

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р П. СТОЯНОВ“ – ВАРНА  
ФАКУЛТЕТ „МЕДИЦИНА“  
КАТЕДРА ПО ПРЕДКЛИНИЧНА И КЛИНИЧНА ФАРМАКОЛОГИЯ

---

**Стефка Василева Вълчева-Кузманова**

**ПСИХОФАРМАКОЛОГИЧНИ  
И ОРГАНОПРОТЕКТИВНИ ЕФЕКТИ  
НА ПЛОДОВ СОК ОТ *ARONIA MELANOCARPA*  
В ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ФАРМАКОЛОГИЧНИ  
ПРОУЧВАНИЯ**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

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

Официални рецензенти:

Чл. кор. проф. д-р Радомир Радомиров, д.м.н.

Чл. кор. проф. д-р Мила Власковска, д.м.н.

Доц. д-р Мария Желязкова-Савова, д.м.

Варна, 2014

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрен съвет на Катедрата по предклинична и клинична фармакология при Медицински университет – Варна, състояло се на 26.03.2014 г. и е насочен за защита пред научно жури.

Дисертационният труд обхваща 286 страници, съдържа 62 фигури и 35 таблици. Библиографията обхваща 652 литературни източника, от които 3 на кирилица и 649 на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 09.07.2014 г. от 13,30 часа в Трета аудитория 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.

# СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на често използваните съкращения

<b>ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b> .....	9
<b>МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ</b> .....	11
<b>1. Експериментални животни и клетъчна линия</b> .....	11
<b>2. Използвани фармакологични средства</b> .....	11
<b>3. Експериментални методи и модели</b> .....	12
3.1. Определяне на съдържанието на полифеноли в плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> .....	12
3.2. Методи за изследване на антиоксидантна активност in vitro .....	12
3.3. Методи за изследване на психофармакологични ефекти при плъхове .....	13
3.4. Модели на органно увреждане и оксидативен стрес при плъхове .....	15
3.5. Оценка на цитотоксичност на клетъчна култура .....	16
3.6. Биохимични и клинично-лабораторни методи .....	16
3.7. Статистически методи .....	17
<b>СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ</b> .....	19
<b>1. Съдържание на фенолни съединения в плодови сокове от <i>Aronia melanocarpa</i>, <i>Rubus caesius</i> и <i>Punica granatum</i> .....</b>	19
<b>2. Антиоксидантна активност на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> .....</b>	21
2.1. Тролокс еквивалентен антиоксидантен капацитет на плодови сокове от <i>Aronia melanocarpa</i> , <i>Rubus caesius</i> и <i>Punica granatum</i> .....	21
2.2. Радикал залавяща активност на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> , измерена чрез електронно-спинов резонанс ...	23
2.3. Капацитет на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> да абсорбира кислородния радикал и да предотвратява образуване на хидроксилни радикали .....	24
2.4. Обсъждане .....	25

<b>3. Психофармакологични ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> при плъхове</b> .....	27
3.1. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху двигателната активност и изследователското поведение .....	27
3.2. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху анксиогенезата/анксиолизата .....	39
3.3. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху паметта .....	47
3.4. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху депресивната симптоматика .....	54
3.5. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху болковата чувствителност .....	58
<b>4. Органопротективни ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i></b> .....	60
4.1. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> в експериментален модел на стрептозотоцин-индуциран диабет при плъхове .....	60
4.2. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> в експериментален модел на амидарон-индуцирана белодробна токсичност при плъхове .....	68
4.3. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> в експериментален модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност при плъхове .....	87
4.4. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> в модел на цисплатин-индуцирана токсичност .....	93
4.5. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> в експериментален модел на етанол-индуциран оксидативен стрес при плъхове .....	97
<b>ИЗВОДИ</b> .....	100
<b>СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b> .....	103
<b>СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b> .....	106

## Списък на често използваните съкращения

ABTS	– 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
ALP	– alkaline phosphatase
ALT	– alanine aminotransferase
AST	– aspartate aminotransferase
CAT	– catalase
ESR	– electron spin resonance
GAE	– galic acid equivalents
GPO	– glutathione peroxidase
HDL	– high-density lipoprotein
HDL-X	– HDL-холестерол
HORAC	– hydroxyl radical averting capacity
HPLC	– high-performance liquid chromatography
IL	– interleukin
LDL	– low-density lipoprotein
LDL-X	– LDL-холестерол
MTT	– 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиум бромид
ORAC	– oxygen radical absorbance capacity
SOD	– superoxide dismutase
TEAC	– trolox equivalent antioxidant capacity
АД	– амидарон
АФ	– алкална фосфатаза
БАЛТ	– бронхоалвеоларна лаважна течност
КФ	– кисела фосфатаза
ЛДХ	– лактат дехидрогеназа
МАО	– моноаминооксидаза
МАРК	– mitogen-activated protein kinase
МДА	– малонов диалдехид
МТТ	– 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиум бромид
ОХ	– общ холестерол
ПСАМ	– плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i>
ПСК	– плодов сок от къпина
ПСН	– плодов сок от нар
РКВ	– реактивни кислородни видове

- ТБКРС – реагиращи с тиобарбитуровата киселина субстанции
- ТГ – триглицериди
- ХП – хидроксипролин
- ЦНС – централна нервна система

## ВЪВЕДЕНИЕ

Природата е неизчерпаем източник на съединения с разнообразна структура и биологична активност. Добре документирано е, че природните продукти са изиграли важна роля в търсенето на нови лекарства. В това отношение са особено важни антибиотиците и антитуморните лекарства. Освен това интензивно се проучват природни продукти за лечението на такива масови заболявания като сърдечно-съдовите и невродегенеративните. Много е важно това, че природните продукти предлагат на учените уникални химически структури и ги подтикват към създаване на лекарства с подобни структури. Сега се оценява, че около 40% от лекарствата произхождат от природни източници (Newman et al., 2003). Световната здравна организация оценява, че около 80% от населението на света за своята първична здравна помощ разчита на лекарства предимно с произход от растения (Farnsworth et al., 1985; Arvigo and Balick, 1993).

В последно време интересът към изследвания на растенията се е увеличил в световен мащаб и има голям брой доказателства за огромния потенциал на лечебните растения. Независимо от досегашната изследователска работа, само около 5-15% от общо 2 500 000 видове висши растения са изследвани химически и фармакологично (Brachmani, 2009).

Полифенолите са клас биологично активни вещества с растителен произход, които са много интензивно проучвани в последните години. Те се откриват в голяма част от плодовете, зеленчуците и зърнените храни, както и в продуктите, произведени от тях. В различни растителни видове са открити над 8000 полифенолни съединения. Те са вторични метаболити в растенията и обикновено участват в защитата срещу ултравиолетовите лъчи или срещу патогени (Beckman, 2000). В храните полифенолите могат да допринесат за горчивия или адстрингентен вкус, за цвета, мириса и устойчивостта на окисляване. Полифенолите и съдържащите ги растения са предмет на повишен научен интерес поради техните възможни благоприятни ефекти върху човешкото здраве. Значителна част от литературата подкрепя ролята на оксидативния стрес в патогенезата на много човешки заболявания и приноса на хранителните полифеноли за предотвратяването им (Brenneisen et al., 2005; Scalbert et al., 2005; Yuen et al., 2005). Епидемиологични проучвания и свързани мета-анализи показват, че

продължителната консумация на храни, богати на растителни полифеноли, осигурява известна защита срещу развитието на рак, сърдечносъдови заболявания, диабет, остеопороза и невродегенеративни заболявания (Keli et al., 1996; Graf et al., 2005; Arts and Hollman, 2005; Крачанова и др., 2010).

В нашата страна има благоприятни климатични условия за отглеждане на *Aronia melanocarpa*. Плодовете на растението са изключително богати на полифеноли – прицианидини, флавоноиди главно от субклас антоцианини и фенолни киселини. При преглед на международните бази данни (PubMed, Scopus) се установява, че първото изследване на фармакологичен ефект на *Aronia melanocarpa* е направено от нашия изследователски колектив. То установява противовъзпалителна активност на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху лапа на плъх (Borissova et al., 1994). Оттогава вече двадесет години в Катедрата по предклинична и клинична фармакология към МУ – Варна се провеждат изследвания на различни активности на този сок, които към настоящия момент са само една малка част от направените в света проучвания на *Aronia melanocarpa* от други изследователски екипи. Това показва изключително големия научен интерес към това растение, който се задържа поради установените много добри ефекти както в експериментални проучвания в модели на болестни състояния при животни, така и в клинични проучвания при хора.

Някои от активностите на плодов сок от *Aronia melanocarpa* не са изследвани. Такива са ефектите върху функциите на централната нервна система, както и протективните ефекти в модели на увреждане като стрептозотоцин-индуциран диабет, амиодарон-индуцирана белодробна токсичност, парацетамол-ндуцирана хепатотоксичност, цисплатин-инуцирана нефротоксичност, алкохол-индуциран оксидативен стрес. Други активности като антиоксидантна и радикал-залавяща са изследвани само чрез някои от множеството възможни методи за тяхното определяне. Проучванията на всички неизследвани досега активности на плодovия сок от *Aronia melanocarpa* допринасят за пълното му фармакологично охарактеризиране и за насърчаване на потенциалното му използване като лечебно и профилактично средство за постигане на здраве и забавяне на процесите на стареене.



## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Имайки предвид изследваните досега ефекти на плодовете и сока от *Aronia melanocarpa* и на съдържащите се в тях биологично активни вещества, използвахме експериментални фармакологични методи и модели за изследване на непроучени до този момент активности на плодovия сок от *Aronia melanocarpa*.

Поставихме си за **ЦЕЛ**:

**Изследване на психофармакологични и органопротективни ефекти на плодov сок от *Aronia melanocarpa* в експериментални фармакологични проучвания.**

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

- 1. Да се определи съдържанието на полифенолни съединения, които са биологично активните вещества с най-голямо съдържание в плодovия сок от *Aronia melanocarpa*.**
  - 1.1. Да се изследва полифенолният състав на плодovия сок от *Aronia melanocarpa*.
  - 1.2. Да се сравни общото съдържание на полифеноли в плодov сок от *Aronia melanocarpa* с това в други богати на полифеноли плодovi сокове като сок от *Punica granatum* (нар) и *Rubus caesius* (къпина).
- 2. Да се изследват *in vitro* показатели за антиоксидантна активност на плодovия сок от *Aronia melanocarpa*.**
  - 1.1. Да се определи ABTS<sup>+</sup>-радикал-залавящата активност на плодov сок от *Aronia melanocarpa* и да се сравни с тази на плодov сок от *Punica granatum* и плодov сок от *Rubus caesius*.
  - 1.2. Да се потърси корелация между общата атиоксидантна активност и общото съдържание на полифеноли в изследваните плодovi сокове от *Aronia melanocarpa*, *Punica granatum* и *Rubus caesius*.
  - 1.3. Да се измери залавящата и обезвреждаща активност на плодovия сок от *Aronia melanocarpa* по отношение на галвиноксилен радикал чрез електронно-спинов резонансен метод.
  - 1.4. Да се определи способността на плодovия сок от *Aronia melanocarpa* да залавя пероксилни радикали.

- 1.5. Да се определи способността на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* да предотвратява образуването на хидроксилни радикали.
- 3. Да се изследват психофармакологични ефекти на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* при пълхове.**
  - 1.1. Да се изследва ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху двигателната активност и изследователското поведение.
  - 1.2. Да се изследва ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху върху анксиогенезата/анксиолизата.
  - 1.3. Да се проучи ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху депресивната симптоматика.
  - 1.4. Да се установи ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху обучението и паметта.
  - 1.5. Да се проучи ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху централната компонента на болковата чувствителност.
- 4. Да се изследват органопротективните ефекти на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* в експериментални фармакологични модели.**
  - 1.1. Да се изследва ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху кръвната глюкоза, липидния профил и показатели на оксидативния стрес в модел на стрептозотоцин-индуциран диабет при пълхове.
  - 1.2. Да се проучи ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху показатели на възпаление, оксидативен стрес и фиброза в модел на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност при пълхове.
  - 1.3. Да се установи ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху чернодробни ензими и показатели на оксидативен стрес в модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност при пълхове. В този експериментален модел ефектът на сока да се сравни с този на флавоноида кверцетин.
  - 1.4. Да се изследва ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху жизнеността на клетките в модел на цисплатин-индуцирана нефротоксичност на човешка ембрионална бъбречна клетъчна линия HEK293T.
  - 1.5. Да се изследва ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху липидната пероксидация в модел на алкохол-индуциран оксидативен стрес при пълхове.

# МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

## 1. Експериментални животни и клетъчна линия

### 1.1. Животни

Използвани са 1226 мъжки Wistar плъха (200 – 250 g), отглеждани при температура 20-25°C, 12-часов цикъл на светлина/тъмнина и при неограничен достъп до храна и вода.

Всички опитни процедури са провеждани съобразно с националните принципи за експерименти с животни, които са в съответствие с директивите на Европейския съюз (European Communities Council Directives 86/609/EEC).

### 1.2. Клетъчна линия

Човешката ембрионална клетъчна линия HEK293T е получена от German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ GmbH, Braunschweig, Germany).

## 2. Използвани фармакологични средства

### 2.1. Плодов сок от *Aronia melanocarpa*

Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* (ПСАМ) е приготвян чрез смилане, пресоване, изцеждане и филтриране на свежи плодове от *Aronia melanocarpa* Elliot. Полученият сок представлява 75-80% от изходната суровина. След приготвянето ПСАМ е консервиран чрез пастеризация при 80°C за 10 min или стерилизация при 100°C за 10 min, или е консервиран с калиев сорбат (1.0 g/l). До използването му за експерименти е съхраняван при стайна температура. Така приготвеният сок е изследван за съдържание на полифеноли.

### 2.2. Други плодови сокове

Използвани са плодови сокове от къпина (*Rubus caesius*) и нар (*Punica granatum*). Плодовете са пресовани, соковете са изцеждани, филтрирани, стерилизирани при 100°C за 10 min и съхранявани при стайна температура до момента на използването им.

### 2.3. Други използвани реактиви и субстанции

Използвани са следните реактиви и субстанции: diazepam под форма на ампули (Софарма, България), етанол 96% (Гея, България и

Кемика, Загреб, Хърватска), diethyl ether (Гея, България), streptozotocin, amiodarone hydrochloride, acetaminophen (paracetamol), quercetin, trolox, galvinoxyl free radical (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany), gallic acid, thiobarbituric acid, trichloroacetic acid, Folin-Ciocalteu phenolreagent, methanol, tween 80 (Merck, Germany), potassium persulfate (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, USA). Използвани са стандартни тестови набори за определяне на глюкоза, общ холестерол, HDL-холестерол и триглицериди (Poite Scientific Inc., USA), за определяне на чернодробни ензими (BioSystems S.A., Barcelona, Spain), за имунологичен анализ Quantikine Rat IL-6 и IL-10 (R&D Systems, USA).

### **3. Експериментални методи и модели**

#### **3.1. Определяне на съдържанието на полифеноли**

**3.1.1. Спектрофотометричен метод за определяне на общи феноли** с реактива на Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965). Резултатите са представени като еквиваленти на галова киселина (galic acid equivalents = GAE) в 1 l сок (mg GAE/l).

**3.1.2. Колориметричен метод за определяне на общи флавоноиди**, разработен от Zhishen et al. (1999). Количеството на флавоноидите е изразено като еквиваленти на катехин в mg/l сок.

**3.1.3. Определяне на антоцианини чрез рН-диференциална спектрофотометрия** при рН 1.0 и рН 4.5 (Guisti et al., 1999). Общите антоцианини са представени количествено като цианидин-3-глюкозид еквиваленти.

**3.1.4. HPLC метод за определяне на кверцетин** по метода на Hertog et al. (1992)

**3.1.5. HPLC метод за определяне на гликозиди на цианидин**

**3.1.6. HPLC метод за определяне на други фенолни съединения (фенолни киселини и флаван-3-оли)**

**3.1.7. Гравиметричен метод за изолиране и определяне на общи проантоцианидини** съгласно процедурата, описана от Howell et al. (2005)

#### **3.2. Методи за изследване на антиоксидантна активност *in vitro***

**3.2.1. Тролокс еквивалентен антиоксидантен капацитет (TEAC)**, определен чрез ABTS радикален катионен деколоризационен анализ (Re et al., 1999)

**3.2.2. Електронно-спинов резонанс (ESR) за измерване на радикал залавяща активност** по отношение на галвиниксилен свободен радикал

**3.2.3. Абсорбционен капацитет на кислородния радикал – ORAC (oxygen radical absorbance capacity)** по метода на Ou et al. (2001) за определяне на неутрализирането на пероксилни радикали

**3.2.4. Капацитет за предотвратяване на образуване на хидроксилни радикали – HORAC (hydroxyl radical averting capacity)** за измерване на комплексообразуващата способност в условия на реакция на Фентън

### **3.3. Методи за изследване на психофармакологични ефекти при плъхове**

#### **3.3.1. Изследователско поведение и двигателна активност**

В апарат Opto Varimex (Columbus Instruments, USA) съгласно метода на Köhler and Lorens (1978) чрез записване на броя на прекъсванията на светлинен лъч по време на движенията на животните се отчитат селективно броят на хоризонталните движения (ходене) и вертикални движения (изправяния) в условни единици (УЕ). Получената информация се записва автоматично на всяка минута през първите 5 min на теста и общо за следващите 5 min. Броят на хоризонтални и вертикални движения, регистриран на всяка минута през първите 5 min, служи като мярка за изследователската активност и привикване към новата среда. Общият брой на движенията по време на първите 5 min и по време на целия 10-минутен период на наблюдение се използва като мярка за двигателна активност.

#### **3.3.2. Тест открито поле**

В тест открито поле (open field test) (Bronstein, 1972) в продължение на 5 min се отчитат броят прекосени линии с четирите лапи (показател за хоризонтална активност) и броят изправяния на задните лапи (показател за вертикална активност).

#### **3.3.3. Тест за социално взаимодействие**

Плъховете се тестват по метод (social interaction test), разработен от Sandra and Hyde (1978). В продължение на 5 min се проследяват и се регистрират следните поведенчески прояви на тест-партньорите: душене, оправяне на козината, преследване, покачване върху или пълзене под партньора. По-продължителният контакт е показател за анксиолитичен ефект.

### **3.3.4. Тест за разпознаване на обект**

Тестът за разпознаване на обект (object recognition test) се основава на различаване на познат от нов обект, които се представят в две сесии – T1 и T2, през интервал от 1 h. Тестът цели да изследва работната памет (Ennaceur and Delacour, 1988). Измерва се времето, през което плъхът изследва обектите, като насочва към тях носа си на разстояние по-малко от 2 cm и/или ги докосва с носа си. Обикалянето около или седенето върху обекта не се счита за изследователско поведение. Определят се параметрите: A = време за изследване на обекта по време на T1, B+A' = време за изследване на новия обект (B) и на познатия обект (A') по време на T2. Разпознаването на обекта се измерва чрез показателите:  $B - A'$ ,  $B - A'/B + A'$  и индексът за разпознаване =  $B \times 100/B + A'$ .

### **3.3.5. Повдигнат кръстосан лабиринт**

Повдигнатият кръстосан лабиринт (elevated plus maze) се използва за изследване на състоянието на тревожност (Pellow et al., 1985). Отчитат се следните показатели в продължение на 5 min: брой влизания в откритите рамена (БОР) и времето, прекарано в откритите рамена (ВОР), брой влизания в закритите рамена (БЗР) и времето, прекарано в закритите рамена (ВЗР), общ брой влизания в рамената (влизания в откритите рамена + влизания в закритите рамена) (ОБ), съотношението брой влизания в откритите рамена/общ брой влизания в рамената (БОР/ОБ) и съотношението време, прекарано в откритите рамена/общо време (ВОР/ОВ).

### **3.3.6. Тест за еднопосочно пасивно избягване**

В теста за еднопосочно пасивно избягване (step through), за да избегне електрически ток в стъпалата, плъхът трябва да се научи да остава в ярко осветеното отделение на апарата и да не влиза в предпочитаното тъмно отделение. Един опит за обучение и два теста за памет (на 3-ия и 24-ия час след обучението) се провеждат в съответствие с метода на Gozzani and Izquierdo (1976). Измерва се латентното време, т.е. времето, след което плъхът се премества в тъмното помещение. Латентно време от най-малко 180 sec се използва като критерий за обученост.

### **3.3.7. Тест за двупосочно активно избягване**

При теста за двупосочно активно избягване (shuttle box), за да избегне лек електрически шок (безусловен стимул), 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). Тестът се провежда по метода на Buresova and Bures (1983), модифициран от Petkov et al. (1993). Условно избягване – авойданс (правилен отговор) се отчита, когато животното избягва безусловния стимул. Има две обучителни сесии (в два последователни дни) и тест за памет – 24 часа след обучението. Регистрира се броят на авойдансите в обучителните сесии и в теста за памет.

### **3.3.8. Тест за принудително плуване**

Методът на Porsolt et al. (1979) за принудително плуване (forced swim test) е използван за оценка на депресивно-подобното поведение. Всеки плъх се поставя за 5 min в цилиндър, пълен с вода. Тестът се провежда в две сесии с интервал от 24 часа между тях. Записват се резултатите от втората сесия. Повишеното време на неподвижност е мярка за депресивно-подобното поведение.

### **3.3.9. Тест за изследване на болковата чувствителност**

Използва се тест (paw pressure test) по метода на Randall и Selitto (1957). С помощта на лост се упражнява натиск върху лапата на плъха. Болка-предизвикващият натиск се отчита в условни единици (УЕ) по скалата на аналгезиметър (Ugo Basile).

## **3.4. Модели на органно увреждане и оксидативен стрес при плъхове**

### **3.4.1. Стрептозотозин-индуциран диабет**

Диабетът се индуцира посредством интраперитонеално инжектиране на стрептозотозин (50 mg/kg). Плъховете с глюкозурия над 55 mmol/l, измерена 72 часа след инжектирането на стрептозотозина, се включват по-нататък в експеримента. Шест седмици след индукцията на диабета се правят биохимичните изследвания.

### **3.4.2. Амидарон-индуцирана белодробна токсичност**

Белодробното увреждане се индуцира чрез две интратрахеални въвеждания на амидарон (6.25 mg/kg като воден разтвор с концентрация 3.125 mg/ml; обем на прилагане 2 ml/kg) в ден 0 и ден 2 (Taylor et al., 2000). Амидаронът се разтваря в дестилирана вода при 60°C и се оставя да се охлади до стайна температура преди интратрахеалната инстилация. Контролната група получава интратрахеално две инстилации на дестилирана вода (2 ml/kg). Животните се декапитират

под анестезия с тиопентал в дни 3, 7, 10 и 28. Прави се изследване на бронхоалвеоларна лаважна течност, белодробен хомогенат и серум.

### **3.4.3. Парацетамол-индуцирана хепатотоксичност**

Хепатотоксичност се индуцира чрез интраперитонеално приложение на парацетамол (1.0 g/kg) на плъхове, които преди това се оставят 42 часа без храна. На 48<sup>-ми</sup> час след инжектирането на парацетамола животните се декапитират под етерна наркоза. Серум и чернодробен хомогенат се изследват биохимично.

### **3.4.4. Алкохол-индуциран оксидативен стрес**

Етанолът се прилага перорално в доза 4.8 g/kg като 48% разтвор с обем 12 ml/kg в продължение на 3 дни. Три часа след последното третиране се вземат кръв за приготвяне на плазма и черен дроб – за хомогенат, които се изследват биохимично.

## **3.5. Оценка на цитотоксичност на клетъчна култура**

Клетъчната жизнеспособност се определя с помощта на тест за редукция на багрилото МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолиум бромид], както е описано от Mosmann (1983) с незначителни модификации (Konstantinov et al., 1999). Анализът се основава на редукция на жълтото тетразолиево багрило МТТ до виолетов формазанов продукт от митохондриалната сукцинат дехидрогеназа в жизнеспособни клетки. След инкубиране в различни концентрации на ПСАМ за 24 часа клетките се излагат на различни концентрации на цисплатин за 72 часа, след което се добавя МТТ разтвор. Изчисляват се фракциите на оцелелите клетки и стойностите на IC<sub>50</sub> за цисплатин.

## **3.6. Биохимични и клинично-лабораторни методи**

**3.6.1. Глюкоза в кръвна плазма** е определяна по ензимно-колориметричен глюкозо оксидазен GOP-PAP метод, описан от Trinder (1969).

**3.6.2. Триглицериди, общ холестерол, HDL-холестерол и LDL-холестерол в кръвна плазма** са определяни с апарат RA-1000-Tehnicon със стандартни тестови набори на Pointe Scientific Inc. За триглицериди е използван ензимно-колориметричен GPO-PAP тест, за тотален холестерол – ензимно-колориметричен CHOD-PAP тест, а за HDL-холестерол – ензимно-колориметричен Direct тест. LDL-холестерол се изчислява по формула (Friedwald et al., 1972):



LDL-холестерол = Общ холестерол – (0.46 × Триглицериди + HDL-холестерол)

**3.6.3. Активностите на чернодробните ензими аспартат аминотрансфераза (AST), аланин аминотрансфераза (ALT) и алкална фосфатаза (ALP) в серум** са измервани чрез спектрофотометричен метод с помощта на стандартен тестов набор на BioSystems S.A., Barcelona, Spain.

**3.6.4. Интерлевкени (IL-6 и IL-10) в серум** са определяни с ELISA метод с помощта на стандартни тест набори на R&D Systems, USA.

**3.6.5. Цитологично изследване на бронхоалвеоларна лаважна течност (БАЛТ)** е правено по процедура на Saltini et al. (1984) и оцветяване с хематоксилин-еозин.

**3.6.6. Активностите на ензимите лактат дехидрогеназа (ЛДХ), кисела фосфатаза (КФ) и алкална фосфатаза (АФ) в БАЛТ** са измервани по метода на Bergmeier et al. (1974).

**3.6.7. Общото съдържание на протеин в БАЛТ** е определяно по метода на Lowry et al. (1951).

**3.6.8. Хидроксипролин в белодробен хомогенат** е определян по метода на Bergman and Loxley (1963).

**3.6.9. Активностите на антиоксидантни ензими в белодробен хомогенат** са определяни както следва: каталаза (CAT) – по метода на Koroljuk et al. (1988), глутатион пероксидазата (GPO) – по метода на Berchneider, модифициран от Pereslegina (Vlasova et al. 1990), супероксид дисмутазата (SOD) – по метода на Maral et al. (1977).

**3.6.10. Реагиращите с тиобарбитуровата киселина субстанции (ТБКРС) в серум, в чернодробен хомогенат и в хомогенат от бъбрек** са определяни спектрофотометрично (Ohkawa et al., 1979).

**3.6.11. Малонов диалдехид (МДА) в белодробен хомогенат, в хомогенат от бъбрек и в хомогенат от панкреас** е измерван спектрофотометрично по метода на Porter et al. (1976).

### **3.7. Статистически методи**

За статистическата обработка на експерименталните данни са използвани следните анализи:

- Еднофакторен вариационен анализ (one-way ANOVA), последван от Dunnett's Multiple Comparison Post Test, post hoc *t*-test или Student-Newman-Keuls (SNK) test;

- Двухфакторен ANOVA (с повтарящи се измервания върху два фактора – време и доза);
- Student's *t*-test за сравняване на две независими групи;
- $\chi^2$  тест;
- Корелационен анализ за определяне на коефициент на корелация (*r*).

Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ SEM. Статистическа достоверност е приемана при  $p < 0.05$ .

Използвани са статистическите програми Excel и GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

# СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

## 1. Съдържание на фенолни съединения в плодови сокове

### 1.1. Съдържание на фенолни съединения в плодов сок от *Aronia melanocarpa*

Измерените фенолни съединения в четири проби плодов сок от *Aronia melanocarpa* (ПСАМ) са представени в Таблицы 1 и 2.

**Таблица 1.** Съдържание на полифенолни съединения в ПСАМ – проба I и проба II; GAE – еквиваленти на галова киселина; CE – еквиваленти на катехин; C-3-G – еквиваленти на цианидин-3-глюкозид

Вещества	Съдържание		Метод
	Проба I	Проба II	
Общи феноли	7093 mg GAE/l	6730 mg GAE/l	Спектрофотометричен (Singleton and Rossi, 1965)
Общи флавоноиди	1894 mg CE/l	Не са определяни	Спектрофотометричен (Zhisten et al., 1999)
Общи антоцианини	1068 mg C-3-G/l	Не са определяни	Спектрофотометричен (Guisti et al., 1999)
Кверцетин	118 mg/l	Не е определян	HPLC (Hertog et al., 1992)

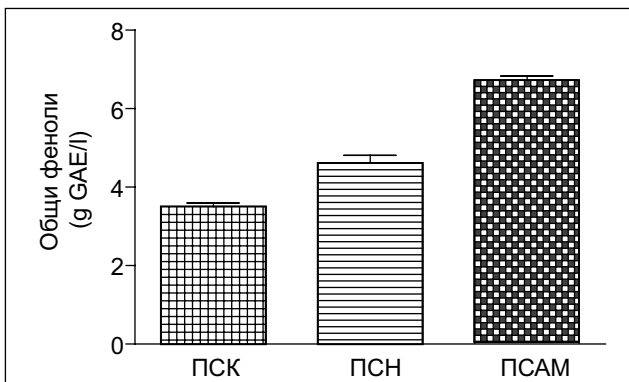
**Таблица 2.** Съдържание на полифенолни съединения в ПСАМ – проба III и проба IV; GAE – еквиваленти на галова киселина

Вещества	Съдържание		Метод
	Проба III	Проба IV	
Общи феноли	6652 mg GAE/l	5461 mg GAE/l	Спектрофотометричен (Singleton and Rossi, 1965)
Общи проантоцианидини	3926.2 mg/l	3122.5 mg/l	Гравиметричен (Howell et al., 2005)
Цианидин-галактозид	20.0 mg/l	143.7 mg/l	HPLC
Цианидин-арабинозид	8.2 mg/l	61.7 mg/l	HPLC
Цианидин-глюкозид	4.4 mg/l	4.4 mg/l	HPLC
Цианидин-килозид	0.6 mg/l	11.6 mg/l	HPLC
Хлорогенова киселина	691 mg/l	585 mg/l	HPLC
Неохлорогенова киселина	840 mg/l	830 mg/l	HPLC

Ферулова киселина	19.9 mg/l	Не се открива	HPLC
Галова киселина	6.9 mg/l	Не се открива	HPLC
Катехин	4.1 mg/l	Не се открива	HPLC

## 1.2. Съдържание на общи феноли в плодови сокове от *Aronia melanocarpa*, *Rubus caesius* и *Punica granatum*

Общото съдържание на полифеноли в ПСАМ (проба II) е сравнено с това на ПСН – плодов сок от нар (*Punica granatum*) и ПСК – плодов сок от къпина (*Rubus caesius*). Концентрациите на общи феноли в трите плодови сока са: ПСАМ –  $6.73 \pm 0.1$  g GAE/l; ПСН –  $4.61 \pm 0.2$  g GAE/l и ПСК –  $3.5 \pm 0.1$  g GAE/l. (Фиг. 24).



