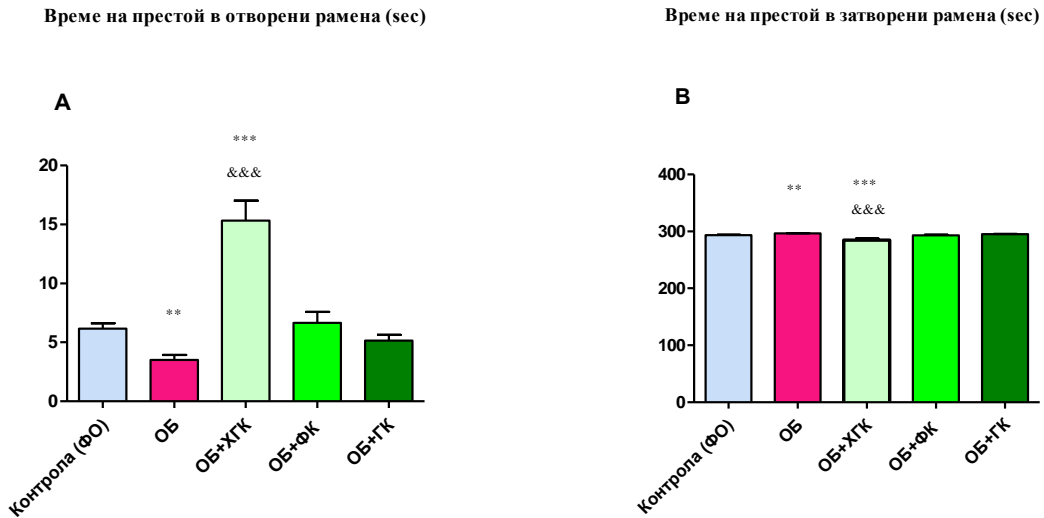
Фигура 10. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселини (в доза 20 mg/kg) върху общия брой влизания в отворени и затворени рамена в тест повдигнат кръстосан лабиринт при плъхове с двустранна булбектомия след 14-дневно третиране; резултатите са представени като средна стойност  $\pm$ S.E.M.

\*\*\* $p < 0.001$  в сравнение с Контролата (ФО); && $p < 0.01$  спрямо група ОБ

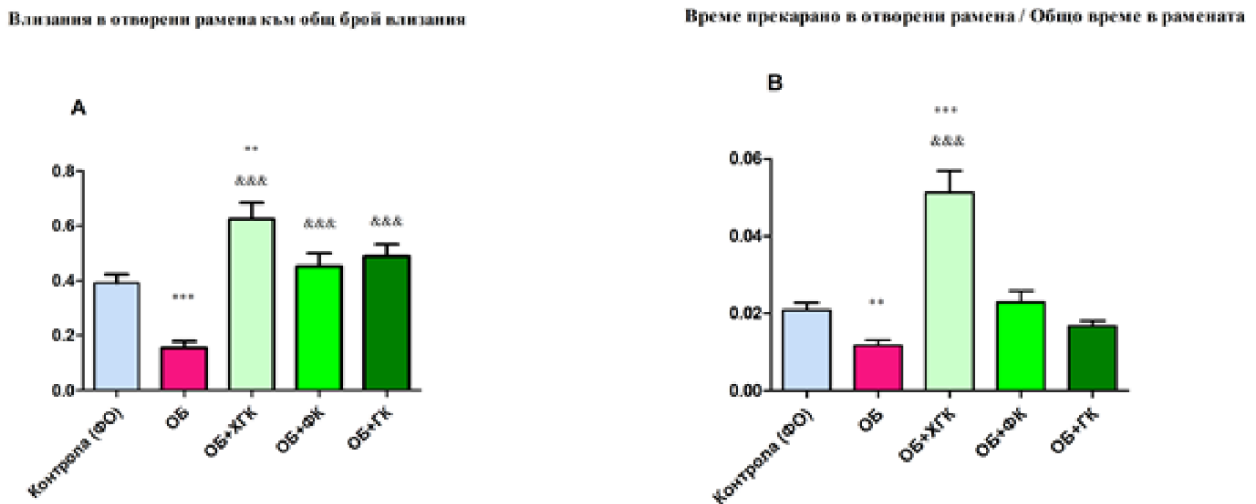


Фигура 11. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселини (в доза 20 mg/kg) върху броя на влизания в отворените рамена (A) и върху броя влизания в затворените рамена (B) при тест повдигнат кръстосан лабиринт на плъхове с двустранна булбектомия след 14-дневно третиране; резултатите са представени като средна стойност  $\pm$ S.E.M.

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  в сравнение с Контролата (ФО); & $p < 0.05$ ; &&& $p < 0.001$  спрямо група ОБ



Фигура 12. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселини (в доза 20 mg/kg) върху времето прекарано в отворените рамена (А) и върху времето прекарано в затворените рамена (В) на тест повдигнат кръстосан лабиринт на плъхове с двустранна булбектомия след 14-дневно третиране; резултатите са представени като средна стойност  $\pm$ S.E.M. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  в сравнение с Контролата (ФО); &&&  $p < 0.001$  спрямо група ОБ



Фигура 13. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселини (в доза 20 mg/kg) върху съотношението на влизания в отворените рамена към общия брой влизания в рамената (А) и върху съотношението на времето прекарано в отворените рамена към общото време прекарано в отворените и затворени рамена (В) в тест повдигнат кръстосан лабиринт при плъхове с двустранна булбектомия след 14-дневно третиране; резултатите са представени като средна стойност  $\pm$ S.E.M.

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  в сравнение с Контролната (ФО) група; &&&  $p < 0.001$  спрямо група ОБ

Поради голямата им социална значимост в световен мащаб тревожно-депресивните заболявания са обект на много експериментални разработки. Експерименталните модели при опитни животни са полезни за изучаването на патогенезата и лечението на тези заболявания.

Хирургически предизвиканата двустранна олфакторна булбектомия (ОБ) се използва за скрининг на антидепресантни лекарства през последните 40 години и при двете групи гризачи – плъхове (Kelly et al., 1997, Mar et al., 2002) и мишки (Han et al., 2009). ОБ индуцира значителни неврохимични, невроанатомични, физиологични, ендокринни и поведенчески промени, които са подобни на симптомите при пациенти с голямо депресивно разстройство (Song & Leonard, 2005).

Олфакторните булбуси са двустранни разширения на ростралния теленцефалон и съставляват около 4% от общата маса на мозъка при възрастни плъхове (Cain, 1974). Наличието на широки еферентни връзки между олфакторните булбуси и мезокортикалните и субкортикалните области на мозъка обясняват до голяма степен ефектите върху мозъчните функции, наблюдавани при отстраняването на обонятелните луковици. Олфакторната система при плъховете е част от лимбичният регион, в който амигдалата и хипокампуса, допринасят за емоционалната и паметова компонента на поведението (Song, 2005).

