

**Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ –  
Варна**

**Факултет по Фармация**

---

**Стела Тошкова Драгоманова**

**НЕВРОФАРМАКОЛОГИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА МИРТЕНАЛОВИ  
КОНЮГАТИ С АМИНОДАМАНТАН**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен  
**„ДОКТОР“**

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт

Професионално направление: 7.3. Фармация

Научна специалност: „Фармакология, вкл. фармакокинетика и химиотерапия“

**Научен ръководител:**

**Доц. Величка Андонова, д.ф.**

**Консултант:**

**Проф. Любка Танчева, д.м., ИНБ – БАН**

Варна, 2024

Дисертационният труд съдържа 220 стандартни машинописни страници. Онагледен е с 41 фигури, 7 таблици и 5 приложения. Библиографската справка включва 481 източника.

Експерименталната работа по дисертационния труд е извършена в лабораториите на Институт по невробиология – БАН. Част от изследванията са проведени в Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна, Факултет по Фармация и Keele University, Великобритания.

Дисертационният труд е обсъден на разширен катедрен съвет на Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“, Факултет по Фармация при Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“, проведен на 12.01.2024 г., и е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:

**Вътрешни членове:**

1. Доц. Светлана Фоткова Георгиева, д.ф. – Факултет по фармация, МУ-Варна,  
Председател на Научното жури

2. Проф. Албена Тодорова Златарева, д.м. – Факултет по фармация, МУ-Варна

Резервен вътрешен член: Доц. Анна Христова Тодорова, д.м. – Факултет по фармация, МУ-Варна

**Външни членове:**

3. Проф. Емил Иванов Христов, д.м. – Факултет по химия и фармация, Софийски университет „Св. Климент Охридски“

4. Проф. Людмил Пейчев Пейчев, д.м. – Факултет по фармация, МУ-Пловдив

5. Доц. Елисавета Георгиева Апостолова, д.м. – Факултет по фармация, МУ-Пловдив

Резервен външен член: Проф. Мария Ганева Ганева, д.м. – Медицински факултет, Тракийски университет

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои онлайн на 29.03.2024 г. от 11.00 часа във Факултет по Фармация на открито заседание на Научното жури.

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

## СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на често използваните съкращения .....	4
Въведение .....	5
Цел и задачи .....	8
Материали и методи .....	9
Резултати и обсъждане .....	20
Изводи .....	65
Приноси .....	66
Списък на научни публикации и съобщения, свързани с дисертационния труд.	67

## Списък на често използваните съкращения

### На кирилица

ДНК	– дезоксирибонуклеинова киселина
М	– миртенал
НЛР	– нежелана лекарствена реакция
НО	– начално обучение
Ск	– скополамин
ХЕБ	– хемато-енцефална бариера
ЯМР	– ядрено-магнитен резонанс

### На латиница

5-HT	– 5-хидрокси триптамин (серотонин)
6-OHDA	– 6-хидроксидопамин
ACh	– ацетилхолин
AChE	– ацетилхолинестераза
AD	– болест на Алцхаймер
ALP	– алкална фосфатаза
ALT	– аланин трансминаза
AST	– аспартат трансминаза
ATP	– аденозин трифосфат
A $\beta$	– амилоид $\beta$
BChE	– бутирилхолинестераза
CAT	– каталаза
CD	– циклодекстрини
DMSO	– диметилсулфоксид
GABA	– гама-аминомаслена киселина
GPx	– глутатион пероксидаза
GR	– глутатион редуктаза
LPO	– липидна пероксидация
MAC	– миртенал-адамантанов конюгат
MDA	– малонов диалдехид
MPTP	– 1-метил-4-фенил-1,2,3,6,-тетрахидропиридин
NA	– норадреналин
NMDA	– N-метил-D-аспартат
PD	– болест на Паркинсон
SOD	– супероксид дисмутаза
TBA	– тиобарбитурова киселина
tGSH	– тотален глутатион
TTX	– тетродотоксин

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Невродегенеративните заболявания са комплексни и се характеризират с многофакторна патоетиология (Ferreira et al., 2010). В днешно време изследванията са фокусирани върху откриването на нови терапевтични средства с повече от една мишена на фармакологично действие. Това се основава на разбирането, че иновативните, многоцелеви лиганди могат по-ефективно да противодействат на сложността на патологичните процеси при невродегенеративните заболявания, с цел преодоляване на предизвикателствата на полифармакологичния подход (Bolognesi, 2008). Търсенето на потенциални фармакологични агенти с комплексен механизъм на действие включва различни вещества, като повечето от тях са природни съединения (Ji et al., 2008; Li et al., 2015; Dey et al., 2017).

Етеричните масла са използвани в народната медицина като лек много години преди началото на тяхното изследване. Част от компонентите им имат биологична активност и се използват като лекарства – таксаните (с противотуморна активност), артемизин (с антималярийно действие) и други. Някои терпени притежават потенциални благоприятни ефекти при болестта на Алцхаймер (Yoo and Park, 2012). Миртенал е бицикличен монотерпеноид от природен произход. Лечебните растения, съдържащи монотерпена в етеричните си масла, притежават широка гама от биологични свойства. През 20-ти век са открити множество ефекти на миртенал върху опитни животни – бронходилататорен, противовъзпалителен, антиагрегантен и антихемолитичен (*in vitro*), антибактериален (срещу G (+) патогени), антихипергликемичен, аналгетичен.

Миртенал е сравнително слабо проучен в областта на невронауките. Потенциалът му да влияе благоприятно върху различни системи и органи, в т. ч. и на ЦНС функциите, е разгледан в обзорния материал на Dragomanova et al. (2018). Невромодулиращи и антиоксидантни свойства на монотерпена, като елемент от невропротективното му действие, са установени за първи път в два експериментални модела на невродегенерация при плъхове – 6-OHDA-индуциран паркинсонизъм (Tancheva et al., 2020) и химически индуцирана деменция (Dragomanova et al., 2022). Миртенал има превантивен ефект върху оксидативните увреждания в мозъка, предизвикани от токсичния агент скополамин при експериментален модел на деменция, потвърден с поведенчески тестове при опитни гризачи, биохимични и хистопатологични изследвания, които показват потенциала му да намали тежестта на симптомите на невродегенерация и загубата на неврони в мозъчната кора. За първи път в резултат на изследванията, проведени от Драгоманова (2020), е установен неговия комплексен механизъм на действие, демонстриран с невромодулиращи и антиоксидантни протективни ефекти върху невродегенеративните процеси при опитни гризачи.

Откриването на адамантан в петрола през 1933 г. от чешките химици Landa, Machacek and Mzourek поставя началото на нова област в химията, посветена на синтеза и свойствата на полиедрични органични съединения, които са намерили практическо приложение в създаването на лекарства, полимерни материали и термично стабилни лубриканти. Във фармацевтичната практика са утвърдени малък брой лекарствени вещества, съдържащи в молекулата си адамантанов радикал. Това са противовирусните

*Amantadine* и *Rimantadine*, *Memantine* при дементни състояния, хипогликемичните дипептидил пептидаза IV инхибитори (*Saxagliptine*, *Vildagliptine* и други), антихерпетичният *Tromantadine*, *Adapalene* за лечение на акне и наскоро одобрения за употреба *Arterolane*, прилаган при инфекции с *Plasmodium falciparum*.

Вниманието на научната общност е насочено към задълбочено проучване върху механизмите на действие на всички адамантанови производни, прилагани в медицинската практика. Продължава синтеза на нови съединения и оценяването на техните биологични свойства в предклинични и клинични изследвания в различни терапевтични области. Производните на адамантан са пример за полициклични съединения, които представляват базова структура за проектиране и разработване на потенциални лекарства при широк спектър от заболявания, прилагани не само като монотерапия, но и като допълнение за подобряване на стабилността и липофилността на утвърдените медикаменти.

Към днешна дата са синтезирани многобройни съединения на основата на адамантан със значителни биологични активности. Обзорът на Lamougeux G. and Artavia G. (2010) обхваща широк спектър от вещества, съдържащи адамантанова структура, с изяви биологични ефекти – противовирусен, антибактериален, антимикотичен и трипаноциден, противовъзпалителен, аналгетичен, противоязвен, антидепресивен, анксиолитичен, антиконвулсивен, антипаркинсоничен, невroleптичен, имуностимулиращ, противотуморен, хипогликемичен, дилатиращ мозъчните съдове, антихипертензивен, антиоксидантен и други. Някои от тях притежават потенциал за позитивно повлияване при множествена склероза, периферна невропатия, зависимости, шизофрения, неврологични и невродегенеративни заболявания, астма и други. Адамантановото ядро е използвано за постигане на конкретна пространствена организация на функционалните групи, съставляващи фармакофора на основната химическа структура, като целта е да се подсилят характеристиките, които са от съществено значение за молекулярно разпознаване при взаимодействието на лиганда с таргета при физиологични условия.

Известно е, че химическата модификация на природни вещества чрез конюгиране с различни синтетични компоненти е съвременен и надежден метод за получаване на нови биологично активни съединения. Установено е, че в много от случаите лечебните свойства на получените деривати са по-силно изразени от тези на изходните вещества и дори могат да надхвърлят ефектите на използваните стандарти в различни терапевтични области. Широкото разпространение на монотерпените като природни продукти са обект на засилено внимание в търсенето на потенциални лечебни свойства за нуждите на различни отрасли на медицината и фармацията. Ето защо включването на достъпните съединения от тази група като градивни елементи в дизайна и синтеза на нови и ефективни терапевтични агенти при различни заболявания е обещаващо и прогресивно направление в експерименталната фармакология. Към настоящия момент информацията в световната научна литература за установени техни позитивни ефекти върху модели на ЦНС-увреждания, е оскъдна. Не са открити и проучвания, свързани с изучаване на невропротективния потенциал на миртеналови конюгати при експериментален модел на деменция.

Двете съединения на миртенал с аминоксамантан, обект на изследване в настоящия дисертационен труд, са проектирани и синтезирани за да се избегнат някои недостатъци на природния монотерпен с оглед повишаване на биологичната му ефикасност. Поради доказан комплексен невропротективен ефект на веществото, от неговите аминоксамантанови производни се очакват не само аналогични, но и по-добри свойства, които предстои да бъдат проучени *in vivo* в експериментални модели с опитни животни. Провеждането на различни неврофармакологични изследвания, важни за изучаване ефектите на двете съединения при интактни и дементни опитни животни, може да бъде принос за разкриването на специфични механизми на действие при невродегенеративни увреждания.

## II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на дисертационния труд е изследване *in vivo* на потенциалните неврофармакологични ефекти на синтетични миртеналови конюгати с аминоксадамтан и разкриването на основните им невропротективни механизми върху експериментален модел на деменция от Алцхаймеров тип при плъхове.

От така формулираната цел произтичат следните задачи:

1. Проучване на физико-химичните параметри на миртеналовите конюгати с аминоксадамтан; *in silico* анализ за прогнозиране на невробиологичните им ефекти и на теоретичните възможности за свързването им с биологични таргети.

2. Проучване неврофармакологичните ефекти на миртеналовите производни при здрави експериментални плъхове.

2.1. Изследване влиянието на веществата върху паметта, обучението и проучвателната активност след многократното им приложение.

2.2. Биохимични механизми на повлияване в мозъчни структури, свързани с паметта

2.2.1. Антиоксидантна активност – определяне на LPO, GSH, CAT, SOD, GPx.

2.2.2. Промени в активността на ацетилхолинестеразата.

2.2.3. Невромодулаторни свойства на съединенията (съдържание на NA, 5-HT).

3. Проучване потенциалните превантивни ефекти на миртеналовите производни върху плъхове с експериментална деменция от Алцхаймеров тип.

3.1. Изследване възстановяващите паметта способности на веществата върху дементни плъхове с индуцирани от скополамин мозъчни увреждания .

3.2. Биохимични механизми на невропротективното действие на миртеналовите производни при дементни плъхове със скополамин индуцирани паметови нарушения.

3.2.1. Антиоксидантна активност – определяне на LPO, GSH, CAT, SOD, GPx.

3.2.2. Антихолинестеразна активност на веществата.

3.2.3. Невромодулаторни свойства на съединенията (съдържание на NA, 5-HT).

4. Сравняване силата на невропротективните ефекти на синтетичните аминоксадамтанови конюгати с природния миртенал при здрави и при дементни експериментални гризачи.



### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

#### 1. Експериментални животни

Опитите са проведени върху мъжки полово зрели плъхове порода Wistar (180 ÷ 220 g). Животните са отглеждани при стандартни лабораторни условия в пластмасови клетки – 12-часов цикъл светло/тъмно, неограничен достъп до питейна вода и храна за гризачи, осигурени оптимална температура, влажност и вентилация на помещенията. Експерименталните процедури са извършени в съответствие с правилата за работа с експериментални животни (Наредба № 20 от 01.11.2012 г. за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им, в сила от 01.01.2013 г., издадена от Министерство на Земеделието и храните, Обн. ДВ бр. 87 от 09.11.2012 г.) и в съответствие с правилата на Комисията по етика на Института по невробиология към Българска академия на науките и на КЕНИ към Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна.

За целите на проучването са използвани 90 плъха. Гризачите са разпределени на случаен принцип в групи по 10 броя във всяка. Изследванията са проведени в два етапа. Първият включва проучване ефектите на миртеналовите конюгати при интактни гризачи (40 бр.), а вторият – при животни с индуцирана от скополамин деменция от Алцхаймеров тип (50 бр.). Здравите гризачи са разпределени в следните групи: контроли (физиологичен разтвор), миртенал (М) (40 mg/kg), МАС-197 (1 mg/kg), МАС-198 (1 mg/kg). Във втория етап от експеримента животните са разделени по следния начин: контроли (физиологичен разтвор), скополамин (Ск) (1 mg/kg), Ск + М, Ск + МАС-197, Ск + МАС-198.

Разтворите на съответните вещества са прилагани интраперитонеално, ежедневно за период от 11 дни, в отделни инокулации. Приготвяни са според правилата за добра лабораторна практика за изготвяне на екстемпорални лекарствени форми, описани по-долу (т. 2.). Експерименталният протокол за предизвикване на химически-индуциран модел на деменция от Алцхаймеров тип включва ежедневно интраперитонеално третиране на лабораторните плъхове със скополамин по едно и също време на денонощието, за период от 11 дни, в доза 1,0 mg/kg телесна маса (т.м.). Стандартно при мъжките плъхове от порода Wistar разтворът на скополамин се въвежда в обем 0,5 ml/100 g.

Експериментът започва с начално обучение в поведенческите тестове, използвани за проследяване състоянието на животните, описани по-долу (т. 4.). На 24-я час след последното третиране се провеждат съответните поведенчески тестове – за памет и обучение, и за пространствена ориентация. Гризачите се евтаназират при спазване на изискванията за етично отношение към експерименталните животни. Мозъкът на всеки плъх се отпрепарира възможно най-бързо, като се сепарират двете мозъчни структури, свързани с паметовите процеси – хипокамп и префронталната кора. След обработване по описаните по-долу методики (т. 3.5. Биохимични изследвания) пробите се подготвят за определяне на нивата на продуктите на липидна пероксидация; съдържанието на

тотален глутатион; активността на ензимите каталаза, супероксид дисмутаза и глутатионпероксидаза; активността на мозъчната ацетилхолинестераза и за съдържание на невротрансмитерите норадреналин и серотонин.

## **2. Фармакологични средства – субстанции, разтвори и емулсии**

### **2.1. Субстанции**

**За целите на изследването са използвани:**

- Scopolamine, ACRÔS Organics, Lot: A0354964
- (-)-Myrtenal 98%, ACRÔS Organics, Lot: A0363097

Миртенал (М), е мастноразтворимо, термолабилно и летливо съединение в течно агрегатно състояние, с приятен аромат. Съхранява се в добре затворени опаковки в хладилник, при температура  $2\pm 8^{\circ}\text{C}$ .

- Миртенал-аминоадамнтанови конюгати MAC-197 и MAC-198

Двете съединения MAC-197 и MAC-198, обект на изследването в дисертационния труд, са синтезирани в Отдела по медицинска химия на Новосибирския институт по органична химия към Руската академия на науките, чрез реакция на (-)-миртенал с 2-аминоадамнтан (с код № 197) или 1-аминоадамнтан (с код № 198), последвано от редукция на  $\text{NaBH}_4$  на съответните амини. Получените деривати са трансформирани в съответните хидрохлориди чрез барботиране на газообразна  $\text{HCl}$  през етерен разтвор на амините и филтруване на образуваната утайка.

Спектралните анализи на конюгатите са извършени в Keele University, Великобритания. Резултатите са публикувани от Dragomanova et al. (2022).

### **2.2. Разтвор на скополамин**

Разтворът на скополамин с концентрация 20% се приготвя във вода за инжекции. Непосредствено преди третирането на експерименталните плъхове, се филтрува през мембранен филтър с размер на порите  $0,22\ \mu\text{m}$ , след което се въвежда в обем  $0,5\ \text{ml}/100\ \text{g}$  т.м.

### **2.3. Миртеналова емулсия от типа масло/вода**

Необходимата за целите на изследването миртеналова емулсия се приготвя като в епруветка, снабдена със запушалка, се поставя  $1\ \text{ml}$  миртенал ( $1,0268\ \text{g}$ ), към който се добавят  $0,05\ \text{g}$   $\alpha$ -лецитин, след което се извършва хомогенизиране в ултразвукова вана. Получената хомогенна смес се разрежда с физиологичен разтвор ( $\text{NaCl}\ 0,9\%$ ) до обем  $5\ \text{ml}$ , така че да се получи 20%-емулсия на миртенал, която се хомогенизира отново до

получаване на бяла млекоподобна дисперсия. Два милилитра от нея се разреждат до 50 ml с физиологичен разтвор, при което се получава емулсия с концентрация 0,8% миртенал, съобразена с използваната ефективна доза на съединението при плъхове (40 mg/kg т.м.).

Съгласно експерименталния протокол емулсията се приготвя *ex tempore* и незабавно се инжектира на опитните гризачи интраперитонеално, в обем 0,5 ml/100 g т.м.

## 2.4. Разтвори на MAC-197 и MAC-198

Миртеналовите конюгати с аминоксадантан MAC-197 и MAC-198 по своята химична структура представляват вторични амини. В настоящото проучване се прилагат под формата на хидрохлоридни соли, които се характеризират с химична стабилност в кисела среда и се различават по физикохимични отнасяния от миртенал. Използват се под формата на разтвори в NaCl 0.9%, в които като съ-разтворител участва и диметилсулфоксид (DMSO). Ефективната доза на съединенията е 1 mg/kg т.м. (Avgustinovich et al., 2014). За получаването на необходимите разтвори, 3 mg от всяко вещество се разтварят в 15 ml физиологичен разтвор (NaCl 0.9%), а количеството на DMSO, изчислено за получаването на 1-, 3- и 5-процентни разтвори, е съответно 150, 450 и 750 mg. Така получените разтвори се филтрат през мембранен филтър с размер на порите 0,22 µm. В настоящия труд съдържанието на DMSO в трите разтвора (1%, 3% и 5%) е съобразено с литературните данни за подходяща концентрация на съ-разтворителя за интраперитонеално приложение (2.16% разтвор на DMSO е изоосмотичен с кръвния серум) (Rowe, Sheskey and Owen, 2006).

## 3. Методи

### 3.1. Софтуерни и докинг изследвания

#### 3.1.1. Физикохимични параметри на миртеналовите конюгати с аминоксадантан

Пакетът QikProp 6.2 (2009) (Schrödinger: New York, NY, USA) е използван за изчисляване на молекулярните дескриптори, като надеждността му е верифицирана за изчислените дескриптори (Ioakimidis et al., 2008). Индексите на известни лекарства (KDI) са изчислени от стойностите молекулярните дескриптори, както е описано от Eurtivong and Reynisson (2018). Стойностите на всяко свойство са представени в отделна колона, като за целите на обработката в Excel и за изчисление на KDI за всеки дескриптор са използвани следните уравнения:  $KDI_{MW} = \text{EXP}(-((MW-371.76)^2)/(2*(112.76^2)))$ ,  $KDI_{LogP} = \text{EXP}(-((LogP-2.82)^2)/(2*(2.21^2)))$ ,  $KDI_{HD} = \text{EXP}(-((HD-1.88)^2)/(2*(1.7^2)))$ ,  $KDI_{HA} = \text{EXP}(-((HA-5.72)^2)/(2*(2.86^2)))$ ,  $KDI_{RB} = \text{EXP}(-((RB-4.44)^2)/(2*(3.55^2)))$ ,  $KDI_{PSA} = \text{EXP}(-((PSA-79.4)^2)/(2*(54.16^2)))$ . Уравненията са копирани в Excel, а

името на дескриптора (например MW) е заменено със стойността в съответната колона. За извличане на KDI2A е използвано уравнението:  $= (KDI\ MW + KDI\ LogP + KDI\ HD + KDI\ HA + KDI\ RB + KDI\ PSA)$ , а за KDI2B -  $= (KDI\ MW \times KDI\ LogP \times KDI\ HD \times KDI\ HA \times KDI\ RB \times KDI\ PSA)$ .

Изследванията са извършени в Keele University, Великобритания.

### **3.1.2. *In silico* анализ за прогнозиране на биологичния ефект и теоретична оценка на възможностите за свързване на миртеналовите конюгати с различни биологични таргети**

*In silico* фармакологията (изчислителна фармакология) използва софтуерни продукти за анализ и интегриране на биологични и медицински данни от много различни източници, с цел изготвяне на прогнози с помощта на изчислителни подходи. Те имат важна роля в стесняването на набора от потенциални таргети и предлагането на вторични такива за известни молекули.

За целите на настоящия труд е използван уеб-базираният софтуер SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>), разработен от *Swiss Institute of Bioinformatics*. Модулът SwissTargetPrediction е валидиран и способства за проследяване възможностите за свързване на изследваните конюгати с различни биологични таргети (ензими и рецептори) (Diana et al., 2019). Основава се на наблюдението, че подобни биоактивни молекули по-вероятно споделят и сходни биологични мишени. Определят се най-вероятните макромолекулни таргети за малки молекули с потенциална биологична активност. Прогнозата представлява комбинация от изследване на сходство между 3D и 2D структурите и сравнението им с библиотечни данни на 376 342 известни активни вещества върху 3068 протеина, с 580 496 възможни места за свързване.

Получените стойности за вероятност (в %) се изчисляват на база комбинираните резултати за съединенията, които притежават най-голямо сходство в 3D и 2D структурите с тези на изследваната молекула (над 0.85 за 3D или над 0.65 за 2D), и за които е известно, че имат афинитет към даден таргет. Важно е да се отбележи, че този коефициент илюстрира вероятността една молекула да се свърже с определена мишена, но не и потенциала ѝ за биологичен ефект. Получените в табличен вид стойността за „3D/2D“ показват колко от известните активни вещества за всяка изброена цел са подобни на изследваната молекула въз основа на структурно сходство. Такива прогнози могат да се правят за различни организми. За целите на настоящото изследване са проведени теоретични анализи при хора и плъхове.

Прогнозите, базирани на хомология, са изготвени както следва: заявената молекула се сравнява с всички молекули, свързващи се с мишени, които проявяват хомология с протеин в избрания организъм. След това се изработват прогнози, като се приема, че лигандите на тези протеини са действителни лиганди на техните хомолози в избрания организъм. Ако се наблюдава само свързване на лиганда, който е най-близък до търсената молекула, към хомоложен протеин, прогнозите са изброени като „по хомология“ на страницата с резултати на SwissTargetPrediction.

Прогнозите по отношение теоретичните таргети на двата миртеналови конюгата от настоящото изследване са извършени в Катедра „Фармацевтична химия“ при Факултет по фармация на Медицински университет – Варна.

