



Медицински Университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ Варна

Факултет Медицина
Катедра „Физиология и Патофизиология”

д-р Добринка Калинова Дончева

**ВЛИЯНИЕ НА СУБХРОНИЧНО ВЪВЕЖДАНИ ЛИГАНДИ
НА КАНАБИНОИДНИТЕ РЕЦЕПТОРИ ВЪРХУ
ОБУЧИТЕЛНИТЕ
И ПАМЕТОВИ ПРОЦЕСИ НА ПЛЪХОВЕ
С ОЛФАКТОРНА БУЛБЕКТОМИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научен ръководител:

доц. д-р Маргарита Великова, д.м.

Варна, 2022

Медицински Университет
„Проф. д-р Параскев Стоянов“ Варна

Факултет Медицина
Катедра „Физиология и Патифизиология“

д-р Добринка Калинова Дончева

**ВЛИЯНИЕ НА СУБХРОНИЧНО ВЪВЕЖДАНИ ЛИГАНДИ
НА КАНАБИНОИДНИТЕ РЕЦЕПТОРИ ВЪРХУ
ОБУЧИТЕЛНИТЕ
И ПАМЕТОВИ ПРОЦЕСИ НА ПЛЪХОВЕ
С ОЛФАКТОРНА БУЛБЕКТОМИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научен ръководител:

доц. д-р Маргарита Великова, д.м.

Официални рецензенти:

проф. д-р Анна Найденова Толева, д.м.
проф. Цветеслава Веселинова Игнатова-Иванова, д.б.

Варна, 2022

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и предложен за официална защита на заседание на разширен катедрен съвет на Катедрата по Физиология и патофизиология, Факултет Медицина, Медицински университет, Варна

Дисертационният труд съдържа общо 146 страници, структуриран е в 6 глави, включва общо 26 фигури, графики, таблици и сертификати.

Книгописът включва общо 418 литературни източника на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 08.04.2022г.

Съдържание

Използвани съкращения	5
Въведение	6
Цел и задачи.....	10
Материали и методи	11
Резултати и обсъждане.....	16
Заклучение	45
Изводи	48
Приноси.....	50
Публикации свързани с дисертационния труд	51
Участия с презентации на материали от дисертационния труд в научни форуми.....	51

Използвани съкращения

ЕКС – ендоканабиноидна система

ЕК – ендоканабиноиди

СВ - канабиноидни

ОВХ - олфакторна булбектомия

СВ1, СВ2 – канабиноидни рецептори тип 1 и 2

Δ^9 -ТНС - Δ^9 -тетрахидроканабинол

АЕА - анандамид

2-AG - 2-арахидоноилглицерол

RIM - Rimonabant

SNK - тест на Student-Newman–Keuls

i.c.v - интрацеребровентрикуларно

ВЪВЕДЕНИЕ

Ендоканабиноидната система (ЕКС) е липидна сигнална система, която е функционално активна от най-ранните етапи от развитието на мозъка, активна е както през пренаталния период, така и след раждането и има важно значение за организацията на връзките в мозъка. ЕКС се състои от ендоканабиноиди (ЕК), канабиноидни (СВ) рецептори и ензими, които регулират производството и разграждането на ЕК.

В края на 80-те и началото на 90-те години на 20-ти век се идентифицират двата канабиноидни рецептора: СВ1 и СВ2. Фармакологичните им ефекти се проявяват главно чрез активиране на Gi/o протеин-свързани мембранни рецептори. Въпреки, че и двата вида рецептора принадлежат към семейството на G-протеин свързаните рецептори и се характеризират със значителна хомология, те се различават по своята функция и специфичност на клетъчната експресия (Koppel and Davies, 2008). През 90-те години са изолирани два ендогенни канабиноида (ендоканабиноиди): N-арахидоноилетаноламин (АЕА, анандамид) и 2-арахидоноилглицерол (2-AG), за които се открива, че служат като ендогенни агонисти на канабиноидните рецептори.

През последните години се обръща значително внимание на използването на екстракти от канабис в медицината. Марихуаната (*Cannabis sativa*) е психоактивно растение, което съдържа над 400 химически съединения, от които над 60 са фитоканабиноиди, много от тях с противоположни ефекти в човешкия организъм. Най-известни и добре проучени сред фитоканабиноидите са Δ^9 -тетрахидроканабинол (Δ^9 -ТНС) и канабидиол. Δ^9 -ТНС е основният психоактивен канабиноид, отговорен за промените в настроението, чувството на еуфория и когнитивните нарушения, които са отличителни белези на

ефектите на канабиса върху хората. Документираната употреба на марихуаната включва: анти-ноцицепция, противовъзпалително, антикспазматично, антиеметично действие, като преобладаваща е употребата за рекреационни цели, което до голяма степен е ограничило нейното медицинско приложение. Има данни, че някои фитоканабиноиди, особено канабидиол, оказват благоприятно въздействие при различни патологични състояния. На фона на множеството публикации за $\Delta 9$ -ТНС и за канабидиола, останалата част от растителните канабиноиди почти не са изследвани. Противоречиви са и данните за действието на синтетични вещества, лиганди на канабиноидните рецептори, върху поведенческите реакции.

Веществата, модулиращи активността на ЕКС, са в състояние както да увредят, така и да подобрят различните фази на формирането на паметта, чрез директни и косвени механизми. Променената активност на ЕКС съпътства редица психиатрични (депресия, тревожност, шизофрения) и невродегенеративни (болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон) заболявания.

Основен акцент на изследванията включени в настоящия дисертационен труд, е оценка на влиянието на лиганди на канабиноидните рецептори върху паметовите нарушения, индуцирани от олфакторна булбектомия. Използваният от нас експериментален модел олфакторна булбектомия (ОВХ) се основава на хирургично двустранно отстраняване на *bulbi olfactorii* при плъхове. След ОВХ при животните (използват се плъхове или мишки) се развива съвкупност от нарушения (поведенчески, имунни, ендокринни, невроцелуларни, неврохимични и др), които наподобяват промените, наблюдавани при пациенти с депресивни разстройства. Повишената двигателна активност на животните в нова среда е една от най-специфичните промени вследствие на олфакторната булбектомия (van Riezen and Leonard, 1990). Експлораторната

активност на ОВХ-животните също е нарушена (Giardina and Radek, 1991; Vinkers, et al., 2009), затруднена е адаптацията към нова среда, налице са и нарушения в паметта (Sieck, 1972; Primeaux and Holmes, 1999). При ОВХ нарушенията в експлораторната и двигателна активност специфично се повлияват при хронично прилагане на антидепресанти. През последното десетилетие, ОВХ се използва не само като модел на депресия, но и като модел на болестта на Алцхаймер, поради ОВХ-индуцираните невродегенеративни промени в мозъка и последвалите когнитивни нарушения.

Противоречивите данни за ролята на канабиноидните рецептори в поведенческите реакции при животински модели на депресия (Segev et al., 2014 ; Kruk-Slomka et al., 2015; Haj-Mir-Zaian et al., 2017), както и по отношение на когнитивните функции, ни мотивираха в настоящото изследване да изследваме влиянието на субхронично въвеждани лиганди на канабиноидните рецептори върху едни от най-характерните и трайни поведенчески промени, развиващи се при ОВХ-гризачи 14 дни след булбектомията - нарушенията в експлораторната и двигателна активност, обучението и паметта. На базата на предходни изследвания с остро приложение на веществата и поради факта, че фармакологичните средства проявяват антидепресивно действие при модела ОВХ след продължително въвеждане, в опитните постановки на настоящото проучване използвахме различен интервал на субхронично третиране (7-14 дни) и различен път на въвеждане: i.c.v и интрагастрален. Промените в изследваните показатели биха ни дала възможност и да преценим как лигандите на рецепторите повлияват депресивно- подобното състояние при ОВХ модела.

Изследванията, представени в настоящия труд, целят да предоставят данни за изясняване на потенциалното участие на канабиноидните рецептори в механизмите на паметовите

нарушения и да хвърлят светлина върху възможностите за модулация на рецепторите като възможен терапевтичен подход при лечение на депресия и невродегенеративни заболявания, съпроводени с когнитивен дефицит.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Да се проучи влиянието на субхронично въвеждани СВ1-лиганди (агонист и антагонист на канабиноидните рецептори) върху обучителните и паметовите процеси при плъхове с експериментален модел олфакторна булбектомия (ОВХ).

ЗАДАЧИ

1. Да се изследва влиянието на лиганди на канабиноидните рецептори върху изследователското поведение и свързаната с него двигателна активност, обучението и паметта, след 7-дневно i.c.v. въвеждане при плъхове с експериментален модел олфакторна булбектомия (ОВХ).

2. Да се проследят ефектите на 14-дневно, интрагастрално въвеждане на СВ1-рецепторен антагонист Rimonabant (SR-141716A) при ОВХ-плъхове (14 дни преди ОВХ, 14 дни непосредствено след ОВХ и 14 дни след развито депресивно-подобно състояние) върху изследователското поведение и свързаната с него двигателна активност, обучението и паметта.

3. Да се оцени значението на времевия интервал при въвеждане на Rimonabant (SR-141716A) за развитието на предизвиканите от булбектомията нарушения в изследователското поведение и свързаната с него двигателна активност, обучението и паметта при ОВХ-плъхове.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Експериментални животни

Експериментите са проведени върху 294 мъжки полово зрели бели плъхове, порода Wistar, с тегло 200-220g. Плъховете са поставяни в полипропиленови клетки със свободен достъп до храна и вода, при постоянна стайна температура $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, с регулиран цикъл на осветление 12 часа тъмнина/12 часа светлина. Поведенческите експерименти са провеждани между 10:00 и 13:00 часа.

Хирургични процедури

Двустранна олфакторна булбектомия (OBX)

След анестезия с Calypsol (50 mg/kg, i.p.), експерименталните животни бяха фиксирани в стереотаксичен апарат (Stoelting, USA). Меките тъкани на главата и периоста бяха премахнати, след което черепните кости се пробиваха с бормашина (диаметър на борчетата 2 mm), в ляво и в дясно от средната линия. Координатите на bulbus olfactorius бяха определени според атласа на Pellegrino и Cushman (1967) за плъхове порода Wistar. Булбектомията се извършваше, като bulbi olfactorii се аспирираха чрез игла от неръждаема стомана, прикрепена към водна помпа. След операцията на животните беше осигурен 7-дневен възстановителен период. Плъховете бяха ежедневно адаптирани към експеримента (хендлирани). Sham-оперираните плъхове бяха подложени на същите хирургични манипулации като булбектомираните, но без аспириране на булбусите.

Имплантиране на водещи канюли във ventriculus ventrolateralis dexter:

Имплантирането на водещи канюли се извърши 3 дни след олфакторната булбектомия. След анестезия, животните бяха фиксирани в стереотаксичен апарат (Stoelting, USA). След отпрепарирване 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 плъховете порода Wistar. След операцията, животните имаха 7-дневен възстановителен период.

