

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ ВАРНА „ПРОФЕСОР Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“  
ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ  
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ, ТОКСИКОЛОГИЯ И ФАРМАКОТЕРАПИЯ

**С Т А Н И С Л А В Й О Р Д А Н О В М А Р Ч Е В**

**ФАРМАКОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ НА СТЕРОИДНИ ХОРМОНИ, ПРИРОДНИ  
ПРОДУКТИ И НОВОСИНТЕЗИРАНИ 2Н-СУБСТИТУИРАНИ ХИДРАЗИД-  
ХИДРАЗОНИ В ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ НА ЕПИЛЕПСИЯ, БОЛКА И  
ОСТЕОПОРОЗА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

**за присъждане на образователна и научна степен**

***ДОКТОР***

**По научна специалност „Фармакология (вкл. Фармакокинетика и  
химиотерапия)“**

Научни ръководители: Проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м., д.м.н.  
Доц. д-р Павлина Гатева, д.м.

Научен консултант: Чл. кор. на БАН проф. д-р Мила Власковска, д.м., д.м.н.

**ВАРНА**

**2020**

Дисертантът е магистър по фармация от Freie Universität Berlin и е докторант в самостоятелна форма на обучение в Катедрата по „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“ на Медицински Университет Варна „Проф. д-р П. Стоянов“. Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на разширено заседание на Катедрата, проведено на 25.06.2020 във Фармацевтичния факултет на Медицински Университет Варна.

Дисертационният труд съдържа 129 страници, 11 фигури, 24 таблици. Библиографията съдържа 155 публикации на чуждестранни автори и 15 публикации на български автори. Изследванията представени в дисертационния труд са финансирани от изследователски проекти NSF DN 13 / 16 21. 12. 2017 и MUS D-74 / 2017.

Публичната защита на дисертацията ще бъде проведена на 24.09.2020 (онлайн) от научно жури със следния състав:

Председател: Проф. д-р Петко Пенков Маринов д.м.

Членове:

Проф. д-р Иванка Илиева Костадинова, д.м.

Проф. д-р Николай Дамянов Данчев д.м.

Проф. Георги Цветанов Момеков, д.ф.н.

Доц. д-р Мария Делчева Желязкова-Савова, д.м.

Материалите по защитата са на разположение в ул. М. Дринов 55, както и на страницата на Медицински Университет Варна.

## I. ВЪВЕДЕНИЕ

Епилепсията е едно от най-сериозните и разпространени неврологични заболявания след мигрена, мозъчен инсулт (мозъчно-съдова болест) и Болест на Alzheimer (Yagielski, A., 2016). За тях са характерни висока морбидност в населението, сериозни медицински и психологични последици за индивида и значителни изисквания към здравните и социални системи на държавата. Понастоящем в света има над 65 милиона пациенти, диагностицирани с *епилепсия* и всяка година към тях се прибавят нови 130 хиляди (Hesdorffer D. C., et al., 2013). Съгласно приетата международна дефиниция “Епилепсията е хронично, пагубно за индивида заболяване, което се проявява с непредсказуеми (два или повече), рекурентни (разделени с най-малко 24 часа) гърчови пристъпи, които не са предизвикани от непосредствено идентифицирана нокса” (Reddy D. S., 2013). Главна и патогномонична характеристика на основните видове епилепсия е появата на генерализирани или фокални припадъци. Лечението на епилепсията е симптоматично и засега не съществуват ефикасна механизъм-базирана терапия и/или ефективна профилактика. Голямо клинично и терапевтично значение има създаването на нови антиепилептични лекарства (АЕЛ), които да бъдат ефективни за третиране на пациенти с рефрактерни форми на епилепсия, деструктивни промени на личността и/или коморбидни състояния. В този контекст е важен фактът, че 40% от пациентите с епилепсия страдат от лекарствено-резистентни форми на болестта (Mohanraj, R., Brodie, M. J., 2005).

Отдавна е известно, че пациентите с епилепсия, които са имали продължителна антиконвулсивна терапия, са изложени на много по-висок риск за поява на остеопорозни изменения на костната система и свързани с това костни фрактури, както и различни други травматични усложнения. Остеопорозата представлява прогресиращо системно заболяване на костната система, при което настъпва загуба на костна тъкан и разрушаване на костната микроархитектоника (World Health Organization, 1998). Тези патологични процеси намаляват здравината на

костта и увеличават значително риска от фрактури при минимална травма. Когато липсват фрактури, единствен алармиращ симптом на тази „тиха“ болест е болката. Болката е аверзивен сигнал за реално или потенциално увреждане на организма. Тя представлява динамичен комплекс от сензорни, когнитивни и емоционални възприятия. В еволюционен аспект болката е неизбежен компонент на живота (Macfarlane, G. J. et al., 2006). Съгласно дефиницията на Международната Асоциация за Изследване на Болката (IASP) „Болката е неприятно сензорно и емоционално преживяване, свързано с реално или потенциално увреждане на тъкани“ (Merskey, H., Bogduk, N., 1994). Прилагането на хормон-заместителна терапия (ХЗТ) с естрогени е средство на избор за облекчаване на симптомите и превенция на остеопорозните промени в костите при менопауза. Хормон-заместителната терапия (ХЗТ) предизвиква обаче сериозни нежелани лекарствени реакции. Най-сериозните от тях са увеличен риск от карцином на матката и млечните жлези, тромбоемболизъм и менорагия (Rang, H. P., et al., 2007). Като алтернатива масово се прилага ХЗТ с фитопродукти. Последните не предизвикват нежеланите усложнения от ХЗТ с нативни естрогени, а към момента най-употребявани са фитопродукти от соя. Понастоящем масово приложение имат лекарствени продукти на растителна основа, в които активната съставка е *Genistein* и/или *Genistin*. Становището, че комбинираните терапевтични схеми помагат за индивидуализиране на лечението на жени с тежка пост-менопаузна остеопороза, намира значителна подкрепа. В този контекст фитопродукти, получени от познати растения, известни със своите кулинарни или лечебни качества, могат да бъдат подходящи за фитохимични и фармакологични изследвания върху експериментални модели на естроген-дефицитна остеопороза.

Вниманието ни бе насочено към изследвания на плодов сок от *Aronia* 10 ml/kg и 5 ml/kg за наличие на антиостеопорозно действие/естроген-подобна активност с вероятен терапевтичен потенциал за профилактика и/или лечение на жени с постменопаузална остеопороза. Плодовете на *Aronia melanocarpa* са популярни

със своите органолептични качества. В последните години интерес към растението проявяват Български и чуждестранни изследователи заради възможността фитопродукти от *Aronia* да намерят реално фармакотерапевтично приложение (Valcheva-Kuzmanova, S., Belcheva, A., 2006). Проведените фитохимични анализи показват, че плодовете на *Aronia melanocarpa* могат да съдържат голям брой биологично активни субстанции, които да обуславят благоприятни терапевтични ефекти. В същия контекст трябва да бъдат интерпретирани и изследвания върху други растения. Представени са експериментални и клинични данни, че продукти от целина (*Apium nodiflorum*) могат да имат многобройни и разнообразни ефекти върху здравословното състояние. С фитохимични анализи на части или продукти от целина е показано, че в тях се съдържат многобройни химични съединения, представляващи различни групи вторични метаболити. В системни *in vivo* и *in vitro* изследвания на Власковска и сътрудници са представени убедителни доказателства за благоприятно повлияване на клиничната и параклинична симптоматика при хронично третиране с екстракт на *Apium Nodiflorum* в експериментални модели на постменопаузална остеопороза (Цакова, А., et al., 2015, Цакова, А., 2016).

### **III. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ**

(Разделите в автореферата са представени с номерацията, която те имат в дисертационния труд)

#### **1. 1. Цели на дисертационния труд**

1. 1. Като се ръководим от многообразието на клинични и лабораторни данни, които в много случаи са опониращи едни на други, цел на настоящото проучване е да бъде изследван ефектът на стероидните супраренални и гонадни хормони върху интензитета, динамиката и латенцията на kainate-евокирани гърчове и леталитета в експериментален модел на епилептогенеза при плъхове. В това направление ще бъде изследвано действието на серия новосинтезирани хидразид-хидразонови съединения върху ноцицепцията

1. 2. Втора цел на настоящия труд е да се проучи действието на фитопродукти на *Aronia melanocarpa* и *Apium nodiflorum* върху костната минерална плътност (КМП) и костното минерално съдържание (КМС) при животни с експериментална естроген-дефицитна „пост-менапаузна“ остеопороза

#### **2. Задачи на дисертационния труд в контекста на дефинираните цели**

##### **2. 1. Експериментален епилептиформен синдром**

2. 1. 1. Да бъдат извършени две оперативни интервенции на всяко животно за набиране на достатъчен брой експериментални животни с „нулеви“ нива на кортикостероидни и андрогенни хормони (билатерална супрареналектомия и тотална орхидектомия)

2. 1. 2. Да бъде валидиран и приложен в изследването kainic acid-индуциран конвулсивен синдром като модел на експериментална епилептогенеза

2. 1. 3. Да бъде приложена нова оригинална кумулативна скала за количествен анализ на интензитета на експериментален епилептиформен синдром (количествена оценка на интензитета на соматичните и когнитивни симптоми)

2. 1. 4. Да бъде изследвано действието на стероидните женски и мъжки полови хормони и глюкокортикоиди върху kainic acid-индуциран конвулсивен синдром.  
Хормоните са:

(i) *Corticosterone*

(ii) *Estradiol*

(iii) *Progesterone*

(iv) *5 $\alpha$ -Dihydroprogesterone*

(v) *5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone*

2. 1. 5. Да бъде изследвано действието на серия новосинтезирани хидразид-хидразонови съединения върху ноцицепцията с „Hot Plate“ тест и „Formaline“ тест.  
Съединенията са: *4a, 4b, 4c, 8a, 8b*

2. 2. Експериментална естроген-дефицитна остеопороза

2. 2. 1. Да бъдат извършени оперативни интервенции (билатерална овариектомия) за набиране на достатъчен брой експериментални животни с „нулеви“ нива на женски полови хормони

2. 2. 2. Да бъде валидиран и приложен в изследването експериментален модел на естроген-дефицитна „пост-менопаузна“ остеопороза на плъхове

2. 2. 3. Да бъде валидирана и приложена в изследването методика за остеодезитометрично измерване на костната минерална плътност (КМП) и костното минерално съдържание (КМС) при експериментална естроген-дефицитна „пост-менопаузна“ остеопороза на плъхове

2. 2. 4. Да бъде изследвано действието на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху КМП и КМС при животни с експериментална естроген-дефицитна „пост-менопаузна“ остеопороза

2. 2. 5. Да бъде изследвано действието на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху ноцицепцията при животни с експериментална естроген-дефицитна „пост-менопаузна“ остеопороза с тест „Randall-Selitto“ и тест „Hot Plate“

2. 2. 6. Да бъде изследвано действието на екстракти на *Apium nodiflorum* върху КМП и КМС при животни с експериментална естроген-дефицитна „пост-менопаузна“ остеопороза



## IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. Експериментален модел на kainic acid-индуцирана епилептогенеза. Методи на експериментални фармакологични и конгитивни изследвания

*Лабораторни животни:* Мъжки плъхове (порода Wistar, възраст 10 седмици, телесна маса 190-210 g) са поставени при контролирани условия ( $20\pm 2^\circ$  C, 12 часов цикъл ден/нощ с начало 8:00 ч, *at libitum* достъп до вода и стандартна храна до 24 ч преди хирургичните интервенции), разпределени случайно (*at random*) по 3 животни/клетка в редовно хигиенизирани клетки с площ 0.05 м<sup>2</sup>. Телесната маса на всички експериментални животни се измерва всяка седмица. След завършване на експериментите животните са екстерминирани с CO<sub>2</sub>. Всички процедури и изследвания са одобрени от комисията по Биоетика на научните изследвания при Медицински Университет, София.

*Оперативни интервенции:* За минимизиране на ефекта от промени в нивото на ендогенните полови хормони се премахват половите и надбъбречните жлези. Всички оперативни интервенции се извършват при асептични условия при обща анестезия и *intra-operationem* локално приложен анестетик. През билатерална инцизия на дорзалната мускулатура в лумбалната зона се извършва екстирпация на супрареналните жлези. Във втория етап на оперативната интервенция през инцизия на скротума се ексцизират билатерално *en bloc* testis, epididymis и vas deferens. На една част от животните тези органи остават интактни. Тези животни са включени в т. нар. *sham operated* група контроли.

*Ресурсна план-програма:* В настоящите изследвания са използвани 70 мъжки животни, получени от вивариума на МУ София. След хабитуация от 7 дни и при обща анестезия с Thiopental (24 mg/kg, IP) и Ketamine 90 mg/kg, IP), и локално

приложен 1% Lidocaine (0.4 ml/плъх), се правят билатерални инцизии с дължина 10-15 mm, през които след лигатура на кръвоносните съдове се ексцизират супрареналните жлези на 60 животни. Жлезите на останалите 10 животни не се отстраняват и остават интактни. Хирургичната интервенция продължава с 15 mm медиална инцизия на скротума и ексцизия *en bloc* на testis, epididymis и vas deferens на всички животни с отстранени супраренални жлези. На всички животни се поставят локално върху раната Sulfathiazole (20 mg/плъх) и Toposine spray, след което с хирургични шевове раната се затваря послойно и се инжектира еднократна доза Gentamicin (8 mg/kg, *i.m.*). В пост-оперативния период животните са оставени за 3 дни в единични клетки, след което *at random* са групирани по 4 животни в по-големи клетки. Всички животни имат свободен достъп до вода с добавен NaCl (4.5 g/l) и стандартна храна за лабораторни животни през целия пост-оперативен период. След възстановяване оперираните животни се разпределят в групи по 10 животни, отделно в група *sham operated* – общо 7 групи. Фармакологичното третиране се провежда ежедневно за 5 дни от постоперативен ден 7 до постоперативен ден 11. Изследваните стероидни хормони са *Corticosterone*, *17 $\beta$ -Estradiol*, *Progesterone*, *5 $\alpha$ -Dihydroprogesterone*, *5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone*, Sigma-Aldrich. Прилаганите стероиди са разтворени в стерилно маслиново масло и се въвеждат подкожно в обем 0.1 ml/100g, т. м., по едно и също време (8:30-9:30 ч) съгласно представената схема на Таблица 1. 1.

