

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

---

**Мирослав Цонков Ефтимов**

**ФАРМАКОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА ЕФЕКТА  
НА ПЛОДОВ СОК ОТ *ARONIA MELANOCARPA*  
В ПОВЕДЕНЧЕСКИ МОДЕЛИ ПРИ ПЛЪХОВЕ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на  
образователна и научна степен „ДОКТОР“  
по научна специалност „Фармакология“

**Научни ръководители:**

Доц. д-р Стефка Василева Вълчева-Кузманова, д.м.н.  
Доц. д-р Роман Емилов Ташев, д.м.

Варна, 2015 г.

*Дисертационният труд е обсъден на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по предклинична и клинична фармакология при Медицински университет – Варна, състояло се на 27.02.2015 г., и е насочен за публична защита пред научно жури в състав:*

- 1. доц. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н. – председател (становище)*
- 2. проф. Рени Калфин, доктор (рецензия)*
- 3. проф. д-р Анна Беронова, д.м.н. (становище)*
- 4. доц. д-р Мария Желязкова-Савова, д.м. (рецензия)*
- 5. доц. д-р Галя Ставрева-Маринова, доктор (становище)*

*Дисертационният труд съдържа общо 165 страници, онагледен е с 87 фигури и 25 таблици. Книгописът включва 306 заглавия на латиница.*

*Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 09.06.2015 г. от 14.00 ч. 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 .....	6
<b>I. ВЪВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>7</b>
<b>II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....</b>	<b>10</b>
<b>III МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Материали.....</b>	<b>12</b>
1.1. Експериментални животни.....	12
1.2. Използвани фармакологични средства.....	12
<b>2. Експериментални методи.....</b>	<b>14</b>
2.1. Методи за определяне на съдържанието на полифеноли в плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> .....	14
2.1. Поведенчески методи.....	14
2.2. Биохимични методи.....	16
2.3. Статистически методи.....	16
<b>IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ .....</b>	<b>17</b>
<b>1. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху двигателната активност и изследователското поведение при млади/здрави плъхове – експерименти в апарат Opto Varimex.....</b>	<b>17</b>
1.1. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху изследователското поведение при плъхове .....	17
1.2. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху общата двигателна активност при плъхове.....	25
1.3. Обсъждане.....	27
<b>2. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху тревожността при млади/ здрави плъхове .....</b>	<b>29</b>
2.1. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху тревожността при млади/здрави плъхове, изследван в повдигнат кръстосан лабиринт.....	29
2.2. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху тревожността при млади/здрави плъхове, изследван в тест за социално взаимодействие.....	35
2.3. Обсъждане.....	36

<b>3.</b>	<b>Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху депресивната симптоматика при млади/здрави пльхове.....</b>	<b>39</b>
3.1.	Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху депресивната симптоматика на млади/здрави пльхове в тест за принудително плуване .....	39
3.2.	Обсъждане.....	40
<b>4.</b>	<b>Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху поведението на пльхове, подложени на социална изолация .....</b>	<b>44</b>
4.1.	Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху двигателната активност.....	44
4.2.	Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху тревожността.....	45
4.3.	Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху депресивната симптоматика .....	46
4.4.	Обсъждане.....	47
<b>5.</b>	<b>Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху индуцирани от алкохол поведенчески промени при пльхове.....</b>	<b>49</b>
5.1.	Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху двигателната активност.....	49
5.2.	Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху тревожността .....	50
5.3.	Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху депресивната симптоматика .....	52
5.4.	Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху оксидативния стрес в мозък.....	53
5.5.	Обсъждане.....	54
<b>6.</b>	<b>Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху поведението и оксидативния стрес при пльхове, подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм .....</b>	<b>56</b>
6.1.	Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху двигателната активност.....	57
6.2.	Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху тревожността .....	58

6.3. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху депресивната симптоматика .....	59
6.4. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху оксидативния стрес в мозък.....	60
6.5. Обсъждане.....	61
<b>7. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху резерпин-индуцирана хипокинезия и оксидативен стрес при плъхове.....</b>	<b>63</b>
7.1. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> и резерпин върху двигателната активност .....	64
7.2. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> и резерпин върху оксидативния стрес .....	65
7.3. Обсъждане.....	66
<b>V. ИЗВОДИ.....</b>	<b>68</b>
<b>VI. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....</b>	<b>69</b>
<b>VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>70</b>
<b>VIII. СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>71</b>

## Списък на често използваните съкращения

ACTH	– adrenocorticotropic hormone (адrenокортикотропен хормон)
BDNF	– brain derived neurotrophic factor (мозъчен невротрофичен фактор)
cAMP	– cyclic adenosine monophosphate (цикличесен аденозин монофосфат)
CREB	– cAMP response element-binding protein (цАМФ отговорен елемент свързващ протеин)
EGCG	– epigallocatechin gallate (епигалокатехин галат)
EPMT	– elevated plus maze test (тест в повдигнат кътосан лабиринт)
FST	– forced swim test (тест за принудително плуване)
HPLC	– high pressure liquid chromatography (високоефективна течна хроматография)
NMDA	– N-метил-D-аспартат
OFT	– open field test (тест открито поле)
SIT	– social interaction test (тест за социално взаимодействие)
ГАМК	– гамааминомаслена киселина
ДМСО	– диметилсулфоксид
КОМТ	– катехол-О-метилтрансфераза
МАО	– моноаминооксидаза
МДА	– малонов диалдехид
ПСАМ	– плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i>
ТБКРС	– реагиращи с тиобарбитурова киселина субстанции
ЦНС	– централна нервна система

# I. ВЪВЕДЕНИЕ

От векове хората се борят с най-различни заболявания. Някои от тях са с висока смъртност (епидемиите от чума и грип през средните векове, раковите заболявания в нашето съвремие), догато други водят до трайно влошаване на живота на боледуващите (сърдечно-съдови и психични заболявания). Едно от основните оръжия в тази борба са лекарствата. Огромното разнообразие от заболявания изисква и непрестанно търсене на нови лекарства. Въпреки че болшинството от съвременните лекарствени продукти се получават синтетично, има и множество лекарства с природен произход. Природата ни предоставя безкрайно много разнообразни съединения, притежаващи биологична активност. Един от най-значимите природни източници за получаването на лекарства са растенията. Могат да се дадат множество примери за лекарствени продукти от растителен произход – както отделни съединения (атропин, морфин, сърдечни гликозиди), така и растителни екстракти (от *Hipericum perforatum*, *Valeriana officinalis*, *Tribulus terrestris*). Независимо от досегашната изследователска работа, само малка част от всички видове растения са изследвани химически и фармакологично.

Полифенолите са едни от най-широко разпространените растителни съединения. Известни са над 8000 полифеноли, намиращи се основно в цветните растения. Срещат се във всички части на растението и се смята, че участват в защитата на растението от патогени или ултравиолетова радиация (Beckman, 2000). В последно време интересът към полифенолните съединения и към растенията, в които се съдържат, се повишава поради множеството им полезни за здравето ефекти. Добре известна е антиоксидантната активност на полифенолите (Scalbert et al., 2005; Pandey et al., 2009). Установени са и протективни ефекти при сърдечно-съдови заболявания, диабет, остеопороза и др. (Vita, 2005; Rao et al., 2012; Anhê et al., 2013). Потенциално предимство на тези природни съединения е, че те рядко имат нежелани ефекти (Taras, 2008). Има данни, че полифенолите или техни метаболити могат да преминават през кръвно-мозъчната бариера (El Mohsen et al., 2006; Andres-Lacueva et al., 2005; He et

al., 2009) и могат да бъдат полезни при заболявания на централната нервна система (Bouayed et al., 2007; Butterweck et al., 2007; Pasinetti et al., 2010).

Две от социалнозначимите психични заболявания в днешни дни са тревожните разстройства и депресията.

Тревожността е нормален емоционален отговор към определена заплаха, но когато е екстремна и постоянна, се класифицира като патологично състояние. Установено е, че една осма от човечеството страда от патологична тревожност (Eisenberg et al., 1998).

Според доклад на Световната здравна организация (2012) депресивните разстройства засягат над 350 милиона хора по света и са причина за продължаваща с години непълноценност на хората от всички възрасти.

*Aronia melanocarpa* е светлолюбив храст с родина Северна Америка, който се отглежда и у нас. Плодовете на аронията се консумират под формата на сок, сироп, сладко или вино и са изключително богати на полифенолни съединения – процианидини, флавоноиди главно от субклас антоцианини и фенолни киселини. Катедрата по предклинична и клинична фармакология към МУ – Варна има традиции в проучването на фармакологичната активност на плодовия сок от *Aronia melanocarpa*. Първото изследване на фармакологичен ефект на *Aronia melanocarpa* е направено от изследователски колектив на тази катедра. Установен е противовъзпалителен ефект на плодовия сок върху лапа на плъх (Borissova et al., 1994), а покъсно са доказани и множество други ефекти: хепатопротективен (Valcheva-Kuzmanova et al., 2004; Valcheva-Kuzmanova et al., 2014), антидиабетичен (Valcheva-Kuzmanova et al., 2007a), холестерол-понижаващ (Valcheva-Kuzmanova et al., 2007b). Интересът към *Aronia melanocarpa* е изключително висок, като изследователи от цял свят са провели стотици проучвания, при които са установени множество полезни ефекти.

Все още обаче някои активности на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* не са изследвани. Това са например ефектите му върху функциите на централната нервна система. Затова настоящият труд е насочен към установяването на централно-нервни ефекти на пло-



довия сок, по-специално анксиолитично-подобен и антидепресивно-подобен при опитни животни. Проучванията на тези активности на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* биха допринесли за по-пълното му фармакологично охарактеризиране, с произтичащите от това възможности за потенциалното му използване като лекарство за профилактика и лечение на често срещани, социалнозначими заболявания като депресивните и тревожните разстройства.

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Имайки предвид направените досега проучвания на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* и за да се постигне по-пълното му фармакологично охарактеризиране, използвахме експериментални фармакологични методи и модели за изследване на непроучени до този момент активности.

Поставихме си за цел **ЦЕЛ:**

**Изследване на психофармакологични ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa*:**

- **при млади/здрави плъхове;**
- **в експериментални модели на тревожно-депресивно поведение и нарушена двигателна активност при плъхове.**

**ЗАДАЧИ:**

1. Да се изследва ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* при субхронично приложение върху двигателната активност и изследователското поведение на млади/здрави плъхове.
2. Да се изследва ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* при субхронично приложение върху тревожността при млади/здрави плъхове.
3. Да се проучи ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* при субхронично приложение върху депресивно-подобното поведение при млади/здрави плъхове.
4. Да се установи ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* при субхронично приложение върху поведението на плъхове, подложени на социална изолация.
5. Да се изследва ефектът при субхронично приложение на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху индуцирани от алкохол поведенчески промени при плъхове.
6. Да се проучи ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* при субхронично приложение върху поведението и оксидативния

стрес при плъхове, подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм.

7. Да се установи ефектът на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху върху резерпин-индуцирана хипокинезия и оксидативен стрес при плъхове.

### **III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

#### **1. Материали**

##### **1.1. Експериментални животни**

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

Процедурите по третирането на животните и експериментите бяха извършени в съответствие с националните закони и международните изисквания (ЕЕС Directive 86/609 от 1986 г.) и в съответствие с правилата на Комисията по етика на Института по невробиология към Българска академия на науките (регистрация FWA 00003059 от американското министерство на здравеопазването и човешките ресурси).

##### **1.2. Използвани фармакологични средства**

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

Експериментите са проведени с две проби ПСАМ, получени от плодовете на *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot чрез смачкване, изстискване и филтриране. Полученият сок е пастьоризиран при температура 80°C за 10 минути и съхраняван при 0°C до провеждане на експериментите. Основни биологично активни вещества в ПСАМ са полифенолните съединения. В Таблица 1 и Таблица 2 е представено съдържанието на полифеноли в двете използвани проби сок и метода, по който са определени.

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

<b>Вещества</b>	<b>Количество</b>	<b>Метод на определяне</b>
Феноли (общо)	7093 mg GAE/l	Спектрофотометричен Singleton and Rossi (1965)
Флавоноиди (общо)	1894 mg CE/l	Спектрофотометричен Zhishen et al. (1999)
Антоцианини (общо)	1068 mg C-3-G/l	Спектрофотометричен Guitsi et al. (1999)
Кверцетин	118 mg/l	HPLC Hertog et al. (1992)

**Таблица 2.** Съдържание на полифенолни съединения в ПСАМ – проба 2 (GAE – еквиваленти на галова киселина)

<b>Вещества</b>	<b>Количество</b>	<b>Метод на определяне</b>
Феноли (общо)	5461 mg GAE/l	Спектрофотометричен Singleton and Rossi (1965)
Процианидини (общо)	3122.5 mg/l	Гравиметричен Howell et al. (2005)
Цианидин-3-галактозид	143.7 mg/l	HPLC
Цианидин-3-арабинозид	61.7 mg/l	HPLC
Цианидин-3-глюкозид	4.4 mg/l	HPLC
Цианидин-3-ксилозид	11.6 mg/l	HPLC
Хлорогенова киселина	585 mg/l	HPLC
Неохлорогенова киселина	830 mg/l	HPLC

### **Други използвани реактиви и субстанции**

Diazepam (Sopharma, България), reserpine (Sigma-Aldrich CHEMIE GmbH, Индия), dimethylsulfoxide (DMSO) (Merck, Германия), ethanol 96% (ХимаксФарма ЕООД, България), diethylether (Химтекс ООД, България), thiobarbituric acid (Merck, Германия) acetic acid (Merck, Германия), sodium hydroxide (Merck, Германия), malondialdehyde standart (Merck, Германия), dodecyl sulfate sodim salt solution (Merck, Германия), hydroxymethyl-aminomethan hydrochloride (TRIS/HCL) буфер (Merck, Германия).

## **2. Експериментални методи**

### **2.1. Методи за определяне на съдържанието на полифеноли в плодов сок от *Aronia melanocarpa***

**2.1.1. 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).

**2.1.2. Колориметричен метод за определяне на общи флавоноиди** (Zhishen et al. 1999). Количеството на флавоноидите се изразява като еквиваленти на катехин в mg/l сок.

**2.1.3. рН-диференциална спектрофотометрия за определяне на антоцианини** при рН 1.0 и рН 4.5 (Guisti et al., 1999). Общите антоцианини се представят количествено като цианидин-3-глюкозид еквиваленти.

**2.1.4. HPLC метод за определяне на кверцетин** (Hertog et al. 1992)

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

**2.1.6. HPLC метод за определяне на фенолни киселини**

**2.1.7. Гравиметричен метод за изолиране и определяне на общи процианидини** по метода на Howell et al. (2005).

## **2.2. Поведенчески методи**

### **2.2.1. Методи за изследване на двигателната активност и изследователското поведение**

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

Тестът е извършван в оградено със стени поле, боядисано изцяло в бяло и разграфено с линии, които разделят пода на 25 квадрата (Bronstein, 1972). Животното се поставя в центъра на полето и се изследва поведението му в рамките на 5 min. Отчитат се: броят на преминатите от животното квадрати и с четирите лапи и изправянията на задните лапи.

*Метод за определяне на промените в двигателната активност и изследователското поведение чрез апарат Opto Varimex*

Промените в изследователското поведение са проследени съгласно метода на Köhler и Lorens (1978) чрез апарат Opto Varimex (Columbus Instruments, USA). Апаратът е конструиран на принципа на фотоклетката – регистрира броя на пресичанията на инфрачервените светлинни лъчи при движението на животното в условни единици (УЕ), което позволява избирателно отчитане на броя на хоризонталните и вертикалните движения за определен период от време. Всяко пресичане на лъч се регистрира като импулс и се записва автоматично от компютър на всяка минута през първите 5 min на теста и общо за следващите 5 min. Броят на хоризонталните и вертикалните движения, регистриран на всяка минута през първите 5 min, служи като мярка за изследователската активност и хаbitуацията към средата. Общият брой движения по време на първите 5 min и за целия 10-минутен период на наблюдение се използва за оценяването на общата двигателна активност на животното.

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

*Тест в повдигнат кръстосан лабиринт – elevated plus maze (EPM)*

Тестът повдигнат кръстосан лабиринт е въведен от Pellow и File (1986). Изследванията се провеждат в апарат, който се състои от разположени едно срещу друго две открити и две закрити рамена, поставени в една равнина, на височина 50 cm от пода. Експерименталните животни се поставят в центъра на кръстосания лабиринт и се наблюдават в продължение на 5 min. Отчитат се следните показатели: брой на влизания в откритите рамена и времето, прекарано в тях, брой на влизания в закритите рамена и времето, прекарано в тях, общ брой влизания в рамената, съотношението брой влизания в откритите рамена/общ брой влизания в рамената и съотношението време, прекарано в откритите рамена/общо време.

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

Тестът се провежда по метода на File и Hyde (1978). Животните се поставят по двойки в непозната за тях среда – апарат за тест открито

поле за време от 5 min. Всяко едно животно е заедно с непознат тестов партньор, за да се създаде безпокойство в тях. Отчита се времето, прекарано в душене, оправяне на козината, следване, покачване върху или пълзене под партньора. По-продължителният активен контакт между опитните животни е показател за анксиолитичен ефект.

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

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

Тестът е провеждан по метода на Porsolt et al. (1979). При него се използва времето на неподвижност на животното, като мярка за депресивно-подобно поведение. Всяко животно се поставя в пълен с вода стъклен цилиндър за 5 min. Животното не трябва да се подпира с лапи или опашка в дъното на цилиндъра (Lucki, 1997).

Тестът се извършва в две сесии с интервал между тях от 24 часа. Първата сесия е тренировъчна и затова се записват резултатите само от втората сесия. Измерва се времето на неподвижност на животното в секунди.

## **2.3. Биохимични методи**

### **2.3.1 *Определяне на реагиращи с тиобарбитурова киселина субстанции в хомогенат от мозък***

Извършва се спектрофотометрично по метода на Okawa et al. (1979)

## **2.4. Статистически методи**

Статистическата обработка на резултатите от изследванията е извършена с помощта на едно- и двуфакторен вариационен анализ (one-way and two-way ANOVA), последван от Dunnett's Multiple Comparison Post Test. Две независими групи са сравнявани посредством Student's *t*-test. Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  SEM. Статистическа достоверност се приема при  $p < 0.05$ .

