

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА
Катедра по физиология и патофизиология
УС по патофизиология

д-р Мирослав Димитров Маринов

**РОЛЯ НА ЕНДОКАНАБИНОИДНАТА
СИСТЕМА В ПОВЕДЕНЧЕСКИТЕ РЕАКЦИИ
ПРИ ДЕПРЕСИВНО-ПОДОБНИ СЪСТОЯНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

По научна специалност „Патофизиология на животните и човека“
шифър 03.01.05

Научни ръководители:
Доц. д-р Маргарита Великова, дм
Доц. д-р Роман Ташев, дм

Официални рецензенти:
Проф. д-р Адриана Бочева, дм
Проф. д-р Ганка Бекярова, дм

Варна 2018

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрен съвет на Катедра Физиология и патофизиология при Медицински университет – Варна и насочен за защита пред научно жури

Дисертационният труд обхваща 162 страници, 42 фигури и 6 таблици. Библиографската справка съдържа 572 заглавия. Номерата на фигурите в автореферата съответстват на номерата в дисертационният труд.

Експерименталната работа е извършена в Институт по Невробиология, БАН

Защитата на дисертационният труд ще се проведе на 15.02.2019 г. от 14.30 часа в

СЪДЪРЖАНИЕ

УВОД.....	4
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	6
Цел.....	6
Задачи.....	6
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	7
1. Експериментални животни.....	7
2. Стереотаксична техника и използвани хирургични процедури.....	7
3. Поведенчески методи.....	8
4. Верификация.....	10
5. Статистическа обработка на резултатите.....	10
РЕЗУЛТАТИ.....	11
1. Ефекти на NU-210 и SR 141716A върху изследователското поведение и локомоторната активност на плъхове.....	11
2. Ефекти на NU-210 и SR 141716A върху изследователското поведение и локомоторната активност на плъхове с модел на депресия (OBX).....	15
3. Ефекти на NU-210 и SR 141716A върху състоянието на тревожност на плъхове.....	22
4. Ефекти на NU-210 и SR141716A върху състоянието на тревожност при плъхове с OBX.....	24
5. Ефекти на NU-210 и SR 141716A върху болковата чувствителност на плъхове.....	25
6. Ефекти на NU-210 и SR 141716A върху болковата чувствителност на OBX-плъхове.....	26
7. Ефекти на NU-210 и SR 141716A върху обучителните и паметовите процеси на плъхове.....	26
8. Ефекти на NU-210 и SR 141716A върху обучителните и паметови процеси на плъхове с модел на депресия (OBX).....	29
ОБСЪЖДАНЕ.....	33
ИЗВОДИ.....	45
ПРИНОСИ.....	46
ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	47
Публикации в научни списания.....	47
Участия в научни форуми.....	47

УВОД

През 2004 г. СЗО поставя депресивните разстройства на първо място сред психичните заболявания като причина за инвалидизация, а според прогнозите, през 2030 г. трите водещи причини за здравно обременяване на икономиката ще бъдат СПИН, депресивно разстройство и ИБС. Депресията се счита за заболяване от групата на афективните разстройства – разстройства на настроението, характеризиращо се с подтиснатост, спад на настроението, загуба на способността за преживяване на радост (анхедония) и др. емоционални промени. Освен с тях, симптомите му се описват и с още 3 рубрики: 2). когнитивни нарушения – влошена памет, обучение и др., 3). понижена активност и енергия – умора, апатия; 4). невро-вегетативни симптоми – нарушен апетит, тегло, сън, либидо, главоболие, болки в кръста и др. локални болки. Болката, често, така привлича вниманието, че депресивният синдром, от който е част, може да остане неразпознат (маскирана депресия). Повечето пациенти с депресивни симптоми имат и изразени прояви на тревожност, което още повече затруднява лечението. Възникването на депресия, често се установява обвързано със стреса. Двете водещи хипотези за патогенезата на депресията са: 1. нарушена регулация на моноаминната сигнализация; 2. дисрегулация на хипоталамо-хипофизо-надбъбречната ос. Моноамин-ергичните неврони са под регулаторно влияние от страна на GABA-ергични и други интер неврони. Усилването на това модулаторно влияние – чрез GABA-миметици, бензодиазепини или други фармакологични въздействия има анксиолитичен ефект.

Канабиноидите са сред веществата с анксиолитичен ефект, познати и използвани от хиляди години. Анксиолитичните им ефекти са резултат от влиянието им върху широко представена в организма ендоканабиноидна сигнализация – ендоканабиноидна система (ЕКС), една от най-скоро откритите медиаторни системи. Представена е в целия организъм и особено в ЦНС. Основните ѝ компоненти са канабиноидните трансмембрanni, G-протеин-куплирани рецептори (CB1R и CB2R) и самите трансмитери – N-арахидоноилетаноламин (NAAE) (анадамид) и 2-арахидоноилглицерол (2-AG). Основното разположение на CB1 рецепторите в мозъка е пресинаптично, върху интерневроните, регулиращи функцията на невронните мрежи, където осъществяват ретроградно предаване на сигнала. Рецепторите, разположени върху GABA-ергичните интерневрони осъществяват инхибиране на задържането, а върху глутаматергичните – инхибиране на възбуждането, като блокират невро-трансмисерната секреция на тези интерневрони. ЕКС участва в широк спектър физиологични процеси,

включително ноцицепция, двигателен контрол, памет и обучение, апетит, енергиен баланс, страх, тревожност и др. Налице са доказателства и за инхибиращо влияние на ендоканабиноидите върху свръхактивираната при стрес хипоталамо-хипофизо-надбъбречна ос и способност за нормализиране на функцията ѝ. В същото време са налице индикации, че дисрегулацията на ЕКС може да допринесе за отключване на депресия при някои индивиди. Не са добре проучени и механизмите, по които ЕКС влияе на състоянието на тревожност, но наличните данни показват, че има анксиолитично действие и при условните, и при безусловните модели на тревожност, и че тези ефекти са по-силни при състояние на стрес или висока възбуда. Използваният от нас модел на депресия – двустранна олфакторна булбектомия, е широко разпространен и с висока степен на валидност. Изследването на ефектите на централно въведени агонисти на канабиноидните рецептори по отношение на определени поведенчески реакции (експлораторна и двигателна активност; ноцицептивен отговор; тревожност; памет и обучение) позволява да се получи нова информация за участието на ЕКС в патофизиологията на депресията и да се изясни кога може да се приложи такава терапия.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Да се проучи ролята на канабиноидни лиганди (селективни агонисти и антагонисти на CB1 рецепторите) върху механизмите на развитие на депресивни разстройства.

Да се проучи участието на канабиноидните рецептори в изследователското поведение, двигателната активност, състоянието на тревожност, болковата чувствителност, процесите на обучение и памет, при експериментален модел на депресия – олфакторна булбектомия (ОВХ).

За постигане на тази цел си поставихме следните

Задачи

1. Да се проследят ефектите на селективни агонисти и антагонисти на CB1 рецепторите при плъхове върху следните поведенчески реакции:
 - изследователско поведение;
 - локомоторна активност;
 - състояние на тревожност (анксиогенеза);
 - болкова чувствителност (ноцицепция);
 - обучение и памет.
2. Да се проследят ефектите на селективни агонисти и антагонисти на CB1 рецепторите след еднократно i.c.v. въвеждане у плъхове на фона на развито депресивно-подобно състояние в резултат на олфакторна булбектомия върху следните поведенчески реакции:
 - изследователско поведение;
 - локомоторна активност;
 - състояние на тревожност (анксиогенеза);
 - болкова чувствителност (ноцицепция);
 - обучение и памет.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Експериментални животни

Експериментите са проведени върху 272 мъжки полово зрели бели плъхове, порода Wistar, с тегло 200-220 g. Експериментите са провеждани съгласно изискванията и правилата на Етичния Комитет при Институт по Невробиология, БАН (регистрация FWA 00003059 от Службите за Човешко Здраве, САЩ).

2. Стереотаксична техника и използвани хирургични процедури

2.1. Двустранна олфакторна булбектомия у плъхове (ОВХ) – експериментален модел на депресия

След анестезия с Calypsol (50 mg/kg, i.p.), експерименталните животни се фиксират в стереотаксичен апарат (Stoelting, USA). След отпрепарирание на меките тъкани на главата и премахване на периоста, черепните кости се пробиват с бормашина (диаметър на борчетата 2 mm) в ляво и в дясно от средната линия. Координатите на bulbus olfactorius се определят според атласа на Pellegrino и Cushman (1967) за плъхове порода Wistar (спрямо брегмата $A=8.0$; $L=\pm 2.0$). Булбектомията се извършва като двата bulbus olfactorius се аспирират чрез игла от неръждаема стомана, прикрепена към водна помпа.

След операцията на животните беше осигурен 7-8 дневен възстановителен период, през който ежедневно бяха “хендлирани” в продължение на 5-10 мин, т.е. вземани в ръце, с цел адаптиране към експерименталните условия.

Sham-оперираните плъхове бяха подложени на същите хирургични манипулации като булбектомираните, но без аспириране на булбусите.

2.2. Имплантиране на водещи канюли във ventriculus ventrolateralis dexter на плъх

Имплантирането на водещи канюли се извърши 3 дни след олфакторната булбектомия. Животните бяха анестезирани с Calypsol (50 mg/kg, i.p.), след което бяха фиксирани в стереотаксичен апарат (Stoelting, USA). След отпрепарирание на меките тъкани на главата в париеталните области и премахване на периоста, черепните кости бяха пробивани с бормашина и водещи канюли от неръждаема стомана бяха имплантирани в десния вентролатерален вентрикул. Координатите на ventriculus ventrolateralis dexter бяха определяни според атласа на Pellegrino и Cushman (1967) за плъхо-

вете порода Wistar (спрямо брегмата $P=0.9$ mm; $L=\pm 1.6$ mm; $h=-3.0$ mm). Канюлите, с височина 9 mm бяха поставяни вертикално на съответните дълбочини. С предпазна цел, около водещите канюли беше монтирана със зъботехнически дуракрил пластмасова тръба, с височина 1 cm. Във водещите канюли бяха поставени мандрени от неръждаема стомана. След операцията, животните имаха 7-8 дневен възстановителен период, през който ежедневно бяха “хендлирани”.

2.3. Използвани фармакологични средства:

HU-210 (Tocris) – CB1R агонист;

SR141716A (Sanofi) – CB1R антагонист.

2.4. Въвеждане на веществата

Изследваните вещества (HU-210 и SR 141716A) бяха разтваряни “ex tempore” във физиологичен разтвор и въвеждани i.c.v. посредством инжекционна канюла с 1 mm по-дълга от водещата. Веществата с рН =7.4 бяха въвеждани в обем 1 μ l в продължение на 1 минута и инжекционната канюла беше оставяна на мястото за още 30 секунди.

Контролните животни бяха инжектирани с физиологичен разтвор по същия начин.

Експериментите се провеждаха 5 минути след микроинжектиране на животните с изследваните вещества или физиологичен разтвор.

3. Поведенчески методи

3.1. Метод за определяне на промените в изследователското поведение и двигателната активност

Промените в изследователското поведение и двигателната активност бяха проследени съгласно метода на Kohler и Lorens (1978) чрез апарат Opto Varimex (Columbus Instruments, USA), свързан с компютър за отчитане по отделно на броя на хоризонталните и вертикалните движения за определен период от време. Движенията на животните бяха регистрирани в продължение на 30 мин (на всяка минута за първите 5 минути и през 5-минутен интервал до края на отчитания период).

3.2. Метод за изследване състоянието на тревожност

Експериментите за изследване на състоянието на тревожност бяха проведени по метода на Pellow и сътр. (1985) в апарат “повдигнат кръстосан лабиринт”(elevated plus maze). Бяха отчитани следните показатели: брой на излизанията в “откритите рамена”; брой на влизанията в “закритите рамена”; общ брой на влизанията и излизанията в открити и закрити

рамена; времето на престой в “откритите рамена” в секунди; времето на престой в “закритите рамена” в секунди; общото време на престой в открити и закрити рамена в секунди.

3.3. Метод за изследване на болковата чувствителност

Степента на промените в болковата чувствителност чрез механичен натиск, беше определяна чрез апарат аналгезиметър, тип Ugo Basile. Експериментите се провеждаха по модифициран метод на Randall и Selitto (1957). Степента на болковата чувствителност, предизвикана от изследваното вещество, се отчиташе по специфичната двигателна реакция на животното (отдръпване на предварително поставената под “острието” на аналгезиметъра задна лапичка) при поява на болка.

3.4. Метод за определяне степента на обучение и запаметяване

3.4.1. Метод за обучение с активно двупосочно избягване, с отрицателно подкрепление – shuttle box

Обучението беше проведено в апарат Shuttle box по метода на Gozzani и Izquierdo (1976), модифициран от Petkov и съавт. (1993). Като условен дразнител се използва изкуствена светлина, а като безусловен – променлив ток (0.5mA; 50Hz; 20 до 30V). Обучението се провеждаше в два последователни дни. Във всеки обучителен ден се провеждаха по 50 тренировки. Тестирането за памет се провеждаше на 24-тия час след втория обучителен ден. Като показател за обученост и запаметяване се отчитаха броят на авойданс-отговорите (условнорефлекторното избягване) за всяка тренировъчна сесия (всеки обучителен ден поотделно) и при теста за памет.

3.4.2. Метод за обучение с пасивно избягване – step-through

Обучението за пасивно избягване с отрицателно подкрепление се провеждаше по метода на Bureshova и Buresh (1983) чрез апарат step through. Обучението се състои от еднократна тренировка. Тестът за памет се провежда на 3-ия и 24-ия час след обучението. Като критерий на обученост се приема престой на животните в осветената камера за период от 180 секунди.