### 3.1.3. Афинитет на миртеналовите конюгати към ензима ацетилхолинестераза

Програмата Scigress версия FJ 2.6 (Scigress Ultra V. FJ 2.6. 2016, Краков, Полша) е използвана за изграждане на инхибиторите, а ММЗ силово поле (Allinger et al., 1989; Lii and Allinger, 1989a; Lii and Allinger, 1989b) е приложено за идентифициране на глобалния минимум с помощта на метода CONFLEX, последвано от структурна оптимизация (Gotō and Osawa, 1993). Докинг центърът за кристалната структура на АСhЕ (PDB ID: 5HF9, резолюция 2.20 Å, Homo sapiens) се определя от позицията на азота в пиридиновия пръстен, заместен с оксима на ко-кристализирания лиганд 4-(aminocarbonyl)-1-[(2-[(E)-(hydroxyimino)methyl]pyridinium-1-yl)methoxy)methyl]pyridinium (H16) ( $x = 12.350$ ,  $y = -55.749$ ,  $z = -24.154$ ) (Franklin et al., 2016). Петдесет докинг цикъла са разрешени за всеки лиганд, като се използва гъвкава ефективност на търсене (200%) в радиус от 10 Å. Основните аминокиселини лизин и аргинин се определят като протонирани, като се предполага, че аспарагиновата и глутаминовата киселина са депротонирани. Чрез софтуерния пакет GOLD v5.4.1 (Cambridge, UK) точкуващите функции GoldScore (GS) (Jones et al., 1997), ChemScore (CS) (Eldridge et al., 1997; Verdonk et al., 2003), PiecewiseLinear Potential (ChemPLP) (Korb et al., 2009) и Astex Statistical Potential (ASP) (Mooij and Verdonk, 2005) са приложени за предсказване на вида на връзките и относителните енергии на лигандите. Същият софтуер е използван за изготвяне на кристалната структура за докинг, т.е. с добавяне на водородни атоми, докато ко-кристализираните лиганди и кристалографските водни молекули са отстранени. За да се установи силата на прогнозиране на програмата за докинг GOLD, ко-кристализираният H16 лиганд е повторно закачен в местата на свързване. Средно-квадратичните отклонения (RMSD) са получени при наслагване на текокристализирани и докингирани конформации и измерване на разстоянието на техните тежки атоми; колкото по-ниска е стойността, толкова по-добра е прогнозата, като  $RMSD < 1.0$  Å се счита за добър показател. С най-добрата стойност е функцията ChemPLP = 1.896 Å, следвана от ASP (8.423 Å), CS (6.937 Å) и GS (3.705 Å).

Анализите са извършени в Keele University, Великобритания.

## 3.2. Изследване на физичната стабилност на миртеналовата емулсия и разтворите на MAC-197 и MAC-198

От получените по методиките, описани в т. 2.3. и 2.4., емулсия на миртенал с  $\alpha$ -лецитин (M+L 1%) и 6-те разтвора на синтетичните конюгати с участието на съ-разтворител – MAC-197 + DMSO 1%; MAC-197 + DMSO 3%; MAC-197 + DMSO 5%; MAC-198 + DMSO 1%; MAC-198 + DMSO 3%; MAC-198 + DMSO 5%, се приготвят общо 7 дисперсии, които подлежат на изследване за физична стабилност.

### **3.2.1. Аналитично центрофугиране (Seifert et al., 1991)**

Миртеналовата емулсия и ратворите на двата конюгата (в обем 1,5 ml от всяка проба) се центрофугират при стайна температура – 5 цикъла x 3000 об./мин за 1 минута и 3 цикъла x 15 000 об./мин за 1 минута. В края на всеки цикъл се прави визуална оценка за наличие на разделяне на фазите, след което пробите се охлаждат за едно денонощие, при температура  $2\pm 8^{\circ}\text{C}$ . На 24-я час отново се проследява за наличие на забележими промени и описаният протокол за центрофугиране се повтаря. Следва рехомогенизиране на препаратите в ултразвукова вана за 30 минути, загряване до  $40^{\circ}\text{C}$  на водна баня и повтаряне на аналитичното центрофугиране, съгласно протокола. На всеки етап от работата се следи и се документира наличието на промени в препаратите.

### **3.2.2. Изследване в климатична камера**

По 5 милилитра от така приготвените 7 дисперсии се поставят в климатична камера (Climatic chamber ARGO LAB, CH 150) при температура  $25^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) и влажност 60% ( $\pm 5\%$ ).

На 72-ия час пробите се проследяват за наличие на забележими промени. Продължителността на тестовия протокол е 21 дни, като наблюденията се провеждат на всеки 7 дена.

Изследванията за стабилност са проведени в Научна лаборатория „Технология на лекарствените форми“ към Катедра „Фармацевтични технологии“ при Факултет по фармация на Медицински университет – Варна.

## **3.3. Поведенчески тестове**

### **3.3.1. Тест за памет и обучение/пасивно избягване (*Step through/Passive Avoidance test*) (Jarvik and Kopp, 1967)**

Разработеният от Venault et al. през 1986 година тест, е използван за определяне състоянието на дългосрочната памет. Експерименталната постановка се състои от две части – светла и тъмна, разделени с преграда, която първоначално трябва да е отворена и да се затвори когато животното навлезе в тъмната част. Целта е плъховете да се научат да остават в ярко осветеното отделение на устройството, въпреки инстинктивно предпочитаната от тях тъмна камера, за да избегнат слабия електрически ток, протичащ по пода ѝ (0.1 A за 3 сек), който усещат с лапичките си. Изчислява се латентното време или периодът, след който животното влиза в тъмната камера. Като критерий за обученост се използва латентно време от 180 секунди.

Тестът се провежда в два етапа – първоначално обучение преди началото на третирането с изпитваните съединения и финално изследване 24 часа след края на прилагането им.

### **3.3.2. Тест за изследователско поведение (*Hole board test*) (Boissier and Simon, 1964)**

Експерименталният протокол се базира на вроденото изследователско поведение на гризачите, поставени в нова среда. Характерен феномен е стереотипното поведение на „потаяне“ на главата до ушите в дупките, разположени по пода на постановката. Честотата на тази активност е индикатор за проучвателно поведение. Липсата на активност се счита за проявява на анксиогенеза (състояние на тревожност), свързана с недостатъчното познаване на обстановката, а нарастващият брой активности се обяснява с понижено нивото на тревожност и проява на нормална проучвателна активност, поради регистриране на позната обстановка. Постановката представлява открита платформа (60 x 60 см), оградена с прозрачни стени. Върху експерименталното поле са изработени 16 отвора с диаметър 3 см, разположени на разстояние 10 см (от център до център). Проследява се наличието на промяна в поведението на животните, предизвикано от приложението на изследваните вещества.

Тестът се провежда 24 часа след последното третиране, като всяко животно, при спазване на тишина, се поставя върху равномерно осветеното поле, за период от 3 минути.

## **3.4. Биохимични изследвания**

След провеждане на тестовете, разпределените в описаните групи плъховете са евтаназирани с въглероден диоксид. Измерени са основни биохимични показатели в мозъка – нива на MDA и tGSH; активност на CAT, SOD, GPx; активност на мозъчна AChE; нива на медиаторите NA и 5-НТ.

### **3.4.1. Оксидативен статус в мозъчна кора**

Изследванията са извършени в лаборатория „Свободно – радикални процеси“ при ИНБ – БАН.

#### **3.4.1.1. Получаване на хомогенат от мозък**

Извършва се декапитация, след което мозъкът на всяко от експерименталните животни се изважда внимателно. Следва промиване с охладен 0.15 М KCl и сепариране на мозъчната кора. Всеки от така получените препарати се хомогенизира отделно в охладен 0.15 М KCl – 10 mM калиево-фосфатен буфер (pH 7,4) и при температура 4°C се центрофугира в продължение на 10 минути, при 3000 об/мин. В част от този постядрен мозъчен хомогенат се извършва количественото определяне на концентрацията на tGSH и MDA. Друга част от хомогената се използва за определяне активността на антиоксидантните ензими (CAT, SOD, GPx). За целта се приготвя супернатант чрез центрофугиране при 12 000 об/мин и температура 4°C, в продължение на 20 мин.

### 3.4.1.2. Определяне на белтък (Lowry, 1951)

Методът се основава на известната способност в алкална среда медните йони да образуват комплекси с ароматните аминокиселини, като тирозин и триптофан, с които взаимодействат с висок афинитет. Към пробите от мозъчния хомогенат се прибавя реактива на Фолин, като целта е да се образува комплекс със синьо оцветяване с пик на поглъщане при  $\lambda = 700 \text{ nm}$ , чийто интензитет е пропорционален на количеството белтък в пробата. За изчисляване на концентрацията на белтъка (в  $\text{mg/mL}$ ) се построява калибровъчна крива, получена с говежди серумен албумин (Pentex USA).

### 3.4.1.3. Нива на продуктите на липидна пероксидация (Hunter et al., 1963)

Методът се основава на анализ на реактивните вещества с тиобарбитурова киселина (TBARs), които се получават като страничен продукт от липидната пероксидация, с използване на ТВА като реагент. Определят се малонов диалдехид (MDA), присъстващ в пробата, който е един от няколко крайни продукта с ниско молекулно тегло, резултат от разлагането на някои първични и вторични продукти на липидна пероксидация, както и генериран от липидни хидропероксиди при хидролитичните условия на реакцията. В кисела среда, при висока температура се образува цветен комплекс с максимум на поглъщане  $\lambda = 532 \text{ nm}$ .

За получаването на разтвор с концентрация на белтъка  $1 \text{ mg/mL}$  отделеният постядрен мозъчен хомогенат се разрежда и пробите се инкубират за 1 час при температура  $37^\circ\text{C}$ . Към тях се прибавя смес от киселини (2,8% TCA + 5N HCl + 2% ТВА) в съотношение 2:1:2, след което се нагряват на водна баня за 15 минути при температурата на кипене. Следва охлаждане на пробите, центрофугиране в продължение на 5 минути при 3000 об/мин и измерване при  $\lambda = 532 \text{ nm}$ . За изчисляване съдържанието на продуктите на липидна пероксидация, получени в резултат на реакцията с ТВА, се построява калибрационна крива, като за стандарт се използва MDA. Резултатите се представят като  $\text{nmol}$  малонов диалдехид (MDA) на  $\text{mg}$  протеин, с използването на моларен абсорбционен коефициент  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.4.1.4. Съдържание на тотален глутатион (tGSH) (Tietze, 1969)

Методът се базира на превръщането на окисления глутатион в редуциран при взаимодействие с NADPH, като реакцията се катализира от GR:

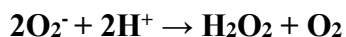


При взаимодействието на редуцирания глутатион с дитио-нитро бензоат (DTNB) се получава съединение, оцветено в жълто, с пик на поглъщане при  $\lambda = 412 \text{ nm}$ . За определяне концентрацията на глутатион в пробата (в  $\text{ng/mg}$  белтък) като референтен стандарт се използва окислен глутатион.



### 3.4.1.5. Активност на супероксиддисмутаза (Beauchamp and Fridovich, 1971)

Определянето на активността на Cu, Zn-супероксид дисмутазата (SOD) се основава на способността на ензима да катализира реакцията на дисмутация на супероксидните анион радикали до водороден пероксид:

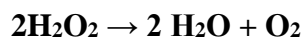


Редукцията на нитроблу-тетразолиум (NBT) от супероксидните анион радикали, генерирани фотохимично от рибофлавин, води до образуването на неразтворим формазан, който оцветява в синьо реакционната среда. Инхибирането на редукцията на NBT в присъствието на ензимния препарат се измерва спектрофотометрично при  $\lambda = 560 \text{ nm}$ . Изразява се в U/mg протеин, като за единица активност на SOD се приема количеството на ензима, което осигурява 50% инхибиране на редукцията на нитроблу-тетразолиум.

Приготвя се смес от необходимите реактиви (0,05 M калиево-фосфатен буфер (pH 7,8), 0,1 M метионин, 0,000044 M рибофлавин, 0,001M NBT и 0,03 M KCN), която се поставя в два набора кювети. В едната група се прибавя SOD в нарастващи количества. Намирацията се в тези кювети разтвор се осветява при  $\lambda = 560 \text{ nm}$  за 6 мин, а разтворът в другия набор кювети, използвани като контролна проба, която не съдържа ензимен препарат, се оставя на тъмно за същото време от 6 минути. Понижаването на редукцията на NBT спрямо тази на контролата се измерва при  $\lambda = 560 \text{ nm}$ .

### 3.4.1.6. Активност на каталаза (Aebi, 1970)

Известно е, че каталазата притежава свойството да катализира разграждането на водородния пероксид до вода и молекулен кислород:



За измерване активността на каталазата от мозъчната супернатанта се приготвя разтвор на  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) в 50 mM калиево-фосфатен буфер (pH 7,0), към който се прибавя ензима. Срещу празна проба при  $\lambda = 240 \text{ nm}$  се отчита намаляването на абсорбцията, което е пропорционално на разграждането на  $\text{H}_2\text{O}_2$  и е показател за каталазната активност, изразяваща се като  $\Delta A_{240}/\text{min}/\text{mg}$  белтък.

### 3.4.1.7. Активност на глутатионпероксидаза (Günzler et al., 1972)

Глутатионпероксидазата катализира редукцията на органични пероксиди, което се извършва с участието на редуциран глутатион в качеството на ко-субстрат:



Окисленият глутатион се редуцира в присъствие на GR и NADPH по реакцията:



Окислението на NADPH, който има пик на поглъщане при  $\lambda = 340 \text{ nm}$ , е показател за активността на глутатионпероксидазата (GPx), която се оценява по намаляването на абсорбцията при същата дължина на вълната.

Пробите от мозъчната супернатанта се инкубират в реакционна среда, която съдържа 0,05 M калиево-фосфатен буфер (pH 7,0); 1 mM ЕДТА; 1 mM NaN<sub>3</sub>; 0,2 mM NADPH; 1 mM GSH и 1 U/mL GR, в продължение на 5 минути, при стайна температура, като реакцията започва след добавяне на 0,0015 M t-бутилперекис. Намаляването на абсорбцията се отчита при  $\lambda = 340 \text{ nm}$ . Активността на глутатионпероксидазата се изразява като pmol NADPH, окислен за минута, на mg протеин, с моларен коефициент на екстинкция от  $6,22 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### **3.4.2. Активност на ацетилхолинестераза в мозък (кора и хипокамп) (Ellman, 1961)**

Изследванията са извършени в Научно-изследователска лаборатория на Институт по невробиология при БАН, Направление „Биологични ефекти на природни и синтетични вещества“.

Активността на AChE в кората и хипокамп се определя съгласно протокола на Ellman et al. (1961). Мозъчните супернатанти се добавят към разтвор, съдържащ 1,0 mM ацетил тиохолин (AcSCh), 0,1 mM 5,5'-дитио-бис (2-нитробензоена киселина) (DTNB) и 100 mM фосфатен буфер (pH 8,0), след което пробите се инкубират за 5 минути при 37°C. Интензитетът на жълтото оцветяване, което се получава при реакцията на тиохолин с DTNB се измерва спектрофотометрично при дължина на вълната  $\lambda = 412 \text{ nm}$ . Резултатите се представят като AChE в  $\mu\text{mol min/g}$  протеин.

### **3.4.3. Съдържание на моноамини в мозък (кора и хипокамп)**

Концентрацията на моноамините норадреналин (NA) и серотонин (5-НТ) в мозъчната кора и хипокамп се измерва чрез флуоресцентна реакция по метода на Jacobowitz and Richardson (1978). Норадреналинът се екстрахира във фосфатен буфер, а 5-НТ – в 0,1 N HCl. За необходимата флуоресценция на NA, реакцията изисква етилендиамин тетраоцетна киселина (EDTA), йодиден разтвор, алкален сулфит и 5N CH<sub>3</sub>COOH, докато за тази на 5-НТ трябва да се добави о-фталалдехид. Концентрацията на моноамините (в  $\mu\text{g/g}$  свежа тъкан) се определя при  $\lambda = 385/485 \text{ nm}$  за NA и  $\lambda = 360/470 \text{ nm}$  за серотонин, изчислени на базата на флуоресценция на стандартен разтвор.

## **3.5. Статистически анализ на резултатите**

На статистическа обработка са подложени два масива от данни, всеки от които се състои от отделни групи и подгрупи поведенчески и биохимични показатели, получени в хода на експерименталното изследване върху плъхове.

Резултатите са изразени като средни стойности ( $\pm$ ) стандартната грешка на средната стойност (SEM). Статистическият анализ на данните е извършен чрез еднопосочен анализ на дисперсията (ANOVA), с използване на софтуера GraphPadPrism 7.0 (San Diego, CA 92108, USA).

При сравняването на ефектите на изследваното вещество при здрави и при дементни животни е използван следния подход: големината на ефекта му при контролни условия се изчислява като разлика от средната стойност на изследваните параметри при здравите животни и единичните стойности за третираните с миртенал гризачи; аналогично за гризачите с индуцирано увреждане се получава извадка от разликата на средната стойност при скополаминовите контроли и единичните стойности при дементните животни, третирани с миртенал. Двете извадки са сравнени статистически чрез *t*-Test за независими извадки с различна дисперсия и двустранно разпределение.

Оценката на невропротективните свойства на миртеналовите производни върху скополамин-индуциран модел на деменция при плъхове е извършен чрез проучвателен анализ на главните компоненти (Principal Component Analysis – PCA) върху стандартизирани (*z*-трансформирани) стойности на измерените поведенчески и неврохимични параметри. Използвани са животни от следните групи: контролна, скополаминова (Ск), Ск+М, Ск+МАС-197 и Ск+МАС-198. Липсващите стойности са заменени с групова средна стойност преди стандартизацията. Всички изчисления и графики, необходими за целите на проучването PCA, са извършени с програмата IBM SPSS 19.0. В допълнение, за да се потвърди клъстерирането, наблюдавано при PCA групирането, е приложен йерархичен клъстерен анализ (метод на центроидно клъстериране, квадрат на евклидово разстояние).

При всички проведени статистически анализи се приема допустимо ниво на доверителна вероятност  $P < 0,05$ , разделено на три възходящи класа:  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  (висока сигнификантност) и  $P < 0,001$  (много висока сигнификантност).

## IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. Физикохимични характеристики на миртеналовите конюгати. Изследване на предполагаемата способност на двете производни на миртенал за преминаване през кръвно-мозъчната бариера и способността им да влияят върху ЦНС на база физикохимичните им отнасяния

Изчислените молекулярни дескриптори – MW (молекулно тегло, g/mol),  $\log P$  (коефициент на разпределение вода-октанол), HD (донори на водородни връзки), HA (акцептори на водородни връзки), PSA (полярна повърхност, Å<sup>2</sup>) и RB (въртящи се връзки) на лигандите, са дадени в Таблица 1.

Таблица 1. Молекулярни дескриптори на известни лекарства 2a и 2b (KDI2a/2b) със съответните им индекси за миртенал и неговите производни

	RB	MW (g/mol)	HD	HA	Log P	PSA (Å <sup>2</sup> )	KDI <sub>2a</sub>	KDI <sub>2b</sub>
MAC-197	3	285.5	1	1.5	4.5	9.6	4.05	0.07
MAC-198	3	285.5	1	1	4.9	10.7	3.89	0.04
Myrtenal	1	150.2	0	2	1.8	36.6	3.38	0.01

Всички стойности за молекулярните дескриптори се намират в химическо пространство на молекули-кандидати за фармакологични агенти (*lead-like chemical space*), с изключение на  $\log P$ . Двата конюгата MAC-197 и MAC-198 имат относително високи стойности на  $\log P$ , в горната граница на обхвата за лекарствени молекули (*drug-like chemical space*) поради тяхната адамантинова част. Обхватът на тези показатели, както и на известно пространство на лекарствата (KD) е публикуван от Zhu et al. (2012).

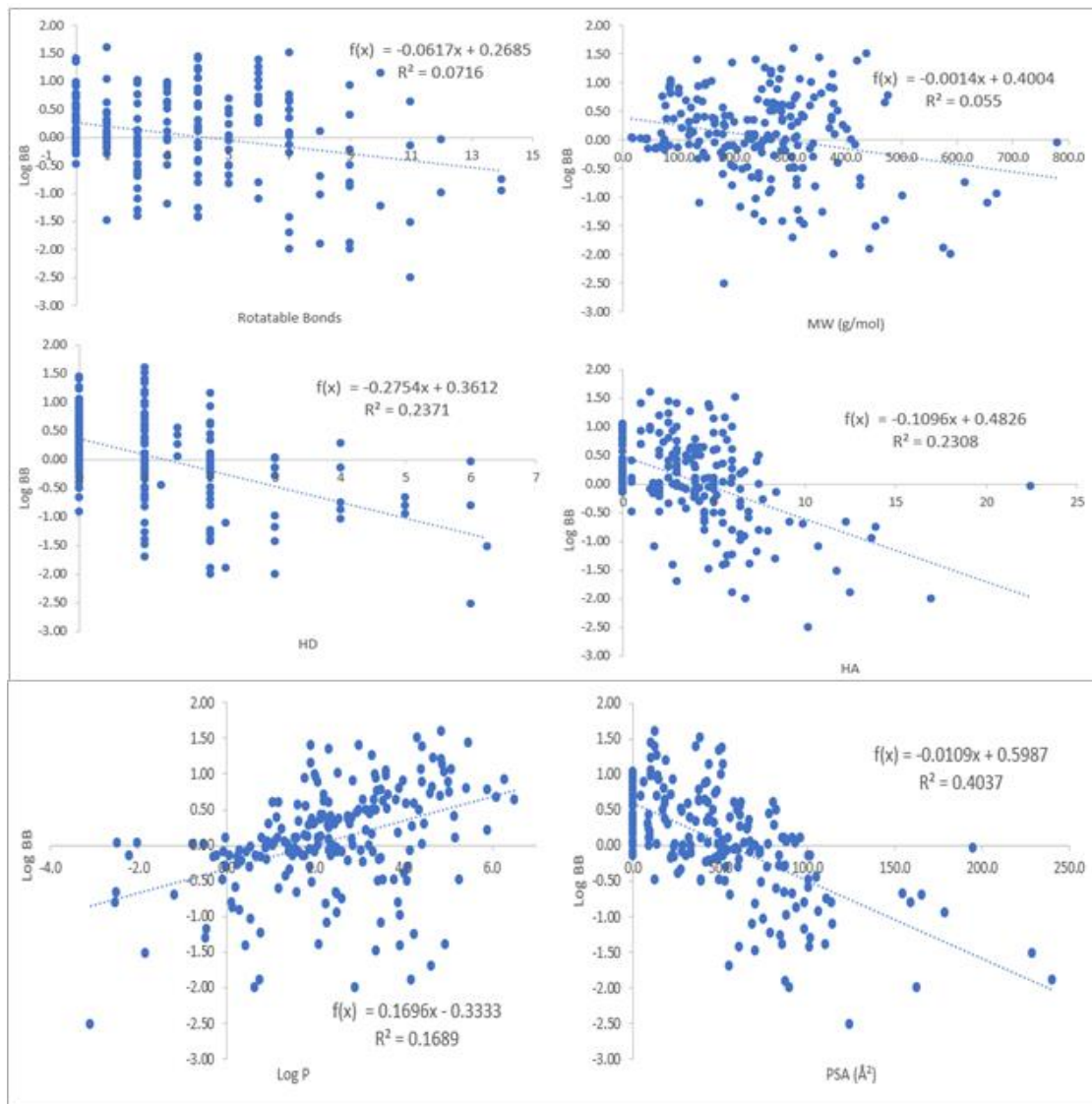
Стойностите на  $\log P$  показват повишената липофилност на конюгатите в сравнение с естествения продукт миртенал.