Двустранното отстраняване на обонятелните булбуси нарушава взаимовръзката между кортекс-хипокампус-амигдала (Russo and Nestler, 2013), засяга поведението търсенето и избягването на храна (Song and Leonard, 2005, Kelly et al., 1996). Билатералната деструкция на обонятелните булбуси води до промени в концентрациите на серотонин и допамин (Masini et al., 2004). Когнитивните дефицити, загубата на либидо (Larsson 1971), намаленото социално взаимодействие и изследването на нова среда са свързани с кортико-невроналната дегенерация при ОБ плъхове (Wang et al., 2007). Нарушената структурна пластичност (дендритна реорганизация, нарушен клетъчен растеж) на хипокампуса също се асоциира с емоционалните дефицити и промени в пространствената памет на опитните ОБ животни (Morales-Medina et al., 2013; Morales-Medina et al, 2017). Билатералната олфакторна булбектомия впоследствие намалява обема на кортекса, хипокампуса и амигдалата (Wrynn et al., 2000), както и експресията на NMDA (N-метил-D-аспартат) рецепторната субединица NR1 (но не NR2A, B) в тези области, а също така намалява фосфорилирането на CREB в префронталния кортекс и хипокампуса (Song et al., 2011).

Невротрансмитърните, структурните и поведенческите промени при ОБ плъхове се свързват и с невроинфламаторни събития. Song et al. (2009) установяват увеличена експресия на кортикотропин рилизинг фактор в хипокампуса и увеличена секрецията на кортикостерон при ОБ плъхове в сравнение със фалшиво-оперирани контроли. Rinvwa et al. (2013) демонстрират повишени нива на инфламаторните цитокини (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) и caspase-3, заедно със значителна редукция на BDNF в мозъка на ОБ плъхове. Изследванията на Song и екип (2009) при ОБ плъхове установяват значимо по-ниска експресия на NGF mRNA в хипокампуса, докато нивата на IL-1 $\beta$  и PgE<sub>2</sub> са увеличени в серума и мозъка. Нестероидното противовъзпалително лекарство celecoxib значимо намалява концентрацията на простагландин E<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$  и кортикостерона в кръвта, и увеличава експресията на NGF, както и нормализира поведението на ОБ плъхове.

Хроничните антидепресантни терапии могат да обърнат поведенческите промени на ОБ плъхове към нормалния фенотип (Song and Leonard, 2005). Данните при хора за директна връзка между обонятелната сензорна функция и голямото депресивно разстройство са с противоречив характер. Някои клинични проучвания показват намалена чувствителност на обонянето при пациентите с остра форма на голямо депресивно разстройство (Atanasova et al., 2008) и наличието на отрицателна връзка между обема на обонятелните булбуси и тежестта на депресивната симптоматика (Negoias et al., 2010).

Повдигнатият кръстосан лабиринт е най-често използваният експериментален метод за оценка на тревожност при гризачи. Тестът се базира на вродения страх на животните от открити пространства. Повечето анксиолитично действащи субстанции, повишават изследването на откритите рамена на лабиринта. Повишеният брой влизания в отворените рамена и времето, прекарано в тях, се приемат като показател за анксиолитичен ефект на изследваното вещество.

В настоящия експеримент двустранната олфакторна булбектомия предизвиква хиперактивност, демонстрирана чрез повишаване на общия брой на влизанията в отворените и затворените рамена на лабиринта. В други проучвания подобно хиперактивно поведение на ОБ плъхове се свързва със завишено ниво на глутамата в мозъчни области като *striatum* (Ho et al., 2000) и *nucleus accumbens* (Rudá-Kučerová et al., 2015). В проведения експеримент хлорогеновата, феруловата и галовата киселини намаляват хиперактивността на плъховете с отстранени обонятелни булбуси. Литературните данни сочат, че в клетъчен модел

хлорогеновата киселина, блокира индуцираната от глутамат токсичност, както и предотвратява глутамат-индуцираната смърт на първични клетки, изолирани от кортикални неврони на мишки (Mikami and Yamazawa, 2015). В друго проучване хлорогеновата киселина и нейните метаболитите противодействат на предизвиканата от глутамат токсичност в първични култури от гранулирани неврони от малък мозък на плъх (Taram et al., 2016).

Експесивната концентрация на глутамат може да предизвика оксидативен стрес чрез увеличаване на производството на РКВ, което е тясно свързано с патогенезата на тревожните разстройства. Литературните данни показват, че патофизиологията на тревожността и свързаните с нея афективни разстройства корелира с широк спектър от епигенетични промени като повишен оксидативен стрес (Hassan et al., 2014), невровъзпаление (Ng et al., 2008), глутаматергична дисфункция (Pitsikas, 2014), дисрегулация на синаптичната пластичност чрез промени в нивото на невротрофините и инхибиране на сигналните пътища (Castrèn and Kojima, 2017).

В проведеното от нас изследване хлорогеновата, феруловата и галовата киселини показват анксиолитичен ефект. Повечето от биологичните действия на фенолни киселини върху мозъка се отдават на техните противовъзпалителни и антиоксидантни свойства (Mandrone et al., 2015). Проучване на Gul и колеги (2016) разкрива невропротективни ефекти на хлорогеновата киселина. Този полифенол намалява H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцираното повишаване на нивата на малондиалдехид и РКВ в кортикални срезове от плъх (Gul et al., 2016). При друг експеримент с първични култури от гранулирани неврони от малък мозък на плъх се установява, че хлорогеновата киселина повишава защитата срещу H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцираното протеазомно инхибиране и каспаза-зависимата апоптоза (Taram et al., 2016). Галовата киселина дължи невропротективните ефекти и способността да стабилизира настроението на антиоксидантната активност и подобряване на загубата на клетъчна плътност в хипокампуса (Moghadas et al., 2016). Изследванията на Lenzi и сътрудници (2015) установяват, че ефектите на феруловата киселина върху централната нервна система също корелират с проявен антиоксидантен капацитет, доказан чрез повишената супероксид дисмутазна и каталазна активност в хипокампуса на третираните мишки, както и чрез ниските нива на субстанциите реагиращи с тиобарбитуровата киселина. За феруловата

киселина има данни, че повишава нивата на BDNF в префронталния кортекс и хипокампуса, а също инхибира микроглиалната активация, експресията на провъзпалителните цитокини и NF- $\kappa$ B сигнализацията (Liu et al., 2017). Намаляването на про-възпалителните цитокините би могло да допринесе за анксиолитично-подобните ефектите на фенолните киселини. Феруловата киселина значимо инхибира производството на TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  и NO, и намалява COX-2 и iNOS (Wu et al., 2015). Рецепторната активация може също да участва в анксиолитично-подобните ефекти на фенолните киселини. В модел при мишки хлорогеновата киселина демонстрира анксиолитичен ефект, изследван в тест светла/тъмна кутия и в тест повдигнат кръстосан лабиринт (Bouayed et al., 2007). В посоченото проучване анксиолитичният ефект на хлорогеновата киселина се блокира от бензодиазепиновия антагонист флумазенил, което дава основание да се предположи, че хлорогеновата киселина вероятно действа като агонист на бензодиазепиновите рецептори (Ramboz et al., 1998). Проявеният анксиолитичен ефект най-вероятно има комплексен механизъм и включва: стимулиране на GABA-ергичната невротрансмисия, намаляване на оксидативния стрес, стимулиране на невроналния растеж и диференциация, както и поддържане на невропластичността (Bouayed et al., 2007; Saitou et al., 2018). Друг възможен механизъм на анксиолитичното действие на изследваните фенолни киселини е повлияване на 5-HT<sub>1A</sub> рецепторната активация. Известно е, че 5-HT<sub>1A</sub> рецепторите участват в модуляцията на изследователското и свързаното със страх поведение, а намалената 5-HT<sub>1A</sub> рецепторна плътност би могла да повиши тревожността (Bouayed et al., 2007). При изследването на плъхове в тест повдигнат кръстосан лабиринт галовата киселина проявява анксиолитично-подобна активност, подобна на 5-HT<sub>1A</sub> рецепторния агонист буспирон (Mansouri et al., 2014). В заключение, хлорогеновата киселина, галовата киселина и феруловата киселина възпрепятстват развитието на хиперактивно и тревожно-подобно поведение при плъхове с двустранна булбектомия. Ефектът е най-силно изразен при хлорогеновата киселина.