Използван е статистически пакет GraphPad Prism (Version 5.00, GraphPad Software, Inc.).



## IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху двигателната активност и изследователското поведение при плъхове – експерименти в апарат Opto Varimex

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 (1 седмица), 14 дни (2 седмици), 21 дни (3 седмици) или 30 дни (1 месец). 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<sup>-ми</sup>, 14<sup>-ти</sup>, 21<sup>-ви</sup> и 30<sup>-ти</sup> 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).

#### 1.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху изследователското поведение при плъхове

##### 1.1.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху хоризонталната активност през първия 5-минутен период за всяка минута поотделно

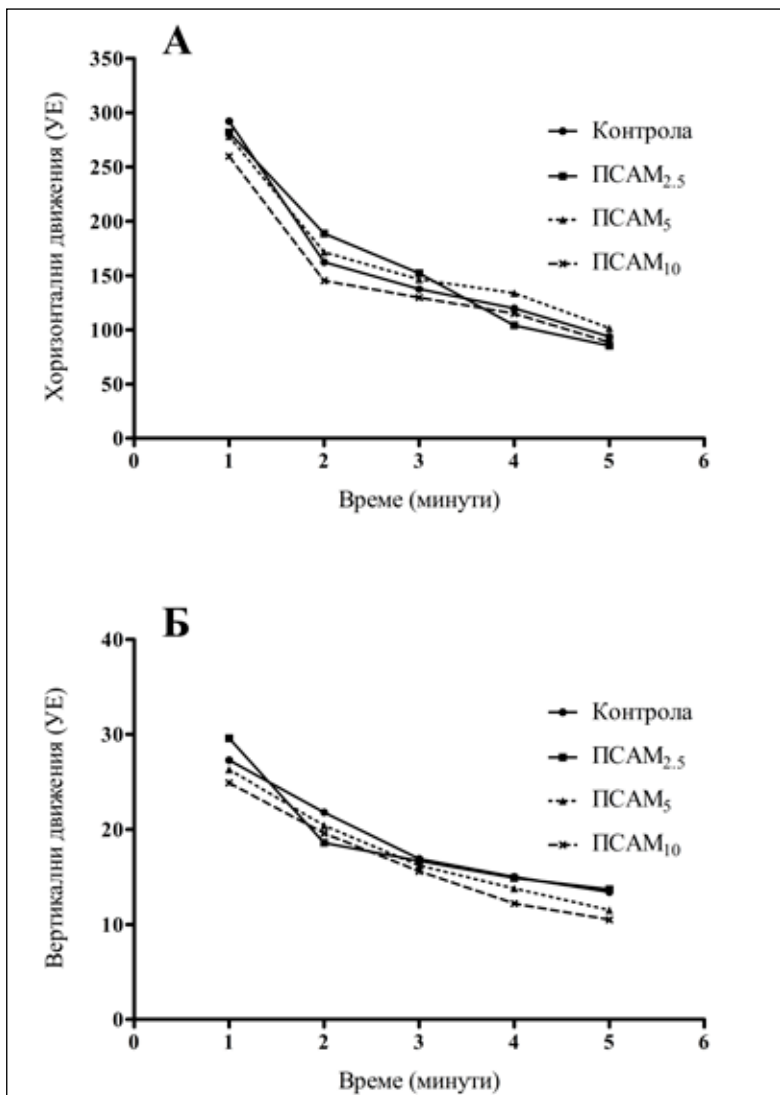
Резултатите от 7-, 14-, 21- и 30-дневно приложение на ПСАМ върху хоризонталната двигателна активност на млади/здрави плъхове за всяка минута поотделно, при 5-минутно наблюдение, са представени на Фиг. 1А, 2А, 3А, 4А.

ПСАМ, прилаган в дози 2.5 ml/kg и 5 ml/kg за периоди от 7, 14, 21 и 30 дни, не променя значимо броя на хоризонталните движения на опитните животни в сравнение със съответните контроли (Фиг. 1А, 2А, 3А, 4А). ПСАМ в доза 10 ml/kg, прилаган за 7 и 14 дни, също не оказва значим ефект върху хоризонталната двигателна активност на плъховете (Фиг. 1А, 2А). В доза 10 ml/kg ПСАМ достоверно понижава броя на хоризонталните движения на 21<sup>-ия</sup> ден и на 30<sup>-ия</sup> на 1<sup>-ва</sup>, 2<sup>-ра</sup>, 3<sup>-та</sup>, 4<sup>-та</sup> и 5<sup>-та</sup> min в сравнение със съответните контроли (Фиг. 3А, 4А).

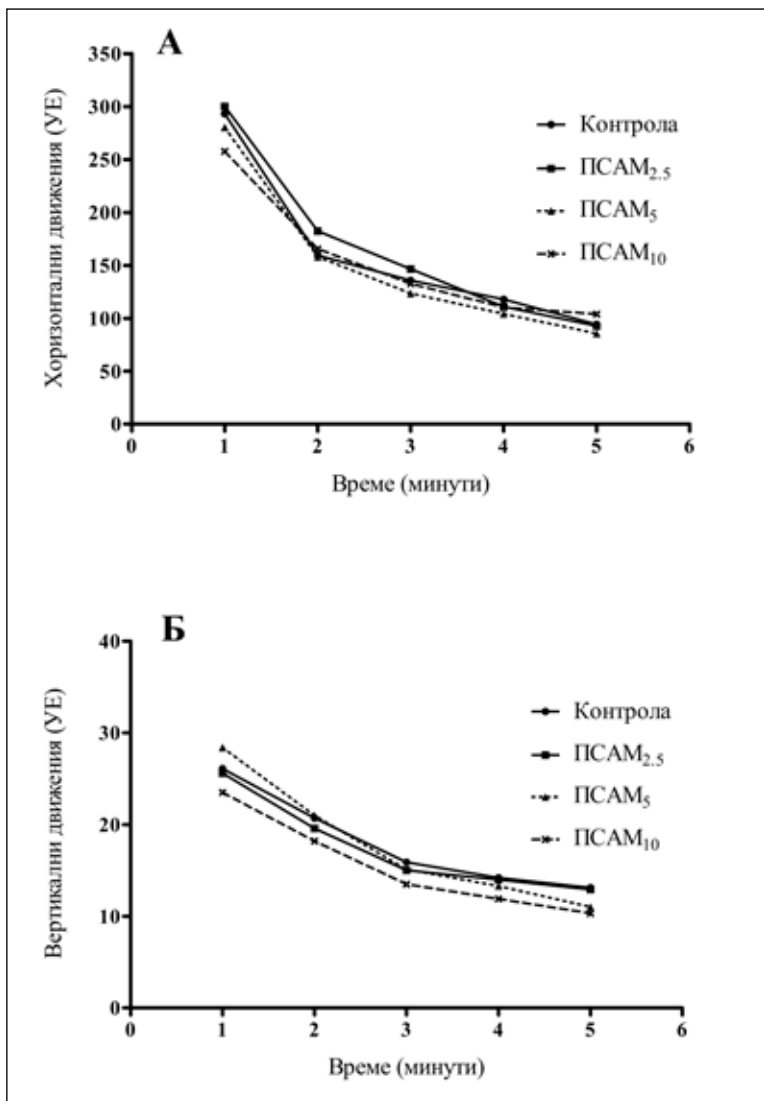
### ***1.1.2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху вертикалната активност през първия 5-минутен период за всяка минута поотделно***

Резултатите от 7-, 14-, 21- и 30-дневно приложение на ПСАМ върху вертикалната двигателна активност на млади/здрави плъхове за всяка минута поотделно, при 5-минутно наблюдение, са представени на Фиг. 1Б, 2Б, 3Б, 4Б.

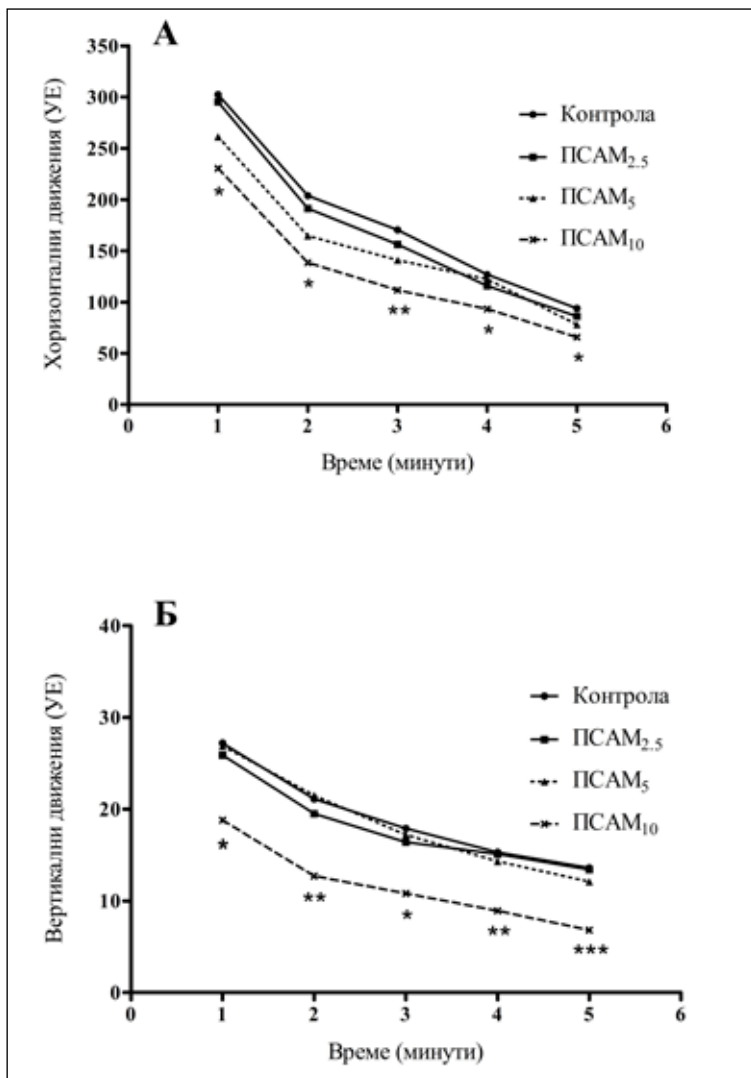
Прилагането на ПСАМ в дози 2.5 и 5 ml/kg за период от 7, 14, 21 и 30 дни не показва съществени промени в броя на вертикалните движения на опитните животни (Фиг. 1Б, 2Б, 3Б, 4Б). Не се наблюдават значими промени в броя на вертикалните движения и при плъхове, третирани 7 и 14 дни с ПСАМ в доза 10 ml/kg (Фиг. 1Б, 2Б). Достоверно намаление на вертикалните движения на 1<sup>-ва</sup>, 2<sup>-ра</sup>, 3<sup>-та</sup>, 4<sup>-та</sup> и 5<sup>-та</sup> min, в сравнение със съответните контроли, се наблюдава след 21- и 30-дневно приложение на ПСАМ в доза 10 ml/kg (Фиг. 3Б, 4Б).



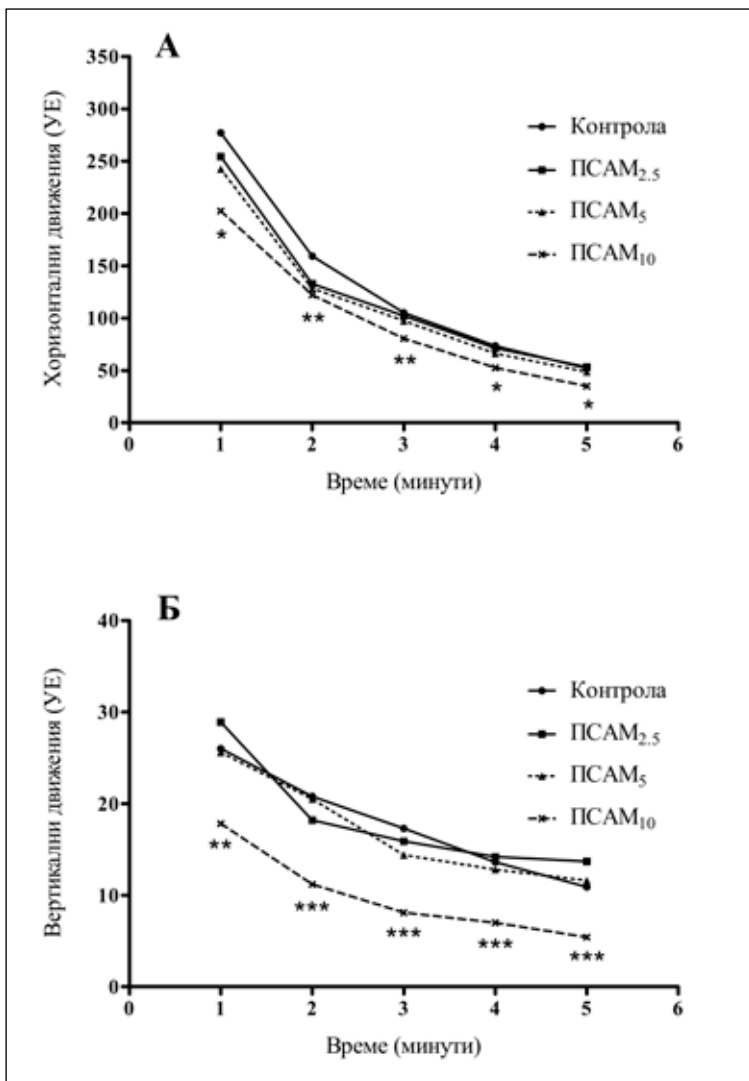
**Фиг. 1.** Ефект на PCAM, въвеждан интрагастрално при плъхове в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 7 дни, върху броя на хоризонталните движения (панел А) и вертикалните движения (панел Б), отчитани на всяка минута за период на наблюдение 5 min; УЕ – условни единици; n = 10



**Фиг. 2.** Ефект на ПСАМ, въведен интрагастрално при плъхове в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 14 дни, върху броя на 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. 3.** Ефект на ПСАМ, въведен интрагастрално при плъхове в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 21 дни, върху броя на 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 в сравнение с контролната група

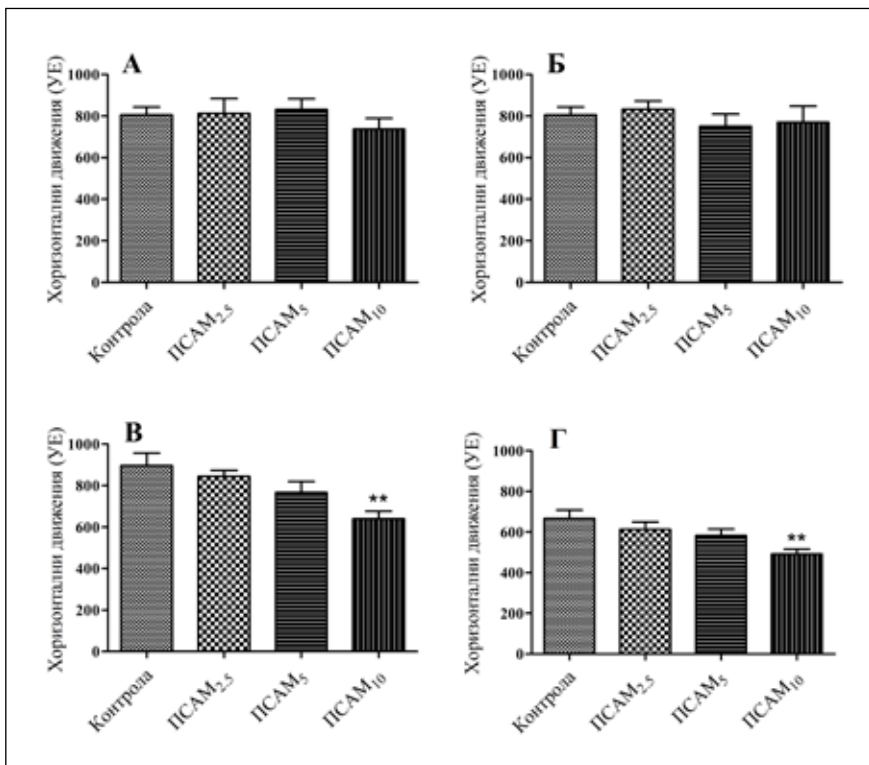


**Фиг. 4.** Ефект на ПСАМ, въвеждан интрагастрално при плъхове в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 30 дни, върху броя на хоризонталните движения (панел А) и вертикалните движения (панел Б), отчитани на всяка минута за период на наблюдение 5 min; UE – условни единици; n = 10; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 в сравнение с контролната група

### 1.1.3. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху хоризонталната активност за целия 5-минутен период

Отчетен е броят на хоризонталните движения за първите 5 min. Резултатите са представени на Фиг. 5.

ПСАМ в доза от 10 ml/kg намалява достоверно общия брой на хоризонталните движения в сравнение със съответните контроли, третиран с физиологичен разтвор на 21-ия ден ( $p < 0.01$ ) и на 30-ия ден ( $p < 0.01$ ) (Фиг. 5В, 5Г).