Относително високите стойности на Log P и ниските стойности на HD, HA и PSA определят оптималната способност на изследваните вещества за преминаване през ХЕБ.

За по-задълбочено проучване на ефектите на използваните молекулярни дескриптори са събрани 208 съединения с експериментално установена пропускливост на кръвно-мозъчната бариера (Usansky et al., 2003; Garg and Verma, 2005; Guerra et al., 2008; Muehlbacher et al., 2011). Тези стойности се определят като логаритмично съотношение между концентрациите им в мозъка ( $c_{\text{Brain}}$ ) и в кръвта ( $c_{\text{Blood}}$ ):

$$\log BB = \log \left( \frac{c_{\text{Brain}}}{c_{\text{Blood}}} \right)$$

Стойностите са корелирани с молекулярните дескриптори, като резултатите са илюстрирани на Фигура 1.



**Фигура 1. Корелации на молекулярните дескриптори с експериментално получените стойности на  $\log BB$  ( $n = 208$ ).**

*\* По-високите стойности на HD, HA и PSA затрудняват пропускливостта през бариерата, докато по-високите стойности на  $\log P$  я улесняват.*

При сравняването на корелациите и тенденциите със стойностите на MAC-197 и MAC-198 от фигурата, се вижда, че лигандите са отлично локализирани в пространството на свойствата. Резултатите показват, че и двете съединения имат относително високи стойности на  $\log P$  и ниски стойности на HD, HA и PSA, което се оценява като оптимална възможност за преминаване през хемато-енцефалната бариера.

Балансът на молекулните дескриптори (MW,  $\log P$ , HD, HA, PSA и RB) се преценява чрез изчисляване на индексите на известни лекарства (KDI) за лигандите. Този метод се основава на анализа на лекарства в клинична употреба, чрез който статистическото разпределение на всеки дескриптор се напасва към функция на Гаус и се нормализира до единица, което позволява да се изчисли индекса. Използвани са

както методите на сумиране на индексите ( $KDI_{2a}$ ), така и методите на умножение ( $KDI_{2b}$ ) (Eurtivong and Reynisson, 2018), което е показано за  $KDI_{2a}$  в уравнение 1 и за  $KDI_{2b}$  в уравнение 2, а числените резултати са дадени в Таблица 1 (горе):

$$KDI_{2a} = I_{MW} + I_{\log P} + I_{HD} + I_{HA} + I_{RB} + I_{PSA} \quad (1)$$

$$KDI_{2b} = I_{MW} \times I_{\log P} \times I_{HD} \times I_{HA} \times I_{RB} \times I_{PSA} \quad (2)$$

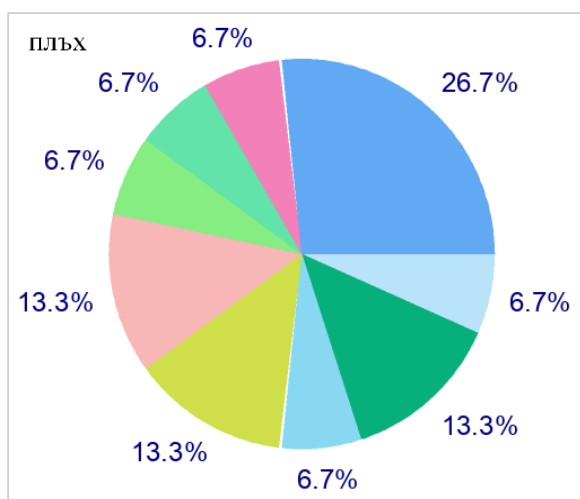
Стойностите на  $KDI_{2a}$  за лигандите са, съответно 4,05 (MAC-197), 3,89 (MAC-198) и 3,38 за М, с теоретичен максимум от 6, при средна стойност за известни лекарства 4,08 ( $\pm 1,27$ ). Анализирани са колекцията от 1880 лекарствени записа на Eurtivong and Reynisson (2018). От тях 245 имат индикация за повлияване на заболявания на ЦНС.

Средната стойност за повлияващите ЦНС фармацевтични продукти е 4,54 ( $\pm 0,67$ ), малко по-висока от тази за MAC-197 и MAC-198.  $KDI_{2b}$  има стойности, съответно от 0,07 (MAC-197), 0,04 (MAC-198) и 0,01 за миртенал, с теоретичен максимум 1 и с KDS средна стойност от 0,18 ( $\pm 0,20$ ). ЦНС-активните лекарства имат средна стойност 0,21 ( $\pm 0,19$ ). Показателят  $KDI_{2b}$  е категоричен, тъй като параметрите се умножават, като едно ниско число води до ниска обща стойност. Данните позволяват да се заключи, че производните на миртенал имат благоприятни физикохимични параметри за навлизане в ЦНС.

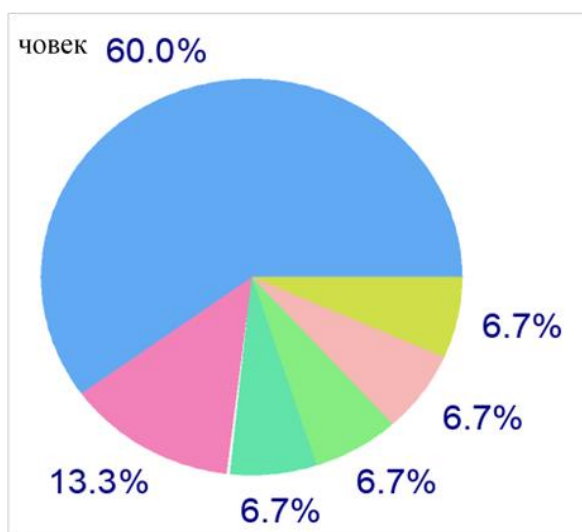
## **2. Прогнозиране потенциалните таргети на миртеналовите конюгати с аминокиселини посредством SwissADME софтуер**

### **2.1. Прогнозиране потенциалните таргети на MAC-197 при двата биологични вида – плъх и човек**

При анализа на резултатите от софтуерното изследване прави впечатление, че основните прогнозираните мишени за свързване на MAC-197 при плъхове и хора са от семейството на G-протеин-свързаните рецептори, като наблюдаваната разлика се свързва с видовата принадлежност (Фигура 2).



26.7%	G-протеин свързани рецептори
13.3%	Ензими
13.3%	Кинази
13.3%	Волтаж-зависими йонни канали
6.7%	Електрохимични транспортери
6.7%	Изомеразы
6.7%	Други цитозолни протеини
6.7%	Лиганд-опериращи йонни канали
6.7%	Нуклеарни рецептори



60.0%	G-протеин свързани рецептори
13.3%	Хидролази
6.7%	Електрохимични транспортери
6.7%	Волтаж-зависими йонни канали
6.7%	Ензими
6.7%	Мембранни рецептори

**Фигура 2. Афинитет на MAC-197 към прогнозираните таргети при плъх и човек**

При експериментални плъхове потенциалните мишени на изследваното съединение се отнасят към различни групи биологични структури като G-протеин свързани рецептори, ензими, волтаж-зависими йонни канали и други, докато при хора се прогнозира по-голям афинитет на MAC-197 към метаботропните рецептори (60%).

На Таблица 2 е представен подробен списък на целите и вероятността за свързване при лабораторни плъхове, към които MAC-197 проявява афинитет.

**Таблица 2. Мишени при плъхове и прогнозираната вероятност за свързване с MAC-197**

Мишена	Код (съкратено наименование)	Клас мишена	Вероятност,%
Muscarinic acetylcholine receptor M1 (by homology)	CHRM1	Family A G protein-coupled receptor	13.07919551770
Muscarinic acetylcholine receptor M2	CHRM2	Electrochemical transporter	13.07919551770

Alpha-2c adrenergic receptor (by homology)	ADRA2C	Nuclear receptor	9.78745343258
Ionotropic glutamate receptor NMDA 1	GRIN1	Isomerase	9.78745343258
Serotonin 1a (5-HT1a) receptor	HTR1A	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 2a (5-HT2a) receptor (by homology)	HTR2A	Kinase	9.78745343258
Lanosterol synthase	LSS	Voltage-gated ion channel	9.78745343258
Sigma opioid receptor (by homology)	SIGMAR1	Other cytosolic protein	9.78745343258
Serotonin transporter (by homology)	SLC6A4	Enzyme	9.78745343258
Norepinephrine transporter	SLC6A2	Kinase	9.78745343258
Alpha-1a adrenergic receptor (by homology)	ADRA1A	Ligand-gated ion channel	9.78745343258
Alpha-1b adrenergic receptor	ADRA1B	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Squalene synthetase	FDFT1	Enzyme	9.78745343258
C-X-C chemokine receptor type 3 (by homology)	CXCR3	Voltage-gated ion channel	9.78745343258
Cyclooxygenase-2 (by homology)	PTGS2	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Muscarinic acetylcholine receptor M5 (by homology)	CHRM5	Lyase	9.78745343258
Muscarinic acetylcholine receptor M3 (by homology)	CHRM3	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Delta opioid receptor (by homology)	OPRD1	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 1b (5-HT1b) receptor (by homology)	HTR1B	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 1d (5-HT1d) receptor (by homology)	HTR1D	Electrochemical transporter	9.78745343258
Serotonin 7 (5-HT7) receptor	HTR7	Enzyme	9.78745343258
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8	TRPM8	Unclassified protein	9.78745343258
Neuronal acetylcholine receptor; alpha3/beta4	CHRNA3/CHRNB4	Voltage-gated ion channel	9.78745343258
Neuronal acetylcholine receptor; alpha2/beta4	CHRNB4	Ligand-gated ion channel	9.78745343258
Neuronal acetylcholine receptor protein alpha-7 subunit	CHRNA7	Hydrolase	9.78745343258
Mas-related G-protein coupled receptor member X1 (by homology)	MRGPRX1	Enzyme	9.78745343258
Histamine H3 receptor	HRH3	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258



Структурата на МАС-197 притежава най-висок потенциал за свързване с М<sub>1</sub>- и М<sub>2</sub>-холинергичните рецептори, както и с адренергични, серотонинергични, глутаматергични и опиоидни рецептори, а също и с транспортерите за норадреналин и серотонин в израз на възможността му да влияе върху ЦНС при плъхове.

Изследването на теоретичните мишени и вероятността за свързване при човека са представени в Таблица 3.

**Таблица 3. Мишени при хора и прогнозираната вероятност за свързване с МАС-197**

Мишена	Код (съкратено наименование)	Клас мишена	Вероятност,%
Muscarinic acetylcholine receptor M1	CHRM1	Family A G protein-coupled receptor	13.07919551770
Muscarinic acetylcholine receptor M2	CHRM2	Family A G protein-coupled receptor	13.07919551770
Butyrylcholinesterase	BCHE	Hydrolase	9.78745343258
Acetylcholinesterase	ACHE	Hydrolase	9.78745343258
Adrenergic receptor alpha-2	ADRA2C	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 2a (5-HT <sub>2a</sub> ) receptor	HTR2A	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Intermediate conductance calcium-activated potassium channel protein 4	KCNN4	Voltage-gated ion channel	9.78745343258
Lanosterol synthase	LSS	Enzyme	9.78745343258
Serotonin 2b (5-HT <sub>2b</sub> ) receptor	HTR2B	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 7 (5-HT <sub>7</sub> ) receptor	HTR7	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Sigma opioid receptor	SIGMAR1	Membrane receptor	9.78745343258
Serotonin transporter	SLC6A4	Electrochemical transporter	9.78745343258
Alpha-1a adrenergic receptor	ADRA1A	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Dopamine D5 receptor	DRD5	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Dopamine D1 receptor	DRD1	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Alpha-1d adrenergic receptor	ADRA1D	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 2c (5-HT <sub>2c</sub> ) receptor	HTR2C	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 6 (5-HT <sub>6</sub> ) receptor	HTR6	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Cytochrome P450 3A4	CYP3A4	Cytochrome P450	9.78745343258
Alpha-2a adrenergic receptor	ADRA2A	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Geranylgeranyl pyrophosphate synthetase	GGPS1	Enzyme	9.78745343258

Neuronal acetylcholine receptor; alpha4/beta2	CHRNA4 CHRNB2	Ligand-gated ion channel	9.78745343258
Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	PRCP	Protease	9.78745343258
HERG	KCNH2	Voltage-gated ion channel	9.78745343258
Serotonin 1a (5-HT1a) receptor	HTR1A	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Squalene synthetase (by homology)	FDFT1	Enzyme	9.78745343258
C-X-C chemokine receptor type 3	CXCR3	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Neuronal acetylcholine receptor; alpha3/beta4	CHRNA3 CHRNB4	Ligand-gated ion channel	9.78745343258
Cyclooxygenase-2 (by homology)	PTGS2	Oxidoreductase	9.78745343258
Muscarinic acetylcholine receptor M4	CHRM4	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Muscarinic acetylcholine receptor M5	CHRM5	Family A G protein-coupled receptor	9.7874534325
Muscarinic acetylcholine receptor M3	CHRM3	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Glutamate NMDA receptor; GRIN1/GRIN2B	GRIN1 GRIN2B	Ligand-gated ion channel	9.78745343258
Glutamate NMDA receptor; GRIN1/GRIN2A	GRIN2A GRIN1	Ligand-gated ion channel	9.78745343258
Delta opioid receptor	OPRD1	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 1b (5-HT1b) receptor	HTR1B	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 1d (5-HT1d) receptor	HTR1D	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8 (by homology)	TRPM8	Voltage-gated ion channel	9.78745343258
Mas-related G-protein coupled receptor member X1	MRGPRX1	Unclassified protein	9.78745343258
Histamine H3 receptor	HRH3	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon 2	GRIN2B	Ligand-gated ion channel	9.78745343258

При хора MAC-197 притежава допълнителен потенциал за свързване с ацетилхолинестеразата и псевдохолинестеразата, допаминови рецептори от подтип D<sub>1</sub> и D<sub>5</sub>, както и CYP 3A4, за разлика от плъхове. За сравнение, потенциалните мишени на MAC-197 при плъх са 27, докато при човека са 41.

## 2.2. Прогнозиране потенциалните таргети на МАС-198 при двата биологични вида – плъх и човек

Анализът на резултатите от софтуерното изследване показва, че при плъхове и хора, както при МАС-197, така и при МАС-198, се наблюдава разлика в основните мишени за свързване, дължаща се на видовата принадлежност (Фигура 3).



**Фигура 3. Афинитет на МАС-198 към прогнозираните таргети при плъх и човек**

И тук, при човешкия вид, предвиждането показва като основна група потенциални мишени фамилията на G-протеин-свързаните рецептори (66,67% вероятност), както и при другото миртеналово производно. От друга страна, при плъхове с най-голям афинитет за свързване на МАС-198 са ензими (33%), което се отличава от основната група теоретични таргети за МАС-197 при плъхове – G-протеин-свързани рецептори (23%).

На Таблица 4 е представен подробен списък на прогнозираните цели и вероятността за свързване при плъхове, към които МАС-198 проявява афинитет.

**Таблица 4. Мишени при плъхове и прогнозираната вероятност за свързване с МАС-198**

Мишена	Код (съкратено наименование)	Клас мишена	Вероятност,%
Muscarinic acetylcholine receptor M1 (by homology)	CHRM1	Family A G protein-coupled receptor	13.0791955177
Muscarinic acetylcholine receptor M2	CHRM2	Electrochemical transporter	12.2581769115
Alpha-2c adrenergic receptor (by homology)	ADRA2C	Nuclear receptor	9.78745343258
Serotonin 1a (5-HT1a) receptor	HTR1A	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Ionotropic glutamate receptor NMDA 1	GRIN1	Isomerase	9.78745343258
Serotonin 2a (5-HT2a) receptor (by homology)	HTR2A	Kinase	9.78745343258
Lanosterol synthase	LSS	Voltage-gated ion channel	9.78745343258
Sigma opioid receptor (by homology)	SIGMAR1	Other cytosolic protein	9.78745343258
Norepinephrine transporter	SLC6A2	Kinase	9.78745343258
Serotonin transporter	SLC6A4	Enzyme	9.78745343258
Alpha-1a adrenergic receptor (by homology)	ADRA1A	Ligand-gated ion channel	9.78745343258
Alpha-1b adrenergic receptor	ADRA1B	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Histamine H3 receptor	HRH3	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
C-X-C chemokine receptor type 3 (by homology)	CXCR3	Voltage-gated ion channel	9.78745343258
Squalene synthetase	FDFT1	Enzyme	9.78745343258
Muscarinic acetylcholine receptor M5 (by homology)	CHRM5	Lyase	9.78745343258
Muscarinic acetylcholine receptor M3 (by homology)	CHRM3	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 1d (5-HT1d) receptor (by homology)	HTR1D	Electrochemical transporter	9.78745343258
Delta opioid receptor (by homology)	OPRD1	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Cyclooxygenase-2 (by homology)	PTGS2	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 1b (5-HT1b) receptor (by homology)	HTR1B	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Mas-related G-protein coupled receptor member X1 (by homology)	MRGPRX1	Enzyme	9.78745343258
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8	TRPM8	Unclassified protein	9.78745343258
Serotonin 7 (5-HT7) receptor	HTR7	Enzyme	9.78745343258
Neuronal acetylcholine receptor; alpha3/beta4	CHRNA3/CHRNB4	Voltage-gated ion channel	9.78745343258
Neuronal acetylcholine receptor; alpha2/beta4	CHRNB4	Ligand-gated ion channel	9.78745343258

Neuronal acetylcholine receptor protein alpha-7 subunit	CHRNA7	Hydrolase	9.78745343258
Serotonin 2c (5-HT2c) receptor	HTR2C	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Dopamine D3 receptor (by homology)	DRD3	Enzyme	9.78745343258

Важно е да се отбележи, че при пльховете МАС-198 не притежава афинитет за свързване с транспортерите на невромедиатори, какъвто се наблюдава при другото производно МАС-197.

Изследването на теоретичните мишени на МАС-198 при човека са представени в Таблица 5.

**Таблица 5. Мишени при хора и прогнозираната вероятност за свързване с МАС-198**

Мишена	Код (съкратено наименование)	Клас мишена	Вероятност,%
Muscarinic acetylcholine receptor M1	CHRM1	Family A G protein-coupled receptor	13.07919551770
Muscarinic acetylcholine receptor M2	CHRM2	Family A G protein-coupled receptor	12.25817691150
Butyrylcholinesterase	BCHE	Hydrolase	10.60999491330
Acetylcholinesterase	ACHE	Hydrolase	9.78745343258
Adrenergic receptor alpha-2	ADRA2C	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 2a (5-HT2a) receptor	HTR2A	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 2b (5-HT2b) receptor	HTR2B	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 7 (5-HT7) receptor	HTR7	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Sigma opioid receptor	SIGMAR1	Membrane receptor	9.78745343258
Serotonin transporter (by homology)	SLC6A4	Electrochemical transporter	9.78745343258
Intermediate conductance calcium-activated potassium channel protein 4	KCNN4	Voltage-gated ion channel	9.78745343258
Alpha-1a adrenergic receptor	ADRA1A	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Dopamine D5 receptor	DRD5	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Dopamine D1 receptor	DRD1	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Alpha-1d adrenergic receptor	ADRA1D	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 2c (5-HT2c) receptor	HTR2C	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Serotonin 6 (5-HT6) receptor	HTR6	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Cytochrome P450 3A4	CYP3A4	Cytochrome P450	9.78745343258

Alpha-2a adrenergic receptor	ADRA2A	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Geranylgeranyl pyrophosphate synthetase	GGPS1	Enzyme	9.78745343258
Histamine H3 receptor	HRH3	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Neuronal acetylcholine receptor; alpha4/beta2	CHRNA4 CHRNB2	Ligand-gated ion channel	9.78745343258
Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	PRCP	Protease	9.78745343258
Serotonin 1a (5-HT1a) receptor	HTR1A	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
HERG	KCNH2	Voltage-gated ion channel	9.78745343258
C-X-C chemokine receptor type 3	CXCR3	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Squalene synthetase (by homology)	FDFT1	Enzyme	9.78745343258
Glutamate NMDA receptor; GRIN1/GRIN2B	GRIN1 GRIN2B	Ligand-gated ion channel	9.78745343258
Glutamate NMDA receptor; GRIN1/GRIN2A	GRIN2A GRIN1	Ligand-gated ion channel	9.78745343258
Neuronal acetylcholine receptor; alpha3/beta4	CHRNA3 CHRNB4	Ligand-gated ion channel	9.78745343258
Muscarinic acetylcholine receptor M4	CHRM4	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Muscarinic acetylcholine receptor M5	CHRM5	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Muscarinic acetylcholine receptor M3	CHRM3	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Glutamate [NMDA] receptor subunit epsilon 2	GRIN2B	Ligand-gated ion channel	9.78745343258
Serotonin 1d (5-HT1d) receptor	HTR1D	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Delta opioid receptor	OPRD1	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Cyclooxygenase-2 (by homology)	PTGS2	Oxidoreductase	9.78745343258
Serotonin 1b (5-HT1b) receptor	HTR1B	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258
Mas-related G-protein coupled receptor member X1	MRGPRX1	Unclassified protein	9.78745343258
Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8 (by homology)	TRPM8	Voltage-gated ion channel	9.78745343258
Dopamine D3 receptor	DRD3	Family A G protein-coupled receptor	9.78745343258

Потенциалните мишени на МАС-198 при плъх са 29 броя, а при човек – 41 броя. Различията са във връзка с допълнителната теоретична възможност за взаимодействие на съединението с СУР 3А4, с ацетилхолинестеразата, бутирилхолинестеразата, както и с D<sub>1</sub>-, D<sub>5</sub>- и M<sub>4</sub>-рецепторите в човешкия организъм.

При извършения софтуерен анализ, отнасящ се за потенциалните таргети на миртеналовите конюгати с аминоксадантан, се регистрират междувидови различия (плъх спрямо човек), както и такива, определени от химичната структура на съединенията. Афинитетът на двете производни при плъхове по отношение на теоретичните мишени за свързване е сходен, като при МАС-198 се отчита допълнителна възможност за взаимодействие с 5HT<sub>2C</sub>- и D<sub>3</sub>- рецептора в сравнение с МАС-197. По отношение на потенциалните таргети при човека, двете производни отново показват подобен потенциал за свързване. Различават се по това, че за МАС-197 е характерен афинитет към H<sub>3</sub>-хистаминовите рецептори, а за МАС-198 – към D<sub>3</sub>-рецепторите. Съединенията притежават теоретичната възможност да се свързват с много структури в ЦНС, като по този начин влияят върху различни невротрансмитерни системи и регулаторни процеси.

### **3. Физична стабилност на миртеналовата емулсия и разтворите на МАС-197 и МАС-198 за интраперитонеално приложение**

*Миртеналовата емулсия* показва първи признаци на физична нестабилност на 72-ия час от началото на цикличното аналитично центрофугиране (намаление в степента на млечната опалесценция в горните слоеве на епруветката), които се задълбочават във времето. След рехомогенизиране в ултразвукова вана и центрофугиране се забелязват няколко маслени капчици, които се ресуспендират след разклащане. Макроскопски се отчита, че емулсията опалесцира по-слабо.

На 14-ия ден от 21-дневното изследване при температура 25°C (+/- 2°C) и влажност 60% (+/- 5%) в епруветката с миртеналовата емулсия се забелязват по-едри маслени капки по дъното, които се запазват до края на наблюдението.

*Разтворите на миртеналовите конюгати с аминоксадантан* в трите използвани концентрации на съ-разтворителя DMSO (1, 3 и 5%) остават непроменени до края на експеримента. Снимков материал от изследването е предоставен в Приложение № 4.