Таблица 1. 1. Схема на фармакологично третиране

	<b>Група</b>	<b>Вещество</b>	<b>Доза</b>
Г1	<i>Sham operated</i> контроли	<i>Olive Oil</i>	0.1 ml/100g, т. м.
Г2	Оперирани контроли	<i>Olive Oil</i>	0.1 ml/100g, т. м.
Г3	Оперирани	<i>Corticosterone</i>	30 mg/kg, т. м.
Г4	Оперирани	<i>17<math>\beta</math>-Estradiol</i>	0.03 mg/kg, т. м.
Г5	Оперирани	<i>Progesterone</i>	75 mg/kg, т. м.
Г6	Оперирани	<i>5<math>\alpha</math>-Dihydroprogesterone</i>	75 mg/kg, т. м.
Г7	Оперирани	<i>5<math>\alpha</math>-Dihydrotestosterone</i>	0.75 mg/kg, т. м.

Ресурсната план-програма удовлетворява оптимално времевите, материални и методологични изисквания за изпълнение на настоящия изследователски проект.

*Изследване:* Общоприето е, че *kainic acid*, *pentylentetrazole*, *pilocarpine*, *flurothyl* или електрошок са най-подходящи и често прилагани епилептогенни стимули за предизвикване на епилептиформни гърчове в експериментални модели на епилепсия. В проведените изследвания като най-адекватен експериментален модел на епилептичен синдром са приети *kainic acid*-индуцирани гърчове на плъхове. Епилептиформните гърчове са предизвикани чрез подкожна инжекция на 24 mg/kg, т. м. *kainic acid*, разтворена в 0.2 ml буфер (pH 7.4) след предходно хормонално третиране в продължение на 5 последователни дни. Поведенческите реакции са отчитат в продължение на 3 часа от двама наблюдатели, които нямат информация за проведеното хормонално третиране на животните. Едновременно с това се хронометрира времето за поява на гърчова активност и настъпването на екзитус. Интензитетът на епилептиформния синдром се оценява по създадена от М. Власковска и сътрудници нова оригинална 6-степенна скала представена на Таблица 1. 2.

Таблица 1. 2. Кумулативна скала за количествена оценка на интензитета на епилептиформения синдром

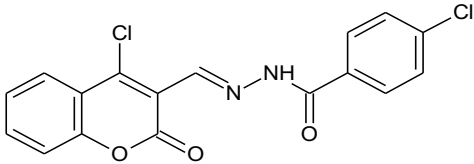
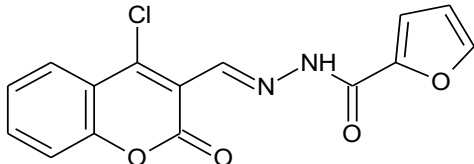
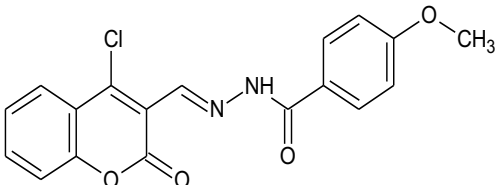
ЛОКОМОТОРНО ПОВЕДЕНИЕ	ТОЧКИ
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Локомоторна възбуда</li> </ul>	1
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Миоклонус на фациалните мускули и/или конвулсии на мускулите на главата, и/или контракции на цервикалната мускулатура, или мускулите на предните крайници</li> </ul>	2
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Контракции на мастикаторната мускулатура и/или <i>wet dog</i> тръскане, или клонус на предните крайници</li> </ul>	2.5
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Слаб генерализиран клоничен гърч</li> </ul>	3
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Силен генерализиран клоничен гърч с изправяне на задните крайници и падане на пода на клетката</li> </ul>	4
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Субмаксимален тоничен гърч (тонична флексия на предните крайници)</li> </ul>	5
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Максимален тоничен гърч (тонична флексия на предните крайници и тонична екстензия на задните крайници)</li> </ul>	6

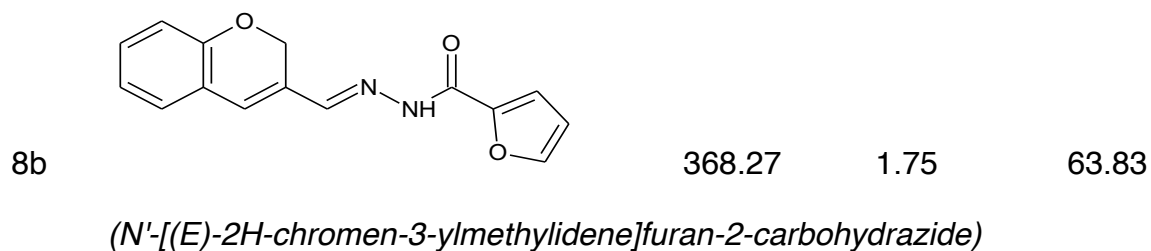
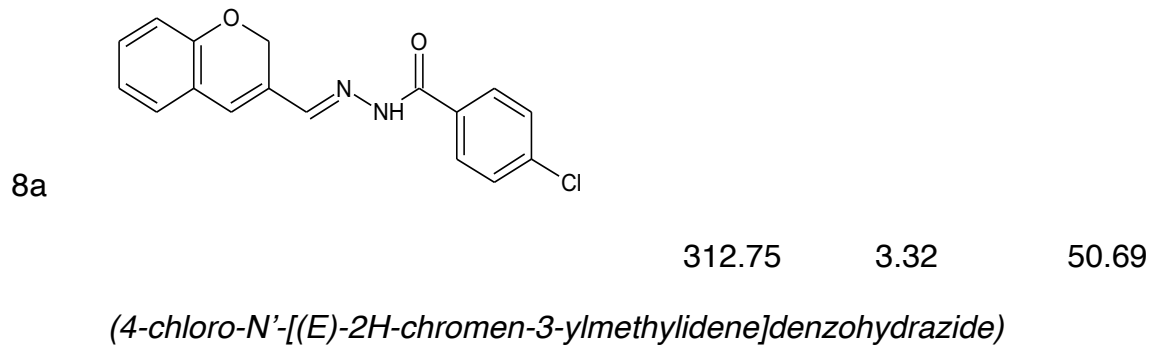
*Статистически анализ:* Получените резултати са представени като Mean±SEM. Анализът на данните е проведен с програмен пакет ANOVA two way measures със следващ тест Bonferroni multiple comparison. Разликите са приети за достоверни при  $P \leq 0.05$ .

## **2. Материали и фармакологични методи за изследване на аналгетично действие на 2Н-хромен-субституирани хидразид-хидразони**

Методите за синтез на оригинални кумаринови и 2Н-хромен-субституирани хидразид-хидразони са приложени в изследвания, проведени във Фармацевтичен Факултет на Медицински Университет, София, Институт по Органична Химия с Център по Фитохимия при БАН и Институт по Биофизика и Биомедицинско Инженерство при БАН. Цялото количество новосинтезирани субстанции, които са използвани в проведените изследвания, е получено от ФФ на МУ София. На основата на фармакофорно картиране и тридимензионален структурен анализ са синтезирани арил-хидразонови деривати с проявена антиконвулсивна активност (Ulloora, S., et al., 2013). Като прилагат методология за молекулна хибридизация, колективи от Български изследователи са синтезирали серия нови хидразид-хидразон-кумарин производни, за които предвиждат, че могат да проявят антиконвулсивна и аналгетична активност (Angelova, V. T., et al., 2016a, 2016b, 2017). Основните физикохимични характеристики на изследваните съединения са представени на Таблица 1. 1., Раздел 1. 2. 1. Новосинтезирани кумаринови и 2Н-хромен-субституирани хидразид-хидразони.

Таблица 1. 2. 1. Основни химични характеристики на новосинтезирани кумаринови и 2Н-хромен-субституирани хидразид-хидразони

Съединение		Физикохимични параметри		
Код	Химична структура	МТ	Log O/B	ППП
4a	 <p><i>(4-chloro-N- [(E)-(4-chloro-2-oxochromen-3-yl)methylidene]benzohydrazide)</i></p>	361.17	2.18	67.76
4b	 <p><i>(N'-[(E)-(4-chloro-2-oxochromen-3-yl) methylidene]furan-2-carbohydrazide)</i></p>	316.70	0.61	80.90
4c	 <p><i>(N'-[(E)-(4-chloro-2-oxochromen-3-yl) methylidene]-4-methoxybenzohydrazide)</i></p>	356.76	1.41	76.99



MT - молекулно тегло, ППП - площ на полярна повърхност, Log O/B - коефициент на разпределение Октанол/Вода

След *in silico* физикохимичен и *NMR* анализи на синтезираните съединения, авторите правят извода, че тези съединения притежават основни фармакофорни елементи, за които се приема, че детерминират добра антиконвулсивна активност (Tripathi, L., Singh, R., Stables, J. P., 2011). Естествено следствие на тези изследвания е провеждането на първоначален фармакологичен и токсикологичен скрининг на тези съединения за наличие на антиконвулсивна и аналгетична активност в *in vivo* модели на конвулсивен синдром. Основните фармакологични и токсикологични характеристики на пет съединения, които са отчетени като перспективни, са представени в Таблица 1. 2. 2. Данните в таблицата са компилирани от резултати, представени от Angelova, V. T., et al. (2017).

Таблица 1. 2. 2. Основни фармакологични и токсикологични характеристики на новосинтезирани кумаринови и 2Н-хромен-субституирани хидразид-хидразони

Съединение		Фармакологични параметри		
Код	Тест	ED50 (mg/kg)	TD50 (mg/kg)	ПИ
4a	MES	99.71	над 300	над 3.01
4b	MES	68.66	над 300	над 4.37
4c	MES	81.29	над 300	над 3.69
8a	MES	87.63	над 300	над 3.42
	PTZ	218.50	над 300	над 1.37
8b	MES	12.51	над 300	над 23.98
	PTZ	127.10	над 300	над 2.36

*MES* - максимален електрошок (50 mA, 50 Hz, 0.2 sec), *ПИ* - протективен индекс ( $TD50/ED50$ ), *PTZ* - *Pentylentetrazole* (85 mg/kg, sc)

Резултатите от направения скрининг показват, че съединенията с код *4b*, *4c* и *8b* имат реален фармокотерапевтичен потенциал като антиконвулсивни средства. Необходими са допълнителни проучвания на тяхната аналгетична активност, както и изследвания за изясняване на механизма на тяхното действие (Angelova, V. T., et al., 2017).

*Лабораторни животни:* Мъжки албино мишки (ICR, телесна маса 20-25 g) са поставени при контролирани условия ( $20\pm 2^\circ$  C, 12 часов цикъл ден/нощ с начало 8:00 ч и достъп *at libitum* до вода и стандартна храна), предварително разпределени *at random* по 8 животни/клетка в редовно хигиенизирани клетки с площ 0.05 м<sup>2</sup>. След завършване на експериментите животните не са екстерминирани. Всички процедури и изследвания са одобрени от Комисия по



Биоетика на Научните Изследвания на Медицински Университет София и Комитет по Биоетика на ИНБ при БАН.

*Ресурсна план-програма:* В настоящите изследвания са използвани 96 албино мъжки мишки получени от вивариума на МУ София. Фармакологичното третиране се провежда след 7 дни период на хабитуация. Изследваните субстанции са разтворени в DMSO и се въвеждат интраперитонеално в доза ED<sub>50</sub> в краен инжекционен обем 0.1 ml/животно в интервала 9:00-10:00 ч по схема, представена в Таблица 2. 1. Тестирането се извършва в ранен (до 5 min) и късен (до 30 min) период след въвеждане на съответната субстанция на едно и също животно.

Таблица 2. 1. Групи и брой животни в група за фармакологично изследване на аналгетичното действие на хромен-субституирани хидразид-хидразони в доза ED<sub>50</sub> чрез тест „Hot Plate” и тест „Formalin”

Тест	Тест (min)	Изследвани субстанции						
вид	I и II	4a	4b	4c	8a	8b	DMSO	
HP	I - 5 min	(N) 8	8	8	8	8	8	
	II - 30 min	(N) 8	8	8	8	8	8	
F	I - 5 min	(N) 8	8	8	8	8	8	
	II - 30 min	(N) 8	8	8	8	8	8	
ED <sub>50</sub> (mg/kg) с MES		100	70	80	90	12.5	0.1 ml	

*I - първо измерване, II - второ измерване, HP - тест Hot Plate, F – тест Формалин, MES - максимален електрошок, N - брой животни в група*

*Изследване:* Приложени са алгогенни стимули с различни модалности: ноцицептивен тест с термично дразнене (тест Hot Plate с температура 47±1° C. D' Amour, F. F., Smith, D. L., 1941, Тест HP) и интраплантарно инжектиране на 5% разтвор на Формалин (Barrot, M., 2012, Тест F). Ноцицептивният праг, определен

с тест НР, е верифициран чрез латентното време (латенция, sec) от момента на стъпване върху нагорещената повърхност до момента на усещане на болка, проявен като защитен рефлекс на повдигане/близване на един от крайниците. Интраплантарното инжектиране в задния крайник на животното на 5% разтвор на формалин в обем 0.1 ml провокира бифазна аллогенна реакция. Началната реакция е облизване на инжектирания крайник и се отчита в ранния период след инжектирането. След латентен период от 25-30 min се отчита по-късна реакция на повдигане/хапане на инжектирания крайник. Степента на хипералгезия определена с тест F е верифицирана чрез латентното време (латенция, sec) от момента на субплантарна инжекция до момента на настъпване на ранна и респ. късна аллогенна реакция.