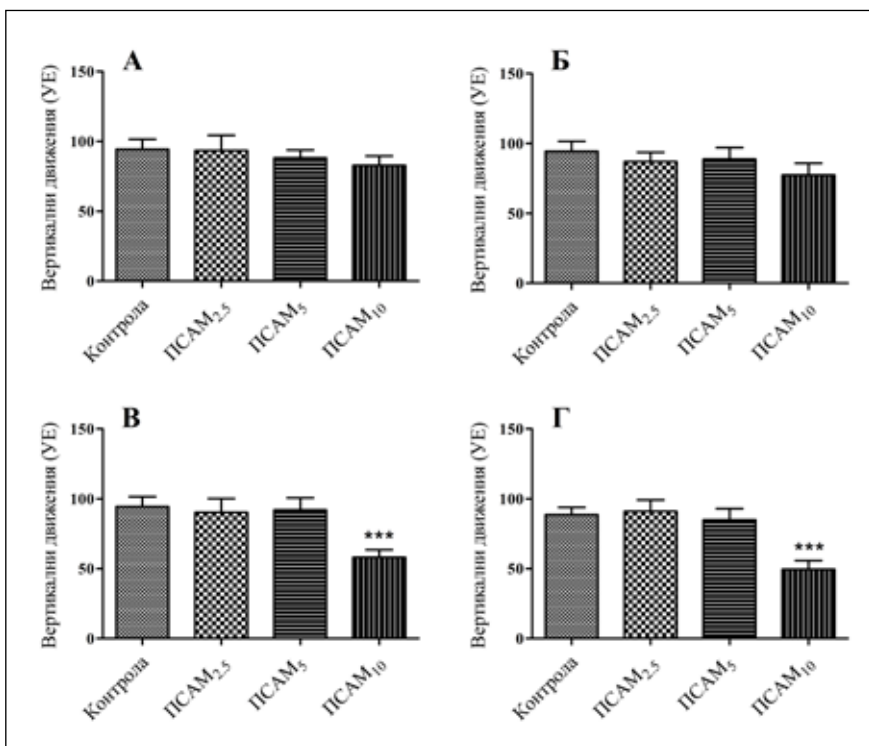


**Фиг. 5.** Ефект на ПСАМ, въвеждан интрагастрално в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 7 дни (панел А), 14 дни (панел Б), 21 дни (панел В) и 30 дни (панел Г), върху общия брой на хоризонталните движения през първите 5 min; УЕ – условни единици. Стойностите са средна±SEM; n = 10; \*\*p < 0.01 в сравнение със съответната контролна група

### 1.1.4. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху вертикалната активност за целия 5-минутен период

Общият брой вертикални движения, отчетени през началния 5-минутен период на наблюдение, са представени на Фиг. 6.

От Фиг. 6В и 6Г се вижда, че ПСАМ, прилаган в доза 10 ml/kg в продължение на 21 и 30 дни, значимо намалява вертикалната активност ( $p < 0.001$ ) на опитните животни в сравнение със съответните контроли.



**Фиг. 6.** Ефект на ПСАМ, въвеждан интрагастрално в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 7 дни (панел А), 14 дни (панел Б), 21 дни (панел В) и 30 дни (панел Г), върху общия брой на вертикалните движения през първите 5 min; UE – условни единици. Стойностите са средна±SEM; n = 10; \*\*\* $p < 0.001$  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 изследователското поведение на животните.

## **1.2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху общата двигателна активност при плъхове**

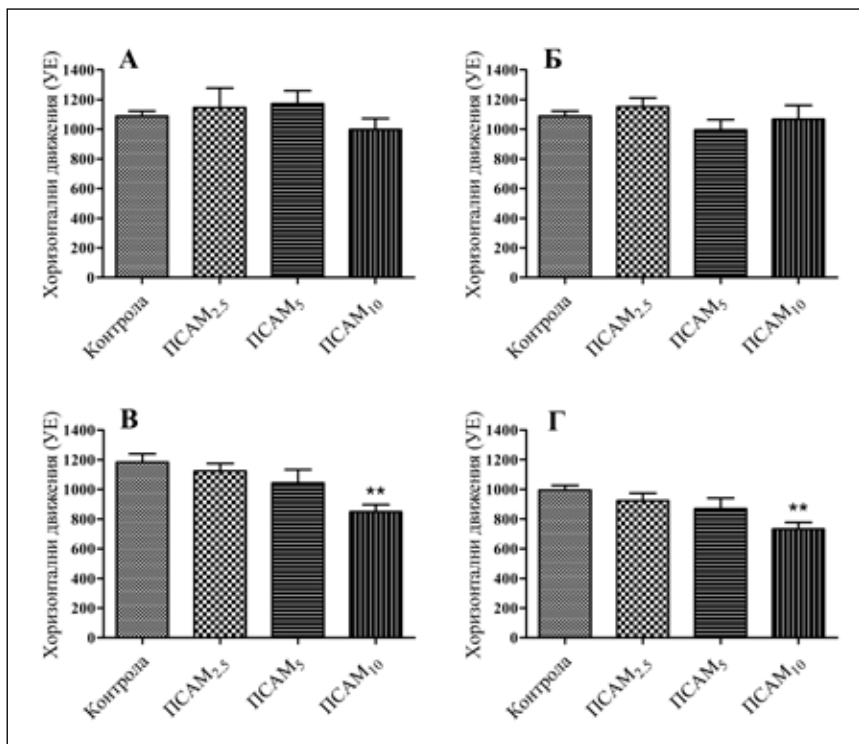
След първия 5-минутен период се отчита броят на хоризонталните и вертикалните движения за втория период от 5 min и резултатите се представят като сума от двата периода – брой хоризонтални и вертикални движения за 10 min.

### ***1.2.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху хоризонталната активност за период от 10 минути***

Резултатите от отчетените хоризонтални движения за период от 10 min са представени на Фиг. 7.

Промени в хоризонталната активност след въвеждането на ПСАМ в дози 2.5 и 5 ml/kg не са отчетени в нито един от периодите на прилагане (7, 14, 21 и 30 дни).

В доза 10 ml/kg ПСАМ намалява значимо броя на хоризонталните движения на 21<sup>-ия</sup> ден ( $p < 0.01$ ) (Фиг. 7В) и на 30<sup>-ия</sup> ден ( $p < 0.01$ ) (Фиг. 7Г) в сравнение с контролите, третирани с физиологичен разтвор.



**Фиг. 7.** Ефект на ПСАМ, въведен интрагастрално в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 7 дни (панел А), 14 дни (панел Б), 21 дни (панел В) и 30 дни (панел Г), върху общия брой на хоризонталните движения за период от 10 min; УЕ – условни единици.

Стойностите са средна±SEM; n = 10;

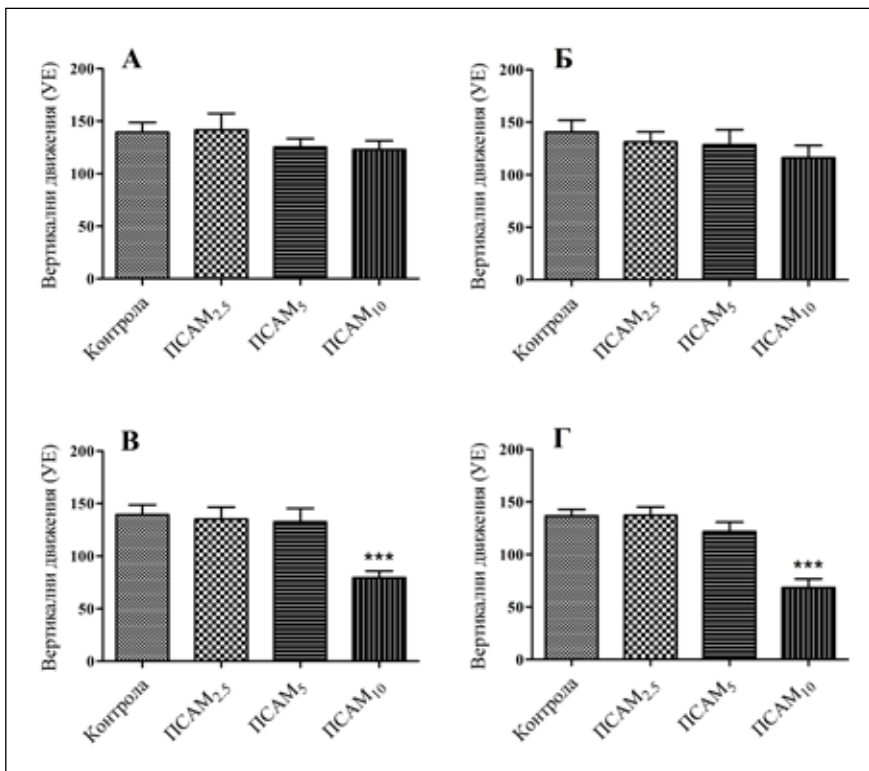
\*\*p < 0.01 в сравнение със съответната контролна група

### ***1.2.2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху вертикалната активност за период от 10 минути***

Вертикалните движения, отчетени за 10 min, са представени на Фиг. 8.

ПСАМ, приложен на плъхове в дози 2.5 ml/kg и 5 ml/kg за всички периоди на прилагане (7, 14, 21 и 30 дни), не предизвиква значими промени във вертикалната активност.

ПСАМ в доза 10 ml/kg статистически достоверно намалява броя на вертикалните движения на 21-ия ден ( $p < 0.001$ ) (Фиг. 8В) и на 30-ия ден ( $p < 0.001$ ) (Фиг. 8Г).



**Фиг. 8.** Ефект на ПСАМ, въведен интрагастрално в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 7 дни (панел А), 14 дни (панел Б), 21 дни (панел В) и 30 дни (панел Г), върху общия брой на вертикалните движения за период от 10 min; UE – условни единици. Стойностите са средна±SEM; n = 10; \*\*\* $p < 0.001$  в сравнение със съответната контролна група

### 1.3. Обсъждане

В представеното проучване изследователското поведение и двигателната активност на плъховете са тествани в среда, която е непозна-

та за животните – камерата на апарата Opto Varimex. Тестът открито поле е често използван за определянето на изследователското поведение и общата двигателна активност при гризачи (Gould et al., 2009). Очакваният модел на поведение на животните включва първоначално силно желание за изследване на новата среда, което постепенно намалява до привикване (хабитуация) към средата (Daenen et al., 2001). Изследователското поведение се дефинира като интензивно проучване (определено чрез повишената двигателна активност), което да даде информация на животното за заобикалящата го околна среда (Lynn and Brown, 2009). Изследователското поведение се определя за кратък период на наблюдение (Gould et al., 2009).

Настоящото проучване показва, че ПСАМ, приложен в дози 2.5 и 5 ml/kg за 7, 14, 21 и 30 дни, не повлиява значимо изследователското поведение и двигателната активност на плъховете. В доза 10 ml/kg, прилаган 21 и 30 дни, ПСАМ инхибира изследователското поведение и редуцира хоризонталната и вертикалната двигателна активност. Анализът на промените в броя на хоризонталните движения за всяка минута поотделно след въвеждането и на трите дози (2.5, 5 и 10 ml/kg) за различните периоди на третиране (7<sup>-ия</sup>, 14<sup>-ия</sup>, 21<sup>-ия</sup> и 30<sup>-ия</sup> ден) показва, че хабитуацията не е нарушена.

Наблюдаваните ефекти на ПСАМ върху локомоторната активност вероятно се дължат на съдържащите се в него полифенолни съединения – флавоноиди (антоцианидини), процианидини, фенолни киселини. Намалението в спонтанната двигателна активност, отчетено в апарата, може да е в резултат от понижена възбудимост на централната нервна система и седация (Prut and Belzung, 2003). Смята се, че мозъчната ГАМК-ергична система е отговорна за седацията, а също и участва в депресивното поведение. Съществуват данни за флавоноиди, които могат да взаимодействат с ГАМК<sub>A</sub> рецептори (Vignes et al., 2006; Fernandez et al., 2009). Седативни ефекти са описани в литературата за изолирани флавоноиди (Martínez et al., 2009; Vissiennona et al., 2011) и растителни екстракти, съдържащи процианидини, флавоноиди или други полифеноли (Jiang et al., 2007). Установено е, че анксиолитичният и седативен ефект на флавоноидите могат да се дължат на активиране на ГАМК-ергичната невротрансмисия чрез свързване с

бензодиазепиновия рецептор (Hui et al., 2002) или на места, различни от тези за бензодиазепиновите лекарства (de Carvalho et al., 2011).

Опити с мишки, при които липсват гени за различните подтипове  $\alpha$  субединици на ГАМК<sub>A</sub> рецептора, позволяват идентифицирането на бензодиазепинови ефекти, които липсват или са намалени при мутантите. Чрез този подход се доказва, че рецепторите с  $\alpha 1$ -субединици медираат седация, тези, съдържащи  $\alpha 2$ - и/или  $\alpha 3$ -субединици, водят до анксиолиза, а съдържащите  $\alpha 5$ -субединица рецептори са свързани с паметта (Rudolph and Möhler, 2006).

Обяснение за възможния седативен ефект на най-високата доза ПСАМ в представеното проучване може да бъде активиране на съдържащи  $\alpha 1$  субединица ГАМК<sub>A</sub> рецептори вследствие на акумулация на полифенолни съединения в мозъка на опитните животни, която е доказана от Willis et al. (2009).

Хабитуация на животното в новата за него среда се счита за елементарна форма на памет, при което намаляването на изследователската двигателна активност се приема за паметов индекс (Thiel et al., 1998). Както вече отбелязахме, ПСАМ не нарушава хабитуацията на плъховете към новата среда в апарат Opto Varimex. Това доказва, че ПСАМ няма неблагоприятно въздействие върху паметта. В множество проучвания дори се установява, че богати на флавоноиди плодове или плодови сокове имат способността да подобряват паметта (Spencer, 2010; Rendeiro et al. 2013).

## **2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху тревожността при млади/здрави плъхове**

### **2.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху тревожността при млади/здрави плъхове, изследван в повдигнат кръстосан лабиринт (elevated plus-maze)**

Мъжки плъхове порода Wistar (n = 160) са разделени в 16 групи по 10 плъха в група. Животните са третирани интрагастрално посредством сонда веднъж дневно в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни. Четири независими групи са използвани за всеки период на третиране. Групите са третирани както следва: Контрола – физиологичен разтвор в доза 10 ml/kg; ПСАМ<sub>2.5</sub> – ПСАМ в доза 2.5 ml/kg, разреден с дес-

тилирана вода до 10 ml/kg; ПСАМ<sub>5</sub> – ПСАМ в доза 5 ml/kg, разреден с дестилирана вода до 10 ml/kg и ПСАМ<sub>10</sub> – ПСАМ в доза 10 ml/kg. Поведенческият тест е проведен 60 min след третирането на 7-ия, 14-ия, 21-ия и 30-тия ден.

Проследени и анализирани са за всеки период поотделно (7-ия, 14-ия, 21-ия и 30-ия ден) следните показатели:

- Брой на влизанията в откритите рамена;
- Времето на престой в откритите рамена (в секунди);
- Брой на влизанията в закритите рамена;
- Времето на престой в закритите рамена (в секунди);
- Общият брой на влизанията в откритите и закритите рамена;
- Отношението брой на влизания в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена;
- Отношението на времето на престой в откритите рамена към общото време.

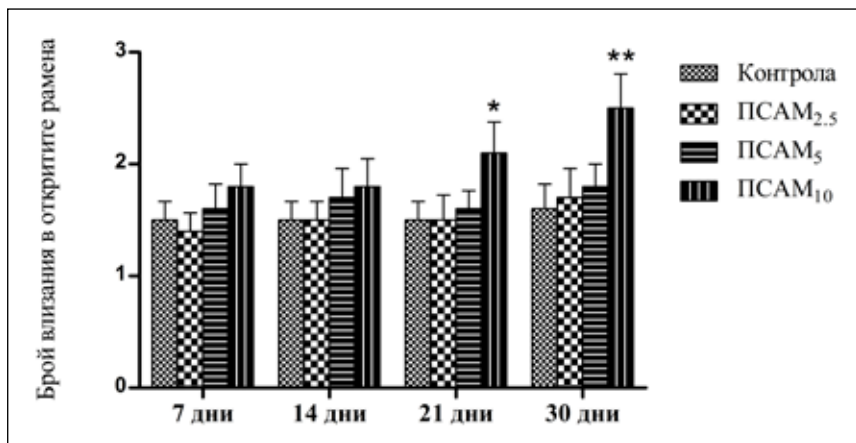
Резултатите, които са регистрирани по време на 5-минутното тест-ване, са представени на Фиг. 9; Фиг. 10; Фиг. 11; Фиг. 12; Фиг. 13; Фиг. 14; Фиг. 15.

ПСАМ, приложен в дози 2.5 ml/kg, 5 ml/kg и 10 ml/kg в продължение на 7 дни и 14 дни, не оказва значим ефект върху броя на влизанията в откритите рамена (Фиг. 9), времето на престой в откритите рамена (Фиг. 10), броя на влизанията в закритите рамена (Фиг. 11), времето на престой в закритите рамена (Фиг. 12), общия брой на влизанията в откритите и закритите рамена (Фиг. 13), отношението броя на влизанията в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена (Фиг. 14) и отношението на времето, прекарано в откритите рамена, към общото време (Фиг. 15) в сравнение с контролите.

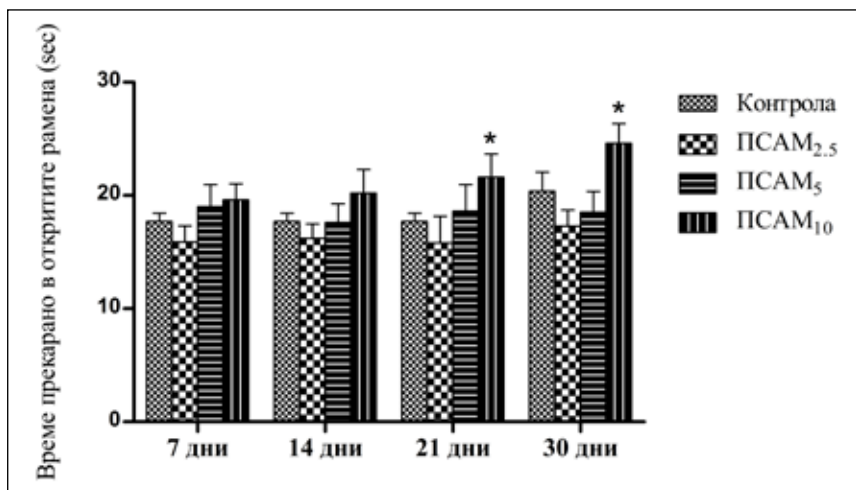
При 21-дневно приложение на ПСАМ в дози 2.5 ml/kg и 5 ml/kg също не се наблюдава значим ефект върху броя на влизанията в откритите рамена (Фиг. 9), времето на престой в откритите рамена (Фиг. 10), броя на влизанията в закритите рамена (Фиг. 11), времето на престой в закритите рамена (Фиг. 12), общия брой на влизанията в откритите и закритите рамена (Фиг. 13), отношението броя на влизанията в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите

рамена (Фиг. 14) и отношението на времето, прекарано в откритите рамена, към общото време (Фиг. 15) 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 ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 9), удължава времето на престой в откритите рамена ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 10), скъсява времето на престой в закритите рамена ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 12), повишава отношението на броя на влизанията в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 14), без да променя значимо влизанията в закритите рамена (Фиг. 11), общия брой на влизанията в откритите и закритите рамена (Фиг. 13) и отношението на времето, прекарано в откритите рамена, към общото време (Фиг. 15) в сравнение с контролните животни.