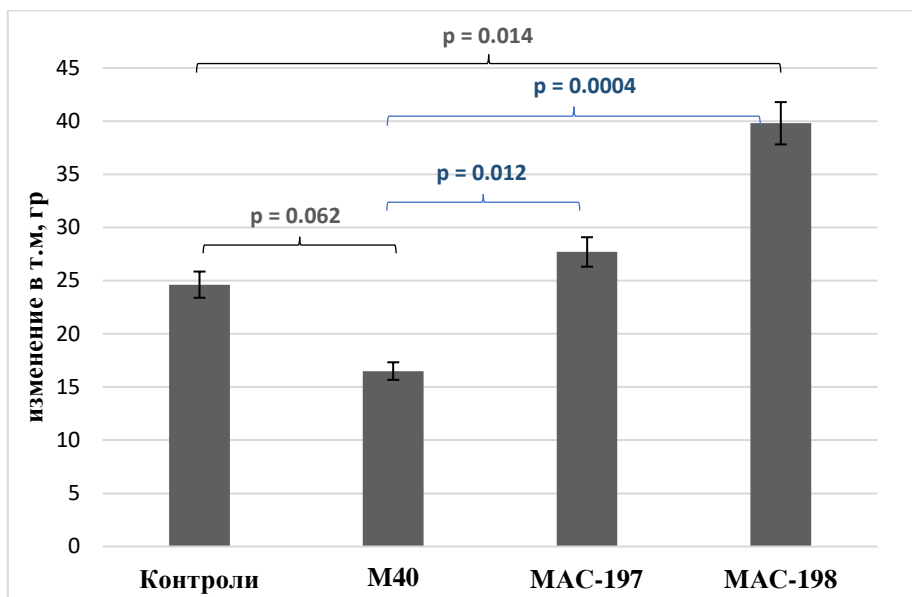
Получените резултати позволяват да се избере най-ниската концентрация на съ-разтворителя диметилсулфоксид при изготвянето на работните разтвори за интраперитонеално приложение, която в случая е 1%.

### **4. Експерименти върху интактни плъхове**

#### **4.1. Ефекти на миртеналовите конюгати върху общото състояние на гризачите**

##### **4.1.1. Изменение на телесната маса**

Изменението на телесните тегла на плъховете за периода на провеждане на експеримента е важен показател за ефекта на изследваните субстанции върху общия им физиологичен статус. Резултатите са представени на Фигура 4.



**Фигура 4.** Изменение в телесните тегла при пълхове след 11-дневно приложение на M (40 mg/kg), MAC-197 (1 mg/kg) и MAC-198 (1 mg/kg)

Очаквано миртенал води до намаляване на теглото на гризачите спрямо контролите (с гранична значимост), установено и в предишни изследвания на Драгоманова (2020). Това според нас е резултат от потискане на апетита, характерно за всички етерични масла, съдържащи природния монотерпен, което не се наблюдава при новосинтезираните му производни. Вижда се, че прилагането на MAC-197 предизвиква незначително изменение на телесната маса, сравнимо с това при контролните животни, докато нарастването на теглото спрямо миртеналовата група е с 67,9% ( $P = 0,012$ ). След прилагането на MAC-198 показателят е статистически достоверно повишен, както спрямо контролната група – с 61,6% ( $P = 0,014$ ), така и спрямо третираните с миртенал пълхове – със 141,2% ( $P = 0,0004$ ). Вероятно това се дължи на променените физикохимични свойства на производните, различаващи се от тези на изходния продукт по отсъствие на аромат и летливост, основните причини за потискане на апетита от етеричните масла.

Резултатите от това пилотно наблюдение представляват своеобразен ориентир за липсата на общотоксично действие на двата миртеналови деривата при многократно интраперитонеално приложение.

#### 4.1.2. Макроскопска обсервация

След евтаназиране на опитните животни, като част от пилотните изследвания, е извършена макроскопска обсервация за установяване на забележими увреждания на основните жизнени органи. При дисекцията на пълховете от отделните групи не са установени увреждания в сърцето, черния дроб, бъбреците, стомаха, жлъчката и червата.

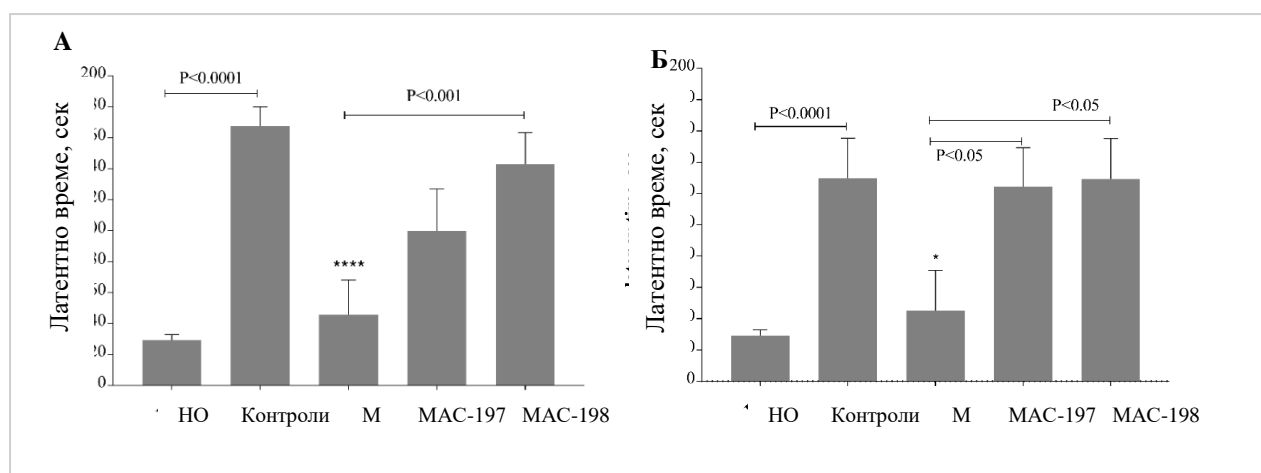


## 4.2. Влияние на миртенал-аминоадамантановите производни МАС-197 и МАС-198 върху паметовите способности на лабораторни гризачи

### 4.2.1. Състояние на краткосрочната и дългосрочната памет (*Passive avoidance test*)

#### 4.2.1.1. Проследяване на латентното време

Наблюдава се значително подобрение на паметта при плъховете след еднократно (Фиг. 5 А) и многократно (Фиг. 5 Б) приложение на двете миртеналови производни МАС-197 и МАС-198.



**Фигура 5. Ефекти на МАС-197 и МАС-198 върху паметта при плъхове след остро (А) и многократно третиране (Б) – отчитане на латентното време (сек); М (40 mg/kg) е използван като референт; \*\*\*\* $P < 0,0001$ , \* $P < 0,05$  спрямо контролите**

Контролната група е със запазена памет в острия експеримент и според очакванията латентното време е значително увеличено в сравнение с НО ( $P < 0,0001$ ) (Фиг. 5 А). Потвърждават се резултатите от предишните ни проучвания, които показват, че миртенал предизвиква влошаване на краткосрочната и дългосрочната памет на интактни лабораторни гризачи, което свързваме с ефекта му върху GABA рецептора и подобните на бензодиазепините хипомнезични свойства (Драгоманова, 2020).

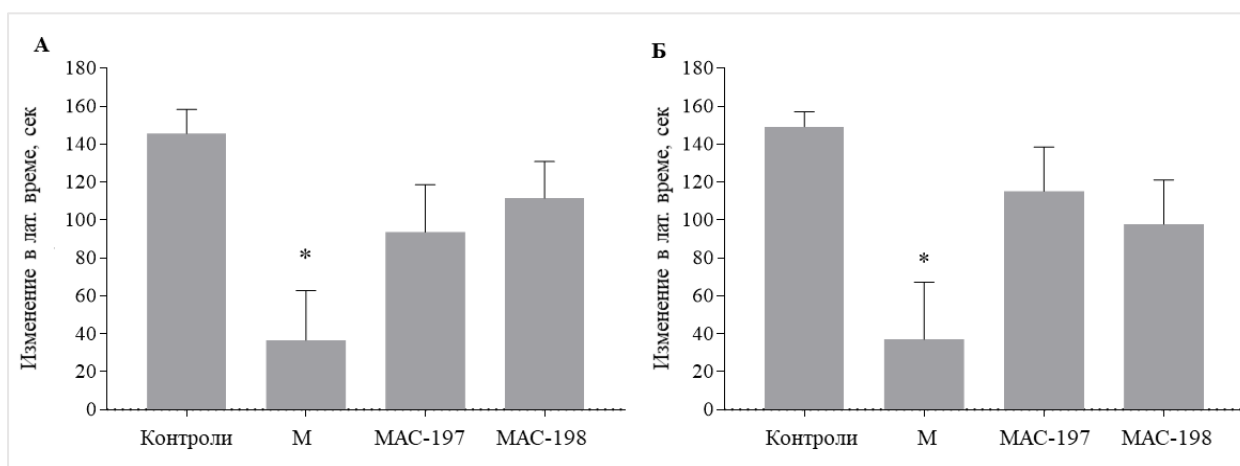
При еднократното приложение монотерпенът понижава стойностите на латентното време със 72,8% спрямо контролната група ( $P < 0,0001$ ). Острото третиране на плъховете с двата адамантанови конюгата на миртенал води до увеличаване на латентното време. Прилагането на МАС-198 предизвиква ефект, сравним с този на контролите, който се различава от миртеналовата група с високо ниво на значимост ( $P < 0,001$ ).

След многократното приложение при гризачите от контролната група отново се наблюдават запазени паметови способности, демонстрирани със значително повишена стойност на показателя спрямо НО ( $P < 0,0001$ ) (Фиг. 5 Б). При третираните с миртенал

плъхове, както при острия опит, така и при повтарящото се приложение, се регистрира намален капацитет на паметта (с 65%) в сравнение с контролите ( $P < 0,05$ ). Многократното приложение на двете миртеналови производни в продължение на 11 дни запазва паметта на плъховете, близка до тази на контролите, докато стойностите на показателя при животните от миртеналовата група са статистически достоверно по-ниски ( $P < 0,05$ ).

#### 4.2.1.2. Отчитане на изменението в латентното време

Влиянието на миртеналовите деривати върху паметта при опитните плъхове и при двете схеми на приложението им, отчетено чрез наблюдаваните промени в латентното време е показано на Фигура 6.



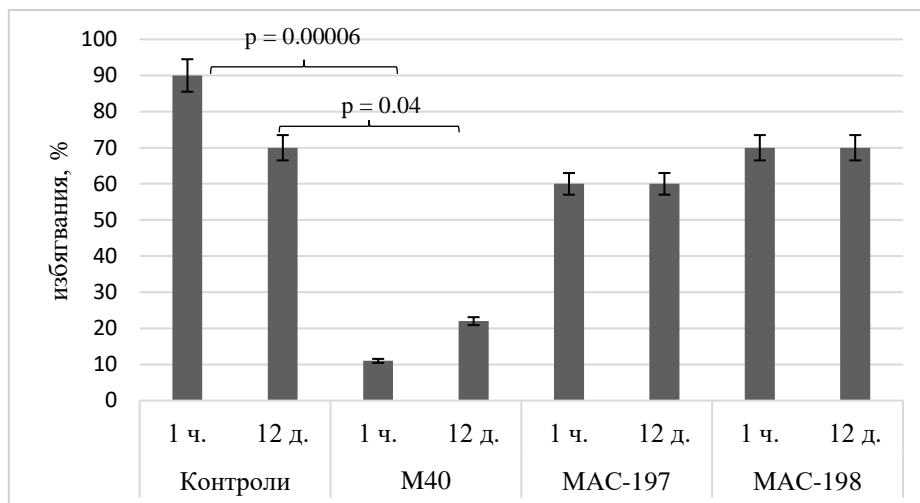
**Фигура 6. Ефекти на MAC-197 и MAC-198 върху паметта след остро (А) и многократно третиране (Б) при плъхове – отчитане на изменението в латентното време (сек); М (40 mg/kg) е използван като референт; \* $P < 0,05$  спрямо контролната група**

Според очакванията, миртенал в значима степен намалява изменението на латентното време в сравнение с контролната група плъхове ( $P < 0,05$ ), както при остро (еднократно) – с 49,7% (Фиг. 6 А), така и при многократно (повтарящо се) приложение – със 75,2% (Фиг. 6 Б).

За разлика от него, конюгатите му с аминоксадаммантан и при двете схеми на приложение не повлияват забележимо показателя, което потвърждава липсата на характерния за природния референт хипомнезичен ефект при плъховете.

#### 4.2.1.3. Проследяване на броя избягвания в тъмното отделение на постановката

Друг показател за определяне състоянието на паметта е броят на избягванията във всяка група животни, които се отчитат с *Passive avoidance* тест. Резултатите са представени на Фигура 7.



**Фигура 7. Ефекти на MAC-197 и MAC-198 върху паметта след остро и многократно третиране при плъхове - отчитане на броя избягвания в групата, %**

И при това изследване миртенал предизвиква влошаване на състоянието на паметта, отчетено чрез значимо понижаване броя на избягванията в тъмното отделение в сравнение с контролните плъхове. Ефектът е налице, както един час след еднократното приложение ( $P = 0,00006$ ), така и след 11-дневното третиране ( $P = 0,04$ ). Аминоадамантановите му производни не водят до съществени изменения в показателя, което подкрепя твърдението ни за липсата на увреждащо действие върху паметовите процеси при интактни плъхове.

В настоящото изследване за първи път е демонстриран потенциалът на двата новосинтезирани конюгата на миртенал с аминоксадамантан за подобряване на паметта на изследваните гризачи. Поведенческите тестове показват запазена функция на паметта при третираните и с двете съединения плъхове. След тяхното еднократно и многократно приложение стойностите на показателите са близки до тези на контролната група.

### **4.3. Влияние на миртеналовите конюгати върху активността на мозъчната ацетилхолинестераза**

#### **4.3.1. Докинг-изследвания за потенциала на миртеналовите деривати за повлияване активността на мозъчната AChE**

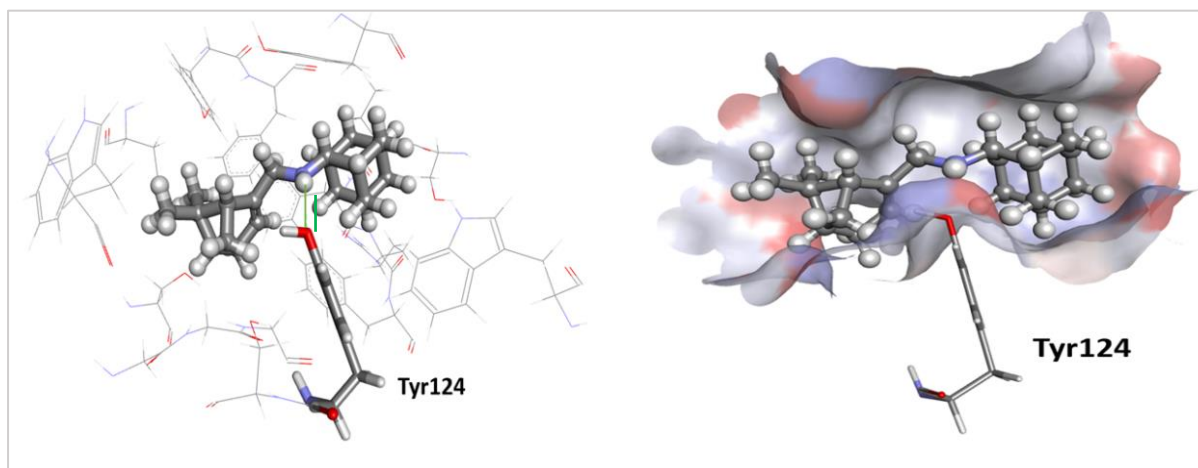
Предсказаният афинитет на MAC към ензимния каталитичен център на AChE е показан в Таблица 6.

**Таблица 6. Афинитет на свързване към каталитичното място на АСhЕ, както е предсказано от точковите функции GoldScore (GS), ChemScore (CS), ChemPiecewise Linear Potential (ChemPLP) и Astex Statistical Potential (ASP), използвайки GOLD (v5.4.1) *HI6* е съкристиализираният лиганд (4-(aminobarbonyl)-1-[(2-[(E)-hydroxyimino)methyl]pyridinium-1-yl]methoxy) methylpyridinium)**

	ASP	ChemPLP	CS	GS
<b>MAC-197</b>	34.9	68.4	40.9	47.3
<b>MAC-198</b>	35.0	64.2	40.3	45.1
<b>Myrtenal</b>	23.8	44.0	28.5	35.1
<b>HI6</b>	48.1	85.6	29.1	62.4
<b>Acetylcholine</b>	<b>24.1</b>	<b>43.1</b>	<b>18.2</b>	<b>36.6</b>
<b>Donepezil</b>	59.1	83.2	43.3	56.9
<b>Tacrine</b>	42.1	66.0	35.1	57.1

За по-нататъшно сравнение към мястото на свързване са прикрепени невротрансмитера АСh и лекарствените препарати *Tacrine* и *Donepezil*. Последните две съединения са ацетохолинестеразни инхибитори, които намират клинично приложение при терапията на АД. Според всичките четири точкови функции, както MAC-197, така и MAC-198, в сравнение с миртенал и АСh, взаимодействат по-силно с активния център на АСhЕ (Таблица 6). Установено е, че миртенал-адамантановите конюгати имат малко по-нисък прогнозиран афинитет от лекарствата *Donepezil* и *Tacrine*.

Според софтуерната предикция от ChemPLP, MAC-197 образува една водородна връзка с хидроксилния кислороден атом в Tyr124 за АСhЕ (Фиг. 8 А). Миртеналовият радикал се избутва дълбоко в свързващия джоб на активния център с адамантан на входа (Фиг. 8 Б).



**Фигура 8. Хиперпозиране на MAC-197 в мястото на свързване на АСhЕ, както е предвидено от функцията за оценяване на ChemPLP**

**А.** Предсказаната конфигурация е показана във формат на *топка и пръчка*, а водородното свързване към Tyr124 (*формат на пръчка*) е показано като *зелена линия*.

Б. Аминокиселините, образуващи липофилния свързващ джоб, показани като *линии*, са Trp86, Gly120, Gly121, Gly122, Trp286, Val294, Phe295, Phe297, Tyr337, Phe338, Tyr341 и His447.

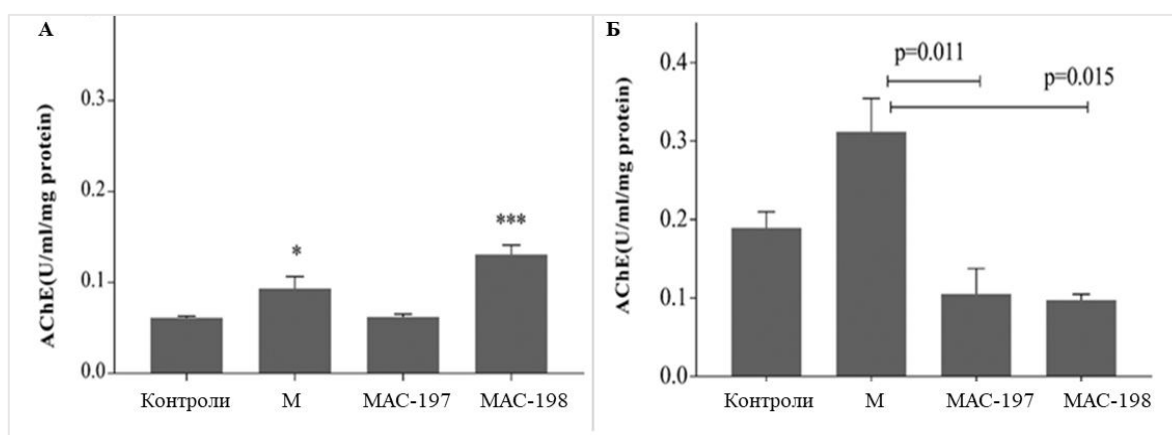
Повърхността на протеина е изобразена в различни цветове: *синьо* – области с частичен положителен заряд на повърхността; *червено* – области с частичен отрицателен заряд; *сиво* – неутрални области. Лигандът заема дълбокия свързващ джоб.

Джобът е изграден от много липофилни аминокиселинни остатъци, побиращи двата алифатни компонента на лиганда. Интересното е, че се предвижда MAC-198 да има конформация на обратното свързване, т. е. миртеналовата част се намира на входа на свързващия джоб. И накрая, предполага се, че миртенал заема дъното на мястото на свързване, т. е. мястото на миртеналовия остатък за MAC-197.

Молекулярното моделиране показва, че AChE е правдоподобна цел за тестваните вещества, тъй като лигандите образуват водородни връзки и се вписват добре в свързващия джоб, без да напрягат молекулярната конформация в енергийно неизгодни взаимодействия.

#### 4.3.2. Ефекти на миртеналовите конюгати върху активността на мозъчната AChE (*in vivo*)

И двете миртеналови производни MAC-197 и MAC-198 показват афинитет към активното място на AChE според докинг анализа. Повечето *in vivo* протоколи обикновено проследяват ефектите на съединенията върху ензимната активност само в хипокампа на експериментални плъхове. В нашите експерименти е установено, че проучваните деривати влияят по различен начин върху ензимната активност в двете основни структури, отговорни за процесите на паметта, а именно кората и хипокампа. Резултатите са представени на Фигура 9.



Фигура 9. Ефекти на MAC-197 и MAC-198 върху активността на AChE в мозъчната кора (А) и хипокампа (Б) на плъхове. Данните са изразени като средна стойност  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ); \*\*\* $P < 0,001$ , \* $P < 0,05$  спрямо контролната група

В мозъчната кора, както миртенал, така и MAC-198 повишават активността на AChE, съответно с 52,5% ( $P < 0,05$ ) и 114,06% ( $P < 0,001$ ) (Фиг. 9 А). MAC-197 не

променя изследвания показател спрямо контролите, което позволява да се направи извода, че при МАС-197 не са регистрирани ефекти върху ацетилхолинестеразната активност в кората.

Хипокампалната активност на АСhЕ е значително инхибирана от приложението на МАС-197 и МАС-198 за разлика от третираните с миртенал плъхове (Фиг. 9 Б), което показва, че в хипокампа той отново предизвиква активиране на ензима, установено от Драгоманова (2020). От друга страна, конюгатите потискат ензимната активност. В сравнение с миртенал, МАС-197 понижава активността на АСhЕ с 66,3%, а МАС-198 – с 68,8%, с ниво на значимост  $P < 0,01$ . Спрямо контролната група, хипокампалната АСhЕ активност е намалена и от двете изследвани вещества, съответно при МАС-197 с 44,4% и при МАС-198 с 48,6%. Резултатите са обобщени в Таблица 7.

**Таблица 7. Активност на АСhЕ в две мозъчни структури, свързани с процесите на паметта – кора и хипокамп**

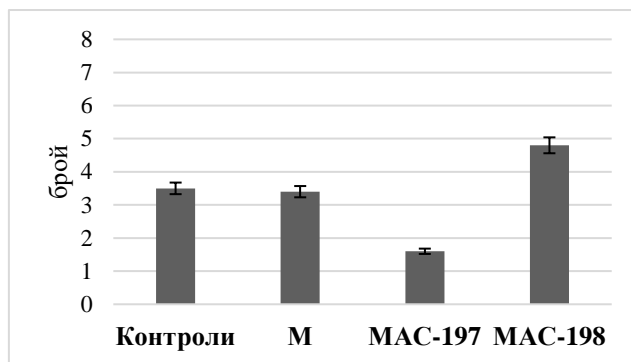
<b>%</b>	<b>Контроли</b>	<b>М</b>	<b>МАС-197</b>	<b>МАС-198</b>
<b>кора</b>	100 (0,06121 U/ml/mg protein )	+ 52,51 *	+ 1,17	+ 114,1 ***
<b>хипокамп</b>	100 (0,189075 U/ml/mg protein)	+ 64,83	- 44,4 (# c/y. M)	- 48,6 (# c/y. M)
<b>Общ ефект</b>		+ 117,34	<b>- 43,23</b>	+ 65,5

Очевидно е, че МАС-197 потиска активността на ензима АСhЕ като сумарен ефект в двете мозъчни области, което е показател за потенциала на това ново съединение да влияе положително върху паметовите увреждания.