Използвани фармакологични вещества

HU-210 (Tocris)

SR-141716A, Rimonabant (Sanofi)

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 $\text{pH}=7.4$ бяха въвеждани в обем 1 μl в продължение на 1 минута и инжекционната канюла беше оставяна на мястото още за 30 секунди.

Веществата (HU-210, в доза 5 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$ и SR-141716A в доза 3 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$) бяха инжектирани в продължение на 7 дни (с начало 15-ти ден след OBX). Sham-оперираните плъхове бяха инжектирани с физ.разтвор по същата процедура.

SR-141716A (Rimonabant, RIM), в доза 3mg/kg беше въвеждан интрагастрално в продължение на 14 дни. Веществото беше разтваряно „ex tempore” във физиологичен разтвор и

въвеждано посредством интрагастрална сонда в доза 1 ml/100g. Използваните експериментални животни, третирани интрагастрално с Rimopabant (RIM) в продължение на 14 дни.

Верификация

След приключване на поведенческите опити беше провеждана анатомична верификация. Верификацията беше осъществена чрез микроинжектиране на 1 µl 2 % метиленово синьо 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 обработката на резултатите.

Поведенчески методи

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). Експерименталната камера е с размери 50 x 50 x 21 cm. Апаратът е конструиран на принципа на фотоклетката - регистрира броя на пресичанията на инфрачервените светлинни лъчи при движението на животното в условни единици, което позволява избирателно отчитане на броя на хоризонталните и вертикалните движения за определен период от време. Животното се поставя в центъра на експерименталната камера и всяко пресичане на лъч от движение на животното автоматично се регистрира като импулс. Получената информация се обработва от компютър. Движенията на животните бяха регистрирани в продължение на 5 минути (на всяка минута отделно и общо за 5 минути).

Методи за оценка на степента на обучение и запаметяване:

Тест за активно двупосочно избягване с отрицателно подкрепление (aparat shuttle box):

Обучението беше проведено в апарат shuttle box по метода на Gozzani и Izquierdo (1976), модифициран от Петков и съавт. (1993). Като условен дразнител се използва изкуствена светлина (електрическа крушка от 21W, монтирана на капака над всеки сектор). Светлината се включва посменно в този сектор, в който към края на междусеанския период не се намира плъхът. Условният дразнител (светлина) предшества прилагането на безусловния (ел. ток) в течение на 9 секунди, като продължава и във времето на действие на безусловния дразнител (общо 21 секунди) за една тренировка, ако преди изтичането им не е реализирано преминаване на плъха в отсрещния сектор на апарата. Безусловният дразнител е променлив ток (0.5 mA; 50 Hz) с напрежение (20-30 V), регулирано чрез потенциометър. Токът се пропуска по металния решетъчен под за 12 секунди на всеки сеанс, ако преди това не е реализирано преминаване на плъха в отсрещната част на апарата. Условнорефлексното избягване (avoidance, авойданс) се регистрира, когато плъхът преминава в отсрещния сектор на апарата във времето на действие на условния дразнител (светлината), т.е. през 9-те секунди преди да се включи електрическият ток.

Обучението беше проведено по следната схема:

С цел адаптация, един ден преди опита всяко животно бе поставяно в камерата на апарата и бяха прилагани само светлинни дразнения.

Обучението се провеждаше в два последователни дни. Във всеки обучителен ден се провеждаха по 50 тренировки, чрез комбинирано прилагане на условен дразнител и безусловен дразнител. Тестването за памет (ретенция) се провеждаше на 24-ия час, след втория обучителен ден. Светлинният стимул беше

прилаган за 9 секунди, последван от електрически ток само за 2 секунди (като “подсещане”).

Като показател за обученост и запаметяване се отчитаха броят на условнорефлексните авойданси за всяка тренировъчна сесия (1-ви, 2-ри обучителен ден) и при теста за памет.

Тест за пасивно избягване с отрицателно подкрепление (step-through test):

Обучението за пасивно избягване с отрицателно подкрепление беше проведено по метода на Buresova и Bures (1963) чрез тест step-through. Апаратът се състои от две камери. Обучението се състои от еднократна тренировка. Животното се поставя на платформата в осветената камера при отворена врата. След влизане на животното в затъмненото помещение, вратата се затваря и по подовата решетка се подава електрически ток.

Тестът за памет се провежда на 3-ия и 24-ия час след обучението, като всяко животно отново се поставя в осветената камера при отворена врата и престоя на плъха там се отчита в секунди. За критерий на обученост се приема престой на животното в осветената камера за период от 180 секунди.

Статистическа обработка на резултатите

Данните от експериментите бяха обработени статистически с еднофакторен или двуфакторен ANOVA. Резултатите получени от step-through са обработени с χ^2 . Резултатите са представени във вид на средно-аритметични стойности със съответните им стандартни грешки ($X \pm S.E.M.$). За определяне достоверността на разликите между групите беше използван post-hoc Student-Newman-Keuls (SNK) при минимална достоверност ($P \leq 0.05$).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Влияние на субхронично въведени лиганди на канабиноидните рецептори върху изследователското поведение и свързаната с него двигателна активност на плъхове с ОБХ-модел.

1.1. Влияние на HU-210 (CB-агонист) и SR-141716A (CB1-антагонист) след 7 дневно i.c.v. въвеждане.

Субстанциите бяха въведени самостоятелно i.c.v. в десния латерален вентрикул на плъхове в продължение на 7 дни, в дози 5 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$ (HU-210) и 3 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$ (SR-141716A). Тестовите в апарат Opto-Varimex се провеждаха на 21-ви ден след операцията (Sham или ОБХ), а микроинжектирането се извършваше 5 минути преди поставянето на животните в камерата.

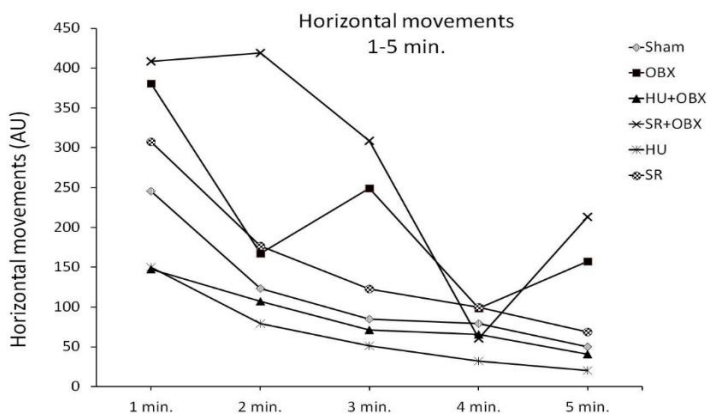
Двуфакторен ANOVA (с повтарящи се измервания върху двата фактора) беше използван за анализиране на изследователското поведение. Факторите бяха вещество с 3 нива (HU-210, SR-141716A и физиологичен разтвор) и време с 5 нива (1-ва, 2-ра, 3-та, 4-та и 5-та мин.). Еднофакторен ANOVA беше използван за анализиране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

1.1.1. Влияние на HU-210 и SR-141716A при Sham-оперирани плъхове

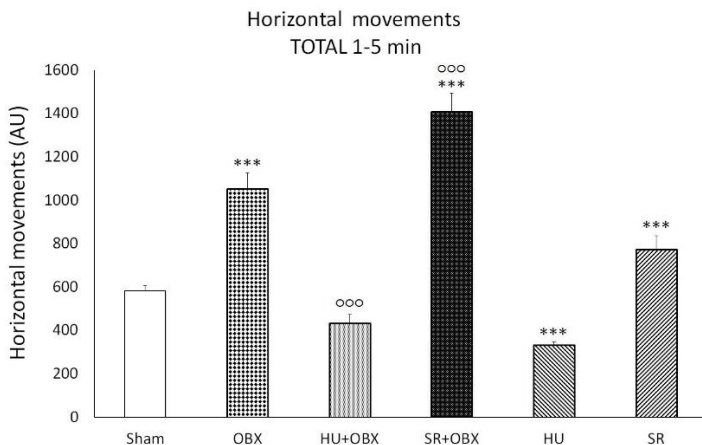
Post-hoc SNK тестът показва, че HU-210, въведен i.c.v. при Sham-оперирани плъхове, постепенно и достоверно понижава броя на хоризонталните движения на 1-ва ($P \leq 0.001$), 2-ра ($P \leq 0.01$), 3-та ($P \leq 0.0001$), 4-та ($P \leq 0.0001$) и 5-та ($P \leq 0.0001$) минута, в сравнение с Sham-контролите (Фиг. 1).

SR-141716A достоверно повишава броя на хоризонталните движения на 1-ва ($P \leq 0.03$), 2-ра ($P \leq 0.01$), 3-та ($P \leq 0.02$), 4-та ($P \leq 0.05$) и 5-та ($P \leq 0.01$) минута, в сравнение с Sham-контролите (Фиг. 1).

Post-hoc SNK-тестът показва, че HU-210 статистически достоверно понижава общия брой на хоризонталните движения ($P \leq 0.0001$) в сравнение с контролите. Обратно, след въвеждането на SR-141716A се наблюдава достоверно в повишение на общия брой на хоризонталните движения, в сравнение с контролите, ($P \leq 0.007$), (Фиг. 2).



Фиг. 1. Влияние на HU-210 и SR-141716A върху броя на хоризонталните движения при Sham- и OBX-плъхове (7-дневно въвеждане i.c.v.) по време на 5-минутен период на наблюдение ($n = 7$).



Фиг. 2. Влияние на HU-210 и SR-141716A върху общия брой на хоризонталните движения при Sham- и OBX-плъхове (7-дневно i.c.v. въвеждане) по време на 5-минутен период на наблюдение. ($n = 7$). *** $P \leq 0.001$ – сравнение с Sham-оперираните контроли; ooo $P \leq 0.001$ – сравнение с OBX-контролите.

1.1.2. Влияние на HU-210 и SR-141716A при плъхове с OBX-модел
 Беше установено значимо повишение на общия брой хоризонтални движения при OBX-плъховете за 5-минутния период на наблюдение, в сравнение с Sham-оперираните контроли ($P \leq 0.001$), (Фиг. 2).