## **2.2. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселини върху паметта и обучението**

### **2.2.1. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселини върху паметта и обучението в тест за еднопосочно пасивно избягване – step through**

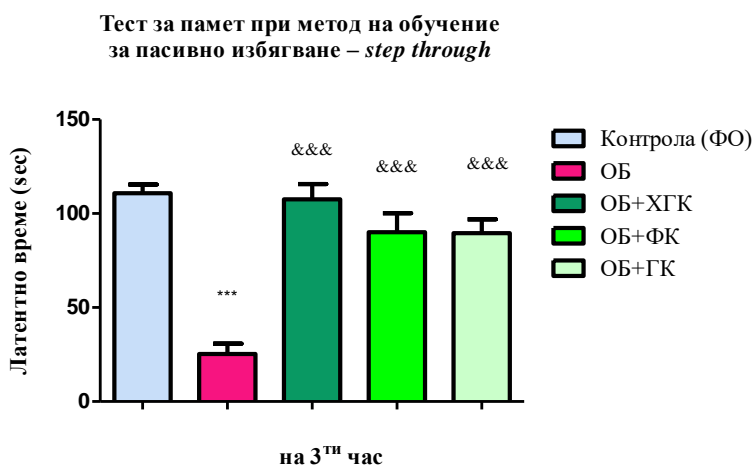
Експериментът е проведен върху 30 мъжки плъха порода Wistar, разделени в 5 групи по 6 животни означени като: Контрола – фиктивно оперирани (ФО), ОБ, ОБ+ХГК, ОБ+ФК и ОБ+ГК. Плъховете от ОБ, ОБ+ХГК, ОБ+ФК и ОБ+ГК групи са булбектомирани двустранно, а контролните животните са фалшиво оперирани. След 15-дневно възтановяване след операцията, за период от 14 дни, животните са третирани еднократно (във времето между 09:00-13:00 часа) чрез орогаstralна сонда, както следва: Контролата и ОБ са получавали физиологичен разтвор в доза 10 ml/kg, а групите ОБ+ХГК, ОБ+ФК и ОБ+ГК са третирани респективно с ХГК, ФК и ГК в доза 20 mg/kg под формата на разтвор в обем 10 ml/kg. Последното третиране на животните е 60 min преди обучителната сесия. Обучението за пасивно избягване с отрицателно подкрепление се състои от еднократна тренировка, проведена по метода на Buresova и Bures (1983) чрез апарат step through. Тестът за памет е проведен на 3<sup>ия</sup> и 24<sup>ия</sup> час след обучението. За критерии на обученост се приема престоят на животните в осветената камера (латентно време в sec) за период от поне 180 sec.

Резултатите, които са регистрирани по време на теста, са представени в Таблица 10, Фигура 14 и Фигура 15. След 14-дневно третиране латентното време на ОБ група е съответно  $25.33 \pm 5.53$  sec на 3<sup>ия</sup> час и  $27.67 \pm 4.49$  sec на 24<sup>ия</sup> час след тренировъчната сесия и е значимо ( $p < 0.001$ ) скъсено спрямо Контролата (ФО), което е  $110.8 \pm 4.55$  sec на 3<sup>ия</sup> час и  $115.8 \pm 3.27$  sec на 24<sup>ия</sup> час. При групата, третирана с ХГК, латентното време при теста за ретенция на 3<sup>ия</sup> и 24<sup>ия</sup> час се удължава със значимост  $p < 0.001$  спрямо ОБ група и не се различава от Контролата (ФО). В група ОБ+ФК латентното време и при двата теста за ретенция се удължава значимо ( $p < 0.001$ ) спрямо ОБ група и не се различават от Контролната група. Животните от група ОБ+ГК също показват значимо удължаване на латентното време при тестовете за памет на 3<sup>ия</sup> и 24<sup>ия</sup> час ( $p < 0.001$ ) спрямо ОБ група и не се различават от Контролните (ФО) животни. Тези резултати показват, че след 14-дневно третиране, ХГК, ФК и ГК подобряват значимо паметовите и обучителните процеси при плъхове с двустранна олфакторна булбектомия.

Таблица 10. Латентно време (sec) при тестове за памет на 3<sup>ти</sup> и 24<sup>ти</sup> час при метод на обучение за пасивно избягване – *step through* на плъхове с двустранна олфакторна булбектомия, след 14-дневно третиране с хлорогенова, ферулова и галова киселини (20 mg/kg). Резултатите са представени като средна  $\pm$  SEM; n=6

\*\*\*  $p < 0.001$  спрямо Контролната (ФО) група; &&&  $p < 0.001$  спрямо ОБ група

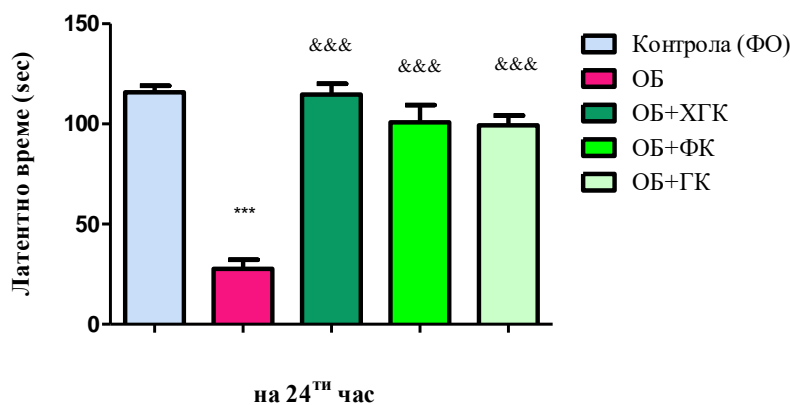
Група животни	3 <sup>ти</sup> час	24 <sup>ти</sup> час
Контрола (ФО)	110.8 $\pm$ 4.55	115.8 $\pm$ 3.27
ОБ	25.33 $\pm$ 5.53 ***	27.67 $\pm$ 4.49 ***
ОБ $\pm$ ХГК	105.5 $\pm$ 8.14 &&&	114.7 $\pm$ 5.33 &&&
ОБ $\pm$ ФК	90.00 $\pm$ 10.25 &&&	100.8 $\pm$ 8.61 &&&
ОБ $\pm$ ГК	89.50 $\pm$ 7.41 &&&	89.50 $\pm$ 7.41 &&&



Фигура 14. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселини (20 mg/kg) върху латентното време (sec) в тест за памет на 3<sup>ти</sup> час при метод на обучение за пасивно избягване - *step through* на плъхове с двустранна олфакторна булбектомия, след 14-дневно третиране. Стойностите са средна  $\pm$  SEM; n=6; \*\*\*  $p < 0.001$  спрямо Контролната (ФО) група; &&&  $p < 0.001$  спрямо ОБ група