Данните от поведенческите тестове корелират с резултатите от оценката на активността на АСhЕ в кората и хипокампа. Синтетични производни инхибират ензимната активност в хипокампа, но не притежават значителни антихолинестеразни свойства в кората. От представените в таблицата разнопосочни ефекти в двете мозъчни структури, може да се предположи наличието на антихолинестеразен потенциал на двете съединения, който е силно изразен при МАС-197. Същото производно намалява предимно хипокампалната АСhЕ активност. Известно е, че активността на АСhЕ е физиологично по-висока в тази мозъчна структура. Вероятно това е причината за наблюдаваните благоприятни ефекти на двете съединения върху паметта на опитните плъхове.

#### **4.4. Влияние на миртеналовите конюгати върху изследователското поведение**

Ефектите на новосинтезираните миртеналови деривати МАС-197 и МАС-198 върху изследователското поведение, изследвани чрез *Hole board* тест, са представени на Фигура 10.



**Фигура 10. Ефекти на MAC-197 и MAC-198 върху изследователското поведение при плъхове след 11-дневно третиране – отчитане на броя „потаяния на главата“**

Използваният за референт миртенал не променя изследователското поведение при плъховете след 11-дневно приложение, докато производните му предизвикват различни по посока изменения в показателя без статистическа достоверност. MAC-197 намалява броя „потаяния“ на главата в отворите на постановката с 56,8% в сравнение с контролите, а MAC-198 ги увеличава с 29,7%.

Липсата на негативни ефекти на конюгатите върху паметовите процеси, в комбинация с резултатите от *Hole board* теста, насочват вниманието към търсене на друга възможна причина за повлияване на изследователската активност при опитните плъхове.

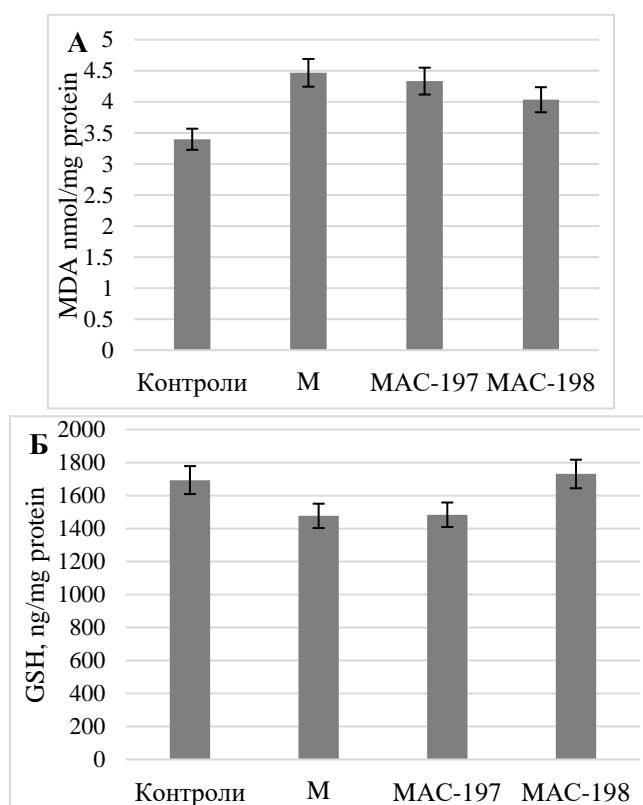
Този поведенчески протокол се използва за изследване на проучвателната активност като индикация за тревожност (d'Isa et al., 2021; Moy et al., 2008; Brown et al., 2008; Takeda et al., 1998). Общият брой „потаяния“ на главата до ушите е показател за изследователската активност на гризачите (d'Isa et al., 2021). Използването на постановката за целта на проучването се основава на хипотезата, че поведението на животни, поставени в нова ситуация, е резултат от конкуренция между две дейности – изследователска и защитна. Трите основни активности са потаяне на главата, оглеждане и придвижване. Посочените поведенчески реакции са изследователски, поради което по-голямата честота на проявата им е индикация за по-ниска степен на тревожност при тестваните животни (Brown et al., 2008). Високото ниво на тревожност води до намалена изследователска активност и обратно, ниското ниво на тревожност се демонстрира с повишен брой „потаяния на главата в дупките“. Това е преобладаващото поведение, за което съществуват доказателства, че е в пряка зависимост от ефектите на различните вещества. File и съавтори разработват постановката, която се използва широко при фармакологични манипулации (File and Wardill, 1975a,b; File and Pellow, 1985). Резултатите от теста показват, че при плъховете, третирани с MAC-198 се регистрира слабо повишение в активността спрямо контролите (без статистическа достоверност), което се проявява с понижаване на тревожността, свързана с непознатата за тях обстановка.

#### 4.5. Влияние на миртеналовите конюгати върху мозъчния оксидативен статус

Друг патогенетичен фактор при невродегенеративните увреждания е индуцирания мозъчен оксидативен стрес. Регистрираните ефекти на изследваните деривати върху основни параметри на оксидативния статус в кората са сравнени с антиоксидантния потенциал на природния монотерпен.

При предишни наши проучвания е установено, че в мозъчната кора на интактни плъхове миртенал проявява про-оксидантни свойства (Драгоманова, 2020).

Резултатите от проследяване влиянието на конюгатите – МАС-197 и МАС-198 върху съдържанието на малоновия диалдехид и на тоталния глутатион в мозъчната кора при плъховете, представени на Фигура 11 А и Б, показват наличие на подобни свойства и при двете съединения.



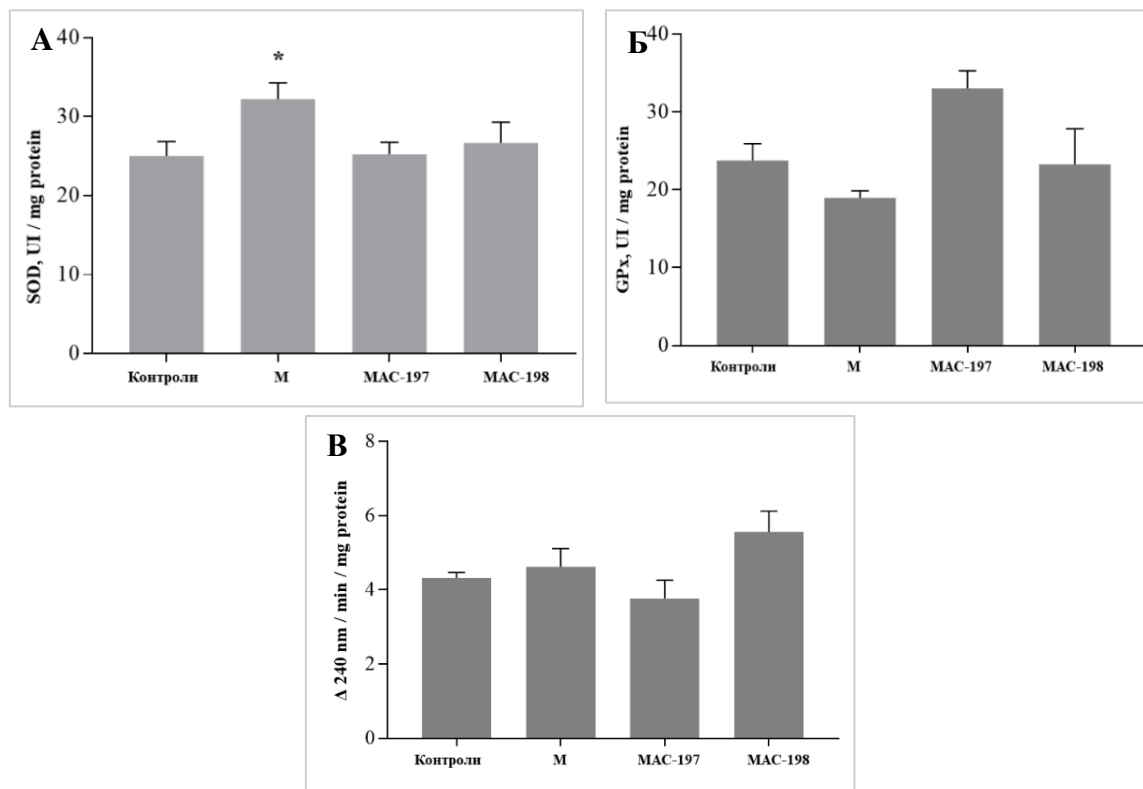
**Фигура 11. Ефекти на МАС-197 и МАС-198 върху нивата на MDA (А) и tGSH (Б) в мозъчната кора при плъхове**

Вижда се, че в сравнение с контролната група, монотерпенът повишава нивата на MDA, основен продукт на LPO, с 31,5%, докато при производните му повлияването е по-слабо проявено, съответно при МАС-197 – с 27,47% и при МАС-198 – с 18,6% (Фиг. 11 А). Установеното понижено съдържание на tGSH – с 12,8%, макар и без статистическа значимост, потвърждава про-оксидантния потенциал на миртенал при интактни гризачи. Неговите съединения с аминокиселини демонстрират сходни



ефекти. MAC-197 понижава недостоверно нивото с 12,4%, а MAC-198 повишава стойността му с 2,2% (Фиг. 11 Б).

В следващия етап от проучването са изследвани ефектите на субстанциите върху активността на ендогенните антиоксидантни ензими супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза и каталаза в мозъчната кора на плъховете. Получените резултати са илюстрирани на Фигура 12 А, Б и В.



**Фигура 12.** Ефекти на MAC-197 и MAC-198 върху активността на ензимите SOD (А), GPx (Б) и CAT (В) в мозъчната кора при плъхове; \*  $P < 0,05$  спрямо контролната група

Супероксиддисмутазата (SOD) катализира инактивирането на свободните радикали. Ензимът трансформира супероксидният радикал ( $O_2^-$ ) във водороден пероксид ( $H_2O_2$ ), който по-нататък формира редица други реактивни кислород-съдържащи радикали, като например хидроксилен радикал ( $\cdot OH$ ) и хидроксилни аниони ( $OH^-$ ) при реакцията на Fenton ( $Fe^{2+}$  – медирано разлагане на  $H_2O_2$ ) (Zogov et al., 2014). Миртенал повишава статистически достоверно ензимната активност с 29,1% ( $P < 0,05$ ) (Фиг. 12 А), без да влияе върху другите ферменти. Производните му не повлияват показателя, като запазват стойностите му близки до тези на контролите.

Глутатион пероксидазата (GPx) е основен антиоксидантен ензим в мозъчната тъкан и затова модулирането на активността ѝ се счита като възможност за противодействие на невронално увреждане вследствие на оксидативен стрес (Power and Blumbergs, 2009). Известно е, че GPx се инактивира от своите субстрати, поради което се очаква при наличие на оксидативен стрес, активността на ензима да е понижена (Cho et al., 2010). Сабит (2021) публикува експериментални данни, които показват, че

приложението на антиоксиданти при модел на невродегенерация повишава активността на GPx.

При нашите опити е установено, че MAC-197 повишава GPx активност (характерно за антиоксидантите) с 39% в сравнение с контролите, макар и статистически недостоверно, а понижението на показателя с 20% при третираните с референта плъховете корелира с про-оксидантния му потенциал, демонстриран при определяне нивата на MDA и tGSH (Фиг. 12 Б). Тези резултати са в подкрепа на твърдението, че подобно на миртенал, синтетичните му конюгати с адамантан притежават свойства, модулиращи активността на ендогенните антиоксидантни ензими.

Каталазата (CAT) от своя страна е отговорна за деактивирането на водородния пероксид до вода и кислород. Според Gandhi and Abramov (2012) ензимът има основна роля при високи нива на H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. И тук миртенал и неговите производни не проявяват изразени модулиращи свойства по отношение на ензимната активност, като монотерпенът и MAC-198 я повишават, съответно с 6,8% и 28,7%, но без статистическа значимост, докато MAC-197 понижава недостоверно показателя – с 13,1% (Фиг. 12 В).

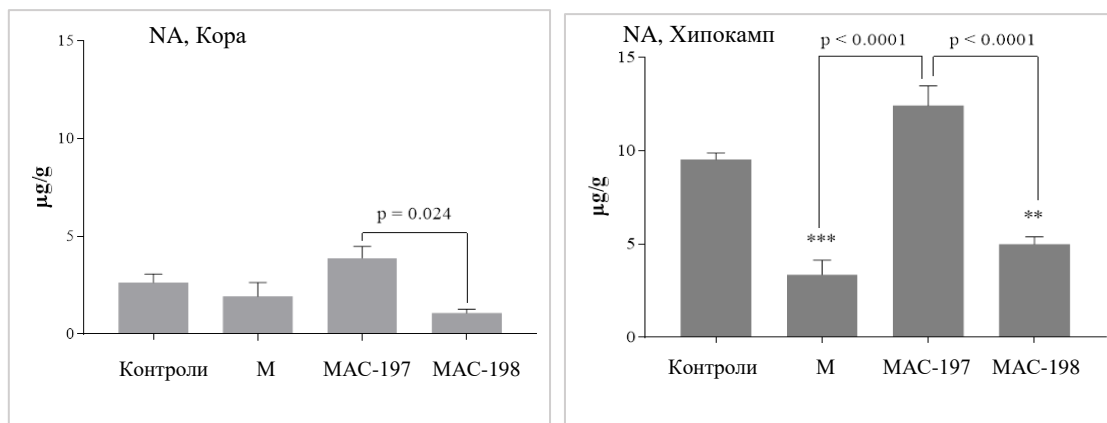
Резултатите позволяват да се направи извода, че при интактни плъхове миртенал, както и конюгатите му с аминоксамантан, не демонстрират забележими антиоксидантни свойства. Миртенал притежава известни про-оксидантни ефекти, които обаче не са проявени при неговите аналози MAC-197 и MAC-198, което разкрива техния по-добър профил на безопасност.

#### **4.6. Влияние на миртеналовите конюгати върху съдържанието на моноамини в мозъчни структури, свързани с паметта**

Независимо от това, че активността на мозъчната ацетилхолинестераза оказва директно влияние върху нивата на ацетилхолина, има и други други невротрансмитери, отговорни за състоянието на когнитивните способности. Съдържанието на глутатионпероксидаза и на серотонин е от значение за степента на проява, както на когнитивните, така и на некогнитивните симптоми при деменция, като депресия, тревожност, възбуда, нарушения на храненето и съня, и агресия (Selles et al., 2018). Когнитивните и некогнитивните симптоми на болестта на Алцхаймер са свързани с модулирани нива на биогенни амини в мозъка на пациентите. На основание ролята на нивата на норадреналин в когнитивната дисфункция и прогресирането на невродегенеративни процеси, Gutierrez et al. (2022) предлагат невротрансмитера като потенциална терапевтична цел. Според Meltzer et al. (1998) серотонинът също е водещ медиатор не само за появата на депресия, но заедно с ацетилхолина има определена роля в зараждането на когнитивните проблеми. А Garcia-Alloza et al. (2005) смятат, че дисбаланса между холинергичната и серотонинергичната невротрансмисия допринася за когнитивно увреждане.

#### 4.6.1. Съдържание на норадреналин

Промените в съдържанието на норадреналин в мозъчната кора и хипокампа на плъховете след многократното приложение на проучваните миртеналови конюгати са показани графично на Фигура 13 А и Б.



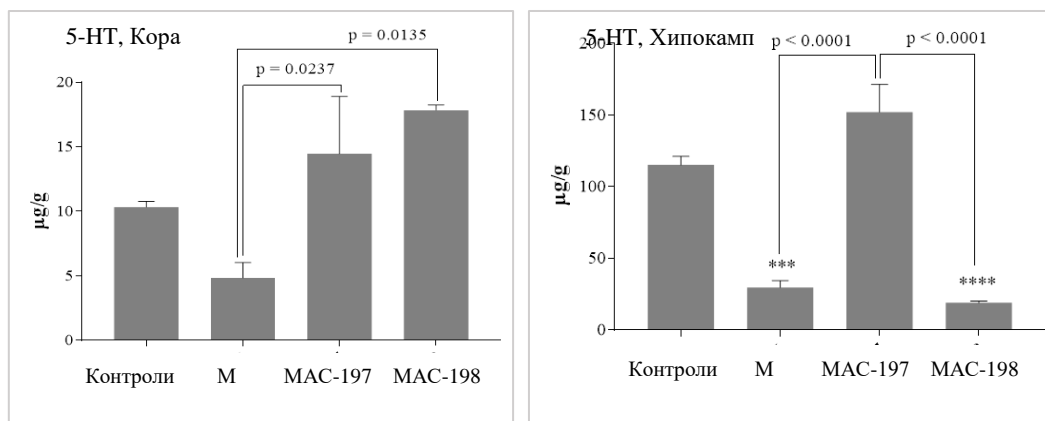
**Фигура 13. Ефекти на MAC-197 и MAC-198 върху съдържанието на NA в кората (А) и хипокампа (Б) на плъхове след 11-дневно приложение; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  спрямо контролната група**

В сравнение с контролната група миртенал и MAC-198 понижават нивото на медиатора в мозъчната кора на плъховете, съответно с 26,8 и 59,6 процента (Фиг. 13 А), докато MAC-197 го повишава с 47,5% и при това със стойност три пъти по-висока от тази при MAC-198 ( $P < 0,05$ ).

В хипокампа миртенал също понижават (с 64,9%) нивото на NA в сравнение с контролните гризачи с висока статистическа значимост на резултатите ( $P < 0,001$ ) (Фиг. 13 Б). Влиянието на миртеналовите конюгати върху съдържанието на медиатора запазва тенденциите, регистрирани в мозъчната кора. MAC-197 статистически достоверно повишава съдържанието на NA с 30,2% ( $P < 0,05$ ) спрямо контролите, докато MAC-198 го понижават с 47,7% ( $P < 0,01$ ). Разликата между предизвикания от MAC-197 и MAC-198 ефект, е с ниво на значимост  $P < 0,0001$ .

#### 4.6.2. Съдържание на серотонин

Регистрираните промени в съдържанието на серотонин в мозъчната кора и хипокампа на плъховете след многократното приложение на миртеналовите конюгати са показани на Фигура 14 А и Б.



**Фигура 14. Ефекти на MAC-197 и MAC-198 върху съдържанието на 5-НТ в кората (А) и хипокампа (Б) на плъхове след 11-дневно приложение; \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$  спрямо контролната група**

В кората миртенал понижава не само нивото на NA, но и това на 5-НТ – с 53,2% спрямо контролните животни (Фиг. 14 А). Ефектът от третирането на опитните плъхове с производните на монотерпена е с обратен знак. MAC-197 повишава съдържанието на 5-НТ 3 пъти в сравнение с референтната група ( $P = 0,0237$ ) и с 30,2% в сравнение с контролите. Другият конюгат MAC-198 повишава нивото на медиатора дори в по-голяма степен от MAC-197 – стойностите са четирикратно по-високи от тези при гризачите от миртеналовата група ( $P = 0,0015$ ) и със 72,7% в сравнение с контролната ( $P < 0,05$ ).

И в хипокампа миртенал понижава съдържанието на 5-НТ с ниво на значимост  $P < 0,001$  в сравнение с контролите (Фиг. 14 Б). Тук също влиянието на производните върху нивото на медиатора е в обратна посока. Както и в кората, MAC-197 повишава стойностите на 5-НТ с 31,9% в сравнение с тези на контролните животни ( $P = n.s.$ ). Неочаквано, третирането с MAC-198 предизвика редукция на показателя с 83,1% в сравнение с контролната група ( $P < 0,0001$ ), като разликата в съдържанието на 5-НТ спрямо това при MAC-197 групата е с ниво на достоверност  $P < 0,0001$ .

Резултатите показват, че и двете синтезирани субстанции предизвикват специфични промени в нивата на биогенните амини, както в мозъчната кора, така и в хипокампа. Интерес представляват установените напълно противоположни ефекти на двата миртеналови конюгата – докато MAC-198 понижава съдържанието на норадреналин и серотонин в мозъчните структури, MAC-197 значително ги повишава.

Опитът да бъдат сравнени установените ефекти на двете съединения с тези на миртенал в качеството му на референт, предоставя ценна информация за широкия спектър на терапевтичния потенциал на двата нови миртеналови конюгата, който следва да бъде обект на допълнителни проучвания. Естественият монотерпен проявява хипомнезични способности, установени и в предишни наши изследвания, което свързваме с неговия анксиолитичен потенциал (Драгоманова, 2020). Обратно, аминоксамантановите конюгати не влияят негативно върху паметовите процеси на опитните плъхове. Тези резултати са потвърдени от антихолинестеразните свойства на двете новосинтезирани съединения, за разлика от миртенал, който не проявява

способност да потиска активността на ензима АСhЕ в мозъка. Що се отнася до влиянието върху нивата на биогенните амини, миртенал понижава съдържанието на NA и 5-НТ, докато при производните му се наблюдават различни, при това напълно противоположни ефекти. МАС-198 проявява подобни на монотерпена свойства, демонстрирани чрез намаляване нивата на NA и 5-НТ, а МАС-197 значително ги повишава. В допълнение към невропротекцията, включваща антихолинестеразни и невромодулаторни механизми на действие, притежаваните от МАС-197 способности, му позволяват да повлияе депресивните симптоми при невродегенеративни процеси.

В заключение, проведените изследвания за първи път разкриват потенциала на двата новосинтезирани миртенал-адамантанови конюгата за подобряване на паметта, което е свързано с техните АСhЕ-инхибиращи ефекти и невромодулиращата активност в мозъчната кора и хипокампа на опитните плъхове. Установените от нас поведенчески и биохимични ефекти на двете съединения са по-силно изразени от тези на природния миртенал. Получените оригинални данни дават основание за по-нататъшно изследване на тези нови перспективни вещества върху експериментални модели на деменция.

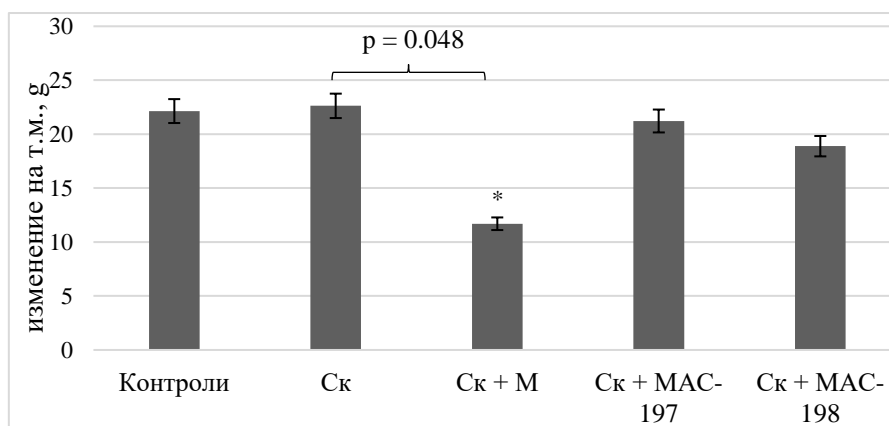
## **5. Експерименти с плъхове с индуцирана деменция**

Скополамин е мускаринов антагонист, който се използва широко като стандарт за инициране на експериментална деменция при опитни животни (Lagalwar et al., 1999; Lott, 2012; Qin et al., 2015; More et al., 2016). Токсичният агент повлиява негативно краткосрочната памет, създаването на паметовите следи, ученето, паметта за визуално разпознаване, визуално-пространствената памет, визуооперцептивната функция, отговорът на вербален стимул и скоростта на психомоториката (Flicker et al., 1990; Hasselmo and Wyble, 1997; More et al., 2016). Интраперитонеалното въвеждане на скополамин предизвиква дисрегулация на холинергичната система на мозъка със съответните последствия: повишена активност на АСhЕ, оксидативен стрес и понижени нива на АСh (Tang, 2019; Dragomanova et al., 2022; Tancheva et al., 2022). На поведенческо ниво тези биохимични промени се проявяват като изразен когнитивен дефицит при опитните животни, потвърдено от нашите изследвания.