Анализът на броя на хоризонталните движения за всяка минута поотделно за 5-минутния период показва, че HU-210 ($5 \mu\text{g}/1\mu\text{l}$) достоверно намалява броя на хоризонталните движения на OBX-плъховете, на 1-ва ($P \leq 0.0001$), 2-ра ($P \leq 0.01$), 3-та ($P \leq 0.0001$), 4-та ($P \leq 0.001$) и 5-та мин. ($P \leq 0.001$), в сравнение с OBX-контролите, като активността на третираните животни не се различава съществено от Sham-контролите. HU-210 нормализира и нарушената при OBX-хабитуация (постепенно намаляване на изследователската активност през периода). SR-

141716A (3 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$), въвеждан i.c.v. в продължение на 7 дни на фона на развито депресивно-подобно състояние, статистически достоверно повишава броя на хоризонталните движения на 2-ра ($P \leq 0.0001$), 3-та ($P \leq 0.04$) и 5-та мин ($P \leq 0.05$), а на 4-та минута ($P \leq 0.001$) ги намалява. Анализът на резултатите показва, че SR-141716A не повлиява нарушената при OBX-хабитуация (Фиг. 1).

HU-210 ($P \leq 0.0001$) статистически достоверно понижи общия брой на хоризонталните движения в сравнение с OBX-контролите, като в сравнение с Sham-контролите при тях липсваха значими различия (P -NS). Нормализирането на хабитуацията и на локомоторната активност под влияние на HU-210 би могло да се счита като проява на антидепресивен ефект. SR-141716A повиши общия брой на хоризонталните движения в сравнение с OBX-плъховете ($P \leq 0.004$) (Фиг. 2).

1.2. Влияние на Rimonabant (SR-141716A), въвеждан интрагастрално, в продължение на 14 дни (преди, непосредствено след и 14 дни след OBX) върху изследователското поведение и свързаната с него двигателна активност на плъхове с OBX-модел.

1.2.1. Хоризонтална активност 1^{-ва} - 5^{-та} минута (брой на хоризонталните движения за всяка минута поотделно и общ брой за целия 5-мин период)

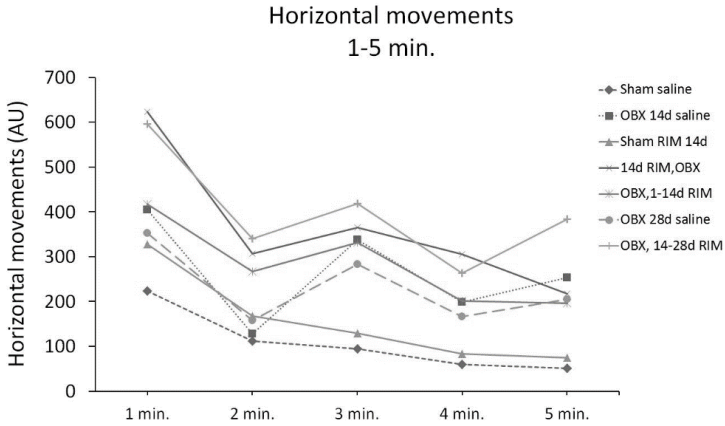
Броят на хоризонталните движения при въвеждане на RIM на Sham-оперирани плъхове беше повишен в сравнение с Sham-оперираните контроли - както за всяка минута поотделно: на 1-ва мин ($P \leq 0.02$); 2-ра ($P \leq 0.003$); 3-та ($P \leq 0.04$); 4-та ($P \leq 0.02$) и 5-та ($P \leq 0.05$) (Фиг. 3) минута, така и за целия 5-минутен период ($P \leq 0.001$) (Фиг. 4).

Хоризонтална активност при OBX модел:

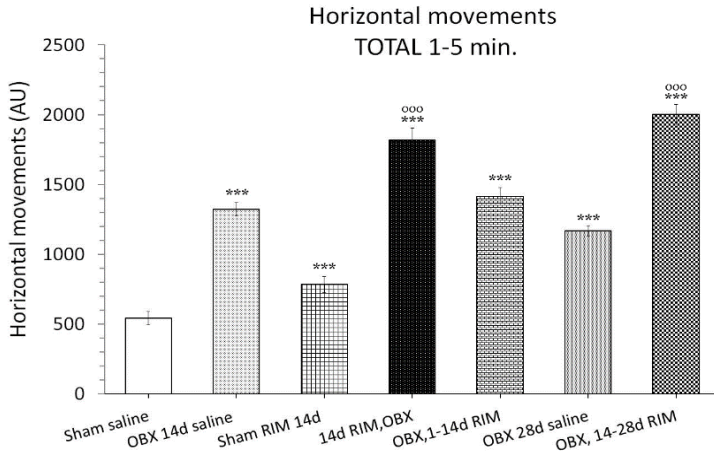
На 14-ия ден след OBX броят на хоризонталните движения е статистически достоверно повишен, както на всяка минута: на 1-ва ($P \leq 0.001$); 3-та ($P \leq 0.001$); 4-та ($P \leq 0.001$) и 5-та ($P \leq 0.001$), а на 2-ра минута липсваха промени ($P - NS$) (Фиг. 3), така и за целия период ($P \leq 0.001$), в сравнение с Sham-оперираните контроли (Фиг. 4).

Въвеждане на Rimonabant преди OBX (1-14d RIM, OBX):

RIM, въведен 14 дни преди булбектомията (14d RIM, OBX) повиши броя на хоризонталните движения на 1-ва мин ($P \leq 0.001$); 2-ра – ($P \leq 0.001$); 3-та ($P \leq 0.001$); 4-та ($P \leq 0.001$); 5-та ($P \leq 0.001$) минута, в сравнение с Sham-оперираните контроли (фиг.3). Общият брой хоризонтални движения за 5-минутния период също беше повишен ($P \leq 0.001$) в сравнение с Sham-контролите. Установихме и увеличение на броя на хоризонталните движения на 1-ва мин ($P \leq 0.001$); 2-ра ($P \leq 0.001$) и 4-та ($P \leq 0.005$) спрямо OBX_{14d}-контролите, а на 3-та и 5-та минута не се наблюдаваха промени ($P - NS$) (Фиг.3). Общият брой на хоризонталните движения за целия 5-минутен период, също показва увеличение ($P \leq 0.001$), спрямо OBX_{14d} -контролите (Фиг. 4).



Фиг. 3. Влияние на Rimonabant (SR-141716A) (3mg/kg) върху броя на хоризонталните движения при OBX-плъхове по време на 5-минутен период на наблюдение (14-дневно интрагастрално въвеждане) (n=8)



Фиг. 4. Влияние на Rimonabant (SR-141716A), (3mg/kg) върху общия брой на хоризонталните движения при OBX-плъхове по време на 5-минутен период на наблюдение (14-дневно интрагастрално въвеждане). (n=8)
 *** $P \leq 0.001$ – сравнение с Sham-оперираните контроли; ⁰⁰⁰ $P \leq 0.001$ – сравнение с OBX-контролите.

Въвеждане на Rimonabant непосредствено след OBX (OBX, 1-14dRIM):

Post-hoc- тестът за периода 1-ва- 5-та минута показва, че RIM, въведен 14 дни непосредствено след булбектомията повишава броя на хоризонталните движения на 2-ра ($P \leq 0.001$) и 5-та ($P \leq 0.04$) минута спрямо контролната група (OBX14d-saline), докато на 1-ва, 3-та и 4-та минута не се наблюдаваха промени (P-NS) (Фиг.3). Промени в общия брой на хоризонталните движения за 5-минутния период в сравнение с OBX_{14d}.saline контролите не бяха установени, (P – NS) (Фиг. 4).

В сравнение с Sham-оперираните контроли, при OBX, 1-14d RIM-животните се установи повишен брой хоризонтални движения на 1-ва мин ($P \leq 0.001$); 2-ра ($P \leq 0.001$); 3-та ($P \leq 0.001$); 4-та ($P \leq 0.001$); 5-та ($P \leq 0.001$) (Фиг. 3) минута, както и повишен общ брой хоризонтални движения ($P \leq 0.008$) (Фиг. 4).

Резултатите показват, че RIM, въведен непосредствено след OBX не повлиява статистически значимо промените в хоризонталната активност, причинена от премахване на *bulbi olfactorii*.

Въвеждане на Rimonabant след OBX (на фона на развито депресивно-подобно състояние), (OBX, 14-28d RIM):

При въвеждането на RIM от 14-ия до 28-ия ден след булбектомията, (на фона на развито депресивно-подобно състояние) се установи, че броят на хоризонталните движения за периода 1-ва - 5-та минута е повишен за всяка минута: на 1-ва мин ($P \leq 0.002$); 2-ра – ($P \leq 0.001$); 3-та ($P \leq 0.03$); 4-та ($P \leq 0.02$); 5-та ($P \leq 0.01$) (Фиг. 3) както и за целия 5-минутен период ($P \leq 0.001$) в сравнение с OBX-контролите, тествани 28 дни след булбектомията, (OBX_{28d}-saline), (Фиг. 4).

В проведеното от нас проучване установихме, че NU-210, въведен i.c.v. в продължение на 7 дни, нормализира

двигателната активност на ОВХ-плъховете през 5-минутния период на наблюдение (намалява броя на хоризонталните и вертикалните движения, като общият брой не се различава съществено от този при Sham-контролите), докато SR-141716A повишава двигателната активност при излагане на нова среда в сравнение с ОВХ и Sham-контролите.

Наред с двигателната активност, за нас беше важно да проследим и въздействието върху изследователското поведение на животните, поставени в нова среда. Привикването (хабитуацията) към нова среда може да се определи като угасване с течение на времето на ориентировъчния рефлекс към повтарящо се индиферентно въздействие. Хабитуацията се смята за една от най-елементарните форми на обучение, при които намаленото изследване като функция на многократно излагане към средата се приема като индекс на паметта (Thiel CM et al., 1998; Thiel CM et al., 1999).

Характерно за ОВХ-плъховете е, че наред с хиперлокомоцията се наблюдава нарушение в изследователското поведение и хабитуацията към нова открита среда. Наблюдавахме, че движенията на ОВХ-животните през първите 5 минути от поставянето им в откритото пространство, не намаляват постепенно (което е характерно при нормална хабитуация), а движенията се активират след 2-ра минута, т.е. хабитуацията е нарушена, животното не може да се ориентира и да свикне с новата обстановка. Въвеждането на НУ-210 при ОВХ плъхове доведе до постепенно намаляване на изследователската активност през 5-минутния период на наблюдение, докато прилагането на SR-141716A на фона на развито депресивно-подобно състояние, не показва статистически значими различия, т.е. експлораторната активност остана висока. Въз основа на тези данни можем да заключим, че НУ-210 нормализира изследователското поведение на ОВХ-животните, докато СВ1-

антагонистът SR-141716A допълнително го влоши, засилвайки хиперлокомоцията. При Sham-оперираните плъхове, активирането на СВ / блокирането на СВ1-рецепторите не промени съществено експлораторното поведение (1-5-та минута). След i.c.v.-въвеждането на СВ-лигандите, активността постепенно намаляваше, но на по-ниско (при NU-210) или на по-високо (при SR-141716A) ниво от тази на контролите, третитрани с физ.разтвор. Интересно е да се отбележи, че за разлика от OBX, при Sham-оперираните животни ефектите на NU-210 се ограничават предимно върху двигателната активност, но не повлияват съществено хабитуацията.