Фиг. 1. Съдържание на общи феноли в плодови сокове от арония (ПСАМ), нар (ПСН) и къпина (ПСК) в еквиваленти на галова киселина (GAE)

## 1.3. Обсъждане

Данните от анализите показват известни вариации в съдържанието на различните полифенолни съединения в четирите проби ПСАМ. Тези вариации могат да се обяснят с различна година на реколтата, с вариация в климатичните условия, разлика в използвания аналитичен метод, различие в начина на консервация на сока (проби I и II – чрез пастьоризация, проба III – чрез стерилизация, проба IV – с калиев сорбат). Антоцианините претърпяват термично разграждане и се превръщат в други фенолни съединения (Sadilova et al., 2007). Това би могло да допринесе за по-ниското съдържание на цианидин-гликозидите в проба III от ПСАМ, която е подложена на стерилизация.

Независимо от вариациите прави впечатление изключително високото съдържание на тотални феноли в ПСАМ. Данни на други изследователи също показват, че арониевите плодове са със забележително високо общо съдържание на полифеноли (Kahkonen et al., 1999; Kolesnikov and Gins, 2001; Zheng and Wang, 2003; Benvenuti et al., 2004; Oszmianski and Wojdylo, 2005; Hudec et al., 2006; Jakobek et al., 2007a, b; Rop et al., 2010).

Получените резултати са в съответствие с резултати на много други изследователи, показващи, 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-кафеолилхлининова киселина) и неохлорогенова (5-О-кафеолилхлининова 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 and Wojdylo, 2005; Rop et al., 2010).

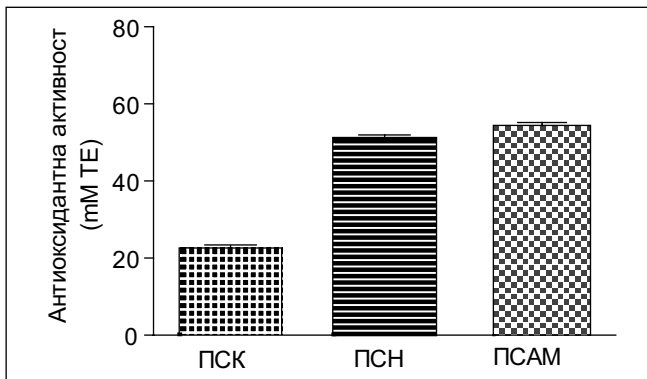
Общото съдържание на полифеноли в ПСАМ е сравнено с това на плодови сокове от нар и къпина, които по литературни данни също имат високо полифенолно съдържание. Сравнителното изследване на трите плодови сока показва, че съдържанието на общи полифеноли в ПСАМ е около 2 пъти по-високо от това на ПСК и около 1.5 пъти по-високо от това на ПСН. Други сравнителни данни в литературата потвърждават факта, че ПСАМ е един от соковете с най-високо полифенолно съдържание. Според Bermúdez-Sato and Thomás-Barberán (2004) съдържанието на фенолни съединения в концентриран сок от арониеви плодове е най-високо в сравнение с други подобни концентрирани сокове: 1.5 пъти по-високо в сравнение с плодов концентрат от бъз, 2 пъти по-високо отколкото в концентрат от черно френско грозде и 3 пъти по-високо отколкото в концентрат от червено френско грозде, ягоди, червено грозде, вишни, сини сливи и малини.

## **2. Антиоксидантна активност на плодов сок от *Aronia melanocarpa***

### **2.1. Тролокс еквивалентен антиоксидантен капацитет на плодови сокове от *Aronia melanocarpa*, *Rubus caesius* и *Punica granatum***

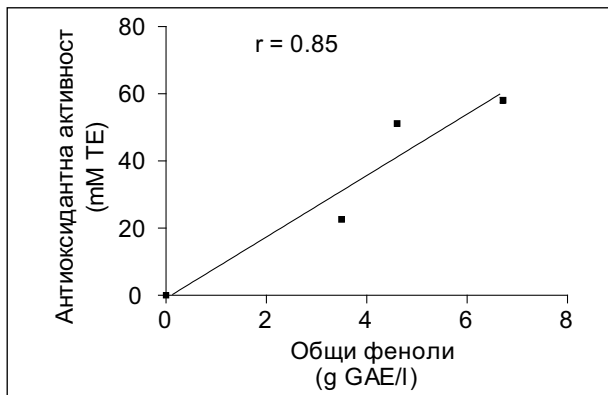
Тролокс еквивалентният антиоксидантен капацитет (TEAC) на плодвите сокове от *Aronia melanocarpa* (ПСАМ, проба II), *Punica gra-*

*natum* (нар, ПСН) и *Rubus caesius* (къпина, ПСК), определени чрез ABTS радикал обезцветяващия метод (Re et al., 1999), е съответно  $58.09 \pm 0.8$  mM TE,  $51.16 \pm 0.7$  mM TE и  $22.63 \pm 0.5$  mM TE (Фиг. 2).



**Фиг. 2.** Антиоксидантна активност на плодови сокове от къпина (ПСК), нар (ПСН) и арония (ПСАМ) като еквиваленти на Trolox (TE)

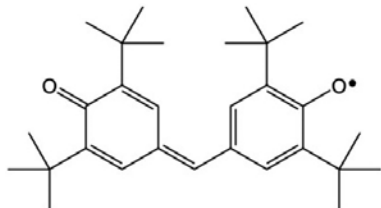
Установена е висока позитивна корелация ( $r = 0.85$ ) между общата антиоксидантна активност (TEAC) и общото съдържание на полифеноли в трите изследвани плодови сока – ПСАМ, ПСН и ПСК (Фиг. 3).



**Фиг. 3.** Корелация между общото съдържание на полифеноли като еквиваленти на галова киселина (GAE) и общата антиоксидантна активност като еквиваленти на Trolox (TE) на плодови сокове от къпина, нар и арония

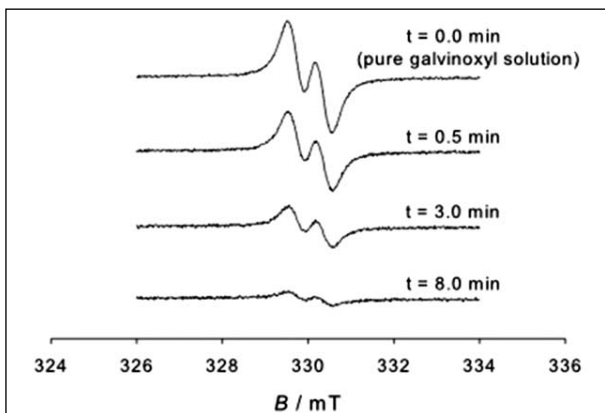
## 2.2. Радикал залавяща активност на плодов сок от *Aronia melanocarpa*, измерена чрез електронно-спинов резонанс

Измерена е залавящата активност на ПСАМ (проба III) по отношение на галвиноксилен свободен радикал (Фиг. 4) чрез електронно-спинов резонанс (ESR).

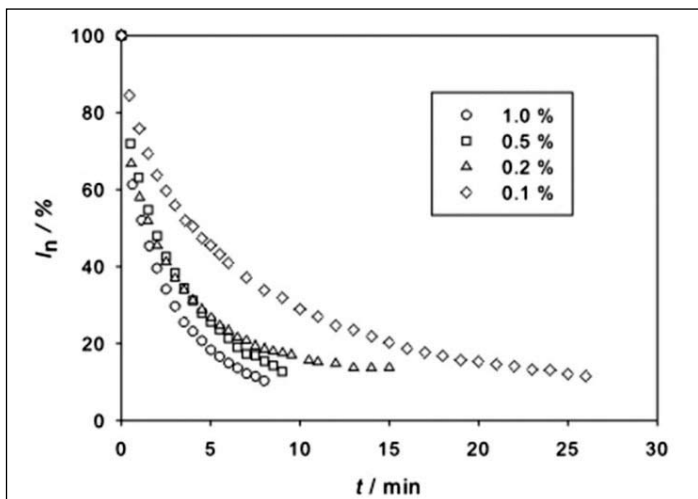


Фиг. 4. Структурна формула на галвиноксилен радикал

ESR спектрите на разтвори на този радикал преди и след добавяне на разтвор на ПСАМ (крайна концентрация на галвиноксилен радикал 0.12 mmol/dm<sup>3</sup> и крайна концентрация на ПСАМ 0.5 обемни %) са показани на Фиг. 5. Вижда се, че интензитетът на сигнала силно намалява като функция на времето  $t$ . Загубата на сигнал е съответно около 18% и 62% за 0.5 min и 3.0 min. След  $t = 8.0$  min намаляването на сигнала е около 85 % и тогава сигналът е на границата на доловимост.



Фиг. 5. ESR спектри на чист разтвор на галвиноксилен радикал ( $t = 0$  min) и на разтвор на радикал, съдържащ 0.5 обемни % ПСАМ за различни реакционни времена;  $B$  – магнитно поле



**Фиг. 6.** Нормализирано съотношение на интензитета на сигнала ( $I_n$ ) на галвиноксилния радикал, измерен като функция на реакционното време  $t$ , за различни концентрации (обемни %) на ПСАМ

На Фиг. 6 е представено намаляването на ESR сигнал във времето в присъствие на различни концентрации на ПСАМ в разтвора. Много малко количество ПСАМ (0.1%) е достатъчно за редукция на сигнала за сравнително кратко време (26 min). По-високите концентрации на ПСАМ (0.2%, 0.5% и 1.0%) имат концентрация-зависим по-висок радикал залавящ ефект, водещ до по-бързо понижаване на сигнала. Най-бърза загуба на сигнала (8 min) се получава от концентрацията на ПСАМ 1%. По-ниските концентрации (0.1% и 0.2%) не са достатъчни да реагират с цялото количество на радикала, докато от наклона на кривите за двете по-високи концентрации (0.5% и 1.0%) във време  $t = 8 \text{ min}$  и  $t = 10 \text{ min}$  е видно, че тези концентрации на сока имат още радикал залавящ потенциал.

### 2.3. Капацитет на плодов сок от *Aronia melanocarpa* да абсорбира кислородния радикал и да предотвратява образуване на хидроксилни радикали

Капацитетът на ПСАМ (проби III и IV) да абсорбира кислородния радикал (ORAC) и капацитетът да предотвратява образуването на хидроксилни радикали (HORAC) са представени в Таблица 3.



**Таблица 3.** ORAC и HORAC на ПСАМ;  $\mu\text{mol TE/l}$  –  $\mu\text{mol Trolox}$  еквиваленти/l;  $\mu\text{mol GAE/l}$  –  $\mu\text{mol}$  еквиваленти на галова киселина/l

Тест \ ПСАМ проба	Проба III	Проба IV
ORAC	74045 $\mu\text{mol TE/l}$	52045 $\mu\text{mol TE/l}$
HORAC	51661 $\mu\text{mol GAE/l}$	30560 $\mu\text{mol GAE/l}$

ORAC и HORAC на проба III са по-високи от тези на проба IV вероятно поради по-високото общо съдържание на полифеноли в проба III (6652 mg GAE/l) в сравнение с проба IV (5461 mg GAE/l).

## 2.4. Обсъждане

Настоящите експерименти показват силно изразени антиоксидантни активности на плодовите сокове от арония, нар и къпина, като най-висок е TEAC на ПСАМ. Демонстрирана е висока степен на корелация между общата антиоксидантна активност и общото съдържание на полифеноли в трите изследвани сока. Rugină et al. (2012) установяват корелация между антиоксидантната активност и общото съдържание на антоцианини и процианидини в екстракти от два сорта *Aronia melanocarpa* (Viking и Aron) и *Aronia prunifolia*. Корелация между полифенолното съдържание и антиоксидантната активност е установена от други изследователи за плодове и листа от къпина, малина и ягода (Wang and Lin, 2000; Cho et al., 2004).

Според Fiore et al. (2005 г.) общата антиоксидантна активност, определена чрез ABTS радикал обезцветяващия метод, е позитивно свързана със съдържанието на антоцианини и други феноли. Антиоксидантният капацитет на фенолни съединения се дължи на лекотата, с която водороден атом от ароматната хидроксилна (OH) група може да бъде отдаден на свободния радикал. Приносът на отделните феноли за антиоксидантният капацитет зависи от тяхната структура. Трите плодови сока са много богати на антоцианини (Noda et al., 2002; Cho et al., 2004; Oszmianski and Wojdylo, 2005). Високоэффективни радикал залавящи структури на антоцианините са 3',4'-дихидрокси субституентите в пръстен В (Zheng and Wang, 2003) и на хидроксилната група в позиция C<sub>3</sub> (Seeram and Nair, 2002). Както е добре известно, ягодоплодните съдържат освен антоцианини и много други фенолни съединения, които действат като антиоксиданти (Zheng and Wang, 2003; Vinson et al., 2001). Способността на малките фенолни молекули като флавоноиди и фенолни киселини да действат като антиоксиданти е добре докумен-

тирана, но по-високо молекулните фенолни съединения са били пренебрегвани. Впоследствие се натрупват данни, че процианидините също имат мощна антиоксидантна активност и възможни полезни ефекти върху човешкото здраве (Santos-Buelga and Scalbert, 2000).

ESR спектроскопията с използване на галвиноксиден свободен радикал, предложена от Quiles et al. (2002) като бърз и много чувствителен метод, в последните години се използва за изследване на антиоксидантната активност на различни хранителни продукти (Pedersen, 2002; Polovka et al., 2003). До този момент няма изследване на антиоксидантната активност на плодове и продукти от *Aronia melanocarpa* чрез ESR техника. Подобни изследвания с маслиново масло и червено вино (Papadimitriou et al., 2006; Koprivnjak et al., 2008; Espinoza et al., 2009) показват, че в сравнение с тях ПСАМ има по-висока радикал залавяща активност.

ORAC методът измерва способността на даден антиоксидант да неутрализира пероксидни радикали, които доказано са с най-голяма физиологична значимост. HORAC методът измерва способността на антиоксиданта да предпазва от образуване на хидроксидни радикали, които са най-реактивоспособните форми на кислорода. В литературата липсват данни за ORAC и HORAC на сок от *Aronia melanocarpa*, но има данни за ORAC на арониеви плодове (Zheng and Wang, 2003; Wu et al., 2004), както и за ORAC и HORAC на арониев екстракт (Denev et al., 2010). ORAC на арониевите плодове е много по-висок от този на други плодове. По литературни данни, ако ORAC на арония се приеме за 100%, тогава активността на боровинките е 77%, на къпините и касиса – около 35%, на ягодите – 9-13%, на малините – 13%, на червените боровинки – 11.6%, на гроздето – 2-5% (Wang et al., 1996; Zheng and Wang, 2003).

Представените резултати показват висока антиоксидантна активност на ПСАМ, измерена чрез няколко теста за радикал залавяща активност. Висока антиоксидантна активност на *Aronia melanocarpa* е установена е чрез други методи. Такъв е например тестът за залавяне на радикал DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), който е използван от много автори за изследване на плодове (Benvenuti et al., 2004; Oszmianski and Wojdylo, 2005; Jakobek et al., 2007b; Rop et al., 2010), плодов сок (Jakobek et al., 2007c) и плодов концентрат (Bermudez-Soto et al., 2004) от *Aronia melanocarpa*. Други автори определят ORAC (Zheng and Wang, 2003) и DPPH залавящата активност (Kähkönen and Heinonen, 2003) на индивидуални фенолни фракции, изолирани от арониеви плодове (гликозиди на цианидин, гликозиди на кверцетин, хлорогенова киселина). В тези изследвания гликозидите на кверцетин

показват най-високи стойности на ORAC, последвани от гликозидите на цианидин, а хлорогеновата киселина е на трето място (Zheng and Wang, 2003). Стойностите на DPPH залавящата активност на кверцетиновите гликозиди, цианидиновите гликозиди и хлорогеновата киселина са сходни (Kahkonen and Heinonen, 2003). Изследванията на радикал обезвреждащите активности на индивидуалните полифеноли директно потвърждават, че радикал-залавящата активност на сока се дължи на неговите полифенолни съставки.

### 3. Психофармакологични ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* при плъхове

#### 3.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху двигателната активност и изследователското поведение

##### 3.1.1. Ефект на еднократно приложение на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху двигателната активност

Експериментът е проведен в тест открито поле върху 36 мъжки плъха порода Wistar (200-250 g), разпределени в три групи по 12 броя. Третирането на плъховете е направено интрагастрално чрез мека еластична сонда 60 min преди провеждането на теста. Групите са третирани както следва: Контрола – дестилирана вода (10 ml/kg), ПСАМ<sub>5</sub> – сок в доза 5 ml/kg, разреден с дестилирана вода до обем 10 ml/kg, ПСАМ<sub>10</sub> – сок в доза 10 ml/kg.

Резултатите от експеримента, представени в Таблица 4, показват, че еднократното третиране на плъховете с ПСАМ в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg не повлиява статистически значимо хоризонталната и вертикалната двигателна активност.

**Таблица 7.** Хоризонтална и вертикална двигателна активност на плъховете, третирани еднократно с дестилирана вода (Контрола) или с ПСАМ в дози 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>) и 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>). Резултатите са представени като средна стойност±SEM; n = 12

Група \ Показател	Хоризонтална активност (Брой прекосени линии)	Вертикална активност (Брой изправяния)
Контрола	42.1±4.3	17.7±2.1
ПСАМ <sub>5</sub>	50.9±5.4	23.6±3.9
ПСАМ <sub>10</sub>	55.1±6.1	21.9±2.2

### **3.1.2. Ефект на субхронично приложение на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху изследователското поведение и двигателната активност**

Експериментът е проведен върху 160 мъжки Wistar плъха, разделени в 16 групи по 10 броя. Плъховете са третирани чрез оро-гастрална сонда в продължение на 7 дни, 14 дни, 21 дни или 30 дни. ПСАМ е прилаган в дози 2.5 ml/kg, 5 ml/kg и 10 ml/kg съответно на групите ПСАМ<sub>2,5</sub>, ПСАМ<sub>5</sub> и ПСАМ<sub>10</sub>. Контролните групи са третирани с физиологичен разтвор. Различните групи са тествани на 7-ми, 14-ти, 21-ви и 30-ти ден 60 min след последното прилагане ПСАМ в апарат Opto Varimex и резултатите са представени в условни единици (УЕ). Опитите са извършвани по едно и също време (между 09:00 и 13:00).

#### **3.1.2.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху хоризонталните движения през първите 5 min**

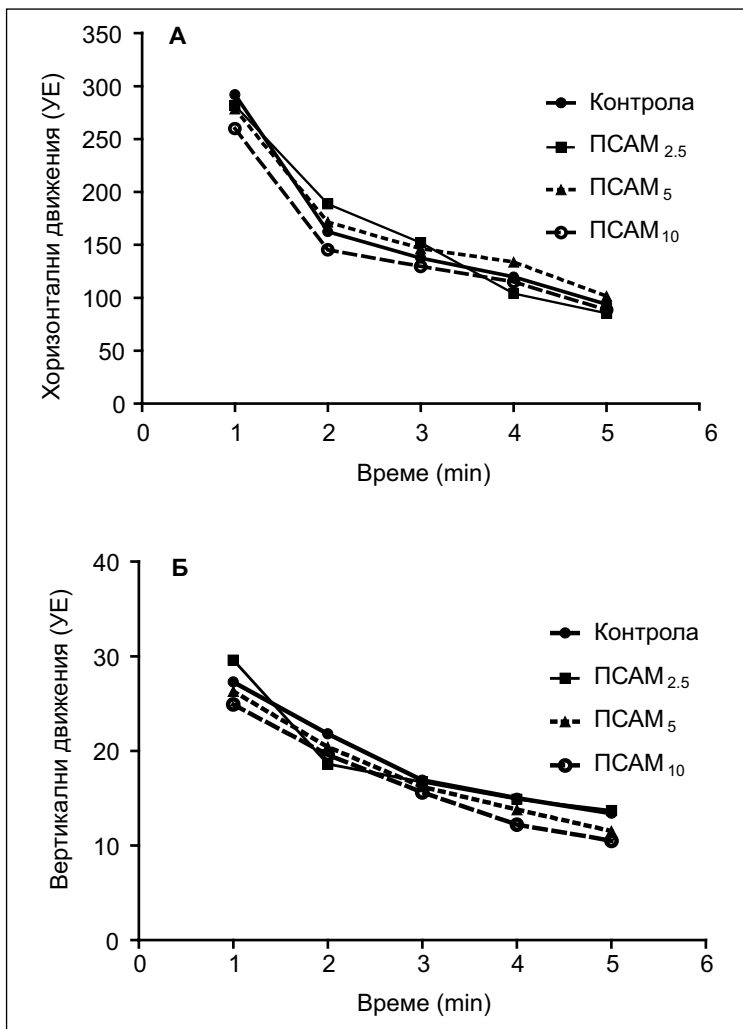
Броят на хоризонталните движения за всяка минута през първите 5 min е представен на Фиг. 7А, 8А, 9А, 10А.

ПСАМ, прилаган в дози 2.5 ml/kg и 5 ml/kg за периоди от 7, 14, 21 и 30 дни, няма значим ефект върху броя на хоризонталните движения (Фиг. 7А, 8А, 9А, 10А). ПСАМ в доза 10 ml/kg, прилаган за 7 и 14 дни, не намалява значимо броя на хоризонталните движения в сравнение със съответните контроли (Фиг. 7А, 8А). Дозата 10 ml/kg на 21-ви ден, както и на 30-ти ден, значимо понижава броя на хоризонталните движения на 1-ва, 2-ра, 3-та, 4-та и 5-та min в сравнение със съответните контроли (Фиг. 9А, 10А).

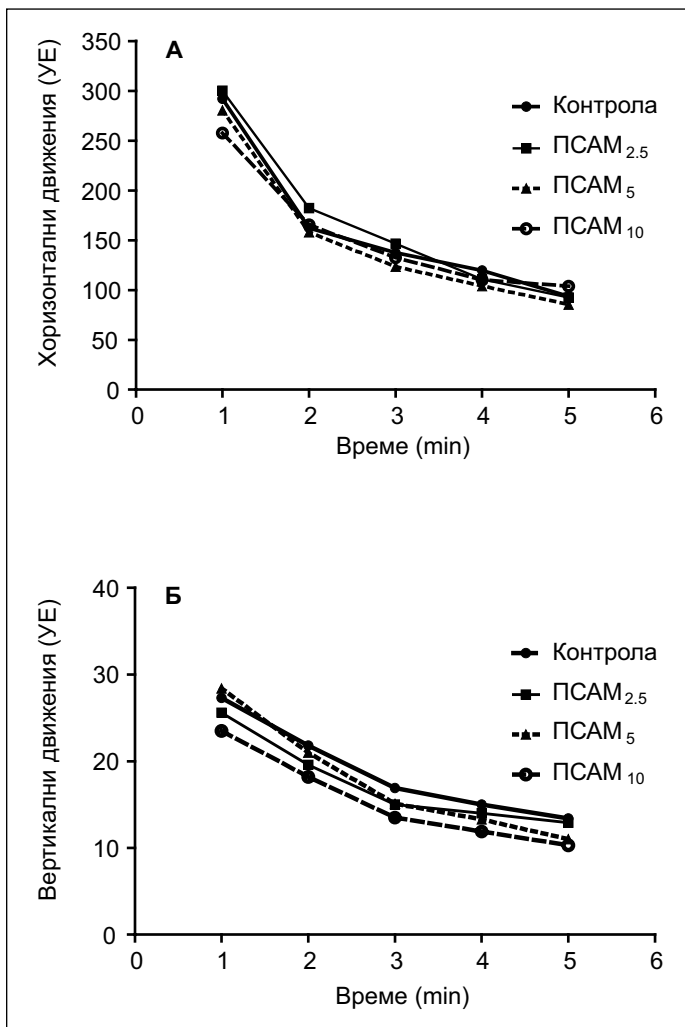
Анализът на промените в броя на хоризонталните движения на всяка минута през първите 5 min показва, че трите дози ПСАМ (2.5, 5 и 10 ml/kg) за всички периоди на третиране (7, 14, 21 и 30 дни) не нарушават хабитуацията на плъховете към новата среда на апарата (Фиг. 7А, 8А, 9А, 10А).

Общият брой на хоризонталните движения през началния 5-min период на наблюдение е представен на Фиг. 11. ПСАМ само в доза 10 ml/kg значимо намалява общия брой на хоризонталните движения за първите 5 min на 21-ви и 30-ти ден в сравнение с третираните с физиологичен разтвор контролни групи. Най-изразен е ефектът на 30-ти ден (Фиг. 11).

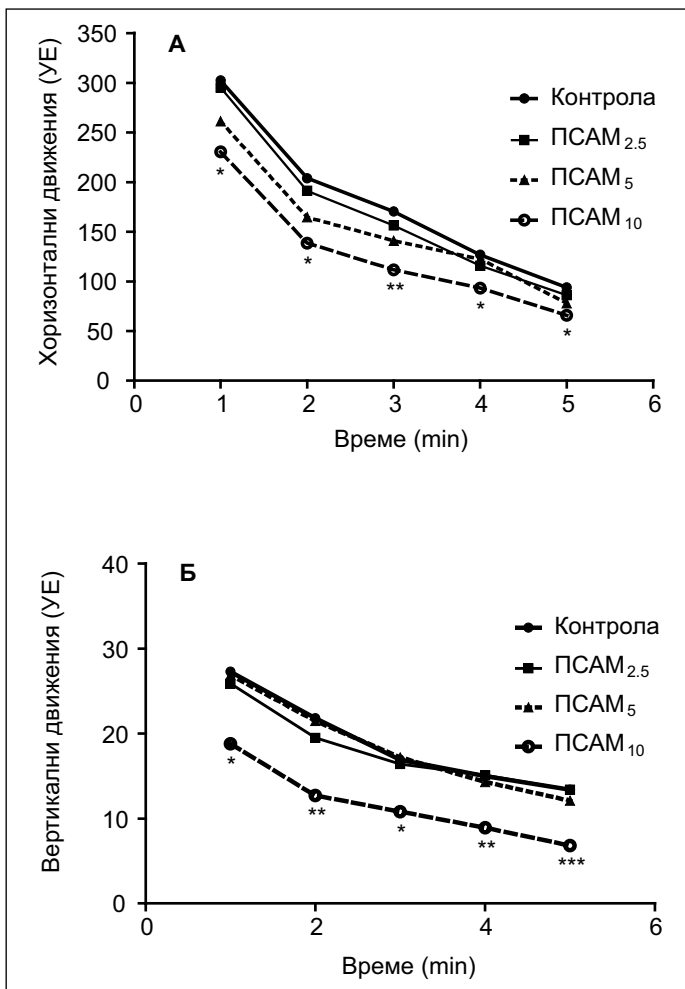
Получените резултати показват, че ПСАМ, въвеждан интрагастрално в доза 10 ml/kg в продължение на 21 и 30 дни, потиска хоризонталната двигателна активност през първите 5 min.