В избория от нас модел опитните плъхове са третирани със скополамин интраперитонеално в доза 1 mg/kg в продължение на 11 дни. Едновременно с това за целите на проучването по същия начин са приложени референта миртенал в доза 40 mg/kg и неговите деривати МАС-197 и МАС-198 в доза 1 mg/kg.

### **5.1. Ефекти на миртеналовите конюгати върху телесната маса при плъхове със скополамин-индуцирана деменция**

Резултатите са представени на Фигура 15.



**Фигура 15. Изменение в телесните тегла при плъхове със скополамин-индуцирана деменция, след 11-дневно приложение на миртенал (40 mg/kg), MAC-197 (1 mg/kg) и MAC-198 (1 mg/kg); \*P < 0,05 спрямо контролната група**

Вижда се, че скополамин в качеството му на токсичен агент не повлиява изменението в телесните тегла (нормалното наддаване), в сравнение контролната група, докато миртенал намалява достоверно показателя, както спрямо дементните животни, така и спрямо контролните ( $P < 0,05$ ). Подобни ефекти са наблюдавани и в предишни изследвания на Драгоманова (2020), проведени при плъхове с експериментална деменция, третирани с миртенал в същата ефективна доза 40 mg/kg. Природният монотерпен повтаря ефектите, установени при интактните плъхове, където изменението в телесната маса е по-малко в сравнение с контролните гризачи – с 14,1%, но без статистическа достоверност, което обясняваме с характерното за етеричните масла потискане на апетита при опитните животни. Както и при интактните плъхове, двете съединения на миртенал (MAC-197 и MAC-198) не демонстрират свойството да повлияват изменението на телесното тегло, което се наблюдава при референта.

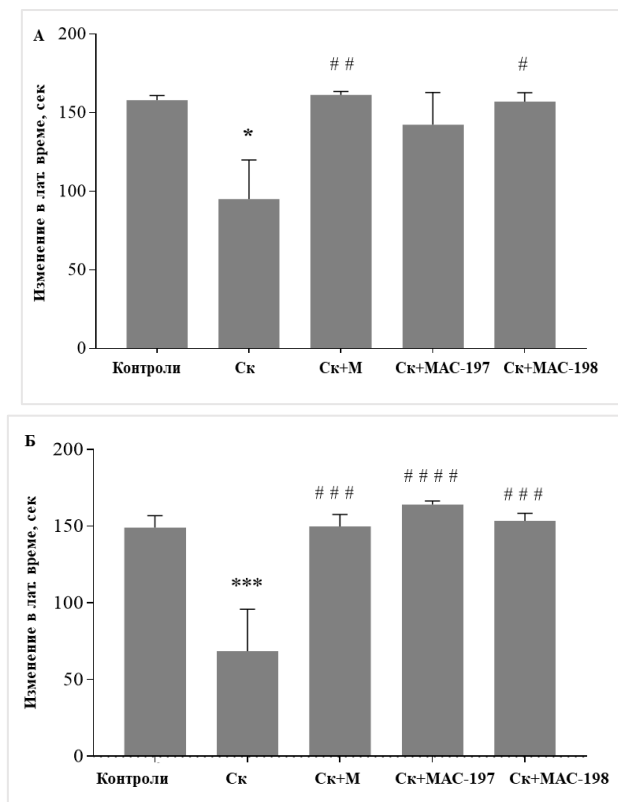
## **5.2. Ефекти на миртеналовите конюгати върху паметовите процеси при плъхове със скополамин-индуцирана деменция**

Добре известно е, че първите клинични симптоми при пациенти с AD са свързани с паметови дефицити (Braak and Braak, 1994). Ефектите на синтетичните миртеналови конюгати върху краткосрочната и дългосрочната памет при плъховете, в сравнение с тези на природния миртенал, са оценени чрез теста за пасивно избягване (*Passive avoidance test*). Целта е да се предизвика страхово изживяване, като разликата в латентното време за реакция на гризача спрямо това при началното обучение, се приема като индикатор за състоянието на паметта.

### **5.2.1. Поведенчески изследвания (*Passive avoidance test*)**

Влиянието на двете вещества върху краткосрочната памет (1 h след еднократното приложение) и дългосрочната памет (11-дневно третиране) е проследено чрез

изчисляване на изменението в латентното време. Резултатите са представени на Фигура 16.



**Фигура 16. Ефекти на миртеналовите конюгати върху краткосрочната (А) и дългосрочната (Б) памет при плъхове със скополамин-индуцирана деменция – отчитане изменението в латентното време; \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$  спрямо контролната група; #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$ , ####  $P < 0,0001$  спрямо скополаминовата група**

Очаквано скополамин предизвиква значително увреждане, както в краткосрочната, така и в дългосрочната памет. При острото третиране, в сравнение с контролната група, токсичният агент намалява изменението на латентното време с 39,9% ( $P < 0,05$ ) (Фиг. 16 А), а след многократното приложение – с 54% ( $P < 0,001$ ) (Фиг. 16 Б).

Миртенал възстановява паметта на плъховете до нива, близки с тези на контролите. В сравнение с животните от скополаминовата група, стойностите на показателя са повишени с 69,7% ( $P < 0,01$ ) след острото приложение (Фиг. 16 А) и с 118,4% ( $P < 0,001$ ) на 12-ия ден след многократното третиране (Фиг. 16 Б). Резултатите потвърждават данните от предишни наши изследвания (Dragomanova et al., 2022).

При групата плъхове със скополамин-индуцирана деменция проучваните от нас конюгати предизвикват подобни на миртенал ефекти. МАС-197 показва по-добър ефект върху увредената от Ск дългосрочна памет – увеличението на индикатора е със 139,3% при значима статистическа достоверност ( $P < 0,0001$ ) (Фиг. 16 Б), докато МАС-198 възстановява и двата вида памет. Изменението в латентното време при краткосрочната

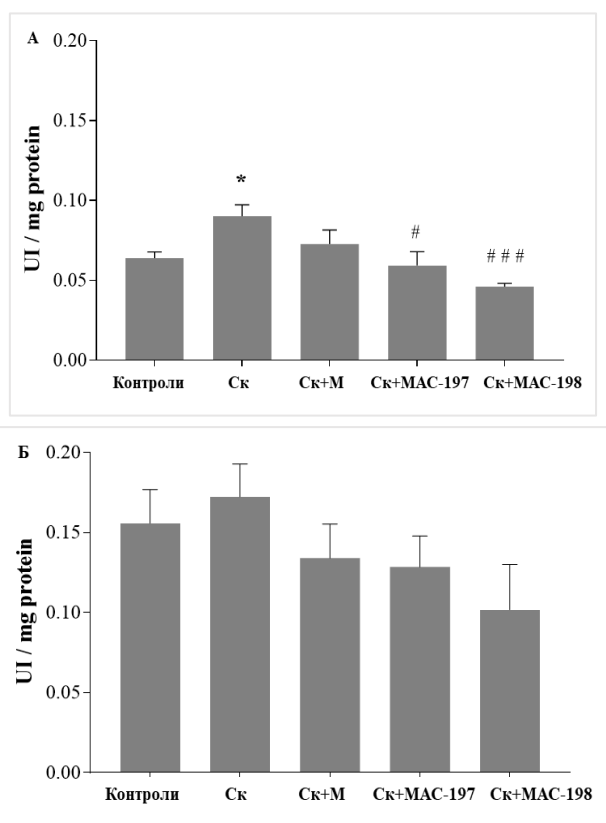
е увеличено с 65,3% ( $P < 0,05$ ) (Фиг. 16 А) и с 123,8% при дългосрочната памет ( $P < 0,001$ ) (Фиг. 16 Б).

В заключение, миртенал и МАС-198 противодействат на вредния ефект на скополамин, както върху краткосрочната, така и върху дългосрочната памет на дементните гризачи. В сравнение с тях, МАС-197 индуцира по-слабо проявен положителен ефект върху паметта при плъховете след еднократното третиране и отчетливо по-силно изразен при многократно приложение, поведение, което според нас представлява интерес.

### 5.2.2. Активност на мозъчната АСhЕ (*in vivo*)

Нормалното функциониране на централната холинергична трансмисия е от съществено значение за регулацията на паметта и настроението (Kolar, 2021). AD се характеризира с холинергична дисфункция, проявяваща се с повишена активност на АСhЕ и намалено съдържание на АСh в мозъка (Drinenberg, 2000).

Докинг моделирането показва, че АСhЕ е потенциален таргет за аминокрептановите конюгати на миртенал. Активността на ензима, както и при интактните плъхове, е определена в две мозъчни структури, свързани с паметовите процеси – кора и хипокамп. Резултатите са представени на Фигура 17.



Фигура 17. Ефекти на МАС-197 и МАС-198 върху активността на АСhЕ в мозъчната кора (А) и хипокампа (Б) на плъхове със скополамин-индуцирана деменция; \*  $P < 0,05$  спрямо контролната група; #  $P < 0,05$ , ###  $P < 0,001$  спрямо скополаминовата група



В сравнение с контролната група плъхове, скополамин предизвиква повишаване на активността на АСhЕ в кората с 41% ( $P < 0,05$ ) (Фиг. 17 А) и в хипокампа – с 10,6% ( $P = n.s.$ ) (Фиг. 17 Б).

В мозъчната кора и двете миртеналови производни демонстрират значима антихолинестеразна активност (Фиг. 17 А) в сравнение с природния монотерпен, който не повлиява значително показателя. Ензимната активност е понижена с 34,2% ( $P < 0,05$ ) от МАС-197 и с 48,7% ( $P < 0,001$ ) от МАС-198 в сравнение с групата животни, третирани със скополамин.

В хипокампа, както миртенал, така и МАС-197 не показват отчетлива тенденция в посока инхибиране на ацетилхолинестеразната активност. Най-изразеното понижение от 41% е предизвикано от МАС-198 ( $P < 0,05$  спрямо скополаминовата група) (Фиг. 17 Б).

В заключение, за разлика от миртенал, и двата адамантанови конюгата демонстрират АСhЕ-инхибиторни свойства, който е по-отчетливо изразен при МАС-198. Този ефект се наблюдава, както в кората, така и в хипокампа и се подкрепя от резултатите от молекулярното моделиране, показващи по-силен афинитет на производните към активния център на ензима в сравнение с монотерпена.

### **5.3. Ефекти на миртеналовите конюгати върху мозъчния оксидативен статус при плъхове със скополамин-индуцирана деменция**

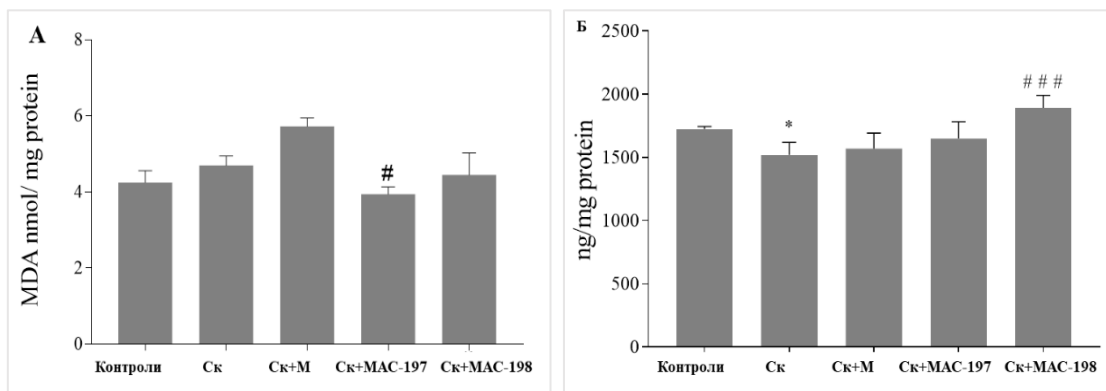
Повишените стойности на параметрите, оценяващи мозъчния оксидативен статус на пациенти с Алцхаймеров тип деменция са добре документирани от редица изследователи (Markesbery, 1997; Markesbery and Carney, 1999; Markesbery, 1999; Pratico and Delanty, 2000; Floyd and Hensley, 2002) и това е една от най-популярните хипотези за патогенезата на невродегенеративното заболяване (Kamat et al., 2016).

Немалък брой проучвания показват, че оксидативният стрес е свързан с дисфункция на паметта в индуцирания от скополамин животински модел на деменция (Giridharan et al., 2011; Nade et al., 2011; Budzynska et al., 2014; Zhao et al., 2016). Увреждането се характеризира със значимо намаляване на съдържанието на GSH, повишена САТ активност, повишено съдържание на MDA, основен продукт на липидната перосидация и тенденция за понижаване активността на GPx. Миртенал, подобно на повечето естествени терпеноиди, проявява антиоксидантна активност, която е установена в модел на хепатоцелуларен карцином на плъх (Babu et al., 2012). Следва да се отбележи, че в наши предишни изследвания миртенал демонстрира засилени невропротективни ефекти в мозъчната кора при плъхове със скополаминов модел на невродегенерация (Dragomanova et al., 2022).

Проучването на антиоксидантните свойства на новосинтезираните вещества е извършено в мозъчната кора, където свойствата им да повлияват ацетилхолинестеразната активност са по-изразени.

#### **5.3.1. Нива на малоновия диалдехид и на глутатиона**

Резултатите са представени на Фигура 18.



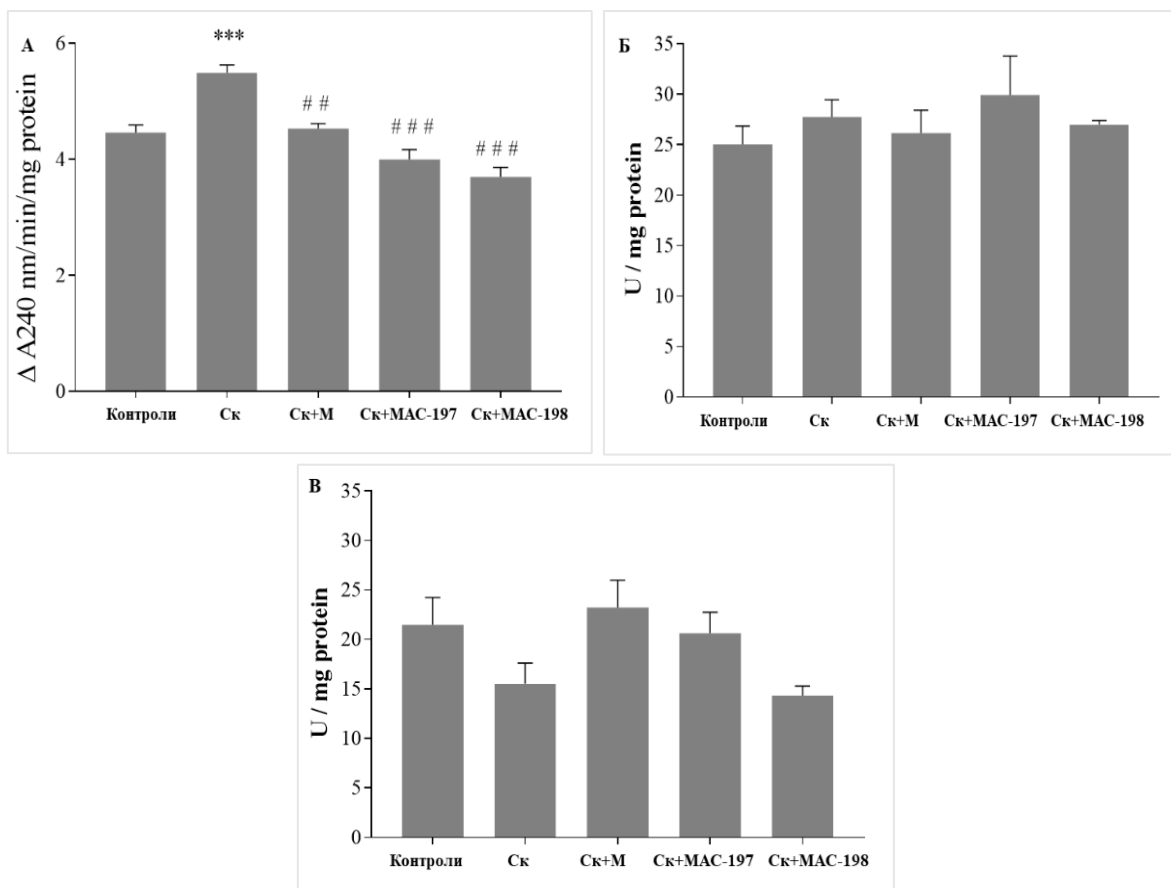
**Фигура 18. Ефекти на MAC-197 и MAC-198 върху нивата на MDA (А) и на GSH (Б) в мозъчната кора на плъхове със скополамин-индуцирана деменция; \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  спрямо контролната група; #  $P < 0,05$ , ###  $P < 0,001$  спрямо скополаминовата група**

При дементните плъхове увреждащото действие на скополамин се проявява с повишаване нивата на MDA с 10,6% ( $P = n.s.$ ) (Фиг. 18 А) и със значимо понижаване съдържанието на GSH с 11,9% ( $P < 0,05$ ) спрямо контролите (Фиг. 18 Б). Природният монотерпен не проявява антиоксидантни ефекти в мозъчната кора на дементните плъхове при отчитане на влиянието му върху двата параметъра, свидетелстващи за наличие на оксидативен стрес. Последното корелира с данните на Драгоманова от 2020 година, които показват, че антиоксидантните свойства на миртенал са по-силно проявени в мозъка при мишки, отколкото при плъхове.

И двете съединения на миртенал с аминоксамантан показват антиоксидантен капацитет, като отчетливо променят нивата на изследваните параметри, оценяващи оксидативния статус, сравнени с тези при плъховете от скополаминовата група. MAC-197 понижава достоверно нивото на продуктите на липидна пероксидация с 16,1% ( $P < 0,05$ ) (Фиг. 18 А), а MAC-198 повишава статистически значимо съдържанието на GSH – с 24,6% ( $P < 0,001$ ) (Фиг. 18 Б). В сравнение с природния референт и двете тествани вещества показват по-добри антиоксидантни свойства в мозъчната кора на плъховете с индуцирана деменция.

### 5.3.2. Активност на ендогенни антиоксидантни ензими

Изследването на антиоксидантния потенциал на двата конюгата в мозъчната кора на опитните плъхове и сравняването му с този на миртенал, е разширено с проучване на ефектите им и върху активността на антиоксидантните ензими (Фигура 19).



**Фигура 19. Ефекти на МАС-197 и МАС-198 върху активността на САТ (А), SOD (Б) и GPx (В) в мозъчната кора при плъхове със скополамин-индуцирана деменция; \*\*\*  $P < 0,001$  спрямо контролната група; ##  $P < 0,01$ ; ###  $P < 0,01$  спрямо скополаминовата група**

Предизвиканият от скополамин оксидативен стрес се потвърждава от значимо повишената активност на каталазата в мозъчната кора при третираните плъхове – с 23,1% в сравнение с контролните ( $P < 0,001$ ) (Фиг. 19 А). Вижда се, че глутатион пероксидазната активност, която при наличието на оксидативен стрес е понижена, също е инхибирана (с 27,7%) спрямо контролите ( $P = n.s.$ ) (Фиг. 19 В). По отношение на супероксид дисмутазата не се наблюдават модулиращи свойства, както на токсичния агент, така и на другите субстанции (Фиг. 19 Б).

Миртенал значимо понижава активността на стимулираната от скополамин САТ (със 17,5%) до стойности, близки с тези на контролите ( $P < 0,01$ ), което се дължи на специфичните му антиоксидантни свойства (Фиг. 19 А). Спрямо GPx активност монотерпенът също антагонизира увреждащото действие на скополамин като възстановява показателя до стойности, близки до тези на здравите плъхове и едновременно с това повишава активността с 49,5% спрямо скополаминовата група (Фиг. 19 В). Не са установени ефекти върху супероксид дисмутазата (Фиг. 19 Б).

Миртеналовите производни проявяват свойства, сходни с неговите по отношение повлияване активността на антиоксидантните ензими. МАС-197 и МАС-198 потискат активирания от скополамин каталаза, съответно с 27,2% и с 32,6%, възстановявайки я

до стойности, близки до тези на контролната група плъхове ( $P < 0,001$ ) (Фиг. 19 А). Конюгатите не оказват влияние върху активността на SOD в мозъчната кора на плъховете (Фиг. 19 Б) и по-слабо модулират GPx активност в сравнение с изходния продукт (Фиг. 19 В).

Наличната информация за терапевтичния потенциал на миртенал, свързан със специфичните му антиоксидантни свойства, при модели на канцерогенеза и захарен диабет са обобщени в дисертационния труд на Драгоманова (2020). На база на получените данни, както и на резултатите от други наши изследвания, за първи път е обсъдена възможността монотерпенът да повлиява положително невродегенеративните процеси, като антиоксидантните свойства са един от компонентите на комплексното му невропротективно действие, установено в мозъка на гризачи с експериментална деменция (Драгоманова, 2020; Dragomanova et al., 2022).

В условията на този експеримент специфичната антиоксидантна активност на миртенал при третираниите със скополамин плъхове се изразява в значимо намаляване на повишената от токсичния агент САТ активност, доближаващо се до контролното ниво ( $P < 0,01$ ) и възстановяване активността на GPx до стойности, близки до тези на контролите, макар и без статистическа достоверност. И двете съединения демонстрират антиоксидантен капацитет. Спрямо скополаминовата група плъхове MAC-197 значимо намалява съдържанието на MDA с 16,1%, а най-изразен е ефектът на MAC-198 върху повишаване нивото на GSH – с 24,6% ( $P < 0,001$ ).

Резултатите от настоящото проучване показват, че новосинтезираните миртеналови конюгати MAC-197 и MAC-198 притежават сходни, при това по-ясно проявени антиоксидантни свойства от тези на природния референт.

#### **5.4. Ефекти на миртеналовите конюгати върху нивата на базови мозъчни невротрансмитери при плъхове със скополамин-индуцирана деменция**

При болестта на Алцхаймер се наблюдават изменения в норадренергичната система. Braak and Del Tredici (2012) установяват, че патологичните промени на норадренергичните неврони в *locus coeruleus*, включително натрупването на  $\tau$ -протеин започват рано в хода на заболяването, а според Gannon et al. (2015) по-късно се наблюдава засилена загуба на норадренергичните неврони, заедно с компенсаторни промени като модификации в невроналната структура, невротрансмитера и норадренергичните рецептори. Загубата на норадренергична инервация, което значително изостря патогенезата и прогресията на патологичния процес е потвърдена с данни от клинични и предклинични изследвания (Marien et al., 2004; Heneka et al., 2006; Grudzien et al., 2007; Kalinin et al., 2007; Pugh et al., 2007). Като се имат предвид добре установените функции на норадренергичната система в познавателната способност, невровъзпалението и метаболизма (Chamberlain and Robbins, 2013), може да се предвиди, че такава дисфункция ще насърчи прогресирането на AD.