Хиперактивността на OBX-плъховете в нова среда е ключов симптом от депресивно-подобното състояние, който се нормализира от хронично прилагане на антидепресанти. Поради тази причина, ние сме склонни да интерпретираме резултатите от субхроничното i.c.v.-третиране на OBX-плъхове с NU-210 (нормализиране на експлораторното поведение и на двигателната активност, както и положителното повлияване на паметовите процеси, виж по-долу) при OBX-плъхове, като тенденция за намаляване на депресивната симптоматика. Антидепресивно-подобният ефект на NU-210 отчасти би могъл да е свързан с хиполокомоторните ефекти, които се проявяват и при Sham-оперираните животни.

Резултатите за положителното действие на СВ-агонист върху експлораторните и двигателни нарушения, индуцирани от OBX, подкрепят данните, че дисрегулацията на ЕКС допринася за хиперлокомоторния отговор след булбектомията (Rodriguez-Gaztelumendi A et al., 2009; Eisenstein et al., 2010.). В подкрепа на това твърдение са и нашите резултати, че субхроничното i.c.v.-въвеждане на SR-141716A води до задълбочаване на индуцираните от OBX нарушения в локомоцията.

Данните за действието на СВ1-антагонисти при животински модели на депресия са изключително противоречиви (Moreira et al., 2009). Преди години, прилаганият с голям успех за лечение на затлъстяване СВ1-рецепторен антагонист Rimonabant проявява странични ефекти, свързани с повишена тревожност и развитие на депресивна симптоматика, поради което употребата му е прекратена. Изследванията върху участието на СВ-рецептори все още не са дали еднозначни резултати при депресивно-подобно състояние в условия на експеримент.

За да допринесем за натрупване на повече данни в тази насока, разширихме проучването на ефектите на SR-141716A (Rimonabant, RIM) върху експлораторната активност на ОБХ-плъхове, по време на началния период на излагане на открито пространство (фазата на новост) като използвахме различен път и продължителност на приложение.

При анализ на резултатите установихме, че времевият интервал има значение за изявата на ефектите на Rimonabant. RIM, прилаган 14 дни преди ОБХ (14d RIM, ОБХ), както и 14 дни след развитие на депресивно-подобно състояние (ОБХ, 14-28d RIM), повиши броя на хоризонталните и вертикални движения (1-ва-5-та минута поотделно), както и общия брой в сравнение с ОБХ-контролите и с Sham-оперираните контроли, докато при въвеждането на RIM непосредствено след извършване на булбектомията (ОБХ, 1-14d RIM,) липсваха значителни промени в броя на движенията (1-ва-5-та мин поотделно и общ брой) в сравнение с ОБХ-контролите. Данните от анализа на изследователското поведение показваха, че в резултат на 14-дневното прилагане на Rimonabant през всички времеви интервали: преди ОБХ (14d RIM, ОБХ), непосредствено след ОБХ (ОБХ, 1-14d RIM,) и 14 дни след развитие на депресивно-подобно състояние (ОБХ, 14-28d RIM), хабитуацията

на ОВХ-плъховете остава нарушена. За неспособността на ОВХ-плъховете да привикнат към новата среда свидетелства липсата на постепенно намаляване на движенията по време на изследователското поведение през 5-минутния период на наблюдение (липса на прогресивно понижаване на кривата). Ясно се открие тенденцията за прилагането на RIM в 14-дневен период, предшестваш булбектомията, както и следващ развитието на депресивно-подобното състояние, да стимулира двигателната активност в сравнение с хиперлокомоторното състояние, индуцирано от ОВХ. Множество литературни данни посочват, че трайните поведенчески промени, индуцирани от ОВХ, сред които и повишената двигателна активност в открита среда, се извяват около 14 дни след оперативното отстраняване на обонятелните луковици. Нашите наблюдения показаха, че именно в този 14 дневен период прилагането на RIM не повлиява двигателната активност. Интерес представлява наблюдението, че при различен път на въвеждане на SR-141716A, интрацеребровентрикулно или интрагастрално при ОВХ-плъхове, стимулиращият двигателната активност ефект се запазва. След 14-дневното интрагастрално въвеждане на RIM при Sham-оперираните контроли установихме повишение на двигателната активност (общ брой вертикални и хоризонтални движения за 5-минутен интервал на наблюдение). Хабитуацията на ОВХ-плъховете в нова среда, макар и на фона на повишена двигателна активност, не беше повлияна сигнификантно в сравнение с ОВХ-контролите, третирани с физ. разтвор, липсваше ефект и върху хабитуацията на Sham-оперираните контроли (която се запази нормална).

Анализът на резултатите ни насочва към заключенията, че СВ-рецепторите имат специфично участие в нарушенията на двигателната активност на ОВХ-животните. RIM, прилаган в определен времеви интервал (преди и 14 дни след ОВХ), води до

допълнително задълбочаване на ОВХ-индуцираните нарушения , докато прилаган в интервала на развитие на поведенческия ОВХ-синдром (1-14 ден) не се повлиява съществено хиперлокомоцията. Резултатите ни са в съгласие с установената от Gorzalka и съавт. Взаимовръзка между нарушенията/блокирането на ендоканабиноидната сигнализация и невъзможността за опознаване и привикване към стреса в нова среда (Gorzalka BB et al., 2008).

2. Влияние на субхронично въвеждани лиганди на канабиноидните рецептори върху обучителните и паметови процеси на плъхове с ОВХ-модел:

2.1. Влияние на HU-210 и SR-141716A след 7-дневно i.c.v.-въвеждане:

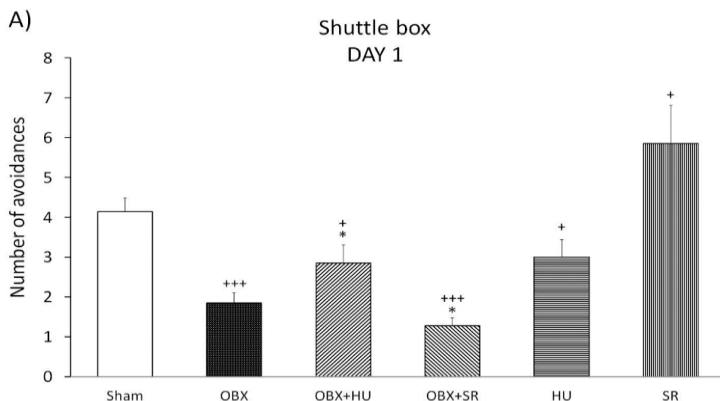
2.1.1. Проучване по метода за активно двупосочно избягване (shuttle box):

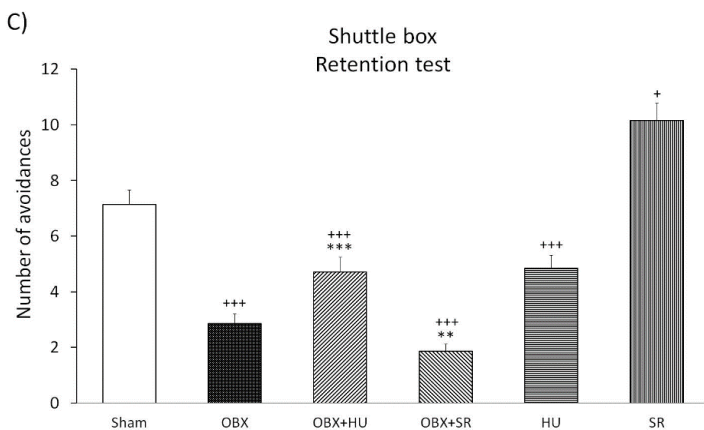
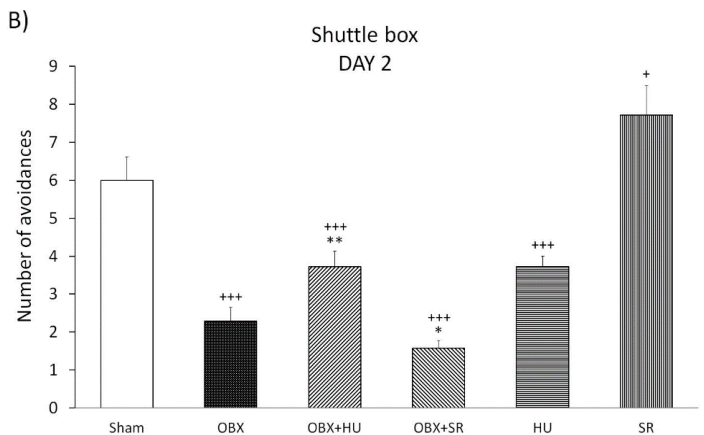
Ефектите на HU-210 (5 µg/1µl) и SR-141716A (3 µg/1µl), въвеждани самостоятелно и на фона на депресивно-подобно състояние в продължение на 7 дни в десния латерален вентрикул, бяха проследени върху обучителните и паметови процеси чрез два метода за избягване (активно и пасивно) с отрицателно подкрепление.

Post-hoc SNK-тестът показва, че HU-210 влошава обучението и паметта при Sham-контролите, т.е достоверно намалява броя на авойдансите на I-ия ($P \leq 0.04$), II-рия обучителен ден ($P \leq 0.01$) и при теста за ретенция ($P \leq 0.006$) в сравнение с контролите, третиран с физиологичен разтвор. (Фиг. 5. А, В, С). SR-141716A подобрява обучението и паметта, като статистически достоверно повишава броя на авойдансите на I-ия обучителен ден ($P \leq 0.04$), на II-рия обучителен ден ($P \leq 0.03$) и при теста за ретенция ($P \leq 0.04$) в сравнение с контролите, третиран с физиологичен разтвор. (Фиг. 5. А, В, С).

14-дни след премахването на *bulbi olfaktorii* при ОВХ-плъховете се наблюдава влошаване на обучителните и паметовите процеси. SNK-тестът показва, че броя на авойдансите достоверно намалява по-време на обучението – I-ви ($P \leq 0.001$) и II-и ден ($P \leq 0.001$), и при теста за памет ($P \leq 0.001$), в сравнение с Sham-оперираните контроли (Фиг. 5 А,В,С).

Установихме, че HU-210 намалява паметовия дефицит при ОВХ-плъховете, като достоверно повишава броя на авойдансите на ОВХ-плъховете на I-вия ден ($P \leq 0.02$), II-ия обучителен ден ($P \leq 0.005$) и при теста за ретенция ($P \leq 0.003$) в сравнение с ОВХ-контролите, инжектирани с физ.разтвор. SR-141716A, въвеждан i.c.v. в продължение на 7 дни намали още повече броя на авойдансите през I-ви ден ($P \leq 0.05$) и II-ри обучителен ден ($P \leq 0.05$) и при теста за ретенция ($P \leq 0.01$) в сравнение с ОВХ-контролите, инжектирани с физ.разтвор. Показателите бяха намалени и в сравнение с Sham-контролите на I-ия ($P \leq 0.0001$), II-рия обучителен ден ($P \leq 0.0001$) и при теста за ретенция ($P \leq 0.0001$) влошава състоянието (Фиг. 5 А, В, С).