*Статистически анализ:* Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  стандартното отклонение и са анализирани с еднофакторен анализ на вариациите (ANOVA) и Holm–Sidak post hoc тест с възприето ниво на значимост  $P < 0.05$ .

### **3. Експериментален модел на естроген-дефицитна остеопороза. Остеодензитометрични и алгометрични изследвания**

*Лабораторни животни:* Женски плъхове (порода Wistar, възраст 2.5 месеца, телесна маса 180-185 g) са поставени при контролирани условия ( $20 \pm 2^\circ$  C, 12 часов цикъл ден/нощ с начало 8:00 ч, *at libitum* достъп до вода и стандартна храна до 24 ч преди хирургичната интервенция), разделени *at random* (4 животни/клетка) в редовно хигиенизирани клетки с площ 0.05 m<sup>2</sup>. Телесното тегло на всички експериментални животни се измерва два пъти седмично. След завършване на експериментите животните се упояват с Pentobarbital (20 mg/kg, IP) и екстерминират. Третирането на животните и планираните експерименти са в съответствие с националните закони (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) и международни изисквания (EU Directive, 2010/63/EU for animal experiments) и са одобрени от Комисията по Биоетика на Научните Изследвания на МУ София.

*Оперативни интервенции:* Оперативните интервенции са извършват след една седмица хабикуация на животните. Всички хирургични манипулации се извършват при асептични условия и обща анестезия, и интраоперативно (*intra-operationem*) локално приложен анестетик. След лапаротомия се извършва двустранна овариектомия, като малък брой животни остават в контролна група с интактни овариуми, т. нар. *sham operated* група. В края на оперативната интервенция всички животни получават единична доза антибиотик. При същите лабораторни условия се отглежда и контролна група от неоперирани животни. Това позволява при анализа на остеопорозните изменения в овариектомирани, не-овариектомирани и здрави животни да бъдат отчетени процесите на физиологично остаряване на всички животни с около 12 месеца до края на изследването.

*Ресурсна план-програма:* В настоящите изследвания са проведени две експериментални постановки.

*Първа експериментална постановка:* Използвани са 64 женски плъха от вивариума на МУ Варна. При обща анестезия с Ketamine 30 mg/kg и Xylazine 30 mg/kg. На животните е направена медиална лапаротомия (15 мм) в тазовата зона. През нея се извършва билатерална овариектомия на 48 животни. На останалите 16 животни, които са контролна група, т. нар. *sham*-оперирани, овариумите остават интактни. Постоперативно на всички животни еднократно е инжектиран Cefazolin в доза 200 mg/kg, IP. След 14 дни период на възстановяване овариектомираните животни се разпределят *at random* в 3 групи по 16 животни. Фармакологичното третиране започва след този възстановителен период и

продължава 12 седмици по представената схема на Таблица 3. 1. Изследваните фармакологични средства се прилагат като разтвор в обем 10 ml/kg, т. м., през стомашна сонда всеки ден във времето 8:30 - 10:30 ч.

Таблица 3. 1. Схема на провежданото фармакологично третиране при първата експериментална постановка

Група	Овариектомия	Третирани
Контрол	<i>sham operated</i>	с дестилирана вода
Остеопороза	приложена	с дестилирана вода
Остеопороза	приложена	с Aronia 10 ml/kg
Остеопороза	приложена	с Aronia 5 ml/kg

*Втора експериментална постановка:* Използвани са 30 женски плъха, получени от вивариума на МУ София. След 7 дни на хабитуация и при обща анестезия с Pentobarbital (12 mg/kg, IP) и Ketamine (50 mg/kg, IP), и локално приложен 1% Lidocaine (0.4 ml/плъх) на животните е направена медиална лапаротомия (15 мм) в тазовата зона. През нея се извършва билатерална овариектомия на 20 животни. На останалите 10 животни, които са контролна група, т. нар. *sham*-оперирани, овариумите остават интактни. Постоперативно на всички животни еднократно е инжектиран Gentamicin в доза 8 mg/kg, *i. m.* След 5 дни период на възстановяване овариектомираните животни се разпределят *at random* в 2 групи по 10 животни. Изследваните фармакологични средства се прилагат като разтвор в обем 0.2 ml/100g, т. м., през стомашна сонда всекидневно във времето 8:30 - 10:30 ч. Фармакологичното третиране започва 6 месеца след оперативните интервенции и продължава 12 седмици по представената схема на Таблица 3. 2.

Таблица 3. 2. Схема на провежданото фармакологично третиране при втората експериментална постановка

Група	Овариектомия	Третирани
Контрол	<i>sham operated</i>	с физиологичен разтвор
Остеопороза	приложена	с физиологичен разтвор
Остеопороза	приложена	с <i>Apium extract 2.5 mg/kg</i>

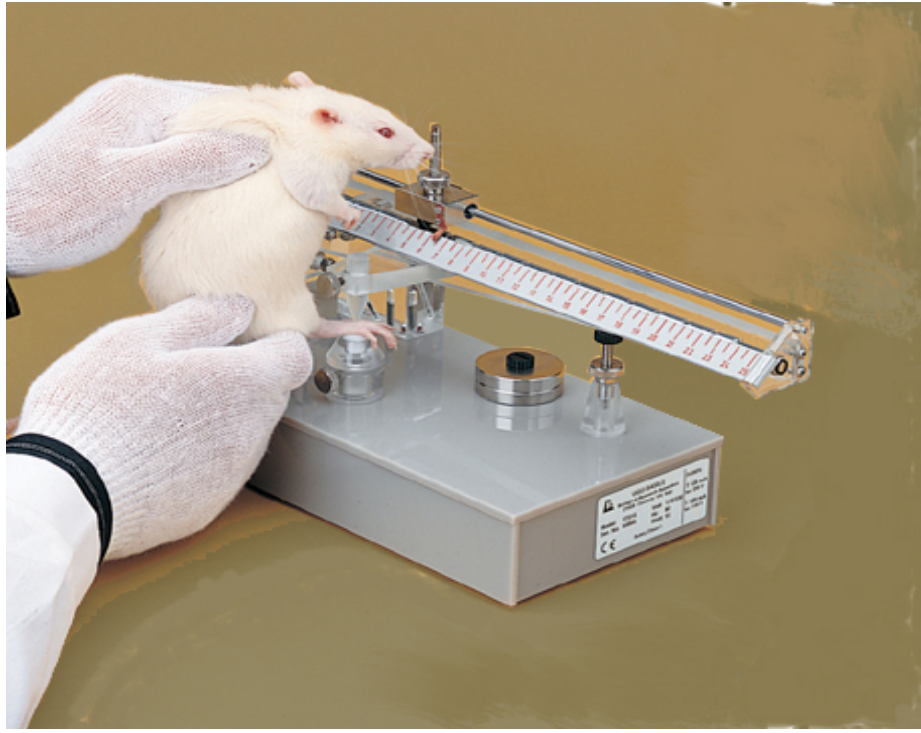
*Apium extract 2.5 mg/kg* (Еквивалентен на *Quercetin 2.4 mg/kg*) във физиологичен разтвор

Ресурсната план-програма осигурява възможности за изследване на промените настъпващи при остеопороза в архитектурата, плътността и минерализацията на костите и ефекта на фармакологично активни субстанции с потенциално антиостеопорозно действие.

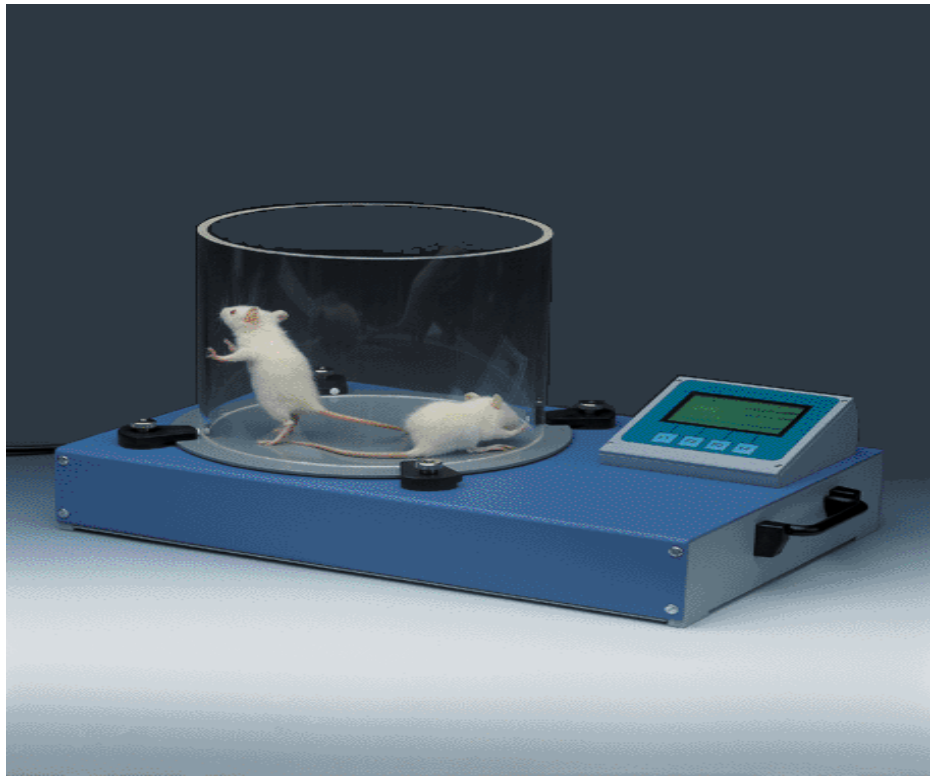
*Изследване: (i) Денситометрия:* Тоталната костна плътност (BMD), минералното съдържание в костите (BMC) на оперирани и неоперирани животни се изследват в следните периоди: 2 седмици преди, 6 месеца след оперативната интервенция и в края на експеримента. При това изследване животните са с обща анестезия с Nembutal (12 mg/kg, IP) и Calypsol (50 mg/kg, IP). За установяване на слабо проявени остеопорозни изменения BMD и BMC се изследват и *ex situ* в изолирани масивни дълги кости. За тези изследвания от десните крайници на 4 животни избрани *at random* от всяка група *post mortem* са отделени фемур и тибия. Денситометричните изследвания се провеждат с апарат за двойно-енергийна рентгенова абсорбциометрия DEXA Hologic Discovery A, версия 13.2:3. Прилага се Small Animal Rat WB компютърна програма за изследване на малки животни. Качествено и количествено калибриране на апарата се извършва всеки ден. Изследванията се провеждат след адекватно калибриране с фантом за изследване на малки животни. Анестезирани животните се позиционират в

апарата и процедурата следва стриктно инструкциите на производителя при технически параметри 140/100 kVp, 2.5 mA avg, 146 sec, 50 Hz, scan length 3.5, scan width 17.9, line splicing 0.1512, point resolution 0.0640, 3.96 x 0.04 coll. Измерват се също общи мастна и мускулна маса на животните. За минимизиране на евентуални субективни вариации в измерванията те се провеждат от един и същ изследовател. Всички 50 дензитометрични изследвания са проведени под ръководството на д-р Н. Темелкова в Център за Остеометрия на Университетска болница Александровска, ул. Г. Софийски № 1, София. (ii) *Ноцицепция*: Ноцицептивните прагове на всяко животно се измерват по схема: 3 пъти в пред-оперативния период, два пъти седмично в пост-оперативния период и 3 пъти седмично в периода на фармакологично третиране. Експериментите се провеждат с начален час 9:00, а в дните на фармакологично третиране непосредствено след третирането. Приложени са алгогенни стимули с различни модалности: ноцицептивен тест (Paw Pressure Test, Тест PP) посредством механичен натиск с аналгезиметър (Randall, L. O., Selitto, J. J., 1957) и ноцицептивен тест (Hot Plate) посредством термично дразнене със затоплена ( $51 \pm 1^\circ \text{C}$ ) плоча (D' Amour, F. F., Smith, D. L., 1941). Аналгезиметърът е апарат, с който се измерва ноцицептивният праг при прилагане на линейно нарастващ натиск върху дорзалната повърхност на заден крайник на животното с конус с маса 74g и контактна площ  $2.2 \text{ mm}^2$ , плъзгащ се с постоянна скорост 40 mm/s по нониус. Болковата чувствителност, респ. ноцицептивният праг, се измерва в относителни единици (RU) в момента, в който силата на приложеното механично дразнене достигне ноцицептивния праг и животното отдръпне крайника си. Ноцицептивният праг, определен с тест „гореща плоча“ е верифициран чрез латентното време (латенция, sec) от момента на прилагане на ноцицептивния стимул до момента на усещане на болка, проявени като защитни рефлексни повдигане/близване на задния крайник. Направени са по три измервания на животно през интервал от два часа. Фигура 3. 1. илюстрира приложените в реални условия тест PP (А) и тест HP (Б).

*Статистически анализ:* Резултатите са представени с Mean±SEM и са анализирани статистически със Student's *t-test* при ниво на достоверност  $P \leq 0.05$ .