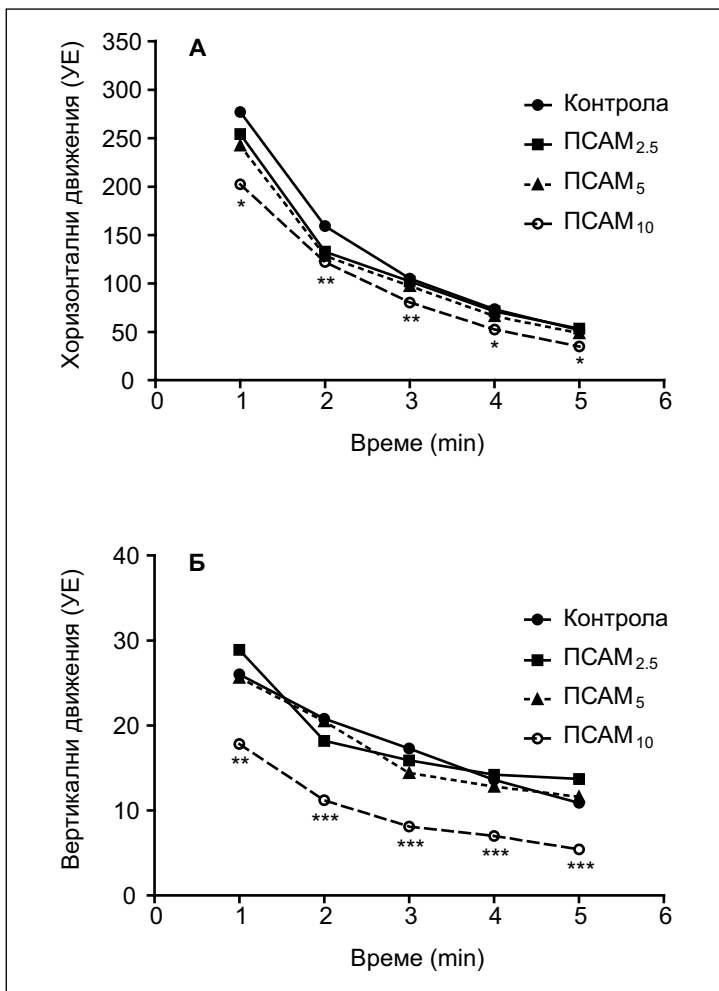
**Фиг. 7.** Ефект на ПСАМ, прилаган перорално на плъхове в продължение на 7 дни в дози 2.5 ml/kg (ПСАМ<sub>2,5</sub>), 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>) и 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>), върху хоризонталните движения (панел А) и вертикалните движения (панел Б), отчитани на всяка минута за период на наблюдение 5 min; UE – условни единици; n = 10



**Фиг. 8.** Ефект на ПСАМ, прилаган перорално на плъхове в продължение на 14 дни в дози 2.5 ml/kg (ПСАМ<sub>2.5</sub>), 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>) и 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>) върху хоризонталните движения (панел А) и вертикалните движения (панел Б), отчитани на всяка минута за период на наблюдение 5 min; УЕ – условни единици; n = 10

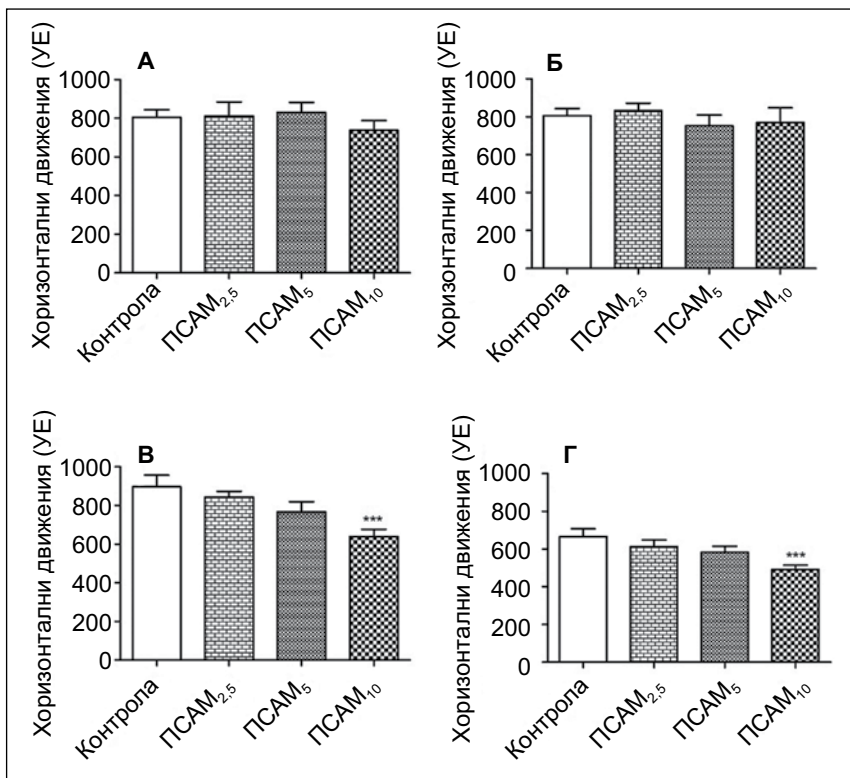


**Фиг. 9.** Ефект на ПСАМ, прилаган перорално на плъхове в продължение на 21 дни в дози 2.5 ml/kg (ПСАМ<sub>2.5</sub>), 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>) и 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>) върху хоризонталните движения (панел А) и вертикалните движения (панел Б), отчитани на всяка минута за период на наблюдение 5 min; УЕ – условни единици; n = 10; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 (или \*\*\*\*p < 0.0001) в сравнение със съответната контролна група



**Фиг. 10.** Ефект на ПСАМ, прилаган перорално на плъхове в продължение на 30 дни в дози 2.5 ml/kg (ПСАМ<sub>2.5</sub>), 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>) и 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>) върху хоризонталните движения (панел А) и вертикалните движения (панел Б), отчитани на всяка минута за период на наблюдение 5 min; UE – условни единици; n = 10; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 (или \*\*\*\*p < 0.0001) в сравнение със съответната контролна група





**Фиг. 11.** Ефект на ПСАМ, прилаган перорално на плъхове в дози 2.5 ml/kg (ПСАМ<sub>2.5</sub>), 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>) и 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>) в продължение на 7 дни (панел А), 14 дни (панел Б), 21 дни (панел В) и 30 дни (панел Г), върху хоризонталните движения за период на наблюдение 5 min; UE – условни единици. Стойностите са средна±SEM; n = 10; \*\*\*p < 0.001 в сравнение със съответната контролна група

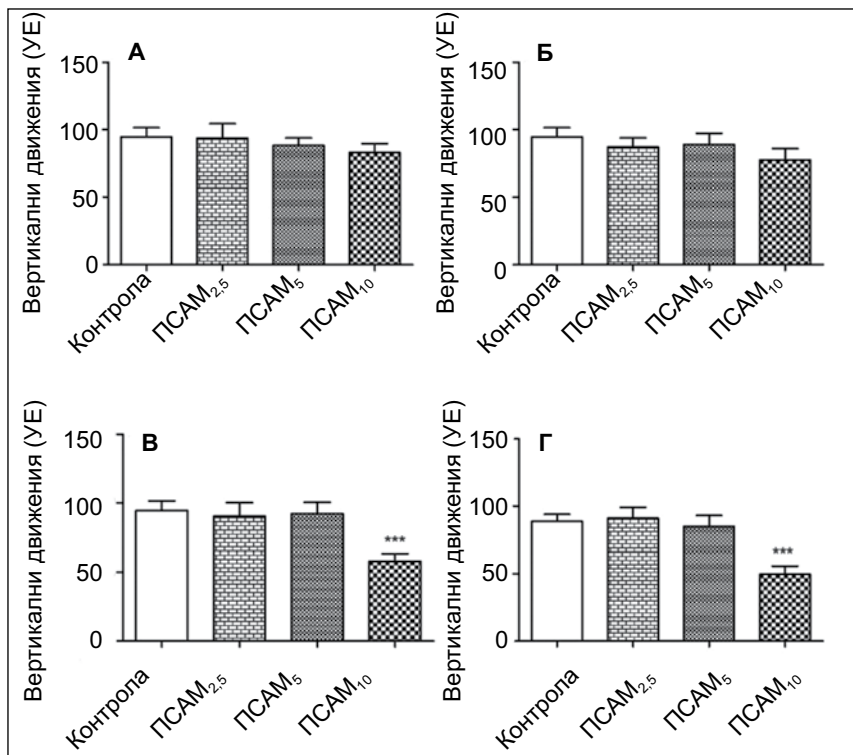
### 3.1.2.2. Ефект на плодov сок от *Aronia melanocarpa* върху вертикалните движения през първите 5 min

Резултатите за броя на вертикалните движения за всяка минута през първите 5 min са представени на Фиг. 7Б, 8Б, 9Б, 10Б.

ПСАМ в дозите 2.5 ml/kg и 5 ml/kg за 7, 14, 21 и 30 дни няма значим ефект върху броя на вертикалните движения за всяка минута през първите 5 min (Фиг. 7Б, 8Б, 9Б, 10Б). ПСАМ в доза 10 ml/kg, прилаган

в продължение на 7 и 14 дни, също не понижава значимо броя на вертикалните движения (Фиг. 7Б, 8Б). Тази доза достоверно намалява вертикалните движения на 21-ви и на 30-ти ден на 1-ва, 2-ра, 3-та, 4-та и 5-та min в сравнение със съответните контроли (Фиг. 9Б, 10Б).

Общият брой на вертикалните движения през началния 5 min период на наблюдение е представен на Фиг. 12. ПСАМ само във високата доза (10 ml/kg) достоверно понижава общия брой на вертикалните движения на 21-ви и 30-ти ден в сравнение със съответните третиранни с физиологичен разтвор контроли (Фиг. 12В, 12Г).



**Фиг. 12.** Ефект на ПСАМ, прилаган перорално на пльхове в дози 2.5 ml/kg (ПСАМ<sub>2,5</sub>), 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>) и 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>) в продължение на 7 дни (панел А), 14 дни (панел Б), 21 дни (панел В) и 30 дни (панел Г), върху вертикалните движения за период на наблюдение 5 min; УЕ – условни единици. Стойностите са средна±SEM; n = 10; \*\*\*p < 0.001 (или \*\*\*p < 0.0001) в сравнение със съответната контролна група

Получените резултати показват, че ПСАМ, въвеждан интрагастрално в продължение на 21 и 30 дни, само в най-високата използвана доза от 10 ml/kg потиска експлораторното поведение на животните.

### ***3.1.2.3. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху хоризонталните движения за 10 min период***

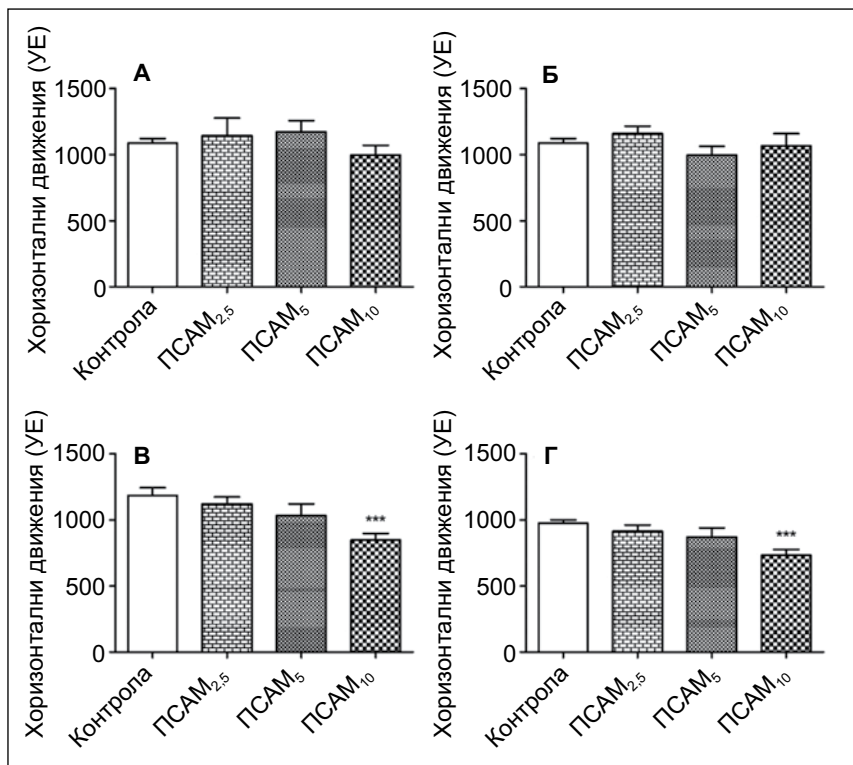
След първия 5 min период броят на хоризонталните движения се регистрира за втория период от 5 min. Резултатите за общия брой на хоризонталните движения за 10 min период са представени на Фиг. 13.

ПСАМ в дози 2.5 ml/kg и 5 ml/kg за всички периоди на третиране (7, 14, 21 и 30 дни) няма значим ефект върху хоризонталната активност до края на 10 min период на наблюдение. ПСАМ в доза 10 ml/kg на 21<sup>-ви</sup> и 30<sup>-ти</sup> ден понижава достоверно броя на хоризонталните движения в сравнение с контролите, третирани с физиологичен разтвор (Фиг. 13).

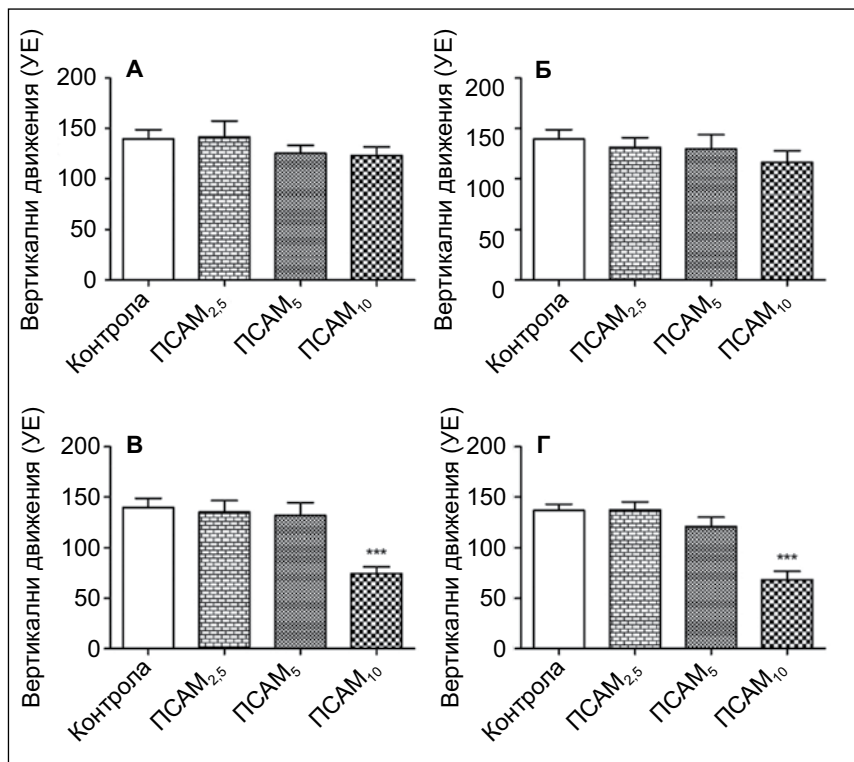
### ***3.1.2.4. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху вертикалните движения за 10 min период***

Вертикалните движения, отчетени за 10 min, са представени на Фиг. 14.

ПСАМ, приложен на плъховете в дози 2.5 ml/kg и 5 ml/kg за всички периоди (7, 14, 21 и 30 дни), не предизвиква значими промени в броя на изправянията. ПСАМ предизвиква промени във вертикалните движения на животните само в доза 10 ml/kg. ПСАМ в тази доза статистически достоверно потиска вертикалните движения на 21<sup>-ви</sup> и 30<sup>-ти</sup> ден (Фиг. 14В, 14Г).



**Фиг. 13.** Ефект на ПСАМ, прилаган перорално на плъхове в дози 2.5 ml/kg (ПСАМ<sub>2.5</sub>), 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>) и 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>) в продължение на 7 дни (панел А), 14 дни (панел Б), 21 дни (панел В) и 30 дни (панел Г), върху хоризонталните движения за период на наблюдение 10 min; UE – условни единици. Стойностите са средна ± SEM; n = 10; \*\*\*p < 0.0001 в сравнение със съответната третирана с физиологичен разтвор контролна група



**Фиг. 14.** Ефект на ПСАМ, прилаган перорално на плъхове в дози 2.5 ml/kg (ПСАМ<sub>2.5</sub>), 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>) и 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>) в продължение на 7 дни (панел А), 14 дни (панел Б), 21 дни (панел В) и 30 дни (панел Г), върху вертикалните движения за период на наблюдение 10 min; VE – условни единици. Стойностите са средна±SEM; n = 10; \*\*\*p < 0.0001 в сравнение със съответната третирана с физиологичен разтвор контролна група

### 3.1.3. Обсъждане

Ефектът на ПСАМ върху двигателната активност при еднократно приложение е определян в тест открито поле, а при субхронично приложение – в апарат Opto Varimex. Това са утвърдени начини за измерване на общата активност и експлораторното поведение при гризачи (Gould et al., 2009). И в двата случая животното е в непозната арена.

Обичайният модел на поведение на плъха е в началото да изследва новата обстановка и впоследствие да привикне към средата (Bolivar et al., 2000; Daenen et al., 2001). Като изследователско (експлораторно) поведение се определя активно изследване (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).

Резултатите показват, че при еднократно приложение ПСАМ в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg не повлиява значимо хоризонталната и вертикалната двигателна активност на плъховете. При субхронично приложение (7, 14, 21 и 30 дни) дозите от 2.5 ml/kg и 5 ml/kg нямат значим ефект върху изследователското поведение и двигателната активност. В най-високата доза (10 ml/kg), прилагана 21 и 30 дни, ПСАМ потиска експлораторната активност, както и хоризонталната, и вертикалната двигателна активност. Тези ефекти на ПСАМ са вероятно резултат от действието на съдържащите се в него биологично активни полифенолни вещества (флавоноиди предимно от субклас антоцианини, процианидини и фенолни киселини). Понижаването на спонтанната двигателна активност – ходене и изправяне – може да е резултат от намалена възбудимост на ЦНС и седация (Ozturk et al., 1996; Perez et al., 1998; Prut & Belzung, 2003). Мозъчната GABA-ергична система е отговорна за седацията (Gottesmann, 2002). Има данни, че флавоноидите притежават афинитет да се свързват с GABA<sub>A</sub> рецепторите (Marder and Paladini, 2002; Wang et al., 2005; Fernandez et al., 2009) и могат да предизвикват седативен, анксиокитичен и противогърчов ефект (Jäger and Saaby, 2011). Седативни ефекти са демонстрирани за флавоноди (Martínez et al., 2009; Vissiennona et al., 2011) и растителни екстракти, съдържащи процианидини, флавоноиди и други полифеноли (Dos Santos et al., 2005; Jiang et al., 2007). Има също данни, че флавоноидите могат да имат анксиолитичен и седативен ефект чрез активация на GABA-ергични места, различни от рецепторите за бензодиазепини (de Carvalho et al., 2011).

Счита се, че анксиолитичният ефект се получава от лиганди, действащи върху GABA<sub>A</sub> рецептори, притежаващи  $\alpha_2$  и/или  $\alpha_3$  субединици (Rudolph and Möhler, 2006), докато седативно-сънотворният е резултат от активация на  $\alpha_1$  субединицата на GABA<sub>A</sub> рецепторите (McKernan et al., 2000). Разликата в ефекта на еднократно и многократно приложение на ПСАМ върху двигателната активност би могла да се обясни с натрупването на флавоноиди и други полифеноли в

мозъка на животните след многократно приложение на сока. Такова натрупване на полифенолните вещества е доказано от Willis et al., 2009. Възможно е наблюдаваният седативен ефект на ПСАМ в настоящия експеримент да се дължи на повлияване на GABA<sub>A</sub> рецептори, притежаващи  $\alpha_1$  субединици, което вероятно настъпва при натрупване на полифенолите в ЦНС при продължителния прием на сока.

Привикването към новата среда се счита за най-елементарната форма на обучение, при което намаляването на изследователската активност се приема за индекс за памет (Thiel et al., 1998; Thiel et al., 1999). Настоящият експеримент показва, че ПСАМ в трите дози за четирите периода на приложение не нарушава хабитуацията на плъховете към новата среда в апарата Opto Varimex. Това показва, че ПСАМ няма неблагоприятно въздействие върху паметта. Тези резултати са в съответствие с резултатите от тестове за памет, проведени със същите дози и продължителности на третиране, които показват, че ПСАМ подобрява паметта. Освен това има множество доказателства за това, че флавоноидите в плодовете и плодовите сокове (най-вече флаваноли, флаванони и антоцианини) имат способността да подобряват паметта (Spencer, 2010; Rendeiro et al., 2012a; Rendeiro et al., 2012b).

### **3.2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху анксиогенезата/анксиолизата**

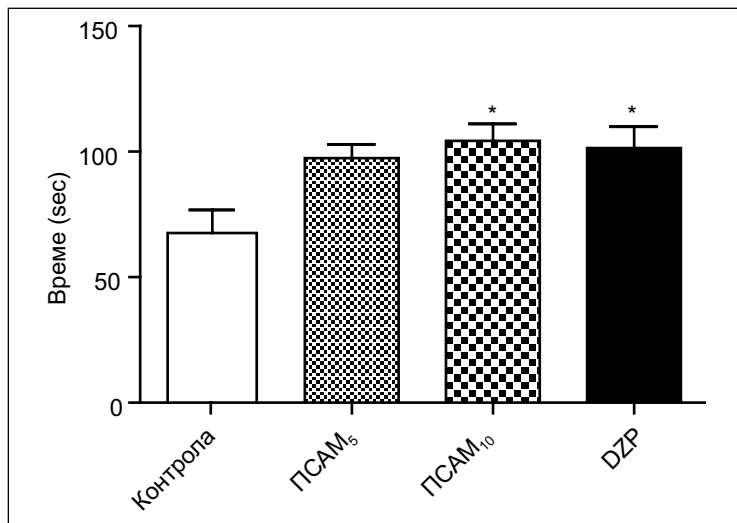
#### **3.2.1. Ефект на еднократно приложение на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху анксиогенезата/анксиолизата**

Експериментът е проведен в тест за социално взаимодействие върху 96 мъжки плъха порода Wistar (200-250 g), разпределени в 4 групи по 24 броя, от които във всяка група са формирани по 12 двойки животни. Третирането на плъховете е направено интрагастрално 60 min преди провеждането на теста. Групите са третирани както следва: Контрола – дестилирана вода (10 ml/kg), ПСАМ<sub>5</sub> – сок в доза 5 ml/kg, разреден с дестилирана вода до обем 10 ml/kg, ПСАМ<sub>10</sub> – сок в доза 10 ml/kg, DZP – diazepam в доза 1 mg/kg под формата на 0.01% разтвор с общ обем 10 ml/kg.

Резултатите показват, че ПСАМ доза-зависимо удължава времето за социален контакт между партньорите от  $72.2 \pm 9.8$  sec при контрол-

ната група до  $97.4 \pm 5.6$  sec за групата ПСАМ<sub>5</sub> и  $104.3 \pm 6.7$  sec за групата ПСАМ<sub>10</sub> (Фиг. 15).

Ефектът на двете дози ПСАМ не се различава значимо от ефекта на diazepam ( $101.4 \pm 8.5$  sec за групата DZP) (Фиг. 38).



**Фиг. 15.** Време за социално взаимодействие при плъхове, третирани с дестилирана вода (Контрола), ПСАМ 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>), ПСАМ 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>) и diazepam 1 mg/kg (DZP). Стойностите са средна  $\pm$  SEM;  $n = 12$ ; \* $p < 0.05$  спрямо контролата

### **3.2.2. Ефект на субхронично приложение на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху анксиогенезата/анксиолизата**

Опитът е проведен в тест повдигнат кръстосан лабиринт върху 160 мъжки плъха (16 групи). Животните са третирани перорално с оро-гастрална сонда в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни. Четири независими групи по 10 плъха са използвани за всеки период на третиране. Групите са третирани както следва: Контрола – физиологичен разтвор (10 ml/kg); ПСАМ<sub>2.5</sub> – ПСАМ в доза 2.5 ml/kg, разредена с дестилирана вода до 10 ml/kg; ПСАМ<sub>5</sub> – ПСАМ в доза 5 ml/kg, разредена с дестилирана вода до 10 ml/kg и ПСАМ<sub>10</sub> – ПСАМ в доза 10 ml/kg. Последното приложение на ПСАМ е 60 min преди поведенческия тест.

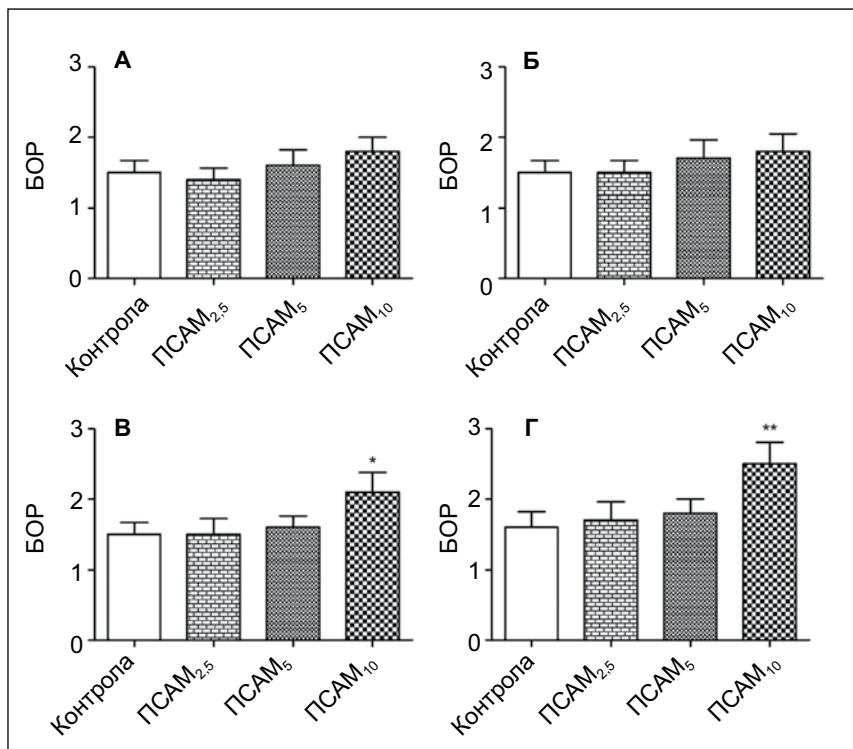


Регистрираните по време на тестването (5 min) резултати са представени на Фиг. 16, Фиг. 17 и Фиг. 18.

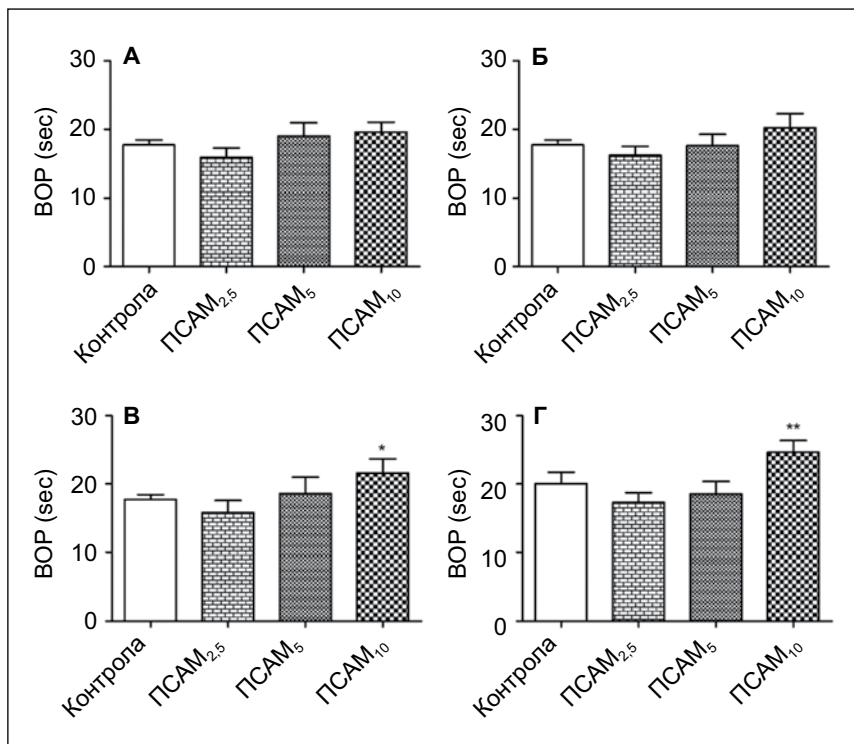
ПСАМ, въвеждан трите дози (2.5 ml/kg, 5 ml/kg и 10 ml/kg) в продължение на 7 дни и 14 дни, е без значим ефект върху броя на влизанията в откритите рамена (Фиг. 16А, 16Б), времето на престой в откритите рамена (Фиг. 17А, 17Б), броя на влизанията в закритите рамена, времето на престой в закритите рамена, общия брой на влизанията в откритите и закритите рамена, отношението броя на влизанията в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена (Фиг. 18А, 18Б) и отношението на времето в откритите рамена към общото време.

ПСАМ, въвеждан в продължение на 21 дни в дози от 2.5 ml/kg и 5 ml/kg, е без значим ефект върху броя на влизанията в откритите рамена (Фиг. 16В), времето на престой в откритите рамена (Фиг. 17В), броя на влизанията в закритите рамена, времето на престой в закритите рамена, общия брой на влизанията в откритите и закритите рамена, отношението броя на влизанията в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена (Фиг. 18В) и отношението на времето в откритите рамена към общото в сравнение с контролите. Въвеждан обаче в доза 10 ml/kg в продължение на 21 дни, ПСАМ достоверно повишава броя на влизанията в откритите рамена (Фиг. 16В), удължава времето на престой в откритите рамена (Фиг. 17В), повишава отношението на броя на влизанията в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена (Фиг. 18В), без да повлиява достоверно влизанията в закритите рамена и общия брой на влизанията в откритите и закритите рамена в сравнение с контролите.

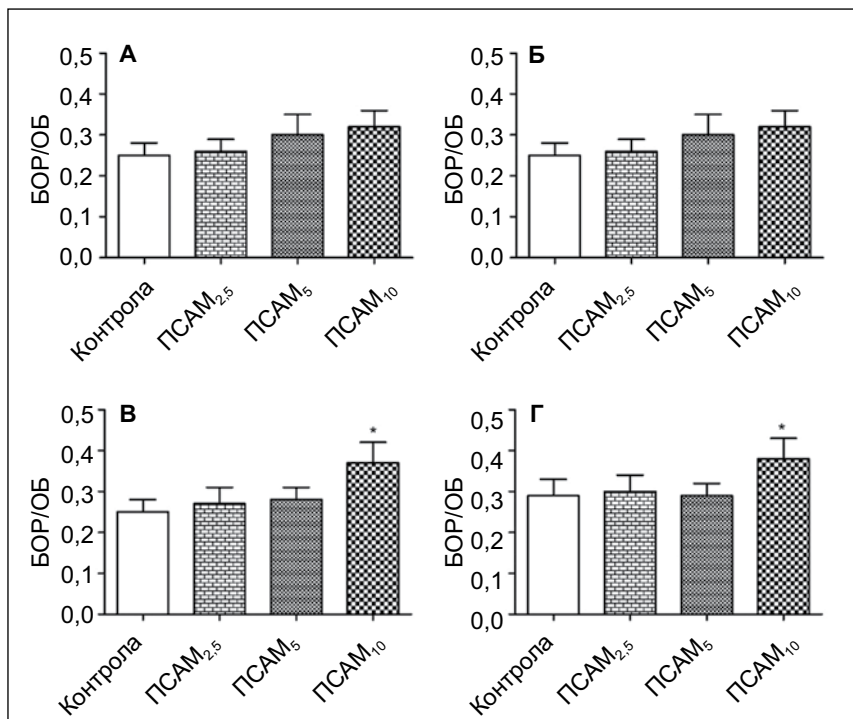
На 30<sup>-ия</sup> ден дозите от 2.5 ml/kg и 5 ml/kg са без значим ефект върху броя на влизанията в откритите рамена (Фиг. 16Г), времето на престой в откритите рамена (Фиг. 17Г), броя на влизанията в закритите рамена, времето на престой в закритите рамена, общия брой на влизанията в откритите и закритите рамена, отношението на броя на влизанията в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена (Фиг. 18Г). Дозата 10 ml/kg на 30<sup>-ия</sup> ден достоверно повишава броя на влизанията в откритите рамена (Фиг. 16Г), удължава времето на престой в откритите рамена (Фиг. 17Г), отношението на броя на влизанията в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена (Фиг. 18Г), скъсява времето за престой в закритите рамена, без да повлиява достоверно броя на влизанията в закритите рамена и общия брой на влизанията в откритите и закритите рамена в сравнение с контролите.