Нивата на серотонин са от съществено значение не само за появата на различни форми на депресия, но и за поведенчески промени при AD. Неговата роля заедно с ацетилхолин за когнитивни проблеми при невродегенеративните процеси също е изяснена (Meltzer et al., 1998). Дисбалансът между холинергичната и

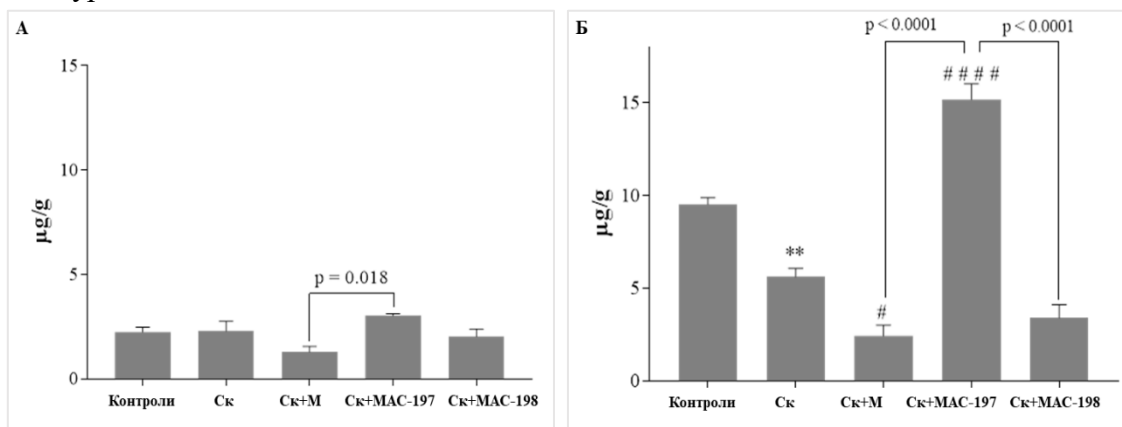
серотонинергичната невротрансмитерни системи допринася за когнитивното увреждане при болестта на Алцхаймер (Garcia-Alloza et al., 2005). Заболяването се свързва със загуба на серотонинергични неврони и намаляване на нивата на 5-хидрокситриптамин, което е усъществено в мозъци на пациенти *post mortem* (Kovacs et al., 2003; Mesulam, 2004).

Във връзка с това в настоящата работа е направен опит да се проучат ефектите на миртеналовите конюгати върху нивата на базови мозъчни невротрансмитери при плъхове със скополамин-индуцирана деменция.

#### 5.4.1. Съдържание на норадреналин

Норадреналинът от клетките на *locus ceruleus*, в допълнение към ролята си на невротрансмитер, потиска мозъчната невроинфламация. Така той действа като ендогенно противовъзпалително средство в микросредата около невроните, глиалните клетки и кръвоносните съдове в неокортекса и хипокампа (Heneka et al., 2010). Експериментално индуцираната дегенерация на *locus ceruleus* повишава експресията на възпалителни медиатори при APP-трансгенни мишки и води до повишено отлагане на А $\beta$ . До 70% от клетките, синтезиращи NA, се губят при болестта на Алцхаймер. Доказано е, че медиаторът стимулира микроглията при опитни мишки, потискайки А $\beta$ -индуцираното производство на цитокини и хемокини, което води до засилена фагоцитоза на А $\beta$  отлагания.

Влиянието на миртеналовите конюгати върху съдържанието на норадреналин в кората и хипокампа на плъховете след многократното приложение е показано графично на Фигура 20 А и Б.



**Фигура 20. Ефекти на МАС-197 и МАС-198 върху съдържанието на NA в кората (А) и хипокампа (Б) на плъхове със скополамин-индуцирана деменция след 11-дневно приложение; \*\*  $P < 0,01$  спрямо контролната група; #  $P < 0,05$ , ###  $P < 0,0001$  спрямо скополаминовата група**

На Фигура 20 А се вижда, че скополамин не повлиява кортикалното съдържание на NA, но индуцира значително намаляване на нивото на медиатора в хипокампа с 41% ( $P < 0,01$ ) (Фиг. 20 Б).

В кората на плъховете, третирани с миртенал, съдържанието на NA е намалено с 44% в сравнение с нивата при скополаминовата група ( $P = n.s.$ ). Както е показано на графиката, МАС-197 повишава показателя със 134,8% спрямо миртеналовата групата ( $P = 0,018$ ) и с 35% в сравнение с контролната, докато при МАС-198 ефектът е по-слабо проявен, със стойност на показателя, близка до тази на контролните гризачи (Фиг. 20 А).

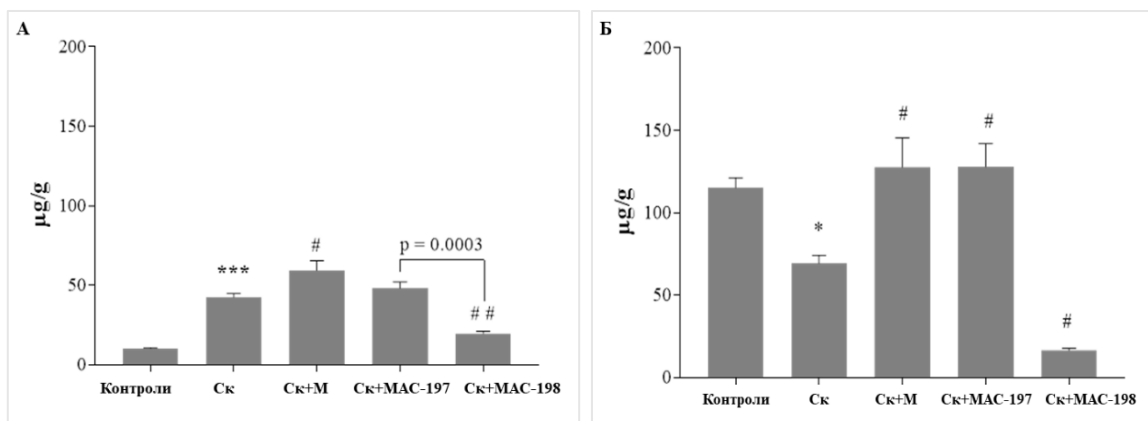
Установено е, че в хипокампа, както референта, така и МАС-198, предизвикват още по-отчетливо понижение в съдържанието на медиатора, което спрямо скополаминовата група достига 57% за миртенал ( $P < 0,05$ ) и 39,4% за МАС-198 ( $P = n.s.$ ) (Фиг. 20 Б). Противоположно на тях, МАС-197 повишава значимо съдържанието на NA – със 170% в сравнение с плъховете, третирани само със скополамин ( $P < 0,0001$ ) и с 59,4% в сравнение с контролните.

В настоящото проучване третирането на опитните плъхове със скополамин води до значимо намаляване съдържанието на NA в хипокампа ( $P < 0,01$ ), което е в съответствие с данните, публикувани от Garcia-Alloza et al. (2005) и Falsafi et al. (2012). Резултатите показват, че миртенал и МАС-198 не повлияват пониженото съдържание на NA, както в кората, така в хипокампа, докато МАС-197 повишава съдържанието на невротрансмитера в кората ( $P = n.s.$ ) и в хипокампа ( $P < 0,01$ ) спрямо гризачите със скополамин-индуцирана деменция, разкривайки неговия невропротективен и антидепресивен потенциал. Според нас тази разлика в ефектите на изследваните нови съединения вероятно се дължи на химичните структури на двете производни, тъй като миртеналовият радикал е свързан чрез аминок група с първа и втора позиция, съответно, в молекулата на адамантан.

Внимание привлича установеното разнопосочно действие на двете нови съединения по отношение съдържанието на норадреналин, особено проявено в хипокампа на плъховете със скополамин-индуцирана деменция. Според нас, това вероятно се дължи на различията в структурата на молекулите им. От двете изследвани производни на миртенал, МАС-197 повишава съдържанието на норадреналин в мозъчните структури на плъховете с експериментална деменция, което може да се тълкува като допълнителен механизъм на невропротективния му потенциал.

#### **5.4.2. Съдържание на серотонин**

Влиянието на проучваните миртеналови конюгати върху съдържанието на серотонин в кората и хипокампа на плъховете след многократното приложение е илюстрирано на Фигура 21 А и Б.



**Фигура 21. Ефекти на МАС-197 и МАС-198 върху съдържанието на 5-НТ в кората (А) и хипокампа (Б) на плъхове със скополамин-индуцирана деменция след 11-дневно приложение;**

**\*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$  спрямо контролната група; #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$  спрямо скополаминовата група**

Съдържанието на 5-НТ, измерено в хипокампа на контролната група плъхове, е 10 пъти по-високо, отколкото в кората. Третирането на гризачите със скополамин предизвиква статистически значимо трикратно увеличение на нивата на медиатора в кората ( $P < 0,001$ ) (Фиг. 21 А), докато в хипокампа индикаторът е понижен с 39,8% в сравнение с контролните животни ( $P < 0,05$ ) (Фиг. 21 Б).

Миртенал значително повишава съдържанието на 5-НТ в мозъчната кора в сравнение с това при скополаминовата група – с 62% ( $P < 0,05$ ) (Фиг. 21 А). Ефектът на МАС-197 върху нивата на 5-НТ, измерени в кортекса, се доближава до този при плъховете, третирани с комбинацията Ск + М, докато при МАС-198 се наблюдава обратния ефект – съдържанието на медиатора е понижено с 53,4% спрямо това при гризачите от скополаминовата група ( $P < 0,01$ ), със средна стойност, близка до тази на контролната група.

В хипокампа, както и в кората, миртенал и МАС-197 значително повишават нивата на серотонин ( $P < 0,05$ ) спрямо тези при плъховете от скополаминовата група, съответно с 83,8% и 84,4%, достигайки контролното ниво (Фиг. 21 Б). И при това изследване МАС-198 проявява противоположния ефект, демонстриран чрез статистически достоверно намаляване на съдържанието на 5-НТ – със 76,2% в сравнение с това при животните от скополаминовата група ( $P < 0,05$ ).

Резултатите от изследването показват, че третирането на плъховете със скополамин индуцира значимо увеличение на съдържанието на 5-НТ в кората ( $P < 0,001$ ) и намаляване в хипокампа ( $P < 0,05$ ), с контролни концентрации на медиатора, 10 пъти по-високи в хипокампа. Това корелира с данните от проучване на Bert et al. (2001), които установяват, че нивата на серотонин са различни в някои области на мозъка и зависят от възрастта на опитните плъхове. Всички тествани съединения променят нивата на 5-НТ в двете мозъчни структури, свързани с паметта – кората и хипокампа. МАС-198 намалява съдържанието му, а миртенал и МАС-197 го повишават. В поведението на миртенал и МАС-197 се наблюдава една особеност, която

предизвиква интерес – в кората и двете вещества потенцират ефекта на скополамин, а в хипокампа му противодействат. И в тези случаи противоположните ефекти на МАС-197 и МАС-198 най-вероятно се дължат на разликите в химичната структура на двете производни.

В заключение МАС-197, както и миртенал, стимулират серотониновата навротрансмисия, което насочва към потенциален невропротективен ефект при експериментален модел на деменция. Предклинични проучвания върху APP/PS1 (фамилна форма) трансгенни модели на мишки с агенти, модулиращи 5-НТ рецептори, показват невропротективни ефекти (Vakalopoulos, 2017). Публикуваната от автора теория за серотонинергична модулация на формиране на паметови следи чрез директно усилване на синаптичната сигнализация може да промени възгледа за ролята на тези мозъчни структури в патогенезата на AD и да доведе до въвеждането на ефективно лечение.

## **6. Сравняване на ефектите на миртеналовите производни**

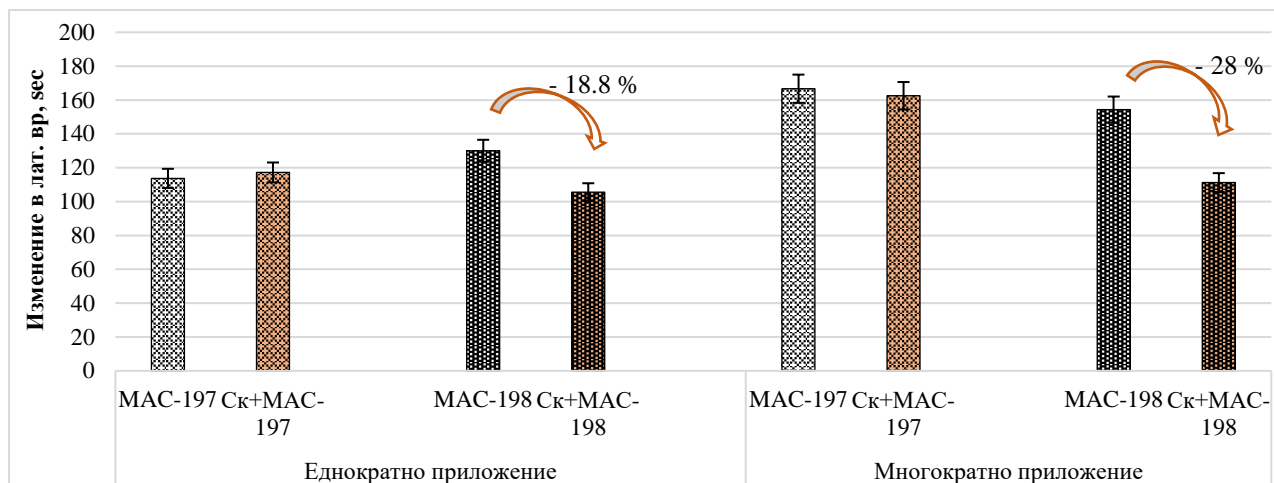
За изпълнение на поставената задача, са сравнени ефектите на миртеналовите производни върху основни поведенчески и биохимични показатели при здрави и при дементни експериментални гризачи. Направен е паралел между измененията при здравите животни, третирани с двете съединения, спрямо тези, третирани едновременно със скополамин и новите МАС.

### **6.1. Сравнителен анализ на резултатите при интактните и дементните плъхове след приложението на конюгатите на миртенал с аминоксамантан**

#### **6.1.1. Паметови способности**

Поведенческите изменения, наблюдавани при *Passive avoidance* теста, са представени на Фигура 22.

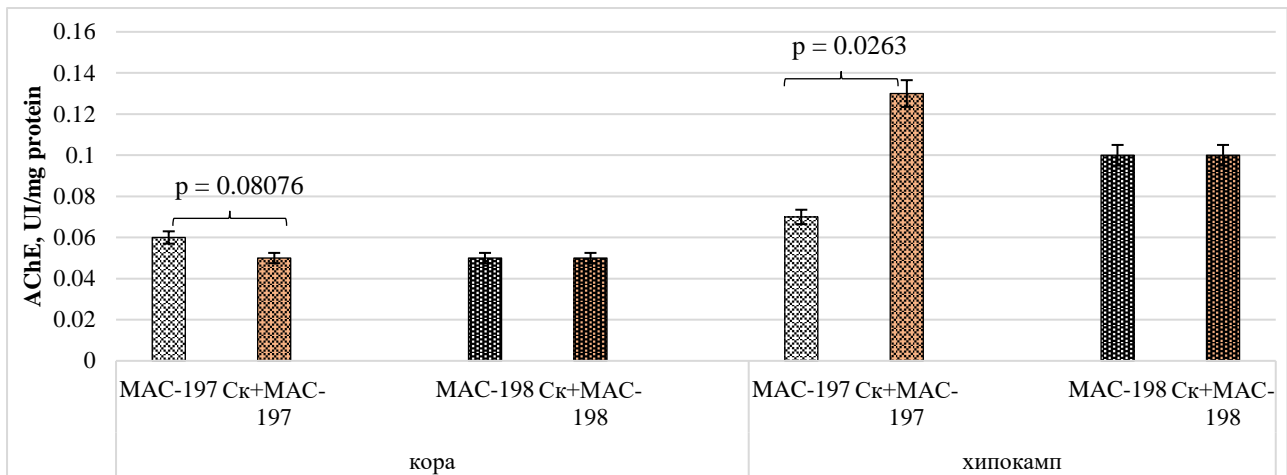




**Фигура 22. Ефекти върху паметовите процеси при интактни и дементни плъхове след еднократно и многократно (11-дневно) приложение на MAC-197 и MAC-198**

Проучването показва, че миртеналовите конюгати не увреждат краткосрочната и дългосрочната памет на интактните гризачи, за разлика от природния монотерпен, използван като референт. MAC-197 предизвиква близко по стойност изменение в латентното време при интактните и при дементните плъхове, както при еднократното, така и при многократното третиране, докато при MAC-198, се наблюдава по-слаб протективен ефект при *Passive avoidance* теста, като измереният показател при плъховете с индуцирано увреждане е понижен недостоверно спрямо интактните. При еднократното приложение MAC-198 предизвиква с 18,8% по-слабо проявено изменение в латентното време, а след 11-дневното показателят е с 28%, по-слабо изразен в сравнение с изменението при гризачите, които не са третирани със скополамин. Резултатите позволяват да се изкаже предположението, че протективните ефекти на MAC-197 не се влияят от токсичния агент, за разлика от ефектите на MAC-198, които са по-слабо проявени при плъховете със скополамин-индуцирана деменция.

Ацетилхолинестеразата е ключов ензим, регулиращ нивата на ацетилхолин, основен медиатор на паметта, поради което повишената ѝ активност води до ускорено разграждане на ACh. Влиянието на изследваните съединения върху активността на мозъчната AChE е илюстрирано на Фигура 23.



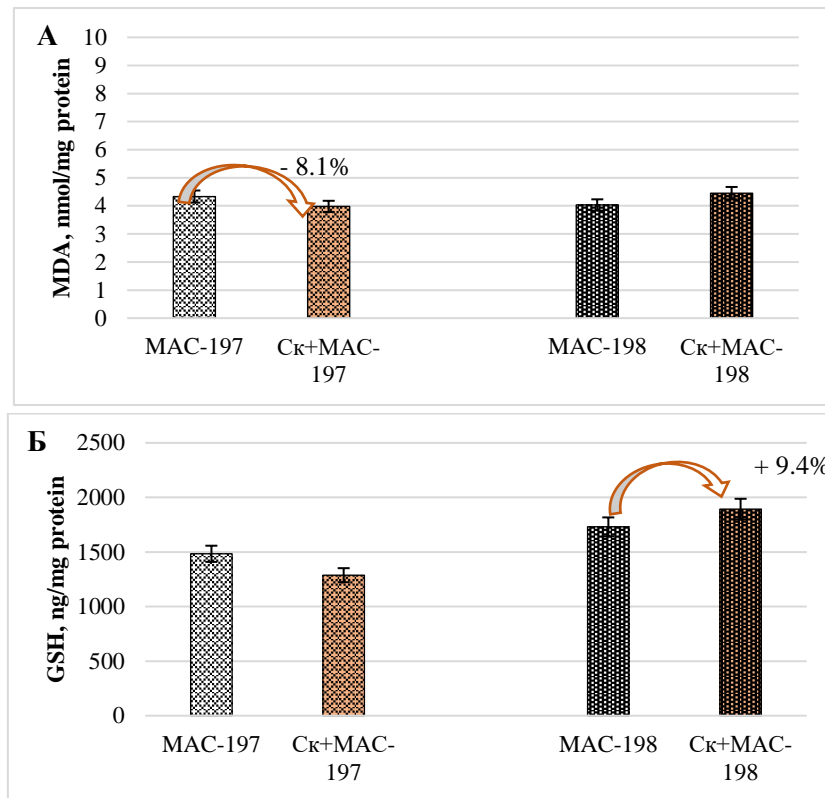
**Фигура 23. Активност на AChE в мозъчната кора и хипокампа на интактни и дементни плъхове след 11-дневно приложение на MAC-197 и MAC-198**

Двете съединения на миртенал имат различни ефекти върху активността на AChE. За разлика от MAC-197, чиито ефекти се повлияват от приложението на скополамин, MAC-198 не променя стойностите на показателя, както при интактните, така и при дементните плъхове и в двете изследвани мозъчни области. Резултатите показват, че в мозъчната кора на дементните гризачи MAC-197 понижава AChE активност със 17%, с гранична достоверност, спрямо интактните, докато в хипокампа предизвиква противоположни ефекти, проява на което е значимото повишение на ензимната активност – с 85% спрямо животните без увреждане ( $P = 0,0263$ ).

Очевидно е, че този дериват притежава свойства, подобни на изходния природен монотерпен, а именно отсъствие на значими антихолинестеразни ефекти при скополамин-индуциран модел на деменция (Драгоманова, 2020). Двете миртеналови съединения влияят върху активността на AChE по различен начин. Установено е, че MAC-198 проявява значими антихолинестеразни свойства при плъхове с химически индуцирана деменция (Раздел 5. от Гл. Резултати и обсъждане), а MAC-197 понижава достоверно ензимната активност при интактни плъхове (Раздел 4. от Гл. Резултати и обсъждане).

### 6.1.2. Мозъчен оксидативен статус

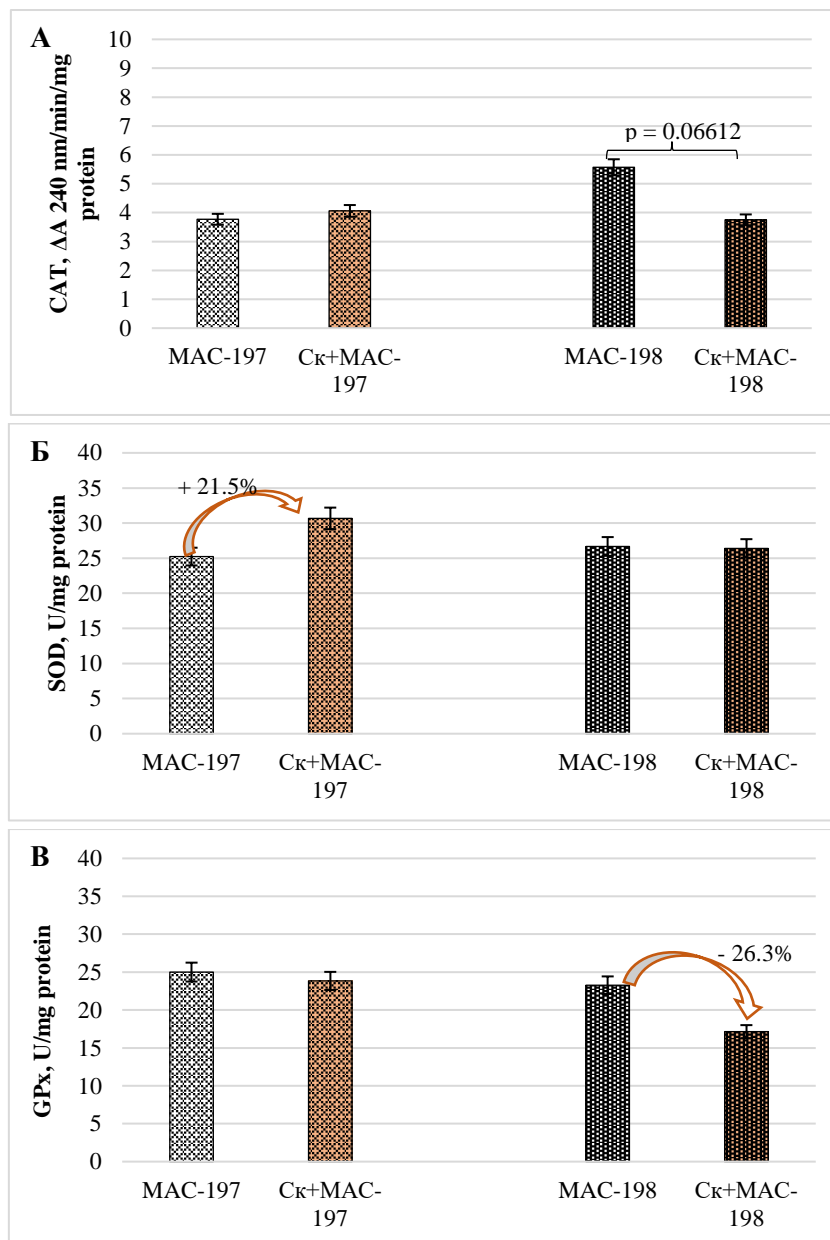
Проследени са измененията в основни показатели, характеризиращи оксидативния статус в мозъчната кора на опитните плъхове (Фигура 24 А и Б).