4. Верификация

След приключване на поведенческите опити беше провеждана анатомична верификация. Верификацията беше осъществена чрез микро-

инжектиране на 1 μ l 2% метиленово синьо в канюлите непосредствено преди декапитирането. Булбектомията беше верифицирана макроскопски, чрез сравняване с булбусите на интактни животни. Експерименталните данни, получени от животни, при които изследваните вещества са били неточно инжектирани, или се установи непълна деструкция на булбусите (< от 80 %) бяха изключени от по-нататъшна обработка на резултатите.

5. Статистическа обработка на резултатите

Данните от експериментите бяха обработени статистически с еднофакторен или двуфакторен ANOVA. Резултатите за обученост, получени от step-through са обработени с χ^2 . Резултатите са представени във вид на средно-аритметични стойности със съответните им стандартни грешки ($\bar{x} \pm S.E$). За определяне достоверността на разликите между групите беше използван post-hoc t-тестът на Student при минимална достоверност – $P \leq 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ

1 Ефекти на HU-210 и SR 141716A върху изследователското поведение и локомоторната активност на плъхове

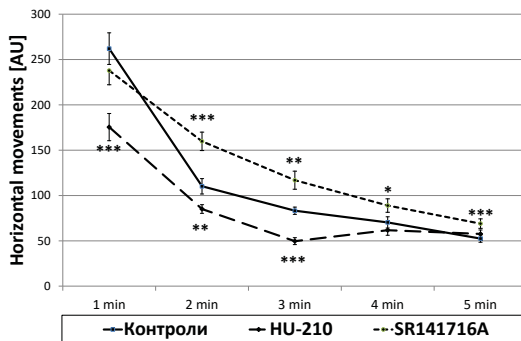
Ефекти върху изследователското поведение на плъхове

Ефектите на HU-210 (5 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$) и SR 141716A (3 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$), въведени самостоятелно в десния латерален вентрикул, върху изследователското поведение, бяха проследени 5 мин след тяхното прилагане. Броят на хоризонталните и вертикалните движения бяха регистрирани за всяка минута поотделно за период от пет минути, отчетен беше и общият им брой за целия петминутен период.

Двуфакторен ANOVA (с повтарящи се измервания върху двата фактора) беше използван за анализиране на изследователското поведение. Факторите бяха вещество с 3 нива (HU-210, SR 141716A и физиологичен разтвор) и време с 5 нива (1-ва, 2-ра, 3-та, 4-та и 5-та мин.).

Ефекти върху хоризонталната активност за периода 1-ва – 5-та минута

ANOVA за броя на хоризонталните движения след i.c.v. въвеждането на HU-210 и SR 141716A показва достоверен ефект за фактора вещество ($F_{2, 179} = 34.93$; $P \leq 0.001$), за фактора време ($F_{4, 179} = 156.23$; $P \leq 0.001$) и достоверно взаимодействие между факторите вещество \times време ($F_{8, 179} = 5.35$; $P \leq 0.001$).



Фиг. 1. Ефекти на HU-210 (5 μg) и SR 141716A (3 μg), микроинжектирани i.c.v., върху броя на хоризонталните движения на плъх за всяка минута поотделно в продължение на 5-минутен период. * $P \leq 0.01$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо контролите.

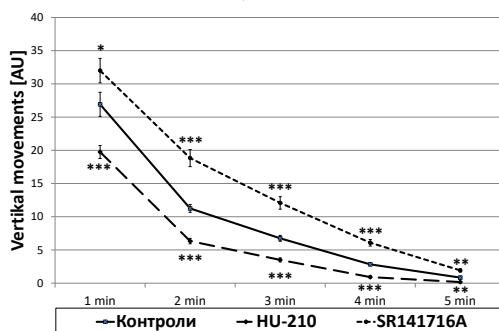
Post-hoc t-тестът показва, че, HU-210 постепенно и достоверно понижава броя на хоризонталните движения на 1-ва ($t = 3.77$; $P \leq 0.001$), 2-ра ($t = 2.58$; $P \leq 0.01$) и 3-та минута ($t = 5.99$; $P \leq 0.001$), а на 4-та и 5-та техния брой не се променя значимо в сравнение с контролите, инжектирани с физиологичен разтвор (фиг. 1). SR 141716A достоверно повишава броя на хоризонталните движения на 2-ра ($t = 3.74$; $P \leq 0.001$), 3-та ($t = 3.17$; $P \leq 0.01$), 4-та ($t = 1.92$; $P \leq 0.05$) и 5-та мин. ($t = 2.49$; $P \leq 0.01$) в сравнение с контролите (фиг. 1).

Ефекти върху общия брой на хоризонталните движения за целия 5-минутен период

Еднофакторният ANOVA за броя на хоризонталните движения за целия 5-минутен период на наблюдение показва достоверност за фактора вещество ($F_{2, 35} = 19.75$; $P \leq 0.001$). Post-hoc t-тестът показва, че HU-210 статистически достоверно понижава общия брой на хоризонталните движения в сравнение с контролите. След въвеждането на SR 141716A се наблюдава достоверно повишение на общия брой на хоризонталните движения в сравнение с контролите.

Ефекти върху вертикалната активност за периода 1-ва – 5-та минута

Инжектирането на HU-210 и SR 141716A предизвиква промени и в броя на вертикалните движения. Двухфакторният ANOVA показва достоверен ефект за фактора вещество ($F_{2, 179} = 106.81$; $P \leq 0.001$) и фактора време ($F_{4, 179} = 394.93$; $P \leq 0.001$). Налице е и достоверно взаимодействие между двата фактора вещество \times време ($F_{8, 179} = 7.42$; $P \leq 0.001$).



Фиг. 3. Ефекти на HU-210 (5 μ g) и SR 141716A (3 μ g), микроинжектирани i.c.v., върху броя на вертикалните движения на плъх за всяка минута поотделно в продължение на 5-минутен период. * $P \leq 0.01$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо контролите.

При сравняване броя на вертикалните движения на инжектираните с HU-210 или с SR 141716A плъхове с тези на контролните животни, беше установено, че HU-210 достоверно намалява броя на вертикалните движения, на 1-ва, 2-ра, 3-та, 4-та и 5-та мин., а SR 141716A статистически достоверно ги повишава на 1-ва, 2-ра, 3-та, 4-та и 5-та мин. (фиг. 3)

Ефекти върху общия брой на вертикалните движения за целия 5-минутен период

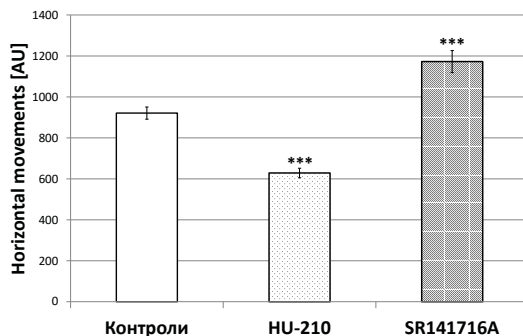
Еднофакторният ANOVA за промените на вертикалната активност през целия 5-минутен период показва достоверен ефект за фактора вещество ($F_{2, 35} = 74.74$; $P \leq 0.001$). Post-hoc сравненията демонстрират, че HU-210 понижава, а SR 141716A повишава, достоверно общия брой на вертикалните движения в сравнение с контролите.

Анализът на промените в броя на хоризонталните и вертикалните движения за всяка минута поотделно след самостоятелното въвеждане както на HU-210, така и на SR 141716A показва, че и двата агента не нарушават хабитуацията на плъховете.

Ефекти върху локомоторната активност на плъхове

Ефекти върху броя на хоризонталните движения за периода 1-ва – 30-та минута

ANOVA анализът на броя на хоризонталните движения показва достоверен ефект за двата фактора: вещество ($F_{2, 215} = 85.00$; $P \leq 0.001$) и време ($F_{5, 215} = 847.21$; $P \leq 0.001$). Имаше също и достоверно взаимодействие между двата фактора вещество \times време ($F_{10, 215} = 10.22$; $P \leq 0.001$). Получените резултати показваха, че третираните с HU-210 животни имат по-ниска двигателна активност в сравнение със съответната контрола. Така, HU-210 достоверно намалява броя на хоризонталните движения на 5-та ($t = 5.11$; $P \leq 0.001$); 10-та ($t = 5.03$; $P \leq 0.001$); 15-та ($t = 5.73$; $P \leq 0.001$); 20-та ($t = 5.51$; $P \leq 0.001$), 25-та ($t = 6.84$; $P \leq 0.001$) и 30-та мин. ($t = 6.27$; $P \leq 0.001$). Инжектирането на SR 141716A доведе до повишаване броя на хоризонталните движения в сравнение със съответната контрола на 5-та ($t = 2.02$; $P \leq 0.05$); 10-та ($t = 3.86$; $P \leq 0.001$); 15-та ($t = 2.86$; $P \leq 0.01$); 20-та ($t = 7.35$; $P \leq 0.001$), 25-та ($t = 5.31$; $P \leq 0.001$) и 30-та мин. ($t = 7.21$; $P \leq 0.001$). Анализът на промените в броя на хоризонталните движения след въвеждането на HU-210 и SR 141716A показва, че хабитуацията не е нарушена.



Фиг. 6. Ефекти на HU-210 (5 μ g) и SR 141716A (3 μ g), микро-инжектирани i.c.v., върху общия брой на хоризонталните движения на плъх за целия 30-минутен период. *** $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо контролите.

Ефекти върху общия брой на хоризонталните движения за целия 30-минутен период

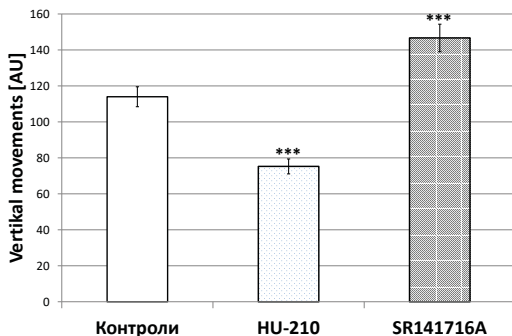
Еднофакторният ANOVA за общия брой на хоризонталните движения извършени от животните за целия период на наблюдение (30 мин.) показва достоверност за въведеното вещество ($F_{2,35} = 51.71$; $P \leq 0.001$). Post-hoc t тестът показва, че HU-210 ($t = 7.76$; $P \leq 0.001$) достоверно намалява общия брой на хоризонталните движения спрямо съответната контрола. Беше установено и достоверно повишаване на общия брой на хоризонталните движения при третираните с SR 141716A ($t = 4.10$; $P \leq 0.001$) плъхове по отношение на съответната контрола (фиг. 6).

Ефекти върху броя на вертикалните движения за периода 1 ва – 30-та минута

Въвеждането на HU-210 и SR 141716A i.c.v. предизвика също така промени във вертикалните движения на животните. Анализът ANOVA показва статистическа значимост за двата фактора – вещество ($F_{2,215} = 61.52$; $P \leq 0.001$) и време ($F_{5,215} = 386.48$; $P \leq 0.001$). Съществува и достоверно взаимодействие между двата фактора вещество \times време ($F_{10,215} = 16.60$; $P \leq 0.001$).

Сравнителният post-hoc t-тест за броя на вертикалните движения на животните, третираните с HU 210 спрямо контролите показва, че на 5-та ($t = 8.23$; $P \leq 0.001$), 10-та ($t = 3.50$; $P \leq 0.001$), 15-та ($t = 2.13$; $P \leq 0.05$); 20-та ($t = 2.32$; $P \leq 0.01$) и 25-та минута ($t = 1.68$; $P \leq 0.05$) има статистически дос-

товерно понижение. Въвеждането на SR 141716A не променя съществено броя на вертикалните движения в сравнение с контролите, с изключение на 5-та ($t = 5.81$; $P \leq 0.001$) и 20-та минута ($t = 1.94$; $P \leq 0.05$), където се отчита достоверно повишение на броя на вертикалните. движения



Фиг. 8. Ефекти на HU-210 (5 μg) и SR 141716A (3 μg), микро-инжектирани i.c.v., върху общия брой на вертикалните движения на плъх за целия 30-минутен период. *** $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо контролите.

Еднофакторният ANOVA за общия брой на вертикалните движения през целия период на наблюдение (30 мин.) показва достоверност за фактора вещество ($F_{2, 35} = 36.19$; $P \leq 0.001$). При сравняване вертикалната активност на третираните животни спрямо контролите се установи, че HU-210 ($t = 5.62$; $P \leq 0.001$) достоверно понижава, а SR1 41716A ($t = 3.46$; $P \leq 0.001$) – достоверно повишава общия брой на вертикалните движения (фиг. 8).

2. Ефекти на HU-210 и SR 141716A върху изследователското поведение и локомоторната активност на плъхове с модел на депресия (ОВХ)

Ефекти върху изследователското поведение на плъхове с модел на депресия (ОВХ)

Олфакторната булбектомия у плъхове след около 15 дни води до промени в изследователското им поведение и двигателната активност. Установено беше, че както свързаната с експлораторното поведение двигателна активност (1-5-та мин), така и локомоторната активност (1-30 мин) е силно повишена в сравнение с контролите. Това се отнася, както за броя на хоризонтал-

ните движения (увеличен 2 пъти), така и за броя на вертикалните движения (увеличен 2 пъти). Анализът на хоризонталните и вертикални движения, за всяка минута поотделно, показва, че хабикуацията на животните е силно нарушена, т.е. животното не може да се ориентира в новата обстановка.