Тест за памет при метод на обучение  
за пасивно избягване – *step through*



Фигура 15. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселини (20 mg/kg) върху латентното време (sec) в тест за памет на 24<sup>ти</sup> час при метод на обучение за пасивно избягване - *step through* на плъхове с двустранна олфакторна булбектомия, след 14-дневно третиране. Стойностите са средна  $\pm$  SEM;  $n=6$ ; \*\*\*  $p<0.001$  спрямо Контролната (ФО) група; &&&  $p<0.001$  спрямо ОБ група

### 2.2.2. Ефекти на хлорогенова, ферулова и галова киселини върху паметта и обучението в тест за двупосочно активно избягване – *shuttle box*

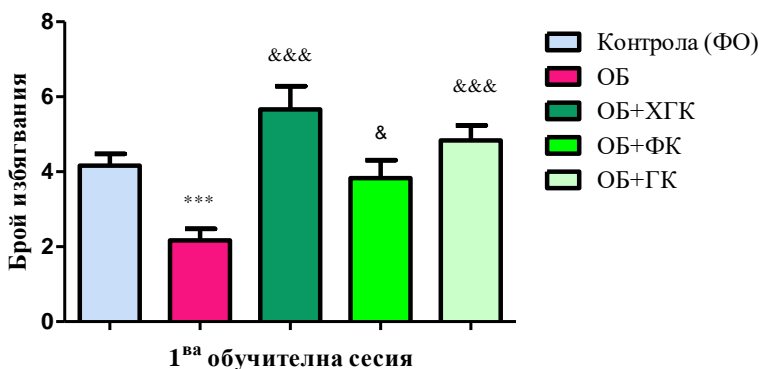
Експериментът е проведен върху 30 мъжки плъха порода Wistar, разделени в 5 групи по 6 животни означени като: Контрола – фалшиво оперирани (ФО), ОБ, ОБ+ХГК, ОБ+ФК и ОБ+ГК. Плъховете от ОБ, ОБ+ХГК, ОБ+ФК и ОБ+ГК групи са булбектомирани двустранно, а контролните животните са фиктивно оперирани. След 15 дневно възстановяване след операцията, за период от 14 дни животните са третирани еднократно (във времето между 09:00-13:00 часа) чрез орогастрална сонда, както следва: Контролата (ФО) и ОБ са получавали физиологичен разтвор в доза 10 ml/kg, а групите ОБ+ХГК, ОБ+ФК и ОБ+ГК са третирани респективно: с ХГК, ФК и ГК в доза 20 mg/kg под формата на разтвор в обем 10 ml/kg. Експерименталните животни са третирани 60 минути преди началото на обучителните сесии (в два последователни дни) и съответно не са третирани преди теста за памет, който е 24 часа след втората обучителна сесия. Като показател за обученост и запаметяване се отчита броят на условнорефлексните избягвания (авойданси) в обучителните сесии (през 1<sup>ви</sup> и 2<sup>ри</sup> ден), както и в теста за памет.

Резултатите, получени след 14-дневно третиране, са представени в Таблица 11, Фигура 16, Фигура 17 и Фигура 18. Броят на авойданс-отговорите при ОБ животните са статистически значимо намалени спрямо Контролата (ФО) и са съответно  $2.17 \pm 0.31$  на 1<sup>ви</sup> тренировъчен ден,  $1.50 \pm 0.22$  на 2<sup>ри</sup> тренировъчен ден и  $1.67 \pm 0.21$  при теста за ретенция. При животните, третирани с ХГК, броят на авойдас-отговорите се повишава значимо на втория тренировъчен ден ( $p < 0.05$ ) спрямо контролната (ФО) група, но не се различава значимо от броя на авойдас-отговорите на Контролата (ФО) на първия тренировъчен ден и при теста за ретенция. При група ХГК значимо ( $p < 0.001$ ) се повишава броят на авойдас-отговорите на първия и втория тренировъчен ден и при теста за ретенция в сравнение с ОБ група. В групата, третирана с ФК, броят на авойдас-отговорите се повишава значимо на първия тренировъчен ден ( $p < 0.05$ ), на втория тренировъчен ден и при теста за ретенция ( $p < 0.001$ ) спрямо ОБ група и не се различава значимо от броя на авойдас-отговорите на Контролата (ФО). При животните, третирани с ГК, се повишава значимо броят на авойдас-отговорите при теста за ретенция ( $p < 0.05$ ) спрямо контролната група (ФО), но не се различава значимо от броя на авойдас-отговорите на Контролата (ФО) на първия тренировъчен ден и на втория тренировъчен ден. При група ГК значимо се повишава броят на авойдас-реакциите на първия тренировъчен ден, както и на втория тренировъчен ден и при теста за ретенция ( $p < 0.001$ ) спрямо ОБ група. Тези резултати показват, че ХГК, ФК и ГК подобряват значимо процесите на памет и обучение при плъхове с двустранна булбектоми

Таблица 11. Брой на условно рефлекторните избягвания (авойданси) по време на първата и втората обучителна сесия и по време на теста за памет (ретенция) при теста за активно двупосочно избягване (shuttle box) след третиране на плъхове с двустранна олфакторна булбектомия с хлорогенова киселина (ХГК), ферулова киселина (ФК) и галова киселина (ГК) 20 mg/kg в продължение на 14 дни. Стойностите са средна  $\pm$  SEM; n=6; \*\*\*  $p < 0.001$  спрямо Контролната (ФО) група; &  $p < 0.05$ , &&  $p < 0.001$  спрямо група ОБ

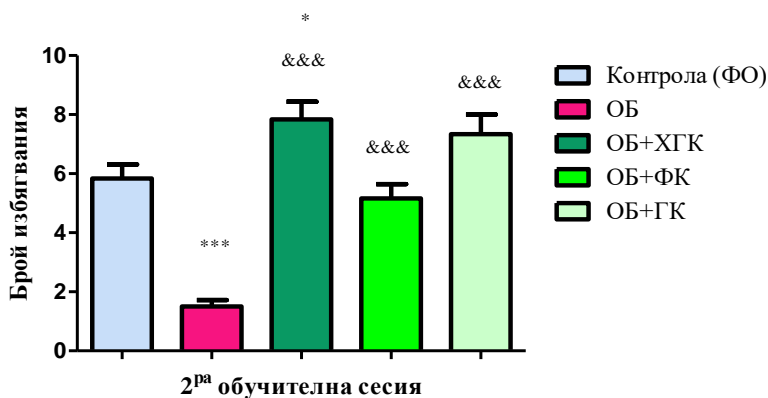
Група \ Тест	Контрола (ФО)	ОБ	ОБ±ХГК	ОБ±ФК	ОБ±ГК
1 <sup>ва</sup> обучителна сесия	3.83±0.47	2.17±0.31* **	5.67±0.61&& &	3.83±0.48&	5.00±0.37&&&
2 <sup>ра</sup> обучителна сесия	5.83±0.48	1.50±0.22* **	7.83±0.64&& &*	5.17±0.48&&&	7.33±0.67&&&
Тест за памет (ретенция)	6.50±0.43	1.67±0.21* **	8.33±0.84&& &	6.17±0.48&&&	8.33±0.56&&& *

Тест за активно двупосочно избягване  
с отрицателно подкрепление (*shuttle box*)