След 30-дневно приложение на ПСАМ в дози 2.5 ml/kg и 5 ml/kg не се наблюдава значим ефект върху броя на влизанията в откритите рамена (Фиг. 9), времето на престой в откритите рамена (Фиг. 10), броя на влизанията в закритите рамена (Фиг. 11), времето на престой в закритите рамена (Фиг. 12), общия брой на влизанията в откритите и закритите рамена (Фиг. 13), отношението броя на влизанията в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена (Фиг. 14) и отношението на времето, прекарано в откритите рамена, към общото време (Фиг. 15) в сравнение с контролите. Дозата 10 ml/kg на 30<sup>-ти</sup> ден достоверно увеличава броя на влизанията в откритите рамена ( $p < 0.01$ ) (Фиг. 9), удължава времето на престой в откритите рамена ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 10) и скъсява времето на престой в закритите рамена ( $p < 0.05$ ) (Фиг. 12), без да повлиява значимо броя на влизанията в закритите рамена (Фиг. 11), общия брой на влизанията в откритите и закритите рамена (Фиг. 13), отношението броя на влизанията в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена (Фиг. 14) и отношението на времето, прекарано в откритите рамена, към общото време (Фиг. 15) в сравнение с контролите.

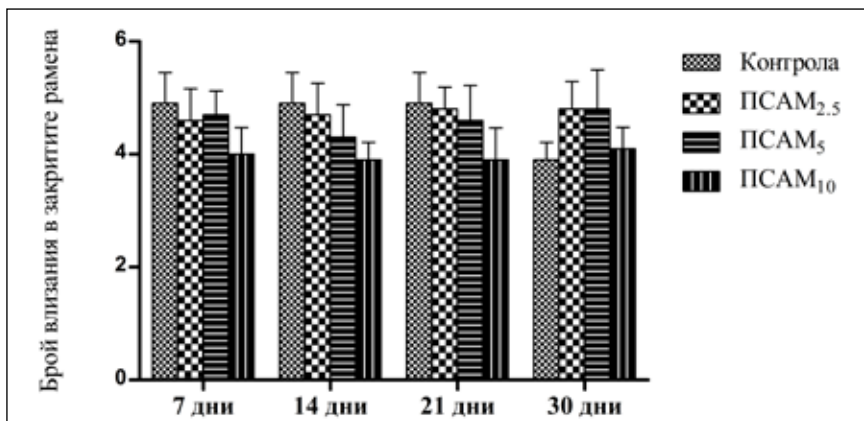


**Фиг. 9.** Ефект на PCAM, въвеждан интрагастрално в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни, върху броя на влизанията в откритите рамена при опити в повдигнат кръстосан лабиринт. Стойностите са средна±SEM; n = 10; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 в сравнение с контролната група

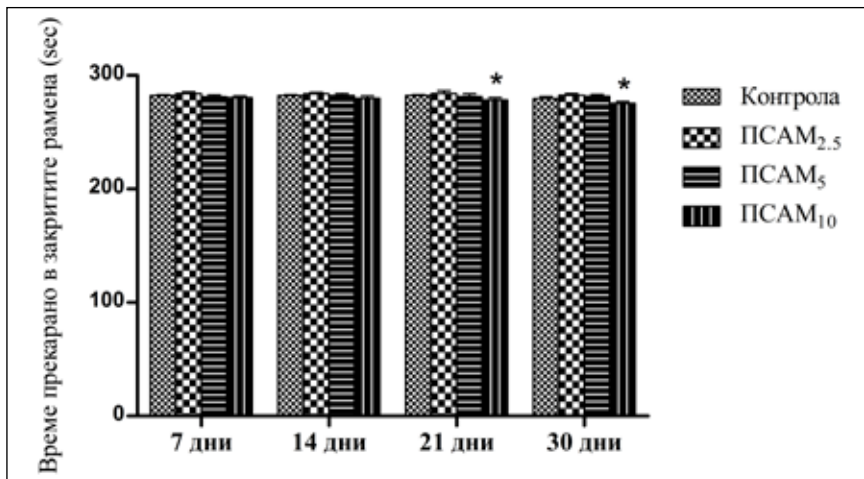


**Фиг. 10.** Ефект на PCAM, въвеждан интрагастрално в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни, върху времето на престой в откритите рамена при опити в повдигнат кръстосан лабиринт. Стойностите са средна±SEM; n = 10; \*p < 0.05 в сравнение със съответната контролна група

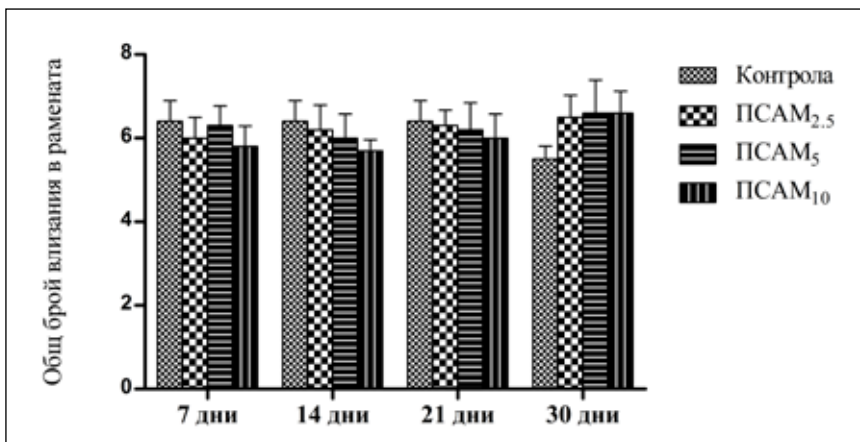




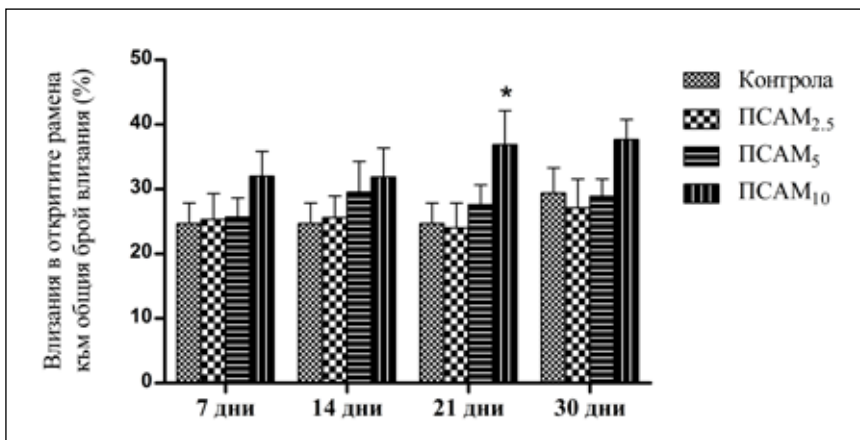
**Фиг. 11.** Ефект на PCAM, въвеждан интрагастрално в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни, върху броя на влизанията в закритите рамена при опити в повдигнат кръстосан лабиринт. Стойностите са средна±SEM; n = 10



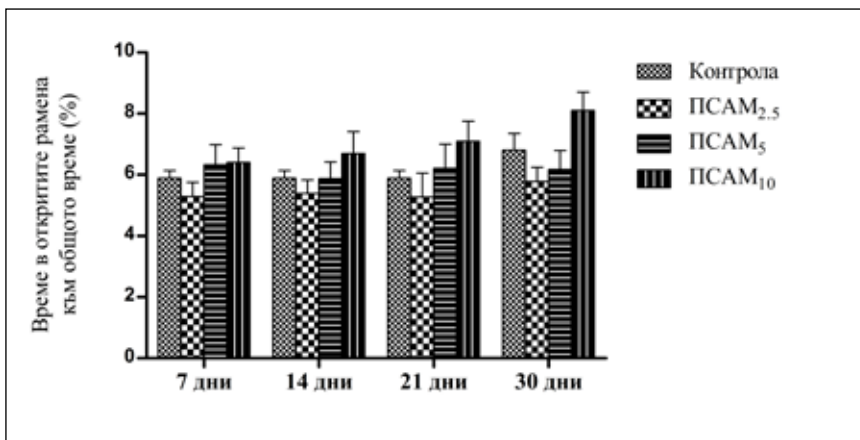
**Фиг. 12.** Ефект на PCAM, въвеждан интрагастрално в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни, върху времето на престой в закритите рамена при опити в повдигнат кръстосан лабиринт. Стойностите са средна±SEM; n = 10; \*p < 0.05 в сравнение със съответната контролна група



**Фиг. 13.** Ефект на PCAM, въведен интрагастрално в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни, върху общия брой на влизания в откритите и закритите рамена при опити в повдигнат кръстосан лабиринт. Стойностите са средна±SEM; n = 10



**Фиг. 14.** Ефект на PCAM, въведен интрагастрално в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни, върху отношението на броя влизания в откритите рамена към общия брой влизания в открити и закрити рамена (в проценти) при опити в повдигнат кръстосан лабиринт. Стойностите са средна±SEM; n = 10; \*p < 0.05 в сравнение с контролната група



**Фиг. 15.** Ефект на PCAM, въвеждан интрагастрално в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни, върху отношението на времето прекарано в откритите рамена към общото време прекарано в откритите и закритите рамена (в проценти) при опити в повдигнат кръстосан лабиринт. Стойностите са средна±SEM; n = 10

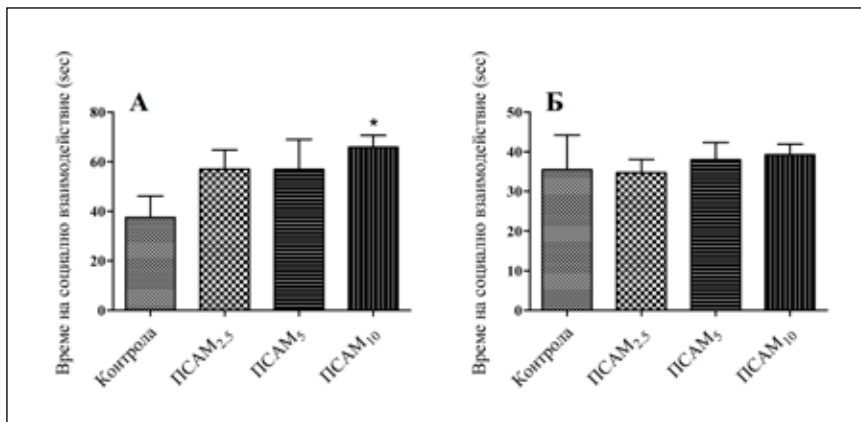
## 2.2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху тревожността при млади/здрави плъхове, изследван в тест за социално взаимодействие (social interaction test)

Мъжки Wistar плъхове (n = 96) са разделени в 8 групи от 12 животни всяка. Четири от групите, означени като Контрола, PCAM<sub>2.5</sub>, PCAM<sub>5</sub> и PCAM<sub>10</sub>, са третирани в продължение на 21 дни. Останалите четири групи, също означени като Контрола, PCAM<sub>2.5</sub>, PCAM<sub>5</sub> и PCAM<sub>10</sub>, са третирани 30 дни. Контролните групи получават интрагастрално дестилирана вода в доза 10 ml/kg веднъж дневно 21 и съответно 30 дни. PCAM е прилаган също интрагастрално веднъж дневно в дози 2.5 ml/kg (за PCAM<sub>2.5</sub> групи), 5 ml/kg (за PCAM<sub>5</sub> групи) и 10 ml/kg (за PCAM<sub>10</sub> групи) в продължение на 21 и респективно 30 дни. Тестът за социално взаимодействие е извършен на 21<sup>-ия</sup> и съответно 30<sup>-ия</sup> ден, един час след последното третиране.

Резултатите, получени по време на 5-минутния тест за социално взаимодействие, са представени на Фиг. 16.

След 21-дневно приложение ПСАМ удължава времето на социален контакт между тестовите партньори. При ПСАМ<sub>10</sub> групата времето на социално взаимодействие е значимо по-дълго ( $p < 0.05$ ) в сравнение с това на контролната група (Фиг. 16А).

Прилаган 30 дни, ПСАМ показва само тенденция към удължаване на времето на социален контакт между опитните животни (Фиг. 16Б).



**Фиг. 16.** Ефект на ПСАМ, въвеждан интрагастрално в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 21 дни (панел А) и 30 дни (панел Б), върху времето на социално взаимодействие на млади/здрави плъхове. Стойностите са средна $\pm$ SEM;  $n = 12$ ; \* $p < 0.05$ , в сравнение с контролната група

### 2.3. Обсъждане

Тревожните разстройства са психични заболявания, при които пациентът изпитва екстреман страх или продължително безпокойство. Установено е, че през 2010 г. 273 милиона души (4.0% от световната популация) страдат от тревожни разстройства (Vos et al., 2012). Намаление в мозъчните нива на инхибиторния невротрансмитер ГАМК се свързват с патологичната тревожност (Lydiard, 2003; Nemeroff, 2003). Едни от най-използваните лекарства за тревожни разстройства – бензодиазепините, постигат анксиолитичен ефект чрез потенциране на ГАМК-ергичната медиация, свързвайки се с ГАМК<sub>A</sub> рецепторите. Те обаче имат множе-

ство нежелани ефекти като седация, миорелаксация, атаксия, амнезия и не на последно място водят до развитие на зависимост. Съвременните проучвания са насочени към изследване на природни анксиолитици с много по-малко странични ефекти (Carlini, 2003).

Повдигнатият кръстосан лабиринт е най-често използваният експериментален тест за изследване на тревожност при гризачи. В основата на теста стои вроденият страх на животните от открити пространства. Чрез този тест се оценява анксиолитично-подобният ефект на кандидати за лекарства при предклинични изпитвания. Повечето анксиолитици увеличават изследването на откритите рамена от животните, което се отчита с увеличение на броя на влизанията в откритите рамена и времето, прекарано в тях. Важно е тези лекарства да се прилагат в дози, които не повлияват двигателната активност, което се установява чрез показателя общ брой влизания в откритите и закритите рамената на лабиринта (Lister, 1987).

Тестът за социално взаимодействие е лесно изпълним метод за оценяване на тревожността при гризачи. В този тест се предизвиква високо ниво на тревожност в опитното животно чрез поставянето му в ярко осветена непозната среда и с непознат тестов партньор (File and Hyde 1978). Намаленото време на социално взаимодействие е показател за повишената тревожност на животното.

Резултатите от експеримента в повдигнат кръстосан лабиринт показват доза- и времезависим анксиолитично-подобен ефект на ПСАМ при млади/здрави плъхове. Доказателство за това е увеличеното изследване на откритите рамена на лабиринта (увеличен брой на влизания в отворените рамена, време, прекарано в тях, и съотношение на броя на влизанията в откритите рамена към общия брой влизания) от третираните с ПСАМ плъхове спрямо контролните животни. Ефектът е установен след 21- и 30-дневен период на третиране с ПСАМ в доза 10 ml/kg. Този резултат е в съответствие с изследването на Willis et al. (2009), които откриват, че флавоноиди и други полифеноли се натрупват в мозъка след дълготрайно приложение. Липсата на значими разлики в общия брой влизания в рамената между третираните с ПСАМ животни и контролите потвърждава, че ефектът не е вследствие на променена двигателна активност.

От резултатите в теста за социално взаимодействие се вижда, че, прилаган 21 дни, ПСАМ удължава времето на социално взаимодействие между тестовите партньори, като ефектът е значим при най-високата доза. Тези данни показват, че ПСАМ има анксиолитично-подобен ефект при млади/здрави плъхове. Прилаган в продължение на 30 дни, ПСАМ не повлиява времето на взаимодействие между тестовите партньори. Възможно обяснение на този резултат може да бъде намалената двигателна активност на животните. Локомоторната активност интерферира с резултатите от теста за социално взаимодействие. Вероятно, поради по-дългия период на приложение на ПСАМ, полифенолните субстанции кумулират в мозъка в по-висока степен (Willis et al., 2009) и водят до по-изявен седативен ефект след 30-дневно приложение в сравнение с 21-дневното приложение. Намалената двигателна активност е в съответствие с намалената възбудимост на централната нервна система и седацията (Prut et al., 2003).

Вероятно анксиолитично-подобният ефект на ПСАМ се дължи на съдържащите се в него полифенолни съединения, които са основните биологично активни вещества на сока. Резултатите от това проучване са в съответствие с изследвания на други автори, които доказват анксиолитични ефекти на растителни екстракти, богати на флавоноиди (Huen et al., 2003, Adachi et al., 2006; Barros et al., 2006; Kumar et al., 2008; Fernandez et al., 2009). Полифенолни съединения, които са съставки на ПСАМ, като кверцетин и хлорогенова киселина, също притежават анксиолитично-подобни ефекти (Bouayed et al., 2007, Aguirre-Hernández et al., 2010). Предишни проучвания с ПСАМ показват, че сокът, приложен еднократно, има анксиолитично-подобен ефект при плъхове (Valcheva-Kuzmanova et al., 2009).

Съществуват данни, че редица флавоноиди притежават бензодиазепино-подобна фармакологична активност чрез свързване с ГАМК<sub>A</sub> рецепторите (Marder et al., 2002, Wang et al., 2008, Fernandez et al., 2009). В изследване на Vignes et al. (2006) се установява, че флавоноидът епигалокатехин-3-галат (EGCG) може да взаимодейства с ГАМК<sub>A</sub> рецепторния комплекс, като потиска инхибицията на рецептора от негативния модулатор – methyl  $\beta$ -carboline-3-carboxylate. Поради това, обяснение за

*in vivo* анксиолитичното действие на EGCG може да бъде изместване на ендогенния негативен модулатор от ГАМК<sub>A</sub> рецептора.