Хоризонтална активност за периода 1-ва – 5-та минута

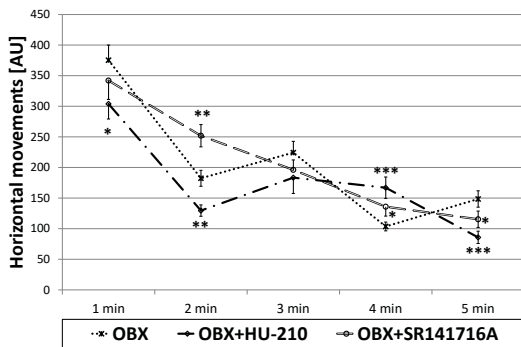
За анализиране на изследователското поведение при развита депресия беше използван двуфакторен ANOVA (с повтарящи се измервания върху двата фактора). Факторите бяха OBX с 2 нива (OBX и sham оперирани) и време с 5 нива (1-ва, 2-ра, 3-та, 4-та и 5-та мин.).

ANOVA за броя на хоризонталните движения след двустранна булбектомия показва достоверен ефект за фактора OBX ($F_{2, 179} = 118.40$; $P \leq 0.001$) и фактора време ($F_{4, 179} = 113.50$; $P \leq 0.001$). Имаше също и достоверно взаимодействие между двата фактора OBX \times време ($F_{4, 179} = 4.80$; $P \leq 0.001$). Post-hoc t-тестът показва, че, при OBX плъховете се наблюдава достоверно повишен брой на хоризонталните движения на 1-ва ($t = 3.09$; $P \leq 0.01$), 2-ра ($t = 5.24$; $P \leq 0.001$), 3-та ($t = 7.33$; $P \leq 0.001$), 4-та ($t = 3.64$; $P \leq 0.001$) и 5-та минута ($t = 7.65$; $P \leq 0.001$) в сравнение с sham оперираните контроли.

Ефектите на HU-210 (5 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$) и SR 141716A (3 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$), микроинжектирани самостоятелно в десния латерален вентрикул на плъхове с OBX върху изследователското поведение, бяха проследени 5 мин след тяхното прилагане. Двуфакторен ANOVA (с повтарящи се измервания върху двата фактора) беше използван за анализиране на изследователското поведение. Факторите бяха вещество с 3 нива (HU-210, SR 141716A и физиологичен разтвор) и време с 5 нива (1-ва, 2-ра, 3-та, 4-та и 5-та мин.).

Двуфакторният ANOVA за броя на хоризонталните движения след i.s.v. въвеждането на HU-210 и SR 141716A показва достоверен ефект за фактора вещество ($F_{2, 179} = 5.56$; $P \leq 0.01$) и фактора време ($F_{4, 179} = 68.38$; $P \leq 0.001$), както и достоверно взаимодействие между двата фактора вещество \times време ($F_{8, 179} = 4.11$; $P \leq 0.001$).

Анализът на броя на хоризонталните и вертикалните движения за всяка минута поотделно за 5-минутния период на отчитане показва, че HU-210 първоначално достоверно намалява броя на хоризонталните движения на 1 ва ($t = 2.04$; $P \leq 0.05$) и 2 ра мин. ($t = 3.29$; $P \leq 0.01$), а на 4-та ги повишава ($t = 3.34$; $P \leq 0.001$), след което отново ги намалява на 5-та мин. ($t = 3.75$; $P \leq 0.001$), т.е. HU 210 от 1-ва до 3-та мин не повлиява нарушената при OBX плъхове хабикуация, а след третата мин. проявява тенденция към нейното нормализиране (фиг. 21). SR 141716A повишава достоверно броя на хоризонталните движения на 2 ра ($t = 3.11$; $P \leq 0.01$) и 4-та мин. ($t = 1.75$; $P \leq 0.05$) и го намалява на 5-та мин. ($t = 1.75$; $P \leq 0.05$) (фиг. 17).



Фиг. 17. Ефекти на HU-210 (5 μ g) и SR 141716A (3 μ g), микроинжектирани i.c.v., върху броя на хоризонталните движения на OBX плъхове за всяка минута поотделно в продължение на 5-минутен период. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо OBX контролите.

Ефекти върху общия брой на вертикалните движения за целия 5-минутен период (OBX)

Еднофакторният ANOVA за броя на вертикалните движения за целия първоначален 5 минутен период на наблюдение показва достоверност за фактора OBX ($F_{1,23} = 78.07$; $P \leq 0.001$). Post-hoc t-тестът показва, че при OBX плъховете се наблюдава статистически достоверно ($t = 8.84$; $P \leq 0.001$) повишение на общия брой на хоризонталните движения в сравнение с sham оперираните контроли.

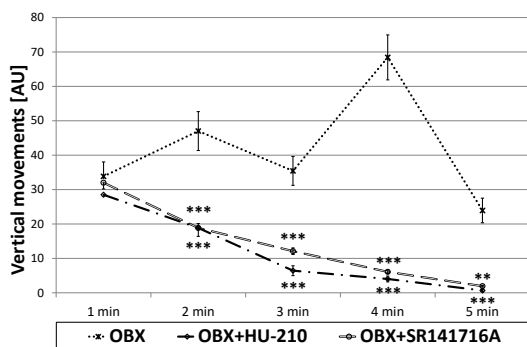
Еднофакторният ANOVA за броя на хоризонталните движения за целия първоначален 5 минутен период на наблюдение не дава достоверност за фактора вещество ($F_{2,35} = 2.55$; $P \leq \text{NS}$), докато ANOVA само за HU-210 дава статистическа значимост за фактора вещество ($F_{1,23} = 5.94$; $P \leq 0.05$). Post-hoc t-тестът показва, че HU-210 ($t = 2.44$; $P \leq 0.01$) статистически достоверно понижава общия брой на хоризонталните движения в сравнение с OBX плъховете, но той остава значимо по-висок от този на sham оперираните контроли ($t = 5.35$; $P \leq 0.001$). SR 141716A не променя значимо общия брой движения за 5-минутния период, който остава значимо по-висок в сравнение с sham оперираните плъхове ($t = 5.52$; $P \leq 0.001$)

Ефекти върху вертикалната активност за периода 1-ва – 5-та минута (OBX)

Двухфакторният ANOVA показва достоверен ефект за фактора OBX ($F_{1,119} = 193.93$; $P \leq 0.001$) и фактора време ($F_{4,119} = 13.02$; $P \leq 0.001$). На-

лице е и достоверно взаимодействие между двата фактора ОВХ × време ($F_{4, 119} = 18.17$; $P \leq 0.001$). Post-hoc t-тестът показва достоверно нарастване броя на вертикалните движения, на 2-ра ($t = 6.13$; $P \leq 0.001$), 3-та ($t = 6.71$; $P \leq 0.001$), 4-та ($t = 9.98$; $P \leq 0.001$) и 5-та ($t = 6.44$; $P \leq 0.001$) мин.

Двухфакторният ANOVA показва достоверен ефект за фактора вещество ($F_{2, 179} = 94.96$; $P \leq 0.001$) и фактора време ($F_{4, 179} = 20.53$; $P \leq 0.001$). Налице е и достоверно взаимодействие между двата фактора вещество × време ($F_{8, 179} = 14.29$; $P \leq 0.001$). При post-hoc сравненията се установи, че HU-210 достоверно намалява броя на вертикалните движения, на 2-ра ($t = 4.58$; $P \leq 0.001$), 3-та ($t = 6.54$; $P \leq 0.001$), 4-та ($t = 9.76$; $P \leq 0.001$) и 5-та мин. ($t = 6.47$; $P \leq 0.001$). SR 141716A подобно на HU-210 също значимо понижава броя на движенията на 2-ра ($t = 5.36$; $P \leq 0.001$), 3-та ($t = 5.09$; $P \leq 0.001$), 4-та ($t = 6.01$; $P \leq 0.001$) и 5-та мин. ($t = 3.26$; $P \leq 0.01$). (фиг. 19).



Фиг. 19. Ефекти на HU-210 (5 μ g) и SR 141716A (3 μ g),

микроинжектирани i.c.v., върху броя на хоризонталните движения на ОВХ плъхове за всяка минута поотделно в продължение на 5-минутен период. ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо ОВХ контролите.

Ефекти върху общия брой на вертикалните движения за целия 5-минутен период (ОВХ)

Еднофакторният ANOVA за промените на вертикалната активност през целия 5-минутен период показва достоверен ефект за фактора ОВХ ($F_{1, 23} = 134.04$; $P \leq 0.001$). Post-hoc t-тестът демонстрира, че двустранната ольфакторна булбектомия предизвиква достоверно повишаване ($t = 11.58$; $P \leq 0.001$) на общия брой на вертикалните движения в сравнение с sham оперираните контроли.

Еднофакторният ANOVA за промените на вертикалната активност през целия 5-минутен период показва достоверен ефект за фактора вещество ($F_{2,35}=49.35$; $P \leq 0.001$). Post-hoc сравненията демонстрират, че HU-210 ($t=9.85$; $P \leq 0.001$) понижава достоверно общия брой на вертикалните движения в сравнение с OBX контролите, който обаче е статистически недостоверно по-висок от този на sham оперираните плъхове ($t=1.31$; $P \leq NS$). SR 141716A понижава ($t=5.45$; $P \leq 0.001$) достоверно общия брой на вертикалните движения в сравнение с OBX плъховете, а при сравнение с sham оперираните ($t=6.02$; $P \leq 0.001$) той е значимо по-висок.

Ефекти върху локомоторната активност на плъхове с модел на депресия (OBX)

Ефекти върху броя на хоризонталните движения за периода 1-ва – 30-та минута (OBX)

Двуфакторен ANOVA беше използван за анализиране на локомоторната активност при плъхове с OBX. Факторите бяха OBX с 2 нива (OBX и sham оперирани) и време с 6 нива (5-та, 10-та, 15-та, 20-та, 25-та и 30-та мин.).

Анализът на броя на хоризонталните движения показва достоверен ефект за двата фактора: OBX ($F_{1,143}=147.26$; $P \leq 0.001$) и време ($F_{5,143}=479.08$; $P \leq 0.001$). Имаше също и достоверно взаимодействие между двата фактора OBX \times време ($F_{5,143}=36.68$; $P \leq 0.001$). Post-hoc сравняването на резултатите показва, че OBX животните имат достоверно по-висока двигателна активност в сравнение с sham оперираните контроли на 5-та ($t=8.83$; $P \leq 0.001$); 10-та ($t=4.39$; $P \leq 0.001$); 15-та ($t=4.49$; $P \leq 0.001$); 20-та ($t=3.97$; $P \leq 0.001$), 25-та ($t=5.73$; $P \leq 0.001$) и 30-та ($t=3.65$; $P \leq 0.001$) мин.

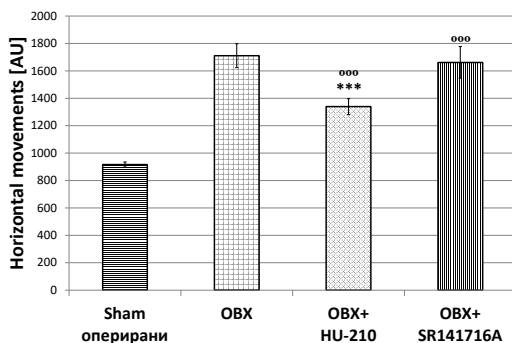
За анализ на локомоторната активност след въвеждане на HU-210 и SR 141716A у плъхове с OBX беше използван двуфакторен ANOVA. Факторите бяха вещество с 3 нива (HU-210, SR 141716A и физиологичен разтвор) и време с 6 нива (5-та, 10-та, 15-та, 20-та, 25-та и 30-та мин.).

Двуфакторният ANOVA за броя на хоризонталните движения след i.c.v. въвеждането на HU-210 и SR 141716A показва достоверен ефект за фактора вещество ($F_{2,215}=8.74$; $P \leq 0.001$) и фактора време ($F_{5,215}=491.22$; $P \leq 0.001$). Нямаше достоверно взаимодействието между двата фактора вещество \times време ($F_{10,215}=1.58$; $P \leq NS$). При post-hoc t-тестът се установи, че HU-210 в сравнение с животните с OBX понижава достоверно, постепенно във времето, още след 5-тата мин., повишения брой хоризонтални движения на 5-та ($t=2.44$; $P \leq 0.01$) 10-та ($t=2.72$; $P \leq 0.01$), 15-та ($t=2.67$; $P \leq 0.01$) и 25-та мин. ($t=2.53$; $P \leq 0.01$), а SR 141716A не го променя съществено.

Ефекти върху общия брой на хоризонталните движения за целия 30-минутен период (OBX)

Еднофакторният ANOVA за общия брой на движенията извършени от животните през целия 30-минутен период показва достоверен ефект за фактора вещество ($F_{2,35} = 5.01$; $P \leq 0.01$).

Общия брой на хоризонталните движения за целия 30 минутен период на наблюдение, след i.c.v. въвеждането на HU-210 ($t = 3.55$; $P \leq 0.001$), анализиран с помощта на t-тест, е достоверно по-малък в сравнение с OBX плъховете, но значимо по-висок от този на sham-оперираните плъхове ($t = 6.40$; $P \leq 0.001$), докато SR 141716A не го променя значимо и той остава достоверно по-висок от този на sham оперираните контроли ($t = 6.40$; $P \leq 0.001$) (фиг. 22).