Фигура 16. Брой избягвания по време на първата обучителна сесия при тест за активно двупосочно избягване с отрицателно подкрепление (в апарат *shuttle box*) при плъхове с двустранна олфакторна булбектомия, третирани с хлорогенова киселина (ХГК), ферулова киселина (ФК) и галова киселина (ГК) 20 mg/kg в продължение на 14 дни. Стойностите са средна  $\pm$  SEM;  $n=6$ ; \*\*\*  $p<0.001$  спрямо Контролната (ФО) група, &  $p<0.05$ , &&&  $p<0.001$  спрямо ОБ

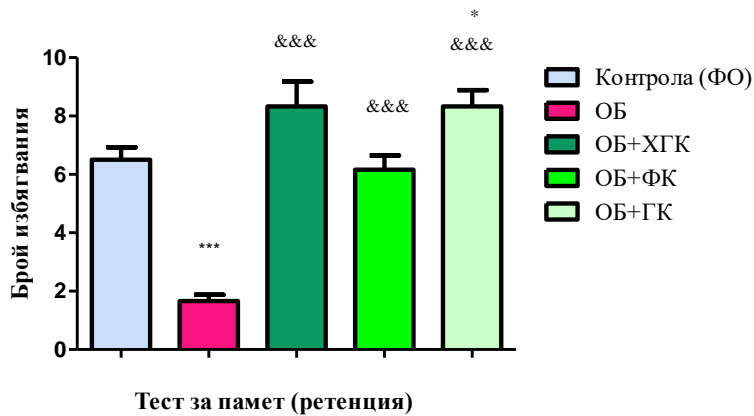
Тест за активно двупосочно избягване  
с отрицателно подкрепление (*shuttle box*)



Фигура 17. Брой избягвания по време на втората обучителна сесия при тест за активно двупосочно избягване с отрицателно подкрепление (в апарат *shuttle box*) при плъхове с двустранна олфакторна булбектомия, третирани с хлорогенова киселина (ХГК), ферулова киселина (ФК) и галова киселина (ГК) 20 mg/kg в продължение на 14 дни. Стойностите са средна  $\pm$  SEM;  $n=6$ ;

\*  $p<0.05$  спрямо ОБ, &&&  $p<0.001$  спрямо Контролната (ФО) група.

Тест за активно двупосочно избягване  
с отрицателно подкрепление (*shuttle box*)



Фигура 18. Брой избягвания по време на теста за памет (ретенция) при теста за активно двупосочно избягване с отрицателно подкрепление (в апарат *shuttle box*) при плъхове с двустранна олфакторна булбектомия, третирани с хлорогенова киселина (ХГК), ферулова киселина (ФК) и галова киселина (ГК) 20 mg/kg в продължение на 14 дни. Стойностите са средна ± SEM; n=6;

\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  спрямо Контролната (ФО) група; &&&  $p < 0.001$  спрямо ОБ

### 2.2.3. Обсъждане

Тъй като застаряването на човешкото население продължава прогресивно, научните усилия все по често са насочени към подобряване качеството на живот и забавяне началото на заболявания, свързани с възрастта.

При различните видове деменции (напр. Болест на Алцхаймер, фронто-темпорална деменция, болест с дифузни телца на Леви, болест на Паркинсон, болест на Хънтингтон, съдови деменции, деменции свързани с депресия и др.) се наблюдава упадък на множество когнитивни и поведенчески функции, което е причина за влошаване на качеството на живот и самостоятелност на болните. Към 2050 г. заболяните от деменция се очаква да достигнат до 135,5 милиона души (Winblad et al., 2017). Прогресиращата загуба на интелект и автономия засяга не само възрастното население, но променя качеството на живота на техните близки. Невродегенеративните заболявания са често съпроводени от афективни проблеми, които влошават протичането им. Те могат да влошат социалното и функционално състояние на пациентите (Kessler et Greenberg, 2002). Zhao и колеги (2016) съобщават, че при 40% от случаите на болест на Алцхаймер се наблюдава коморбидна клинична депресия.

Висок е процентът и на пациентите, диагностицирани с болест на Паркинсон, които имат коморбидност с тревожност, с хранителни разстройства (Kessler and Greenberg, 2002) и с болкова симптоматика –персистираща/хронична (Lee et al, 2012).

Двустранната булбектомия индуцира неврохимични, невроанатомични, физиологични, ендокринни и поведенчески промени, които са подобни на симптомите при пациенти с голямо депресивно разстройство (Song & Leonard, 2005). Олфакторната система при плъховете е част от лимбичният регион, в който амигдалата и хипокампуса допринасят за емоционалната и паметова компонента на поведението (Song, 2005).

Настоящото изследване има за цел да се тестват ефектите на хлорогенова, ферулова и галова киселини върху обучението и паметта на булбектомирани плъхове. Двустранната булбектомия е проведена по метода на Kelly и съавтори (Kelly et al., 1997). За тестване на паметта на ОБ плъхове са използвани два класически метода – обучение за пасивно избягване с отрицателно подкрепление (step-through) и обучение за активно двупосочно избягване с отрицателно подкрепление (shuttle box).

Резултатите от проведеното изследване показват, че отстраняването на обонятелните булбуси предизвиква след 30 дни значимо намаляване на латентното време при тестовете за памет на ОБ група, което е в съответствие с данни на други изследователи (Kelly et al., 1997; Tashev et al., 2010). След 14-дневно третиране хлорогеновата, феруловата и галовата киселини подобряват запамятаването и обучителните процеси при плъховете с двустранна олфакторна булбектомия. Има данни, че хлорогеновата киселина, феруловата киселина и галовата киселина подобряват обучителните и паметовите процеси при млади здрави плъхове (Georgieva et al., 2015). Редица изследвания сочат, че извлечените от храната полифеноли имат потенциала да подобрят човешката памет и невро-когнитивните функции чрез способността си да защитават уязвимите неврони, да подобряват съществуващата невронна функция и да стимулират регенерацията на невроните (Spenser, 2010; Vauzour D, 2012).

Механизмите, лежащи в основата на наблюдаваните ефекти на хлорогеновата, феруловата и галовата киселини в настоящото изследване, могат да бъдат потърсени в невропротективното им действие, което е благоприятствано от способността да преминават през ХЕБ. Съобщава се, че хлорогеновата киселина или нейните метаболити могат да преминават през ХЕБ и да оказват невропротективни ефекти върху мозъчната тъкан (Ohnishi

et al., 2006). Приблизително 30 минути след орално приложение феруловата киселина се открива в мозък на плъх (Chang et al., 1993). Има данни, че феруловата киселина стимулира пролиферацията на невралните прогениторни клетки *in vitro* и *in vivo* (Yabe et al., 2010). Феруловата киселина и хлорогеновата киселина, демонстрират невропротективни ефекти като подобряват когнитивните способности при модели на болест на Алцхаймер (Szwajgier et al., 2018). Има данни, че галовата киселина (100 mg/kg) подобрява хипокампалната невродегенерация и когнитивните промени (пространствена памет и учене) на плъхове, експозирани на алуминиев хлорид ( $AlCl_3$ ) (Ogunlade et al., 2020). Така демонстрираните централни ефекти, потвърждават че хлорогеновата киселина, феруловата киселина и галовата киселина достигат терапевтични концентрации в ЦНС (Caruso et al., 2022).