**Фиг. 16.** Брой влизания в откритите рамена (БОР) в тест повдигнат кръстосан лабиринт при плъхове, третирани с ПСАМ в дози 2.5 ml/kg (ПСАМ<sub>2,5</sub>), 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>) и 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>) в продължение на 7 дни (панел А), 14 дни (панел Б), 21 дни (панел В) и 30 дни (панел Г). Стойностите са средна ± SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  в сравнение със съответната третирана с физиологичен разтвор контролна група



**Фиг. 17.** Време в откритите рамена (BOP) в тест повдигнат кръстосан лабиринт при плъхове, третиран с ПСАМ в дози 2.5 ml/kg (ПСАМ<sub>2.5</sub>), 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>) и 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>) в продължение на 7 дни (панел А), 14 дни (панел Б), 21 дни (панел В) и 30 дни (панел Г). Стойностите са средна±SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  в сравнение със съответната третирана с физиологичен разтвор контролна група



**Фиг. 18.** Съотношение на броя влизания в откритите рамена към общия брой влизания в рамената (БОР/ОБ) в тест повдигнат кръстосан лабиринт при плъхове, третирани с ПСАМ в дози 2.5 ml/kg (ПСАМ<sub>2,5</sub>), 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>) и 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>) в продължение на 7 дни (панел А), 14 дни (панел Б), 21 дни (панел В) и 30 дни (панел Г). Стойностите са средна±SEM; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 в сравнение със съответната третирана с физиологичен разтвор контролна група

### 3.2.3. Обсъждане

Ефектът на еднократно приложение на ПСАМ върху анксиогенезата/анксиолизата е изследван в тест за социално взаимодействие. Тестът се провежда в условия на ярка светлина, непозната арена и непознат тест партньор, за да се създаде високо ниво на тревожност (Sandra and Hyde, 1978). ПСАМ, приложен еднократно в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg, има анксиолитично-подобен ефект в теста за социално взаимодействие при плъхове, който е сравним с този на еталонното

лекарство diazepam (1 mg/kg). ПСАМ при този начин на приложение не потиска двигателната активност, т.е. не проявява седативен ефект (Ozturk et al 1996; Prez et al., 1998). Това е демонстрирано върху други групи плъхове в тест открито поле. ПСАМ в тези дози не повлиява и работната памет, което е установено на други групи плъхове в теста за разпознаване на обект. Тези резултати за анксиолитично-подобно действие на ПСАМ при еднократно приложение, което не е съпроводено със седация и нарушаване на работната памет, показват потенциалното му предимство пред класическите анксиолитици от типа на бензодиазепините (БЗ).

Ефектът на ПСАМ върху ангиогенезата/анксиолизата при субхронично приложение е изследван в тест повдигнат кръстосан лабиринт. Повдигнатият кръстосан лабиринт е най-често използваният тест за изследване на тревожност. Повечето анксиолитици повишават експлорацията в отворените рамена, регистрирано с увеличаване на влизането в отворените времена и времето, прекарано там, в дози, които не повлияват двигателната активност, измерена с общия брой влизания в рамената (Lister, 1987). Резултатите от проучването показват, че в този тест ПСАМ предизвиква анксиолитичен ефект, който се манифестира с повишено изследване на отворените рамена (повишен брой влизания в отворените рамена и прекарано в отворените рамена време, повишено съотношение на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания в рамената). Този ефект на ПСАМ се регистрира едва след 21- и 30-дневно приложение и е статистически значим при най-високата доза (10 ml/kg). Този резултат е в съответствие с наблюдението на Willis et al. (2009), че флавоноидите и другите полифеноли се натрупват в мозъка след дълготрайно приложение.

Анксиолитично-подобните ефекти на ПСАМ се дължат вероятно 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 (Marder et al., 1995; Salgueiro et al., 1997; Grundmann et al., 2008; Kumar et al., 2008; Fernandez et al., 2009; Grundmann et al., 2009), включително антоцианините (Barros et al., 2006; Kumar et al., 2008), имат анксиолитично действие при животни. Има доказателства, че кверцетинът и хлорогеновата киселина, които са други съставки на ПСАМ, притежават анксиолитично-подобно действие (Bouayed et al., 2007; Aguirre-Hernández et al., 2010). Семейство флавоноидни съединения са показали бензодиазепино-подобна фар-

макологична активност в резултат на свързване GABA<sub>A</sub> рецепторите (Marder and Paladini, 2002; Wang et al., 2005; Rudolph and Möhler, 2006; Grundmann et al., 2008; Wang et al., 2008; Fernandez et al., 2009). Потенциалното предимство на тези природни съединения пред класическите БЗ е това, че те рядко дават нежелани ефекти (Taras et al., 2008).

Счита се, че анксиолитичният ефект на лигандите на БЗ рецептори се дължи на действието им върху GABA<sub>A</sub> рецептори, притежаващи  $\alpha_2$  и/или  $\alpha_3$  субединици (Rudolph and Möhler, 2006), докато седативно-сънотворният и вероятно някои други техни ефекти (двигателната дискоординация и др.) са резултат от активация на  $\alpha_1$  субединицата (McKernan et al., 2000).

Флавоноидите са мощни анксиолитици при гризачи, без да предизвикват седативен и миорелаксиращ ефект (Marder and Paladini, 2002). Има предложени две възможни обяснения за механизмите, обуславящи разделянето на анксиолитичния ефект на флавоноидите от седацията, миорелаксацията, паметовото увреждане и моторна некоординираност, които са нежелани ефекти на БЗ. Първата концепция приема, че флавоноидите могат да действат като частични агонисти на БЗ рецептор, като проявяват анксиолитичната активност с ограничени нежелани реакции (Wang et al., 2005) за разлика от класическите БЗ, които са пълни агонисти на GABA<sub>A</sub> рецепторите и често дават нежелани ефекти. След откритието, че поведенческите ефекти на различните лиганди на БЗ рецептори са свързани с повлияване на различни субтипове на GABA<sub>A</sub> рецептора (Rudolph and Möhler, 2006), е предложена втората концепция. Според нея лиганди, действащи селективно върху различни субтипове на GABA<sub>A</sub> рецептора, могат да дават желани ефекти при същевременно редуциране на нежеланите ефекти. Според тази втора концепция (Wang et al., 2008) флавоноидите упражняват избирателни анксиолитично-подобни ефекти чрез действие върху  $\alpha_2$ - и  $\alpha_3$ -съдържащи рецепторни подтипове. Следователно  $\alpha_2$ - и  $\alpha_3$ -съдържащите GABA<sub>A</sub> рецептори са полезни прицелни места за действие на природните анксиолитично действащи флавоноиди – обещаваща алтернатива на класическите БЗ.

### 3.3. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху паметта

#### 3.3.1. Ефект на еднократно приложение на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху паметта

Експериментът е проведен в тест за разпознаване на обект върху 36 мъжки плъха, разпределени в три групи по 12 броя. Третирането на плъховете е направено интрагастрално 60 min преди експеримента, състоящ се от две сесии с интервал между тях 1 h. Групите са третирани както следва: Контрола – дестилирана вода (10 ml/kg), ПСАМ<sub>5</sub> – сок в доза 5 ml/kg, разреден с дестилирана вода до обем 10 ml/kg и ПСАМ<sub>10</sub> – сок в доза 10 ml/kg.

В Таблица 8 са представени стойностите на определяните показатели: А (времето за изследване на обекта в първата сесия Т1), В+А' (сумата от времето за изследване на новия обект В и на познатия обект А' по време на втората сесия Т2), В – А' (разликата на времето за изследване на новия обект В и на познатия обект А' по време на Т2), В – А'/В + А' (съотношението на разликата В – А' към общото време на изследване на двата обекта по време на Т2) и индексът за разпознаване (ИР): В x 100/В + А', който представлява времето за изследване на новия обект В по време на Т2 като процент от общото време за изследване на двата обекта.

**Таблица 8.** Ефект на ПСАМ 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>) и 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>) в тест за разпознаване на обект при плъхове. Резултатите са представени като средна стойност ±SEM; n = 12

Показател Група	А (sec)	В – А' (sec)	В + А' (sec)	В – А'/ В + А'	ИР (В x 100/ В + А') (%)
Контрола	8.4±1.8	5.2±2.1	16.5±3.1	0.32±0.16	65.15±8.6
ПСАМ <sub>5</sub>	9.2±1.5	5.6±1.9	16.1±3.3	0.34±0.11	67.35±6.8
ПСАМ <sub>10</sub>	8.2±1.5	5.3±2.1	14.4±2.6	0.37±0.10	62.92±5.3

Всички определяни показатели А, В + А', В – А', В – А'/В + А' и ИР (В x 100/В + А') не се различават значимо помежду си в трите групи. ИР за всички групи е над 50%, което показва, че животните си спомнят познатия обект.

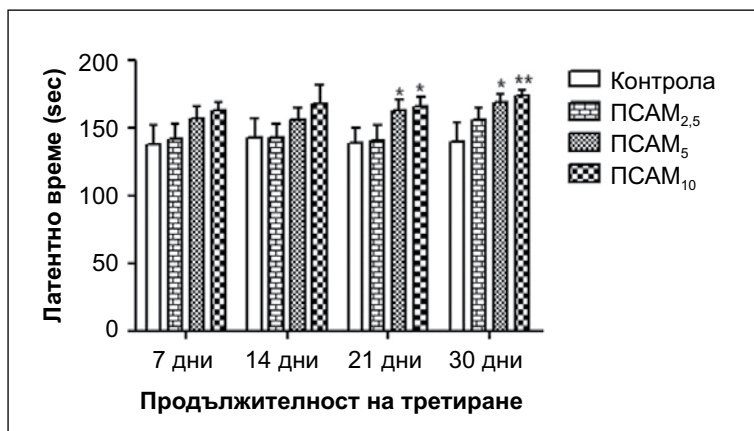
Получените резултати показват, че приложен като еднократна доза, ПСАМ не повлиява неблагоприятно работната памет при плъховете.

### 3.3.2. Ефект на субхронично приложение на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху паметта

#### 3.3.2.1. Тест за еднопосочно пасивно избягване

Тестът за еднопосочно пасивно избягване (*step through*) е проведен върху 224 плъха, разделени в 16 групи по 14 животни. Различни групи плъхове са третирани перорално чрез оро-гастрална сонда в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни. Сокът е прилаган в дози 2.5 ml/kg, 5 ml/kg и 10 ml/kg. Контролната група е третирана с физиологичен разтвор. За всеки период на третиране има по 4 групи: Контрола, ПСАМ<sub>2,5</sub>, ПСАМ<sub>5</sub>, ПСАМ<sub>10</sub>. Последното третиране на животните е 60 min преди обучителната сесия.

Прилаган в продължение на 7 и 14 дни, ПСАМ в изследваните дози предизвиква тенденция за удължаване на латентното време в тестовете за памет на 3<sup>-ти</sup> (Фиг. 19) и 24<sup>-ти</sup> час (Фиг. 20), но този ефект не е статистически значим.



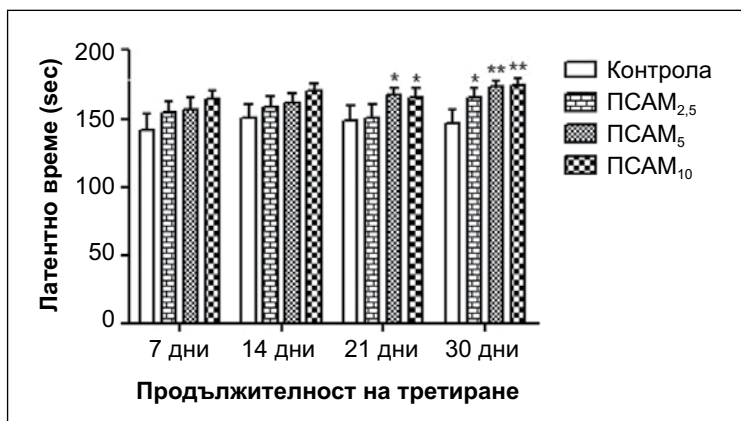
**Фиг. 19.** Ефект на ПСАМ върху латентното време в теста за памет на 3<sup>-ти</sup> час при метод на обучение за пасивно избягване – *step through*. Стойностите са средна±SEM.; n = 14; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 спрямо съответната контрола



След 21-дневно приложение в доза от 2.5 ml/kg ПСАМ няма значим ефект върху латентното време, докато в дози от 5 ml/kg и 10 ml/kg ПСАМ значимо удължава латентното време в тестовете за памет на 3-ти и 24-ти час (Фиг. 19, Фиг. 20).

Прилаган в продължение на 30 дни в доза 2.5 ml/kg, ПСАМ значимо удължава латентното време в теста за памет само на 24-ти час (Фиг. 20). В дози от 5 ml/kg и 10 ml/kg за този период на третиране ПСАМ значимо удължава латентното време в тестовете за памет на 3-ти и 24-ти час (Фиг. 19, Фиг. 20).

Прилагани в продължение на 7, 14 и 21 дни, ПСАМ във всички изследвани дози предизвиква тенденция за повишаване на критерия за обученост, но ефектът не е статистически значим (Таблица 9). Най-изразен е ефектът на ПСАМ върху критерия за обученост при приложение на сока в продължение на 30 дни, когато дозата от 5 ml/kg го повишава значимо в теста за памет на 24-ти час, а дозата от 10 ml/kg го повишава значимо в тестовете както на 3-ти, така и на 24-ти час (Таблица 9).



**Фиг. 20.** Ефект на ПСАМ върху латентното време в теста за памет на 24-ти час при метод на обучение за пасивно избягване – *step through*. Стойностите са средна ± SEM; n = 14; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 спрямо съответната контрола

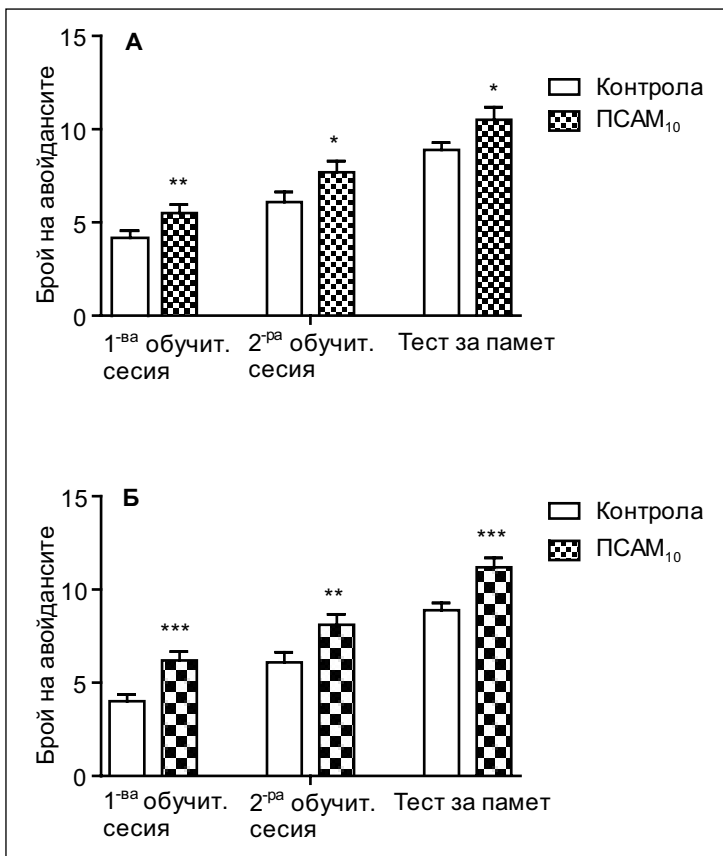
**Таблица 9.** Критерий за обученост в тестовете за памет на 3<sup>-ти</sup> и 24<sup>-ти</sup> час при плъхове, третирани в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни с ПСАМ в дози 2.5 ml/kg (ПСАМ<sub>2.5</sub>), 5 ml/kg (ПСАМ<sub>5</sub>) и 10 ml/kg (ПСАМ<sub>10</sub>). Резултатите са представени като средна стойност±SEM; n = 10; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 спрямо съответната контрола

Критерий за обученост (% от плъховете)								
Група \ Дни	7		14		21		30	
	3-ти час	24-ти час	3-ти час	24-ти час	3-ти час	24-ти час	3-ти час	24-ти час
Контрола	50	50	57	57	43	50	50	50
ПСАМ <sub>2.5</sub>	50	50	50	57	50	57	57	64
ПСАМ <sub>5</sub>	50	57	64	64	57	64	79	86*
ПСАМ <sub>10</sub>	57	64	71	71	64	71	86*	93*

### 3.3.2.2. Тест за двупосочно активно избягване

Тестът за двупосочно активно избягване (*shuttle box*) е проведен върху 40 мъжки плъха, третирани перорално чрез oro-гастрална сонда с физиологичен разтвор (10 ml/kg) или ПСАМ (10 ml/kg) в продължение на 21 и 30 дни. Така са формирани 4 групи по 10 плъха, при което за всеки период на третиране има по две групи: контрола и ПСАМ<sub>10</sub>. Дозата и периодът на третиране са избрани на базата на резултатите от другите тестове за поведенчески ефекти на ПСАМ, в които сокът е прилаган в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg за 7, 14, 21 и 30 дни и които показват най-изразени ефекти на сока в доза 10 ml/kg при продължителност на приложение 21 и 30 дни. Обучителните сесии са на 21<sup>-ви</sup> и 22<sup>-ри</sup> ден и съответно на 30<sup>-ти</sup> и 31<sup>-ви</sup> ден за двата периода на третиране. Третиране е правено 60 min преди обучителните сесии и не е правено преди теста за памет, който е 24 часа след втората обучителна сесия. В обучителните сесии и в теста за памет е регистриран броят на авойдансите.

След период на третиране от 21 и 30 дни ПСАМ значимо увеличава броя на авойдансите в първата и втората обучителна сесия и в теста за памет в сравнение със съответните третирани с физиологичен разтвор контролни групи (Фиг. 21).



**Фиг. 21.** Брой на авойдансите по време на обучителните сесии (1<sup>ва</sup> и 2<sup>ра</sup>) и по време на теста за памет в задачата за активно двупосочно избягване (shuttle box) след третиране на плъхове с физиологичен разтвор (Контрола) и с PCAM 10 ml/kg (PCAM<sub>10</sub>) в продължение на 21 дни (панел А) и 30 дни (панел Б). Стойностите са средна±SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  в сравнение със съответната контрола

### 3.3.3. Обсъждане

Експерименталните модели върху гризачи са широко използвани за проучване на човешката памет и на потенциалните ефекти на флавоноидите върху човешките познавателни функции (Rendeiro et al., 2009).

Тестът за разпознаване на обект показва, че еднократното приложение на ПСАМ в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg не повлиява значимо работната памет. В същите дози ПСАМ не предизвиква седация (не понижава двигателната активност на плъховете) и проявява анксиолитичен ефект в теста за социално взаимодействие. Фактът, че ПСАМ не предизвиква седация и не нарушава краткосрочната памет, представлява потенциално предимство на ПСАМ пред класическите анксиолитици от бензодиазепинов тип.

Задачата за пасивно избягване представлява мотивирано от страх избягване, при което плъхът се обучава да се въздържа от преминаване през вратата към видимо по-безопасното тъмно помещение, където обаче преди това е получил наказание. Латентното време на въздържание от преминаването към тъмното помещение служи като индекс на способността за избягване и позволява да бъде оценявана паметта. Латентното време за влизане в тъмното помещение се повлиява от двигателната активност на животните и от тяхната способност да се обучават. Ефектът на ПСАМ върху паметта в този тест е най-изразен в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg, прилагани в продължение на 21 и 30 дни. В доза 10 ml/kg, прилагана на плъховете в продължение на 30 дни, ПСАМ значимо понижава двигателната активност в апарата Opto Varimex. В теста за еднопосочно пасивно избягване обаче има статистически значим ефект върху латентното време от по-ниската доза (5 ml/kg) и за по-малка продължителност на третиране (21 дни). Това показва, че удължаването на латентното време под влияние на ПСАМ в теста за пасивно избягване не може да се отдаде единствено на намаляване на двигателната активност, а показва подобряване на способността за запаметяване.

Допълнителна информация в подкрепа на способността на ПСАМ да подобрява обучението и паметта дават резултатите от задачата за двупосочно активно избягване. В този експеримент ПСАМ в доза 10 ml/kg, прилаган в продължение на 21 и 30 дни, значимо подобрява обучението и паметта, като повишава броя на авойдансите.

Проведените експерименти за изследване на ефектите на ПСАМ върху паметта при плъховете дават основание да се направи изводът, че ПСАМ, прилаган в продължение на 21 и 30 дни, подобрява паметта и обучението. Тези ефекти са по-изразени при приложение на сока в продължение на 30 дни.

Ефектите на ПСАМ върху обучението и паметта се дължат вероятно на полифенолните му съставки. Доказаните в проведените тестове

ве ефекти на ПСАМ върху обучението и паметта при продължително приложение на ПСАМ (21 и 30 дни) са в съответствие с данни на други изследователи, показващи, че флавоноидите и други полифеноли от ягодоплодни се натрупват в мозъка след продължителна консумация (Willis et al., 2009).

Има проучвания, демонстриращи, че биологичните ефекти на полифенолите върху мозъка се дължат на техните антиоксидантни действия чрез способността им да залавят реактивни кислородни видове (РКВ), да индуцират антиоксидантни ензими и да намаляват оксидативното увреждане на клетъчните компоненти (Papandreou et al., 2009; Tota et al., 2010; Varadinova et al., 2012). Както показват проучванията на нашия колектив (Valcheva-Kuzmanova et al., 2007; Valcheva-Kuzmanova et al., 2012) и на други изследователи (Wu et al., 2004; Jakobek et al., 2011), ПСАМ притежава много висока антиоксидантна активност, която може би допринася за полезните му ефекти върху обучението и паметта.

Класическата антиоксидантна активност вероятно не обуславя всички биологични действия на флавоноидите *in vivo*, особено в мозъка, където те се откриват в много ниски концентрации (Spencer, 2008). Появяват се все повече доказателства за различни потенциални механизми на действие на флавоноидите и техните метаболити в биологичната защита на клетките срещу оксидативен стрес, които могат да са независими от конвенционалните антиоксидантни действия (Spencer, 2008). Флавоноидите предизвикват благоприятни ефекти върху съдовата система, водещи до промени в мозъчния кръвоток, които могат да причинят ангиогенеза, неврогенеза и промени в морфологията на невроните (Vauzour et al., 2008). Perez-Vizcaino et al. (2002) предполагат, че подобряването на мозъчния кръвоток от кверцетин може да се дължи на способността му да преминава през съдовия ендотел, където е вероятно да упражнява ендотел-независим вазодилатативен ефект. Съдоразширяващият ефект може да доведе до засилен приток на кръв в мозъка и подобряване на паметовите функции (Perez-Vizcaino et al., 2002). Ефектът върху съдовете е потенциално значим, тъй като е известно, че подобрената мозъчно-съдова функция улеснява неврогенезата при възрастни (Spencer et al., 2003; Gage 2000).

Опити *in vitro* показват, че флавоноидите и техните физиологични метаболити са способни да активират сигнални пътища, критични за контролиране на синаптичната пластичност (Williams et al., 2004) при ниски наномоларни концентрации, подобни на тези, които се получават

в мозъка. Тези сигнални пътища са извънклетъчната сигнал-регулирана киназа (extracellular signal-regulated kinase, ERK) и протеин киназа B/Akt (Schroeter et al., 2007). Известно е, че тези пътища са от решаващо значение за контролиране на морфологичните механизми, стоящи зад паметта в хипокампа и кората на мозъка. Флавоноидите имат потенциал за подобряване на паметта и обучението чрез активирани на кинази в тези пътища. Един от начините, по които те действат, е чрез регулиране на протеини като цАМФ-отговор елемент-свързващ протеин (cyclicAMP-response element-binding protein, CREB), който участва в експресията на важни гени, свързани с паметта. Например CREB е от решаващо значение за производството на невротрофини като получаваният в мозъка невротрофичен фактор (brain-derived neurotrophic factor, BDNF). Тези невротрофини са необходими по време на придобиване и консолидация на паметта (Spencer, 2010). Изследването на Rendeiro et al. (2012b) показва, че консумацията на богати на флавоноиди боровинки оказва положително въздействие върху пространствената памет при млади здрави животни, и това въздействие е свързано с активирането на ERK-CREB-BDNF път в хипокампа.

Централната холинергична система е от съществено значение за регулиране на когнитивните функции. Има данни, че полифенолите са в състояние да инхибират активността на ацетилхолинестеразата (Parandreu et al., 2009; Tota et al., 2010) и да възстановяват съдържанието на ацетилхолин в мозъка на плъхове с увредена памет (Xu et al., 2009). Има неотдавнашно изследване (Girones-Vilaplana et al., 2012) на ефекта на концентрат от арония, прибавен към лимонов сок (5% тегло/обем), върху активността на ацетилхолинестеразата и бутирилхолинестеразата. Както арониевият сок, така и лимоният сок инхибират тези ензими, а сместа има още по-висока активност.

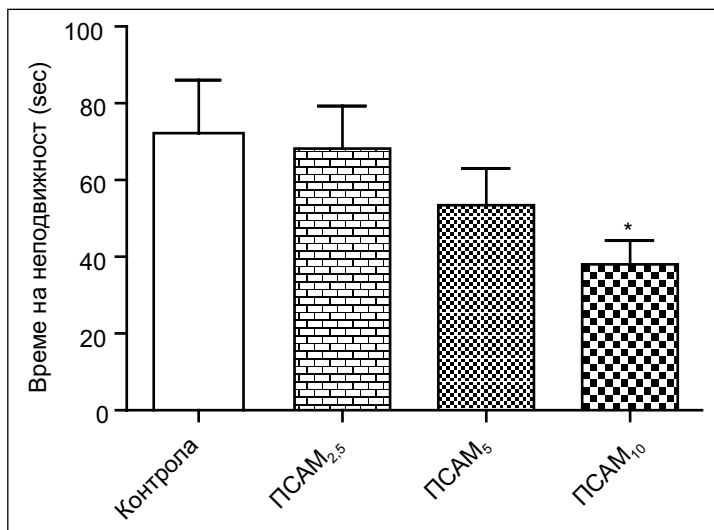
От прегледа на литературата е ясно, че растителните полифеноли, които са компоненти на плодове от *Aronia melanocarpa*, могат да подобряват паметта чрез няколко механизма: антиоксидантна активност, съдови ефекти, активиране на сигналните пътища и инхибиране на ацетилхолинестеразата. Вероятно тези механизми участват в подобряването на паметта от ПСАМ при плъхове.

### **3.4. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху депресивната симптоматика**

Експериментът е проведен в тест за принудително плуване (forced swim test, FST) върху 48 мъжки плъха порода Wistar (200-250 g), раз-

делени в 4 групи по 12 плъха. Третирането на плъховете е направено интрагастрално чрез мека еластична сонда в продължение на 30 дни. Групите са третирани както следва: Контрола – дестилирана вода (10 ml/kg), ПСАМ<sub>2,5</sub> – сок в доза 2.5 ml/kg, разреден с дестилирана вода до обем 10 ml/kg, ПСАМ<sub>5</sub> – сок в доза 5 ml/kg, разреден с дестилирана вода до обем 10 ml/kg, ПСАМ<sub>10</sub> – сок в доза 10 ml/kg. Тестът за принудително плуване е проведен в две сесии. Първата сесия е на 30-ти ден, а втората – на 31-ви ден. В дните на тестването плъховете са получавали ПСАМ 60 min преди провеждането на теста. Записвани са резултатите за времето на неподвижност във втората сесия и са представени на Фиг. 22.

Прилаган в продължение на 30 дни, ПСАМ предизвиква скъсяване на времето на неподвижност с 13% в доза 2.5 ml/kg, с 30% в доза 5 ml/kg и с 51% доза 10 ml/kg (Фиг. 22). Тези резултати показват, че ПСАМ проявява доза-зависим ефект и най-силно понижава депресивната симптоматика при приложение в доза 10 ml/kg.



**Фиг. 22.** Ефект на ПСАМ върху времето на неподвижност в теста за принудително плуване при плъхове, третирани с ПСАМ в дози 2.5 ml/kg (ПСАМ2.5), 5 ml/kg (ПСАМ5) и 10 ml/kg (ПСАМ10) в продължение на 30 дни. Стойностите са средна±SEM; n = 12; \*p < 0.05 спрямо контролата

### 3.4.2. Обсъждане

Депресията е многообразно емоционално разстройство със симптоми не само на поведенческо, но и на физиологично ниво. Серотонинергични и норадренергични дисфункции отдавна се свързват с депресията. Известно е, че серотонинергичната система модулира настроението, емоциите, апетита и познавателните функции и по този начин участва в контрола на множество поведенчески и физиологични функции (Schloss and Williams, 1998). Установено е, че норадренергичната система модулира вниманието, паметта и процеса на възбуда и е свързана с различни поведенчески и познавателни функции (Berridge and Waterhouse, 2003). Моноаминергичната хипотеза за депресията предполага, че има намаляване в нивата на серотонин и норадреналин в централната нервна система (Delgado, 2000). Настоящите ефективни терапии на депресията повишават в мозъка серотонинергичната и/или норадренергичната невротрансмисия (Leonard, 2001).

Съвременни данни показват, че оксидативният стрес може да играе важна роля в патогенетичните механизми, които стоят в основата на големите психични разстройства, включително депресията. Доказано е, че реактивните кислородни видове модулират нивата и дейността на норадреналин, серотонин, допамин и глутамат – основните невротрансмитери, които участват в невробиологията на депресията (Scarpagnini et al., 2012). Тежка депресия се наблюдава при понижени концентрации на няколко ендогенни съединения като витамин Е, цинк и коензим Q10 или ензими като глутатион пероксидаза и при влошаване на общия антиоксидантен статус. Тези наблюдения въвеждат нови потенциални цели за разработване на терапевтични интервенции, базирани на антиоксидантни съединения.