Фиг. 22. Ефекти на HU-210 (5 μg) и SR 141716A (3 μg), микроинжектирани i.c.v., върху общия брой на хоризонталните движения на OBX плъхове за целия 30-минутен период. *** $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо OBX контролите. ooo $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо sham оперираните плъхове.

Ефекти върху броя на вертикалните движения за периода 1-ва – 30-та минута (OBX)

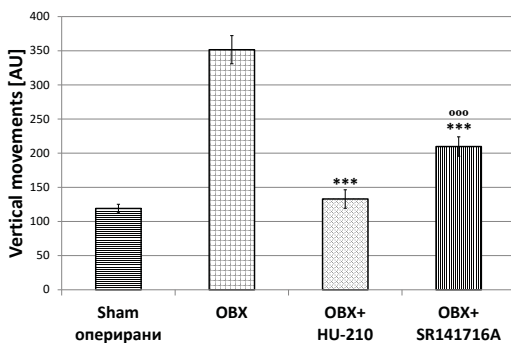
Развитието на депресивно-подобно състояние влияе и на вертикалната локомоторна активност. ANOVA показва статистическа значимост за двата фактора OBX ($F_{1,143} = 117.48$; $P \leq 0.001$) и време ($F_{5,143} = 163.34$; $P \leq 0.001$). Съществува и достоверно взаимодействие между двата фактора OBX \times време ($F_{5,143} = 49.31$; $P \leq 0.001$). Сравнителният post-hoc t-тест за броя на вертикалните движения на OBX животните спрямо sham оперираните плъхове показва, че на 5-та ($t = 11.58$; $P \leq 0.001$), 10-та ($t = 5.17$;

$P \leq 0.001$), 20-та ($t = 3.69$; $P \leq 0.001$), 25-та ($t = 2.50$; $P \leq 0.01$) и 30-та ($t = 2.15$; $P \leq 0.05$) минута има статистически достоверно повишение.

Извършеният двуфакторен ANOVA анализ на броя на вертикалните движения, след въвеждането на HU-210 и SR 141716A i.c.v., показва достоверен ефект за фактора вещество ($F_{2, 215} = 66.50$; $P \leq 0.001$) и фактора време ($F_{5, 215} = 241.53$; $P \leq 0.001$). Достоверно е взаимодействието и между двата фактора вещество \times време ($F_{10, 215} = 27.95$; $P \leq 0.001$). Post-hoc t-тестът показва, че HU-210 значимо понижава броя на вертикалните движения на: 5-та ($t = 9.85$; $P \leq 0.001$), 10-та ($t = 3.82$; $P \leq 0.001$), 15 та ($t = 1.68$; $P \leq 0.05$), 20-та ($t = 4.02$; $P \leq 0.001$), 25-та ($t = 2.15$; $P \leq 0.05$) и 30-та мин. ($t = 1.92$; $P \leq 0.05$) в сравнение OBX-пльховете. SR 141716A значимо понижава броя вертикални движения само на 5-та ($t = 5.45$; $P \leq 0.001$) и 10-та мин. ($t = 3.33$; $P \leq 0.01$)

Ефекти върху общия брой на вертикалните движения за целия 30-минутен период (OBX)

Еднофакторният ANOVA за общия брой на вертикалните движения през целия период на наблюдение (30 мин.) показва достоверност за фактора OBX ($F_{1, 23} = 78.44$; $P \leq 0.001$). При сравняване вертикалната активност на булбектомираните животни спрямо контролите се установи, че има достоверно повишение ($t = 10.78$; $P \leq 0.001$).



Фиг. 24. Ефекти на HU-210 (5 μg) и SR 141716A (3 μg), микроинжектирани i.c.v., върху общия брой на вертикалните движения на OBX пльхове за целия 30-минутен период. *** $P \leq 0.01$ – достоверност на разликата спрямо OBX контролите. °°° $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо sham оперираните пльхове.

Еднофакторният ANOVA за общия брой на вертикалните движения през целия 30-минутен период на наблюдение показва достоверност за фактора вещество ($F_{2,35}=45.42$; $P \leq 0.001$). При post-hoc t-тестът се установи, че HU-210 ($t=8.86$; $P \leq 0.001$) понижава достоверно общия брой движения спрямо OBX плъховете през 30-минутния период на наблюдение, като понижението е близко по стойност с sham оперираните плъхове ($t=1.29$; $P \leq \text{NS}$). SR 141716A ($t=5.65$; $P \leq 0.001$) също понижава значимо общия брой вертикални движения, но не до нивото на sham оперираните животни ($t=6.26$; $P \leq 0.001$) (фиг. 24).

3. Ефекти на HU-210 и SR 141716A върху състоянието на тревожност на плъхове

За анализ на данните бяха направени шест отделни еднофакторни ANOVA анализа. ANOVA за броя на влизанията в откритите рамена ($F_{2,35}=16.96$; $P \leq 0.001$), за времето на престой в откритите рамена ($F_{2,35}=70.12$; $P \leq 0.001$), за броя на влизанията в закритите рамена ($F_{2,35}=52.50$; $P \leq 0.001$), за времето на престой в закритите рамена ($F_{2,35}=70.12$; $P \leq 0.001$), за общия брой на влизанията в откритите и закритите рамена ($F_{2,35}=27.02$; $P \leq 0.001$), за отношението броя на влизанията в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена (open number/total number) ($F_{2,35}=44.47$; $P \leq 0.001$), показва достоверност за фактора вещество.

Post-hoc t-тестът показва, че HU-210 повишава броя на излизанията в откритите рамена ($t=2.24$; $P \leq 0.05$), повишава времето прекарано в откритите рамена ($t=4.88$; $P \leq 0.001$), отношението open number/total number ($t=4.09$; $P \leq 0.001$), понижава броя на влизанията в закритите рамена ($t=3.94$; $P \leq 0.001$), времето на престой в закритите рамена ($t=4.88$; $P \leq 0.001$), общия брой на излизанията и влизанията в откритите и закритите рамена ($t=2.91$, $P \leq 0.001$), в сравнение с контролите (табл. 1). Установеното повишаване на броя на излизанията в откритите рамена удължаването на времето прекарано в откритите рамена, както и отношението open time/total time, показва че HU-210 намалява състоянието на тревожност, т.е. проявява анксиолитичен ефект. Пониженият общ брой на влизанията в откритите и закритите рамена е резултат от потиснатата локомоторна активност след въвеждането на HU 210, установена в апарат Opto Varimex. SR 141716A достоверно намалява броя на излизанията в откритите рамена ($t=3.58$; $P \leq 0.001$), времето прекарано в тях ($t=8.95$; $P \leq 0.001$), отношението open time/total time ($t=8.95$; $P \leq 0.001$) и отношението open number/total number ($t=5.37$; $P \leq 0.001$), повишава броя на влизанията в

закритите рамена ($t = 5.601$; $P \leq 0.001$), времето прекарано в тях ($t = 8.95$; $P \leq 0.001$), общия брой на излизанията и влизанията в отритите и закрити рамена ($t = 4.07$; $P \leq 0.001$) в сравнение с контролите, т.е. SR 141716A проявява анксиогенен ефект (табл. 1).

Табл. 1. Ефекти на HU-210 (5 μg) и SR 141716A (3 μg), микроинжектирани i.c.v. на плъхове върху състоянието на тревожност. – опити в повдигнат кръстосан лабиринт. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ – достоверност спрямо контролите. ° $P \leq 0.05$; °° $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо sham оперираните плъхове. ++ $P \leq 0.01$, +++ $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо OBX плъховете. $n = 12$.

Група	Открити рамена		Закрити рамена		Общ брой влизания (в открити и закрити рамена)	Брой влизания в открити рамена / общ брой влизания [%]
	Брой влизания	Време на престой [s]	Брой влизания	Време на престой [s]		
	$\bar{x} \pm SEM$	$\bar{x} \pm SEM$	$\bar{x} \pm SEM$	$\bar{x} \pm SEM$		
Контроли	1.75 ± 0.18	18.58 ± 0.92	4.75 ± 0.48	281.42 ± 0.92	6.50 ± 0.47	27.95 ± 3.12
HU-210	2.33 ± 0.19 *	28.50 ± 1.81 ***	2.67 ± 0.22 ***	271.50 ± 1.81 ***	5.00 ± 0.21 **	46.94 ± 3.44 ***
SR141716A	0.92 ± 0.15 ***	7.00 ± 0.90 ***	8.50 ± 0.47 ***	293.00 ± 0.90 ***	9.42 ± 0.54 ***	9.53 ± 1.41 ***
Sham- оперирани	1.83 ± 0.24	18.83 ± 1.57	4.42 ± 0.42	281.17 ± 1.57	6.25 ± 0.46	30 ± 3.9
OBX	0.67 ± 0.19 °°°	2.17 ± 0.55 °°°	6.75 ± 0.45 °°°	297.83 ± 0.55 °°°	7.42 ± 0.48 °	8.4 ± 2.4 °°°
OBX + HU-210	1.5 ± 0.20 ++	21.50 ± 3.08 +++	2.58 ± 0.34 +++	278.50 ± 3.08 +++	4.08 ± 0.38 +++	38 ± 3.9 +++
OBX + SR141716A	0.5 ± 0.15 °°°	1.33 ± 0.43 °°°	6.92 ± 0.45 °°°	298.67 ± 0.43 °°°	7.42 ± 0.47 °	6.6 ± 2.1 °°°

4. Ефекти на NU-210 и SR141716A върху състоянието на тревожност при плъхове с OBX

Еднофакторният ANOVA анализ при плъхове с OBX за броя на влизанията в откритите рамена ($F_{1,23} = 14.57$; $P \leq 0.001$), за времето на престой в откритите рамена ($F_{1,23} = 100.92$; $P \leq 0.001$), за броя на влизанията в закритите рамена ($F_{1,23} = 14.62$; $P \leq 0.001$), за времето на престой в закритите рамена ($F_{1,23} = 100.92$; $P \leq 0.001$), за отношението броя на влизанията в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена ($F_{1,23} = 22.37$; $P \leq 0.001$), показва достоверност за фактора депресия, докато за общия брой на влизанията в откритите и закритите рамена такава липсваше ($F_{1,23} = 3.04$; $P = \text{NS}$).

Post-hoc t-тестът показва, че след двустранна ольфакторна булбектомия се повишава броя на влизанията в закритите рамена ($t = 3.82$; $P \leq 0.001$), времето, прекарано в тях ($t = 10.05$; $P \leq 0.001$), общия брой на излизанията и влизанията в откритите и закритите рамена ($t = 1.74$; $P \leq 0.05$) и отношението open number / total number ($t = 4.73$; $P \leq 0.001$). Понижава се броя на излизанията в откритите рамена ($t = 3.82$; $P \leq 0.001$), както и времето, прекарано в тях ($t = 10.05$; $P \leq 0.001$) (табл. 1).

Установено е, че OBX плъховете имат намален брой влизания в откритите рамена в сравнение с sham оперираните контроли ($t = 4.17$; $P \leq 0.001$), намалено време на престой в тях ($t = 15.27$; $P \leq 0.001$) и увеличен брой на влизанията в закритите рамена ($t = 3.06$; $P \leq 0.01$), увеличено време на престоя им в тях ($t = 15.27$; $P \leq 0.001$), статистически недостоверно увеличен общ брой на влизанията в откритите и закритите рамена ($t = 1.36$; $P = \text{NS}$), както и намалено отношение на броя на влизанията в откритите рамена към общия брой на влизанията в рамената ($t = 4.98$; $P \leq 0.001$), т.е. животните с развита депресия имат повишено състояние на тревожност (табл. 1). Повишеният общ брой на влизанията е резултат от влизанията в закритите рамена и се свързва с повишената двигателна активност при OBX плъховете.

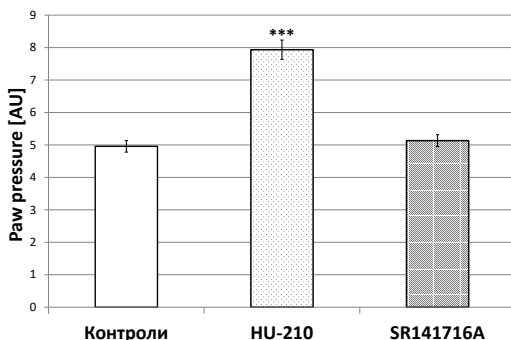
Еднофакторният ANOVA за броя на влизанията в откритите рамена ($F_{2,35} = 8.97$; $P \leq 0.001$), за времето на престой в откритите рамена ($F_{2,35} = 39.14$; $P \leq 0.001$), за броя на влизанията в закритите рамена ($F_{2,35} = 35.06$; $P \leq 0.001$), за времето на престой в закритите рамена ($F_{2,35} = 39.14$; $P \leq 0.001$), за общия брой на влизанията в откритите и закритите рамена ($F_{2,35} = 18.62$; $P = 0.001$), за отношението броя на влизанията в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена ($F_{2,35} = 37.90$; $P \leq 0.001$), показва достоверност за фактора вещество.

Post-hoc t-тестът показва, че NU-210 повишава достоверно броя на из-

лизанията в откритите рамена ($t = 3.08$; $P \leq 0.01$), времето прекарано в тях ($t = 6.18$; $P \leq 0.001$), а намалява броя на влизанията в закритите рамена ($t = 7.46$; $P \leq 0.001$), времето прекарано в тях ($t = 6.18$; $P \leq 0.001$), общият брой на влизанията и излизанията в отритите и закрити рамена ($t = 5.43$; $P \leq 0.001$), отношението open number / total number ($t = 6.56$; $P \leq 0.001$) в сравнение с тези показатели при ОВХ плъховете. Получените данни показват, че HU-210, въведен на фона на развита депресия преодолява състоянието на депресия и води до поведение близко до това на sham оперираните плъхове (табл. 1). SR 141716A, въведен i.c.v. при ОВХ плъхове, не предизвиква статистически значими промени в поведението, т.е. не се отчита разлика в състоянието на тревожност между ОВХ животни, третирани с SR 141716A и ОВХ контролите. Повишеният брой на влизанията в закритите рамена, общия брой на излизанията и влизанията в отритите и закрити рамена е в резултат на повишената двигателна активност. (табл. 1).