**A.**



**Б.**

Фигура 3. 1. Приложения в реални условия Тест РР (А) и Тест НР (Б)



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

Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* (ПСАМ) е приготвян чрез смилане, пресоване, изцеждане и филтриране на свежи плодове от *Aronia melanocarpa* Elliot, отглеждана край Троян. Полученият сок представлява 75-80% от изходната суровина. Той съдържа не по-малко от 13% сухо вещество (определено с рефрактометър). ПСАМ има рН 3.4 и титруема киселинност (като ябълчна киселина) 0.6%. След приготвянето ПСАМ е консервиран чрез пастьоризация при 80°C за 10 min и е консервиран с калиев сорбат (1.0 g/l). До използването му за експерименти е съхраняван в хладилник. Така приготвеният сок е изследван за съдържание на полифеноли и антиоксидантна активност (Вълчева-Кузманова, С. et al., 2014). Анализирани са следните параметри, представени на Таблица 4. 1.

1	Общи феноли
2	Общи проантоцианидини
3	Гликозиди на цианидин
4	Фенолни киселини
5	Капацитет за предотвратяване образуването на хидроксилни радикали
6	Абсорбционен капацитет на кислородния радикал

Данни за съдържанието на биологично активни субстанции в използвания сок от *Aronia*, както и данни за антиоксидантната му активност, са представени на Таблица 4. 2. Таблицата е компилирана по данни от изследвания на други автори (Вълчева-Кузманова, С. et al., 2014).

Таблица 4. 2. Съдържание на биологично активни субстанции в сок от *Aronia melanocarpa* (mg/l) и антиоксидантна активност

Субстанция	
Общи феноли (ЕГК/l)	5461
Общи проантоцианидини	3122.5
Цианидин - галактозид	143.7
Цианидин - арабинозид	61.7
Цианидин - глюкозид	4.4
Цианидин - ксилозид	11.6
Хлорогенова киселина	585
Неохлорогенова киселина	830
КПОХР (ЕГКl)	30560 $\mu\text{mol TE/l}$
АКХР 2 (ТЕ/l)	52045 $\mu\text{mol TE/l}$

*ЕГКl* - еквивалент на галова киселина ( $\mu\text{mol/l}$ ), *КПОХР* - капацитет за предотвратяване образуването на хидроксилни радикали, *АКХР* - абсорбционен капацитет на кислородния радикал, *ТЕ/l* - Trolox еквивалент/litre

## 5. Екстракт от *Apium nodiflorum*

Методите са приложени в изследвания проведени в ИОХЦФ-БАН. Цялото количество екстракт на *Apium*, който е използван в проведените изследвания е получен от ИОХЦФ-БАН.

(l) *Екстрахиране*: Пресни корени от Българска целина (*Apium nodiflorum*) са екстрахирани в метанол в продължение на 24 ч при 18°C. Получените екстракти са филтрирани, събрани и цялото количество изпарено във вакуум до сух остатък.

(ii) *Фитохимичен анализ.* Стандартизацията на екстракта на *Arіum* е извършена чрез квантифициране на тоталното съдържание на феноли и флавоноиди в сухия остатък, разтворен във физиологичен разтвор (10 mg/ml). Флавоноидите са квантифицирани по стандартна крива получена от 0.009, 0.019, 0.037, 0.075 и 0.19 mg/ml Quercetin при абсорбция 425 nm. Фенолите са квантифицирани по стандартна крива получена от 0.009, 0.019, 0.037, 0.075 и 0.19 mg/ml Gallic acid при абсорбция 760 nm. Анализът е извършен в трипликат за всяка концентрация.

## V. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ

### 1. Експериментален епилептиформен синдром

#### 1. 1. Изследвания на антиепилептично/антиконвулсивно действие на стероидни супраренални и полови хормони

Експерименталните данни показват, че след отстраняване на супрареналните жлези и тестисите (група Г2) настъпва значително скъсяване на латентното време от прилагането на епилептогенен стимул до появата на слаби клонични гърчове. Латентното време се скъсява от  $130.2 \pm 11.5$  мин при животните със запазени жлези (група Г1) на  $61.2 \pm 5.1$  мин при тези с отстранени жлези (група Г2), т. е. латенцията е скъсена с 53% (Табл. 1. 1.). След третиране с *17 $\beta$ -Estradiol* (група Г4) настъпва силно изостряне на епилептиформения синдром. Резултатите показват, че след третиране с естрогена слабите клонични гърчове се появяват значително по-рано, отколкото при липсата му. Латентното време е намалено от  $61.2 \pm 5.1$  мин (група Г2) на  $31.4 \pm 4.6$  мин (група Г4), т. е. латенцията е скъсена с 49%. Естествена консеквенция на тези изследвания бе проектът да продължи с проучване на ефекта върху епилептогенезата на хормон с противоположно физиологично действие, т. е. андрогенен хормон. Качествено аналогичен, но количествено по-силно проявен е ефектът на андрогенния аналог *5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone*. Получените резултати показват, че третирането с *5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone* силно агравира всички клонични компоненти на индуцирания епилептиформен синдром. Средното латентно време за появата на първите крампи или на слаби клонични гърчове е намалено от  $34.0 \pm 3.3$  мин на  $19.0 \pm 2.2$  мин, респ. от  $61.2 \pm 5.1$  мин на  $33.6 \pm 5.3$  мин (група Г7), т. е. латенцията за появата им е скъсена съответно с 44% и 45%. Резултатите от проведените изследвания показват, че субституция на гестагени (група Г5 и група Г6) или кортикостероиди (група Г3) не предизвиква съществени изменения на латентното време за поява на клонични компоненти в

kainic acid-индуцирания експериментален епилептиформен синдром. Резултатите от тези изследвания са сумирани в Таблица 1. 1.

Таблица 1. 1. Ефект на стероидни супраренални и полови хормони върху клоничните компоненти на kainic acid-индуциран експериментален епилептиформен синдром

Латентно време клонични гърчове (min)			
Група (1-7)	Вещество	Първи крампи	Слаби гърчове
Sham (N9)	<i>Olive oil</i>	31.2±3.9 (N9)	130.2±11.5 <sup>a</sup> (N5)
Оперирани (N8)	<i>Olive oil</i>	34.0±3.3 (N8)	61.2±5.1 (N6)
Оперирани (N8)	<i>Corticosterone</i>	30.5±1.8 (N5)	63.2±2.6 (N6)
Оперирани (N8)	<i>17β-Estradiol</i>	29.0±4.3 <sup>c</sup> (N8)	31.4±4.5 <sup>a</sup> (N8)
Оперирани (N9)	<i>Progesterone</i>	44.2±10.8 (N9)	66.2±14.2 (N9)
Оперирани (N9)	<i>5α-DHP</i>	35.2±5.2 (N9)	44.2±5.2 <sup>c</sup> (N4)
Оперирани (N9)	<i>5α-DHT</i>	19.0±2.2 <sup>b</sup> (N9)	33.6±5.3 <sup>b</sup> (N9)

*N* - показва брой животни в група и респективно със съответен конвулсивен симптом; <sup>a</sup>  $P \leq 0.001$ , <sup>b</sup>  $P \leq 0.01$ , <sup>c</sup>  $P \leq 0.05$  vs Г2

Експерименталните данни показват, че след отстраняване на супрареналните жлези и тестисите (група Г2) настъпва значително намаляване на латентното време от прилагането на епилептогенен стимул до появата на субмаксимални тонични гърчове. Латентното време се скъсява от 95.0 мин при животните със запазени жлези (група Г1) на 62.5±18.5 мин при животните с отстранени жлези (група Г2), т. е. латенцията е скъсена с 34% (Таблица 1. 2.). Резултатите показват, че третирането с *5α-Dihydrotestosterone* агравира всички тонични компоненти на индуцирания епилептиформен синдром. Средното латентно време за появата на слаби тонични гърчове е намалено от 62.5±18.5 мин на 35.0±4.8 мин (група Г7) -

латенцията за появата им е скъсена с 44%. За разлика от клоничните гърчове третирането с гестагенния аналог *5 $\alpha$ -Dihydroprogesterone* предизвиква количествено аналогичен, но качествено противоположен ефект върху максималните тонични гърчове. Тяхното латентно време нараства от 60.0 мин (група Г2) на 92.0 мин (група Г6), т. е. латенцията е увеличена с 35%. Третирането с *17 $\beta$ -Estradiol* (група Г4) не предизвиква достоверни изменения на латентното време за поява на субмаксимални и максимални тонични гърчове след прилагане на епилептогенен стимул с *kainic acid*. Третирането с *Corticosterone* (група Г3) потиска напълно появата на тонични компоненти в индуцирания с *kainic acid* експериментален епилептиформен синдром. Резултатите от тази група изследвания са сумирани в Таблица 1. 2.

Таблица 1. 2. Ефект на стероидни супраренални и полови хормони върху тоничните компоненти на *kainic acid*-индуциран експериментален епилептиформен синдром

Латентно време тонични гърчове (min)			
Група (1-7)	Вещество	Субмаксимални	Максимални
Sham (N9)	<i>Olive oil</i>	95.0 <sup>b</sup> (N1)	- (N0)
Оперирани (N8)	<i>Olive oil</i>	62.5 $\pm$ 18.5 (N2)	60.0 (N1)
Оперирани (N8)	<i>Corticosterone</i>	- (N0)	- (N0)
Оперирани (N8)	<i>17<math>\beta</math>-Estradiol</i>	48.4 $\pm$ 8.6 (N7)	82.3 $\pm$ 37.9 (N3)
Оперирани (N9)	<i>Progesterone</i>	80.0 $\pm$ 28.2 (N4)	- (N0)
Оперирани (N9)	<i>5<math>\alpha</math>-DHP</i>	69.1 $\pm$ 14.1 (N6)	92.0 <sup>c</sup> (N1)
Оперирани (N9)	<i>5<math>\alpha</math>-DHT</i>	35.0 $\pm$ 4.8 <sup>b</sup> (N4)	- (N0)

*N* - показва брой животни в група и респективно с проявен конвулсивен симптом,

“–“ показва, че съответният конвулсивен симптом не е наблюдаван; <sup>a</sup>  $P \leq 0.001$ ,

<sup>b</sup>  $P \leq 0.01$ , <sup>c</sup>  $P \leq 0.05$  vs Г2

Прилагането на ново-създадената скала за оценка на конвулсивните компоненти позволява да бъдат квантифицирани моторните и когнитивни компоненти на експерименталния kainic acid-индуциран епилептиформен синдром. Експерименталните данни показват, че след отстраняване на надбъбречните жлези и тестисите (група Г2) настъпва значително обостряне на епилептиформения синдром. Интензитетът на епилептичната симптоматика на плъхове в квази-физиологичен статус, при който жлезите са останали интактни, т. нар. *sham*-оперирани животни, е  $2.66 \pm 0.31$  (Табл. 1. 3.). Интензитетът на епилептичния конвулсивен синдром след отстраняване на супрареналните жлези и тестисите става  $4.0 \pm 0.42$ , т. е. клиничните прояви на синдрома са с 50% по-лоши. Третирането на оперирани животни с *17 $\beta$ -Estradiol* предизвиква съществено влошаване на двигателния компонент на епилептиформения синдром. Квантифицирано това се проявява с над 31% увеличаване на стойностите на интензитета на конвулсивния синдром, които от  $4.0 \pm 0.42$  при изразен хормонален дефицит нарастват на  $5.25 \pm 0.25$  след третирането с *17 $\beta$ -Estradiol* (група Г4). За разлика от естрогените, субституцията на кортикостероиди предизвиква категорично противоположен ефект. Данните показват, че приложението с *Corticosterone* понижава интензитета на конвулсивния синдром до  $2.75 \pm 0.09$  (група Г3), т. е. кортикостероидите „омекотяват“ епилептиформената активност при плъхове с „тотален“ хормонален дефицит до тази на животните с нормални хормонални нива (група Г1). От резултатите е видно, че прилагането на гестагени (група Г5 и група Г6) или андрогени (група Г7) не променя интензитета на конвулсивния синдром. Резултатите от тази група изследвания са обобщени в Таблица 1. 3. Ефектът на изследваните хормони върху интензитета на конвулсивните симптоми кореспондира с ефекта на тези хормони върху леталитета при kainic acid-индуциран експериментален епилептиформен синдром. Премахването на супрареналните жлези и тестисите предизвиква трикратно увеличаване на леталитета от 11.1% на 37.5%. Рязко нарастване на леталитета при евокирания епилептиформен синдром до 87.5% настъпва след прилагане на *17 $\beta$ -Estradiol* (група Г4). Това контрастира с пълното блокиране на

леталността при животните след третиране с *Corticosterone* (група Г3). Предизвиканият тежък хормонален дефицит на оперираните и нетретираните плъхове скъсява достоверно с 24% времето за настъпване на екзитус при развитие на епилептичен статус от 97.0 мин на  $74.0 \pm 3.5$  мин (група Г2). Третирането с естрогени (група Г4) или гестагени (група Г5 и група Г6) не променя времето до настъпване на екзитус. Този ефект контрастира със значителното скъсяване на времето до настъпване на екзитус с 24% след третиране с андрогени. Резултатите показват, че прилагането на *5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone* скъсява времето за настъпване на екзитус след инжектиране на епилептогенния стимул от  $74.0 \pm 3.5$  мин на  $56.5 \pm 13.1$  мин (група Г7). Резултатите от тези експерименти са обобщени в Таблица 1. 3.