Фиг. 5. (A, B, C). Ефекти на HU-210 (5 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$) и SR-141716A (3 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$) въвеждани *i.c.v.* в продължение на 7 дни при OBX-плъхове върху броя на авойдансите (*shuttle box*). A) I^{ви} обучителен ден; B) II^{ви} обучителен ден; C) тест за ретенция ($n = 7$). + $P \leq 0.05$; $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$ – сравнение с Sham-оперираните контроли; **** $P \leq 0.001$ – сравнение с OBX-контролите.

2.1.2. Проучване по метода за пасивно избягване (step through):

За определяне ефектите на HU-210 (5 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$) и SR-141716A (3 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$), въведени в продължение на 7 дни самостоятелно и на фона на депресивно-подобно състояние в десния латерален вентрикул, върху паметта беше използван метода за пасивно избягване с отрицателно подкрепление (step through). Въвеждането на HU-210 скъси латентното време при тестовите за ретенция на 3-ия час ($P \leq 0.01$) и на 24-ия час ($P \leq 0.006$) и намали процента на плъховете, които достигат критерия за обученост на 3-ия (14%; $\chi^2 = 2.800$, $P \leq 0.05$) и на 24-ия час (14%; $\chi^2 = 4.667$, $P \leq 0.02$), в сравнение с Sham-контролите (57% и 71% съотв.), инжектирани с физ.разтвор (Фиг. 6, 7).

Post-hoc SNK-тестът показва, че SR-141716A удължава латентното време само при теста за ретенция на 3-ия час ($P \leq 0.05$), докато при теста на 24-ия час не се установи промяна ($P = \text{NS}$). На 3-ия час процента на плъховете достигнали критерия за обученост беше повишен (71 %) спрямо контролата (57 %), докато при теста за ретенция на 24-ия час липсаваше промяна (71 %) в сравнение с Sham-контролите, 71 % (Фиг. 6, 7).

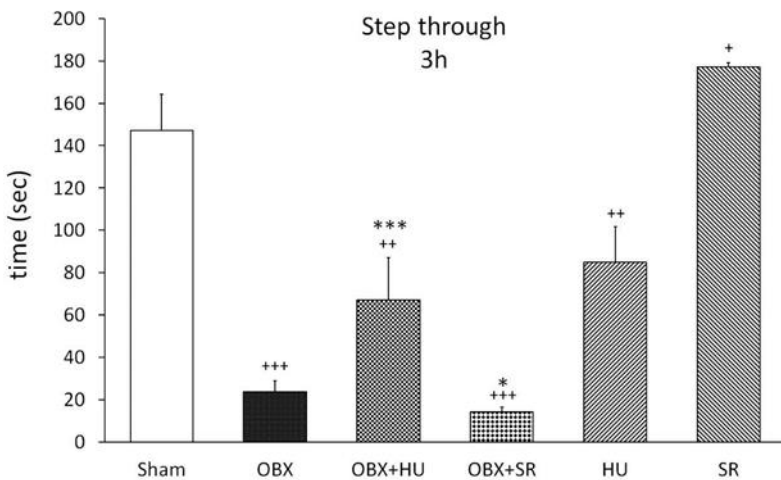
Двустранното премахване на bulbi olfaktorii влоши отчетените показатели при теста с пасивно избягване: намалено латентно време при тестовите за ретенция на 3-ти- час ($P \leq 0.0001$) и на 24-ти-час ($P \leq 0.0001$) и понижен до нула ($P < 0.001$) процент на плъховете, които достигат критерия на обученост в сравнение с Sham-оперираните плъхове на 3-ия час ($\chi^2 = 4.000$; $P \leq 0.05$) и на 24-ия час ($\chi^2 = 6.002$; $P \leq 0.02$) (Фиг. 6, 7).

HU-210, въведен на фона на развито депресивно-подобно състояние, удължи статистически значимо латентното време при теста за ретенция на 3-ти час ($P \leq 0.03$) и на 24-ти час ($P \leq 0.04$) и повиши процента на плъховете, достигащи критерия на обученост на 24-и час, 29 % ($\chi^2 = 2.333$, $P \leq 0.05$) в сравнение с

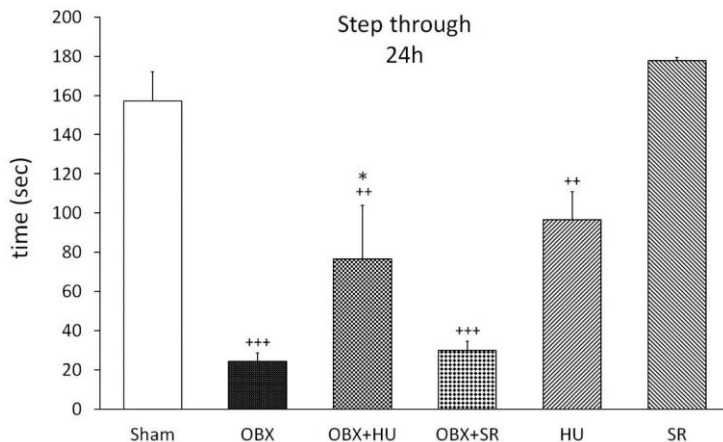
ОВХ-плъховете (0%). В сравнение с Sham-контролите латентно време беше скъсено на 3-ти час ($\chi^2 = 2.800, P = NS$) и на 24-ти часа ($\chi^2 = 2.571, P \leq 0.05$) (фиг. 6, 7).

След въвеждането на SR-141716A наблюдавахме промени в латентното време при ОВХ-животните: достоверно намаление на 3-ти час ($P \leq 0.05$) и повишение на 24-ти час ($P \leq 0.01$), без промяна в процента на плъховете, които достигат критерия на обученост на 3-ти и 24-ти час сравнение с ОВХ-контролите третирани с физ.разтвор ($P=NS$). Сравнението с Sham-контролите показва, че при групата ОВХ-животни, третирани с SR-141716A, латентното време е скъсено на 3-ти час ($P \leq 0.001$) и 24-ти час ($P \leq 0.001$) и е намален броят на животните, които достигат критерия за обученост на на 3-ти час ($\chi^2 = 5.600, P \leq 0.02$) и 24-ти час ($\chi^2 = 7.778, P \leq 0.01$), (фиг. 6, 7).

Получените резултати показват, че при субхронично, *i.c.v.* въвеждане, NU-210 подобрява обучението и паметта на плъховете с ОВХ-модел, докато SR-141716A ги влошава, в сравнение с ОВХ-контролите, третирани с физ.разтвор (shuttle box и step through). NU-210 показва тенденция частично да компенсира паметовия дефицит, предизвикан от депресивното състояние. Ефектите на NU-210 и SR-141716A при ОВХплъховете са противоположни на тези, наблюдавани при Sham-оперираните животни. NU-210, въвеждан *i.c.v.* при Sham-оперирани животни влошава обучителните и паметовите процеси, докато SR-141716A ги подобрява.



Фиг. 6. Ефекти на HU-210 (5 □g) и SR-141716A (3 □g), след 7 дневно, *i.c.v.* въвеждане на OBX - плъхове върху латентното време при тест за ретенция на 3-ия час (*step through*) ($n = 7$). $+P \leq 0.05$; $++P \leq 0.01$; $+++P \leq 0.001$ – сравнение с Sham-оперираните контроли; $*P \leq 0.05$; $***P \leq 0.001$ – сравнение с OBX-контролите.



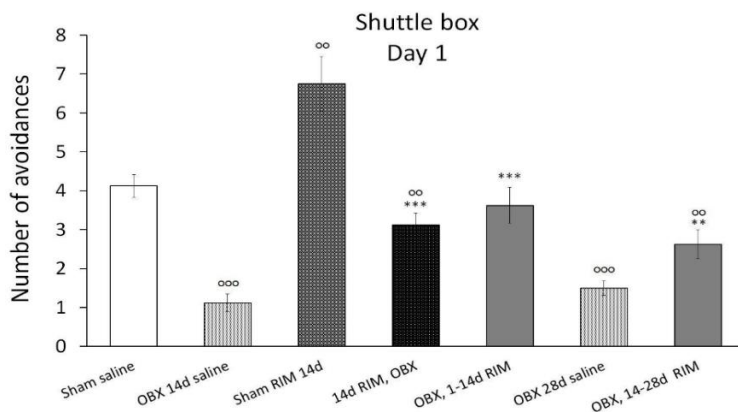
Фиг. 7. Ефекти на HU-210 (5 μ g) и SR-141716A (3 μ g), след 7 дневно *i.c.v.* въвеждане на OBX - плъхове върху латентното време при тест за ретенция на 24-ия час (*step through*). ($n = 7$). $^+P \leq 0.05$; $^{++}P \leq 0.01$; $^{+++}P \leq 0.01$ - $^{+++}P \leq 0.001$ – сравнение с Sham- контроли; $^*P \leq 0.05$ – сравнение с OBX-контролите.

2.2. Влияние на Rimonabant (SR-141716A), въвеждан интрагастрално, в продължение на 14 дни (преди-, непосредствено след-, и 14 дни след OBX):

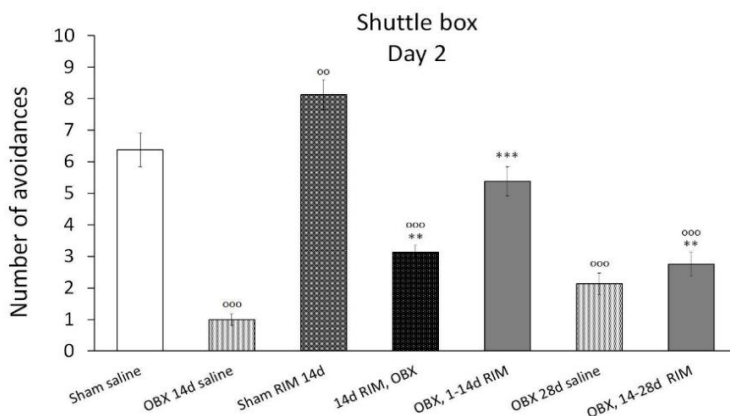
2.2.1. Проучване по метода за активно двупосочно избягване (*shuttle box*):

Въвеждане на Rimonabant (Sham-RIM):

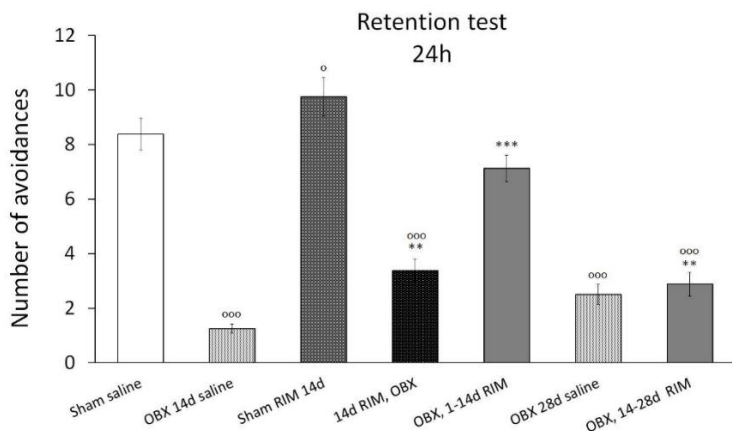
RIM повиши броя на аavoidансите през I-ви ден ($P \leq 0.002$), II-ри ден ($P \leq 0.01$) и при теста за ретенция ($P \leq 0.05$), в сравнение с Sham-контролите (Фиг. 8, 9, 10).