За антоцианините също има данни, че притежават анксиолитичен ефект, който се дължи на свързване с бензодиазепиновите рецептори. При изследване на Gutierrez и съавт. (2014) се установява, че приложени при плъхове антоцианини проявяват афинитет към бензодиазепиновите рецептори, като изместват (около 50%) бензодиазепина флу-нитразепам от мястото му за свързване с ГАМК<sub>A</sub> рецептора.

Хлорогеновата киселина, която е основен полифенол в ПСАМ, притежава анксиолитично действие при изследвания с животни (Bouayed et al., 2007; Manach et al., 2004). При изследванията си Bouayed и съавт., (2007) установяват, че хлорогеновата киселина *in vivo* активира бензодиазепинови рецептори, а *in vitro* предпазва от оксидативен стрес. Тя притежава невротрофични ефекти *in vitro*, като стимулира невроналния растеж и диференциация, поддържа невропластичността, което също може да е свързано с анксиолитичните ѝ ефекти (Ito et al., 2008).

Вероятно анксиолитично-подобният ефект на ПСАМ се дължи на съдържащите се в него полифенолни съединения и има комплексен механизъм, включващ стимулиране на ГАМК-ергичната невротрансмисия, намаляване на оксидативния стрес и невротрофично действие.

### **3. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху депресивната симптоматика на млади/здрави плъхове**

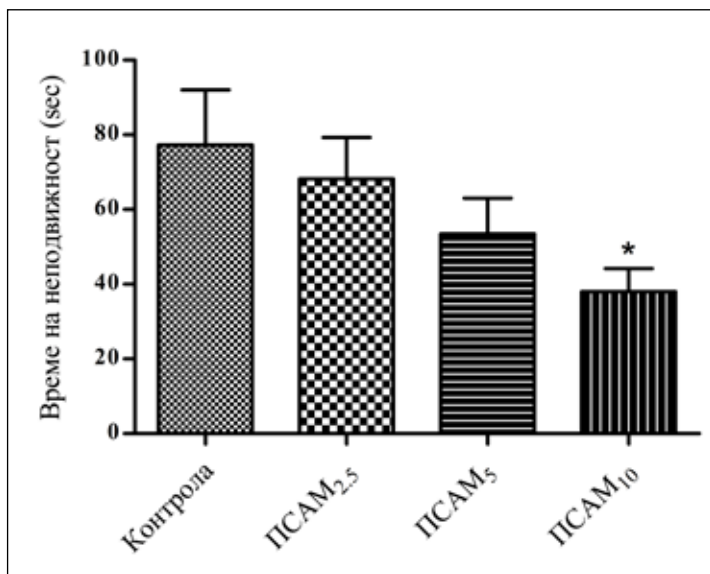
#### **3.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху депресивната симптоматика на млади/здрави плъхове в тест за принудително плуване (forced swim test)**

Мъжки Wistar плъхове (n = 48) са разделени в 4 групи от 12 животни всяка. Групите са означени като: Контрола, ПСАМ<sub>2,5</sub>, ПСАМ<sub>5</sub> и ПСАМ<sub>10</sub>. Контролните групи са приемали интрагастрално дестилирана вода в доза 10 ml/kg веднъж дневно 30 дни. ПСАМ е прилаган също интрагастрално веднъж дневно в дози 2.5 ml/kg (за ПСАМ<sub>2,5</sub> група), 5 ml/kg (за ПСАМ<sub>5</sub> група) и 10 ml/kg (за ПСАМ<sub>10</sub> група) в продължение на 30 дни. Тренировката за принудително плуване е с продължител-

ност 5 min и е извършена на 29<sup>-ия</sup> ден, а тестовата сесия (също 5 min) на 30<sup>-ия</sup> ден, един час след последното третиране.

Резултатите от теста за принудително плуване са представени на Фиг. 17.

След 30-дневно приложение на ПСАМ се наблюдава скъсяване на времето на неподвижност с 12% при група ПСАМ<sub>2,5</sub>, с 31% при група ПСАМ<sub>5</sub> и с 50% при група ПСАМ<sub>10</sub> в сравнение с контролната група (Фиг. 17). Тези резултати показват, че ПСАМ проявява доза-зависим ефект и най-силно понижава депресивната симптоматика при приложение в доза 10 ml/kg.



**Фиг. 17.** Ефект на ПСАМ, въвеждана интрагастрално в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg в продължение на 30 дни, върху времето на неподвижност в тест за принудително плуване. Стойностите са средна±SEM; n = 12; \*p < 0.05, в сравнение с контролната група

### 3.2. Обсъждане

Депресията е тежко протичащо психично разстройство, което води до продължителна нетрудоспособност на заболелите. Основни-



те симптоми са потиснато настроение, ниско самочувствие, загуба на интерес към обикновено приятни дейности, нарушения в съня, храненето и др. През 2010 г. 298 милиона души по света (4.3% от световната популация) страдат от депресия (Vos et al., 2012). Смята се, че основна роля в патогенезата на депресивните състояния играе нарушеното функциониране на норадренергичната и серотонинергичната невротрансмисия в централната нервна система. Моноаминоергичната теория за депресията предполага, че има намаляване в нивата на серотонин и норадреналин в централната нервна система (Delgado and Moreno, 2000). Съвременните антидепресивни лекарства подкрепят тази теория, тъй като механизмът им на действие е свързан с повишаване на серотонинергичната и норадренергичната невротрансмисия в мозъка (Leonard, 2001).

Съществуват множество доказателства, че при хора и животни хроничният стрес предизвиква намалена неврогенезата в хипокампа посредством намаляваща сигнализация на невротрофичните сигнални пътища, включващи CREB и BDNF (Castren et al., 2007). Понижените нива на невротрофините могат да бъдат повишавани при хронично лечение с антидепресивни лекарства (Castren et al., 2007). Освен това, неадаптивни отговори към стреса предизвикват хиперактивност на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек чрез стимулиране на освобождаването на адренокортикотропен хормон и последващо периферно освобождаване на стероиди/кортизол от надбъбречната жлеза (Sapolsky et al., 2000).

Оксидативният стрес е друг фактор, който може да играе важна роля в патогенетичните механизми на депресията. Установено е, че реактивни кислородни видове модулират нивата и дейността на норадреналин, серотонин, допамин и глутамат – основните невротрансмитери, които участват в невробиологията на депресията (Scapagnini et al., 2012). В допълнение, при тежка депресия са наблюдавани понижени концентрации на участващите в антиоксидантната защита витамин Е, цинк, коензим Q10, глутатион пероксидаза.

Тестът за принудително плуване е основен метод за изследване на депресивно-подобното поведение при гризачи (Porsolt et al. 1977). За оценка на поведението на животното се използва показателя време

на неподвижност. Повишеното време на неподвижност се свързва с депресивно-подобно поведение.

Резултатите от настоящото проучване показват, че ПСАМ, прилаган в продължение на 30 дни, намалява времето на неподвижност на опитните животни в тест за принудително плуване, като при най-високата доза ефектът е значим. Това показва, че ПСАМ притежава антидепресивно-подобен ефект при млади/здрави плъхове. Много е важно да се знае какъв е ефектът на ПСАМ в тези дози и продължителности на третиране върху спонтанната двигателна активност на животните. Ако изследваното вещество повишава двигателната активност на опитното животно, то може да даде фалшиво положителен резултат в теста за принудително плуване (Yi et al., 2011). Изследванията в апарат Opto Varimex показват, че ПСАМ доза-зависимо понижава двигателната активност на плъховете след 30-дневно приложение, което понижение е статистически значимо при 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 антидепресивно-подобен ефект на сока.

Точният механизъм на този ефект изисква допълнителни проучвания. Литературните данни показват, че растителни екстракти, богати на полифенолни съединения, както и изолирани фенолни субстанции, притежават антидепресивна активност. Много от изследователите се опитват да установят механизмите, които стоят зад антидепресивните ефекти на растителните препарати. За екстракта от *Hipericum perforatum* (жълт кантарион) е установено, че има комплексно действие, което включва: слаба инхибиция на ензима MAO A и B; инхибиране на синаптичното обратно поемане (uptake) на серотонин, норадреналин и допамин; афинитет към аденозинови, ГАМК<sub>A</sub>, ГАМК<sub>B</sub> и глутаматни рецептори; down-регулация на бета-адренергични рецептори и up-регулация на 5-HT<sub>2</sub> рецептори; регулация на гени, контролиращи функционирането на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек, и др. (Butterweck, 2003). Богатият на катехини, процианидини и флавоноиди екстракт от *Cecropia glaziovii* Sneth, както и шест негови пречистени съставки инхибират обратното захващане на серотонин,

допамин и норадреналин в синапси на различни мозъчни региони. Поради това антидепресивно-подобният ефект на този екстракт най-вероятно се дължи на повишаване нивото на моноаминните медиатори вследствие блокада на пресинаптичното им обратно поемане (Rocha et al., 2007).

В миши модел Takeda et al. (2002) установяват, че розмариновата киселина и нейният главен метаболит кафеена киселина значимо скъсяват времето на неподвижност в тест за принудително плуване. Авторите предполагат, че антидепресивно-подобният ефект на този полифенол се дължи на повишеното ниво на серотонин и норадреналин в синаптичната цепка (Takeda et al., 2002).

Екстрактът от *Ginkgo biloba* L. съдържа много полифеноли, включително флавонолите кверцетин, кемпферол и изорамнетин. Hou et al. (2010) предполагат, че антидепресивно-подобният ефект на този екстракт може да се дължи на способността му да повишава невротрофичните фактори BDNF и CREB. Има проучвания, показващи, че полифенолите на зеления чай имат антидепресивно-подобен ефект в модели на депресия при мишки и механизмът на този ефект е инхибиция на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек (Zhu et al., 2012).

Един от най-изразените и добре изследван ефект на полифенолните съединения е антиоксидантният. Поради това, че ПСАМ е изключително богат на полифеноли, той притежава и значителна антиоксидантна активност. Експеримент на Zafir et al. (2009) показва, че антидепресивните лекарства повишават ендогенната ензимна антиоксидантна защита и понижават липидната пероксидация при стрес-индуцирана депресия. Наличието на антиоксидантен ефект може да допринесе за антидепресивното действие на тези лекарства. Възможно е и механизмът на антидепресивно-подобното действие на полифенолите да включва предпазване на централната нервна система от оксидативен стрес.

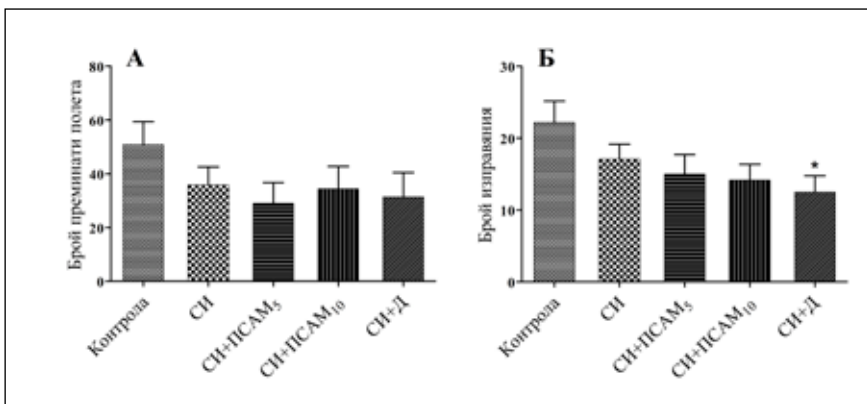
#### **4. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху поведението на пльхове, подложени на социална изолация**

Мъжки Wistar пльхове ( $n = 60$ ) са разделени на 5 групи от 12 животни всяка и обозначени като: Контрола, СИ (социално изолирани), СИ+ПСАМ<sub>5</sub>, СИ+ПСАМ<sub>10</sub>, СИ+Д (диазепам). За период от 8 седмици контролните пльхове (Контрола) се отглеждат в групи от по 6 животни, докато социално изолираните животни са отглеждани в индивидуални клетки. След първите 4 седмици в рамките на оставащите 4 седмици пльховете са третирани веднъж дневно интрагастрално чрез орогастрална сонда. Животните от групи Контрола и СИ получават дестилирана вода (10 ml/kg). Пльховете от група СИ+ПСАМ<sub>5</sub> са третирани с ПСАМ в доза 5 ml/kg (разреден с вода до общ обем 10 ml/kg), а тези от СИ+ПСАМ<sub>10</sub> групата – с ПСАМ в доза 10 ml/kg. Животните от група СИ+Д приемат диазепам в доза 0.1 mg/kg, под формата на разтвор с общ обем 10 ml/kg. След експерименталния период са извършени следните поведенчески тестове: тест открито поле, тест за социално взаимодействие и тест принудително плуване.

##### **4.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху двигателната активност**

Двигателната активност на опитните животни е изследвана в тест открито поле и резултатите са представени на Фиг. 18.

Социалната изолация предизвиква тенденция на намаляване на хоризонталната (брой преминати полета) (Фиг. 18А) и вертикалната (брой изправяния) (Фиг. 18Б) двигателна активност. При третираните с ПСАМ и диазепам животни двигателната активност е леко, но незначимо понижена, в сравнение с група Контрола и група СИ. Единствено при група СИ+Д има достоверно понижение в броя на изправянията ( $p < 0.05$ ) спрямо контролната група (Фиг. 18Б).

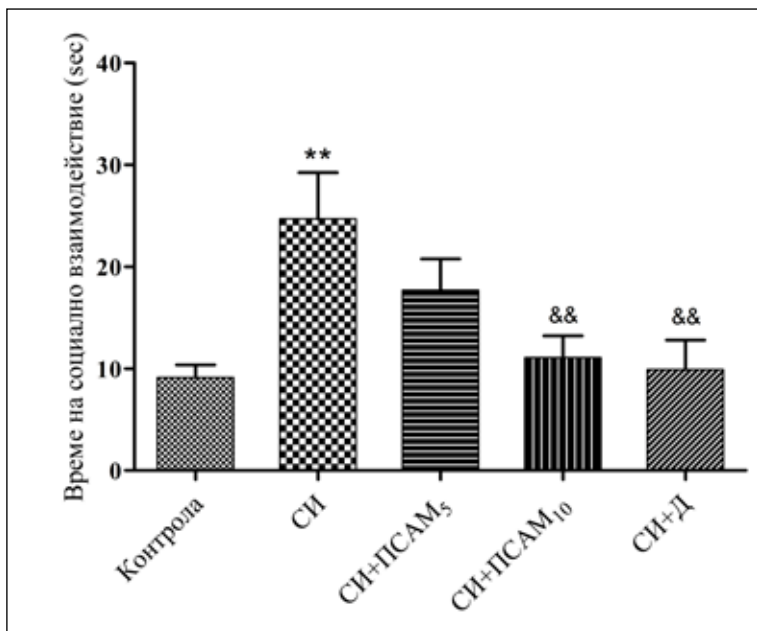


**Фиг. 18.** Брой преминати полета (панел А) и брой изправяния (панел Б) в тест открито поле на плъхове, подложени на социална изолация и третиранни с ПСАМ 5 ml/kg (СИ+ПСАМ<sub>5</sub>), ПСАМ 10 ml/kg (СИ+ПСАМ<sub>10</sub>) и диазепам 0.1 mg/kg (СИ+Д). Стойностите са средна±SEM; n = 12; \*p < 0.05 в сравнение с контролната група

#### 4.2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху тревожността

Тревожността е изследвана в тест за социално взаимодействие и резултатите са представени на Фиг. 19.

В този тест времето на социален контакт между животните от група СИ е значимо по-продължително ( $p < 0.01$ ) от това на контролните животни. Поведението на изолираните животни, третиранни с ПСАМ или диазепам, е подобно на това на контролите. При група СИ+ПСАМ<sub>10</sub> и група СИ+Д времето на социално взаимодействие е значимо по-кратко ( $p < 0.01$ ) от това на група СИ (Фиг. 19).

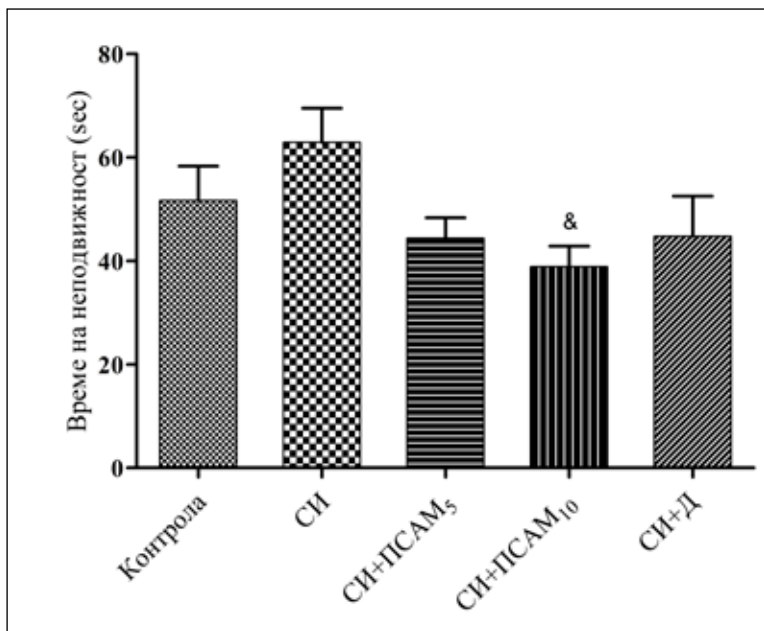


**Фиг. 19.** Време на социално взаимодействие при плъхове, подложени на социална изолация и третирани с ПСАМ 5 ml/kg (СИ+ПСАМ<sub>5</sub>), ПСАМ 10 ml/kg (СИ+ПСАМ<sub>10</sub>) и диазепам 0.1 mg/kg (СИ+Д). Стойностите са средна±SEM; n = 12; \*\*p < 0.01 спрямо група Контрола; &&p < 0.01 спрямо група СИ

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

Ефектът на ПСАМ върху депресивната симптоматика е изследван в тест за принудително плуване и резултатите са представени на Фиг. 20.