Таблица 1. 3. Ефект на супраренални и полови стероидни хормони върху интензитета, леталитета и времето до екзитус на плъхове с kainic acid-индуциран експериментален епилептиформен синдром

Вещество	Интензитет (RU)	Леталитет (%)	Екзитус (min)
Г1 Olive oil	$2.66 \pm 0.31$ <sup>b</sup>	11.1 <sup>a</sup> (N1)	97.0 <sup>b</sup> (N1)
Г2 Olive oil	$4.0 \pm 0.42$	37.5 (N3)	$74.0 \pm 3.5$ (N3)
Г3 Corticosterone	$2.75 \pm 0.09$ <sup>a</sup>	- (N0)	- (N0)
Г4 17 $\beta$ -Estradiol	$5.25 \pm 0.25$ <sup>b</sup>	87.5 <sup>a</sup> (N7)	$87.3 \pm 24.1$ (N7)
Г5 Progesterone	$3.71 \pm 0.43$	44.4 <sup>c</sup> (N4)	$87.0 \pm 32.5$ (N4)
Г6 5 $\alpha$ -DHP	$4.55 \pm 0.33$	44.4 <sup>c</sup> (N4)	$86.5 \pm 13.0$ (N4)
Г7 5 $\alpha$ -DHT	$4.11 \pm 0.30$	44.4 <sup>c</sup> (N4)	$56.5 \pm 13.1$ <sup>b</sup> (N4)

*N* - показва брой животни в група и респективно със съответния клиничен/патолого-анатомичен детерминант, “ – “ показва, че съответният детерминант на конвулсивния епилептиформен синдром не е наблюдаван; <sup>a</sup>  $P \leq 0.001$ , <sup>b</sup>  $P \leq 0.01$ , <sup>c</sup>  $P \leq 0.05$  vs Г2



*Обобщение на експерименталните резултати:* Отстраняването на супрареналните жлези и тестисите силно влошава клиничните и патологични параметри на протичането на kainic acid-индуциран експериментален епилептиформен синдром. На този фон третирането с естрогени или андрогени има силно изразено неблагоприятно действие върху тези параметри. За разлика от това, прилагането на глюкокортикоиди може да антагонизира напълно неблагоприятното действие на тези хормони върху клиничната картина и патологичните параметри на kainic acid-индуцирания конвулсивен синдром.

## **1. 2. Изследвания на аналгетично действие на новосинтезирани 2Н-хромен-субституирани хидразид-хидразони**

В тази серия експериментите са насочени главно към изследване на възможен аналгетичен ефект на пет от новосинтезираните субстанции, за които се предвижда, че могат да покажат аналгетична активност. Изследваните субстанции са въвеждани интраперитонеално като 1% разтвор в DMSO в краен инжекционен обем 1 ml в доза ED<sub>50</sub> на всяка изследвана субстанция. Стойностите на ED<sub>50</sub> са взети от предишна публикация и са представени в Таблица 1. 2. 1. Тези субстанции са означени като 4a, 4b, 4c, 8a и 8b, както са кодирани по-рано от авторите (Angelova, V. T., et al., 2017).

Таблица 1. 2. 1. Използвани дози при интраперитонеално инжектиране на изследваните субстанции (mg/kg)

<b>Контрол</b>	<b>4a</b>	<b>4b</b>	<b>4c</b>	<b>8a</b>	<b>8b</b>
1% DMSO	100	70	80	90	12.5

Получените резултати от тест Hot Plate показват, че веществото 8b има изразен аналгетичен ефект, който настъпва 25-30 min след инжектирането. Данните

показват, че латентното време се увеличава от  $22 \pm 2$  sec в контролната група на  $53 \pm 6$  sec в третираната група, т. е. увеличението е над 2 пъти. Значително по-слаб е ефектът на субстанциите 8a и 4c. По силата на своето аналгетично действие субстанциите могат да бъдат степенувани в следния порядък:  $8b > 8a > 4c$ . Резултатите получени в тези изследвания са обобщени в Таблица 1. 2. 2.

Таблица 1. 2. 2. Ефект на новосинтезирани 2Н-хромен-субституирани хидразид-хидразони върху ноцицепцията тест “Hot Plate”

Време (тест) (min)	Латентно време (sec)					
	Контрол	4a	4b	4c	8a	8b
0-5	$22 \pm 3$	$24 \pm 2$	$21 \pm 2$	$25 \pm 3$	$27 \pm 2$	$24 \pm 1$
25-30	$22 \pm 2$	$28 \pm 9$	$30 \pm 4$	$38 \pm 6^c$	$35 \pm 5^c$	$53 \pm 6^b$

<sup>b</sup>  $P \leq 0.01$ , <sup>c</sup>  $P \leq 0.05$  vs Контрол

Хипералгезията може да бъде компонент на комплексната клинична картина на епилептиформения синдром. За изследване на хипералгезни изменения на ноцицепцията е приложен формалинов тест. Данните от проведената серия експерименти показват, че субстанциите 4a и 4c имат добре проявено антиноцицептивно действие както в най-ранните, така и в късните периоди след инжектирането. По-слаб антиноцицептивен ефект в късните периоди след инжектиране проявяват субстанциите 8a и 8b. Резултатите, получени в тези изследвания, са представени в Таблица 1. 2. 3.

Таблица 1. 2. 3. Ефект на новосинтезирани 2Н-хромен-субституирани хидразид-хидразони върху ноцицепцията - тест „Formalin”

Време (тест) (min)	Реакционно време (sec)					
	Контрол	4a	4b	4c	8a	8b
0-5	68±18	18±7 <sup>a</sup>	56±16	24±9 <sup>b</sup>	40±7	50±4
25-30	120±19	31±10 <sup>a</sup>	82±10	56±14 <sup>b</sup>	58±18 <sup>c</sup>	60±11 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>  $P \leq 0.001$ , <sup>b</sup>  $P \leq 0.01$ , <sup>c</sup>  $P \leq 0.05$  vs Контрол

Обобщение на експерименталните резултати: Получените данни показват, че в серията оригинални новосинтезирани хромен-субституирани хидразид-хидразони има съединения с проявен антиноцицептивен ефект. Чрез НР тест е установено, че проявено антиноцицептивно действие имат три от новосинтезираните хромен-субституирани хидразид-хидразони - 4c, 8a и 8b. По сила на антиноцицептивното действие верифицирано с НР тест тези съединения се нареждат като 8b > 8a > 4c. Чрез тест „Formalin” е показано, че съединенията 4a и 4c проявяват умерено аналгетично действие верифицирано като 4a > 4c. Горните данни заедно с установените по-рано антиконвулсивни ефекти (Angelova, V. T., et al., 2017) аргументират становището, че новосинтезираните хромен-субституирани хидразид-хидразони имат терапевтичен потенциал и могат да представляват интерес за създаване на нови антиепилептични агенти.

## 2. Експериментален модел на естроген-дефицитна остеопороза

### 2. 1. Изследвания на антиостеопорозно и аналгетично действие на сок от Aronia 10 ml/kg и сок от Aronia 5 ml/kg

## Промени в костната минерална плътност

Данните от дензитометричните изследвания показват, че дефицитът на естрогени, който настъпва след тотална овариектомия, предизвиква остеопорозни изменения и намаляване на костната минерална плътност (КМП) в изследваните дълги кости на задните крайници - отделени *at random* и екстерминирани по 3-4 животни от всяка група. Усреднените стойности показват, че КМП е понижена от  $0.297 \pm 0.003 \text{ g/cm}^2$  на  $0.263 \pm 0.002 \text{ g/cm}^2$  във фемура и от  $0.230 \pm 0.001 \text{ g/cm}^2$  на  $0.217 \pm 0.002 \text{ g/cm}^2$  в тибията, т. е. КМП е намалена с 11%, респ. с 6%. Средните стойности на КМП на фемура от животни с остеопороза са  $0.263 \pm 0.002 \text{ g/cm}^2$ , а на третираните с 10 ml/kg сок от Aronia -  $0.299 \pm 0.01 \text{ g/cm}^2$ , т. е. понижението на КМП с 11%, което е установено при остеопороза, е напълно елиминирано. Ефектът на Aronia 5 ml/kg сок е аналогичен, но по-слабо изявен от ефекта на Aronia 10 ml/kg сок. Средните стойности на КМП на фемура са  $0.278 \pm 0.009 \text{ g/cm}^2$ , т. е. КМП остава понижена с 6% спрямо тази на контролната група. Резултатите от тези измервания са представени в Таблица 2. 1. 1.

Таблица 2. 1. 1. Ефект на 10 ml/kg съответно 5 ml/kg сок от Aronia върху костната минерална плътност на кости от заден крайник на плъхове в експериментален модел на остеопороза

Костна минерална плътност (g/cm <sup>2</sup> )		
Група	Фемур	Тибия
Контрол	$0.297 \pm 0.003$ (n4)	$0.230 \pm 0.001$ (n4)
Остеопороза	$0.263 \pm 0.002^a$ (n4) (-11%)	$0.217 \pm 0.002^a$ (n4) (-6%)
О. Aronia 10 ml/kg	$0.299 \pm 0.01$ (n4) (+1%)	ns (n4)
О. Aronia 5 ml/kg	$0.278 \pm 0.009^a$ (n4) (-6%)	ns (n4)

*n* - показва брой животни от всяка група, на които е проведено *post mortem* денситометрично измерване на костната минерална плътност в кости на заден крайник (+/- %) - стойност на промяната vs Контрол, *ns* - недостоверна разлика, <sup>a</sup>  $P \leq 0.05$  vs Контрол

Данните от денситометричните изследвания показват, че продължителното третиране със сок от *Aronia* може да възпрепятства развитието на остеопорозни изменения в костната структура на фемура. Прилагането на сок от *Aronia* 10 ml/kg задържа КМП на фемура на овариектомираните животни на нива, които са типични за здравите животни. На Фигура 2. 1. 1. и Фигура 2. 1. 2. са представени оригинални дензитографии на изследваните кости, които са представителни за костната структура и КМП на животните от група Контрол и група Остеопороза. На Фигура 2. 1. 3. и Фигура 2. 1. 4. са представени оригинални дензитографии на изследваните кости, които са представителни за костната структура и КМП на животните от група Остеопороза+*Aronia* 10 ml/kg и група Остеопороза+*Aronia* 5 ml/kg. За разлика от благоприятното повлияване на остеопорозните изменения на КМП във фемура при третирането с екстракти на *Aronia* при този терапевтичен протокол в тибиялните кости не е установен статистически достоверен благоприятен ефект върху КМП при проявена остеопороза. Може да се допусне, че статичното и динамично натоварване на тибията са по-слаби и кореспондират с по-тънка костна структура и фина архитектоника на тази кост сравнение с фемура и могат да допринасят в известна степен за липсата на ефект.

Osteo Unit Alexandrovska University Hospital  
1 St. Georgi Sofiyski  
Sofia, Bulgaria 1431

II B

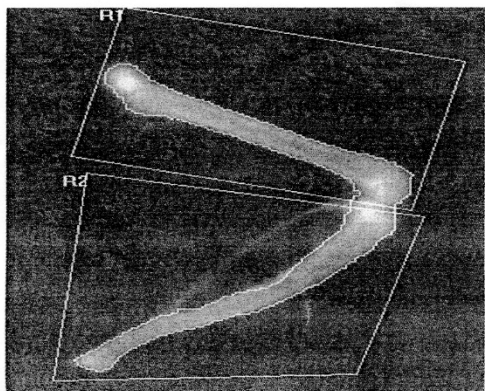
Telephone: 029230528

Name: 2.6  
Patient ID:  
DOB:

Sex: Female  
Ethnicity: White

Height:  
Weight:  
Age:

Referring Physician:



k = 1.194, d0 = 73.2  
159 x 185

**Scan Information:**

Scan Date: 27 July 2017 ID: D0727170C  
Scan Type: h Hi-Res  
Analysis: 27 July 2017 13:39 Version 13.3:3  
Subregion Hi-Res  
Operator:  
Model: Discovery A (S/N 45654)  
Comment:

**DXA Results Summary:**

Region	Area (cm <sup>2</sup> )	BMC (g)	BMD (g/cm <sup>2</sup> )
GLOBAL	2.60	0.70	0.269
R1	1.35	0.41	0.301
R2	1.21	0.28	0.231
Net	2.56	0.69	0.268

ACF = 0.991, BCF = 0.993, TH = 1.734

No Reference Curve Available

**Comment:**

**HOLOGIC**

Фигура 2. 1. 1. Оригинална *post mortem* денситография и костна минерална плътност (BMD) на *фемур* (R1) и *тибия* (R2) на плъх II-B от група Контрол

**Osteo Unit Alexandrovska University Hospital**  
 1 St. Georgi Sofiyski  
 Sofia, Bulgaria 1431

IV C

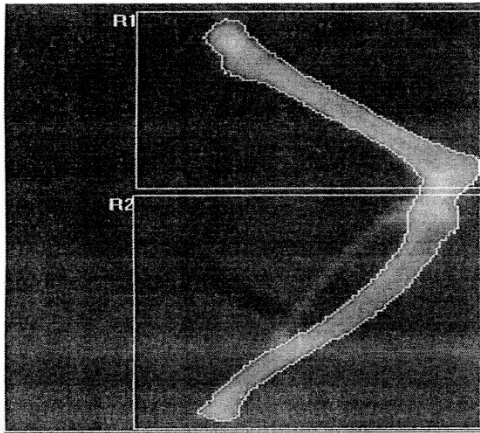
Telephone: 029230528

Name: 4.7  
 Patient ID:  
 DOB:

Sex: Female  
 Ethnicity: White

Height:  
 Weight:  
 Age:

Referring Physician:



k = 1.194, d0 = 73.1  
 159 x 185

**Scan Information:**

Scan Date: 27 July 2017 ID: D0727170K

Scan Type: h Hi-Res

Analysis: 27 July 2017 16:46 Version 13.3:3  
 Subregion Hi-Res

Operator:

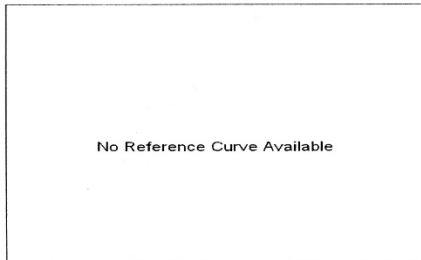
Model: Discovery A (S/N 45654)

Comment:

**DXA Results Summary:**

Region	Area (cm <sup>2</sup> )	BMC (g)	BMD (g/cm <sup>2</sup> )
GLOBAL	2.48	0.57	0.229
R1	1.23	0.32	0.256 ✓
R2	1.22	0.25	0.202 ✓
<b>Net</b>	<b>2.46</b>	<b>0.56</b>	<b>0.229</b>

ACF = 0.991, BCF = 0.993, TH = 1.742



**Comment:**

**HOLOGIC®**

Фигура 2. 1. 2. Оригинална *post mortem* дензитография и костна минерална плътност (BMD) на *фемур* (R1) и *тибия* (R2) на плъх IV-C от група Остеопороза

Osteo Unit Alexandrovska University Hospital  
1 St. Georgi Sofiyski  
Sofia, Bulgaria 1431

VIII A

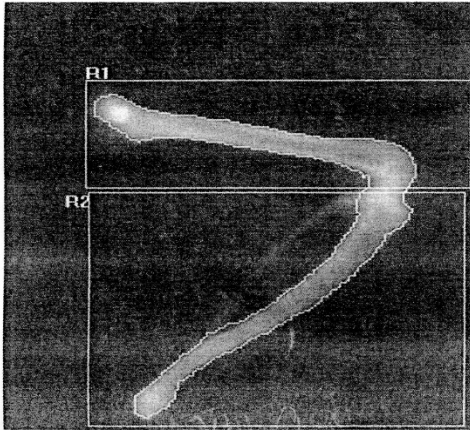
Telephone: 029230528

Name: 8.5  
Patient ID:  
DOB:

Sex: Female  
Ethnicity: White

Height:  
Weight:  
Age:

Referring Physician:



k = 1.194, d0 = 73.2  
159 x 185

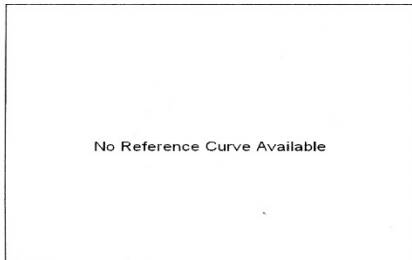
**Scan Information:**

Scan Date: 27 July 2017 ID: D0727170T  
Scan Type: h Hi-Res  
Analysis: 27 July 2017 15:37 Version 13.3:3  
Subregion Hi-Res  
Operator:  
Model: Discovery A (S/N 45654)  
Comment:

**DXA Results Summary:**

Region	Area (cm <sup>2</sup> )	BMC (g)	BMD (g/cm <sup>2</sup> )
GLOBAL	2.47	0.64	0.258
R1	1.19	0.36	0.305
R2	1.26	0.27	0.213
Net	2.46	0.63	0.258

ACF = 0.991, BCF = 0.993, TH = 1.743



**Comment:**

HOLOGIC®

Фигура 2. 1. 3. Оригинална *post mortem* денситография и костна минерална плътност (BMD) на *фемур* (R1) и *тибия* (R2) на плъх VIII-A от група Остеопороза и сок 10 ml/kg от Aronia



**Osteo Unit Alexandrovska University Hospital**  
 1 St. Georgi Sofiyski  
 Sofia, Bulgaria 1431



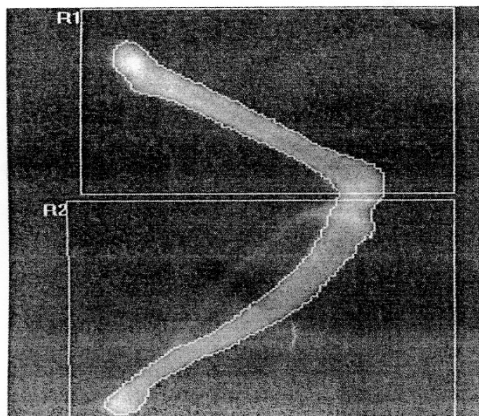
Telephone: 029230528

Name: 6.8  
 Patient ID:  
 DOB:

Sex: Female  
 Ethnicity: White

Height:  
 Weight:  
 Age:

Referring Physician:



k = 1.192, d0 = 73.3  
 159 x 185

**Scan Information:**

Scan Date: 27 July 2017 ID: D0727170N  
 Scan Type: h Hi-Res  
 Analysis: 27 July 2017 16:39 Version 13.3:3  
 Subregion Hi-Res  
 Operator:  
 Model: Discovery A (S/N 45654)  
 Comment:

**DXA Results Summary:**

Region	Area (cm <sup>2</sup> )	BMC (g)	BMD (g/cm <sup>2</sup> )
GLOBAL	2.45	0.58	0.236
R1	1.15	0.31	0.267 ✓
R2	1.27	0.26	0.206
Net	2.42	0.57	0.235

ACF = 0.991, BCF = 0.993, TH = 1.745

No Reference Curve Available

**Comment:**

**HOLOGIC®**

Фигура 2. 1. 4. Оригинална *post mortem* денситография и костна минерална плътност (BMD) на *фемур* (R1) и *тибия* (R2) на плъх VI-D от група Остеопороза и сок 5 ml/kg от Aronia

### Промени в костното минерално съдържание

Данните от денситометричните изследвания показват, че дефицитът на естрогени, който настъпва след тотална овариектомия, предизвиква несъществено понижаване на костното минерално съдържание (КМС) в изолираните *at random* изследвани дълги кости на задните крайници. Усреднените стойности показват тенденция за понижаване на КМС само във фемура. Средната стойност на костното минерално съдържание спада от  $0.34 \pm 0.03$  g на  $0.32 \pm 0.01$  g, т. е. намалява с около 6%. Не са установени съществени промени в минералното съдържание след третиране с Aronia. Резултатите от тези измервания са представени в Таблица 2. 1. 2.

Таблица 2. 1. 2. Ефект на сок от Aronia 10 ml/kg и сок от Aronia 5 ml/kg върху минералното съдържание в кости на заден крайник на плъхове в експериментален модел на остеопороза

Костно минерално съдържание (g)			
	Фемур	Тибия	Тотално
Контрол	$0.34 \pm 0.03$ (n4)	$0.26 \pm 0.01$ (n4)	$0.61 \pm 0.04$ (n4)
Остеопороза	$0.32 \pm 0.01$ (n4) (-6%)	$0.27 \pm 0.01$ (n4) ns	$0.61 \pm 0.02$ (n4) ns
О. + Aronia 10 ml/kg	$0.34 \pm 0.01$ (n4) ns	$0.26 \pm 0.006$ (n4) ns	$0.63 \pm 0.006$ (n4) ns
О. + Aronia 5 ml/kg	$0.33 \pm 0.006$ (n4) ns	$0.26 \pm 0.03$ (n4) ns	$0.60 \pm 0.008$ (n4) ns

*n* - показва брой животни от всяка група, на които е проведено *post mortem* денситометрично измерване на минералното съдържание в кости на заден крайник (-%) - стойност на промяната vs Контрол, ns - недостоверна разлика

### Промени на болковата чувствителност

Данните от проведените експерименти показват, че достоверни резултати са получени от изследванията с тест Hot Plate. Използването на тест Randall-Selitto не се оказва ефективно. Резултатите от направените измервания са представени в Таблица 2. 1. 3. Данните показват, че при състояние на проявена остеопороза прагът на болка са понижава достоверно. При тест Hot Plate прагът на болка се понижава 13% - от  $32.55 \pm 1.36$  sec на  $28.26 \pm 1.18$  sec. Третирането със сок от Aronia 10 ml/kg и Aronia 5 ml/kg възстановява нивата на ноцицепция до тези на контролните животни, т. е може да намали достоверно болковата чувствителност в модел на експериментална остеопороза.

Таблица 2. 1. 3. Ефект на 10 ml/kg сок от Aronia и 5 ml/kg сок от Aronia върху болковата чувствителност на плъхове в експериментален модел на остеопороза

Група	Тест Randall-Selitto (RU)	Тест Hot Plate (sec)
Контрол	$4.58 \pm 0.27$ (n32)	$32.55 \pm 1.36$ (n37)
Остеопороза	$4.71 \pm 0.20$ (n35) ns	$28.26 \pm 1.18$ <sup>a</sup> (n42) (-13%)
О. + Aronia 10 ml/kg	$4.69 \pm 0.19$ (n39) ns	$35.52 \pm 0.99$ (n45) ns
О. + Aronia 5 ml/kg	$5.01 \pm 0.19$ (n33) ns	$34.33 \pm 1.08$ (n39) ns

*n* - показва общия брой самостоятелни измервания направени на животните от всяка групи в два последователни дни (-%) - стойност на промяната vs Контрол, ns - недостоверна разлика, <sup>a</sup>  $P \leq 0.05$  vs Контрол

Обобщение на експерименталните резултати: Представени са убедителни дензитометрични доказателства, че естроген-дефицитна експериментална остеопороза на плъх може да бъде използвана като достоверен модел на постменопаузна остеопороза при жени. Резултатите показват, че продължителното третиране със сок от Aronia 10 ml/kg може да забави развитието на остеопорозни

изменения на костите. В унисон с резултати от изследванията на минералната костна плътност са данните за промени в болковата чувствителност. При остеопороза ноцицептивните прагове, измерени с тест Hot Plate, са понижени достоверно. Третирането със сок от Aronia 10 ml/kg може да действа благоприятно, като облекчава болката при състояние на проявена остеопороза. Приложената схема на фармакологичното третиране със сок от Aronia 10 ml/kg и Aronia 5 ml/kg не предизвиква съществени промени в минералното съдържание. Налице е известна тенденция за понижаване на КМС във фемура, която би могла да спре след третиране със сок от Aronia 10 ml/kg.

## **2. 2. Изследвания на антиостеопорозно действие на екстракт от Arium**

В продължение на целия пост-оперативен период телесното тегло на оперираните и не-оперирани животни беше регулярно измервано. Данните показват, че телесното тегло на не-овариектомираните плъхове е увеличено с 19.5%. В пред-оперативния период средното телесно тегло в групата с интактни овариуми е  $231 \pm 4.0$  g. Шест месеца по-късно се увеличи с 20% на  $276 \pm 12$  g. За разлика от не-оперираните плъхове средното телесно тегло в групите с направена овариектомия е увеличено с над 32%. Непосредствено преди оперативната интервенция средното телесно тегло на животните е  $239 \pm 8$  g. Шест месеца след овариектомията средното телесно тегло на животните от тези групи достига  $317 \pm 8$  g. Данните от измерванията показват, че теглото на мастната тъкан в овариектомираните плъхове нараства значително. Това е потвърдено и в направена *post mortem* секция на голям брой животни. След приключване на експериментите е направено също *post mortem* измерване на теглото на утеруса на част от животните във всяка група. Средното тегло на утеруса на животни от контролната група животни е  $0.71 \pm 0.1$  g (N=3). Теглото на утеруса на животни с овариектомия е  $0.42 \pm 0.02$  g (N=3). Данните са валидни и за Раздел 2.1.

## Промени в костната минерална плътност

Дензитометричният анализ показва, че при модела на естрогенен дефицит при отстранени овариуми, промените на костната минерална плътност са слаби или липсват. Усреднените данни от *ex situ* дензитометрични измервания показват, че костната минерална плътност е намалена от  $0.294 \pm 0.003 \text{ g/cm}^2$  на  $0.278 \pm 0.005 \text{ g/cm}^2$  във фемура, т. е. намалението е 5%, а в тибията от  $0.234 \pm 0.004 \text{ g/cm}^2$  на  $0.224 \pm 0.01 \text{ g/cm}^2$ , т. е. намалението е 4%. На фона на тези промени на костната минерална плътност е документирано, че третирането с екстракт на *Arіum* при този експеримент има несигурен ефект. Резултатите от тези измервания са представени в Таблица 2. 2. 1.

Таблица 2. 2. 1. Ефект на екстракт на *Arіum nodiflorum* върху костната минерална плътност на кости от заден крайник при експериментален модел на постменопаузна остеопороза

Костна минерална плътност (g/cm <sup>2</sup> )		
Група	Фемур	Тибия
Контрол	$0.294 \pm 0.003$ (n4)	$0.234 \pm 0.004$ (n4)
Остеопороза	$0.278 \pm 0.005^a$ (n4) (-5%)	$0.224 \pm 0.01^a$ (n4) (-4%)
Остеопороза <i>Arіum</i>	$0.285 \pm 0.005^a$ (n3) (-2%)	$0.226 \pm 0.01$ (n3) ns

*n* - показва брой животни от всяка група, на които е проведено *post mortem* дензитометрично измерване на плътността в кости на заден крайник, (-%) - стойност на промяната vs Контрол, ns - недостоверна разлика, <sup>a</sup>  $P \leq 0.05$  vs Контрол

### Промени в костното минерално съдържание

Резултатите от денситометричните изследвания показват, че при естрогенния дефицит след отстраняване на овариумите не настъпват съществени промени в минералното съдържание на фемура и тибията. Не са документирани промени на минералното съдържание в изследваните кости при третиране с екстракт на *Apium* през този етап. Резултатите от тези измервания са представени в Таблица 2. 2. 2.