5. Ефекти на HU-210 и SR 141716A върху болковата чувствителност на плъхове.

Еднофакторният ANOVA за ефектите на HU-210 и SR 141716A върху болковия праг показва достоверност на фактора вещество ($F_{2,35} = 54.47$; $P \leq 0.001$). Post-hoc t-теста показва, че HU-210 в доза $5 \mu\text{g}/1\mu\text{l}$, въведен i.c.v., достоверно повишава прага на болковата чувствителност в сравнение с контролите, т.е. проявява аналгетичен ефект, а SR 141716A в доза $3 \mu\text{g}/1\mu\text{l}$, въведен i.c.v. не променя болковата чувствителност в сравнение с контролите (фиг. 34).



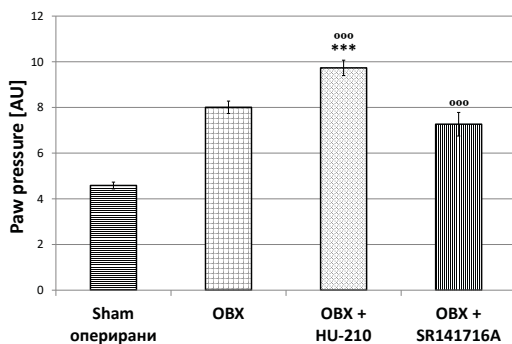
Фиг.34. Ефекти на HU-210 ($5 \mu\text{g}$) и SR 141716A ($3 \mu\text{g}$), микроинжектирани i.c.v. на плъхове, върху болковия праг (AU – условни единици).

*** $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо контролите.

6. Ефекти на HU-210 и SR 141716A върху болковата чувствителност на OBX-плъхове

Еднофакторният ANOVA за влиянието на двустранната олфакторна булбектомия върху болковия праг показва достоверност на фактора OBX ($F_{1,23} = 122.25$; $P \leq 0.001$). При post-hoc t-теста се установи, че OBX плъховете имат значимо повишен праг на болковата чувствителност ($t = 11.06$; $P \leq 0.001$) в сравнение с sham оперираните контроли.

Еднофакторният ANOVA за ефектите на HU-210 и SR 141716A върху болковия праг при OBX плъхове показва достоверност за фактора вещество ($F_{2,35} = 10.60$; $P \leq 0.001$). При post-hoc t-теста се установи, че HU-210, въведен i.c.v. на фона на развита депресия повишава болковия праг ($t = 3.99$; $P \leq 0.001$), т.е. проявява антиноцицептивен ефект при това състояние. SR 141716A, въведен на фона на развита депресия не променя значимо прага на болката по отношение на OBX плъховете ($t = 1.27$; $P = \text{NS}$) и болковата чувствителност остава значимо по-висока при сравнение с sham оперираните контроли ($t = 4.99$; $P \leq 0.001$) (фиг. 36).



Фиг. 36. Ефекти на HU-210 (5 μg) и SR 141716A (3 μg), микроинжектирани i.c.v. на OBX плъхове върху болковия праг (AU – условни единици). *** $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо OBX контролите. ooo $P \leq 0.001$ – достоверност на стойностите спрямо sham оперираните плъхове.

7. Ефекти на HU-210 и SR 141716A върху обучителните и паметовите процеси на плъхове

Експерименти в апарат shuttle box

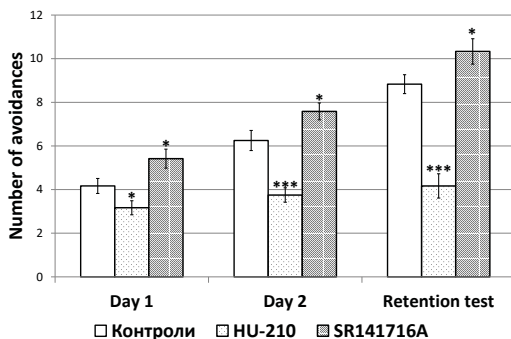
При експериментите, проведени по метода за активно двупосочно избягване с отрицателно подкрепление (shuttle box), HU-210 и SR 141716A,

бяха микроинжектирани 5 минути преди I-вия обучителен ден и преди теста за памет.

Бяха използвани отделни еднофакторни ANOVA за анализиране на броя на авойданс-отговорите, отчетени по време на обучението (I-ви и II-ри ден) и теста за памет (24-ия час след обучението).

Еднофакторният ANOVA на броя на авойдансите показва статистическа достоверност за фактора вещество на I-вия обучителен ден ($F_{2,35} = 9.28$; $P \leq 0.001$); на II-рия обучителен ден ($F_{2,35} = 17.98$; $P \leq 0.001$) и при теста за памет, на 24-ия час след II-рия обучителен ден ($F_{2,35} = 52.51$; $P \leq 0.001$).

Post-hoc t-тестът показва, че HU-210 влошава обучението и паметта, т.е. достоверно намалява броя на авойдансите на I-вия обучителен ден ($t = 2.12$, $P \leq 0.05$), на II-рия обучителен ден ($t = 4.41$, $P \leq 0.001$) и при теста за памет ($t = 9.29$, $P \leq 0.001$). SR 141716A подобрява обучението и паметта като статистически достоверно повишава броя на авойдансите на I-вия обучителен ден ($t = 2.25$, $P \leq 0.05$), на II-рия обучителен ден ($t = 1.84$, $P \leq 0.05$) и при теста за памет ($t = 2.25$, $P \leq 0.05$) в сравнение с контролите, третираны с физиологичен разтвор (Фиг. 37).



Фиг. 37. Ефекти на HU-210 (5 μ g) и SR 141716A (3 μ g), микроинжектирани i.c.v. на плъхове, върху броя авойдансите на I-ви и II-ри обучителен ден и при теста за ретенция (апарат “shuttle box”). * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо контролите.

Експерименти в апарат step-through

При експериментите, проведени по метода за пасивно избягване с отрицателно подкрепление (step through), лигандите на CB1R бяха микроинжектирани 5 мин. преди началото на обучението и не бяха прилагани преди тестовите за памет (3-тия и 24-тия час след обучението).

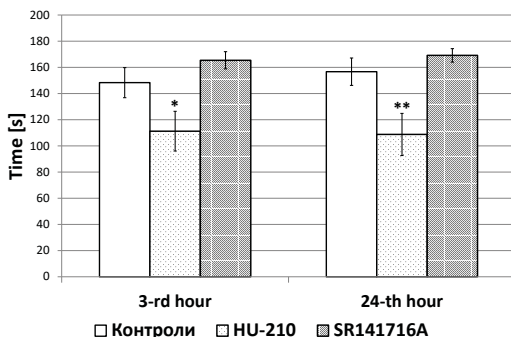
Отделни еднофакторни ANOVA бяха използвани за анализиране на латентното време при тестовете за ретенция на 3-ия и на 24-ия час.

Еднофакторният ANOVA на броя на секундите латентно време, показва статистическа достоверност за фактора вещество на 3-тия час ($F_{2,35} = 5.68$; $P \leq 0.01$) и на 24-тия час ($F_{2,35} = 7.73$; $P \leq 0.01$).

Табл. 2. Ефекти на HU-210 (5 μg) и SR 141716A (3 μg), микроинжектирани i.c.v. на плъхове, върху латентното време при тестовете за памет (апарат “step through”). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ – достоверност спрямо контролите. +++ $P \leq 0.01$ – достоверност на разликата спрямо sham оперираните контроли. °° $P \leq 0.01$, °°° $P \leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо sham оперираните плъхове.

Групи	Тест за ретенция					
	3-ти час			24-ти час		
	Латентно време	% обучени плъхове	критерий за обученост	Латентно време	% обучени плъхове	критерий за обученост
Контроли n =12	148.33 ±11.48	58%	(7/12)	156.67 ±10.47	67%	(8/12)
HU-210 n =12	111.25 ±15.16 *	33%	(4/12)	108.75 ±16.09 **	33%	(4/12)
SR141716A n =12	165.42 ±6.56	67%	(8/12)	169.17 ±5.14	67%	(8/12)
Sham оперирани n =10	148.90 ±13.03	60%	(6/10)	154.80 ±12.29	60%	(6/10)
OBX n =10	26.00 ±4.93 ***	0%	(0/10)	29.30 ±5.17 ***	0%	(0/10)
OBX + HU-210 n =10	83.50 ±12.76 *** °°°	10%	(1/10)	90.60 ±16.70 *** °°	20%	(2/10)
OBX + SR141716A n =10	32.70 ±5.07 °°°	0%	(0/10)	34.70 ±8.70 °°°	0%	(0/10)

Въвеждането на HU-210 статистически достоверно скъсява латентното време при тестовите за ретенция на 3-тия час ($t = 1.95$; $P \leq 0.05$) и на 24-тия час ($t = 2.50$; $P \leq 0.01$) и намалява процента на плъховете, които достигат критерия за обученост при тестовите за ретенция на 3-тия на 24-тия час в еднаква степен (33 %), в сравнение с инжектираните с физ. разтвор контроли ($\chi^2 = 2.667$, $P = \text{NS}$) (Фиг. 38, табл. 2). SR 141716A не променя значимо, относно контролните животни, латентното време при тестовите за памет на 3-ия ($t = 1.29$; $P = \text{NS}$) и на 24-ия час ($t = 1.07$; $P = \text{NS}$) и процента плъхове, достигащи критерия за обученост, еднакъв за 3-ия и 24-ия час – 67 % ($\chi^2 = 0.0$, $P = \text{NS}$) (Фиг. 38, табл. 2).



Фиг. 38. Ефекти на HU-210 (5 μg) и SR 141716A (3 μg), микроинжектирани i.c.v. на плъхове, върху латентното време при тестовите за памет на 3-ия и 24-ия час (апарат “step through”). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ – достоверност на разликата спрямо контролите.

8. Ефекти на HU-210 и SR 141716A върху обучителните и паметови процеси на плъхове с модел на депресия (OBX)

Експерименти в апарат shuttle box

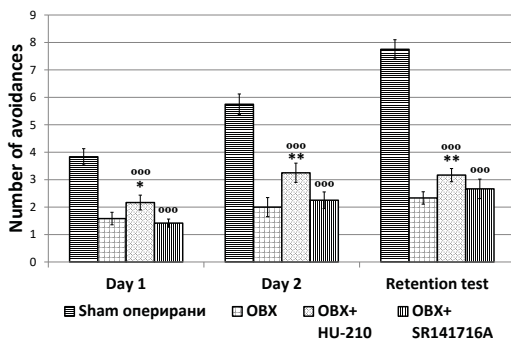
Бяха използвани отделни еднофакторни ANOVA за анализиране на броя на авойданс-отговорите, отчетени по време на обучението (I-ви и II-ри ден) и теста за памет (24-ия час след обучението).

Отделните еднофакторни ANOVA на броя на авойданс-отговорите показва достоверен ефект при OBX плъховете на: I-ия обучителен ден ($F_{1,23} = 35.96$, $P \leq 0.001$), на II-ия обучителен ден ($F_{1,23} = 54.20$, $P \leq 0.001$) и при теста за памет ($F_{1,23} = 169.00$, $P \leq 0.001$). Post hoc t-тест сравненията показва, че при плъховете с развито депресивно-подобно състояние (OBX) броя

на авоидансите е достоверно намален както по време на обучението – I-ви ($t=6.00$, $P \leq 0.001$) и II-ри ден ($t=7.36$, $P \leq 0.001$), така и при теста за памет ($t=13.00$, $P \leq 0.001$) в сравнение с sham оперираните контроли (фиг. 41).

Бяха проследени ефектите на HU-210 ($5 \mu\text{g}/1\mu\text{l}$) и SR 141716A ($3 \mu\text{g}/1\mu\text{l}$), въведени i.c.v. на фона на развито депресивно-подобно състояние след олфакторна булбектомия върху обучението и паметта.

Отделните еднофакторни ANOVA на авоидансите по време на обучението показаха достоверност за фактора вещество на I-вия ($F_{2,35}=3.15$, $P \leq 0.05$) и II-рия обучителен ден ($F_{2,35}=3.89$, $P \leq 0.05$).



Фиг. 41. Ефекти на HU-210 ($5 \mu\text{g}$) и SR 141716A ($3 \mu\text{g}$), микроинжектирани i.c.v. на OBX плъхове, върху броя на авоидансите на I-ви и II-ри обучителен ден и при теста за ретенция (апарат “shuttle box”). * $P \leq 0.05$,

** $P \leq 0.01$ – достоверност на разликата спрямо OBX контролите.

°°° $P \leq 0.01$ – достоверност на разликата спрямо sham оперираните плъхове.