Експеримент на Zafir et al. (2009) при гризачи показва, че утвърдените в клиничната практика антидепресанти флуоксетин (селективен инхибитор на серотониновото обратно захващане), имипрамин (трицикличен антидепресант) и венлафаксин (инхибитор на обратното захващане на серотонин/норепинефрин) повишават ендогенната ензимна антиоксидантна защита и понижават липидната пероксидация при стрес-индуцирана депресия. Възможно е увеличаването на антиоксидантната защита *in vivo* да служи като точка за конвергенция на няколко групи антидепресанти и като важен механизъм в основата на невропротективните фармакологични ефекти на тези лекарства, наблюдавани клинично. Следователно фармакологична модулация на



предизвиканото от оксидативен стрес увреждане е важен прицел за по-нататъшни изследвания.

Природните полифеноли, открити в множество растителни продукти, са известни със способността си да повлияват различни физиологични и биохимични процеси в човешкия организъм. Проучванията показват защитния ефект на тези съединения при различни неврологични и психични разстройства. Полифенолите модулират моноаминергичната невротрансмисия в мозъка и по този начин притежават антидепресивно действие, доказано в животински модели на депресия (Pathak et al., 2013). Засега е известен антидепресивният потенциал на някои важни полифеноли като аментофлавонол, апигенин, хлорогенова киселина, куркумин, ферулова киселина, хесперидин, рутин, кверцетин, нарингенин, ресвератрол, елагова киселина и проантоцианидини (Pathak et al., 2013). Някои от тези полифеноли са съставки на ПСАМ. Такива са проантоцианидините, хлорогеновата киселина, феруловата киселина и кверцетинът. Вероятно на тези и на другите полифенолни съединения в ПСАМ се дължи наблюдаваният в настоящото проучване ефект в теста за принудително плуване при плъхове. При плъховете, третирани субхронично с ПСАМ, е понижено времето на неподвижност, което показва понижени симптоми на депресивната симптоматика. Много е важно да се знае какъв е ефектът на ПСАМ в тези дози и продължителности на третиране върху спонтанната двигателна активност на животните. Това уточнение е необходимо, тъй като, ако едно вещество повишава двигателната активност, то може да даде фалшиво позитивен ефект в теста за принудително плуване (Yi et al., 2010). Изследванията на двигателната активност в апарат Opto Varimex показват, че ПСАМ доза-зависимо понижава двигателната активност при 30-дневно приложение, което понижение е статистически значимо от най-високата доза. Същата доза статистически значимо намалява времето на неподвижност в теста за принудително плуване, което дава основание да се направи заключението, че скъсяването на времето на неподвижност от ПСАМ се дължи на антидепресивен ефект на сока.

Точният механизъм на този ефект изисква допълнителни изследвания. Проучвания, проведени с други растителни продукти, показват, че катехин, процианидин В2 и процианидин В3 са сред най-активните флавоноиди и процианидини по отношение на инхибицията на обратното захващане на серотонин, допамин и норадреналин, при което най-силно се повлиява норадреналинът (Rocha et al., 2007). Проци-

аниини, съдържащи се в много други лечебни растения като например жълт кантарион (*Hypericum perforatum*) и какао (*Theobroma Cacao*), блокират обратното поемане на моноамините в ЦНС (Jensen et al., 2001; Wonnemann et al., 2001) и са активни в животински модели на депресия.

Повишаването на мозъчните моноамини може да се дължи и на инхибиция на тяхното разграждане от моноаминооксидазата (MAO). Доказано е, че полифенолите от зеления чай инхибират активността на MAO 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. Анализ, проведен *in vitro* с цианидин и цианидин-3-глюкозид, показва, че те инхибират MAO A и MAO B (Dreiseitel et al., 2009).

Стресът е един от най-важните фактори, отговорни за депресивните разстройства. Неадаптивни отговори към стреса предизвикват хиперактивност на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбреци чрез стимулиране на освобождаването на адренокортикотропен хормон и последващото периферно освобождаване на стероиди/кортизол от надбъбречната жлеза (Sapolsky, 2000). Има проучвания, показващи, че полифенолите на зеления чай имат антидепресивен ефект в модели на депресия при мишки и механизмът на този ефект е инхибиция на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбреци (Zhu et al., 2012).

Настоящото изследване на ПСАМ за антидепресивна активност допринася за обогатяване на наличните до момента данни за антидепресивен ефект на растителните полифеноли и разширява познанията за възможните полезни ефекти на ПСАМ.

### **3.5. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху болковата чувствителност**

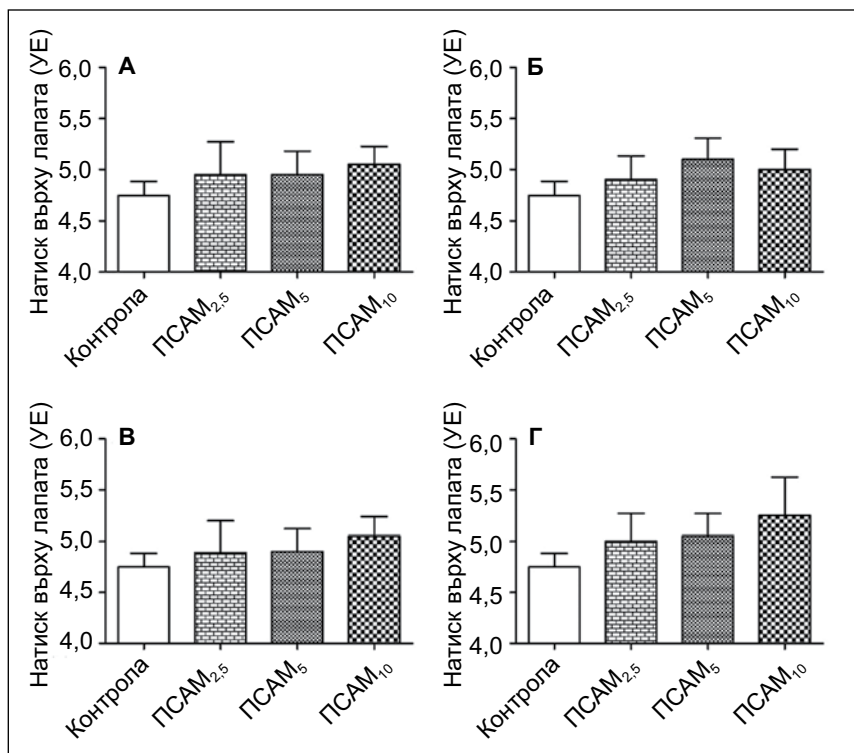
#### **3.5.1. Тест за изследване на болковата чувствителност по Randall u Selitto**

Опитите са проведени върху 160 мъжки Wistar плъха (200 – 240 g), отглеждани при температура 20-25°C, 12-часов цикъл на светлина/тъмнина и при неограничен достъп до храна и вода. Третирането на опитните животни е в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни. За всеки период на третиране има по 4 групи, във всяка от които има по 10 животни. Третирането на експерименталните групи е ежедневно, перорално чрез сондиране както следва: Контрола – физиологичен

разтвор 10 ml/kg; ПСАМ<sub>2.5</sub> – ПСАМ 2.5 ml/kg, ПСАМ<sub>5</sub> – ПСАМ 5 ml/kg и ПСАМ<sub>10</sub> – ПСАМ 10 ml/kg. Прагът на болката се измерва 60 min след последното третиране.

Различните групи са тествани на 7-ми, 14-ти, 21-ви и 30-ти ден. Измерената чрез аналгезиметър болкова чувствителност при механичен натиск е изразена в условни единици (УЕ).

ПСАМ не води до статистически значимо повишаване на болковия праг към механичен натиск върху невъзпалена лапа на плъх (Фиг. 23). Има известна тенденция за повишаване на болковия праг, която в повечето случаи е доза-зависима.



**Фиг. 23.** Ефект на ПСАМ върху болковата чувствителност при приложението му на плъхове в дози 2.5 ml/kg (ПСАМ2.5), 5 ml/kg (ПСАМ5) и 10 ml/kg (ПСАМ10) в продължение на 7 дни (панел А), 14 дни (панел Б), 21 дни (панел В) и 30 дни (панел Г); УЕ – условни единици

### **3.5.2. Обсъждане**

Тестът с натиск върху лапата е метод за измерване на болковата чувствителност при плъхове (Randall and Selitto, 1957). Приложението на този тест върху невъзпалена лапа дава възможност да се отдиференцира централната от периферната аналгетична активност, тъй като периферно действащите аналгетици (като нестероидните противовъзпалителни лекарства) повишават болковия праг само на възпалена лапа, а централно действащите (като опиоидните аналгетици) повишават болковия праг и на невъзпалена лапа (Dubinsky et al., 1987).

Флавоноидите имат доказан противовъзпалителен и свързан с това аналгетичен ефект (Ahmadiani et al., 1998; Ahmadiani et al., 2000). Има също данни, че флавоноидите имат и известна централна аналгетична активност. Така например за растителен екстракт, съдържащ флавоноидите кверцетин и кемпферол, е демонстриран изразен аналгетичен ефект в няколко модела на болка, като ефектът поне отчасти се дължи на взаимодействие с опиоидната система (Maleki-Dizaji et al., 2007). Централна аналгетична активност е установена и за екстракт от *Newbouldia laevis*, която авторите обясняват със съдържанието на флавоноиди (Tanko et al., 2008). Кверцетинът притежава противоболева активност в няколко модела на болка (Filho et al., 2008).

Резултатите от настоящото проучване показват, че субхроничното приложение на ПСАМ при плъхове не предизвиква статистически достоверно повишаване на болковия праг към механичен натиск върху невъзпалена лапа на плъх. Тъй като болковият праг на невъзпалена лапа се повишава само от централно действащите аналгетици (Dubinsky et al., 1987), получените резултати дават основание да се направи изводът, че ПСАМ няма централно аналгетично действие.

## **4. Органопротективни ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa***

### **4.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* в експериментален модел на стрептозотоцин-индуциран диабет при плъхове**

Опитът е проведен върху 36 мъжки плъха порода Wistar с тегло  $200 \pm 20$  g в началото на експеримента. Животните са разделени в шест групи в съответствие с експерименталната постановка, посочена

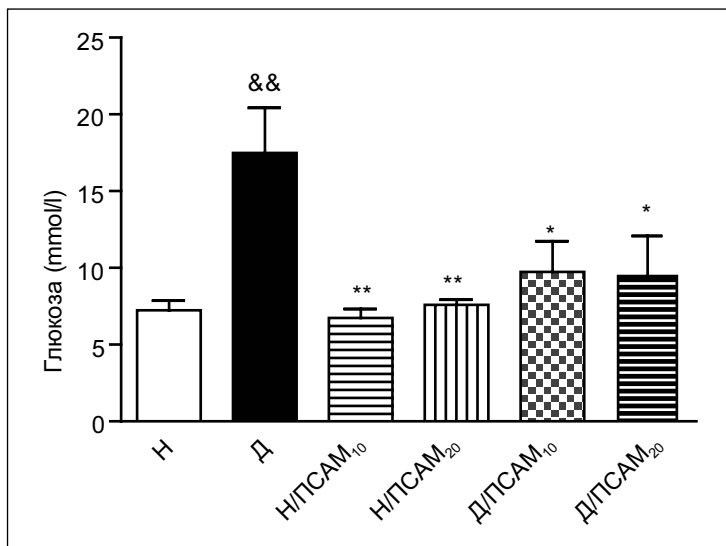
на в Таблица 10. Диабетът е индуциран посредством стрептозотоцин. ПСАМ е прилаган перорално в дози 10 ml/kg и 20 ml/kg в продължение на 6 седмици на нормални плъхове (групи Н/ПСАМ<sub>10</sub> и Н/ПСАМ<sub>20</sub>) и на плъхове с индуциран диабет (групи Д/ПСАМ<sub>10</sub> и Д/ПСАМ<sub>20</sub>). В същото време контролната група е получавала дестилирана вода (10 ml/kg). След периода на третиране (6 седмици) плъховете са оставени без храна през нощта и на следващия ден под етерна наркоза е взета кръв от подезичните вени, от която се получена плазма за биохимичните изследвания (глюкоза, липиди, МДА). Взети се и органи (панкреас и бъбреци) за определяне на МДА.

**Таблица 10.** *Експериментална постановка в модел на стрептозотоцин-индуциран диабет при плъхове*

Група, брой (n = 6)	Индукция на диабет	Третиране (6 седмици)
Нормална контрола (Н)		Дестилирана вода (10 ml/kg)
Диабетна контрола (Д)	Стрептозотоцин (50 mg/kg)	Дестилирана вода (10 ml/kg)
Н/ПСАМ <sub>10</sub>		ПСАМ (10 ml/kg)
Н/ПСАМ <sub>20</sub>		ПСАМ (20 ml/kg)
Д/ПСАМ <sub>10</sub>	Стрептозотоцин (50 mg/kg)	ПСАМ (10 ml/kg)
Д/ПСАМ <sub>20</sub>	Стрептозотоцин (50 mg/kg)	ПСАМ (20 ml/kg)

#### **4.1.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху кръвената глюкоза**

Както се вижда от Фиг. 24, плазмената концентрация на глюкоза при плъховете с диабет (Д) е 2.4 пъти по-висока от тази при нормалните плъхове (Н) и тази разлика е статистически значима. Приложението на ПСАМ при нормални плъхове не предизвиква значими промени в плазмените нива на глюкозата в сравнение с тези на нормалните контролни плъхове.

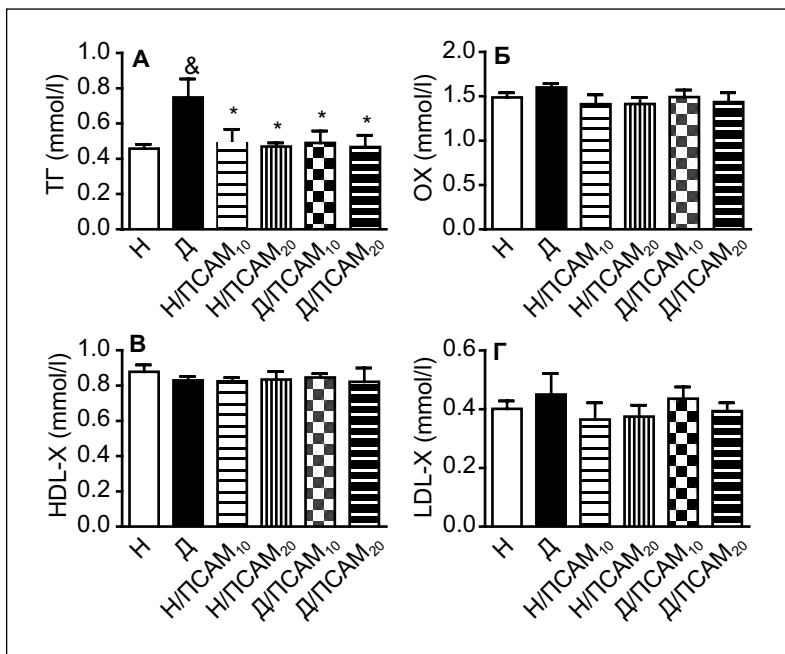


**Фиг. 24.** Ефект на ПСАМ в дози 10 ml/kg и 20 ml/kg върху плазмените нива на глюкоза при нормални плъхове (Н/ПСАМ<sub>10</sub> и Н/ПСАМ<sub>20</sub>) и при плъхове с диабет (Д/ПСАМ<sub>10</sub> и Д/ПСАМ<sub>20</sub>); && $p < 0.01$  спрямо нормалната контрола (Н); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  спрямо диабетната контрола (Д)

Прилаган при плъхове с диабет, ПСАМ в дози 10 ml/kg и 20 ml/kg значимо понижава плазмените глюкозни концентрации респективно с 44% и с 42% в сравнение с група Д, като това понижение е статистически значимо до нива, които не се различават значимо от тези на нормалните контролни плъхове (Фиг. 24).

#### **4.1.2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху кръвните липиди**

Плазмената концентрация на триглицеридите при плъховете с диабет (Д) е с 64% по-висока от тази на нормалните контролни плъхове (Н) и това повишение е статистически значимо (Фиг. 25).



**Фиг. 25.** Ефект на ПСАМ в дози 10 ml/kg и 20 ml/kg върху плазмените нива на: (А) триглицериди (ТГ), (Б) общ холестерол (ОХ), (В) HDL-холестерол (HDL-X) и (Г) LDL-X при нормални плъхове (Н/ПСАМ<sub>10</sub> и Н/ПСАМ<sub>20</sub>) и при плъхове с диабет (Д/ПСАМ<sub>10</sub> и Д/ПСАМ<sub>20</sub>); <sup>&</sup>p < 0.05 спрямо нормалната контрола (Н); \*p < 0.05 спрямо диабетната контрола (Д)

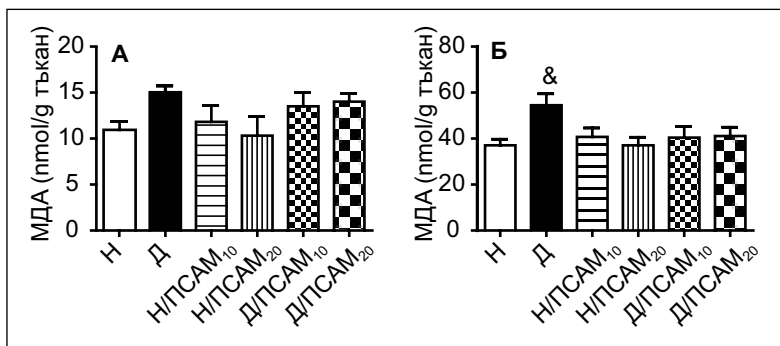
Нивата на триглицеридите при нормалните плъхове, третирани с двете дози ПСАМ, не се различават значимо от тези на нормалните контролни плъхове. Плазмените триглицериди при плъховете с диабет, третирани с ПСАМ в дози 10 и 20 ml/kg, са значимо, респективно с 35% и 39%, по-ниски от тези на плъховете от група Д и не се различават значимо от тези на нормалната контролна група (Фиг. 25А).

При плъховете от група Д стрептозотоцинът предизвиква незначими промени в останалите плазмени липиди: повишение на общия холестерол със 7.4%, на LDL-холестерол с 12.5% и понижение на HDL-холестерол с 6.0% в сравнение с нормалните контролни плъхове (Фиг. 25Б,В,Г). Прилаган при нормални плъхове, ПСАМ не предизвиква зна-

чими промени в нивата на тези плазмени липиди. При плъховете с диабет ПСАМ противодейства на ефекта на стрептозотоцина върху плазмените общ холестерол, LDL-холестерол и HDL-холестерол, като възстановява нивата им до тези на контролата, но тези ефекти не са статистически значими (Фиг. 25Б,В,Г).

#### 4.1.3. Ефект на плодов сок от *Argonia melanocarpa* върху нивата на малонов диалдехид в панкреас и бъбреци

Както се вижда от Фиг. 26, приложението на ПСАМ при нормални плъхове (групи Н/ПСАМ<sub>10</sub> и Н/ПСАМ<sub>20</sub>) не предизвиква значими промени в нивата на МДА в панкреаса и бъбреците в сравнение с нормалната контролна група (Н).



**Фиг. 26.** Ефект на ПСАМ в дози 10 ml/kg и 20 ml/kg върху нивата на МДА в панкреас (А) и бъбрек (Б) при нормални плъхове (Н/ПСАМ<sub>10</sub> и Н/ПСАМ<sub>20</sub>) и при плъхове с диабет (Д/ПСАМ<sub>10</sub> и Д/ПСАМ<sub>20</sub>); \* $p < 0.05$  спрямо нормалната контрола (Н)

Стрептозотоцинът предизвиква повишение на нивата на МДА в панкреаса и в бъбреците на група Д с 42.9% и 47.3% респективно, като повишението е статистически значимо в бъбреците (Фиг. 26). Приложението на ПСАМ при плъхове с диабет (групи Д/ПСАМ<sub>10</sub> и Д/ПСАМ<sub>20</sub>) предизвиква понижаване на МДА в панкреаса и бъбреците до нива, които не се различават значимо от тези на нормалната контрола.

#### 4.1.4. Обсъждане

В настоящото проучване стрептозотоцинът индуцира диабет, който се манифестира с хипергликемия и повишени нива на триглице-



ридите. Както и другите алкилиращи агенти от нитрозоуреиния клас, стрептозотоцинът е токсичен за клетките чрез увреждане на ДНК, въпреки че и други механизми могат да имат значение. Повишено отделяне на азотен оксид, повишено гликиране на панкреасните протеини и увеличена продукция на РКВ се изтъкват като причина за стрептозотоцин-индуцираното увреждане на панкреасните  $\beta$ -клетки (O'Brien et al., 1996). Стрептозотоцинът е достатъчно близък до глюкозата, за да бъде транспортиран в клетките чрез транспортен протеин GLUT2, но не е разпознаван от другите глюкозни транспортери. Това обяснява неговата сравнително избирателна токсичност за  $\beta$ -клетките, тъй като тези клетки имат сравнително високи нива на GLUT2 (Wang et al., 1998).

ПСАМ понижава хипергликемията при плъхове със стрептозотоцин-индуциран диабет. Този ефект е в съответствие с много съобщения, показващи глюкозо-понижаващ ефект на растителни вещества като флавоноиди, включително антоцианини (Cignarella et al., 1996; Jankowski et al., 2000; Maslov et al., 2002a; Al-Awwadi et al., 2004; Pinent et al., 2004; Liu et al., 2005; Kamalakannan and Prince, 2006). Изследвания с флавоноиди, някои от които са компоненти на ПСАМ, са демонстрирали няколко механизма на глюкозо-понижаващия ефект. Богат на левкоантоцианидин екстракт от листа на *Aronia melanocarpa* стимулира поемането на глюкоза от PC12 феохромоцитомни клетки и L929 фибробласти в концентрация, близка до тази на инсулина (Maslov et al., 2002b). Инсулиноподобни ефекти са доказани и за процианидините (Pinent et al., 2004). Флавоноидът мирицетин повишава поемането на глюкоза и улеснява синтеза на гликоген в изолирани хепатоцити от плъхове със стрептозотоцин-индуциран диабет (Liu et al., 2005). Рутинът (кверцети-3-рутинозид) повишава инсулиновите нива, възстановява чернодробния и мускулния гликоген и активностите на ензимите от въглехидратния метаболизъм при плъхове с диабет (Kamalakannan and Prince, 2006). Освобождането на инсулин се повишава също от флавоноида епикатехин (Kim et al., 2003). Изследването на Jayaprakasam et al. (2005) показва способността на антоцианините да стимулират инсулиновата секреция от панкреасни  $\beta$ -клетки на гризачи *in vitro*. Неотдавнашно изследване (Bräunlich et al., 2013) показва, че обогатена с процианидини субфракция от арониеви плодове, проявява инхибиторна активност по отношение на ензима  $\alpha$ -глюкозидаза, което би могло да допринесе за глюкозо-понижаващия ефект на ПСАМ.

Освен това, известно е, че хранителните антиоксиданти предпазват панкреаса от глюкоза-индуцирания оксидативен стрес. Има съобщения, че консумацията на плодове и зеленчуци, особено такива, богати на полифеноли, понижава честотата на диабет тип 2 (Anderson and Polansky, 2002; Landrault et al., 2003). Хистопатологично изследване на панкреас на плъхове със стрептозотоцин-индуциран диабет разкрива протективния ефект на рутин (Stanley Maizen Prince and Kamalakkannan, 2006) и епикатехин (Kim et al., 2003). Както прегледът на литературата за *Aronia melanocarpa*, така наши изследвания показват, че ПСАМ е много богат на фенолни антиоксиданти. Вероятно, действайки като антиоксидант, ПСАМ предпазва панкреасните  $\beta$ -клетки от стрептозотоцин-индуцираната повишена продукция на РКВ.

Серумният липиден профил, който е променен при пациенти с диабет (Orchard, 1990; Betteridge, 1994), се оказва важен фактор за развитието на преждевременна атеросклероза и включва повишение на нивата на триглицеридите и общия холестерол. Високи нива на триглицериди, които са типични за диабета, се установяват в настоящия модел на диабет при плъхове. Хипертриглицеридемията при плъхове със стрептозотоцин-индуциран диабет се предизвиква от побавното отстраняване на липопротеините, носещи триглицериди, от плазмата поради понижена липолитична активност на периферните тъкани (Bobek et al., 1981). Изразена хипертриглицеридемия без повишаване на скоростта на секреция на триглицериди показва дефект в отстраняването на триглицеридите при плъховете с диабет (Yoshino et al., 1991). В настоящото изследване нивата на триглицериди при третираните с ПСАМ диабетни плъхове са значимо по-ниски от тези на диабетните контроли. Този липидо-понижаващ ефект може би се дължи на намаляване на тежестта на диабета при третираните с ПСАМ плъхове. Подобен триглицериди-понижаващ ефект при плъхове със стрептозотоцин-индуциран диабет е демонстриран за антоцианини от листа на *Vaccinium myrtillus* L. (боровинка) (Cignarella et al., 1996). В настоящото проучване ПСАМ не предизвиква значими промени в нивата на общия холестерол, LDL-холестерол и HDL-холестерол, но тези липиди не са значимо повишени от стрептозотоцина. В експеримент на хранително-индуцирана хиперхолестеролемия обаче ПСАМ значимо понижава плазмените концентрации на общия холестерол и на LDL-холестерола при плъхове (Valcheva-Kuzmanova et al., 2007).

Липидната пероксидация е една от характерните черти на диабета. Оксидативният стрес и понижението на тъканната антиоксидантна

защита се считат за важни фактори в развитието на диабетните усложнения (Wohaieb and Godin, 1987; Marra et al., 2002). Ниските нива на липидни пероксиди стимулират секрецията на инсулин, но когато концентрацията на пероксиди се повишава, може да започне неконтролирана липидната пероксидация, което води до увреждане на островните клетки при диабет тип 1 (Metz, 1984). Увеличената тъканна податливост на животни с диабет към липидна пероксидация се доказва чрез увеличеното съдържание на МДА в панкреаса и бъбреците в настоящия експеримент. Други автори също отчитат повишение на нивата на МДА при плъхове със стрептозотоцин-индуциран диабет (Ramesh et al., 2005; Sabarimuthu et al., 2005). Понижението на нивата на МДА в панкреаса и особено в бъбреците при плъховете с диабет от ПСАМ е вероятно резултат от действието на съдържащите се в сока фенолни антиоксиданти. Изследванията показват висока корелация между полифенолното съдържание и антиоксидантната активност (Wang et al. 2000; Cho et al., 2004). Подобна зависимост установяват и посочените по-горе наши изследвания на ПСАМ. Понижаването на липидната пероксидация може би е сред механизмите, чрез които диетичните фактори допринасят за предотвратяване на усложненията от диабета (Armstrong et al., 1996).

След провеждане на настоящия експеримент с ПСАМ в модел на стрептозотоцин-индуциран диабет в литературата се появяват и други подобни проучвания. Ciocoiu et al. (2008) изследват ефекта на комбинирано приложение на полифеноли от *Aronia melanocarpa* и *Sambucus nigra* (бъз) в модел на стрептозотоцин-индуциран хипоинсулинемичен диабет. Това изследване показва, че нивата на гликирания хемоглобин са много по-високи при диабетната група и са значимо по-ниски при групата, третирана с полифеноли. Освен това активностите на антиоксидантните ензими глутатион пероксидаза и супероксид дисмутаза в диабетната група са значимо по-ниски от тези в групата, протектирана с полифеноли. В същото време серумната концентрация на МДА на диабетните плъхове, получаващи полифеноли, е по-ниска в сравнение с тази на нетретираната с полифеноли диабетна група. Така авторите доказват хипогликемичен, хиполипидемичен и антиоксидантен ефект на полифенолния екстракт от *Aronia melanocarpa* и *Sambucus nigra* при стрептозотоцин-индуциран диабет.

Друго изследване, което се появява в литературата след резултатите от настоящия експеримент, е изследването на Jurgoński et al.

(2008) за ефект на екстракт от *Aronia melanocarpa* при плъхове с експериментален модел на предиабет и хиперлипидемия. Нарушенията, наподобяващи тези при метаболитен синдром, са предизвикани чрез високо-фруктозна диета и еднократна интраперитонеална инжекция на стрептозотоцин (20 mg/kg). Добавката на екстракт от арониеви плодове предизвиква понижаване на активността на малтазата и захарата, както и повишаване на активността на лактазата в лигавицата на тънките черва, подобрява антиоксидантния статус, като нормализира концентрацията на ТБКРС в органите (черен дроб, бъбреци, бял дроб), проявява известна холестерол-понижаваща и изразена глюкозо-понижаваща активност.

#### 4.2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* в експериментален модел на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност при плъхове

Изследването е проведено върху 120 мъжки плъха порода Wistar (тегло 220-250 g, възраст 4 месеца). Животните са разделени на четири основни групи от по 30 плъха в съответствие с експерименталната постановка, представена в Таблица 11. Всяка група допълнително е подразделена на 5 подгрупи от по 6 плъха, като една подгрупа от всяка група е умъртвявана под анестезия с тиопентал (50 mg/kg) съответно на 3<sup>-ти</sup>, 5<sup>-ти</sup>, 10<sup>-ти</sup>, 28<sup>-ми</sup> и 28<sup>-ми</sup> ден, когато се провеждат биохимичните изследвания. Дестилираната вода е инстилирана интратрахеално в доза 2 ml/kg, а перорално е прилагана в доза 10 ml/kg. Амиодаронът (АД) е инстилиран интратрахеално в доза 6.25 mg/kg като воден разтвор 3.125 mg/ml (Taylor et al., 2000). ПСАМ е прилаган перорално в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg.