Таблица 2. 2. 2. Ефект на екстракт от *Apium nodiflorum* върху минералното съдържание в кости на заден крайник при експериментален модел на постменопаузна остеопороза

Костно минерално съдържание (g)			
Група	Фемур	Тибия	Тотално
Контрол	0.31±0.01 (n4)	0.24±0.01 (n4)	0.57±0.04 (n4)
Остеопороза	0.28±0.01 <sup>a</sup> (n4) (-6%)	0.21±0.02 (n4) ns	0.61±0.02 (n4) ns
О. + <i>Apium</i>	0.32±0.01 (n4) ns	0.26±0.006 (n4) ns	0.63±0.006 (n4) ns

*n* - показва брой животни от всяка групи на които е проведено *post mortem* денситометрично измерване на минералното съдържание в кости на заден крайник, (-%) - стойност на промяната vs Контрол, ns - недостоверна разлика, <sup>a</sup>  $P \leq 0.05$  vs Контрол

Обобщение на експерименталните резултати: Представените данни показват, че при този етап на естрогенен дефицит с отстранени овариуми, не настъпват съществени остеопорозни промени в костите. Фармакотерапията с екстракт на *Apium* като антиостеопорозно средство има несигурен ефект при третиране, което вероятно се дължи на недостатъчна продължителност.

## VI. АНАЛИЗ И ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

### ***Ефект на стероидни супраренални и полови хормони върху експериментален kainic acid-индуциран епилептиформен конвулсивен синдром***

Данните от проведените изследвания допълват съществуващата информация за действието на стероидните супраренални и гонадни хормони върху епилептогенезата и нямат претенцията да изясняват изцяло тези проблематика. Резултатите от изследванията показват, че kainate-индуцираният епилептиформен синдром може да бъде използван като адекватен модел на епилептогенеза. За постигане на „нулево“ хормонално ниво и хормонална субституция на фона на пълен дефицит на глюкокортикоиди и андрогени, моделът съзнателно е създаден при кастрирани мъжки животни с отстранени надбъбречни жлези и с поддържан водно-солеви и хранителен баланс. Хирургичните интервенции представляват екстремален стресогенен фактор и драстично агравират конвулсивния синдром. Други автори съобщават също, че при мъжки животни кастрацията засилва реакциите към различни стресогенни стимули (Thomas, J., McLean, J. H., 1991). Представените тук данни показват, че прилагането на *Corticosterone* може да потисне напълно kainate-индуцирания епилептиформен синдром. Тези данни са в хармония с резултатите от редица клинични изследвания, показващи че прилагането на кортикостероиди облекчава в значителна степен клиничните прояви на конвулсивния синдром при пациенти с епилепсия (Curian, M., Korff, C. M., 2011, Inutsuka, M., et al., 2006, Verhelst, H., Boon, P., Buyse, G., 2005, Sinclair, D. B., 2003). Изясняването на принципните механизми на антиепилептичното действие на *Corticosterone* е извън обсега на настоящия дисертационен труд и е обект на бъдещи изследвания. Приемливо е да се допусне, че анти-стресогенното действие на кортикостероидите на централно и периферно ниво са в основата на тяхното анти-епилептогенно действие.

Представените резултати показват, че *Estradiol* силно влошава kainate-индуцирания епилептиформен синдром. Показано е, че естрогените имат подобно про-конвулсивно действие в кастрирани женски животни (Reddy, D. S., 2009). Добре известно е, че *Estradiol* стимулира освобождаването на глутамат и потиска синтеза на GABA, което може да бъде правдоподобно обяснение на неговото про-конвулсивно действие. Данните от проведените изследвания показват, че ефектът на гестагените върху kainate-индуцираната епилетогенеза се проявява с тенденция за намаляване на латенцията при слабите гърчове от *Dihydroprogesterone* и с незначително увеличение на латенцията при субмаксималните. Изследваните гестагени нямат съществен ефект върху интензитета и леталитета на тоничните гърчове. Експериментални и клинични изследвания са показали, че *Progesterone* има антиконвулсивно действие в женски индивиди (Reddy, D. S., 2013, Reddy, D. S., et al., 2004, Herzog, A. G., 1999). В експерименти *in vitro* е показано, че *Progesterone* и *Dihydroprogesterone* потискат amygdala-тригерираната спайкова активност в двигателните неврони на мозък от женски животни (Lonsdale, D., Burnham, W. M., 2003). Може да се допусне, че наблюдаваният от нас по-слаб ефект в мъжките индивиди сравнение с описаните от други автори ефекти в женските индивиди корелира с по-слабата експресия на церебрални прогестеронови рецептори при мъжкия пол. Представените резултати показват, че *Dihydrotestosterone* екзацербира kainate-индуцирания епилептиформен синдром и увеличава свързания с него леталитет. В клинични и експериментални изследвания е установено, че *Testosterone* засилва епилептиформените пристъпи след като е метаболизиран до *Estradiol* от ензима ароматаза (Reddy, D. S., 2004). Може да се приеме, че описаните ефекти на *Dihydrotestosterone* се реализират по аналогичен механизъм.

В настоящите изследвания спецификата и интензивността (соматични и когнитивни симптоми), с които се проявява клиничната картина на kainate-индуцирания епилептиформен синдром, е оценена за първи път количествено посредством създадената от Власковска и сътрудници квантитативна точкова



скала. Данните получени в проведените от нас изследвания показват, че кватнитативната кумулативна скала дава възможност за детайлизиран и адекватен анализ на соматичната и когнитивна симптоматика при експериментален модел на епилептогенеза. Прилагането на такъв методологичен подход би спомогнало за избягване на несигурни и амбивалентни интерпретации при оценката на характера и интензитета на поведенческите реакции чрез прилаганите досега дескриптивни скали за оценка на поведението.

### *Обобщение*

Представените от нас данни показват:

- (i) *Corticosterone* има по-силно антиепилептично действие отколкото *Progesterone*
- (ii) *Testosterone* притежава значителна про-конвулсивна активност. Това налага внимателно дозиране при лица, които получават анаболни стероиди
- (iii) Хормоналният дисбаланс може да има съществено значение за прояви на епилептиформената конвулсивна активност при лица с епилепсия
- (iv) Създадената кватнитативна кумулативна скала дава възможност за детайлизиран и адекватен анализ на соматичната и когнитивна симптоматика при експериментален модел на kainate-индуцирана епилептогенеза. Използван е адекватен модел на конвулсивен епилептиформен синдром.

### ***Ефект на новосинтезирани хромен-субституирани хидразид-хидразони с антиконвулсивно действие върху ноцицепцията***

Епилептогенезата е сложен поликомпонентен процес, който детерминира както разгръщането на клиничната симптоматика на епилепсията, така и развитието на заболяването (Pitkanen, A., Engel, J. Jr., 2014). Епилепсията е заболяване, при което се проявяват тежки коморбидни усложнения, предизвикани от исхемични инциденти, церебрални травматични увреждания, генетични йонни каналопатии,

невронална свръхвъзбудимост и пълзяща кортикална инхибиция, които могат да бъдат електрофизиологичен еквивалент на аурата (Zarcone, D., Corbetta, S., 2017). В клиниката е добре известно, че при епилепсия и невропатна болка има много общи характеристики, между които са пристъпно начало, наличие на провокиращ агент, аура, фамилна обремененост. Представените в настоящото проучване данни, които показват, че някои от новосинтезираните 2Н-хроменови деривати могат да имат антиноцицептивно действие, кореспондират с установените по-рано данни, че тези съединения могат да имат антиконвулсивно действие (Angelova, V. T., et al., 2016). Може да се допусне, че процесите на централна сензитизация, която се наблюдава при епилепсия и при невропатна болка, предизвикват прогресивно нарастване на честотата на пристъпите, което води до хронифициране на процеса, и предизвиква резистентност и/или адикция към прилаганите лекарства. Клинични наблюдения показват, че пост-икталното главоболие се наблюдава в 41% от пациентите с темпорална епилепсия, при 40% от пациентите с фронтална епилепсия и при 59% от пациентите с окципитална епилепсия (Ito, M., et al., 2003). От получените в настоящите изследвания резултати не могат да бъдат направени изводи за механизмите на аналгетично действие на изследваните съединения. Има убедителни данни обаче, че <sup>2</sup>Н-хроменови-деривати могат да действат като лиганди на аденозинови A<sub>2A</sub>-рецептори (Areias, F., et al., 2012) и/или като инхибитори на NMDA glutamate-ергични рецептори (Costa, B. M., et al., 2010). Други автори са показали, че кумаринови производни могат да действат като некомпетитивни агонисти на GABA<sub>A</sub> рецепторите (Luszczki, J. J., et al., 2009) или да модулират активността на NMDA-ергични неврони в ЦНС (Irvine, M. W., et al., 2012). В този контекст може да се предположи, че в механизмите на антиноцицептивно действие на изследваните съединения са въввлечени някои от цитираните по-горе невротрансмитерни процеси.

## Обобщение

Данните, получени в настоящите изследвания с тест „Hot Plate” и тест „Formalin”, показват, че съединенията 4a, 4c, 8a и 8b могат да намалят ноцицепцията. Това може да бъде използвано като допълнителна полезна характеристика при създаването на нови антиконвулсивни средства.

### **Фармакотерапевтичен потенциал на плодов сок *Aronia melanocarpa* в модел на експериментална пост-менопаузна остеопороза**

С приложения в тези изследвания експериментален подход за предизвикване на естроген-дефицитна остеопороза в овариектомирани женски плъхове валидирахме адекватен модел на остеопороза, която клинично се манифестира у жени в периода след климактериума. С основание може да се приеме, че патогенетичните механизми, които се разгръщат при развитието на експериментална остеопороза, са принципно аналогични на механизмите, които са въввлечени в патогенезата на деструктивните изменения в костната система при постклимактерната остеопороза у жени (Jee, W. S. S., Yao, W., 2001, Lelovas, P. P., et al., 2008). В настоящите изследвания са използвани методи за измерване на костна минералната плътност и костно минерално съдържание, които са приети като най-добри клинични методи за обективизиране и количествено определяне на костната деминерализация и деструкция при остеопороза. Резултатите от проведените от нас изследвания показват, че при третиране на животните с 10 ml/kg сок от *Aronia* развитието на остеопороза настъпва по-късно в съчетание с по-слабо изразена костна деструкция. Това е верифицирано със значително подобрени параметри на КМП и КМС, установени след третиране с 10 ml/kg сок от *Aronia*. Данните за благоприятно действие на 5 ml/kg сок от *Aronia* при остеопороза са неубедителни.

В клиничната практика има консенсус, че най-честата проява на остеопороза при възрастни пациенти е фрактура на проксималния сегмент на фемуралната кост. Настоящите изследвания предоставят убедителни данни, че суплементираща терапия със сок от *Aronia* 10 ml/kg при остеопороза, предизвикана от естрогенен дефицит след овариектомия (експериментален модел на постклимактерна остеопороза при жени), може да има благоприятно действие срещу костната деструкция, което да резултира в съществено подобряване на основните параметри на костната микроархитектоника.

Болката в костите е тривиален симптом на метаботропните увреждания на костната система, много често в резултат от костна деструкция от остеопороза или болест на Paget. Засега обаче цялостният патогенетичен механизъм на болката, съпътстваща тези заболявания не е изяснен в детайли. Най-приемлива от съществуващите многобройни хипотези е, че болката се дължи на сензитизация на периосталните ноцицептори при увреждане на тъкани, или при възпалителни процеси, но са възможни и структурни поражения на нервните фибри от директна компресия на тъканите (Gennari, C., 1998). Добре известно е, че инфламаторните медиатори (брадикинин, хистамин, цитокини, PG F2 $\alpha$ , nerve growth factor), които се генерират след увреждания на тъканите, ускоряват кинетиката на трансдукционните процеси в периферните нервни терминали и понижават прага за тяхната активация. Инфламаторните медиатори повишават активността на остеокластите. Нарушенията на костния метаболизъм водят до микрофрактури, което може да бъде едно приемливо обяснение за възникването на остеопорозна болка (Orita, S., et al., 2012). Настоящото изследване показва, че развитието на остеопороза се съпътства с изразена хипералгезия (Randall-Selitto Test, Hot Plate Test). Фармакотерапията с 10 ml/kg сок от *Aronia* намалява болковата чувствителност на третираните животни сравнение с контролите, третирани с плацебо. Може да се допусне, че като подобрява костната структура и намалява болката, плодов сок от *Aronia* 10 ml/kg би представлявал фитопрепарат с терапевтичен потенциал при пост-менопаузна остеопороза.

Понастоящем е детайлно документирано, че естрадиолът е основният регулатор на костната хомеостаза чрез директно действие върху активността на остеобластите и остеокластите. Естрогените блокират синтеза/освобождаването на про-инфламаторни цитокини и производството на имунокомпетентни клетки в костния мозък (Pacifci, R., 1996, Spos, S., et al., 2009). Представени са достатъчно убедителни доказателства, че про-инфламаторни цитокини като IL-6, TNF $\alpha$ , RANKL стимулират развитието и активността на остеокластите (Spos, S., et al., 2005, Ginaldi, L., et al., 2005), които имат важно значение за развитието на пост-менопаузната остеопороза. Типична находка е повишеното ниво на IL-6 да корелира със симптомите на остеопороза и/или болка по костите при отсъствие на други съпътстващи патологични състояния, които да засягат костната система (Theoharides, T. C., Boucher, W., Spear, K., 2002).