Фиг. 8. Ефекти на Rimopabant (3 mg / kg), прилаган интрагастрално в продължение на 14 дни при OBX-плъхове върху обучение и памет (shuttle box, 1-ви обучителен ден) (n=8) $^{ooo}P < 0,001$, $^{oo}P < 0,01$ - сравнение спрямо Sham-контроли, третирани с физ.разтвор. $^{***}P < 0,001$; $^{**}P < 0,01$ - сравнение спрямо OBX-контролите, третирани с физ.разтвор.



Фиг. 9. Ефекти на Rimopabant (3 mg / kg), прилаган интрагастрално в продължение на 14 дни при OBX-плъхове върху обучение и памет (shuttle box, 2-ри обучителен ден), обучение (n=8) $^{ooo}P < 0,001$, $^{oo}P < 0,01$, сравнение спрямо Sham-контроли инжектирани с физ.разтвор. $^{***}P < 0,001$, $^{**}P < 0,01$, сравнение спрямо OBX-контролите, третирани с физ.разтвор.



Фиг. 10. Ефекти на Rimonabant (3 mg / kg), прилаган интрагастрално в продължение на 14 дни при OBX-плъхове върху обучение и памет (shuttle box, тест за ретенция) обучение ($n=8$) $^oP < 0,05$ $^{ooo} P < 0,001$ сравнение спрямо Sham-контроли инжектирани с физ.разтвор. $^{***} P < 0.001$ $^{**} P < 0.01$ - сравнения спрямо OBX-контролите, третирани с физ.разтвор.

Промени при OBX

При булбектомираните животни (OBX_{14d} –saline), тествани с метода на активно избягване/авойданс, обучението и запаметяването са влошени значително. Броят на авойдансите беше намален през I-ия обучителен ден ($P \leq 0.001$), II-ия обучителен ден ($P \leq 0.001$), и при теста за ретенция ($P \leq 0.001$) в сравнение с Sham-оперираните контроли. (Фиг. 8, 9, 10).

Въвеждане на Rimonabant (1-14d RIM, OBX):

RIM въведен 14 дни преди OBX, предизвика подобрение на обучението и паметта, т.е. достоверно повиши броя на авойдансите през I-ви обучителен ден ($P \leq 0.001$), II-ри обучителен ден ($P \leq 0.01$), и при теста за ретенция ($P \leq 0.01$) в сравнение с OBX_{14d} – saline контролите. Сравнението с Sham-контролите обаче показва по-

ниски резултати при тестовете на I-ви ($P \leq 0.01$), II-ри обучителен ден ($P \leq 0.001$) и теста за ретенция, ($P \leq 0.001$), (Фиг. 8; 9; 10).

Въвеждане на Rimonabant (OBX, 1-14d RIM):

При групата OBX 1-14d RIM-плъхове, RIM доведе до статистически достоверно подобрене на обучението и паметта: през I-ия ($P \leq 0.001$), II-ия обучителен ден ($P \leq 0.001$) и при теста за ретенция ($P \leq 0.001$) в сравнение с OBX_{14d}-saline контролите. Не се установи статистически достоверна разлика в показателите при сравнение с Sham-saline контролите (през I-ия и II-ия ден и при теста за ретенция), (P-NS), (Фиг. 8, 9, 10), тоест, RIM предотвратява развитието на свързаните с булбектомията паметови нарушения.

Въвеждане на Rimonabant (OBX, 14-28d RIM):

RIM, въведен на фона на депресивно-подобно състояние (OBX, 14-28d RIM), показва статистически достоверно подобрене на обучителните и паметовите процеси в сравнение с OBX_{28d}-saline контролите изразено чрез повишен брой на авойдансите за I-ия ($P \leq 0.01$) и II-ия ($P \leq 0.01$) обучителен ден, както и при теста за ретенция ($P \leq 0.01$) (Фиг. 8, 9, 10). Въпреки това, сравнението с Sham-оперираните контроли показва, че показателите остават влошени. Броят на авойдансите беше намален при I-ия ($P \leq 0.004$), II-ия обучителен ден ($P \leq 0.001$) и при теста за ретенция, ($P \leq 0.001$), (Фиг. 8, 9, 10).

При сравнение на показателите при булбектомираните животни, тествани 14 дни след OBX (OBX_{14d}) и 28 дни след OBX (OBX_{28d}), не се откриха статистически значими различия при тестовете на I-ия и II-ия обучителен ден и при теста за ретенция (P-NS), (Фиг. 8, 9, 10).

2.2.2. Проучване по метода за пасивно избягване (step through): Въвеждане на Rimonabant (Sham-RIM):

Въвеждането на RIM статистически достоверно удължи латентното време при тестовете за ретенция на 3-ия час ($P \leq 0.05$) и 24 час ($P \leq 0.05$) и прояви тенденция към повишаване процента на плъховете, достигащи критерия за обученост на 3-ия час (75%; $\chi^2 = 1.657$; $P = \text{NS}$) и 24-ия час (75%; $\chi^2 = 1.657$; $P = \text{NS}$), в сравнение с Sham-контролите (60%), третирани с физ.разтвор. Установихме удължаване на латентното време и в сравнение с OBX₁₄-контролите: при тестовете за ретенция на 3-ия час ($\chi^2 = 4.000$; $P \leq 0.05$) и 24 час ($\chi^2 = 4.000$; $P \leq 0.05$) и увеличаване процента на плъховете, достигащи критерия за обученост на 3-ия час (14%; $\chi^2 = 2.800$, $P \leq 0.05$) и 24-ия час (14%; $\chi^2 = 4.667$, $P \leq 0.02$) (фиг. 11, 12).

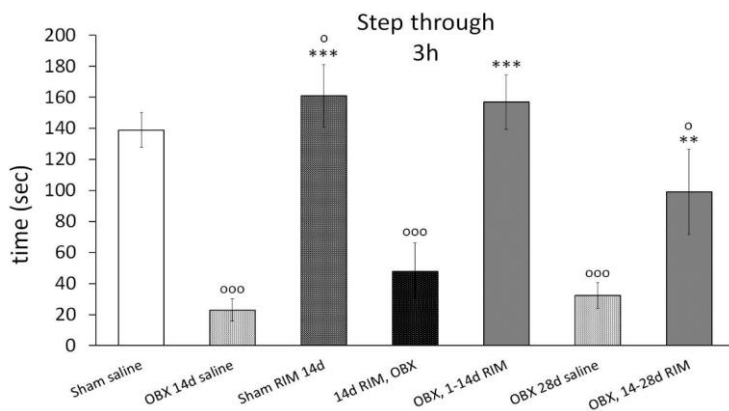
Промени при OBX

Двустранното премахване на *bulbi olfaktorii* (OBX) предизвика достоверно скъсяване на латентното време при тестовете за ретенция на 3-ия час ($P \leq 0.001$) и 24-ия час ($P \leq 0.001$) 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 3-ия час ($\chi^2 = 9.643$; $P \leq 0.001$); 24-ия час ($\chi^2 = 9.643$; $P \leq 0.001$) (фиг. 11, 12).

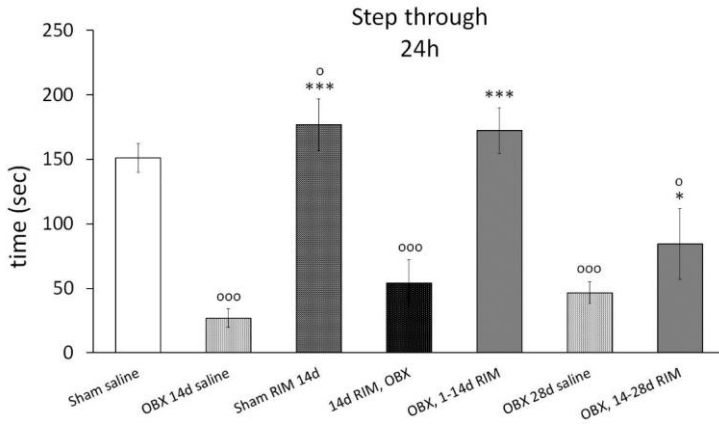
Въвеждане на Rimonabant (1-14d RIM, OBX):

Не се наблюдаваха статистически значими промени в поведението на OBX-плъховете, третирани с RIM преди булбектомията (1-14d RIM, OBX), в сравнение с OBX₁₄-контролите (3-ия и 24-ия час, $P = \text{NS}$). Показателите за обучение и памет бяха влошени: скъсено латентно време на 3-ия час ($P \leq 0.05$) и 24-ия час ($P \leq 0.05$), намален процент плъхове, достигащи критерия за обученост на 3-ия час ($\chi^2 = 7.200$; $P \leq 0.01$) и 24-ия час

($\chi^2 = 4.866$; $P \leq 0.05$), в сравнение с Sham-контролите. Не повлиява/предотвратява развитието на паметов дефицит (Фиг. 11, 12).



Фиг. 11. Ефекти на Rimobabant върху паметта (step through) след 14-дневно интрагастрално третиране на OBX-плъхове - тест за памет на 3^{-та} час. ($n = 8$)
⁰ $P < 0.05$; ⁰⁰⁰ $P < 0.001$ - сравнения спрямо Sham-контроли. $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$ - сравнения спрямо OBX-контроли.



Фиг. 12. Ефекти на Rimonabant върху върху паметта (step through) след 14-дневно третиране на OBX-плъхове - тест за памет на 24^{ми} час; (n = 8) ^o P < 0.05; ^{ooo} P < 0.001 - сравнения спрямо Sham-контроли *P < 0.05; *** P < 0.001 - спрямо OBX-контроли.