**Таблица 11.** Експериментална постановка в модела на АД-индуцирана белодробна токсичност; АД – амиодарон; ДВ – дестилирана вода; ПСАМ<sub>5</sub> – ПСАМ 5 ml/kg; ПСАМ<sub>10</sub> – ПСАМ 10 ml/kg

Група	Подгрупа	Интратрахеална инстилация – дни 0 и 2	Третиране – дни	Край на опита – ден
Контрола	1 (n = 6)	ДВ	ДВ 1-2	3
	2 (n = 6)	ДВ	ДВ 1-4	5
	3 (n = 6)	ДВ	ДВ 1-9	10
	4 (n = 6)	ДВ	ДВ 1-10	28
	5 (n = 6)	ДВ	ДВ 11-27	28

АД	1 (n = 6)	АД	ДВ 1-2	3
	2 (n = 6)	АД	ДВ 1-4	5
	3 (n = 6)	АД	ДВ 1-9	10
	4 (n = 6)	АД	ДВ 1-10	28
	5 (n = 6)	АД	ДВ 11-27	28
АД + ПСАМ <sub>5</sub>	1 (n = 6)	АД	ПСАМ <sub>5</sub> 1-2	3
	2 (n = 6)	АД	ПСАМ <sub>5</sub> 1-4	5
	3 (n = 6)	АД	ПСАМ <sub>5</sub> 1-9	10
	4 (n = 6)	АД	ПСАМ <sub>5</sub> 1-10	28
	5 (n = 6)	АД	ПСАМ <sub>5</sub> 11-27	28
АД + ПСАМ <sub>10</sub>	1 (n = 6)	АД	ПСАМ <sub>10</sub> 1-2	3
	2 (n = 6)	АД	ПСАМ <sub>10</sub> 1-4	5
	3 (n = 6)	АД	ПСАМ <sub>10</sub> 1-9	10
	4 (n = 6)	АД	ПСАМ <sub>10</sub> 1-10	28
	5 (n = 6)	АД	ПСАМ <sub>10</sub> 11-27	28

#### **4.2.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху коефициента бял дроб/телесно тегло**

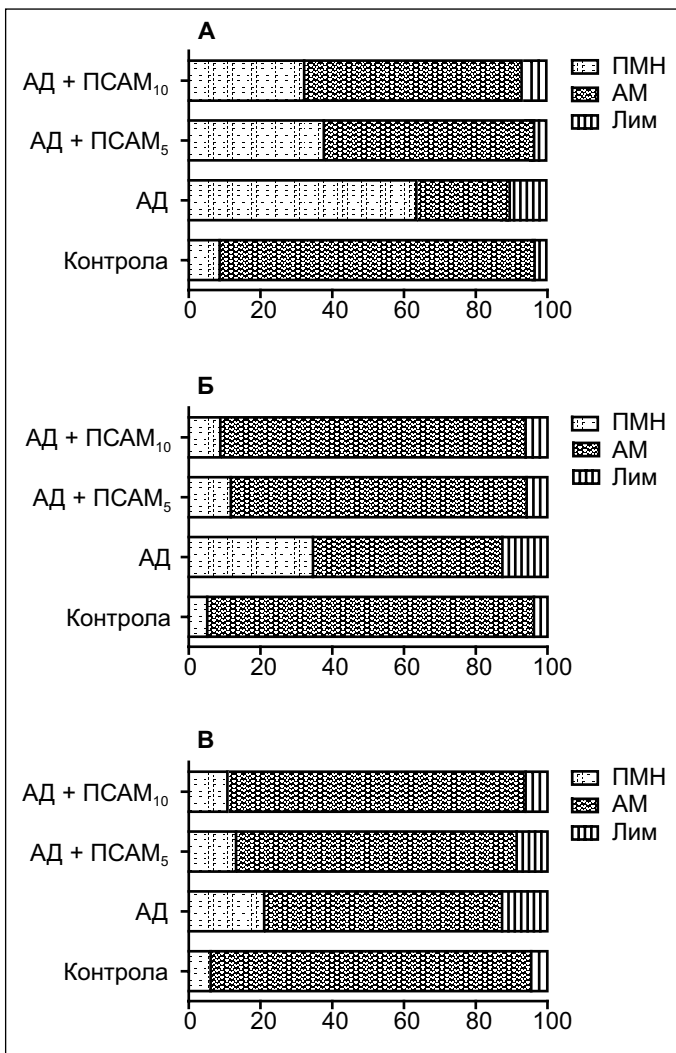
Стойностите на коефициента бял дроб/телесно тегло са представени в Таблица 12. Този коефициент при плъховете от група АД е значимо по-висок в сравнение с контролните стойности в дни 3, 5 и 10. Той се повишава постепенно с времето и на 10<sup>-ти</sup> ден достига 204% в сравнение с контролната стойност. Коефициентите бял дроб/телесно тегло при плъховете, третирани с двете дози ПСАМ, са значимо по-ниски в сравнение със съответните АД групи в ден 5 и ден 10 и не се различават значимо от тези на съответните контроли (Таблица 12).

**Таблица 12.** Коефициент бял дроб/телесно тегло и клетки в бронхоалвеоларна лаважна течност при плъхове, третирани интратрахеално с АД (група АД) и при плъхове, третирани интратрахеално с АД и перорално с ПСАМ в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg (АД + ПСАМ<sub>5</sub> и АД + ПСАМ<sub>10</sub>); Резултатите са средна стойност±SEM; ПМН – полиморфнонуклеарни левкоцити, АМ – алвеоларни макрофаги, Лим – лимфоцити; \*p< 0.05, \*\*p< 0.01, \*\*\*p< 0.001 спрямо съответната контрола; <sup>§</sup>p<0.05, <sup>&&</sup>p<0.01, <sup>&&&</sup>p<0.001 спрямо АД

Параметър Група	Време на определяне		
	Ден 3	Ден 5	Ден 10
<b>Коефициент бял дроб/телесно тегло</b>			
Контрола	0.56±0.04	0.60±0.03	0.50±0.05
АД	0.81±0.06**	0.90±0.02***	1.02±0.09***
АД + ПСАМ <sub>5</sub>	0.67±0.02	0.65±0.04 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	0.68±0.04 <sup>&amp;&amp;</sup>
АД + ПСАМ <sub>10</sub>	0.77±0.04**	0.66±0.05 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	0.68±0.06 <sup>&amp;&amp;</sup>
<b>Общ брой клетки (x 10<sup>5</sup>/l)</b>			
Контрола	7.54±0.24	7.74±0.73	7.51±0.48
АД	27.73± 1.83***	14.38±3.04*	11.32±2.09
АД + ПСАМ <sub>5</sub>	15.51± 3.26 <sup>&amp;&amp;</sup>	9.80±1.74	8.71±0.49
АД + ПСАМ <sub>10</sub>	15.06±2.94 <sup>&amp;&amp;</sup>	9.40±0.59	7.58±0.47
<b>ПМН (x 10<sup>5</sup>/l)</b>			
Контрола	0.65±0.13	0.41±0.04	0.46±0.06
АД	17.60±2.61***	4.98±1.07***	2.38±0.51**
АД + ПСАМ <sub>5</sub>	5.85±1.64 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	1.15±0.22 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	1.15±0.39 <sup>&amp;</sup>
АД + ПСАМ <sub>10</sub>	4.85±1.29 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	0.83±0.08 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	0.82±0.10 <sup>&amp;&amp;</sup>
<b>АМ (x 10<sup>5</sup>/l)</b>			
Контрола	6.62±0.16	7.05±0.58	6.71±0.51
АД	7.22±0.85	7.60±0.58	7.52±0.25
АД + ПСАМ <sub>5</sub>	9.09±1.06	8.08±0.97	6.82±0.49
АД + ПСАМ <sub>10</sub>	9.13±0.91	8.00±1.02	6.30±0.46
<b>Лим (x 10<sup>5</sup>/l)</b>			
Контрола	0.27±0.03	0.29±0.07	0.34±0.03
АД	2.92±0.55***	1.80±0.47**	1.43±0.43*
АД + ПСАМ <sub>5</sub>	0.57±0.23 <sup>&amp;&amp;&amp;</sup>	0.57±0.08 <sup>&amp;&amp;</sup>	0.75±0.26
АД + ПСАМ <sub>10</sub>	1.08±0.31 <sup>&amp;&amp;</sup>	0.57±0.16 <sup>&amp;&amp;</sup>	0.46±0.04

#### **4.2.2. Ефект на плодов сок от *Argonia melanocarpa* върху съдържанието на клетки в бронхоалвеоларна лаважна течност**

Общият брой клетки в бронхоалвеоларна лаважна течност (БАЛТ) е представен в Таблица 12.



**Фиг. 27.** Ефект на ПСАМ в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg върху процентното съдържание на клетки в бронхоалвеоларна лаважна течност на 3<sup>-ти</sup> ден (панел А), на 5<sup>-ти</sup> ден (панел Б) и на 10<sup>-ти</sup> ден (панел В) при плъхове, третирани интратрахеално с АД (АД + ПСАМ<sub>5</sub> и АД + ПСАМ<sub>10</sub>); ПМН – полиморфнонуклеарни левкоцити, АМ – алвеоларни макрофаги, Лим – лимфоцити

Общият брой на клетките в БАЛТ при плъхове в група АД се увеличава драстично, като на 3<sup>-ти</sup> ден е 368% от контролната стойност, а след това постепенно намалява. На 5<sup>-ти</sup> ден той е 186% от контролната стойност, а на 10<sup>-ти</sup> ден е статистически незначимо по-висок от контролния брой. ПСАМ в двете използвани дози ефективно антагонизира ефекта на АД и при третираните с ПСАМ плъхове общият клетъчен брой в дни 3, 5 и 10 не се различава значимо от този на респективните контролни групи.

АД предизвиква драматично повишение на полиморфнонуклеарните левкоцити (ПМН) в ден 3 (27 пъти по-високи стойности от тези на контролната група). След това ПМН постепенно се понижават, но остават около 12 пъти по-високи в сравнение с контролната стойност в ден 5 и около 5 пъти по-високи спрямо контролата в ден 10 (Таблица 12). АД повишава също процентния дял на ПМН от общия клетъчен брой в БАЛТ в дни 3, 5 и 10 до стойности, които са съответно 63.47%, 34.28% и 21.02% от общия клетъчен брой, докато контролните стойности в тези дни са 8.60%, 5.30% и 6.13% (Фиг. 27). Третирането с ПСАМ значимо намалява ефекта на АД върху ПМН. При третираните с ПСАМ плъхове броят на ПМН не се различава значимо от този на съответните контроли в дните 3, 5 и 10 и е значимо по-нисък от този на съответните АД групи (Таблица 12). За тези плъхове процентът на ПМН от общия брой клетки в тези дни е значително по-нисък от този на съответните АД групи (Фиг. 27).

Нито АД, нито ПСАМ значимо повлияват броя на алвеоларните макрофаги (АМ) в БАЛТ (Таблица 12). В групата АД процентът на тези клетки от общия клетъчен брой в дни 3, 5 и 10 е 26.04%, 52.85% и 66.43%, респективно. Поради повишения общ брой клетки в БАЛТ тези проценти са значимо по-ниски в сравнение с контролните стойности, които в тези дни са съответно 87.80%, 91.09% и 89.35% (Фиг. 27). При третираните с ПСАМ плъхове процентът на АМ е в известна степен намален спрямо контролата в ден 3 и почти се връща до контролните стойности в дни 5 и 10 (Фиг. 27).

При плъховете от група АД броят на лимфоцитите (Лим) се повишава значимо в дни 3, 5 и 10 (Таблица 12). Така АД предизвиква повишение на процента на Лим от общия брой клетки в БАЛТ в дни 3, 5 и 10 до стойности 10.53%, 12.52% и 12.63%, съответно, докато контролните стойности за тези дни са 3.58%, 3.75% и 4.53% (Фиг. 27). Броят на Лим в групите АД + ПСАМ<sub>5</sub> и АД + ПСАМ<sub>10</sub> в дни 3, 5 и 10 не се различава значимо от съответните контролни стойности и техният

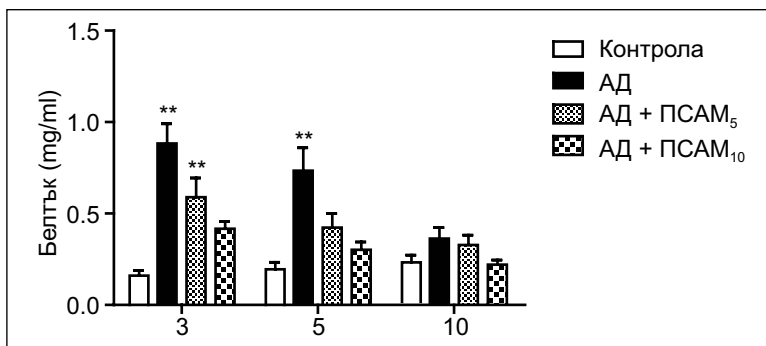


процент от общия клетъчен брой е подобен на този при контролите (Таблица 12, Фиг. 27).

### 4.2.3. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху биохимични показатели в бронхоалвеоларна лаважна течност

#### 4.2.3.1. Общо съдържание на протеин в бронхоалвеоларна лаважна течност

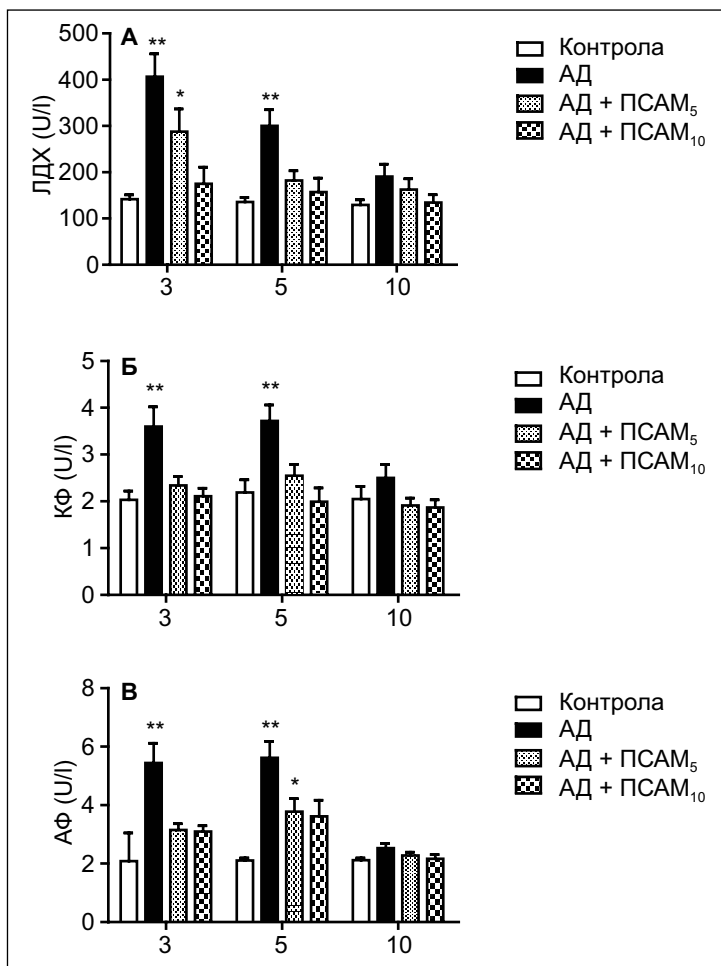
В група АД общото съдържание на протеин в БАЛТ се повишава рязко, като на 3-ти ден е 518% от контролната стойност. След това то постепенно се понижава: на 5-ти ден е 365% от контролната стойност и на 10-ти ден не се различава значимо от контролната стойност (Фиг. 28). ПСАМ в двете дози предотвратява този ефект на АД. При ПСАМ-третираните плъхове общият протеин във всички дни на определяне не се различава значимо от този на контролите с изключение на групата АД + ПСАМ<sub>5</sub> в ден 3 (Фиг. 28).



**Фиг. 28.** Ефект на ПСАМ в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg върху съдържанието на белтък в бронхоалвеоларна лаважна течност на 3-ти, на 5-ти ден и на 10-ти ден при плъхове, третирани интратрахеално с АД (АД + ПСАМ<sub>5</sub> и АД + ПСАМ<sub>10</sub>); \*\* $p < 0.01$  спрямо контролата

#### 4.2.3.2. Ензими в бронхоалвеоларна лаважна течност

Активността на лактат дехидрогеназата (ЛДХ) е общ маркер за клетъчно увреждане. След инстилирането на АД активността на ЛДХ в БАЛТ се повишава до ниво, което е 3 пъти по-високо от контролната стойност в ден 3, около 2 пъти по-високо в ден 5 и около 1.5 пъти по-високо в ден 10 (Фиг. 29А).



**Фиг. 29.** Ефект на ПСАМ в дози 5 и 10 ml/kg върху съдържанието на ензими лактат дехидрогеназа (панел А), кисела фосфатаза (панел Б) и алкална фосфатаза (панел В) в бронхоалвеоларна лаважна течност на 3-ти ден, на 5-ти ден и на 10-ти ден при плъхове, третирани интратрахеално с АД (АД + ПСАМ<sub>5</sub> и АД + ПСАМ<sub>10</sub>); \*\* $p < 0.01$  спрямо контролата

ПСАМ доза-зависимо ефективно предотвратява АД-индуцираното повишение на ЛДХ активност, така че този ензим е със значимо по-ви-

соки стойности в сравнение с контролата само в групата АД + ПСАМ<sub>5</sub> в ден 3 (Фиг. 29А).

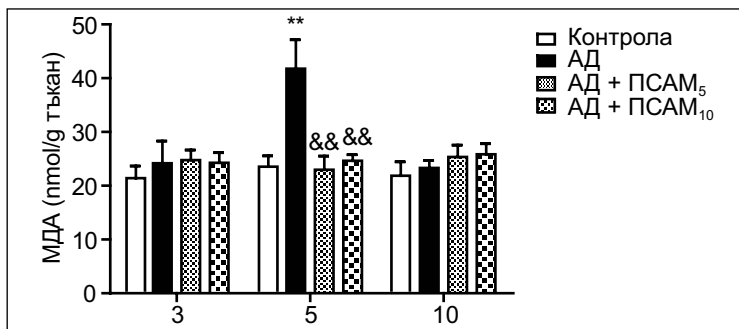
Активността на киселата фосфатаза (КФ) се повишава в групата АД и това повишение е значимо в ден 3 (177% спрямо контролата) и ден 5 (170% спрямо контролата). ПСАМ противодейства на това повишение на ензимната активност и при третираните с ПСАМ животни активността на КФ не се различава статистически достоверно от съответните контроли (Фиг. 29Б).

Значимо повишаване на активността на алкалната фосфатаза (АФ) се наблюдава в БАЛТ при плъховете от АД група в ден 3 (260% спрямо контролата) и ден 5 (266% спрямо контролата). ПСАМ доза-зависимо предотвратява АД-индуцираното повишение на активността на АФ и при третираните с ПСАМ животни тази ензимна активност е значимо по-висока в сравнение с контролното ниво само в групата АД + ПСАМ<sub>5</sub> в ден 5 (Фиг. 29В).

#### 4.2.4. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху биохимични показатели в белодробен хомогенат

##### 4.2.4.1. Малонов диалдехид в белодробен хомогенат

АД предизвиква повишаване на съдържанието на МДА в белодробен тъкан, което е статистически значимо в ден 5 (196% от контролната стойност). И двете дози ПСАМ предотвратяват това повишение. В ден 5 нивата на МДА при третираните с ПСАМ плъхове не се различават значимо от тези на контролата и са значимо по-ниски от тези на съответната АД група (Фиг. 30).



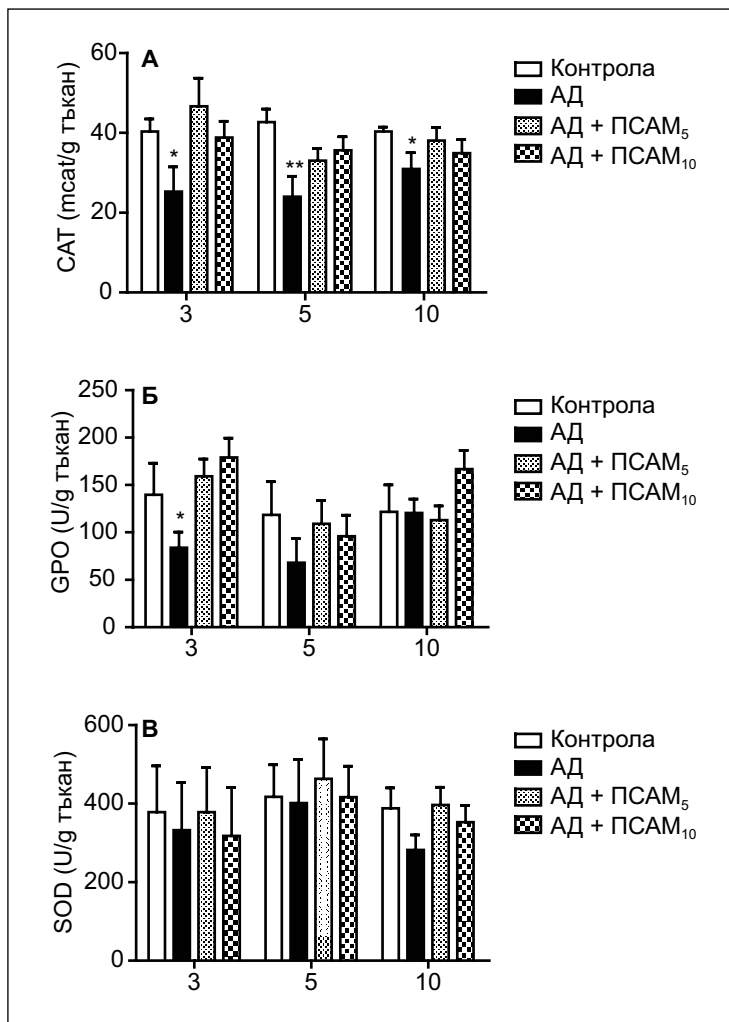
**Фиг. 30.** Ефект на ПСАМ в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg върху съдържанието на малонов диалдехид (МДА) в белодробен хомогенат на 3<sup>-ти</sup> ден, на 5<sup>-ти</sup> ден и на 10<sup>-ти</sup> ден при плъхове, третирани интратрахеално с АД (АД + ПСАМ<sub>5</sub> и АД + ПСАМ<sub>10</sub>); \*\**p* < 0.01 спрямо контролата, &&*p* < 0.01 спрямо АД

#### **4.2.4.2. Антиоксидантни ензими в белодробен хомогенат**

Инстилацията на АД предизвиква понижаване на активността на каталазата (CAT) в дни 3, 5 и 10 до нива, които са съответно 62%, 55% и 76% от контролните активности (Фиг. 31А). Инхибицията на ензимната активност е най-изразена на 5-ти ден. ПСАМ предотвратява този ефект на АД. При плъховете от група АД + ПСАМ<sub>5</sub> активността на САТ не се различава значимо от контролната стойност и е съответно 114%, 77% и 93% от тази стойност съответно в дни 3, 5 и 10. При плъхове от група АД + ПСАМ<sub>10</sub> активността на САТ не се различава значимо от контролната стойност и е съответно 95%, 82% и 85% от контролното ниво в дни 3, 5 и 10 (Фиг. 31А).

В група АД активността на глутатион пероксидазата (GPO) е понижена до нива, които са 60%, 57% и 99% от тези на съответната контрола в дни 3, 5 и 10. ПСАМ антагонизира този ефект. При третираните с ПСАМ животни GPO активност не се различава значимо от контролната активност в дните 3, 5 и 10. При плъховете от група АД + ПСАМ<sub>5</sub> GPO активност е 114%, 92% и 93% от контролната стойност, а при плъховете от група АД + ПСАМ<sub>10</sub> GPO активност е 128%, 81% и 137% от тази стойност съответно в дните 3, 5 и 10 (Фиг. 31Б).

Активността на супероксид дисмутазата (SOD) при плъховете от АД група е 88%, 96% и 73% от контролната активност в дните 3, 5 и 10 и не се различава значимо от контролната активност. В повечето моменти на определяне и подгрупи животни ПСАМ антагонизира АД-индуцираната тенденция за понижаване на SOD активност. Така тази ензимна активност при плъховете от група АД + ПСАМ<sub>5</sub> е съответно 100%, 111% и 102% от нивото на контролата, а при плъховете от група АД + ПСАМ<sub>10</sub> тя е 84%, 100% и 91% от контролното ниво съответно в дни 3, 5 и 10 (Фиг. 31В).

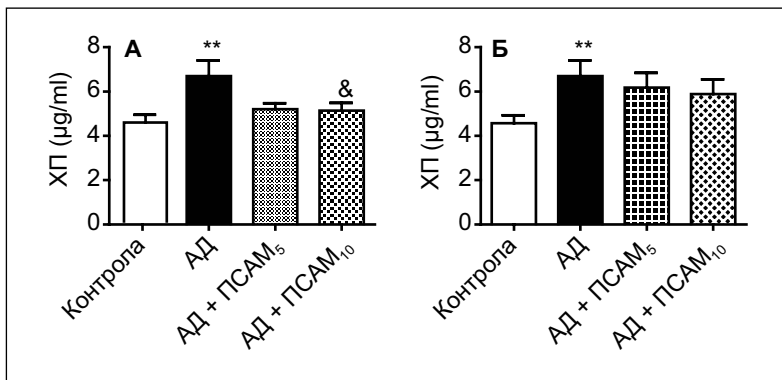


**Фиг. 31.** Ефект на ПСАМ в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg върху активностите на ензимите каталаза (CAT, панел А), глутатион пероксидаза (GPO, панел Б) и супероксид дисмутаза (SOD, панел В) в белодробен хомогенат 3, 5 и 10 дни след интратрахеалната инстилация на АД; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  спрямо контролата

#### 4.2.4.3. Хидроксипролин в белодробен хомогенат

Съдържанието на хидроксипролин (ХП) в белодробен хомогенат е определено на 28<sup>ми</sup> ден при плъхове, които са третирани с двете дози ПСАМ по два начина: от ден 1 до ден 10 (в ранната фаза на увреждането) и от ден 11 до ден 27 (в по-късна фаза на увреждането, предизвикано от АД) (Фиг. 32).

При плъховете от АД група има значимо повишаване на съдържанието на ХП (147% от контролните стойности). При плъховете, третирани с ПСАМ от ден 1 до ден 10, нивото на ХП не се различава значимо от това на контролата: при доза 5 ml/kg то е 114% от контролното, а при доза 10 ml/kg то е 112% от контролното и е значимо по-ниско от това на АД група (Фиг. 32А). При плъховете, третирани с ПСАМ от ден 11 до ден 27, съдържанието на ХП не се различава значимо от това на контролата: при доза 5 ml/kg то е 135% от контролното, а при доза 10 ml/kg то е 129% от контролното (Фиг. 32Б). Тези резултати показват, че ефектът на ПСАМ е по-изразен при приложението му в първите дни след инстилирането на АД, отколкото при приложението му в по-късен етап (11-27 ден) след индуциране на увреждането.



**Фиг. 32.** Ефект на ПСАМ в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg върху съдържанието на хидроксипролин (ХП) в белодробен хомогенат 28 дни след интратрахеалната инстилация на АД; ПСАМ е прилаган от ден 1 до ден 10 (панел А) или от ден 11 до ден 27 (панел Б);

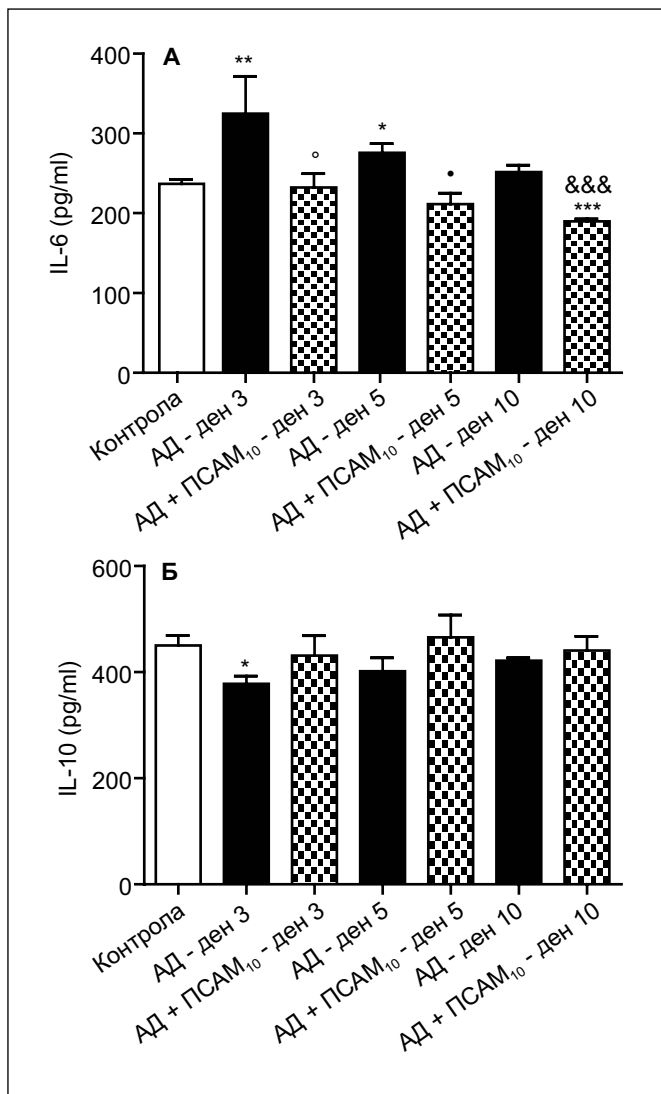
\*\* $p < 0.01$  спрямо контролата, & $p < 0.05$  спрямо АД

#### **4.2.5. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху интерлевкини в серум**

Интерлевкините IL-6 и IL-10 са определяни само при групите, получавали ПСАМ в доза 10 ml/kg. Измерването е правено в дни 3, 5, 10 и 28, като на 28<sup>-ми</sup> ден има две групи – едната, третирана с ПСАМ в дни 1-10 [група АД + ПСАМ<sub>10</sub>(1-10)], и друга, третирана с ПСАМ в дни 11-27 [група АД + ПСАМ<sub>10</sub>(11-27)].