Социалната изолация предизвиква тенденция към удължаване на времето на неподвижност в сравнение с контролите. Третирането с ПСАМ и диазепам антагонизира тази тенденция, като времето на неподвижност на група СИ+ПСАМ<sub>10</sub> е значимо по-кратко (p < 0.05) от това на група СИ (Фиг. 20).



**Фиг. 20.** Време на неподвижност в тест за принудително плуване при плъхове, подложени на социална изолация и третирани с ПСАМ 5 ml/kg (СИ+ПСАМ<sub>5</sub>), ПСАМ 10 ml/kg (СИ+ПСАМ<sub>10</sub>) и диазепам 0.1 mg/kg (СИ+Д). Стойностите са средна±SEM; n = 12; \*p < 0.05 спрямо група СИ

#### 4.4. Обсъждане

Бозайниците са социални животни и комуникацията между членовете на групата е изключително важна за тяхното оцеляване.

В тази връзка изолацията на членове на една социална група би имала негативен ефект върху тях. При хората продължителната самота влошава психическото и физическото им здраве (Heinrich, 2006). В зряла възраст липсата на социални взаимоотношения повишава риска и от развитие на психични заболявания като депресия (Stansfeld et al., 1998) и болестта на Алцхаймер (Wilson et al., 2007). При животните изолацията може да бъде мощен стресор, който да предизвика негативни промени в тяхното поведение (Shoji and Mizoguchi, 2011; Fone and Porkess, 2008; Green and McCormick, 2013).

Резултатите от теста открито поле показват тенденция за намаляване на двигателната активност на изолираните животни. При третираните с ПСАМ и диазепам плъхове двигателната активност е леко понижена, което е по-изразено при животните, приемали диазепам. Тези резултати са в съответствие с данни на други изследователи, които установяват, че плъховете, подложени на хроничен мек стрес (Liu et al., 2005) или социална изолация (Spasojevic et al., 2007), имат намалена хоризонтална и вертикална двигателна активност в тест открито поле.

Тъй като социалната изолация е вид хроничен стрес, може да се очаква повишена тревожност и респективно намалено социално взаимодействие между изолираните животни. Интересно е да се отбележи, че обратно на тази логика, в настоящия експеримент социалната изолация предизвиква значимо повишение във времето на социално взаимодействие между тестовите партньори от СИ групата. Като обяснение на тези резултати може да се предположи, че продължителната социална изолация на животните повишава интереса за изследване на тестовия партньор и предизвиква агресивно поведение на плъховете в теста за социално взаимодействие. Приложението на ПСАМ или диазепам води до потискане на поведенческите промени, индуцирани от социалната изолация в теста за социално взаимодействие, и поведението на третираните животни е подобно на това на контролите. Подобни резултати получават и Wongwitdecha and Marsden (1996). Те установяват повишено социално взаимодействие на изолираните животни в сравнение с животни, отглеждани заедно, когато са поставени в ярко осветена, непозната среда. Освен повишено време на взаимодействие при изолираните животни тези автори наблюдават и агресивно поведение към тестовия партньор (хапане и ритане), което не се наблюдава при животните, които са отглеждани заедно. В опитите на тези изследователи претретирането с диазепам води до редуциране на агресивното поведение и съответно времето на социално взаимодействие при изолираните животни. Резултатите им показват, че социалната изолация индуцира агресивно поведение, което се променя от диазепам в теста за социално взаимодействие.

В съответствие с резултатите на Djorjevic et al. (2012) и при настоящето проучване социалната изолация предизвиква тенденция на



повишаване времето на неподвижност в теста за принудително плуване. Третирането с ПСАМ или с диазепам скъсява времето на неподвижност, т.е. противодейства на ефекта на социалната изолация. Най-изразено е намалението при ПСАМ, даван в доза 10 ml/kg. В този случай се проявява антидепресивно-подобният ефект на ПСАМ, който установяваме в същата доза при млади/здрави животни.

## **5. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху индуцирани от алкохол поведенчески промени при плъхове**

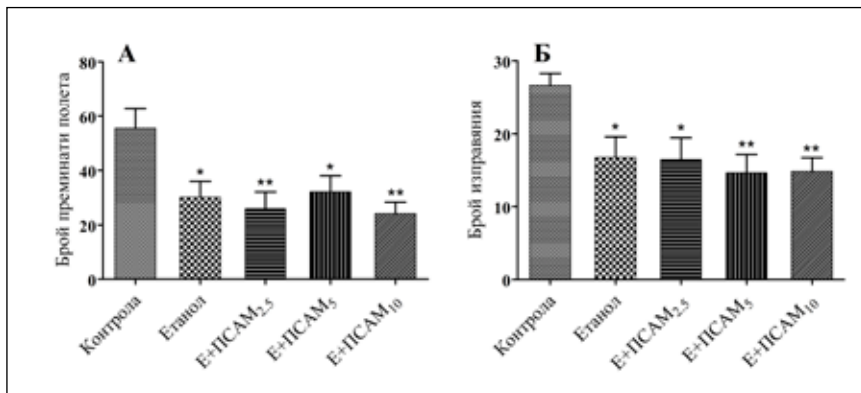
Женски Wistar плъхове ( $n = 60$ ) са разделени в пет групи от по 12 животни всяка: Контрола, Етанол (Е), Е+ПСАМ<sub>2,5</sub>, Е+ПСАМ<sub>5</sub>, Е+ПСАМ<sub>10</sub>. Контролната и Етаноловата група са претретираны двукратно (в 8.00 ч. и 16.00 ч.) с дестилирана вода (10 ml/kg), докато Е+ПСАМ<sub>2,5</sub> групата е претретирана в същите часове с ПСАМ в доза 2.5 ml/kg (разреден до общ обем от 10 ml/kg), Е+ПСАМ<sub>5</sub> групата с 5 ml/kg (разреден до общ обем от 10 ml/kg) и Е+ПСАМ<sub>10</sub> групата с 10 ml/kg. Един час след всяко претретиране животните от Контролната група получават дестилирана вода (в доза 24 ml/kg), докато плъховете от останалите групи са третирани с етанол, в доза 4 g/kg, като 20% разтвор с обем 24 ml/kg. Дневната доза на етанола е 8 g/kg. Експерименталните субстанции са прилагани на животните посредством интрагастрална сонда в продължение на 14 дни.

На 15<sup>-ия</sup> ден, 16 часа след последното третиране, са проведени поведенчески тестове – тест открито поле, тест повдигнат кръстосан лабиринт и тест за принудително плуване. Периодът между отделните тестове е 1 час. Оксидативният стрес е оценен чрез определяне концентрацията на реагиращи с тиобарбитурова киселина субстанции (ТБКРС) в мозъка на плъховете.

### **5.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху двигателната активност**

Ефектът на ПСАМ върху двигателната активност е изследван в тест открито поле. Резултатите от теста са представени на Фиг. 21.

Етанолът значимо намалява ( $p < 0.05$ ) хоризонталната (с 46%) (Фиг. 21А) и вертикалната (с 37%) (Фиг. 21Б) двигателна активност на плъховете спрямо контролните животни. Претретирането с ПСАМ не променя тази тенденция: при Е+ПСАМ<sub>2.5</sub> хоризонталната двигателна активност е намалена с 53% ( $p < 0.01$ ), а вертикалната с 38% ( $p < 0.05$ ); при Е+ПСАМ<sub>5</sub> хоризонталната двигателна активност е намалена с 42% ( $p < 0.05$ ), а вертикалната с 45% ( $p < 0.01$ ); при Е+ПСАМ<sub>10</sub> хоризонталната двигателна активност е намалена с 57% ( $p < 0.01$ ), а вертикалната с 44% ( $p < 0.01$ ) спрямо контролната група (Фиг. 21).



**Фиг. 21.** Ефект на ПСАМ, приложен като претретиране в дози 2.5 ml/kg, 5 ml/kg и 10 ml/kg на плъхове, приемащи етанол (8 g/kg), върху хоризонталната (панел А) и вертикалната (панел Б) двигателна активност. Стойностите са средна±SEM; n = 12; \*p < 0.05;\*\*p < 0.01 спрямо контролната група

## 5.2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху тревожността

Ефектът на ПСАМ върху тревожността е изследван в тест повдигнат кръстосан лабиринт. Резултатите са представени на Фиг. 22.

Етанолът индуцира значимо намаляване на влизанията в закритите рамена (с 53%;  $p < 0.01$ ) (Фиг. 22Б) и общия брой влизания в рамената (с 48%;  $p < 0.001$ ), спрямо група Контрола (Фиг. 22Г). Той незначимо

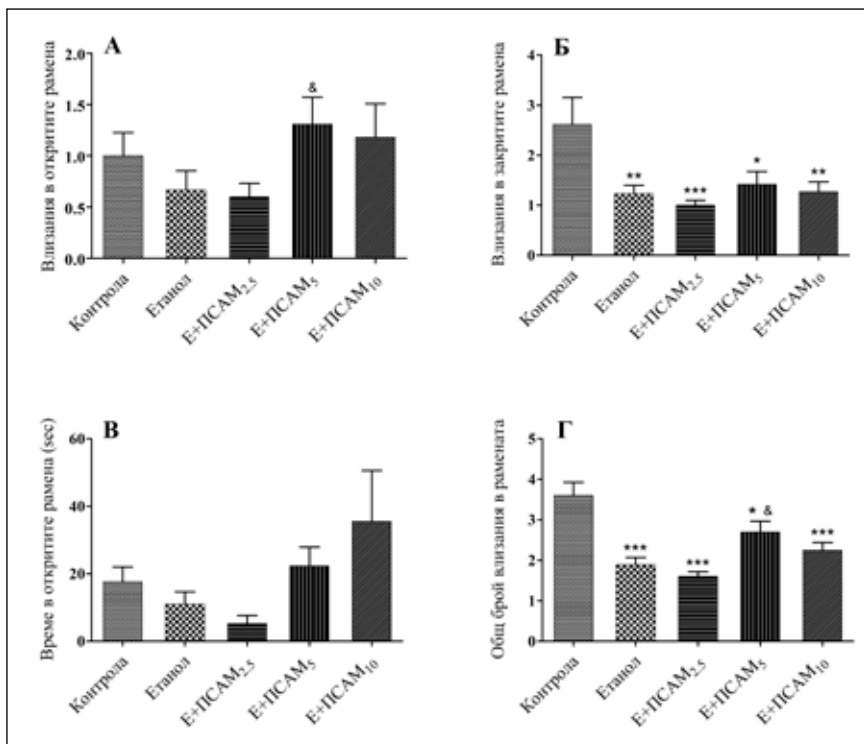
намалява влизанията в откритите рамена (Фиг. 22А) и времето, прекарано в тях (Фиг. 22В).

Броят на влизания в откритите рамена на третираните с ПСАМ животни не се различава от този на контролите. ПСАМ в доза 5 ml/kg значимо повишава броя на влизанията в откритите рамена (с 95%;  $p < 0.05$ ) спрямо група Етанол (Фиг. 22А).

Броят на влизания в закритите рамена на третираните с ПСАМ плъхове е намален спрямо контролната група: при група Е+ПСАМ<sub>2,5</sub> с 62% ( $p < 0.001$ ); при група Е+ПСАМ<sub>5</sub> с 46% ( $p < 0.05$ ); при група Е+ПСАМ<sub>10</sub> с 51% ( $p < 0.01$ ) и не се различава значимо от този на група Етанол (Фиг. 22Б).

Времето на престой в откритите рамена на третираните с ПСАМ животни не се различава значимо от това на групите Контрола и Етанол (Фиг. 22В).

Общият брой влизания в рамената на плъховете, приемали ПСАМ, е намален спрямо контролната група: при група Е+ПСАМ<sub>2,5</sub> с 56% ( $p < 0.001$ ); при група Е+ПСАМ<sub>5</sub> с 25% ( $p < 0.05$ ); при група Е+ПСАМ<sub>10</sub> с 38% ( $p < 0.001$ ). При група Е+ПСАМ<sub>5</sub> се наблюдава значимо повишение на общия брой влизания в рамената с 43% ( $p < 0.05$ ) в сравнение с група Етанол (Фиг. 22Г).



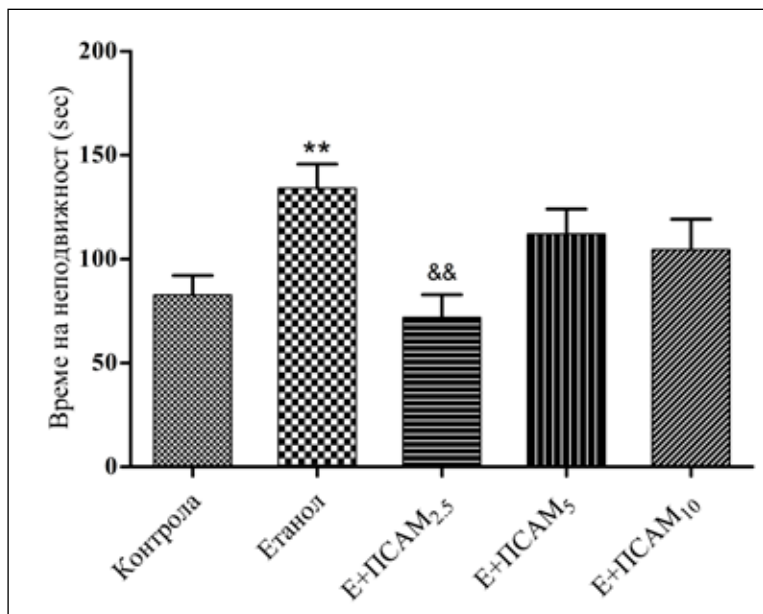
**Фиг. 22.** Ефект на PCAM, приложен като претретиране в дози 2.5 ml/kg, 5 ml/kg и 10 ml/kg на плъхове, приемащи етанол (8 g/kg), върху поведението им в повдигнат кръстосан лабиринт: влизания в откритите рамена (панел А); влизания в закритите рамена (панел Б); време, прекарано в откритите рамена (панел В); общ брой влизания в рамената (панел Г). Стойностите са средна±SEM; n = 12; \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 спрямо Контрола; &p < 0.05 спрямо група Етанол

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

Ефектът на PCAM върху депресивната симптоматика е изследван в тест за принудително плуване и резултатите са представени на Фиг. 23.

Времето на неподвижност на животните от група Етанол е значимо по-дълго (с 62%;  $p < 0.01$ ) в сравнение с това на контролните животни (Фиг. 23).

Времето на неподвижност на третираните с ПСАМ животни не се различава значимо от контролното време. При Е+ПСАМ<sub>2,5</sub> групата то е значимо по-кратко (с 46%;  $p < 0.01$ ) от това на група Етанол (Фиг. 23).



**Фиг. 23.** Ефект на ПСАМ, приложен като претретиране в дози 2.5 ml/kg, 5 ml/kg и 10 ml/kg при животни, приемащи етанол (8 g/kg), върху времето на неподвижност в тест за принудително плуване. Стойностите са средна $\pm$ SEM;  $n = 12$ ; \*\* $p < 0.01$ , спрямо Контрола; && $p < 0.01$  спрямо група Етанол

#### 5.4. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху оксидативния стрес в мозък

Определени са нивата на реагиращите с тиобарбитурова киселина субстанции като маркери за оксидативен стрес. Резултатите са представени в Таблица 3.

**Таблица 3.** Нива на ТБКРС в мозък на плъхове, третирани с ПСАМ (2.5 ml/kg; 5 ml/kg; 10 ml/kg) и етанол (8 g/kg)

Група Показател	Контрола	Етанол	Е+ПСАМ <sub>2.5</sub>	Е+ПСАМ <sub>5</sub>	Е+ПСАМ <sub>10</sub>
ТБКРС мозък [nmol/g]	87.8±7.1	93.4±4.1	81.4±5.6	87.8±3.8	87.8±7.5

Резултатите показват, че нито алкохолът, нито претретирването с ПСАМ дават значими промени в ТБКРС в мозъка на опитните животни.

### 5.5. Обсъждане

Алкохолизмът (алкохолната зависимост) е най-тежката форма на алкохолната злоупотреба. Подобно на другите зависимости и алкохолната се изявява с развитие на толеранс, пристрастяване и физическа зависимост (абстинентен синдром). Алкохолизмът може да има неблагоприятно въздействие върху психичното здраве, като най-честите симптоми са тревожността и потиснатото настроение (Dunn and Cook, 1999).

Въпреки че точният механизъм, по който алкохолът постига ефектите си, е предмет на дебати, изследвания в последното десетилетие показват, че етанолът диференцирано повлиява няколко невротрансмитерни системи в ЦНС. Етанолът е инхибитор на глутаматните NMDA рецептори и продължителният му прием води до компенсаторна up-регулация на NMDA рецепторите. Смята се, че тези промени в глутаматната невротрансмисия са причина за развитието на толеранс и зависимост към алкохола, както и на синдрома на отнемането (Nagy, 2008). При плъхове, приемали етанол, се наблюдава и понижено ниво на кортикалния норадреналин. Авторите свързват потиснатата норадреналинова невротрансмисия с алкохол-индуцираното депресивно-подобно поведение на опитните животни (Getachew et al., 2010).

Острата и хронична употреба на алкохол модулира вътреклетъчните сигнални пътища, като CREB протеин, в мозъка. Проучване на Moonat et al. (2010) установява, че свързаните с CREB протеина – невропептид Y, BDNF и кортикотропин освобождаващ фактор могат

да играят основна роля в поведенческите ефекти на етанола. BDNF подобно на повечето невротрофини е отговорен за невроналната устойчивост, развитие и пластичност. Литературни данни показват, че алкохол-индуцираното депресивно-подобно поведение при плъхове е свързано с редукция на хипокампа BDNF (Hauser et al., 2011).

В множество изследвания се установява, че свободни радикали или реактивни кислородни видове, като  $\alpha$ -хидроксиетиллов радикал, супероксидни и хидроксилни радикали, са отговорни за етанол-индуцирания оксидативен стрес (Hoek and Pastorino, 2002; Nordmann et al., 1992). Всички тези радикали притежават потенциал да реагират бързо с липиди, което да доведе до липидна пероксидация. Липидните пероксиди са потенциално токсични и могат да увредят повечето видове клетки (Das and Vasudevan, 2007).