Въвеждане на Rimonabant (OBX, 1-14d RIM):

RIM, въведен непосредствено след OBX статистически достоверно удължи латентното време на 3-ия час ($P \leq 0.001$) и 24-ия час ($P \leq 0.001$) и увеличи процента на плъховете, достигащи критерия за обученост при тестовете за ретенция на 3-ия час (62.5 %; $\chi^2 = 8.654$; $P \leq 0.01$) и 24-ия час (75%; $\chi^2 = 11.250$; $P \leq 0.001$) в сравнение с OBX₁₄ контролите (0%).

Показателите на третираните животни не се различаваха от тези на Sham-оперирани животни на 3-ия час и 24-ия час (P-NS), тоест RIM пречи на развитието на паметов дефицит (Фиг. 11, 12).

Въвеждане на Rimonabant (OBX, 14-28d RIM):

RIM, въведен след развитие на депресивно-подобното състояние, удължи латентното време на 3-ия час ($P \leq 0.01$) и 24-ия час ($P \leq 0.05$) и увеличи процента на плъховете, достигащи критерия

за обученост при тестовете на 3-ия час (37.5 %; $\chi^2 = 3.692$; $P \leq 0.05$) и 24-ия час (37,5 %; $\chi^2 = 3.692$; $P \leq 0.05$) в сравнение с ОВХ₂₈-контролите (0%).

В сравнение с Sham-контролите, показателите при тази група бяха влошени: скъсено латентно време на 3-ия час ($P \leq 0.05$) и 24-ия час ($P \leq 0.05$), намален процент плъхове, достигащи критерия за обученост на 3-ия час ($\chi^2 = 7.200$; $P \leq 0.01$) и 24-ия час ($\chi^2 = 4.866$; $P \leq 0.05$), (Фиг. 11; 12).

Основна задача на настоящото изследване беше, използвайки различни начини на въвеждане - i.c.v и интрагастрален, в условия на субхроничен опит (7 и 14 дни), да оценим ефектите на лиганди на канабиноидните рецептори върху обучителните и паметовите процеси на плъхове с модел ОВХ.

Агонистът на СВ рецепторите HU-210, прилаган субхронично, i.c.v, подобри обучителните и паметови дефицити на ОВХ-плъховете и при двата теста, което беше демонстрирано чрез увеличен брой авойданси (тест с активно избягване, shuttle box), удължено латентно време и увеличен брой плъхове, достигащи критерия за обученост (тест РА), но резултатите на Sham-оперираните контроли не бяха достигнати. СВ1 рецепторният антагонист SR-141716A повлия негативно резултатите на ОВХ-плъховете при двата теста (с активно и пасивно избягване), което беше демонстрирано чрез намален брой авойданси, скъсено латентно време и намален брой плъхове достигащи критерия за обученост, т.е SR-141716A влоши обучението и паметта на ОВХ-плъховете в сравнение с ОВХ-контролите, третирани с физ.разтвор. При Sham-оперираните животни, HU-210 предизвика значителни нарушения в обучението и паметта, докато въвеждането на SR-141716A подобри показателите и при двата теста.

Ефектите на NU-210 върху поведението на избягване при мишки са подобни на тези, докладвани по-рано при проведени от нашата изследователска група изследвания с остро i.c.v. инжектиране (Marinov et al., 2013). Има съобщения, че острото приложение на агонисти на СВ1-рецепторите нарушава запаметяването при различни животински модели (Abush H and Akirav I, 2013), а претретирането с SR-141716A предотвратява развитието на паметови нарушения (Kruk-Slomka M et al., 2017).

Относно влиянието на SR-141716A, установихме, че за разлика от острото третиране, където бяха подобрени резултатите само при теста с активно избягване, при субхроничното 7-дневно третиране на Sham-плъховете се подобряват показателите и при двата теста. Доколкото лекарствено- или лезионно-индуцираните промени в двигателната активност биха могли да повлияят предимно активното избягване (Ogren и Stiedl, 2015), ние използвахме допълнително и тест с пасивно избягване за оценка на ефектите на СВ-лигандите.

В теста за пасивно избягване (step through) задържането в светлата камера на апарата зависи от потискането на вродената нагласа за влизане в тъмното отделение на апарата и плъховете с намалена локомоторна активност биха останали по-дълго време на осветената платформа, преди да се преместят в тъмното отделение (удължено латентно време). Както вече споменахме, двигателната активност на ОБХ плъховете беше намалена под влияние на NU-210, докато SR-141716A я увеличи.

Интересен факт на нашето проучване е, че СВ-лигандите повлияха разнопосочно поведението на Sham-оперирани и ОБХ-плъхове при тестовете за обучение и памет, докато ефектите върху двигателната активност бяха непроменени и при двете групи. По-конкретно: NU-210 намали двигателната активност (Sham-оперирани и ОБХ-плъхове), влоши паметта (Sham-

оперирани) и подобри паметовия дефицит (ОВХ), а SR-141716A увеличи двигателната активност (Sham-оперирани и ОВХ-плъхове), подобри паметта (Sham-оперирани) и влоши резултатите при теста за активно избягване (ОВХ). Фактът, че СВ-лигандите упражняват еднопосочни двигателни ефекти при Sham-оперирани и при ОВХ-плъхове, но противоположно - повлияват поведението на избягване при двете групи животни, позволява предположението, че променената двигателна активност не повлиява значително наблюдаваните ефекти върху обучението и паметта.

Резултатите ни от субхроничното 7-дневно, *i.c.v.*-въвеждане на СВ-лиганди на ОВХ-плъхове подкрепят наличните данни за антидепресивен и подобряващ паметта ефект, свързан с повишаване на активността на ЕКС при различни животински модели с паметов дефицит (McLaughlin и Gobbi, 2012 ; Segev et al., 2014; Kruk-Slomka et al., 2015; Haj-Mirzaian et al., 2017; Kruk-Slomka и Biala, 2016).

На фона на разнопосочни данни за действието на лиганди на канабиноидните рецептори върху обучителните и паметови процеси, нашите резултати потвърждават влошаващите паметта ефекти на канабиноидни агонисти при животни. Оригинални са данните, че централно въведените лиганди на канабиноидните рецептори оказват модулиращо действие върху обучителните и паметовите процеси на плъхове с експериментален модел ОВХ, съпроводен с когнитивен дефицит и че повишената активност на ЕКС при *i.c.v.* въвеждане на СВ рецепторен агонист оказва антидепресивен и подобряващ когнитивните функции ефект.

За да се оцени въздействието на ендоканабиноидната сигнализация в отделните времеви интервали от развитието на ОВХ-синдрома, ние изследвахме ефекта на СВ1-рецепторния антагонист SR-141716A (Rimonabant), прилаган интрагастрално,

в продължение на 14 дни преди операцията (булбектомия), веднага след операцията(1-14 ден) и 14 дни след операцията (14-28 ден) на ОВХ-плъхове подложени на тестове с активно (shuttle box) и пасивно (РА) избягване. Наблюдавахме, че Rimonabant показва тенденция към подобряване на показателите на Sham-оперираните плъхове в двата теста (за пасивно и активно избягване) за оценка на обучение и памет.

Резултатите ни подкрепят данните, че системното приложение на SR-141716A преди тренировъчните сесии подобрява паметовите процеси при гризачи (Deadwyler SA et al., 2007; Lichtman AH, 2000; Terranova JP et al., 1996; Wolff MC, Leander JD, 2003).

Установихме, че Rimonabant, прилаган 14 дни преди ОВХ не успява да предотврати ОВХ-индуцираното когнитивно увреждане при РА-теста, но показва положителна тенденция при теста с активно избягване. Блокирането на СВ1-рецепторите след развитие на депресивно-подобното състояние (14-28-и ден след ОВХ) оказва положителен ефект върху увредената вследствие на ОВХ-памет, но не е в състояние да я възстанови напълно. От особено значение са резултатите, разкриващи способността на СВ1-антагониста да противодейства на механизмите, водещи до възникване на паметов дефицит при тестовете за активно и пасивно избягване, като поведението на животните, третирани веднага след премахване на обонятелните луковичи (1-14 ден след ОВХ), не се отличава от това на Sham-оперираните контроли.

Резултатите от нашето изследване относно влиянието на SR-141716A, прилаган при различен път на въвеждане на ОВХ-плъхове и в различен времеви интервал от развитието на ОВХ-синдрома отново са противоречиви. Налице са влошаващи паметта ефекти на СВ1-антагониста при 7-дневно, i.c.v.-въвеждане, наред с тенденция да се намалят паметовите

дефицити при 14-дневно, интрагастрално въвеждане, като ефектът е най-силно изразен при прилагане в интервала непосредствено след булбектомията. Това ни навежда на предположението, че нарушената активност на ЕКС допринася за паметовите дефицити, съпътстващи ОВХ-синдрома.

Наред с това, резултатите от субхроничното, интрагастрално въвеждане на СВ1 антагониста показват, че наред с повишена двигателна активност, SR-141716A проявява тенденция да противодейства на развитието на когнитивния дефицит, индуциран от булбектомията, а въвеждането му непосредствено след булбектомията нормализира поведението на животните в двата теста за обучения памет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение можем да обобщим, че проучването на влиянието на субхронично въвеждани лиганди на канабиноидните рецептори на плъхове с модел олфакторна булбектомия, допринася за разкриване ролята на СВ рецепторите в развитието на паметовите дефицити, съпътстващи модела. Сравнението на ефектите при OBX- и Sham-оперирани плъхове позволява и оценка на физиологичното значение на СВ рецепторите за когнитивните процеси в организма. При Sham-оперирани плъхове, лигандите на канабиноидните рецептори не промениха съществено експлораторното поведение. След i.c.v. въвеждане, двигателната активност за 5 -мин. период при излагане в нова среда постепенно намаляваше, макар и на пониско (HU-210) или на по-високо (SR-141716A) ниво от тази на контролите, третирани с физ. разтвор. За разлика от Sham-оперирани животни, при OBX плъхове HU-210 нормализира експлораторното поведение (хабитуацията) и двигателната активност. След субхронично въвеждане на SR-141716A (RIM), i.c.v. или интрагастрално, се наблюдаваше повишена двигателна активност както при Sham-оперирани, така и при OBX-плъхове. Хабитуацията на OBX-плъховете в нова среда, макар и на фона на повишена двигателна активност, не беше повлияна сигнификантно в сравнение с OBX-контролите.

Модуляторното действие на ЕКС по отношение на механизмите на обучение и памет е комплексно и многопластово, поради което и резултатите от изследванията са често разнопосочни. Нашите изследвания предоставят допълнителни сведения относно влиянието на ендоканабиноидите в мозъчните структури, свързани с обучението и паметта. Резултатите ни са в подкрепа на данните

за участие на ендоканабиноидната система в развитие на паметовия дефицит при олфакторна булбектомия.