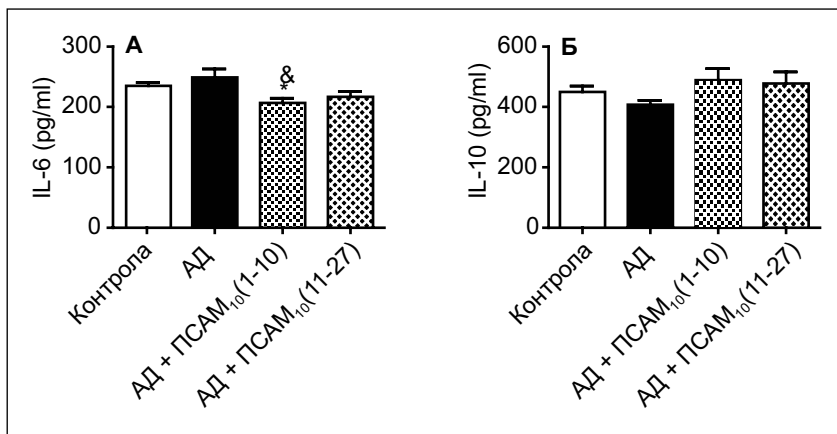
Инстилацията на АД предизвиква повишаване на IL-6 в серума на плъховете, което е значимо в ден 3 (136% от контролната стойност) и ден 5 (116% от контролната стойност) и не е статистически значимо в ден 10 (105% от контролната стойност) (Фиг. 33А) и ден 28 (104% от контролната стойност) (Фиг. 34). ПСАМ предотвратява АД-индуцираното повишение на IL-6. При третираните с ПСАМ животни нивата на IL-6 в дни 3, 5 и 10 са значимо по-ниски от тези на АД група (Фиг. 33А), а в ден 10 нивото на IL-6 е значимо по-ниско и от контролната стойност (Фиг. 33А). На 28<sup>-ми</sup> ден IL-6 при плъховете, получавали ПСАМ в дни 1-10, е 87% от контролната стойност, а при плъховете, получавали ПСАМ в дни 11-27, IL-6 е 91% от контролната стойност (Фиг. 34А). Така при плъховете от група АД + ПСАМ<sub>10</sub>(1-10) IL-6 е значимо по-нисък в сравнение с група АД и е дори значимо по-нисък от контролната стойност (Фиг. 34А).

В група АД се наблюдава понижение на IL-10 в серума в дни 3, 5, 10 (Фиг. 33Б) и 28 (Фиг. 34Б), като това понижение е значимо в ден 3. ПСАМ антагонизира ефекта на АД върху IL-10. При третираните с ПСАМ животни нивата на IL-10 в дни 3, 5, 10 и 28 не се различават значимо от контролната стойност (Фиг. 33Б, Фиг. 34Б).



**Фиг. 33.** Ефект на PCSAM в доза 10 ml/kg върху нивата на IL-6 (панел А) и IL-10 (панел Б) в серум на плъхове 3, 5 и 10 дни след интратрахеалната инстилация на АД; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  спрямо контролата; ° $p < 0.05$  спрямо АД (Ден 3); • $p < 0.05$  спрямо АД (Ден 5); &&& $p < 0.001$  спрямо АД (Ден 10)





**Фиг. 34.** Ефект на PCAM в доза 10 ml/kg върху съдържанието на IL-6 (панел А) и IL-10 (панел Б) в серум на плъхове 28 дни след интратрахеалната инстилация на АД; PCAM е прилаган от ден 1 до ден 10 на група АД + PCAM<sub>10</sub>(1-10) или от ден 11 до ден 27 на група АД + PCAM<sub>10</sub>(11-27); \*\* $p < 0.05$  спрямо контролата; & $p < 0.05$  спрямо АД

#### 4.2.6. Обсъждане

Има множество сходства в патологията при човешки бял дроб и бял дроб на гризачи, поради което гризачите са отличен модел за изследване на патологичните промени *in vivo* (Moeller et al., 2006).

Както индиректни, така и директни токсични ефекти върху прицелните клетки са предложени за обяснение на АД-индуцираната белодробна токсичност. Демонстрирано е, че АД предизвиква мембранна дестабилизация и повишен вътреклетъчен инфлукс на Ca<sup>2+</sup> (Powis et al., 1990), митохондриална дисфункция (Bolt et al., 2001) и свръхпродукция на РКВ (Vereckei et al., 1993; Nicolescu et al., 2008). Множество данни показват ролята на оксидативния стрес в АД-индуцираната белодробна фиброза (Pollak, 1993). Свободнорадикаловите реакции допринасят за фиброгенезата както директно, така и чрез възпалителни стимули. Липидната пероксидация и някои продукти от нея индуцират генетична свръхекспресия на фиброгенни цитокини, ключови молекули в механизмите на фиброгенезата, както и увеличена транскрипция и синтеза на колаген (Brian, 2008). Тези събития могат да бъдат поти-

снати, поне в експериментални модели, чрез използването на антиоксиданти. Доказано е, че антиоксидантите отслабват АД-индуцираното белодробно увреждане и фиброза при животни (Brian, 2008). Други открития сочат, че активацията на макрофагите и последващото освобождаване на възпалителни и цитотоксични медиатори стимулират АД-индуцираната белодробна фиброза (Reinhart and Gairola, 1997; Chung et al., 2001).

Настоящото проучване изследва ефекта на ПСАМ в белодробната тъкан в модел на АД-индуцирана пневмотоксичност при плъхове. Всички цитологични показатели в БАЛТ, както и биохимичните изследвания на БАЛТ, белодробен хомогенат и серум, показват добре изразен протективен ефект на ПСАМ.

Taylor et al. (2003) показват, че инстилацията на АД предизвиква бързо и масивно разрушаване на алвеоло-капилярната бариера, увреждане и смърт на клетките на дихателните пътища и белодробния паренхим. В настоящия експеримент предизвиканото от АД увреждане повишава пермеабилитета на белодробния епител и ендотел, в резултат на което настъпва екстравазация на плазмени протеини. Така АД предизвиква значимо повишаване на общото съдържание на протеин в БАЛТ в дни 3 и 5 до нива, които са съответно 3 и 5 пъти по-високи от контролните. ПСАМ предотвратява нарушението на алвеоло-капилярната бариера, оценено чрез нивото на протеин в БАЛТ. Общото протеиново съдържание в БАЛТ при плъхове, третирани с ПСАМ, е сравнимо с това на съответните контролни групи. Ефектът на ПСАМ би могъл да се дължи на инкорпориране на биологично активните полифеноли в съдовите стени. Това предположение е в съответствие с наблюдението, че съдовите ендотелни клетки могат да икорпорират антоцианини в мембраните и цитозола, чрез което стават по-устойчиви на оксидативни увреждания (Youdim et al., 2000).

Цитологичното изследване на БАЛТ показва, че АД предизвиква значими промени. Те са най-изразени на 3<sup>-ти</sup> и 5<sup>-ти</sup> ден, след което отслабват. АД предизвиква повишение на общото клетъчно съдържание в БАЛТ в резултат на бързо и масивно увреждане на алвеоло-капилярната бариера. ПСАМ предотвратява този ефект. При АД-третираните плъхове броят на ПМН драстично се повишава. Счита се, че инфлуксът на ПМН (маркер на възпалението) в интерстициума и бронхо-алвеоларното пространство играе ключова роля в прогресията на острото белодробно увреждане (Grommes and Soehnlein, 2011). ПМН са главните участници в острите възпалителни отговори в тъканите,

като постъпват от циркулацията, когато намалее локалната защита. Чрез апоптоза (програмирана клетъчна смърт) и чрез фагоцитоза от макрофагите стимулираните неутрофили се отстраняват от местата на възпаление, което е ключов момент в разнасянето на възпалението (Serhan and Savill, 2005). ПМН вероятно играят роля във възпалителната реакция чрез освобождаване на растежни фактори и цитокини, както и чрез освобождаване на оксиданти като елемент на защитната система на гостоприемника. В това проучване цитологичното изследване показва, че ПСАМ подчертано понижава броя на ПМН в БАЛТ. По този начин сокът потиска началния възпалителен отговор, индуциран от АД, включващ миграция и активация на възпалителни клетки, както и разрушаване на алвеоло-капилярната бариера. Като действа върху ранното преходно възпаление и увреждане на алвеоло-капилярната бариера, ПСАМ би могъл да предпазва от по-късното развитие на белодробно увреждане и фиброза. Има изследвания, че сокът притежава също про-апоптотична активност по отношение на неутрофилите чрез повишаване на активността на капсаза-3, маркер на апоптозата (Zielinska-Przyjemka et al., 2007).

В съответствие с развитието на белодробно възпаление и едем интратрахеалното приложение на АД се придружава от прогресивно повишение на коефициента тегло на бял дроб/общо тегло. ПСАМ предотвратява това повишение.

Повишените нива на някои ензими в БАЛТ са отдавна известни като маркери на токсични пулмонални лезии: ЛДХ – на повишена мембранна пропускливост и клетъчен разпад, АФ – на токсично увреждане и пролиферация на пневмоцити тип 2 и КФ – на повишена фагоцитна активност или убиване на клетки (Dusinska et al., 1998; Tsukamoto et al., 2000).

В това проучване АД значимо повишава активностите на ЛДХ и КФ в БАЛТ в дни 3 и 5 и тези резултати потвърждават неговия пневмотоксичен ефект скоро след интратрахеалната му инстилация. Тези ензими изтичат от мъртвите или повредени клетки, когато мембраната цялост се загуби. Активността на АФ в БАЛТ също е повишена в дни 3 и 5 при АД-третираните плъхове. Този резултат показва ранните токсични ефекти и пролиферацията на пневмоцити от тип 2 по време на възстановителния период. Данните от настоящото проучване са в съответствие с други изследвания, които са демонстрирали повишени ензимни активности при третирани с АД плъхове (Taylor et al., 2000). ПСАМ предотвратява това ранно индуцирано от АД повишение на ен-

зимните активности. Този ефект би могъл да се дължи на мощната антиоксидантна активност на ПСАМ, чрез която ПСАМ може да предпазва клетъчните мембрани от оксидативно увреждане и да намалява мембранния пермеабилитет.

Изследването на МДА е все още най-често използваният метод за оценка на липидната пероксидация поради неговата чувствителност и простота (Ghabaee et al., 2010). Индуцираното от АД увреждане е демонстрирано чрез повишената липидна пероксидация, измерена чрез нивата на МДА, които са значимо повишени на 5<sup>-тия</sup> ден. ПСАМ напълно предотвратява този ефект на АД вероятно чрез изразената си антиоксидантна и радикал-залавяща активност, демонстрирана в множество проучвания (Oszmianski and Wojdylo, 2005; Zheng and Wang, 2003; Bermudez-Soto and Tomas-Barberan, 2004; Wu et al., 2004; Valcheva-Kuzmanova et al., 2007; Jakobek et al., 2011; Valcheva-Kuzmanova et al., 2012) и включена в обзорите на Chrubasik et al. (2010) и Kokotkiewicz et al. (2010).

Експериментите на Zielinska-Przyjemaska et al. (2007) показват, че сок от *Aronia* и неговите активни фракции понижават оксидативния метаболизъм в ПМН. Тъй като свободните радикали играят ключова роля в АД-индуцираната белодробна токсичност (Vereckeai et al., 1993), бихме могли да предположим, че протективният ефект на ПСАМ в този експеримент е предимно резултат от неговите антиоксидантни и радикал-залавящи свойства. Тези наблюдения са в съответствие с проучвания, които демонстрират, че други фенолни антиоксиданти (бутилиран хидроксианизол, куркумин, процианидини от грозде) са ефективни за ограничаване на АД-индуцираното генериране на РКВ и белодробно увреждане (Leeder et al., 1994; Punithavathi et al., 2000; Bagchi et al., 2002). Има също литературни данни за цитопротективен ефект на витамин С и N-ацетилцистеин при АД-индуцирана цитотоксичност на клетъчни култури (Durukan et al., 2012). И двете вещества се използват в клинични ситуации поради техните добре известни антиоксидантни свойства (Durukan et al., 2012).

АД не само повишава липидната пероксидация, измерена чрез нивата на МДА, но повлиява и антиоксидантната защита на организма, измерена чрез активностите на някои антиоксидантни ензими в белодробен хомогенат. Ензимите CAT, GPO и SOD действат колективно за предпазване на клетките от оксидативния стрес. CAT е хем-съдържащ ензим, намиращ се в пероксизомите, който катализира дисмутацията на водороден пероксид ( $H_2O_2$ ) до вода и молекулярен кислород

(Harris, 1992). GPO катализира окислението на глутатион до глутатион дисулфид, чието съотношение може да се използва като индикатор на оксидативния стрес (Carey et al., 2003) и участва в метаболизма на липидните хидропероксиди и  $H_2O_2$  (Arthur, 2000). SOD катализира метаболизма на супероксидните аниони до водороден пероксид и молекулярен кислород с помощта на различни ко-фактори като мед, цинк, манган, желязо (Maral et al., 1977).

Както вече беше посочено, АД-индуцираното възпаление включва ангажиране на специфични възпалителни клетки като ПМН, лимфоцити, плазматични клетки и еозинофили (Martin and Rosenow, 1988). Възпалителните клетки имат способността да освобождават РКВ (Laskin and Pendino, 1995), които предизвикват липидна пероксидация, полимеризация на протеините и разкъсване на ДНК веригата.

В настоящото проучване АД понижава активността на ензимите CAT и GPO и няма значим ефект върху активността на SOD. Тези резултати за ефекта на АД върху активността на CAT и GPO са в съответствие с данни на други автори (Al-Shammari et al., 2009), които са изследвали ефекта на АД, приложен интраперитонеално при плъхове. Има обаче и данни на други изследователи, показващи, че АД няма ефект върху активностите на SOD, CAT и GPO в митохондрии на плъхове (Ribeiro et al., 1997) или дори повишава активността на SOD при хамстери след интратрахеалното му приложение (Leeder et al., 1994).

В настоящото проучване инхибицията на антиоксидантната защитна ензимна система от АД вероятно има за резултат натрупването на РКВ и последваща от оксидативния стрес белодробна токсичност, която се демонстрира чрез патологичните промени в БАЛТ и белодробната тъкан. Резултатите показват, че ПСАМ антагонизира ефекта на АД върху антиоксидантните ензими CAT, GPO и SOD и запазва ензимните активности до нива, които не се различават значимо от контролните. Ефектът на ПСАМ е най-изразен върху активността на CAT, която е и в най-голяма степен понижена от АД. Тези наблюдения са в съответствие с данни на други автори. Kowalczyk et al. (2004) установяват, че антоцианини от арония повишават активността на CAT при мишки, интоксикирани със сулфид-2-хлороетил-3-хлоропропил. Изследване на Kedzierska et al. (2011) демонстрира, че екстракт от плодове на *Aronia melanocarpa* намалява промените в активностите на различни антиоксидантни ензими (GPO, SOD и CAT) в тромбицити, третирани с  $H_2O_2$ . Претретирането със сок води до повишаване на ак-

тивността на CAT, GPO и глутатион редуктаза при плъхове, изложени на N-нитрозодиметиламин (Kujawska et al., 2011). Екстракт от *Aronia melanocarpa* повишава активността на SOD и GPO при пациенти с метаболитен синдром (Broncel et al., 2010).

Запазването на активността на антиоксидантните ензими от ПСАМ вероятно допринася за протективния ефект на сока при АД-индуцираната пневмоксичност. Вероятно поради способността си да залавя РКВ ПСАМ намалява тяхното увреждащото действие върху клетъчните функции, като по този начин запазва капацитета на клетките да произвеждат антиоксидантни ензими. Тези ензими, от своя страна, биха могли да повишават протекцията на белодробните клетки срещу оксидативното увреждане.

В литературата няма данни за ефекта на АД върху нивата на IL-6 и IL-10. IL-6 е мощен, плейотропен провъзпалителен цитокин, секретран от Т-клетки и макрофаги. Той се произвежда в мястото на възпалението и играе ключова роля в острофазовите отговори, които се дефинират чрез множество клинични и биологични особености като например производството на острофазови протеини. В настоящото проучване най-високи са серумните нива на IL-6 на 3<sup>-ти</sup> и 5<sup>-ти</sup> ден след инстилацията на АД. Но дори и на 28<sup>-ми</sup> ден все още има в известна степен повишено серумно ниво на IL-6. Известно е, че когато активността на IL-6 като проинфламаторен цитокин персистира, остро възпаление преминава в хронично възпаление, което включва имунни отговори (Gabay, 2006). Оказва се, че IL-6 играе важна роля в иницирането и развитието на фиброзата (Delaunois, 2004). В настоящото изследване АД предизвиква значимо повишаване на серумния IL-6, което може би е резултат от преминаване на IL-6 от белодробната тъкан в циркулацията (Kido et al., 2011). ПСАМ предотвратява АД-индуцираното повишение на IL-6. Плъховете, третирани с ПСАМ, имат значимо по-ниски нива на IL-6 в сравнение с АД група, а на 10<sup>-ти</sup> ден – дори по-ниски и от контролната стойност. На 28<sup>-ми</sup> ден нивата на IL-6 са по-ниски при плъховете, получавали ПСАМ в първите 10 дни, отколкото след това (11-27 ден). Така, приложен в ранната фаза на възпалението, ПСАМ би могъл да предотврати преминаването от остро към хронично възпаление.

IL-10 е един от най-важните цитокини с противовъзпалителни свойства. Днес е известно, че способността за синтезиране на IL-10 не се ограничава до определени Т-клетъчни подгрупи, а е характерна за почти всички левкоцити (Wolk et al., 2002). Синтезата на IL-10 обик-

новено настъпва в резултат на остри и хронични възпалителни реакции, а неутрализирането на IL-10 често изостря възпалителни лезии (Avdiushko et al., 2001). АД предизвиква понижаване на IL-10 в серума на плъховете, докато ПСАМ антагонизира този ефект на АД, което вероятно допринася за противовъзпалителния ефект на ПСАМ.

Установените в това проучване ефекти на ПСАМ върху интерлевкините са в съответствие с противовъзпалителната активност на флавоноидите, които са важна съставка на сока. Данни на Tsuda et al. (2002) и Gauliard et al. (2008) показват, че флавоноидите, включително антоцианини, потискат освобождаването на проинфламаторни цитокини като TNF- $\alpha$  и интерлевкини (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8).

Тъй като белодробният ХП се получава почти изключително от колаген (Crystal, 1974), цялото съдържание на колаген в белия дроб се оценява чрез измерване на нивата на ХП. Фиброзният отговор в АД група се потвърждава от значимото повишение на белодробния ХП над контролните стойности. ПСАМ, прилаган както по време на първите 10 дни, така и от ден 11 до ден 27, потиска ефекта на АД. Нивата на ХП при плъховете, третирани с ПСАМ, не се различава значимо от контролните стойности, но ефектът на ПСАМ е относително по-изразен при плъховете, третирани със сок през първите 10 дни след интратрахеалната инстилация на АД.

#### **4.3. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* в експериментален модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност при плъхове**

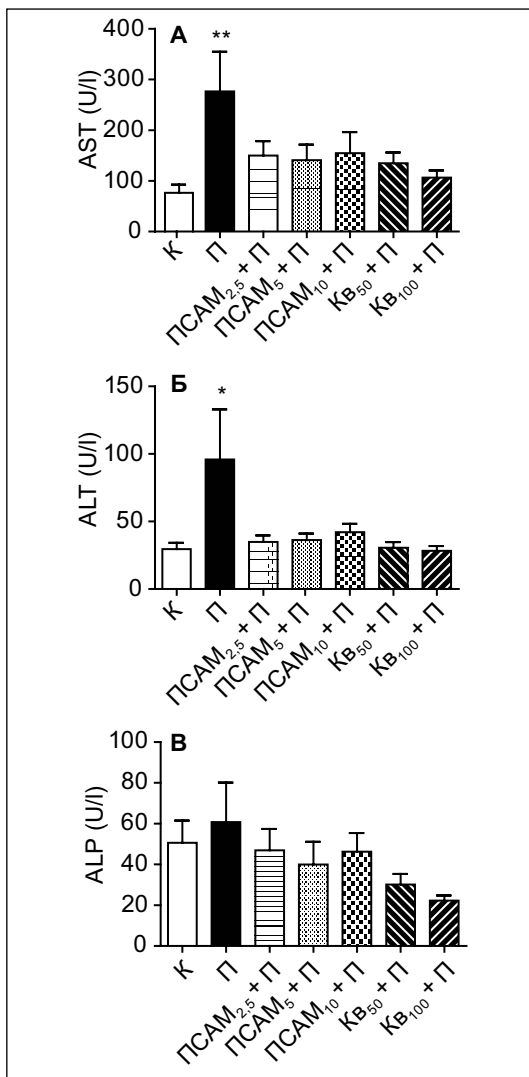
Мъжки Wistar плъхове ( $n = 70$ ; 200-250 g) са разделени в 7 групи по 10 броя както следва: Контрола (К), Парацетамол (П), ПСАМ<sub>2.5</sub> + П, ПСАМ<sub>5</sub> + П, ПСАМ<sub>10</sub> + П, Кв<sub>50</sub> + П и Кв<sub>100</sub> + П. ПСАМ е прилаган перорално чрез интрагастрална сонда от 1<sup>-ви</sup> до 7<sup>-ми</sup> ден в дози 2.5 ml/kg, 5 ml/kg и 10 ml/kg. Дозите 2.5 ml/kg и 5 ml/kg са разреждани съответно до 10 ml/kg с дестилирана вода. Кверцетинът в дози 50 mg/kg и 100 mg/kg е приготвян с помощта на 2% Tween 80 като суспензия, която също е прилагана перорално в доза 10 ml/kg от 1<sup>-ви</sup> до 7<sup>-ми</sup> ден. Парацетамолът в доза 1.0 g/kg с помощта на 2% Tween 80 е приготвян като суспензия с дестилирана вода, която е инжектирана в количество 4.0 ml/kg на 5<sup>-ти</sup> ден 2 часа след съответното перорално третиране на животните. Контролната група е получила интраперитонеално 2% Tween 80 в дестилирана вода (4.0 ml/kg). На 7<sup>-ми</sup> ден 48 часа след инжектирането на парацетамола и 2 часа след последното перорално

третиране под етерна наркоза е вземана кръв от подезичните вени за приготвяне на серум за биохимични изследвания. След декапитация на животните е вземан черен дроб за приготвяне на хомогенат за биохимични изследвания.

#### **4.3.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху активността на чернодробни ензими в серум**

Активностите на аспартат аминотрансферазата (AST), аланин аминотрансферазата (ALT) и алкалната фосфатаза (ALP) при плъховете от група П са съответно 3.6 пъти, 3.2 пъти и 1.2 пъти по-високи от тези на контролната група. Така парацетамолът предизвиква значимо повишаване на серумните активности на AST и ALT, и не оказва значим ефект върху активността на ALP (Фиг. 35). ПСАМ в трите използвани дози противодейства на парацетамол-индуцираното повишение на чернодробните ензими. Активностите на AST и ALT при плъховете, третирани с ПСАМ, не се различават значимо от тези на контролните плъхове (Фиг. 35А, Фиг. 35Б). Активностите на ALP при групите, третирани с ПСАМ, са съизмерими или дори по-ниски от контролните стойности (Фиг. 35В). Кверцетинът в двете използвани дози също предотвратява парацетамол-индуцираното повишение на ензимните активности. При групите  $Kv_{50} + П$  и  $Kv_{100} + П$  активностите на AST, ALT и ALP не се различават значимо от контролните нива, като стойностите на ALP са по-ниски от контролните. При групите, третирани с кверцетин, нивата на чернодробните ензими са относително по-ниски от тези на групите, третирани с ПСАМ, но тази разлика не е статистически значима (Фиг. 35).

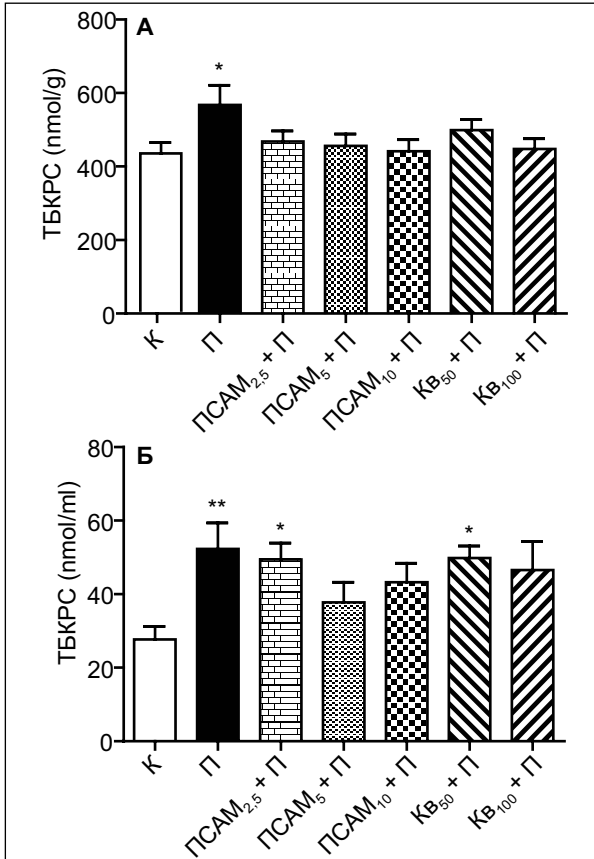




**Фиг. 35.** Ефект на PCAM в дози 2.5 ml/kg, 5 ml/kg и 10 ml/kg и на кверцетин (Кв) в дози 50 mg/kg и 100 mg/kg върху серумните нива на AST (панел А), ALT (панел Б) и ALP (панел В) при плъхове в модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност. Резултатите са представени като средна стойност±SEM; n = 10; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 спрямо контролата

#### 4.3.2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху реагиращи с тиобарбитуровата киселина субстанции в чернодробен хомогенат и в серум

Парацетамолът предизвиква липидна пероксидация, която се потвърждава от значимо повишаване на нивата на ТБКРС в черния дроб (130% от контролната стойност) (Фиг. 36А).



**Фиг. 36.** Ефект на ПСАМ в дози 2.5 ml/kg, 5 ml/kg и 10 ml/kg и на кверцетин (Кв) в дози 50 и 100 mg/kg върху нивата на ТБКРС в чернодробен хомогенат (панел А) и в серум (панел Б) при плъхове в модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност. Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM;  $n = 10$ ; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  спрямо контролата

В групи ПСАМ<sub>2,5</sub> + П, ПСАМ<sub>5</sub> + П и ПСАМ<sub>10</sub> + П чернодробните нива на ТБКРС са съответно 107%, 105% и 102% от контролната стойност. В групи Кв<sub>50</sub> + П и Кв<sub>100</sub> + П нивата на ТБКРС в чернодробен хомогенат са съответно 115% и 110% от контролната стойност. По този начин както ПСАМ в трите дози, така и двете дози кверцетин предотвратяват повишението на ТБКРС в черния дроб и при третираниите с тях животни чернодробните ТБКРС не се различават значимо от контролната стойност (Фиг. 36А).

Серумът на животните от група П съдържа ТБКРС, които са статистически значимо по-високи от тези на контролната група ( $p < 0.05$  спрямо контролата; 190% от контролната стойност). ПСАМ противодейства на този ефект на парацетамола, като в групите ПСАМ<sub>2,5</sub> + П, ПСАМ<sub>5</sub> + П и ПСАМ<sub>10</sub> + П нивата на серумните ТБКРС са съответно 178%, 136% и 156% от тези на контролата. При този резултат нивата на ТБКРС на група ПСАМ<sub>2,5</sub> + П са значимо по-високи от контролната стойност, а тези на групи ПСАМ<sub>5</sub> + П и ПСАМ<sub>10</sub> + П не се различават значимо от контролното ниво (Фиг. 36Б). Кверцетинът също намалява ефекта на парацетамола върху серумните ТБКРС. В групите Кв<sub>50</sub> + П и Кв<sub>100</sub> + П нивата на серумните ТБКРС са съответно 179% и 168% от тези на контролата. Така серумните нива на ТБКРС на група Кв<sub>50</sub> + П са значимо по-високи от контролната стойност, а тези на група Кв<sub>100</sub> + П не се различават значимо от контролното ниво (Фиг. 36Б).

#### **4.3.2. Обсъждане**

В литературата няма данни за изследване на ефекта на *Aronia melanocarpa* при парацетамол-индуцирана хепатотоксичност. В предишно изследване на нашия колектив е доказан изразен хепатопротективен ефект на ПСАМ в модел на карбон тетрахлорид-индуцирана хепатотоксичност при плъхове, при който водещият механизъм на увреждането е оксидативният стрес (Valcheva-Kuzmanova et al., 2004).

Литературните данни показват, че метаболитът на парацетамол N-ацетил-Р-бензохинонимин (NAPQI) се свързва с протеините в митохондриите и предизвиква митохондриален оксидативен стрес (Jaeschke et al., 2013), който в крайна сметка води до апоптоза (Nakagawa et al., 2008) и клетъчна некроза (Bajt et al., 2008). Всъщност митохондриите са идентифицирани като основен източник на РКВ и образуване на пероксинитрит (Cover et al., 2005).

Оксидативният стрес при парацетамол-индуцираната хепатотоксичност се демонстрира с повишаване на нивата на ТБКРС. В на-

стоящия експеримент нивата на ТБКРС се повишават 1.3 пъти в черния дроб и около 2 пъти – в серума. Тези данни са в съответствие с данните на други автори (Ajith et al., 2007a; Wu et al., 2008; Kumari and Kakklar, 2012), в чиито експерименти при парацетамол-индуцирана токсичност нивата на ТБКРС се увеличават 2-4 пъти, понякога дори по-малко от 2 пъти в сравнение с изходното ниво. Счита се, че такива нива на липидни пероксиди са по-ниски от необходимите за предизвикване на клетъчно увреждане. По този начин, независимо че липидната пероксидация е малко вероятен механизъм на клетъчна смърт (Jaeschke et al., 2003), продуктите на липидната пероксидация (ТБКРС) при парацетамоловата токсичност са важен маркер на оксидативния стрес в тъканта. Оксидативният стрес, ако не чрез липидните пероксиди, то по други механизми (в митохондриите) отключва апоптозата и клетъчната некроза.

При хора и при гризачи CYP2E1 и CYP1A2 са основните ензими, чрез които се получава хепатотоксичният метаболит NAPQI (Kalsi et al., 2011). Особено важна е изоформата CYP2E1, която участва в генерирането на РКВ като супероксиден йон и хидроген пероксид и може да има отношение към токсичния ефект на множество ксенобиотици (Lee et al., 1996). Освен това мишки без ген за CYP2E1, подложени на парацетамол, са много по-слабо податливи на неговия хепатотоксичен ефект в сравнение с дивия тип животни (Shayiq et al., 1999).