Post-hoc t-тестът показва, че HU-210 подобрява обучението, т.е. достоверно повишава броя на авоидансите на микроинжектираните OBX плъхове на I-вия ($t=1.65$; $P \leq 0.05$) и на II-рия ($t=2.53$, $P \leq 0.01$) обучителен ден в сравнение с OBX контролите, инжектирани с физ. разтвор. Сравнявайки обаче, ефектите на HU-210, въведен на фона на депресивно-подобно състояние с sham оперираните животни, се установява достоверно понижаване на броя на авоидансите на I-вия ($t=4.15$; $P \leq 0.001$) и на II-рия ($t=4.89$; $P \leq 0.001$) обучителен ден, т.е. HU-210, не може да компенсира увредените от булбектомията обучителни процеси (фиг. 41). SR 141716A не променя значимо показателите на I-вия ($t=0.612$; $P = \text{NS}$) и на II-рия ($t=0.54$, $P = \text{NS}$) обучителен ден в сравнение с OBX контролите, но в сравнение с sham оперираните животни броя на авоидансите на I-вия ($t=7.27$; $P \leq 0.001$) и

на II-рия ($t = 7.28$, $P \leq 0.001$) обучителен ден остава достоверно понижен (фиг. 41).

Еднофакторният ANOVA на авойданс-отговорите при теста за ретенция не показва достоверен ефект за фактора вещество ($F_{2, 35} = 2.25$; $P = \text{NS}$). Post-hoc тестът показва, че HU-210 ($t = 2.53$; $P \leq 0.01$) подобрява паметта на плъховете с депресия, а SR 141716A ($t = 0.8$; $P = \text{NS}$) не я повлиява в сравнение с OBX плъховете, третирани с физ. разтвор. При сравняване ефектите на HU-210 ($t = 10.76$; $P \leq 0.001$) и SR 141716A ($t = 10.18$; $P \leq 0.001$) с sham оперираните животни се установи, че при теста за ретенция и двете съединения не могат да компенсират паметовия дефицит, предизвикан от депресивно-подобното състояние (фиг. 41).

Експерименти в апарат step through

Отделни еднофакторни ANOVA бяха използвани за анализиране на латентното време при тестовете за ретенция на 3-ия и на 24-ия час.

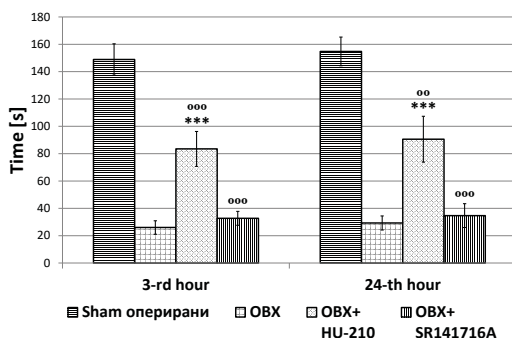
ANOVA на броя на секундите латентно време, показва статистическа достоверност за фактора OBX на 3-ия час ($F_{1, 19} = 77.86$; $P \leq 0.001$) и на 24-ия час ($F_{1, 19} = 88.61$; $P \leq 0.001$).

Двустранното премахване на bulbi olfaktorii (OBX), след 15-ия ден, предизвиква достоверно намаляване на латентното време при тестовете за ретенция на 3-ия час ($t = 8.82$, $P \leq 0.001$) и на 24-ия час ($t = 9.41$, $P \leq 0.001$) и драстично намаляване (до 0 % на 3-ия и 24-ия час) процента на плъховете, които достигат критерия на обученост в сравнение с sham оперираните плъхове ($\chi^2 = 9.643$, $P < 0.001$) (Фиг. 42, Табл. 2).

При провеждане на експеримента, веществата бяха микроинжектирани на фона на развитото депресивно-подобно състояние (OBX), 5 мин. преди обучителната сесия и не се прилагаха преди тестовете за памет на 3-тия и 24-тия час след обучението.

Отделните еднофакторни ANOVA за латентното време показва статистическа достоверност за фактора вещество на 3-тия час ($F_{2, 29} = 13.93$; $P \leq 0.001$) и на 24-тия час ($F_{2, 29} = 9.00$; $P \leq 0.001$). Post-hoc t-теста показва, че HU-210, въведен на фона на развито депресивно-подобно състояние, удължава статистически значимо латентното време при теста за ретенция на 3-тия час ($t = 4.20$; $P \leq 0.001$) и на 24-тия час ($t = 3.49$; $P \leq 0.001$) и повишава процента на плъховете (от 10 % на 3-тия час до 20 % на 24-тия час), които достигат критерия на обученост в сравнение с контролните плъхове с OBX (0 % и при двата теста) ($\chi^2 = 1.053$, $P = \text{NS}$). Сравнението с sham оперираните плъхове обаче показва, че латентните времена на 3-тия час ($t = 3.59$; $P \leq 0.001$) и на 24-тия час ($t = 3.09$; $P \leq 0.01$) са достоверно скъсени (фиг.42; табл 2).

Прилагането на SR 141716A не води до съществено различие от контролната OBX група. Латентните времена са значимо скъсени на 3-тия ($t=0.95$; $P=NS$) и на 24-тия ($t=0.53$; $P=NS$) час в сравнение с sham оперираните животни (фиг. 42; Табл. 2). , а критерия на обученост е 0% на 3-ия и на 24-ия час ($\chi^2=0.0$, $P=NS$). Латентните времена са значимо скъсени на 3-ия ($t=8.31$; $P\leq 0.001$) и на 24-ия час ($t=7.98$; $P\leq 0.001$) в сравнение с sham оперираните животни (фиг. 42; Табл. 2).



Фиг. 42. Ефекти на HU-210 (5 μ g) и SR 141716A (3 μ g), микроинжектирани i.c.v. на OBX пълхове върху латентното време при тестовете за памет на 3-ия и 24-ия час (апарат “step through”). *** $P\leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо OBX контролите. ^{oo} $P\leq 0.01$; ^{ooo} $P\leq 0.001$ – достоверност на разликата спрямо sham оперираните пълхове.

ОБСЪЖДАНЕ

Ендоканабиноидната система (ЕКС) участва в модулиране на синаптичната трансмисия в различни части от системата за регулация на движението при гръбначните, включително в невронални центрове, отговорни за планиране и изпълнение на движенията в мозъчната кора, базалните ганглии, малкия мозък и мозъчния ствол (El Manira and Kyriakatos, 2010).

Резултатите от проведеното проучване показаха, че активирането или блокирането на CB1R при интактни плъхове не нарушава хабитуацията по време на свързаната с експлораторното поведение активност (1-5-та мин). Прилагането на HU-210 и SR 141716A, i.c.v., предизвиква постепенно снижаване на хоризонталната и вертикалната двигателна активност, но на по-ниско (HU-210) и обратно, на по-високо ниво от тази на контролите (SR 141716A). Това подсказва, че острото прилагане на лиганди на CB1R при плъхове не нарушава значимо когнитивните възможности и приспособимостта им при попадане в непозната среда.

При локомоторната активност (1-30 мин) промените наподобяват тези, получени за експлораторното поведение. Въздействието на HU-210 се изразява в достоверно потискане на двигателната активност, а на SR 141716A, макар и недостоверно през част от периода – в повишаване през 30-те минути отчитан период, сравнени с контролите. Намаляването на двигателната активност във времето също става успоредно на тази на контролните животни.

Първоначалните проучвания върху ефектите на канабиноидите показват двупосочен, доза-зависим ефект върху двигателната активност на опитните животни при различни поведенчески тестове. Ниските дози стимулират двигателната активност, а високите – я намаляват и дори предизвикват катаlepsия (Wickens and Pertwee, 1993). Като стандартен тест за агонистично действие спрямо CB1R в ЦНС се прилага т.нар. канабиноид-предизвикана тетрада у мишки, изразяваща се в хиполокомоция, хипотермия, катаlepsия и аналгезия, установена първоначално под действие на Δ^9 -тетрахидроканабинол (Δ^9 -THC) (Metna-Laurent et al., 2017). Тези ефекти се купират от SR 141716, селективен CB1R антагонист, което предполага, че се медира от CB1R рецепторите (Metna-Laurent et al., 2017). Друго доказателство за това е наблюдаваната екстремна локомоторна хипоактивност при тест в открито поле (open-field test) при мишки с деактивиран ген за CB1R (Steiner et al., 1999).

Ендоканабиноидите потискат освобождаване на медиатори и в задръжните и в активаторните синапси, но количеството на CB1R в задръж-

ните синапси, където предизвикват подтискане на задържането, е многократно по-голямо. Въздействието на агонистите върху СВ1R предизвиква нарушаване на времевата синхронизация в динамиката на електричната активност на хипокампапалните неврони, което вероятно, променя нивото на двигателна активност на животните (Robbe and Buzsáki, 2009).

Резултатите ни дават основание да заключим, че лигандите на канабиноидните СВ1R, микроинжектирани *i.c.v.* на интактни плъхове, проявяват разнопосочен ефект върху експлораторната и двигателната активност (HU-210 – потискащ, SR 141716A – стимулиращ), без да нарушават хаби-туацията. Вероятно е налице модулиращо участие на СВ1R в осъществяването на тези поведенчески реакции.

Множество изследвания разкриват важното значение на ендоканабиноидната система в патогенезата на депресивните разстройства (Zhou, 2017). Доказателствата са натрупани както при животински модели на депресия, така и от проучвания при хора. Животни с премахнат ген за СВ1R проявяват депресивно-подобно поведение (Valverde, 2012). Подобен ефект има и блокирането на СВ1R при животни и хора (Moreira et al., 2009a; Vuggy et al., 2011).

Използваният от нас модел на депресия – двустранна олфакторна булбектомия (ОВХ), предизвиква при гризачи синдром с поведенчески, неврохимични и структурни аномалии, подобни на тези, наблюдавани при депресия у хора. Невродегенеративните промени вследствие на олфакторната булбектомия и промяната в активността на редица невротрансмитерни системи, включително и на ендоканабиноидната сигнализация водят до състояние на повишена двигателна активност. Установява се и промяна в експлораторното поведение с нарушена хаби-туация (Tashev et al., 2010; Pudell et al., 2014).

Промяната в нивото на ендоканабиноидите в ЦНС оказва влияние върху депресивно-подобните симптоми при животински модели. Екзогенното им внасяне или внасянето на агонисти, блокирането на разграждането или обратното им захващане има антидепресивно действие (Eisenstein et al., 2010), а дефицита им в ЦНС има продепресивно действие (Bluett et al., 2014).

Установено е, че активирането на СВ1R под действие на агонисти предимно подобрява депресивно-подобното състояние при животински модели (Haj-Mirzaian et al., 2017). Данните за действието на антагонистите, обаче са противоречиви (Moreira et al., 2009a).

При използвания от нас ОВХ модел, прилагането на HU-210 доведе до намаляване на експлораторната и локомоторната активност, проследени

съответно в 5-мин и 30-мин период и показва тенденция към подобряване на нарушената хаbitуация. Тъй като хиперактивността на ОВХ плъховете е ключов симптом на депресивно-подобното състояние, предизвикано от булбектомията, склонни сме да интерпретираме резултата като тенденция за нормализиране на двигателната активност и намаляване на депресивната симптоматика. SR 141716A също показва подобна тенденция, като намали само броя на вертикалните движения.

В литературата има данни за промяна в активността на редица невротрансмитерни и невромодулаторни системи след ОВХ, сред които и ендоканабиноидната. Smaga и сътр. (2014) в проучването си върху ОВХ плъхове установяват намаление на нивата на анандамид в префронтална кора, хипокамп и стриатум и увеличение в nucleus accumbens, докато нивата на 2-AG са повишени в префронтална кора и намалени в nucleus accumbens, като промените са съпроводени с изменение на експресията на ендоканабиноид-метаболизиращите ензими в съответните структури. Намален е и броят на CB1R и CB2R в хипокамп, дорзален стриатум и нуклеус акумбентс. Eisenstein и сътр (2010), провели своето изследване по отношение на вентралния стриатум, съобщават за понижаване в нивата на анандамид и 2-AG при запазена гъстота на CB1R.

Резултатите ни подкрепят хипотезата, че промените в ЕКС придружават развитието на депресивно-подобно поведение при плъхове. В използвания от нас модел на депресия, активирането на CB1R показва сигнификантна тенденция за преодоляване на депресивно-подобното състояние, променяйки поведенческите параметри в посока към стойностите, отчетени при sham оперираните контроли. За регистриране на по-отчетливи прояви следва да допринесе проучване на ефектите в условията на хроничен опит.

Натрупани са множество експериментални данни които показват, че ендоканабиноидната система участва в регулацията на тревожното състояние, емоционалното обучение, стресовия отговор на организма и др. (Hill and Gorzalka, 2009). Канабисът се използва от древността до наши дни заради еуфоричния и релаксиращ ефект върху организма. Употребата му обаче, във високи дози при продължителен прием е причина за възникване на промени в настроението, съпроводени с повишена тревожност и паника. Въпреки интензивните проучвания, механизмите, чрез които ЕКС повлиява настроението и тревожността, все още са ненапълно изяснени. (Lisboa et al., 2017). За модулиране активността на ЕКС са използвани множество методи, сред които модификация на гена, кодиращ CB1R, прилагане на CB1R агонисти и антагонисти, инхибитори на ендоканабиноид-

ни трансмембранни преносители и др.

В литературата са налице противоречиви данни за ефектите на високи и ниски концентрации на канабиноидни агонисти върху тревожността (както при хора, така и при експериментални животни) (Moreira and Wotjak, 2010). Интерпретацията на експерименталните резултати се затруднява от факта, че поведенческите реакции зависят от редица фактори. Ефектът е много често доза-зависим, като ниските дози имат анксиолитично действие, а високите дози засилват анксиогенезата (Rey et al., 2012). Използването на различни поведенчески тестове за оценка на състоянието на тревожност и излагането на животните на допълнителен стрес, са фактори, водещи до различни поведенчески отговори при третиране с канабиноиди. Начинът на въвеждане на канабиноидите или мястото на въвеждане в мозъка е допълнителен фактор, пораждащ разнородни резултати. Така например, ниските дози Δ^9 -THC инжектирани в префронталната кора или хипокампуса имат анксиолитично действие, докато в базолатералната амигдала ефектът е анксиогенен (Segev et al., 2018).