Има съобщения, че активирането на CB1 рецепторите има както анти-депресивен, така и про-депресивен ефект, което обяснява и противоречивите данни относно действието на канабиса при депресия. В тази връзка ние установихме, че CB-рецепторният агонист HU-210, прилаган субхронично, i.c.v., има антидепресивно действие, тъй като нормализира нарушенията в изследователското поведение и двигателната активност и подобри обучението и паметта при плъхове с модел OBX.

От друга страна, изследвайки ефектите на CB1-селективния антагонист (SR-141716A), въвеждан субхронично (i.c.v. или интрагастрално), наблюдавахме задълбочаване на нарушенията в двигателна активност на OBX-плъхове. Наред с това, установихме разнопосочно влияние в зависимост от пътя на въвеждане по отношение на паметовите процеси. Докато SR-141716A, прилаган субхронично i.c.v, при OBX-плъховете задълбочи паметовия дефицит, при интрагастралното му въвеждане показателите за обучение и памет, изследвани с методите на активно и пасивно избягване, бяха значително подобрени. Предоставихме данни, че при Sham-оперирани животни блокирането на CB1-рецепторите подобрява обучителните и паметови процеси, тествани с методи за избягване, с което потвърдихме комплексното участие на ЕКС в когнитивните функции, което много често се променя/влие от конкретното, моментно състояние на организма.

Демонстрирахме значението не само на пътя на въвеждане, но и на времевия интервал на приложение за изява на ефектите на субхронично, интрагастрално прилагания CB1-антагонист върху паметовия дефицит при OBX-плъхове. Оказа се, че само при въвеждане по време на развитие депресивно-

подобното състояние, блокирането на СВ1-рецепторите предотврътява развитието на паметовия дефицит, индуциран от булбектомията, докато въвеждането преди и след този период проявява положителна тенденция да противодейства на паметовите нарушения.

През последното десетилетие депресивните разстройства се превърнаха в социално-значимо заболяване в световен мащаб. Намирането на средства, които лекуват както депресивни, така и когнитивни симптоми остава едно от основните предизвикателства в тази област. Въздействието върху активността на ендоканабиноидната система изглежда обещаваща теперавтична цел по отношение на депресивните състояния и някои невродегенеративни заболявания, като болестта на Алцхаймер. Нашите резултати и заключения подчертават необходимостта от натрупване на повече данни за ефектите от манипулирането на ЕКС по специфичен за състоянието начин, за да бъде разширен потенциалния терапевтичен подход за лечение на депресия и болест на Алцхаймер.

Дисертационният труд предоставя допълнителни сведения за изясняване на взаимовръзката между когнитивните и депресивните симптоми, както и относителното влияние на ЕКС върху когнитивните или емоционалните процеси при заболявания, съпроводени с когнитивен дефицит, като депресия, болест на Алцхаймер. Фармакологичното лечение все още е в дълг към този контингент пациенти. Изследвания на нови вещества и иновативни стратегии за лекарства са необходими, за да се определи кое специфично лечение може да е от полза. Нашият скромнен опит да проучим ролята на канабиноидните рецептори в обучителните и паметовите процеси, и конкретно при паметовите дефицити, е една малка крачка напред в познанието ни за когнитивните функции на мозъка.

ИЗВОДИ И ПРИНОСИ

ИЗВОДИ

1. Модулирането на активността на канабиноидните рецептори оказва влияние върху обучителните и паметовите дефицити, съпровождащи модела олфакторна булбектомия (ОВХ).

1.1. Субхроничното (i.c.v.) въвеждане на СВ-агониста HU-210 нормализира нарушенията в изследователското поведение и свързаната с него двигателна активност при ОВХ-плъхове.

1.2. СВ1-селективният антагонист (SR-141716A), въвеждан субхронично (i.c.v. или интрагастрално), задълбочава нарушенията в изследователското поведение и свързаната с него двигателна активност.

1.3. Субхроничното, i.c.v. микроинжектиране на HU-210 показва тенденция за нормализиране на обучителните и паметови нарушения на ОВХ-плъхове, изследвани с тестове за активно и пасивно избягване, докато SR-141716A ги влошава.

1.4. Субхроничното, интрагастрално третиране с SR-141716A (Rimonabant) подобрява показателите за обучение и памет при ОВХ-плъхове.

2. Времевият интервал е от значение за проявата на ефектите на Rimonabant върху обучителните и паметови процеси при ОВХ-модел.

2.1. Нормализиране на обучителните и паметови дефицити на ОВХ-плъхове, тествани с методи на избягване се установява само при въвеждане в интервала непосредствено след ОВХ (1-14 ден); а въвеждането преди ОВХ и след развитие на депресивно-подобното състояние (14-28 ден) показва положителна тенденция за възстановяването им.

3. Влиянието на лигандите на СВ рецептори върху поведението на плъхове при тестовете с избягване зависи от експерименталната постановка.

3.1. При ОВХ-модела, при различен път на въвеждане на СВ1-антагониста (SR-141716A) се наблюдават разнопосочни ефекти върху показателите за обучение и памет: влошаване при i.c.v. и подобрение при интрагастрално приложение.

3.2. При Sham-оперирани животни SR-141716A повлиява положително обучителните и паметови процеси.

3.3. Активирането на СВ рецептори (i.c.v.) показва противоположни ефекти върху обучението и паметта на Sham-оперирани (влошава) и ОВХ-плъхове (подобрява).

ПРИНОСИ

С потвърдителен характер:

- 1.** Получени са данни, че канабиноидните рецептори участват в обучителните и паметови процеси, както и в развитието на депресивно-подобното състояние при плъхове с OBX-модел.
- 2.** Установено е, че CB1 антагонистът (SR-141716A) показва тенденция за задълбочаване на депресивно-подобното състояние, а пътят на въвеждането му е от значение за изявата на ефектите върху поведенческите реакции на животните.

С оригинален характер:

- 1.** Установено е, че лигандите на канабиноидните рецептори оказват разнопосочно влияние върху обучението и паметта при Sham-оперирани и OBX-плъхове.
- 2.** Установено е, че активирането на канабиноидните рецептори има антидепресивен ефект при OBX-модел.
- 3.** Получени са данни, че при интрагастрално въвеждане, CB1-антагонистът подобрява обучителните и паметови процеси при OBX модел.
- 4.** Установено е, че времевият интервал на въвеждане на CB1-антагониста има значение за повлияване на поведенческите дефицити при OBX-модел. SR-141716A възпрепятства развитието на OBX-индуцираните обучителни и паметови нарушения, прилаган интрагастрално, непосредствено след OBX (1-14 ден).
- 5.** Резултатите допринасят за допълнително изясняване ролята на канабиноидните рецептори в обучителните и паметовите процеси както и паметови дефицити, съпровождащи неврологични и психични заболявания.

Публикации, свързани с дисертационния труд

1. M.Velikova, **D. Doncheva**, R. Tashev. Effects of Rimonabant on active avoidance learning in bulbectomized rats, Journal of IMAV, Annual Proceeding (Scientific Papers), 2020 26(1), 2936-2941.
2. M.Velikova, **D. Doncheva**, R. Tashev. Subchronic effects of ligands of cannabinoid receptors on learning and memory processes of olfactory bulbectomized rats. Acta Neurobiologiae Experimentalis, 2020, 80(3) 286-296, **IF=1.529**
3. **Д. Дончева**, М. Великова, Р.Ташев. Ефекти на Rimonabant върху обучението и паметта на плъхове с олфакторна булбектомия. Известия на съюза на учените – Варна, 2‘2018 том XXIII с. 51-56.

Участия с презентации на материали от дисертационния труд в научни форуми

Участия в научни форуми в България

1. **Doncheva D.**, Velikova M. Tashev R. Intracerebroventricular injection of cannabinoid CB1 receptor ligands modulates the exploratory activity of OBX rats. International scientific conference “Neuroscience, bioinformatics, microbiome and beyond”, 17-19 September 2019, Bachinovo, Bulgaria, Abstract book. p.95.
2. Tashev R., **Doncheva D.**, Velikova M. Memory-modulatory effects of centrally administered cannabinoid receptor ligands in

olfactory bulbectomized rats. Юбилейна научна конференция - 45-години МУ-Плевен 31.10 - 02.11.2019 г. *J Biomed Clin Res* 12, 1- 2, 2019, p.110.

3. **Д.Дончева**, М.Маринов, М.Великова. Влияние на ендоканабиноидната система върху паметовите процеси. Заключителна конференция „Науката в служба на обществото“ – Варна, октомври, 2020.

Участия в международни научни форуми

1. D. Doncheva, M. Marinov, M. Velikova. Effects of subchronic ICV-treatment with cannabinoid CB1-receptor ligands on locomotor activity of rats with olfactory bulbectomy. 9th South-East European Conference of Chemotherapy for Infection and Cancer; 11-14 October 2018, Sarajevo, B&H

2. D. Doncheva, R.Tashev, M.Velikova. Effects of Rimonabant on locomotor and exploratory activities olfactory bulbectomized rats. 11th South-East European Conference on Infection and Cancer and 31st Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria; Plovdiv, 28-31 October 2021.

Награда за представен постер от млад учен в програмата на 11-та Юго-Източно Европейска Конференция, заедно с 31^{-та} Годишна Асамблея на ИМАБ :

Young Scientists Annual Award: Dobrinka Doncheva
Supporting First Award

of 11-SEEC and 31-st IMAV Assembly, Пловдив, 28-31 окт. 2021

За представен постер: "**Effects of Ribonabant on locomotor and exploratory activities in olfactory bulbectomized rats**": co-authors: Dobrinka Doncheva, Roman Tashev, Margarita Velikova (Medical University, Varna, Bulgaria)



Joint Forum SEEC-IMAB



**11-th South-East European Conference
of chemotherapy, infections and cancer
and
31-st Annual Assembly of International
Medical Association Bulgaria**

**28 - 31 October 2021,
Plovdiv, Bulgaria**

Certificate: Young Scientists Annual Award

The Certificate is issued to confirm the **First Supporting Award** granted to:

Name: Dr. Dobrinka Doncheva

From: Dept. Physiology, Medical University, Varna, Bulgaria

Section: Medicine, Dental Medicine, Health Management, Varia (please, underline the corresponding section), for her attendance in the Scientific Programme of the Joint Forum: 11-th SEEC Infections and Cancer, and 31-st IMAB Annual Assembly, and her presented paper: "**Effects of Ribonabant on locomotor and exploratory activities in olfactory bulbectomized rats**" (co-authors: D. Doncheva, R. Tashev, M. Velikova

Rector of Medical University Plovdiv:

Prof.Dr. Marianna Murdjeva, MD, PhD, МНМ

President of IMAB:

Prof.Dr. Krassimir Metodiev, MD, PhD, DScmed

30October 2021