Форма на програмирана клетъчна смърт е апоптозата, която играе решаваща роля за нормалното развитие и тъканната хомеостаза. Въпреки това, неподходящата или прекомерна апоптоза участва в патогенезата на редица заболявания, включително и някои невропсихиатрични разстройства (Kim et al., 2010). Има данни, че прекомерната невронална апоптоза в кортекса и хипокампуса, допринася за дисфункцията на паметта и нарушаване на способността за учене. Смята се, че оксидативният стресът е в състояние да предизвика невронална смърт, вероятно чрез активиране на апоптозата (Kudryashov et al., 2002). В тази връзка, би могло да се очаква, че антиоксидантните съединения могат да потискат този клетъчен процес. Фенолните киселини са с доказан антиоксидантен капацитет. Анти-апоптотичното действие на фенолните киселини би могло да допринася за подобряването на паметта на ОБ плъхове в настоящото изследване. В експериментален модел на алкохол-индуцирана клетъчна увреда хлорогеновата киселина повишава жизнеспособността на клетките, насърчава пролиферацията на увредените клетки, повишава митохондриалния трансмембранен потенциал, а също инхибира апоптозата, като повишава експресията на Bcl-2 и понижава активирането на капсаза-3 (Fang et al., 2016). Литературните данни сочат, че галовата киселина противодейства на индуцираната от амилоид програмирана невронална смърт при плъхове чрез намалено отделяне на глутамат и РКВ (Van et al., 2008). До известна степен положителното влияние на фенолните киселини върху паметовите и обучителни процеси се дължи на антиоксидантния им капацитет. В модел на оксидативна невронална смърт в клетъчни култури хлорогеновата киселина потиска индуцираните от

водороден пероксид апоптотична кондензация на клетъчното ядро на невроните и down-регулацията на антиапоптотичните протеини Bcl и Bcl-XL. Като същевременно се блокират проапоптотичните фактори caspasa-3 и про-поли (АДФ-рибоза) полимераза (Kim et al., 2012). При опити с мишки с индуциран диабет Stefanello и колеги (2014) установяват, че хлорогеновата киселина подобрява паметта, проявява анксиолитично-подобен ефект и предпазва от продукцията на реагиращи с тиобарбитурова киселина субстанции. Приема се, че тези ефекти се дължат и на намаляване активността на ацетилхолинестеразата (Stefanello et al., 2014). Централната холинергична система е от съществено значение за регулиране на когнитивните функции, като ацетилхолинът играе важна роля в паметовите процеси, по специално в мозъчни зони, важни за запазване на нови спомени като хипокампуса, перириналния и енториналният кортекс (Hasselmo and Chantal, 2006). Антиоксидантните свойства на феруловата киселина са демонстрирани в модел на хипоксия-индуцирана невротоксичност в клетъчни култури (Lin et al., 2015). Едновременно с улавяне на свободните радикали, феруловата киселина повишава клетъчната жизнеспособност и активността на супероксид дисмутаза. Също така намалява повишаването на вътреклетъчния свободен  $Ca^{2+}$ , липидната пероксидация, апоптозата и производство на PGE2 в третираните PC12 клетки (Lin et al., 2015).

Активирането на транскрипционния фактор CREB регулира експресията на редица важни гени, включително BDNF, като по този начин участва в контрола на синаптичната функция и оцеляването на невроните в централната нервна система (Carito et al., 2014; Pardon MC, 2010). Тези невротрофини са необходими по време на придобиване и консолидация на паметта (Spencer, 2010). Счита се, че агенти, които могат да индуцират пътища, водещи до активиране на CREB/BDNF, са с потенциал да подобряват както краткосрочната, така и дългосрочната памет (Spencer, 2009). В тази връзка, има данни, че хлорогеновата киселина повишава нивата на BDNF в хипокампуса на плъхове с диабет-индуцирани когнитивни дефицити (Xianchu et al., 2021). При животински модел феруловата киселина повишава експресията на BDNF и насърчава функционалното възстановяване на мозъка от исхемия-индуцирано увреждане (Baek et al, 2014).

Потискане на проинфламаторните фактори може да е друг възможен механизъм при подобряване на паметта от страна на хлорогеновата, феруловата и галовата киселини в



настоящото изследване. Хлорогеновата киселина проявява неврозащитна и противовъзпалителна активност при микроглиални клетки, инфектирани с вируса на херпес симплекс. При заразените клетки хлорогеновата киселина увеличава процента на оцеляване, намалява освобождаването на TNF- $\alpha$  и интерлевкин IL-6, както и експресията на NF- $\kappa$ B p65 (Guo et al., 2015), а антиоксидантните свойства на тази киселина редуцират нивата на malonaldehyde (MDA) и реактивните кислородни видове в мозъчни срезове от плъх (Gul et al., 2016). Комбинация от антиоксидантни и противовъзпалителните активности демонстрира и феруловата киселина, която инхибира TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 и NO и намалява COX-2 и iNOS, в модел на LPS-идуцирано възпаление на микроглията (Huang et al., 2011). Галовата киселина проявява невропротективен ефект в модел на травматична мозъчна увреда, подобрявайки паметта и дългосрочното потенциране (LTP) чрез намаляване на липидната пероксидация и про-възпалителните цитокини (IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ ) в мозъка на опитните животни (Caruso et al., 2022).

Потенциалният ефектът на фенолните киселини върху съдовете е значим, тъй като е известно, че подобрената мозъчно-съдова функция, улеснява неврогенезата при възрастни (Shohayeb et al., 2018). Съдовите ефекти на фенолните киселини вероятно допринасят за подобрените паметови и обучителни процеси в настоящия опит. За феруловата киселина се съобщава, че подобрява ангиогенезата, повлиявайки активността на основните фактори, участващи в нея, а именно - васкуларния ендотелен растежен фактор (VEGF), тромбоцитния растежен фактор (PDGF) и индуцирания от хипоксия фактор 1 (HIF-1). При тест с ендотелни клетки от човешка пъпна вена Lin и колеги (2010) установяват, че феруловата киселина усилва експресията на VEGF и PDGF и увеличава количеството на индуцирания от хипоксия HIF-1, който генерира, реагиращи на хипоксията отговори. Редица други *in vivo* и *in vitro* проучвания също доказват, че феруловата киселина подобрява ангиогенезата и насърчава образуването на нови съдове (Yang et al., 2017; Lin et al., 2010). За хлорогеновата киселина има данни, че подобрява ендотелната функция чрез увеличаване биодостъпността на NO в артериалната мускулатура на плъхове, което води до вазодилатация (Suzuki et al., 2006). В допълнение към това, в модел при мишки, хлорогеновата киселина демонстрира антиатерогенен ефект, като понижава плазмените нива на общия холестерол, триглицеридите, липопротеините с ниска плътност и възпалителните маркери. В клетъчна

култура хлорогеновата киселина значително повишава транскрипцията на PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , ABCA1/ABCG1, които са ключови регулатори в ефлукса на холестерол (Wu et al., 2014).

Според проучените научни данни хлорогеновата, феруловата и галовата киселини могат да подобряват паметовите и обучителни процеси при плъхове с двустранна булбектомия, най-вероятно чрез няколко механизма: антиоксидантно действие, потискане освобождаването на проинфламаторни фактори, благоприятни съдови ефекти, активиране на сигналните пътища и инхибиране на ацетилхолинестеразата, както и чрез увеличаване нивата на CREB-BDNF и потискане на апоптозата и стимулиране пролиферацията на нервните клетки.