Нашето проучване беше осъществено с оглед предоставяне на нови данни за ефектите на лиганди на CB1R, въведени еднократно i.c.v. върху състоянието на тревожност на плъхове, тествани в повдигнат кръстосан лабиринт. При микроинжектиране на интактни плъхове, агонистът на CB1R HU-210 прояви анксиолитичен ефект, докато антагонистът SR 141716A показва анксиогенен ефект, съпроводен с повишаване на двигателната активност на животните. Данните ни са в подкрепа на резултатите от изследване, при което, използвайки метода на повдигнатия кръстосан лабиринт, Patel и Hillard (2006) установяват, че CB1R агонисти WIN 55212-2 и CP 55,940, прилагани интраперитонеално, осъществяват анксиолитичен ефект в ниски дози.

Установихме също, че на фона на състоянието на повишена тревожност при OBX плъховете, въвеждането на HU-210 успява да намали тревожността, като поведението на OBX плъховете се доближава до това на sham оперираните контроли. Не отчетохме разлика в състоянието на тревожност между OBX животните, третирани с SR 141716A и OBX контролите.

В литературата надделява схващането, че като цяло, потискането на ЕКС засилва състоянията на стрес и тревожност, докато умереното стимулиране на активността на системата ги намалява (Lutz, 2009). По-голямата част от наличните данни показват, че ЕКС има анксиолитично действие при различни модели на тревожност, като ефектите са по-силни при състояние на стрес или висока възбуда (Lisboa et al., 2017).

Стимулацията посредством високи дози CB1R агонисти усилва тревожността и стресовите изяви (Lutz, 2009) като тези двуфазни ефекти са описани както при животни, така и при хора (Hill and Gorzalka, 2009). Също така, има данни, че ниски дози преки CB1R агонисти проявяват анксиолитично действие (Patel and Hillard, 2008).

При тест с повдигнат кръстосан лабиринт системно въведеният в ниски дози $\Delta 9$ -THC проявява анксиолитично-подобно действие при плъхове, посредством CB1R медиран механизъм, но ефекта не се наблюдава при мишки, (Rubino et al., 2007) което предполага, че е налице видова специфичност. Във високи дози, $\Delta 9$ -THC повишава състоянието на тревожност при гризачи (Patel and Hillard, 2006; Rubino et al., 2007). Канабисът може да предизвика аверзивно състояние при продължителна употреба, както и състояние на тревожност и пристъп на паника (Hall and Solowij, 1998), приемът на $\Delta 9$ -THC може да отключи психотични състояния, (Linszen and van Amelsvoort, 2007).

В регулацията на тревожното състояние участват различни невротрансмитерни системи. Освен GABA-ергичната и серотонинергичната система, чиято нарушена функция се свързва с възникването на тревожните разстройства, в контрола на тревожното състояние участват и допаминергичната, адренергичната, холинергичната и глутаматергичната система (Gelfuso et al., 2014; Prado et al., 2017).

Изследванията показват, че CB1R върху GABA-ергичните и глутаматергичните неврони са необходими за изява на съответно анксиогенните/анксиолитичните ефекти наблюдавани при въвеждане на високи/ниски дози на CB1R агонист CP55,940 (Rey et al., 2012). Разнородните резултати при прилагане на канабиноидни агонисти биха могли да се обяснят с различната чувствителност на GABA-ергичните и глутаматергичните неврони към активирането чрез CB1R при двата вида гризачи (Haller et al., 2007) както и на различия в експресията, разпространението и функционалната характеристика на CB1R. Проучванията при трансгенни мишки показват, че анксиолитичния ефект на ниските дози CB1R агонисти е следствие от инхибиране на глутаматергичната трансмисия, докато аксиогенният – на високите им дози се дължи на потиснатата GABA-ергична трансмисия (Rey et al., 2012).

Една от най-популярните теории за възникването на депресивното състояние е моноаминоергичната хипотеза, при която се предполага наличието на дисфункция в серотонинергичната и норадренергичната невротрансмисия (Chiriță et al., 2015). Подобряването на моноаминоергичната невротрансмисия е ефект, характерен за всички антидепресивни средства,

независимо от механизма им на действие (Racagni and Popoli, 2010).

Ендоканабиноидните взаимодействия със серотонинергичната система в мозъка са демонстрирани в експериментални изследвания. Ниските дози на CB1/2R агонист WIN55212-2 усилват невроналната активност в nucleus raphe dorsalis в мозъчния ствол, а установеният антидепресивен ефект се свързва с активиране на ЕКС в префронталния кортекс (Gobbi et al., 2005).

Блокадата на CB1R с SR 141716A, както и хроничното въвеждане на Δ^9 -ТНС, водят до повишение на серотониновите нива в префронталния кортекс (Tzavara et al.2003; Sagredo et al., 2006), а хроничното периферно въвеждане на HU-210 усилва поведенческите ефекти в отговор на еднократно въведени агонисти на серотониновите 5-HT1A и 5-HT2A рецептори. Стимулацията на ендоканабиноидната система с HU-210 води до повишена (5-HT2A) и понижена (5-HT1A) активация на двата вида серотонинови рецептори, което също така се наблюдава и при депресивни състояния. С тези ефекти би могло и да се обясни настъпването на афективни разстройства след продължителна употреба на канабис (Hill et al., 2005b).

Олфакторната булбектомия е модел, който предизвиква промени в множество невротрансмитерни системи, сред които серотонинергична, адренергична, глутамат и GABA-ергична, установени са и нарушения в ендоканабиноидната сигнализация (Song and Leonard, 2005; García-Gutiérrez et al., 2012; Smaga et al., 2017).

Получените резултати ни дават основание да допуснем, че възстановяването на тревожното състояние при въвеждане на HU-210 до нивата на контролните животни вероятно се дължи на коригирания дефицит в ендоканабиноидната сигнализация. Възможно е, анксиолитичните ефекти на агониста на кананабиноидните рецептори да са свързани с модулиращото влияние на ЕКС върху някои невротрансмитерни системи в мозъка. Резултатите биха могли да допринесат за по-добро разбиране на нервните механизми, участващи в анксиолитичното действие на ендоканабиноидната система при интактни животни и при животни с OBX модел на депресия.

В настоящото изследване установихме, че HU-210 микроинжектиран *i.s.v.*, повишава прага на болката при интактни плъхове в сравнение с контролите, третирани с физиологичен разтвор, докато SR 141716A не повлиява значимо ноцицептивния отговор. Основната находка е, че при плъхове с OBX, HU-210 повишава болковия праг в сравнение с OBX контролите и с sham оперираните контроли, докато SR 141716A не повлиява значимо ноцицепцията, в сравнение с OBX контролите, но повишава прага на бол-

ката в сравнение с sham оперираните контроли.

Депресията и симптомите на соматична болка често се срещат заедно и са описани сложни взаимодействия между възприемането на болката и депресивните симптоми. В предишни изследвания е установено, че прагът на болката при плъхове с OBX е повишен, в сравнение с sham оперираните контроли (Belcheva et al., 2009). При прилагането на CB1R агонист нарушенията в ноцицепцията, предизвикани от булбектомията, се задълбочиха още повече, като праговете на болка се отдалечиха още повече от нормалните стойности, т.е. отново се прояви сигнификантен, антиноцицептивен ефект, наблюдаван и при интактните животни. Отново наблюдавахме липса на изявен ефект при въвеждане на CB1R антагонист.

Аналгетични ефекти на канабиноидите са демонстрирани при различни животински модели на болка. Антиноцицептивните ефекти включват действия на различни нива, включително периферни сензорни неврони, гръбначен мозък и централни нервни пътища (Burston and Woodhams, 2014). CB1R присъстват в някои мозъчни области, участващи в ноцицепцията, като таламус и амигдала (Hasanein et al., 2007; Itami et al., 2016). CB1R също са експресирани в клетките на периакведукталното сиво вещество в средния мозък и в повърхностните слоеве I и II на дорзалния рог гръбначния мозък (получаващи ноцицептивни сигнали от първични аферентни неврони), които са ключови места за модулиране на ноцицептивната информация (Hu and Mackie, 2015). Има данни, че системното и i.c.v. прилагане на агонисти на канабиноидните рецептори предизвиква аналгезия, включваща централни антиноцицептивни механизми (Nana and Sagen, 2011).

Известно е, че прилагането на CB1R агонисти на гръбначномозъчно ниво действа антиноцицептивно, а на антагонисти – предизвиква хипералгезия и води до евокирано от нея повишено активиране на неврони с широко динамично разпространение (wide dynamic range (WDR) neurons), което показва, че ендоканабиноидната система оказва важно модулаторно действие върху ноцицепцията на спинално ниво (Starowicz et al., 2012; Woodhams et al., 2015). Известно е, че CB1R се експресират върху аксоните на първичните сетивни неврони, генериращи ноцицептивни сигнали, достигащи до слой I и II на дорзалния рог, както и върху част от GABA-ергичните и глицинергичните интенеурони, астроцитите и микроглиалните клетки в същите слоеве. Установено е наличието им и в дорзолатералния фуникулум и слой X (сивата комисура) на гръбначния мозък – структури, свързани с ноцицепцията (Woodhams et al., 2015; Lu et al., 2018). Обсъжда се хипотезата, че силно повишената ноцицептивна ак-

тивност предизвиква освобождаване на 2-AG, който с помощта на CB1R отрицателно модулира ноцицептивната сигнализация чрез инхибиране освобождаването на проноцицептивни невротрансмитери от първичните аферентни терминали. За това дава основание наблюдението, че при животни без увреждания, инжектирането интраспинално на JZL184, инхибитор на моноацилглицерол липаза (MAGL), селективно инхибира острата ноцицептивна невротрансмисия, евокирана от механичен стимул, по начин, медиран от CB1R. Приложен при същите условия инхибиторът на хидролазата на мастнокиселинни амиди (FAAH) няма ефект (Woodhams et al., 2012; Woodhams et al., 2015).

При изследвания върху модели на остра болка някои автори установяват намаление в нивата на N-арахидоноилетаноламин (NAAE), 2-AG и палмитоилетаноламина (Jhaveri et al., 2008), други не откриват значима промяна (Beaulieu et al., 2000), а трети установяват повишени нива на анандамида и понижена активност на FAAH, локално и в гръбначния мозък (Holt et al., 2005). Khasabova и сътр. (2008; 2011) наблюдават понижени нива на NAAE, поради повишеното му разграждане от FAAH, съчетано с повишена експресия на CB1R и миграция към периферната част – дендритите на сензорни клетки в спиналния ганглий, както и повишени нива на 2-AG, съчетани с повишена експресия на CB2R в кожни клетки. Екзогенното внасяне, съответно, на двата ендоканабиноида или местно повишаване на нивото им, чрез селективни инхибитори на FAAH и MAGL, блокиращи разграждането им, предизвиква антиноцицептивни ефекти (Khasabova et al., 2008; 2011). Прилагането на селективни ензимни инхибитори, съответно на MAGL и FAAH позволява удължаване ефекта на ендоканабинаидите и това има важно практическо значение, както за експерименталното проучване на ефектите им, така и за евентуално разработване на нови обезболяващи медикаменти (Woodhams et al., 2015; Dupertas et al., 2018). Друг механизъм за локално повишаване на ендоканабиноидите е прилагане на инхибитори на захващането и транспорта им вътре в клетката, където се метаболизират (Pertwee, 2014, Burston and Woodhams, 2014). Локалното инхибиране на MAGL увеличава тъканите нива на 2-AG и блокира зараждането и предаването на болевия сигнал, чрез механизми, включващи както CB1R, така и CB2R (Guindon et al., 2011; Woodhams et al., 2015). Повишените нива на NAAE и 2-AG могат да оказват директно антиноцицептивно действие чрез активиране на CB1R и CB2R върху локалните аферентни неврони, което се наблюдава при периферно инжектиране на URB937, инхибитор на FAAH, който не може да премине кръвно-мозъчната бариера (Clapper et al., 2010). От друга страна

2-AG може да активира периферни CB2R върху имунни клетки в кожата – макрофаги (клетки на Лангерханс), лимфоцити, мастоцити и др., а това инхибира продуцирането и освобождаването на провъзпалителни и проноцицептивни медиатори (Burston and Woodhams, 2014; Turcotte et al., 2016). В допълнение, блокираното разграждане на 2-AG намалява освобождаването на арахидонова киселина, ключов прекурсор на провъзпалителните простагландини и така също намалява болката (Nomura et al., 2011; Burston and Woodhams, 2014). Антиноцицептивното действие на ЕКС в гръбначния мозък е свързано както с потискане на невроналната хипервъзбудимост, така и с модулиране активирането на астроцити и микроглиални клетки. Може да се окаже, че подобряването на този ендегенен път има широк спектър от терапевтични приложения при лечението на множество болкови състояния (Burston and Woodhams, 2014).