В представения експеримент третирането с етанол води до намаляване в спонтанната двигателна активност на плъхове в тест открито поле и повдигнат кръстосан лабиринт. Този ефект може да бъде свързан с понижена централно нервна възбудимост (File et al., 1994), повишена тревожност и страх (Rygula et al., 2005), загуба на интерес към нови стимулиращи ситуации, дефицит на мотивация и емоционалност (Katz et al., 1981). В теста повдигнат кръстосан лабиринт етанолът намалява броя на влизанията и времето на престой в откритите, броя на влизанията в закритите рамена и общия брой влизания в рамената. Тези ефекти на етанола са вероятно вследствие на понижена двигателна активност на плъховете, което се потвърждава и от резултатите в тест открито поле. В теста за принудително плуване алкохолът повишава времето на неподвижност, което показва намалена мотивация и отчаяние (Porsolt, 1979) и може да бъде тълкувано като поведенческа изява на депресивно-подобни симптоми при плъхове. Всички тези ефекти на алкохола вероятно не са асоциирани с оксидативен стрес, което се вижда от липсата на промяна в нивата на ТБКРС.

Приложен като претретиране, ПСАМ не повлиява значимо намалената от етанола централно-нервна възбудимост, което се демонстрира в тест открито поле. В повдигнатия кръстосан лабиринт ПСАМ в доза 5 ml/kg значимо повишава броя на влизанията в отворените рамена спрямо група Етанол. Това обаче е съпроводено с повишение на об-

щия брой влизания в рамената, което говори за увеличена двигателна активност на плъховете и корелира с резултата от хоризонталната активност на тази група в теста открито поле. Поради това повишеният брой влизания в отворените рамена на животните от група Е+ПСАМ<sub>5</sub> вероятно не се дължи на анксиолитичен ефект. При групите, третирани с ПСАМ в доза 2.5 ml/kg и 10 ml/kg, резултатите от теста в повдигнат кръстосан лабиринт не се различават значимо от тези на група Етанол. Редукцията във времето на неподвижност в тест за принудително плуване показва, че ПСАМ има антидепресивно-подобен ефект в доза 2.5 ml/kg. Този ефект вероятно не се дължи на антиоксидантната активност на ПСАМ, поради факта, че етанолът не индуцира оксидативен стрес (не са повишени нива на ТБКРС). Поради това намалението на алкохол-индуцираните депресивно-подобни симптоми при плъхове от ПСАМ може да се дължи на ефект върху невротрансмисията. Някои автори предполагат, че полифенолните съединения повишават наличността на медиаторите норадреналин и серотонин в синаптичната цепка (Takeda et al., 2002; Machado et al., 2008). Полифенолът резвератрол, който се среща в растението *Polygonum cuspidatum*, притежава антидепресивно-подобна активност при плъхове, подложени на хроничен непредвидим стрес, която се обяснява с повишаване на BDNF и CREB в хипокампа и амигдалата на опитните животни (Dexiang et al., 2014).

## **6. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху поведението и оксидативния стрес при плъхове, подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм (НДР)**

Мъжки Wistar плъхове (n = 40) са разделени на четири групи: Контрола, НДР, НДР+ПСАМ<sub>5</sub>, НДР+ПСАМ<sub>10</sub>. Животните от групи Контрола и НДР са третирани еднократно дневно интрагастрално с вода (10 ml/kg), а тези от групи НДР+ПСАМ<sub>5</sub> и НДР+ПСАМ<sub>10</sub> – с ПСАМ, респективно в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg. Плъховете от групи НДР, НДР+ПСАМ<sub>5</sub> и НДР+ПСАМ<sub>10</sub> са подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм чрез непрекъснато осветяване в продължение на 14

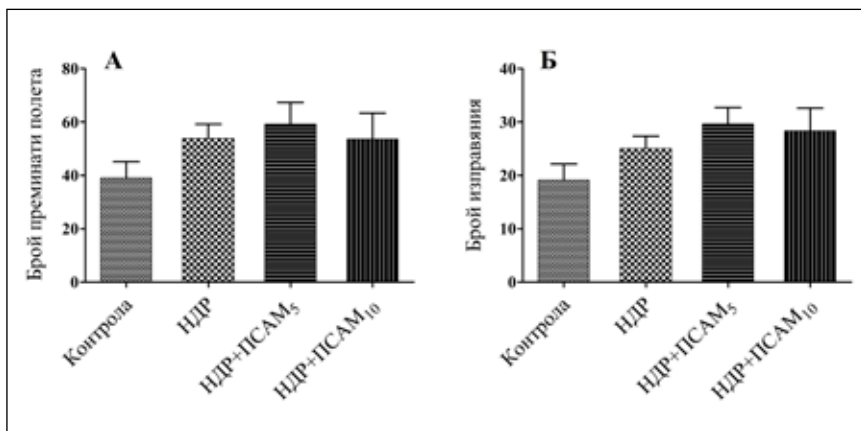


дни. Животните от контролната група са с нормален денонощен ритъм. На 15<sup>-ия</sup> ден са извършени следните поведенчески експерименти: тест открито поле, тест за социално взаимодействие и тест за принудително плуване. Оксидативният стрес е оценен чрез определяне концентрацията на реагиращи с тиобарбитурова киселина субстанции в мозъка на плъховете.

### 6.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху двигателната активност

Ефектът на ПСАМ върху двигателната активност е изследван в тест открито поле. Резултатите са представени на Фиг. 24.

Непрекъснатата осветеност повишава незначимо двигателната активност на плъховете спрямо контролите. Приложението на ПСАМ също не води до значими промени в двигателната активност на животните (Фиг. 24).

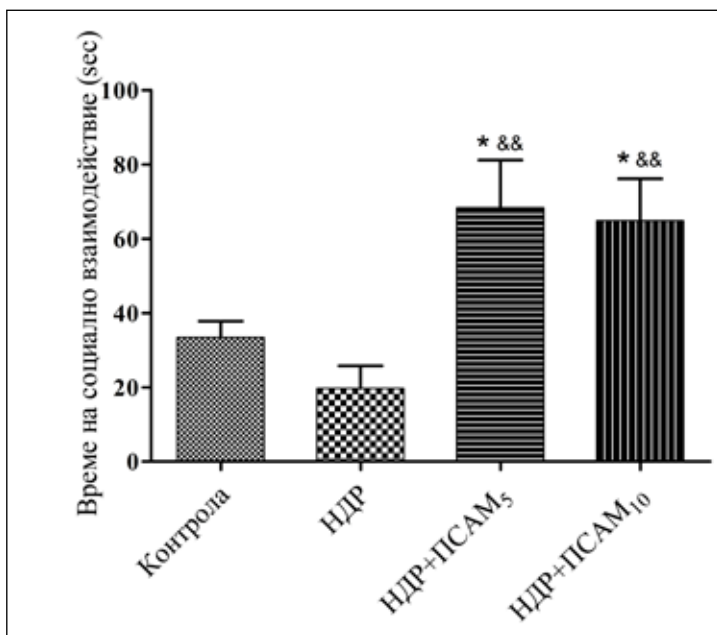


**Фиг. 24.** Ефект на ПСАМ, приложен в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg, върху хоризонталната (панел А) и вертикалната (панел Б) двигателна активност на плъхове, подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм. Стойностите са средна±SEM; n = 10

## 6.2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху тревожността

Ефектът на ПСАМ върху тревожността е изследван в тест за социално взаимодействие и резултатите са представени на Фиг. 25.

В този тест нарушеният светлинен денонощен ритъм скъсява с гранична значимост ( $p = 0.0565$ ) взаимодействието между тестовите партньори спрямо контролите. Третирането с ПСАМ и в двете дози удължава времето на социално взаимодействие между животните със 105% при група НДР+ПСАМ<sub>5</sub> ( $p < 0.05$ ) и с 94% при група НДР+ПСАМ<sub>10</sub> ( $p < 0.05$ ) спрямо група Контрола. Спрямо група НДР времето на социален контакт е удължено при група НДР+ПСАМ<sub>5</sub> с 247% ( $p < 0.01$ ), а при група НДР+ПСАМ<sub>10</sub> с 229% ( $p < 0.01$ ) (Фиг. 25).

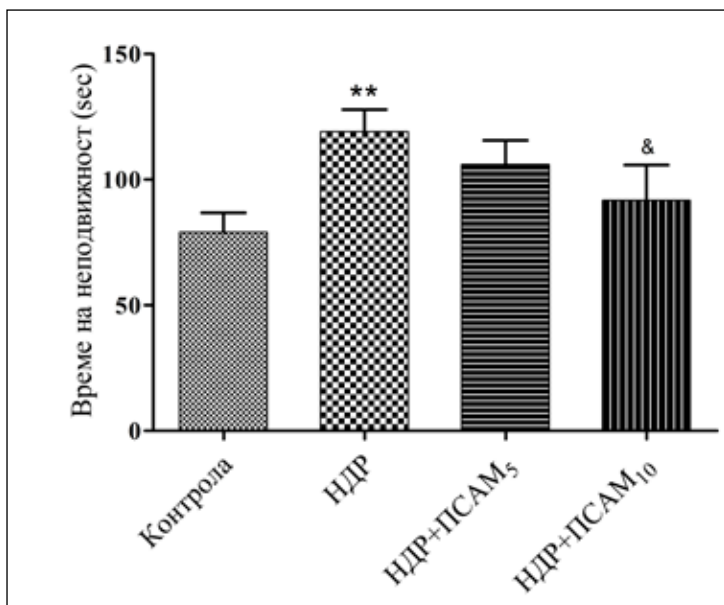


**Фиг. 25.** Ефект на ПСАМ, приложен в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg, върху времето на социално взаимодействие при плъхове, подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм. Стойностите са средна±SEM;  $n = 10$ ; \* $p < 0.05$  спрямо Контрола; && $p < 0.01$  спрямо група НДР

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

Ефектът на ПСАМ върху депресивната симптоматика е изследван в тест за принудително плуване. Резултатите са представени на Фиг. 26.

В теста за принудително плуване времето на неподвижност на НДР групата е значимо по-дълго (с 51%;  $p < 0.01$ ) от това на контролната група. ПСАМ скъсява времето на неподвижност на животните с нарушен светлинен денонощен ритъм, като при група НДР+ПСАМ<sub>10</sub> то е значимо по-кратко (с 23%;  $p < 0.05$ ) в сравнение с това на група НДР (Фиг. 26).



**Фиг. 26.** Ефект на ПСАМ, приложен в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg, върху времето на неподвижност в тест за принудително плуване при плъхове, подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм.

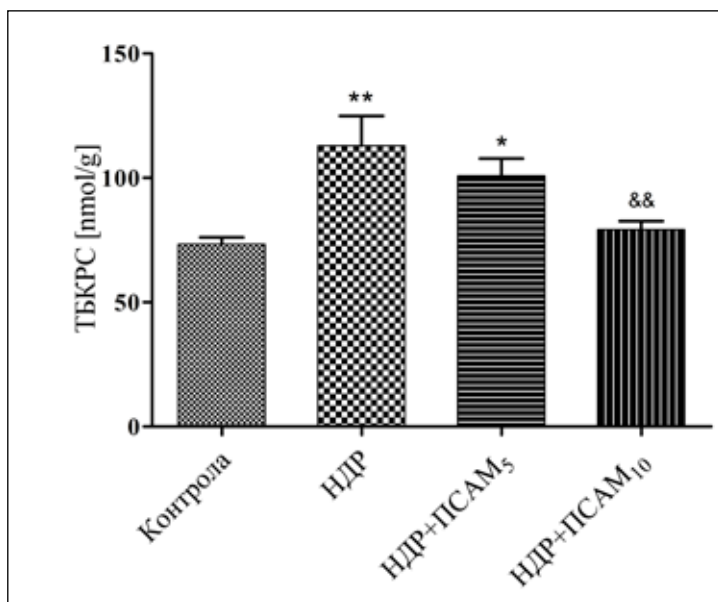
Стойностите са средна $\pm$ SEM;  $n = 10$ ;

\*\* $p < 0.01$  спрямо Контрола; & $p < 0.05$  спрямо група НДР

#### 6.4. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху оксидативния стрес в мозък

Оксидативният стрес е оценяван чрез определяне нивата на реагиращите с тиобарбитурова киселина субстанции. Резултатите са представени на Фиг. 27.

Концентрацията на ТБКРС в мозъка на плъхове, подложени на непрекъснатата осветеност (НДР група), е значимо по-висока (с 54%;  $p < 0.01$ ) от тази на контролната група. ПСАМ доза-зависимо редуцира ТБКРС, като при НДР+ПСАМ<sub>10</sub> групата намаляването на нивата им е значимо (с 30%;  $p < 0.01$ ) спрямо НДР групата (Фиг. 27).



**Фиг. 27.** Ефект на ПСАМ, приложен в дози 5 ml/kg и 10 ml/kg, върху нивата на ТБКРС в мозък на плъхове, подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм. Стойностите са средна±SEM;  $n = 10$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  спрямо Контрола; && $p < 0.01$  спрямо група НДР

## 6.5. Обсъждане

Биологичните ритми са резултат на адаптация на живите организми към цикличността (ден и нощ, сезони), породена от въртенето на Земята. Затова организмите имат синхронизирани ритми с цикличните дневно/нощни и сезонни промени, наречени циркадни ритми. През 70-те години на миналия век учени са установили, че лезии в супрахиазматичния нуклеус водят до загуба на циркадните ритми (Moore and Eichler, 1972; Stephan and Zucker, 1972). Това означава, че в мозъка съществува структура, която подобно на часовник регулира процесите в организма, съобразени с промените в околната среда. Нарушаването на циркадните ритми води до разстройване на съня, раздразнителност, загуба на внимание, стомашно-чревни или сърдечно-съдови проблеми, а също и тенденция към развитие на ракови заболявания (Knutsson, 2003; Hastings et al., 2003; Sahar and Sassone-Corsi, 2009; Bechtold et al., 2010; Reed, 2011). Една от често използваните методики за нарушаване на циркадните ритми в експериментални модели е продължителното излагане на животните на непрекъсната светлина (Depres-Brummer et al., 1995; Ikeda et al., 2000). Поставянето на опитните животни на непрекъсната осветеност води до раздразнимост, депресивно-подобно и тревожно-подобно поведение, промени в паметта (Fujioka et al., 2011; Fonken et al., 2009; Dauchy et al., 2010; Ma et al., 2007).

При плъхове, изложени на непрекъсната осветеност, се наблюдава намалена активност на супрахиазматичния нуклеус, водещо до промени в циркадните ритми и развитие на тревожност и депресивно-подобно поведение (Tapia-Osorio et al. 2013; Edelstein et al. 2000).

Резултатите от проведеното проучване показват, че в теста открито поле нарушаването на денонощния ритъм чрез непрекъсната осветеност води до незначимо повишаване на хоризонталната и вертикалната двигателна активност на опитните животни. Приложението на ПСАМ не променя тази тенденция.

В теста за социално взаимодействие животните, подложени на непрекъсната осветеност, имат намаление във времето на социално взаимодействие (с гранична значимост) спрямо контролните животни, което предполага тревожно поведение. Значимо повишение на социалното взаимодействие спрямо група НДР се наблюдава при животни,

подложени на непрекъсната осветеност и третирани с ПСАМ. Това не е резултат от променена двигателна активност на животните, тъй като не се наблюдават значими разлики в хоризонталната и вертикалната активност на НДР, НДР+ПСАМ<sub>5</sub> и НДР+ПСАМ<sub>10</sub> групите. Установено е и значимо повишение на социалния контакт на третираните с ПСАМ животни спрямо контролната група. Резултатите показват, че освен наблюдавания анксиолитично-подобен ефект на самият сок, който установихме в същия тест при млади/здрави животни, вероятно ПСАМ има анксиолитично-подобен ефект и при плъхове с тревожно поведение, индуцирано от нарушен светлинен денонощен ритъм. В теста за принудително плуване нарушаването на денонощния ритъм увеличава значимо времето на неподвижност на плъховете. Това говори за депресивно-подобна симптоматика при тези опитни животни. Обяснение на този резултат може да се търси в променена активност на различни хормони или невротрансмитери в супрахиазматичния нуклеус. Съществуват литературни данни, че излагането на непрекъсната осветеност води до нарушение в активността на серотонина (Graeff et al., 1996), ГАМК (Fonken et al., 2009) и на кортикостеронония циркаден ритъм (Claustrat et al. 2008; Castro et al. 2005), което се асоциира с развитието на тревожност и депресивно-подобно поведение (Castro et al. 2005; Ma et al. 2007). Следователно, излагането на непрекъсната осветеност в рамките на 14 дни може да се използва като експериментален модел на депресивно-подобни състояния при плъхове. Приложението на ПСАМ води до значимо намаляване на времето на неподвижност в теста за принудително плуване. На базата на тези резултати можем да предположим, че ПСАМ притежава антидепресивно-подобен ефект при плъхове с нарушен денонощен светлинен ритъм. Този ефект на ПСАМ може да бъде свързан със съдържащите се в него полифенолни съединения. Ревю на Müller (2003) показва, че съдържащият полифеноли екстракт от *Hipericum perforatum* инхибира на синаптичното обратно поемане на невротрансмитерите серотонин, норадреналин, допамин, ГАМК и глутамат, което вероятно е свързано с антидепресивното му действие. Освен това е установено, че флавоноидите в *Hipericum perforatum* редуцират активността на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек при плъхове (Butterweck et al. 2004).

Резултатите от биохимичните изследвания показват, че ТБКРС са значимо повишени в мозъка на опитните животни с нарушен денонощен ритъм, което говори за оксидативен стрес. Подобни резултати получават и други изследователи (Baydaş et al., 2001; Navara and Nelson, 2007; Traykova et al., 2012). Вероятно нарушаването на денонощния ритъм чрез излагането на непрекъсната осветеност стимулира продукцията на супероксид и азотен оксид в мозъка, което води до формирането на пероксинитрит. Той от своя страна се разпада до хидроксилни радикали и азотен двуоксид, които са мощни цитотоксични оксиданти, предизвикващи оксидативен стрес в мозъка (Beckman, 1991). Повишените нива на ТБКРС в настоящия експеримент са резултат от липидна пероксидация в мозъка, която вероятно е свързана с генерирането на посочените радикали. Оксидативният стрес също би могъл да бъде обяснение за депресивно-подобното поведение на животните в теста за принудително плуване. ПСАМ намалява нивата на оксидативния стрес, като значими резултати се получават при доза 10 ml/kg. Високата антиоксидантната активност на полифенолите от ПСАМ (Valcheva-Kuzmanova et al. 2013) може да е причина за тези резултати.