## VI. ИЗВОДИ

### 1. В експериментален модел на двустранна овариектомия при плъхове се установяват следните промени в поведението:

#### 1.1. Двигателна активност в тест открито поле

- 1.1.1. Двустранната овариектомия незначимо понижава общата двигателна активност, отчетена на 30<sup>ия</sup> и 75<sup>ия</sup> ден от началото на третирането;
- 1.1.2. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* в дози от 5 ml/kg и 10 ml/kg значимо намалява двигателната активност на овариектомираните животни след 30- и 75-дневно приложение, вероятно вследствие на седативен ефект;
- 1.1.3. Хлорогеновата киселина в доза 20 mg/kg след 30- и 75-дневно приложение потиска двигателната активност на овариектомираните плъхове до степен, че тя е значимо по-ниска от тази на фалшиво оперираните, но не се различава значимо от тази на овариектомираните контролни животни.

#### 1.2. Тревожност в тест за социално взаимодействие

- 1.2.1. Двустранната овариектомия не предизвиква тревожно-подобно поведение на 31<sup>ия</sup> ден от началото на третирането;
- 1.2.2. Двустранната овариектомия води до тревожно-подобно поведение на 76<sup>ия</sup> ден от началото на третирането, отчетено чрез скъсяване на времето на социално взаимодействие;
- 1.2.3. На 31 ден, когато не се отчита развитие на тревожно поведение при овариектомираните животни, плодовият сок от *Aronia melanocarpa* в дози от 5 ml/kg и 10 ml/kg понижава времето на активните социални контакти. Този ефект може да се дължи на намалената обща двигателна активност на тези животни, отчетена в теста открито поле;
- 1.2.4. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* в доза 5 ml/kg удължава времето на активните социални контакти след 76-дневно приложение, вероятно поради анксиолитично-подобно действие. Липсата на подобен ефект от сока в доза 10 ml/kg може да е резултат от по-изразено потискане на

двигателна активност от тази доза, отчетено при същите животни в тест открито поле;

1.2.5. Хлорогеновата киселина в доза 20 mg/kg след 31-дневно приложение не променя значимо времето на социално взаимодействие на овариектомираните плъхове, при които за този период не се развива тревожно поведение;

1.2.6. Хлорогеновата киселина в доза 20 mg/kg след 76-дневно приложение, предотвратява овариектимия-индуцираната тревожност, като повишава времето на активните социални контакти до стойности, които не се различават значимо от тези на фалшиво оперираните плъхове.

### 1.3. Депресивно поведение в тест за принудително плуване

1.3.1. Двустранната овариектомия води до депресивно-подобното поведение, като удължава времето на неподвижност, отчетено на 33<sup>ия</sup> и 78<sup>ия</sup> ден;

1.3.2. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* в доза 5 ml/kg няма значим ефект върху времето на неподвижност след 33- и 78-дневно приложение;

1.3.3. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* в доза 10 ml/kg след 33- и 78-дневно приложение намалява депресивно-подобното поведение, като скъсява времето на неподвижност. Този ефект е още по-значим поради факта, че в тест открито поле същите животни имат понижена двигателната активност;

1.3.4. Хлорогеновата киселина в доза 20 mg/kg не понижава депресивната симптоматика след 33- и 78-дневно приложение.

### 1.4. Болкова чувствителност в тест гореща плоча

1.4.1. Двустранната овариектомия намалява праговата чувствителност за термична болка, отчетена на 79<sup>ия</sup> ден;

1.4.2. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa*, приложен в дози от 5 ml/kg и 10 ml/kg, повишава праговата чувствителност за термична болка на овариектомираните животни след 79-дневно приложение;

1.4.3. Хлорогеновата киселина в доза 20 mg/kg увеличава праговата чувствителност за термична болка на овариектомираните животни след 79-дневно приложение.

## **2. В експериментален модел на двустранна олфакторна булбектомия се установяват следните промени в поведението:**

### 2.1. Хиперактивност в тест повдигнат кръстосан лабиринт

2.1.1. Олфакторната булбектомия предизвиква хиперактивност, демонстрирана чрез повишаване на общия брой на влизанията в отворените и затворените рамена на лабиринта;

2.1.2. След 14-дневно приложение хлорогеновата киселина, феруловата киселина и галовата киселина в доза 20 mg/kg предотвратяват развитието на хиперактивно поведение.

### 2.2. Тревожност в тест повдигнат кръстосан лабиринт

2.2.1. Олфакторната булбектомия води до развитие на тревожно-подобно поведение, проявено чрез значимо по-малък брой влизания в отворените рамена на лабиринта и време, прекарано там, както и по-голям брой влизания в затворените рамена и време, прекарано в тях. Установени са по ниски съотношения на брой влизания в отворените рамена към общ брой влизания и на времето на престой в отворените рамена към общото време на престой в отворените и затворените рамена;

2.2.2. Хлорогеновата киселина, феруловата киселина и галовата киселина след 14-дневно приложение в доза 20 mg/kg проявяват анксиолитично-подобен ефект при булбектомирани животни, като повишават броя на влизанията в отворените рамена на лабиринта и времето, прекарано там, както и съотношенията брой влизания в отворените рамена към общ брой влизания и времето на престой в отворените рамена към общото време на престой в отворените и затворените рамена. Ефектът е най-силно изразен при хлорогеновата киселина.

### 2.3. Памет и обучение в тест за еднопосочно пасивно избягване

- 2.3.1. Олфакторната булбектомия предизвиква влошаване на обучителните и паметовите процеси, проявено чрез скъсяване на латентното време в тестовете за памет на 3<sup>ти</sup> и 24<sup>ти</sup> час след обучението;
- 2.3.2. Хлорогеновата киселина, феруловата киселина и галовата киселина след 14-дневно приложение в доза 20 mg/kg подобряват паметовите и обучителните процеси при булбектомирани животни, проявено чрез удължаване на латентното време на 3<sup>ти</sup> и 24<sup>ти</sup> час в тестовете за памет.

### 2.4. Памет и обучение в тест за двупосочно активно избягване

- 2.4.1. Олфакторната булбектомия предизвиква влошаване на обучителните и паметовите процеси, проявено чрез намаляване на броя на условнорефлексните избягвания в обучителните сесии през 1<sup>ви</sup> и 2<sup>ри</sup> ден, както и в теста за памет;
- 2.4.2. Хлорогеновата киселина, феруловата киселина и галовата киселина в доза 20 mg/kg след 14-дневно приложение подобряват паметовите и обучителните процеси при булбектомирани животни, демонстрирано чрез увеличаване на броя на условнорефлексните избягвания в обучителните сесии през 1<sup>ви</sup> и 2<sup>ри</sup> ден, както и в теста за памет.