Експерименти с мишки с инактивиран ген само за CB1R или само за CB2R показват значителен принос на CB1R към канабиноид-медираната аналгезия (Li et al., 2017b). Селективното изключване на CB1R експресията в сетивни неврони от спинален ганглий на мишки значително намалява ефикасността на локално и системно прилаганите канабиноиди при модели на остра и хронична болка (Agarwal et al., 2007). Блокирането на CB1R преди инжектиране на формалин при формалинов тест, повишава чувствителността към болка, но подобен е ефектът и при блокиране на CB2R, което показва участието и на CB2R в ноцицептивната модулация (Guindon et al., 2007; Burston et al., 2014; Woodhams et al., 2015). Използването на смесения CB1/2R агонист CP55940 при модел на токсична невропатия върху мишки също потвърждава участие на CB2R (Deng et al., 2015).

На супраспинално ниво ендоканабиноидната система оказва модулаторно влияние върху възходящите ноцицептивни пътища. Директното микроинжектиране на канабиноидни агонисти в таламуса, параакведукталното сиво вещество, дорзалният нуклеус рафе и ростралната вентромедиална медула предизвикват антиноцицептивни ефекти при тестове за остра болка, които могат да бъдат блокирани чрез антагонизъм на CB1R. При електрическа стимулация на параакведукталното сиво вещество, при възпаление в периферните тъкани или невропатична болка в него се освобождава анандамид и 2-AG, което определя тази структура като много важна в провеждане и обработка на ноцицептивната информация (Olango et al., 2012; Woodhams et al., 2017). Параакведукталното сиво вещество участва в медиране на стрес-индуцираната аналгезия – намаляване на ноцицептивните отговори, възникващо след въздействие на екзогенен стрес. При животни, изложени на лек електрически шок на стъпалото,

се наблюдава по-слаба реакция при следващ тест за остра ноцицепция, медирана от CB1R и свързана с освобождаване на анамид и 2-AG в параакведукталното сиво вещество, като ефекта е по-силен след използването на инхибитори на FAAH или MAGL. Приема се, че основно значение има действието на 2-AG в дорзолатералното параакведуктално сиво вещество и се предполага механизъм, включващ активиране на низходящи инхибиторни пътища (Gregg et al., 2012; Woodhams et al., 2017).

Ростралната вентромедиална медула също е важен регулаторен център в модулирането на ноцицептивната информация. В нея са установени 3 вида клетки: “ON-”, “OFF-“ и неутрални спрямо ноцицептивните сигнали. Счита се, че on-клетките улесняват предаването на ноцицептивни сигнали, а off-клетките имат противоположно действие – инхибират го. Микроинфузията на агонист на CB1R в ростралната вентромедиална медула инхибира активирането на on-клетките, като същевременно спомага за активиране на off-клетките (Meng and Johansen 2004). Приема се, че ростралната вентромедиална медула участва в модуляцията на гръбначно-мозъчната ноцицептивна функция с помощта на десцендентни инхибиторни въздействия (Woodhams et al., 2017).

Настоящото изследване е първото, което изследва ефектите на CB1R върху ноцицепцията на плъхове с модел на депресия, използвайки метода на механичен натиск върху лапичката. Резултатите посочват възможно участие на CB1R в ноцицептивния отговор на плъховете с ОВХ.

Влиянието на CB1 рецепторните лиганди върху процесите на паметта и обучението е документирано чрез различни експерименти и клинични изследвания, но резултатите остават противоречиви – те могат както да подобрят, така и да влошат паметта, като всеки от тях засяга паметта по различен начин. Тези противоречия могат да бъдат свързани с разликите в използваните поведенчески модели, конкретните експериментални условия, като например доза, вид и време на прилагане на лиганда, област на приложение в ЦНС и др. (Kruk-Slomka et al., 2017).

Литературните данни, въпреки известни противоречия при резултатите с хронична употреба на канабис, потвърждават наличието на паметови нарушения при хора, употребяващи канабис (Montgomery et al., 2012). Противоречието би могло да се обясни отчасти с малката извадка, с недостатъчно прецизните тестове или използване на доброволци, употребяващи и други психоактивни вещества, което нарушава чистотата на проучването.

Проучванията показват, че остро приложение на синтетични агонисти на CB1R нарушава запаметяването при различни животински модели

(Wise et al., 2012; Abush and Akirav, 2013). Подобен е и ефектът при непряко стимулиране на CB1R (Campolongo et al., 2012). Това влошаване се възстановява чрез предварително третиране със селективния CB1R антагонист SR 141716A (Kruk-Slomka et al., 2017).

Получените от нас данни показват влошаване на обучението и запамяването под действие на агониста на CB1R върху интактни плъхове, при тестовете с активно и пасивно избягване (shuttle box и step through). Резултатите ни потвърждават данните на Wise и сътр. (2012) и Abush и Akirav (2013), където са използвани различни тестове за памет.

Когнитивните нарушения, наблюдавани при трансгенни мишки с изключен ген за CB1R са нееднозначни и зависят от използваните поведенчески тестове. Така например, съвместно с повишена склонност към развитие на тревожност (Litvin et al., 2013), се установява нарушение в пространствената памет и дефицит в разпознаването на нови обекти и в разпознаването на партньора (Albayram et al., 2016). Друго проучване не установява промени в краткосрочната и дългосрочната памет за социално и обектно разпознаване между мишки с неактивен CB1R и дивия тип, но е установена засилена контекстуална памет за страх и промяна на синаптичната пластичност в хипокампа (Jacob et al., 2012).

Установихме, че блокирането CB1R с SR 141716A при i.c.v. въвеждане предизвика подобрение на обучението и паметта, изследвани с теста за активно избягване (shuttle box), но не и в другия поведенчески тест – step through.

Ефектите на SR 141716A прилаган при различни тестове за памет са нееднозначни. Острото прилагане на SR 141716A преди тренировките подобрява паметовите процеси при гризачи при теста за пасивно избягване, теста с повдигнат Т-лабиринт, теста за памет при социално разпознаване и в радиален лабиринт, а нарушава запаметяването при тест за пространствена памет (Terranova et al., 1996; Wolff and Leander, 2003; Robinson et al., 2008).

Олфакторната булбектомия като модел на депресивно разстройство води до тежки нарушения в обучението и паметта и се явява добър животински модел за проучване въвличането на мозъчните CB1R в обучителните и паметовите процеси при депресивни разстройства (Tashev et al., 2010). При прилагането на лиганди на CB1R на плъхове с модел на депресивно разстройство установихме поведенчески ефекти, противоположни на отчетените при интактни животни. Микроинжектирането на HU-210 доведе до подобрение на тежкото нарушение на способността за обучение и запомняне, предизвикано от олфакторната булбектомия, въпреки,

че подобрението е частично и много по-малко от нивото на тези процеси при sham оперираните плъхове. Блокирането на CB1R обаче, за разлика от интактните плъхове, не повлиява значимо паметовите нарушения, възникнали като последица от OBX и при двата използвани теста за обучение.

Abush and Akirav (2013) установяват при плъхове, изложени на действието на хроничен стрес, нарушения в кратковременната памет, подобни на тези след OBX, както и нарушена дълготрайна потенциация (LTP). Хроничното системно прилагане на CB1/2R агонист WIN55,212-2 подобрява нарушенията в паметта и LTP. Блокирането на подобренията, предизвикано от CB1R антагониста AM251 насочва към мисълта, че те са последица от стрес-предизвикани нарушения във функцията на ендоканабиноидната система.

Moriguchi и сътр. (2006) установяват нарушение на LTP в областта CA1 на хипокампа при OBX мишки като последица от намалената активност на калций/калмодулин-зависимата протеин киназа II и протеин киназа C. Това нарушение на LTP най-вероятно е причина за нарушенията на обучението и паметта, характерно за OBX. Би могло да се предположи, че прилагането на HU-210 вероятно подобрява частично времевата координация между възбудните и задръжните синаптични потенциали и следователно – хипокампалната LTP.

Резултатите от изследването ефектите на лиганди на канабиноидните рецептори върху обучителните и паметовите процеси при плъхове с модел на депресия спомагат за разбиране приноса на ЕКС в патогенетичните механизми на депресивното състояние.

В заключение може да се обобщи, че изследванията върху депресията с помоща на моделиране върху животни, целят да подпомогнат нашето разбиране за проявите ѝ, както и за влиянието на ендоканабиноидната невротрансмисия върху нея, а също и да изяснят при кои пациенти може да се приложи терапия, основаваща се на модулиране на ЕКС. Получените от нашите опити резултати убедително разкриват важната роля на ендоканабиноидната система за формирането на поведение спрямо средата – била тя благоприятна или неблагоприятна. Бъдещи изследвания в тази насока не само биха хвърлили още светлина върху механизмите, лежащи в основата на поведенческите реакции – изобщо, и в частност – при депресивно-подобни състояния, но и, екстраполирайки ги при човека, биха допринесли за прецизиране и оптимизиране на терапията при депресивни състояния.

ИЗВОДИ

1. Ендоканабиноидната система (ЕКС) участва в регулацията на изследователското поведение и двигателната активност на плъхове.
 - 1.1. Активирането на ЕКС не нарушава хабитуацията при изследователското поведение, но понижава двигателната активност на интактни животни.
 - 1.2. Прилагането на канабиноиден СВ1 рецепторен агонист при плъхове с модел на ОВХ подобрява нарушената хабитуация и показва тенденция да нормализира двигателната активност.
2. Активирането на ЕКС има анксиолитичен, а потискането ѝ – анксиогенен ефект при плъхове, подложени на ЕПМ-тест (“повдигнат кръстосан лабиринт”, elevated plus maze). При модела на ОВХ активирането ѝ има подчертан анксиолитичен ефект, като състоянието на тревожност се възстановява до изходното ниво.
3. Канабиноидният рецепторен агонист повишава прага на болката при плъхове. При модела на ОВХ болковият праг е повишен, а активирането на ЕКС допълнително намалява болковата чувствителност.
4. ЕКС участва в регулацията на процесите на обучение и памет при плъхове.
 - 4.1. Прилагането на СВ1 рецепторен агонист нарушава обучителните и паметовите процеси при тестове за избягване; СВ1 рецепторният антагонист подобрява способността за обучение.
 - 4.2. СВ1 рецепторният агонист проявява тенденция да нормализира нарушените обучителни и паметови процеси при ОВХ модел на депресия.

ПРИНОСИ

1. Потвърдено е, че канабиноидните СВ1 рецептори участват в механизмите на депресивно-подобното състояние при ОВХ модел на депресия.
2. Установено е участие на ЕКС в механизмите на тревожното състояние при ОВХ модел. Установен е изразен анксиолитичен ефект при активиране на мозъчните СВ1 рецептори.
3. За първи път е използван методът на механичен натиск върху лапичката на плъх за изследване влиянието на СВ1 рецепторите върху ноцицепцията на плъхове с ОВХ модел.
4. Установено е, че активирането на мозъчните СВ1 рецептори подобрява обучителните и паметовите процеси на ОВХ плъхове при два теста за памет.
5. Предоставени са данни за ролята на канабиноидните СВ1 рецептори в ЦНС при формиране на поведението, както и за участието им в нарушените поведенчески реакции при ОВХ модел на депресия.
6. Получените данни могат да спомогнат за изясняване механизмите, лежащи в основата на депресивните разстройства при човека, като и за разработване на нови терапевтични средства.

ПУБЛИКАЦИИ И УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Публикации в научни списания

1. Marinov M., M. Ivanova, S. Belcheva, I. Belcheva, N. Negrev, R. Tashev. CB1 ligands modulate learning and memory of OBX rats. *Scripta Scientifica Medica*, 2016, 48 (3): 61-66.
2. Маринов М., М. Иванова, С. Белчева, И. Белчева, Н. Негрев, Р. Ташев, Р. Радев, И. Маринова. Промени в експлораторното поведение на плъхове с олфакторна булбектомия след еднократно въвеждане на лиганди на канабиноидния СВ1 рецептор. *Известия на съюза на учените – Варна*, 2014, 19 (2): 3-8.
3. Marinov M., M. Ivanova, S. Belcheva, I. Belcheva, R. Tashev. Effects of acutely applied cannabinoid CB1 ligands on learning and memory in rats with a model of depression. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 2013, 66 (9): 1331-1338.
4. Marinov M., M. Ivanova, S. Belcheva, D. Kochev, I. Belcheva, R. Tashev. Effects of acutely applied cannabinoid CB1 ligands on nociception in rats with a model of depression. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 2013, 66 (6): 877-882.

Участия в научни форуми

1. Маринов М., М. Иванова, С. Белчева, И. Белчева, Н. Негрев, Р. Ташев, Р. Радев, И. Маринова. Промени в експлораторното поведение на плъхове с изявен модел на депресия – олфакторна булбектомия след еднократно въздействие на лиганди на канабиноидния СВ1 рецептор. 31 октомври 2014 г.: „Месец на науката“ – Варна 2014: Заключителна конференция – „Науката в служба на обществото – 2014“, Варна.
2. Marinov M., M. Ivanova, S. Belcheva, I. Belcheva, N. Negrev, R. Tashev. Effects of acutely applied cannabinoid CB1 ligands on exploratory activity of bulbectomized rats. 24th Annual Assembly of IMAB, 15-18 May 2014, Hotel “Admiral”, Resort “Golden Sands”, Varna, Bulgaria.

3. Marinov M., M. Ivanova, I. Belcheva, S. Belcheva, N. Negrev, R. Tashev. Antinociceptive effect of cannabinoid CB1 receptor agonist in rats with a model of depression. 18th Session of the Balkan Medical Days 16-18 September 2011 Varna, Bulgaria.
4. Marinov M., M. Ivanova, I. Belcheva, S. Belcheva, N. Negrev, R. Tashev. Learning and memory effects of cannabinoid CB1 ligands in rats with a model of depression. 18th Session of the Balkan Medical Days 16-18 September 2011 Varna, Bulgaria.