## **7. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху резерпин-индуцирана хипокинезия и оксидативен стрес при плъхове**

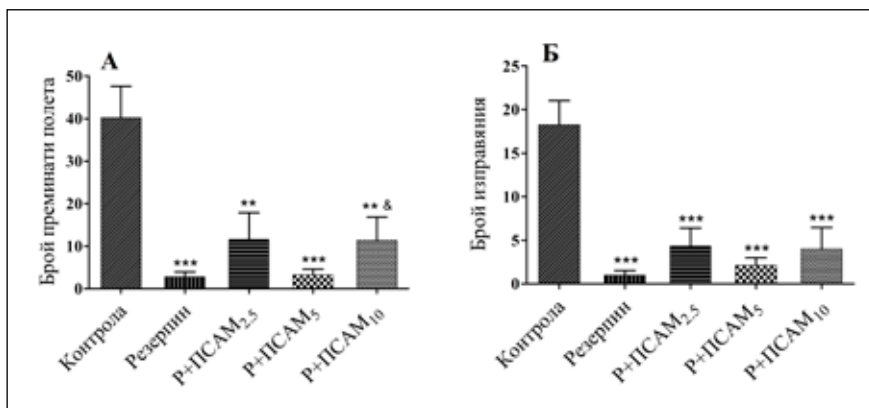
Мъжки Wistar плъхове ( $n = 45$ ) са разделени в 5 групи по 9 животни обозначени като: Контрола, Резерпин, Р+ПСАМ<sub>2,5</sub>, Р+ПСАМ<sub>5</sub>, Р+ПСАМ<sub>10</sub>. Резерпинът е прилаган еднократно, интраперитонеално в доза 6 mg/kg (като разтвор в 5% диметил сулфоксид – ДМСО, 2 ml/kg) на плъховете от групи Резерпин, Р+ПСАМ<sub>2,5</sub>, Р+ПСАМ<sub>5</sub> и Р+ПСАМ<sub>10</sub>. Животните от контролната група са инжектирани еднократно, интраперитонеално с 5% ДМСО (2 ml/kg). ПСАМ е прилаган интрагастрално чрез сонда три пъти – веднага след инжектирането с резерпин, на 19<sup>-ия</sup> и 23<sup>-ия</sup> час. Животните от Р+ПСАМ<sub>2,5</sub> групата са третирани с ПСАМ в доза 2.5 ml/kg (разтворен с вода до общ обем 10 ml/kg), тези от Р+ПСАМ<sub>5</sub> групата – с ПСАМ в доза 5 ml/kg (разтворен с вода до общ обем 10 ml/kg), а Р+ПСАМ<sub>10</sub> групата – с ПСАМ в доза 10 ml/kg.

Плъховете от контролната група са третирани с дестилирана вода (10 ml/kg) в същите времеви точки. На 24<sup>-ия</sup> час след прилагането на резерпин е проведен тест открито поле. След умъртвяване на животните е взет мозък за изследване на реагиращи с тиобарбитурова киселина субстанции като маркери за оксидативен стрес.

### 7.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и резерпин върху двигателната активност

Ефектът на ПСАМ и резерпин върху двигателната активност е изследван в тест открито поле. Резултатите са представени на Фиг. 28.

Резерпинът предизвиква значимо намаляване ( $p < 0.001$ ) в хоризонталната с 93% (Фиг. 28А) и вертикалната двигателна активност с 95% (Фиг. 28Б) при плъхове спрямо контролната група. Прилагането на ПСАМ индуцира тенденция към повишаване на двигателната активност на третираните с резерпин плъхове. Хоризонталната двигателна активност е значимо повишена при група Р+ПСАМ<sub>10</sub> със 150% (& $p < 0.05$ ) в сравнение с група Резерпин (Фиг. 28А).



**Фиг. 28.** Ефект на ПСАМ в дози 2.5 ml/kg, 5 ml/kg и 10 ml/kg, приложен трикратно след инжектиране на резерпин (Р) върху хоризонталната (панел А) и вертикалната (панел Б) двигателна активност на плъхове.

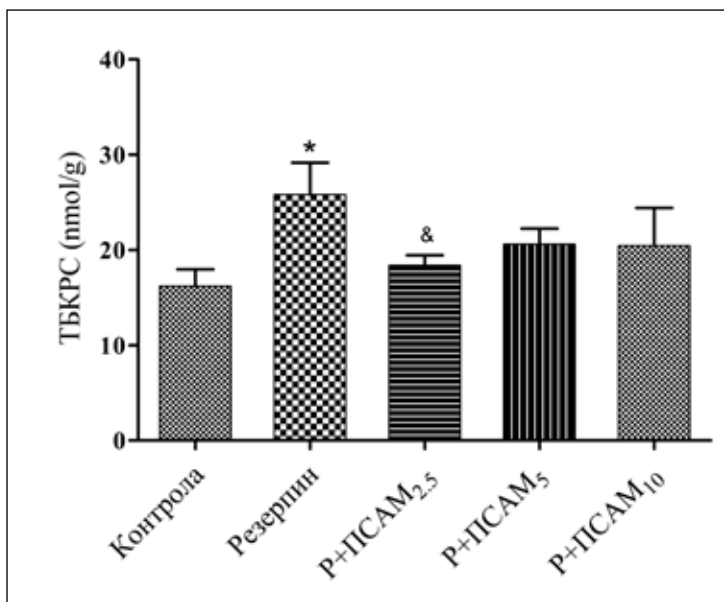
Стойностите са средна±SEM; n = 9; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , спрямо Контрола; & $p < 0.05$  спрямо група Резерпин



## 7.2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху резерпин-индуцирания оксидативен стрес в мозък

Определени са нивата на реагиращите с тиобарбитурова киселина субстанции в мозъка на плъховете. Резултатите са представени на Фиг. 29.

Нивата на ТБКРС в мозък от животните от група Резерпин са значимо по-високи (с 59%;  $p < 0.05$ ) от тези на контролните плъхове. Концентрацията на ТБКРС в мозък от плъхове, третирани с ПСАМ, е близка до тази при контролните животни, като при P+ПСАМ<sub>2.5</sub> групата е значимо по-ниска (с 29%;  $p < 0.05$ ) от тази на група Резерпин (Фиг. 29).



**Фиг. 29.** Ефект на ПСАМ в дози 2.5 ml/kg, 5 ml/kg и 10 ml/kg, приложен трикратно след инжектиране на резерпин (P), върху нивата на ТБКРС в мозък на плъхове. Стойностите са средна±SEM; n = 9; \* $p < 0.05$  спрямо Контрола; & $p < 0.05$  спрямо група Резерпин

### 7.3. Обсъждане

В това проучване резултатите от теста открито поле показват значимо намаление в двигателната активност на третираните с резерпин животни. Резерпин-индуцираната хипокинезия може да бъде обяснена със способността на лекарството да блокира необратимо везикуларния моноаминен транспортер (Henry, 1989). Това води до невъзможност норадреналинът, допаминът и 5-хидрокситриптаминът (серотонин) да бъдат депонирани в техните пресинаптични везикули, в резултат на което тези медиатори се метаболизират от ензимите моноаминооксидаза (MAO) и катехол-О-метилтрансфераза (КОМТ). MAO съществува като две изоформи – MAO-A и MAO-B. MAO-A с предпочитание метаболизира серотонина, докато норадреналинът и допаминът са субстрат и на двете изоформи. Намаленото ниво на норадреналин и серотонин в централната нервна система се смята за причина за изява на депресивни симптоми, което е един от нежеланите ефекти на резерпина. Намаляването на допамина в централната нервна система води до лекарство-индуциран паркинсонизъм, характеризиращ се с хипокинезия, мускулна ригидност, орофациални дискинезии и др. (Barcelos, 2010). В мозъка на плъховете резерпинът значимо повишава нивата на ТБКРС, което показва, че е индуциран оксидативен стрес в третираните с него животни. Блокдата на допаминовия везикуларен транспортер от резерпин води до окислителен метаболизъм чрез MAO на този медиатор (Fuentes et al., 2007). В резултат се формират допаминови хинони и хидроген пероксиди, които водят до оксидативен стрес (Burger et al., 2003; Naidu et al., 2004) в области на мозъка, богати на моноаминни невротрансмитъри, като например базалните ганглии, които са много уязвими на увреждане от свободни радикали (Lohr et al., 2003). Увреждането на базалните ганглии се асоциира с нарушения в двигателната активност (Dawson et al., 2000). Nado и съавт. (2009) установяват, че третираните с резерпин животни имат повишени нива на липидна пероксидация и ниски нива на детоксикиращи ензими като супероксид дисмутаза, каталаза и редуциран глутатион, което вероятно се дължи на генерирането на свободни радикали. Те прилагат съдържащ кверцетин и антоцианини екстракт от корени на *Hibiscus rosa*

*sinensis*, който намалява нивата на липидната пероксидация и увеличава антиоксидантните ензими.

ПСАМ намалява индуцирания от резерпин оксидативен стрес, в резултат на което нивата на ТБКРС на третираниите с ПСАМ плъхове не се различават от контролните нива. ПСАМ е изключително богат на полифенолни съединения, които са мощни антиоксиданти, и това може да обясни намаления оксидативен стрес при третираниите с ПСАМ животни. Резултатите от този експеримент също показват, че ПСАМ частично антагонизира индуцираната от резерпин хипокинезия. За момента не можем да дадем обяснение на факта, че ПСАМ в доза 5 ml/kg има по-малък ефект върху локомоторната активност в сравнение с ефектите в дози 2.5 ml/kg и 10 ml/kg. Антагонистичният ефект на ПСАМ върху индуцираната от резерпин хипокинезия може да бъде обяснен с вероятен инхибиторен ефект на полифенолите от сока върху активността на MAO. Тази хипотеза се поддържа от *in vitro* експерименти, които показват, че основният антоцианин в ПСАМ – цианидин и цианидин-гликозид, инхибират активността на MAO-A и MAO-B (Dreiseitel et al., 2009). Подобни данни съществуват и за полифеноли, съдържащи се в зеления чай, които инхибират активността на MAO и увеличават нивата на моноамините в С6 астроцитни клетки на плъхове (Mazzio et al., 1998). Резултатите от настоящото проучване се потвърждават и от експеримент, при който галова киселина намалява индуцираните от резерпин двигателни нарушения (орофациални дискинезии) при плъхове (Reckziegel et al., 2013).

## V. ИЗВОДИ

1. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa*, при субхронично приложение, намалява доза-зависимо общата двигателна активност и изследователското поведение при млади/здрави плъхове, без да нарушава хабитуацията на животните към новата среда.
2. Приложен субхронично, плодовият сок от *Aronia melanocarpa* проявява анксиолитично-подобен ефект при млади/здрави плъхове.
3. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa*, при субхронично приложение, намалява депресивно-подобното поведение на млади/здрави плъхове.
4. При плъхове, подложени на социална изолация, плодовият сок от *Aronia melanocarpa*:
  - не променя общата двигателна активност на животните;
  - предотвратява индуцираното от изолацията повишаване на социалното взаимодействие/агресивно поведение;
  - предотвратява предизвиканата от изолацията тенденция за повишаване на депресивната симптоматика.
5. При плъхове с алкохол-индуцирани поведенчески промени плодовият сок от *Aronia melanocarpa*:
  - не повлиява значимо намалената от алкохола централно-нервна възбудимост;
  - проявява антидепресивно-подобен ефект.
6. При плъхове, подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм, плодовият сок от *Aronia melanocarpa*:
  - не променя значимо двигателната активност на животните;
  - проявява анксиолитично-подобен ефект;
  - проявява антидепресивно-подобен ефект;
  - намалява оксидативния стрес, като предотвратява липидната пероксидация в мозъка.
7. При плъхове с резерпин-индуцирана хипокинезия и оксидативен стрес плодовият сок от *Aronia melanocarpa*:
  - частично антагонизира хипокинезията;
  - предотвратява резерпин-индуцирания оксидативен стрес.

## VI. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За пръв път е изследван ефектът на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* върху двигателната активност при плъхове, като е установено, че при субхронично приложение на млади/здрави животни потиска изследователското поведение и общата двигателна активност, вероятно вследствие на седативен ефект.
2. За пръв път е установен анксиолитично-подобен ефект при субхронично приложение на плодов сок от *Aronia melanocarpa* при:
  - млади/здрави плъхове;
  - плъхове с нарушен светлинен денонощен ритъм.
3. За пръв път е показано, че приложен субхронично, плодовият сок от *Aronia melanocarpa* има антидепресивно-подобен ефект при:
  - млади/здрави плъхове;
  - плъхове с алкохол-индуцирано депресивно-подобно поведение;
  - плъхове с нарушен светлинен денонощен ритъм.
4. За пръв път е установено, че плодовият сок от *Aronia melanocarpa* частично антагонизира индуцираното от резерпин намаляване на двигателната активност при плъхове.
5. За пръв път е установено, че плодовият сок от *Aronia melanocarpa* намалява индуцирания от нарушен светлинен денонощен ритъм и от резерпин оксидативен стрес в мозък на плъхове.
6. Направените проучвания с плодов сок от *Aronia melanocarpa* допринасят за разширяване на познанията за ефектите на полифенолите върху функциите на централната нервна система и подпомагат търсенето на природни продукти за лечението на социалнозначими заболявания като тревожно-депресивните разстройства.

## VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Eftimov M., C. Dobрева, D. Velkova, S. Valcheva-Kuzmanova. (2014) Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on behavior of rats exposed to social isolation.- *Trakia Journal of Sciences*, 12 (Suppl. 1), 123-126.
2. Eftimov M., C. Dobрева, D. Velkova, S. Valcheva-Kuzmanova. (2014) Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on reserpine-induced hypokinesia and oxidative stress in rats.- *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, 1 (2), 29-34.
3. Valcheva-Kuzmanova S., M. Eftimov, R. Tashev, L. Yankova, I. Belcheva, S. Belcheva. (2014) Effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice on exploratory behavior and locomotor activity in rats.- *Acta alimentaria*, 43 (2), 315-23. (IF = 0.427)
4. Ефтимов М., А. Георгиева, Ст. Вълчева-Кузманова. (2014) Ефект на социалната изолация върху поведението и оксидативния стрес при плъхове.- *Здраве и наука*, 2, 19-22.
5. Eftimov M., S. Valcheva-Kuzmanova. (2013) Antidepressant-like effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice applied subchronically to rats.- *Scripta Scientifica Medica*, 45 (Suppl. 6), 7-11.
6. Eftimov M., S. Valcheva-Kuzmanova. (2013) Anxiolytic-like effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice applied subchronically to rats.- *Scripta Scientifica Medica*, 45 (Suppl. 5), 7-11.

## VIII. СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Eftimov M., S. Valcheva-Kuzmanova. Anxiolytic-like effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice applied subchronically to rats. – VII Национален Конгрес по Фармакология „Фармакологията – от експеримента към клиниката“, Плевен, 17–19 октомври, 2014, Abstract: Journal of Biomedical and Clinical Research, 2014, 7(1), Suppl. 1: 59.
2. Eftimov M., S. Valcheva-Kuzmanova. Antidepressant-like effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice applied subchronically to rats. – VII Национален Конгрес по Фармакология „Фармакологията – от експеримента към клиниката“, Плевен, 17–19 октомври, 2014, Abstract: Journal of Biomedical and Clinical Research, 2014, 7(1), Suppl. 1: 58.
3. Eftimov M., C. Dobрева, D. Velkova, S. Valcheva-Kuzmanova. Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on behavior of rats exposed to social isolation. – „I Trakia Medical Days“ International Scientific Conference, Stara Zagora, May 22–23, 2014.
4. Eftimov M., A. Georgieva, S. Valcheva-Kuzmanova. Effect of social isolation on behavior and oxidative stress in rats. Black Sea Symposium for Young Scientists in Biomedicine, Varna, March 27–30, 2014, Abstract: Варненски медицински форум, 2014, 3, Suppl. 1: 46.
5. Eftimov M., C. Dobрева, D. Velkova, S. Valcheva-Kuzmanova. Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on reserpine-induced hypokinesia and oxidative stress in rats. – Black Sea Symposium for Young Scientists in Biomedicine, Varna, March 27–30, 2014, Abstract: Варненски медицински форум, 2014, 3, Suppl. 1: 14.
6. Valcheva-Kuzmanova S., M. Eftimov, R. Tashev, L. Yankova, I. Belcheva, S. Belcheva. Effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice on exploratory behavior and locomotor activity in rats. – X National Congress of Bulgarian Society for Physiological Sciences, Varna, October 06–09, 2011, Abstract: Scripta Scientifica Medica, 2011, 43, Suppl. 3: 244.

7. Eftimov M., S. Valcheva-Kuzmanova, I. Belcheva, R. Tashev, S. Belcheva. Anxiolytic effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice administered subchronically orally to rats. – X National Congress of Bulgarian Society for Physiological Sciences, Varna, October 06–09, 2011, Abstract: Scripta Scientifica Medica, 2011, 43, Suppl. 3: 210.
8. Valcheva-Kuzmanova S, Eftimov M, Kuzmanov K. Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on alcohol-induced anxiety- and depressive-like behavior in rats. V National Pharmaceutical Congress with International Participation, Hotel „Hissar“, Hisarya – Bulgaria, April 01–03, 2011. Abstract: Pharmacia, 2011, Suppl., p. 100-101.
9. Eftimov M, Valcheva-Kuzmanova S. Polyphenols and the central nervous system – effects on anxiety and depression. V National Pharmaceutical Congress with International Participation, Hotel „Hissar“, Hisarya – Bulgaria, April 01–03, 2011. Abstract: Pharmacia, 2011, Suppl., p. 93.