Известно е, че фитоестрогените стимулират естрогеновите ER- $\beta$  рецептори, но все още цялостният механизъм на тяхното действие не е изяснен напълно. Многобройните хипотези, които представят принципните механизми на действие на фитоестрогените, варират от инхибиране на активността на ДНК II топоизомераза, през регулация на целуларни регулаторни центрове, до анти-ангиогенезна и/или антиоксидантна активност. В последните години се лансира хипотезата, че фитоестрогените могат да потиснат целуларната пролиферация чрез модулация на сигналните каскади на трансформиращ растежен фактор b1 (Kim, H., Peterson, T. G., Barnes, S., 1998, Wang, J., Wang, S., 2012). Досега в достъпната литературата не сме открили данни за доказан фармакотерапевтичен потенциал на сок от *Aronia* срещу пост-менопаузна остеопороза, както и за антиоксидантна активност на фитопрепарати от части на растението. Този резултат, както и данни от фитохимични и фитофармакологични изследвания на плодове и фитопродукти от *Aronia* на други автори, аргументират становището, че „*Aronia melanocarpa* може да бъде едно от най-полезните медицински растения (Valcheva-Kuzmanova, S., Belcheva, A., 2006)“.

## Обобщение

Резултатите от проведените проучвания на фармакологичното действие на сок от *Aronia* при синдром на експериментална постклимактерна остеопороза изисква данните да бъдат предпазливо екстраполирани с оглед потенциална терапевтична/профилактична употреба на 10 ml/kg сок от *Aronia*.

### **Фармакотерапевтичен потенциал на екстракт от *Arіum nodiflorum* в модел на експериментална пост-менопаузна остеопороза**

Резултатите от проведените изследвания показват, че при естрогенен дефицит, настъпващ след отстраняване на овариумите, не се откриват значителни отклонения в денситометричните показатели на костите на овариектомираните животни сравнение с денситометричните показатели на костите на контролните животни.

Данните показват, че фармакотерапията с екстракт от *Arіum* с кратка продължителност, приложена за превенция на потенциални остеопорозни изменения, има слаб и несигурен ефект. Резултати от проведени неотдавна мултидисциплинарни изследвания на тъканно, молекулно и системно ниво на промените в костната система, които настъпват при проявена остеопороза и преодоляването им чрез продължителна субституция на естрогенния дефицит с екстракт от *Arіum*, са представени по-рано от Tsakova, A. P. (2016) и Tsakova, A. P., и колеги (2015). Авторите доказват, че третиране с екстракт от *Arіum* има много благоприятно действие срещу изразени остеопорозни изменения в костите, ако то е прилагано за продължителен период от време на фона на разгърнат естрогенен дефицит и клинична симптоматика на пост-менопаузна остеопороза. В тези изследвания промените в микроархитектониката и особеностите в хистоморфологията на дългите кости в експериментални модели на пост-менопаузна, естроген-дефицитна остеопороза, са проследени при дългосрочна

фитофармакологична субституция с екстракт от *Apium* или третиране с плацебо. Авторите представят убедителни доказателства, че при остеопороза настъпват едновременно паралелни изменения в трабекуларната костна микроархитектоника, както в епифизните, така и в метафизните сегменти на фемура и тибията. Хроничното третиране с екстракт от *Apium* възпрепятства развитието на тежки деструктивни изменения в костната микроархитектоника. Деструктивни промени в костната микроструктура едновременно в епифизните и метафизни сегменти на фемура и тибията при експериментална остеопороза са в съгласие с данни от хистоморфологични проучвания на други автори (Hidaka, S., et al., 2006, Bitto, A., et al., 2011, 2008, Yogesh, H. S., et al., 2011). Това налага да бъде ревизирано становището, че след овариектомия деструктивните изменения в костната система не засягат трабекуларната костна тъкан в епифизата на дългите кости (Jee, W. S. S., Yao, W., 2001, Westerlind, K. C., et al., 1997).

Показано е от други автори, че екстракт от *Apium* има анти-инфламаторно действие (Lewis, D. A., 1985). Най-вероятно анти-инфламаторният и антиноцицептивният ефект на екстракт от *Apium* имат поликомпонентна патогенеза. Може да се допусне, че компонентите на екстракта проявяват изразена антиоксидантна активност и потискат генерирането на супероксидни радикали. Едновременно с това може да инхибират генерирането и освобождаването на инфламаторни медиатори (хистамин, 5-НТ, брадикинин, простагландини) и/или да антагонизират ефекта на про-инфламаторните цитокини (IL-6).

Целината (*Apium nodiflorum*) показва едни от най-високите нива на антиоксидантна активност, което корелира със съдържанието на високи нива на тотални феноли и флавоноиди, установени във фитопродукти от растението (Stankovic, M. S., 2011, Morales, P., et al., 2012). Установеното съдържание на тотални феноли и флавоноиди в екстракта от *Apium* са в същите граници, както

тези съобщени в други изследвания по отношение на стебла и корени на целина. *Apium nodiflorum* (целина) е популярно и широко разпространено в страната растение, което може да бъде евтина и лесна за добиване суровина за фармацевтичната индустрия.

### Обобщение

Изследванията в обхвата на представения дисертационен труд са планирани в два аспекта. В теоретичен аспект са проведени комплексни изследвания на фармакотерапевтичните ефекти на фитопродукти от растенията *Aronia melanocarpa* и *Apium nodiflorum*, познати със своите лечебни и кулинарни качества, които са изпълнени в две нива: *in vivo* интегративно ниво (ноцицепция) и *ex situ* (остеодензитометрия на *post mortem* отделени фемур и тибия). В приложен аспект е валидиран експериментален модел „еквивалент“ на пост-менопаузна остеопороза.



## VII. ИЗВОДИ

Валидирана и приложена е ново-създадена квантитативна скала за оценяване на интензитета на соматичните и когнитивни прояви на експериментален епилептиформен синдром, което дава възможност за детайлизиран и адекватен анализ.

Третирането с естрогени влошава клиничните и патофизиологични характеристики на експериментален kainic acid-индуциран епилептиформен синдром.

Третирането с андрогени има силно проявено про-конвулсивно действие.

Третирането с глюкокортикоиди облекчава протичането и/или елиминира животозастрашаващите прояви на експериментален kainic acid-индуциран епилептиформен синдром.

Хормоналният дисбаланс е основен патогенетичен фактор за развитие на епилептиформена/конвулсивна активност.

Новосинтезираните хидразид-хидразонови съединения 4a, 4b, 4c, 8a и 8b, които са показали *in silico* профил на антиконвулсанти, притежават умерено изразена противоболкова активност.

Естроген-дефицитният модел на експериментална „пост-менопаузна“ остеопороза е достоверно валидиран и приложен в серия фармакологични изследвания.

Продължителното третиране със сок от *Aronia melanocarpa* има протективен ефект върху костната минерална плътност и паралално с това понижава болковата чувствителност при експериментална „пост-менопаузна“ остеопороза.

Прилагането на екстракт на *Apium nodiflorum* с недостатъчна продължителност при експериментална „пост-менопаузна“ остеопороза има несигурен благоприятен ефект върху костната минерална плътност.

## VIII. ПРИНОСИ

Установено е, че новосинтезираните хидразид-хидразонови съединения 4a, 4b, 4c, 8a и 8b, показали *in silico* профил на антиконвулсанти, притежават умерено изразена противоболкова активност.

Установено е, че продължителното третиране с екстракт на *Aronia melanocarpa* 10 ml/kg може значително да забави развитието на остеопорозни изменения в костите и понижава болковата чувствителност при експериментална „пост-менопаузна“ остеопороза.

Валидирана и приложена е ново-създадена квантитативна скала за количествена оценка на клиничната симптоматика при експериментален епилептиформен синдром. Квантитативната кумулативна скала дава възможност за детайлизиран и адекватен анализ на соматичните/конвулсивни и когнитивни прояви при експериментална „епилепсия“.

## X. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Slavina Surcheva, **Stanislav Marchev**, Roman Tashev, Stilyana Belcheva, Mila Vlaskovska. Action of adrenal and gonadal steroid hormones on kainic acid-evoked seizures in a rat model of epileptogenesis. "Biotechnology & Biotechnological Equipment", Vol. 31, 2017 (6); p. 1226-1230 (IF=1.277)
2. **Stanislav Marchev**, Pavlina Andreeva-Gateva, Roumiana Tzoneva, Slavina Surcheva, Alex Tzonev, Kalina Kamenova, Violina T. Angelova, Jana Tchekalarova, Mila Vlaskovska. Analgesic activity of some aroylhydrazone-based molecular hybrids with antiseizure activity: *in vivo* and *in silico* evaluations. "Biotechnology & Biotechnological Equipment", Vol. 33, 2019 (1); p. 98-107 (IF=1.327)
3. **Станислав Марчев**, проф. Стефка Вълчева-Кузманова, проф. Славина Сурчева, доц. Павлина-Андреева Гатева. Повишен риск от остеопороза при епилепсия. Остеопороза и епилепсия; роля на антиепилептичните лекарства. Сп. "Наука Фармакология", кн.2, 2019; 19-24
4. Василена Кузманова, Атанас Кузманов, Симеон Тодоров, **Станислав Марчев**, Стефка Вълчева-Кузманова. Болка при остеопороза - причини и патогенеза. "Варненски медицински форум", т. 9, 2020, бр. 2; стр. 7-11
5. Доц. Павлина Андреева-Гатева, **Станислав Марчев**. Мелатонин при епилепсия и коморбидни състояния - през погледа на доказателствената медицина. Сп. "Наука Фармакология", кн. 2, 2020; стр. 5-13

## **XI. УЧАСТИЯ В НАЦИОНАЛНИ И МЕЖДУНАРОДНИ НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА**

1. P. Andreeva-Gateva, J. Tchekalarova, V. Angelova, **S. Marchev**, Y. Voynikov, N. Vassilev, M. Vlaskovska, S. Surcheva. Preclinical screening of coumarin and 2H-Chromene substituted hydrazide-hydrazone derivatives, as potential anticonvulsants. 13<sup>th</sup> Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT), Prague, 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup> June 2017. Published in Clinical Therapeutics, v39, 85, E78-E79, August 2017

2. **Marchev, S.**, Temelkova, K., Todorova, M., Eftimov, M., Georgieva, A., Kuzmanova, V., Kuzmanov, A., Surcheva, S., Vlaskovska, M., Valcheva-Kuzmanova, S. Effects of antioxidants isolated from Aronia and Apium on experimental model of osteoporosis. 18<sup>th</sup> World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases. Krakow, Poland, 19-22 April, 2018. Abstract: Osteoporosis International 29 (Suppl. 1), P610. (IF=3.83)

3. Tzonev Alex, **S. Marchev**, P. Andreeva-Gateva, S. Surcheva. Evaluation of the antinociceptive properties of newly synthesized hydrazide-hydrazone derivatives. NVIII International Congress of Medical Sciences, 10-13 May, 2018, Sofia, Abstract book, p.14-15

4. П. Гатева, **С. Марчев**, С. Сурчева, В. Ангелова, К. Каменова. Аналгетична активност на новосинтезирани ароилхидразони – предклинични и *in silico* проучвания. Девета национална конференция за изследване и лечение на болката с международно участие, Хисаря, 07-09 Юни, 2018 г.

5. **Stanislav Marchev**, Pavlina Andreeva-Gateva, Alex Tzonev, Jana Tchekalarova, Violina Angelova, Mila Vlaskovska, Slavina Surcheva. Experimental study on the analgesic and anti-seizure activity of newly synthesised hydrazide-hydrazone derivatives bearing 2H-chromene and coumarin scaffold. 18<sup>th</sup> World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 01-06 July, 2018, Kyoto, Japan; P03-1-81

6. S. Valcheva-Kuzmanova, V. Kuzmanova, A. Kuzmanov, M. Eftimov, M. Todorova, A. Georgieva, K. Kuzmanov, **S. Marchev**, M. Vlaskovska. Effects of Aronia melanocarpa fruit juice on metabolic indices in a rat ovariectomy-induced model of bone loss. World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases, Paris, France, 04-07 April, 2019. Abstract: Osteoporosis International (2019) 30 (Suppl. 2):S465. (IF=3.83)

7. S. Valcheva-Kuzmanova, A. Kuzmanov, V. Kuzmanova, M. Eftimov, A. Georgieva, M. Todorova, K. Kuzmanov, **S. Marchev**, M. Vlaskovska. Evaluation of lipid metabolism, inflammation and bone turnover in a rat model of ovariectomy-induced bone loss. World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases, Paris, France, 04-07 April. Abstract: Osteoporosis International (2019) 30 (Suppl. 2):S501. (IF=3.83)

8. S. Valcheva-Kuzmanova, A. Georgieva, M. Eftimov, M. Todorova, V. Kuzmanova, A. Kuzmanov, **S. Marchev**, K. Kuzmanov, M. Vlaskovska. Effects of polyphenol-rich aroniamelanocarpa fruitjuice on bone mineral density and pain sensitivity threshold in ovariectomized rats. 14<sup>th</sup> Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT), S72-S73, Stockholm, Sweden. Abstract: European Journal of Clinical Pharmacology (2019) 75 (Suppl. 1):S72-S73. (IF=2.997)

9. P. Gateva, S. Surcheva, **S. Marchev**, J. Tchekalarova, V. Amgelova. Antiseizure and analgesic activity of newly synthesized melatonin derivatives bearing aroylhydrazone moiety. IV International Conference on Natural Products Utilization. Albena Resort, 29 May-1 June 2019, PP56

## **XII. БЛАГОДАРНОСТИ**

Изказвам безкрайните си благодарности на своите ръководители:

Проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м., д.м.н.

Доц. д-р Павлина Гатева, д.м.

Също така и на своя научен консултант:

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

Благодаря за съдействието и на:

Д-р Н. Темелкова

Благодаря и на целия колектив от МУ Варна и МУ София

и не на последно място на семейството си за цялата подкрепа!