Резултатите от настоящото проучване показват, че ПСАМ в трите приложени дози (2.5 ml/kg, 5 ml/kg и 10 ml/kg) понижава биохимичните маркери на парацетамол-индуцирано чернодробно увреждане и оксидативен стрес при плъхове, като ефектите са съпоставими с тези на кверцетин (50 mg/kg и 100 mg/kg). Най-малко два механизма биха могли да участват в този ефект на ПСАМ. Единият от механизмите вероятно включва изключително високата антиоксидантна активност на ПСАМ и способността му да залавя РКВ. Тази активност е много проучвана и категорично доказана (Zheng and Wang, 2003; Wu et al., 2004; Oszmianski and Wojdylo, 2005; Valcheva-Kuzmanova et al., 2007; Jakobek et al., 2011). Другият възможен механизъм е ефект на ПСАМ върху ензимите, участващи в метаболизма на парацетамола. Проучване на Krajka-Kuźniak et al. (2009) показва, че сок от *Aronia melanocarpa* понижава активността на CYP1A1 и CYP1A2, а претретирането със сок допълнително намалява понижената от N-нитрозодиетиламин активност на CYP2E1. Тези данни показват, че ПСАМ би могъл да понижава генерирането на токсичния метаболит на парацетамола NAPQI.

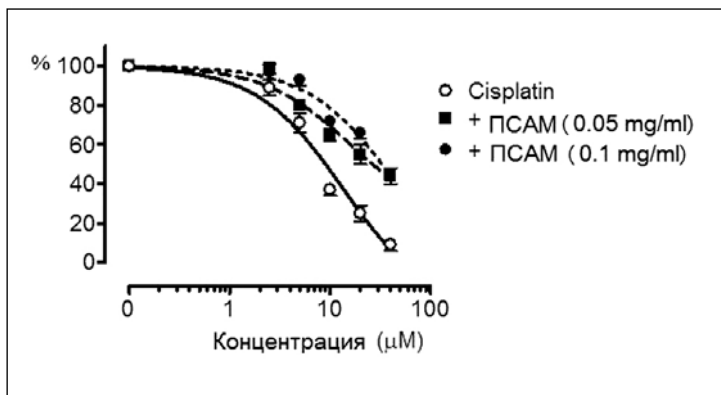
В настоящия експеримент ефектът на ПСАМ е сравним с този на кверцетин. Кверцетинът е флавоноид, който е изключително широко проучван. В последните години има и данни за ефекта на кверцетин в модели на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност, които показват добър протективен ефект на този флавоноид (Janbaz et al., 2004; Yousef et al., 2010; Singh et al., 2011), сравним с този на N-ацетилцистеин – утвърдения антидот при отравяне с парацетамол. В тези проучвания хепатопротективният ефект на кверцетин е съпроводен с понижаване на оксидативния стрес и повишаване на антиоксидантната защита на животните. Guzu et al. (2004) изследват ефекта на кверцетин върху парацетамол-индуцираната митохондриална дисфункция. Авторите установяват, че парацетамолът предизвиква значими промени в митохондриалната дихателна верига и в активността на митохондриалната АТФ-аза, а кверцетинът противодейства на тези ефекти на парацетамола благодарение на антиоксидантния си потенциал.

#### **4.4. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* в модел на цисплатин-индуцирана токсичност**

##### **4.4.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху цисплатин-индуцирана токсичност на клетъчна култура**

Нефропротективният потенциал на ПСАМ е оценен в модел на цисплатин-индуцирана цитотоксичност на човешка ембрионална бъбречна клетъчна линия HEK293T. За тази цел противотуморното лекарство е прилагано в повишаващи се концентрации (до 40  $\mu\text{M}$ ) или самостоятелно, или след 24-часово претретиране на клетките с ПСАМ в концентрации 0.1 mg/ml и 0.05 mg/ml.

При самостоятелно приложение за 72 часа цисплатинът предизвиква силно понижаване на жизнестта на HEK293T клетки с почти пълна ерадикация на жизнестите клетки при най-високата използвана концентрация 40  $\mu\text{M}$  (Фиг. 37).



**Фиг. 37.** Цитотоксичен ефект на цисплатин, прилаган самостоятелно или след 24-часово претретиране с ПСАМ в концентрации 0.1 mg/ml и 0.05 mg/ml; на абсцисата – концентрация на цисплатин ( $\mu\text{M}$ ); на ординатата – % жизнени клетки (% от нетретираната контрола)

Концентрацията на цисплатин, която предизвиква инхибиране на 50% от клетките ( $\text{IC}_{50}$ ), е  $8.3 \pm 1.1 \mu\text{M}$ . Както е видно от промяната на кривата концентрация-отговор и от получените стойности на  $\text{IC}_{50}$ , ПСАМ значимо отслабва *in vitro* нефротоксичността на платиновото лекарство по концентрация-зависим начин (Фиг. 37). Стойностите на  $\text{IC}_{50}$  след комбинираното приложение на цисплатин и ПСАМ са съответно  $25.1 \pm 2.7 \mu\text{M}$  (при ПСАМ 0.05 mg/ml) и  $34.4 \pm 3.4 \mu\text{M}$  (при ПСАМ 0.1 mg/ml). И двете стойности са значимо по-високи ( $p < 0.001$ ) от  $\text{IC}_{50}$  на цисплатин, приложен самостоятелно.

#### 4.4.2. Обсъждане

Цисплатин е ефективно химиотерапевтично лекарство, което е широко използвано при лечението на много злокачествени тумори. Най-често срещаният му неблагоприятен ефект, нефротоксичност, ограничава използването на това лекарство при много пациенти с рак. Експериментални данни показват, че цисплатин влошава бъбречната функция и скоростта на гломерулна филтрация по доза-зависим начин (Yao et al., 2007).

Въпреки че механизмите, участващи в цисплатин-индуцираната нефротоксичност, са широко проучвани, те все още не са напълно изяснени. Напречни връзки на цисплатин с ДНК се считат за цито-

токсичната лезия в туморни и други дялящи се клетки. Непролифериращите клетки са по-малко чувствителни към токсичността на ДНК-увреждащите средства, но клетките на проксималните тубули селективно биват унищожавани от цисплатин. От съществено значение за нефротоксичността на цисплатин в проксимални тубулни клетки е метаболитното му активиране. Изследвания както *in vivo*, така и на клетъчни култури представят доказателства, че цисплатин се метаболизира до нефротоксин, при което се минава през междинен конюгат на цисплатин с редуциран глутатион. Гама-глутамил трансферазата е първият ензим в метаболитния път за активиране на цисплатин-глутатионовия конюгат до нефротоксин (Townsend et al., 2003).

Предишни изследвания показват, че цисплатин води до тежки увреждания на бъбречната тъкан чрез комбинация от механизми, включващи образуването на РКВ (Atessahin et al., 2005), засилване на липидната пероксидация (Silici et al., 2010) и изчерпване на ензимните и неензимните антиоксиданти (Ajith et al., 2007b; Naqshbandi et al., 2012), митохондриална дисфункция, инхибиране на синтеза на протеини, увреждане на ДНК в бъбреците и апоптоза (Santos et al., 2007). Увеличените от цисплатин РКВ могат да доведат директно или индиректно, чрез няколко редокс-чувствителни сигнални пътища, до некроза и апоптоза на тубулните епителни клетки (Francescato et al., 2009; Lopez-Novoa et al., 2011). Клетъчната некроза и деструкция на тъканта е силен провъзпалителен стимул и активира възпалителен отговор, разширяващ тъканното увреждане, което от своя страна допълнително изостря възпалението (Yano et al., 2007; Pabla and Dong, 2008). Оказва се, че оксидативният стрес играе важна роля както в първичната клетъчна и тъканна деструкция, така и във вторичната възпалителна реакция (Valério et al., 2009). РКВ могат да предизвикват възпалителни процеси чрез активиране на транскрипционни фактори като нуклеарен фактор-кВ (NF-кВ), който от своя страна индуцира производството на провъзпалителни цитокини като тумор некротичен фактор- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

Подходът за идентифициране на естествено срещащи се хранителни източници и използването им като цитопротектори осигурява стратегия, която е от голям интерес за химиотерапията. В действителност редица проучвания оценяват широк спектър от антиоксиданти като потенциални бъбречни цитопротектори с оглед прилагането им като добавки към химиотерапията с цисплатин.

Клетъчните култури често се използват за изясняване на механизмите на оксидативния стрес, а също и за оценка на защитните

ефекти на различни антиоксиданти. Предимството на използването на клетъчни култури е, че различните антиоксиданти и клетъчни типове, включително моделни системи за някои специфични заболявания, могат да бъдат използвани за оценка на антиоксидантно действие (Niki, 2010). При перорален прием много от хранителните флавоноиди и полифеноли се появяват в кръвоносната система не като изходните съединения, а като глюкурониди, сулфати и метилирани метаболити с напълно различна структура от изходните съединения. В случая с *Aronia melanocarpa* благоприятно е това, че нейните антоцианини са в голяма степен непроменени в серума и урината, което прави извършените проучвания с изолирани клетки и клетъчни линии в по-висока степен физиологично реалистични и свързани с потенциалните ползи за здравето.

Резултатите от настоящото изследване са в съответствие с многобройни експериментални данни за протективния ефект на хранителни антиоксиданти (Chirino and Pedraza-Chaverri, 2009), включително растителни полифеноли при цисплатин-индуцирана нефротоксичност. Sanchez-Gonzalez et al. (2011) показват, че кверцетин, един от флавоноидите в ПСАМ, предотвратява нефротоксичия ефект от цисплатин, без да засяга неговата антитуморна активност. Има данни, че кверцетин може да потисне липополизахарид-индуцираната продукция на TNF- $\alpha$  и NO чрез намаляване на активността на NF- $\kappa$ B в макрофаги, микроглиални клетки и мастоцити (Rahman, 2002). Francescato et al. (2004) показват, че кверцетин оказва защитен ефект при цисплатин-индуцирана остра тубуларна некроза при плъхове, което е свързано с намаляване NF- $\kappa$ B.

Като се има предвид мултимодалната активност на полифенолите, които са в изобилие в ПСАМ, очертаването на механизма на нефропротективния ефект на сока изисква допълнителни изследвания. Въпреки това, тъй като изчерпването на глутатиона и генерирането на РКВ играят централна роля в токсичните ефекти на цисплатин, бихме могли да предположим, че наблюдаваният в това проучване протективен ефект на ПСАМ най-вероятно се дължи на силното му антиоксидантно действие, което е демонстрирано от много изследователи (Zheng and Wang, 2003; Wu et al., 2004; Oszmianski and Wojdylo, 2005; Valcheva-Kuzmanova et al., 2007; Jakobek et al., 2011; Valcheva-Kuzmanova et al., 2012).



#### **4.5. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* в експериментален модел на етанол-индуциран оксидативен стрес при плъхове**

Използвани са 40 мъжки Wistar плъха (200 – 250 g). Животните са разпределени по 8 броя в 5 експериментални групи: I (Контрола), II (Ет.), III (ПСАМ<sub>2,5</sub> + Ет.), IV (ПСАМ<sub>5</sub> + Ет.) и V (ПСАМ<sub>10</sub> + Ет.). Експерименталните вещества са прилагани перорално чрез сондиране като претретиране (от 1<sup>ви</sup> до 6<sup>ти</sup> ден) и като третиране (на 4<sup>ти</sup>, 5<sup>ти</sup> и 6<sup>ти</sup> ден 1 час след съответното претретиране). Претретирането е: I и II група – дестилирана вода 10 ml/kg; III група – ПСАМ 2.5 ml/kg; IV група – ПСАМ 5 ml/kg; V група – ПСАМ 10 ml/kg. Третирането е: I група – дестилирана вода 12 ml/kg; всички останали групи – етанол в доза 4.8 g/kg като 48% разтвор с обем 12 ml/kg.

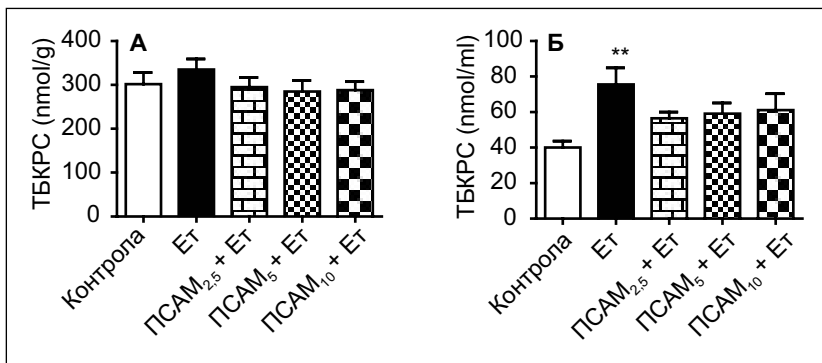
На 6<sup>та</sup> ден 3 часа след последното третиране под етерна наркоза от сублингалните вени е вземана кръв, от която е получавана плазма. След декапитация на животните от чернодробна тъкан е приготвян хомогенат. Концентрациите на реагиращите с тиобарбитуровата киселина субстанции (ТБКРС) са определяни в кръвната плазма и чернодробния хомогенат.

##### **4.5.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху нивата на реагиращи с тиобарбитуровата киселина субстанции в чернодробен хомогенат и в плазма**

Етанолът не предизвиква значима промяна в съдържанието на ТБКРС в черния дроб на третираните с него плъхове. В чернодробния хомогенат на плъховете от Ет. група ТБКРС са с 11% по-високи от контролната стойност. ТБКРС в чернодробния хомогенат на плъховете от групи ПСАМ<sub>2,5</sub> + Ет., ПСАМ<sub>5</sub> + Ет. и ПСАМ<sub>10</sub> + Ет. са съответно 98%, 94% и 95% от контролната стойност. Така в чернодробния хомогенат етанолът предизвиква повишение на ТБКРС, което не е статистически достоверно (Фиг. 38А), а ПСАМ в трите дози противодейства на тенденцията за етанол-индуцираното повишение на ТБКРС в черния дроб (Фиг. 38А).

Предизвиканата от етанола липидна пероксидация се потвърждава от значимо повишаване на нивата на ТБКРС в плазмата (191% от контролната стойност) (Фиг. 38Б). В групи ПСАМ<sub>2,5</sub> + Ет., ПСАМ<sub>5</sub> + Ет. и ПСАМ<sub>10</sub> + Ет. нивата на ТБКРС са съответно 141%, 148% и 153% от контролната стойност. По този начин претретирането с трите дози ПСАМ води до задържане на нивата на ТБКРС в плазмата до стой-

ности, които не се различават значимо от тези на контролната група (Фиг. 38Б).



**Фиг. 38.** Ефект на PCAM в дози 2.5 ml/kg, 5 ml/kg и 10 ml/kg върху нивата на TBKPC в чернодробен хомогенат (панел А) и в плазма (панел Б) при плъхове в модел на остър алкохол-индуциран оксидативен стрес. Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM;  $n = 8$ ; \* $p < 0.05$  спрямо контролата

#### 4.5.2. Обсъждане

Токсичността на етанола се дължи не само на директното му действие, но и на метаболитните продукти, вкл. РКВ, които се получават при неговата биотрансформация (Brocardo et al., 2011). Етанолът се метаболизира по три основни пътя с участието на алкохол дехидрогеназа, микрозомална оксидираща система (цитохром P450 2E1) и алдехид оксидаза (Mira et al., 1995; Lieber, 1997). И трите пътя имат за резултат генериране на РКВ, вкл. супероксидни и хидроксилни аниони, и водороден пероксид, които водят до цялостно повишаване на оксидативния стрес в организма (Nordmann et al., 1992; Brocardo et al., 2011).

Оксидативният стрес настъпва, когато клетъчната антиоксидантна защита е недостатъчна да се справи с натрупването на РКВ, които предизвикват дисфункция на клетъчните мембранни системи, протеини и ДНК. Полиненаситените мастни киселини в мембранните двуслойни структури са основните мишени на атака от РКВ (Gutteridge, 1995), които инициират в мембраните процес на липидна перок-

сидация. Веднъж иницирана, липидната пероксидация продължава като верижна реакция да генерира липидни пероксиди и алдехиди. Натрупването на хидропероксиди в клетъчната мембрана може да има цялостен ефект върху нейния пермеабилитет и селективност и в крайна сметка води до промяна в клетъчната хомеостаза и метаболизъм (Chen et al., 1995). Маркер на липидната пероксидация са ТБКРС.

Токсичността на етанола, респективно създаваният от него оксидативен стрес в организма биха могли да се понижат чрез прилагане на хранителни антиоксиданти. Медицинските растения привличат все повече интереса на изследователите поради това, че те са важен източник на антиоксиданти (Halliwell et al., 2005).

Резултатите от настоящото проучване показват, че 3-дневното приложение на алкохол при плъхове създава оксидативен стрес, който се манифестира с повишаване на маркерите на липидната пероксидация в плазмата. Подобен модел на остро приложение на алкохол с цел създаване на оксидативен стрес е използван и от други изследователи (Nadro et al., 2006). Данните от настоящия експеримент са в съответствие с данните от други опити, които също не установяват достоверно повишаване на липидните пероксиди в черния дроб от етанола (Inomata et al., 1987; Speisky et al., 1985). Статистически достоверното повишаване на ТБКРС в плазмата и тенденцията за тяхното повишаване в черния дроб показва, че не само черният дроб е прицел на увреждащото действие на алкохола. Вероятно липидните пероксиди постъпват в плазмата и от други органи като бъбреци, мускули, бял дроб, черва и мозък, които също могат да метаболизират макар и по-малки количества от приетия етанол (Pawan, 1972).

ПСАМ понижава липидната пероксидация, като този ефект се дължи вероятно на съдържащите се в него фенолни антиоксиданти, които имат способността да залавят РКВ, образувани при метаболизма на етанола. Друг възможен механизъм, по който ПСАМ понижава етанол-индуцирания оксидативен стрес, би могъл да бъде ефект на сока върху ензимите, участващи в метаболизма на алкохола. Проучване на Krajka-Kuźniak et al. (2009) показва, че сок от *Aronia melanocarpa* допълнително намалява активността на CYP2E1, която е понижена от N-нитрозодиетилламин. Тези данни показват, че ПСАМ би могъл да понижава генерирането на РКВ в резултат на намален метаболизъм на етанола от микрозомалната оксидираща система цитохром P450 2E1.

## ИЗВОДИ

1. Основните биологично активни вещества в плодовия сок от *Aronia melanocarpa* са полифенолни съединения.
  - 1.1. Полифенолите с най-високо съдържание в плодовия сок от *Aronia melanocarpa* са проантоцианидини, фенолни киселини и флавоноиди предимно от субклас антоцианини.
  - 1.2. Общото съдържание на полифеноли в плодовия сок от *Aronia melanocarpa* е около 2 пъти по-високо от това на плодов сок от *Rubus caesius* (къпина) и около 1.5 пъти по-високо от това на плодов сок от *Punica granatum* (нар).
2. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* притежава висока антиоксидантна активност *in vitro*, проявена като способност да залавя ABTS<sup>+</sup>-радикал, галвиноксилен радикал и пероксиден радикал, както и като способност да предотвратява образуването на хидроксилни радикали.
  - 2.1. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* има много по-изразена способност да залавя ABTS<sup>+</sup>-радикал в сравнение с плодови сокове от къпина и нар.
  - 2.2. Има висока позитивна корелация между общата атиоксидантна активност и общото съдържание на полифеноли в изследваните плодови сокове от арония, къпина и нар.
3. При еднократно приложение плодовият сок от *Aronia melanocarpa* не повлиява значимо двигателната активност при плъхове. При субхронично приложение той доза-зависимо потиска двигателната активност и изследователското поведение при плъхове, без да нарушава хабитуацията на животните към нова среда.
4. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* проявява анксиолитично-подобен ефект при плъхове както при еднократно, така и при субхронично приложение. При еднократно приложение този ефект не е съпроводен със седация и нарушаване на работната памет.
5. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* при субхронично приложение подобрява обучението и паметта при млади/здрави плъхове.
6. При субхронично приложение плодовият сок от *Aronia melanocarpa* намалява депресивната симптоматика при плъховете.

7. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* при субхронично приложение не повлиява централната компонента на болката и не проявява централно аналгетично действие.
8. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* показва висока протективна активност при индуциран от стрептозотоцин диабет при плъхове, като:
  - предотвратява хипергликемията и запазва нивата на кръвната глюкоза до контролните стойности;
  - предотвратява стрептозотоцин-индуцираното повишение на плазмените триглицериди и ги задържа до стойности, които не се различават от контролните;
  - предотвратява индуцираното от стрептозотоцин повишение на липидната пероксидация в бъбреците, измерена чрез нивата на малонов диалдехид.
9. В експериментален модел на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност при плъхове плодовият сок от *Aronia melanocarpa*:
  - предотвратява повишението на съотношението бял дроб/телесно тегло и го запазва до контролните стойности;
  - предотвратява индуцираното от амиодарон повишение както на общото клетъчното съдържание в бронхоалвеоларна лаважна течност, така и на съдържанието на определени клетъчни видове (полиморфнонуклеарни клетки и лимфоцити);
  - запазва стойностите на биохимични показатели в бронхоалвеоларна лаважна течност (общ белтък и ензимите лактат дехидрогеназа, кисела фосфатаза и алкална фосфатаза) до контролните стойности, като противодейства на повишението им от амиодарон;
  - предотвратява индуцирания от амиодарон оксидативен стрес: понижава липидната пероксидация, измерена чрез нивата на малонов диалдехид, и повишава ендогенната антиоксидантна защита чрез повишаване на активностите на ензимите каталаза и глутатион пероксидаза в белодробен хомогенат;
  - намалява процесите на фиброзиране в белодробната тъкан, доказано чрез понижаване на съдържанието на хидроксипролин в белодробен хомогенат, като ефектът е

по-изразен при приложение на сока в ранните фази на възпалението;

- понижава възпалението при третираните с амиодарон плъхове, като предотвратява повишението на провъзпалителния цитокин IL-6 и понижението на противовъзпалителния цитокин IL-10 в серума на животните.

10. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* проявява много добър хепатопротективен ефект в експериментален модел на парацетамол-индуцирано чернодробно увреждане при плъхове:

- предотвратява индуцираното от парацетамол повишение на серумните нива на чернодробните ензими аспарат аминотрансфераза и аланин аминотрансфераза, като ефектът на сока е съизмерим с този на флавоноида кверцетин;
- предотвратява индуцираната от парацетамол липидна пероксидация, измерена чрез нивата на реагиращи с тиобарбитуровата киселина субстанции, като ефектът на сока е съизмерим с този на кверцетин.

11. В модел на цисплатин-индуцирана цитотоксичност плодовият сок от *Aronia melanocarpa* оказва протективен ефект върху клетките на човешка ембрионална бъбречна клетъчна линия HEK293T, като:

- отслабва *in vitro* цитотоксичността на цисплатин по концентрация-зависим начин;
- силно повишава концентрацията на цисплатин, предизвикваща инхибиране на 50% от клетките.

12. В експериментален модел на етанол-индуциран оксидативен стрес при плъхове плодовият сок от *Aronia melanocarpa* предотвратява липидната пероксидация, като запазва плазмената концентрация на реагиращите с тиобарбитуровата киселина субстанции до контролните стойности.

## СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За пръв път е установено, че общото съдържание на полифеноли в плодовия сок от *Aronia melanocarpa* е около 1.5 пъти по-високо от това на плодов сок от *Punica granatum* (нар) и около 2 пъти по-високо от това на плодов сок от *Rubus caesius* (къпина).
2. За пръв път е установено е, че плодовият сок от *Aronia melanocarpa* има много по-изразена способност да залавя ABTS<sup>+</sup>-радикал в сравнение с плодовите сокове от *Rubus caesius* (къпина) и *Punica granatum* (нар).
3. За пръв път е установена *in vitro* висока залавяща и обезвреждаща активност на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* по отношение на галвиноксиден радикал чрез електронно-спинов резонансен метод.
4. За пръв път е установена висока залавяща и обезвреждаща активност на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* по отношение пероксилни радикали както и висока способност на сока да предотвратява образуването на хидроксилни радикали.
5. За пръв път е показано, че плодовият сок от *Aronia melanocarpa* проявява психофармакологична активност, като при плъхове:
  - при еднократно приложение няма ефект върху двигателната активност, докато при субхронично приложение потиска двигателната активност и изследователското поведение вероятно вследствие на седативен ефект;
  - не нарушава хабитуацията, която се счита за елементарна форма на обучение;
  - има анксиолитично-подобен ефект както при еднократно, така и при субхронично приложение, като при еднократно приложение този ефект не е съпроводен със седация и нарушаване на работната памет;
  - при субхронично приложение подобрява обучението и паметта;
  - намалява депресивната симптоматика при субхронично приложение;

- при субхронично приложение не проявява централно аналгетично действие.
6. За пръв път е установено, че в модел на стрептозотоцин-индуциран диабет при плъхове плодовият сок от *Aronia melanocarpa* проявява много добър протективен ефект, като нормализира биохимичните маркери на метаболитни нарушения и оксидативен стрес.
  7. За пръв път е установено, че в експериментален модел на амиодарон-индуцирана белодробна токсичност при плъхове плодовият сок от *Aronia melanocarpa* оказва изразен протективен ефект, като повишава резистентността на алвеоло-капилярната мембрана, намалява белезите на оксидативен стрес, възпаление и пулмонална фиброза.
  8. За пръв път е установено, че в експериментален модел на парацетамол-индуцирано чернодробно увреждане при плъхове плодовият сок от *Aronia melanocarpa* проявява много добър хепатопротективен ефект, като понижава маркерите на хепатоцитна увреда и оксидативен стрес.
  9. За пръв път е установено, че в модел на цисплатин-индуцирана цитотоксичност плодовият сок от *Aronia melanocarpa* проявява цитопротективен ефект върху клетките на човешка ембрионална бъбречна клетъчна линия HEK293T, като по концентрация-зависим начин отслабва *in vitro* цитотоксичността на цисплатин.
  10. За пръв път е показано, че в експериментален модел на етанол-индуциран оксидативен стрес плодовият сок от *Aronia melanocarpa* предотвратява липидната пероксидация.
  12. Направените проучвания с плодов сок от *Aronia melanocarpa* допринасят за разширяване на предклиничните данни за ефектите на полифенолите върху функциите на централната нервна система и са в подкрепа на усилията за търсене на природни продукти за лечение на социално значими болести като депресия, тревожност и нервно-дегенеративни заболявания.
  13. Изследванията на протективните ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* в модели на органични увреждания и оксидативен стрес показват важната роля на растителните продукти при диабет и лекарствена токсичност.



14. Всички демонстрирани полезни ефекти на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* могат да индуцират изследвания на други растителни продукти с подобен състав на биологично активни вещества и да послужат за създаване на лекарствени продукти и хранителни добавки с полезни за здравето свойства.

## **СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

1. Valcheva-Kuzmanova S, Ivanova D, Belcheva A (2006) Total phenolic content and in vitro antioxidant activity of fruit juices from *Aronia melanocarpa*, *Punica granatum* and *Rubus caesius*. *Bulletin of the Medical Institute after Mehrabyan* 2: 5-9.
2. Valcheva-Kuzmanova S (2007) Flavonoids and the central nervous system – effects on memory, anxiety and depression. „Ovidius” University Annals of Medical Science - Pharmacy V(1): 73-79.
3. Valcheva-Kuzmanova S (2009) Anthocyanins and the brain. *Bulletin of the Medical Institute after Mehrabyan* 5: 63-72.
4. Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Galunska B, Chervenkov T, Gerova D, Ivanova D (2007) Influence of *Aronia melanocarpa* fruit juice on the process of lipid peroxidation in rats with streptozotocin-induced diabetes. “Ovidius” University Annals of Medical Science-Pharmacy IV (1): 11-15.
5. Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K, Tancheva S, Belcheva A (2007) Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in streptozotocin-induced diabetic rats. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 29(2): 101-105. (IF=0.808)
6. Вълчева-Кузманова С (2011) Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* в модел на остър алкохол-индуциран оксидативен стрес при плъхове. *Здраве и наука* 3: 11-14.
7. Valcheva-Kuzmanova S, Blagović B, Valić S (2012) Electron spin resonance measurement of radical scavenging activity of *Aronia melanocarpa* fruit juice. *Pharmacogn Mag* 8(30): 171-174. (IF=1.525)
8. Вълчева-Кузманова С, Ефтимов М, Белчева И, Ташев Р, Белчева С (2012) Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху болковата чувствителност при плъхове. *Здраве и наука* 2: 19-22.
9. Valcheva-Kuzmanova S, Stavreva G, Dancheva V, Terziev L, Atanasova M, Stoyanova A, Shopova V (2012) Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on indices of inflammation and fibrosis in a rat model of amiodarone-induced pneumotoxicity. *Scr Sci Med* 44(2): 37-40.

10. Valcheva-Kuzmanova S, Stavreva G, Dancheva V, Terziev L, Dimitrova A, Shopova V (2012) Effect of Aronia melanocarpa fruit juice on the activity of antioxidant enzymes in a rat model of amiodarone-induced pneumotoxicity. *J Biomed Clin Res* 5(2): 97-103.
11. Valcheva-Kuzmanova S, Eftimov M, Belcheva I, Tashev R, Belcheva S (2013) Effect of Aronia melanocarpa fruit juice on learning and memory in the two-way active avoidance task in rats. *J Biomed Clin Res* 6(1): 18-23.
12. Valcheva-Kuzmanova S, Belcheva A, Momekov G (2013) Protective effect of Aronia melanocarpa fruit juice in a model of cisplatin-induced cytotoxicity in vitro. *Folia Medica* 3-4: 76-79.
13. Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov K (2014) Protective effect of Aronia melanocarpa fruit juice in a model of paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. In: *Toxicological Problems*, Eds. Dishovsky C, Radenkova J, Military Publishing House, Sofia, pp. 160-166.
14. Вълчева-Кузманова С, Денев П, Крачанова М, Сурлева А, Белчева А (2014) Състав и антиоксидантна активност на плодов сок от Aronia melanocarpa. *Варненски медицински форум 1* (под печат).
15. Valcheva-Kuzmanova SV, Eftimov MTz, Tashev RE, Belcheva IP, Belcheva SP (2014) Memory effects of Aronia melanocarpa fruit juice in a passive avoidance test in rats. *Folia Medica* (in press).