**Фигура 24. Съдържание на MDA (А) и GSH (Б) в мозъка на интактни и дементни плъхове след 11-дневно приложение на MAC-197 и MAC-198**

Драгоманова (2020) установява, че миртенал проявява про-оксидантни свойства при интактни лабораторни гризачи и антиоксидантен потенциал при гризачите с предизвикано от скополамин увреждане. Неговите конюгати, обект на настоящия труд, модулират съдържанието на MDA и GSH с незначителна разлика при интактните и дементните гризачи, което е илюстрирано на Фигура 24. Ефектите им слабо се променят при експериментална деменция, за която е характерно наличие на оксидативен стрес. В сравнение с интактните плъхове MAC-197 понижава съдържанието на малонов диалдехид с 8,1%, а MAC-198 повишава нивото на глутатион с 9,4%.

Антиоксидантните ензими са ендогенна защита при оксидативен стрес и техните нива се променят при генерирането на свободни реактивни видове. Изследванията при интактните плъхове не показват значими изменения в активността им, в резултат на приложението на MAC-197 и MAC-198 (Фигура 25 А, Б и В).



**Фигура 25. Ефекти върху активността на CAT (А), SOD (Б) и GPx (В) в мозъка на интактни и дементни плъхове след 11-дневно приложение на MAC-197 и MAC-198**

MAC-198 понижава активността на CAT при интактни плъхове с повече от 20%, но без статистическа достоверност (Раздел 4. от Гл. Резултати и обсъждане), а при дементните гризачи потиска стимулираната от токсина каталазна функция с 32,6% ( $P < 0,001$ ) (Раздел 5. от Гл. Резултати и обсъждане). Разликата в ефектите на това съединение спрямо CAT при интактни и при дементни гризачи се изразява в по-слаба активност на ензима при плъховете със скополаминово увреждане (с 32,7%, гранична значимост), в сравнение с интактната група (Фиг. 25 А). Този резултат е показателен за наличието на отчетливи антиоксидантни свойства на MAC-198 при скополамин-индуцирана деменция.

Както при интактните, така и при дементните плъхове дериватите не променят активността на SOD в мозъчната кора (Раздели 4. и 5. от Гл. Резултати и обсъждане).

MAC-197 повишава с 21,5% активността на ензима, катализиращ инактивирането на свободните радикали при дементните гризачи в сравнение с интактните ( $P = n.s.$ ), в отговор на предизвикания от скополамин оксидативен стрес (Фиг. 25 Б).

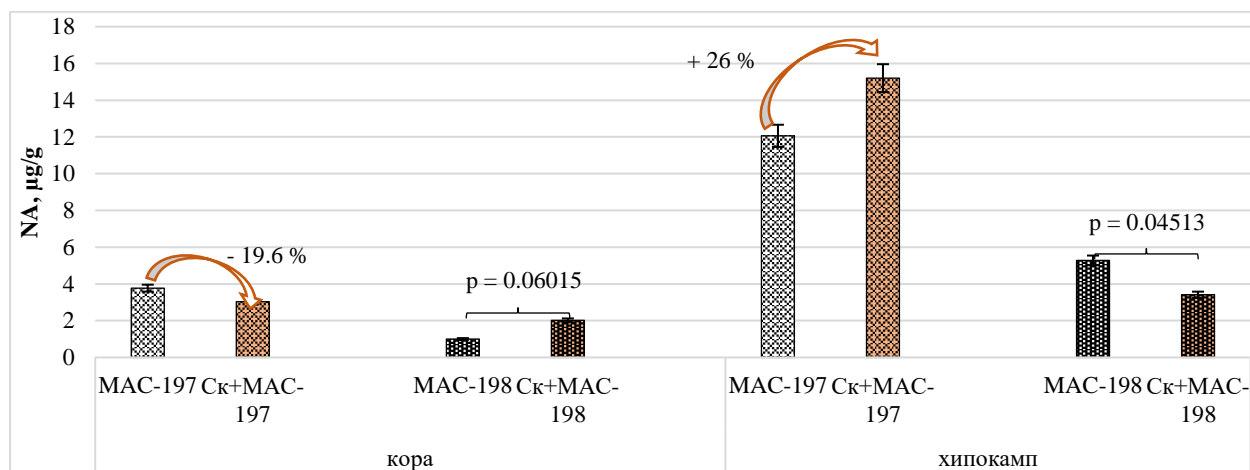
По отношение влиянието върху активността на глутатионпероксидазата, само при MAC-197 са установени антиоксидантни свойства, проявени при интактните плъхове чрез повишаване на активността ѝ с 39% в сравнение с контролните (Раздел 4. от Гл. Резултати и обсъждане). Нашите резултати кореспондират с данните на Сабит (2021), който в дисертационния си труд доказва, че активността на GPx се повишава при включване на антиоксиданти. При дементните плъхове MAC-197 поддържа GPx активност до стойности, близки с тези на контролните, противодействайки на понижението, предизвикано от токсичния агент (Раздел 4. от Гл. Резултати и обсъждане), докато MAC-198 не променя показателя в сравнение с дементната група.

От направеното сравнение, илюстрирано на Фигура 25 В, се вижда, че MAC-198 понижава активността на фермента при дементните плъхове с 26,3% в сравнение с тази при интактните животни, което се дължи на слабия му потенциал да противодейства на понижената GPx активност, в резултат на предизвикания от токсина оксидативен стрес.

На базата на извършения сравнителен анализ, може за се направи заключението, че миртеналовите конюгати с адамантан притежават специфични антиоксидантни свойства за противодействие на генерирания от скополамин оксидативен стрес.

### 6.1.3. Нива на мозъчни невротрансмитерни моноамини

Ефектите на проучваните миртеналови конюгати върху съдържанието на норадреналин в кората и хипокампа на интактни и дементни плъхове след многократното приложение са показани на Фигура 26.

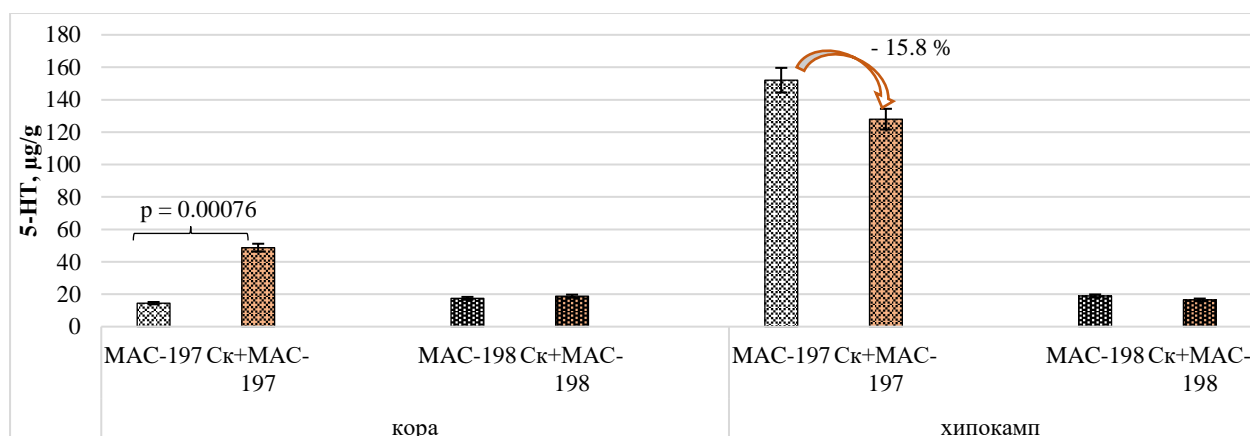


**Фигура 26.** Съдържание на NA в мозъчната кора и хипокампа на интактни и дементни плъхове след 11-дневно приложение на MAC-197 и MAC-198

При интактните плъхове MAC-197 повишава съдържанието на норадреналин в кората и хипокампа в сравнение с контролните, а MAC-198 го понижава (Раздел 4. от

Гл. Резултати и обсъждане), като тези свойства са проявени и при гризачите от скополаминовата група (Раздел 5. от Гл. Резултати и обсъждане). Разнопосочно повлияване в стойностите на NA се наблюдава и при сравняването на ефектите на двете вещества при интактните плъхове и тези с експериментална деменция (Фиг. 26). МАС-197 повишава по-слабо нивото на NA в кортекса при дементната група (с 19,6%, недостоверно), докато съдържанието на медиатора в хипокампа при тази група е по-високо от това при интактните животни с 26%. Изненадващо, подобни са резултатите и при другия миртеналов дериват. МАС-198 предизвиква по-слабо понижение в съдържанието на норадреналин в кората при дементните плъхове в сравнение с интактните ( $p = 0,06015$ ) и засилва ефекта на медиатора в хипокампа, където разликата между двете групи е с ниво на значимост  $P < 0,05$ . Ефектите на миртенал-адамантановите конюгати върху нивата на норадреналин се различават в двете изследвани мозъчни области, което е в потвърждение на данните, публикувани през 1999 година от Míguez et al.

Влиянието на проучваните миртеналови конюгати върху съдържанието на серотонин в кората и хипокампа на интактните и дементните плъхове след многократно приложение е илюстрирано на Фигура 27.



**Фигура 27. Съдържание на 5-НТ в мозъчната кора и хипокампа на интактни и дементни плъхове след 11-дневно приложение на МАС-197 и МАС-198**

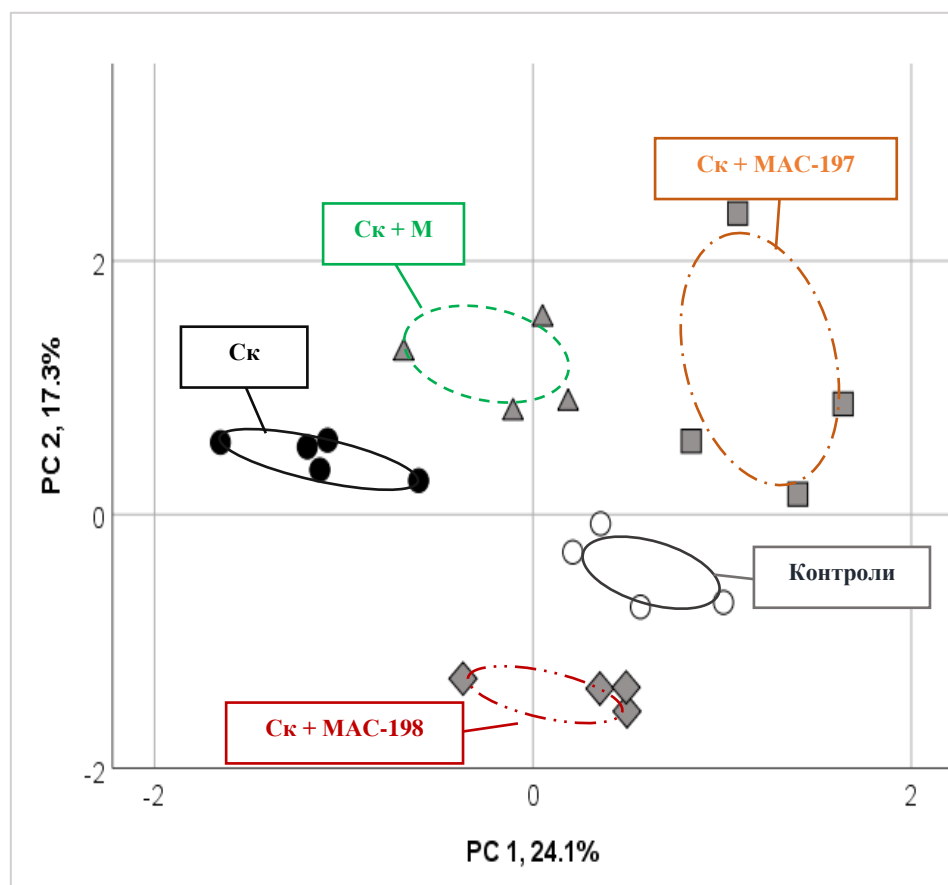
И тук, както при норадреналина, МАС-197 повлиява в различна посока съдържанието на серотонин в двете мозъчни области, които са обект на изследването. Съединението повишава нивото на 5-НТ в кората и хипокампа, както при интактните, така и при дементните гризачи. В кортекса при плъховете с експериментална деменция МАС-197 води до по-силно повишаване съдържанието на серотонин спрямо това при интактните животни, с висока степен на значимост ( $P < 0,001$ ), докато в хипокампа промяната е по-слабо проявена, като нивото е статистически недостоверно понижено с 15,8%. МАС-198 не променя влиянието си върху съдържанието на 5-НТ в двете мозъчни области в резултат на третирането на опитните плъхове с токсичния агент.

В заключение, влиянието на миртеналовите конюгати върху нивата на мозъчните моноаминни медиатори NA и 5-НТ в кортекса и хипокампа е разнопосочно, а така също варира и в зависимост от приложението на скополамин. Считаме, че потенциалът на

новосинтезираните вещества да влияят върху заболявания, свързани с дисбаланс на норадренергичната и серотонинергичната невротрансмисии е перспективна насока за бъдещи изследвания.

## 6.2. Анализ на резултатите от поведенческите и биохимичните изследвания при дементните плъхове след приложението на миртеналовите производни. Оценка на ефективността на двете молекули при експериментална невродегенерация от Алцхаймеров тип

Обобщеният анализ на ефектите на миртенал и неговите аминоксамантанови конюгати върху опитните животни, според линейната комбинация на биохимичните и поведенческите данни, при експерименталния модел на деменция, е илюстриран на Фигура 28.



**Фигура 28.** Графично представяне на резултата от анализа на главните компоненти. За координати са използвани стойностите на първите два основни компонента (PC1 и PC2), изобразени върху двуизмерна равнина. С елипси е означено групирането, установено при кълстерния йерархичен анализ.

Всяка точка от фигурата представлява отделно експериментално животно. Анализът на главните компоненти показва, че плъховете образуват обособени групи в зависимост от приложеното вещество, което е доказателство за системен ефект.

Използваният статистически метод позволява да се направи интеграция на получените биохимични и поведенческите данни в тяхната съвкупност и по този начин да бъде оценен цялостния невропротективен ефект на миртенал-адамантановите производни върху експериментална деменция на плъхове. Двете производни МАС-197 и МАС-198 са ясно разграничени от скополаминовата група и са в относителна близост спрямо контролната. От друга страна, третираните с миртенал дементни плъхове също образуват независим клъстер.

Тези резултати потвърждават предположението, че природният монотерпен миртенал и неговите синтетични деривати, обект на проучването, проявяват специфични невропротективни ефекти.



## V. ИЗВОДИ

1. Физикохимичните свойства на синтетичните миртеналови конюгати с аминоксадамтан (МАС-197 и МАС-198) благоприятстват преминаването им през хемато-енцефалната бариера, а софтуерното изследване на потенциалните таргети разкрива способността им да се свързват със структури в ЦНС и по този начин да влияят върху различни невротрансмитерни системи и регулаторни процеси.
2. Многократното интраперитонеално приложение на двете съединения (11 дни, в доза 1 mg/kg) не предизвиква негативни ефекти върху паметовите процеси при интактните плъхове, не е установено общотоксично действие и не са регистрирани макроскопски увреждания на вътрешните органи (сърце, черен дроб, бъбреци, стомах, жлъчка и черва) след дисекция.
3. Молекулярното моделиране показва, че мозъчната АСhЕ е правдоподобен таргет за аминоксадамтановите конюгати на миртенал. Антихолинестеразният им потенциал, установен при докинг изследванията, е потвърден *in vivo* върху **интактни плъхове**, като най-силно той е изразен при МАС-197 в хипокампа. Синтетичните деривати значимо подобряват увредената краткосрочна и дългосрочна памет на **дементните гризачи**, което е свързано с антихолинестеразната им активност в мозъчната кора, а при МАС-198 – и в хипокампа.
4. Миртеналовите аналози демонстрират изразени невромодулиращи свойства в двете мозъчни структури на **интактни плъхове**, свързани с паметта (хипокамп и кора), предизвиквайки специфични промени в нивата на биогенните амини – МАС-198 понижава нивата на NA и 5-НТ, а МАС-197 значително ги повишава. Тези различия се запазват и при **дементните гризачи** – МАС-197 повишава съдържанието на NA в мозъчната кора и хипокампа, и на 5-НТ в хипокампа, докато МАС-198 понижава концентрацията на 5-НТ в кортекса и хипокампа, и на NA в хипокампа.
5. Антиоксидантните свойства на миртеналовите аналози, по-отчетливо изразени от тези на природния референт, успяват да коригират оксидативния стрес, предизвикан от скополамин, в мозъчната кора на **дементните плъхове**. Двете нови вещества потискат повишената каталазна активност, МАС-197 понижава съдържанието на MDA, а МАС-198 повишава нивата на тоталния глутатион.
6. Двата конюгата на миртенал с аминоксадамтан МАС-197 и МАС-198 проявяват по-силно изразени ефекти върху увредената от скополамин памет на гризачите, както и по-отчетливи антихолинестеразни, антиоксидантни и невромодулаторни свойства, спрямо природния референт.
7. Комплексните невропротективни механизми на двете изследвани вещества (антихолинестеразен, невромодулаторен и антиоксидантен) са по-ясно проявени при гризачите със скополамин-индуцирана деменция, в сравнение с интактните плъхове.

## **VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

- 1.** За първи път са проучени неврофармакологичните ефекти на новосинтезирани конюгати на миртенал с аминоксамантан. Върху здрави лабораторни плъхове е доказан потенциалът на двете съединения (МАС-197 и МАС-198) за подобряване на паметта, без увреждащи ефекти върху изследователското поведение.
- 2.** При плъхове с експериментален модел на деменция за първи път е установен невропротективния потенциал на аминоксамантановите деривати, дължащ се на комплексните им механизми на действие – антихолинестеразен, антиоксидантен и невромодулиращ.
- 3.** Разкрит е потенциалът на новосинтезираните вещества да влияят върху заболявания, свързани с дисбаланс на норадренергичната и серотонинергичната невротрансмисии, като променят разнопосочно нивата на мозъчните медиатори NA и 5-НТ в кортекса и хипокампа, както на интактните, така и на дементните плъхове, което е перспективна насока за бъдещи изследвания.
- 4.** Извършен е сравнителен анализ на ефектите на миртеналовите деривати при здрави и при дементни плъхове чрез интегриране на поведенческите и биохимичните данни. Установено е, че синтетичните конюгати притежават специфични невропротективни свойства, които са по-ясно изразени при гризачите с паметови увреждания, в сравнение със здравите.
- 5.** Получените за първи път в това проучване оригинални данни разкриват по-голямата ефективност на синтетичните конюгати на миртенал с аминоксамантан, в сравнение с изходния природен продукт, което е основание за бъдещото им разработване като невропротективни агенти при паметови нарушения.

## **VII. СПИСЪК НА НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **Публикации във връзка с дисертационния труд**

- 1. Dragomanova S., Andonova V.** Adamantane-containing drug delivery systems. *Pharmacia* **2023**; 70(4): 1057-1066. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.70.e111593>
- 2. Dragomanova S., Andonova V., Lazarova M., Munkuev A., Suslov E., Volcho K., Salakhutdinov N., Stefanova M., Gavrilova P., Uzunova D., Kalfin R., Tancheva L.** Memory-improving effects of myrtenal-adamantane conjugates. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. **2023**; 58, 3, 627-634.

### **Научни съобщения по темата на дисертационния труд**

- 1. Dragomanova S., Lazarova M., Munkuev A., Suslov E., Volcho K., Salakhutdinov N., Stefanova M., Gavrilova P., Uzunova D., Kalfin R., Tancheva L.** Mechanisms of memory-improving effects of Myrtenal-Adamantane Conjugates in Wistar Rats. Научна конференция с международно участие „Innovations in Drug molecules“, 19 - 22 юли, 2022 г., Хисаря.
- 2. Драгоманова С., Лазарова М., Мункуев А., Суслов Е., Волчо К., Салахудинов Н., Биби А., Рейнисон Й., Цветанова Е., Александрова А., Георгиева А., Узунова Д., Стефанова М., Калфин Р., Танчева Л.** Ефекти на миртенал-адамантанови конюгати при експериментален модел на деменция. III<sup>та</sup> Национална научна конференция „Дръзновение и младост във фармакологията 2022“, 30 септември - 02 октомври 2022 г., Цигов чарк.
- 3. Dragomanova S., Andonova V., Lazarova M., Stefanova M., Tsvetanova E., Alexandrova A., Uzunova D., Volcho K., Munkuev A., Suslov E., Salakhutdinov N., Kalfin R., Tancheva L.** Myrtenal-Aminoadamantane Derivatives in Experimental Dementia. Девети фармацевтичен бизнес форум и Научно-практическа конференция, 20-21 окт, 2023.
- 4. Dragomanova S., Andonova V., Kalfin R., Tzvetanova E., Alexandrova A., Munkuev A., Suslov E., Volcho K., Salakhutdinov N., Tancheva L.** Antioxidant Potential of Myrtenal and Its Adamantane Conjugates in Dementia Rat Model. The 23<sup>rd</sup> European Meeting on Environmental Chemistry (EMEC 23), 03-06 Dec 2023, Budva, Montenegro.

## ***БЛАГОДАРНОСТИ***

Изказвам благодарности на научния ми ръководител доц. Величка Андонова, д.ф., за всестранната помощ и безусловната подкрепа, на научния ми консултант проф. Любка Танчева, д.м., за съдействието и за ценните съвети, на проф. Рени Калфин, д.м., ръководител на Направление „Биологични ефекти на природни и синтетични съединения“ при Институт по невробиология – БАН, за предоставените ми условия и материалната база за работа. Благодаря и на всички колеги, които по различен начин допринесоха за осъществяването на този мултидисциплинарен труд – проф. К. Волчо от Отдела по медицинска химия на Новосибирския институт по органична химия към Руската академия на науките за предоставяне на синтезираните от неговия екип вещества, обект на настоящото изследване, prof. Johannes Reynisson от Keele University, Великобритания, проф. Албена Александрова, д.м., доц. Елина Цветанова, д.м., доц. Мария Лазарова, д.м., ас. Диамара Узунова, ас. Мирослава Стефанова и Петя Гаврилова от ИНБ – БАН, ас. Йордан Ходжев от Национален център по заразни и паразитни болести, България, Катедра Микробиология – Сектор Микробиом. Не на последно място – на колегите от Факултет по Фармация при Медицински университет - Варна – ас. Ивайло Пехливанов и ас. Стефан Стефанов от Катедра „Фармацевтични технологии“, и ас. Ивелин Илиев, д.ф., от Катедра „Фармацевтична химия“.

Последно, но не и по важност, искрено благодаря на родителите и семейството ми, на които посвещавам този труд.

Благодаря ви!