## VII. ПРИНОСИ

1. За пръв път са изследвани ефектите на плодов сок от *Aronia melanocarpa* при овариектомирани плъхове, като е установено, че той:
  - Потиска двигателната активност вероятно вследствие на седативен ефект;
  - Проявява известен анксиолитичен ефект;
  - Проявява антидепресивно-подобен ефект;
  - Увеличава праговата чувствителност за термична болка.
2. За пръв път са изследвани ефектите на хлорогенова киселина при овариектомирани плъхове, като е установено, че тя:
  - Предизвиква известно понижаване на общата двигателната активност;
  - Предотвратява развитието на тревожност;
  - Няма ефект върху депресивната симптоматика;
  - Увеличава праговата чувствителност за термична болка.
3. За пръв път са изследвани ефектите на хлорогенова киселина, ферулова киселина и галова киселина при булбектомирани плъхове, като е установено, че те:
  - Предотвратяват индуцираната от булбектомия хиперактивност;
  - Проявяват анксиолитично-подобен ефект;
  - Подобряват паметовите и обучителните процеси.
4. Направените проучвания с плодов сок от *Aronia melanocarpa* и фенолните киселини – хлорогенова, ферулова и галова, допринасят за по пълното фармакологично характеризиране и разширяване на знанията за ефектите на полифенолите върху централната нервна система, както и за разкриване на бъдещи възможности при лечение на тревожно-депресивните, невродегенеративните и други заболявания на нервната система.

## VIII. Списък с публикациите и участията, свързани с дисертационния труд

### Списък на публикациите

1. **Todorova M**, Tashev RE, Valcheva-Kuzmanova SV. Chlorogenic acid, gallic acid and ferulic acid prevent the development of hyperactivity and anxiety in olfactory bulbectomized rats. *Bulgarian Chemical Communications* 2020; 52 (Special issue D): 125-130 (**SJR=0.168; Impact score=0.4**).
2. **Todorova M**, Georgieva A, Valcheva-Kuzmanova S. Behavioral changes in experimental models of estrogen deficiency. *Varna Medical Forum* 2021; 10 (2): 172-180.
3. Gorgieva A, **Todorova M**, Eftimov M, Kuzmanova V, Kuzmanov A, Kuzmanov K, Vlaskovska M, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of chlorogenic acid on behavior and metabolism in ovariectomized rats. *Farmacia* 2022; 70 (1): 54-58 (**IF=1.48**).
4. Georgieva A, Eftimov M, **Todorova M**, Kuzmanova V, Kuzmanov A, Kuzmanov K, M.Vlaskovska, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of ovariectomy-induced estrogen deficit on rat behavior, lipid metabolism, inflammation, bone mineral density and turnover. *Folia medica* 2022 2021; 63 (3): 385-391 (**SJR=0.203; Impact score=0.54**)..



## Списък на участията в научни форуми:

1. Georgieva A, **Todorova M**, Eftimov M, Kuzmanov K, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice and chlorogenic acid on locomotor activity in ovariectomized rats. 3<sup>rd</sup> International Conference on natural products utilization: From plants to pharmacy shelf, 18-20 October 2017, Bansko, Bulgaria. Abstract: Book of Abstracts, p.181.
2. Kuzmanova V, Kuzmanov A, Georgieva A, Eftimov M, **Todorova M**, Kuzmanov K, Vlaskovska M, Valcheva-Kuzmanova. Effects of chlorogenic acid on bone mineral density and pain sensitivity threshold in ovariectomized rats. форум; Abstract: *Osteoporosis International*. 2018; 29 (1): 514 (IF = 3,83).
3. Marchev S, Temelkova K, **Todorova M**, Eftimov M, Georgieva A, Kuzmanova V, Kuzmanov A, Bankova V, Surcheva S, Vlaskovska M, Valcheva-Kuzmanova. Effects of antioxidants from *Aronia melanocarpa* and *Apium graveolens* on experimental model of osteoporosis. форум; Abstract: *Osteoporosis International*. 2018; 29 (1): 610 (IF = 3,83).
4. Valcheva-Kuzmanova S, **Todorova M**, Belcheva I, Belcheva S, Tashev R. Chlorogenic acid and gallic acid elevate pain sensitivity threshold in olfactory bulbectomized rats. 31<sup>st</sup> ECNP Congress Barcelona, 06-09 October 2018. Abstract: *European Neuropsychopharmacology*. 29, Suppl.1, 2018, pp. S562-S563 (IF = 4,468).
5. Valcheva-Kuzmanova S, **Todorova M**, Belcheva I, Belcheva S, Tashev R. Anxiolytic-like effect of chlorogenic acid, gallic acid and ferulic acid in olfactory bulbectomized rats. 31<sup>st</sup> ECNP Congress Barcelona, 06-09 October 2018.
6. Marchev S, Temelkova K, **Todorova M**, Eftimov M, Georgieva A, Kuzmanova V, Kuzmanov A, Bankova V, Surcheva S, Vlaskovska M, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of antioxidants from *Aronia melanocarpa* and *Apium graveolens* on experimental model of osteoporosis. World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases. Kraków, Poland, 19-22 April, 2018. Abstract: *Osteoporosis International*. 29 (Suppl.1), P.610 (IF = 3,83).
7. Kuzmanova V, Kuzmanov A, Georgieva A, Eftimov M, **Todorova M**, Kuzmanov K, Vlaskovska M, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of chlorogenic acid on bone mineral density and pain sensitivity threshold in ovariectomized rats. World Congress on

- Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases. Kraków, Poland, 19-22 April, 2018. Abstract: *Osteoporosis International*. 29 (Suppl.1), P.514 (IF = 3.83).
8. Valcheva-Kuzmanova S, Georgieva A, **Todorova M**, Eftimov M, Kuzmanov K. Behavioral effects of chlorogenic acid in ovariectomized rats. 4th International Conference on Natural Products Utilization “From Plants to Pharmacy Shelf“, 29 May – 01 June 2019, Albena Resort, Bulgaria. Abstract: Book of Abstracts: p 178.
  9. **Todorova M**, Tashev R, Valcheva-Kuzmanova S. Chlorogenic acid, gallic acid and ferulic acid prevent the development of hyperactivity and anxiety in olfactory bulbectomized rats. 3rd International Conference on Bio-antioxidants (BIO-ANTIOXIDANTS 2019), 17-21 September, 2019. Nessebar, Bulgaria.

#### **Участие в проекти**

##### **Проект 2014**

Изследване на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и съдържащата се в него хлорогенова киселина за анксиолитичен и антидепресивен ефект в поведенчески модели при плъхове.

Финансиран от Фонд „Наука“, МУ-Варна. Ръководител: Проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н.

## БЛАГОДАРНОСТИ

В заключение изказвам благодарности на:

- Научния ми ръководител проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н. - за проявеното доверие към мен, за подкрепата, търпението, напътствието и съветите при осъществяване на изследванията и оформянето на дисертационния труд. С признателност и възхищение към достойнствата ѝ като ръководител и човек;
- Научния ми консултант проф. д-р Роман Ташев – за професионалната и техническа помощ, без която някой от изследванията не биха се състояли;
- Доц. д-р Силвия Ганчева – за техническата и професионална подкрепа;
- д-р Красимир Кузманов – за споделения опит и умения, за помощта и професионализмът при изготвяне на експерименталната част от научното изследване;
- д-р Антоанета Георгиева, м.ф. Мирослав Ефтимов и всички участници в настоящото проучване – за съдействието без което реализирането на този труд не би било възможно;
- Целия колектив на Катедрата по фармакология и клинична фармакология и терапия – за разбирането, търпението и подкрепата;
- Дъщеря ми Габи, на цялото ми семейство и близки приятели – за безкрайната любов, търпение и подкрепа.