



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“- ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И КЛИНИЧНА ФАРМАКОЛОГИЯ И
ТЕРАПИЯ

Весела Ангелинова Борисова-Ненова

ФАРМАКОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА ПОВЕДЕНЧЕСКИ
ЕФЕКТИ НА *CHAENOMELES MAULEI* ПРИ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ЖИВОТНИ

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР“

по научна специалност „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“

Научен ръководител:

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

Варна, 2020 г.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрен съвет на Катедрата по фармакология и клинична фармакология и терапия при Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна, състояло се на 10.07.2020 г., и е насочен за публична защита пред научно жури в състав:

- 1. Проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н. – председател (становище)*
- 2. Проф. д-р Ирен Петкова Белчева, д.м.н. (рецензия)*
- 3. Доцент д-р Мария Желязкова-Савова, д.м. (рецензия)*
- 4. Доцент д-р Галя Цветанова Ставрева, д.м. (становище)*
- 5. Доцент д-р Илия Димитров Костадинов, д.м. (становище)*

Дисертационният труд съдържа общо 192 страници, онагледен е с 58 фигури и 13 таблици. Книгописът включва 398 заглавия на латиница и 2 на кирилица.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 7.10.2020 г. от 10.00 ч. в електронната платформа „Blackboard” на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

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

Използвани съкращения

BDNF- brain derived neurotrophic factor (мозъчен невротрофичен фактор)

COX-1 и COX-2- cyclooxygenase 1 and 2 (циклооксигеназа- 1 и 2)

CREB- c.AMP response element-binding protein (ц.АМФ отговорен елемент свързващ протеин)

HPA- hypothalamus- pituitary- adrenal- хипоталамо-хипофизарно-адренална ос

HPLC- high-pressure liquid chromatography (високоефективна течна хроматография)

NF-κB- nuclear factor-κB

АД- антидепресанти

АКТХ- адренокортикотропен хормон

БАВ- биологично активни вещества

ГАМК- гамааминомаслена киселина или GABA- gamma aminobutyric acid

ДТ- допаминов транспортер

ЕРК- екстрацелуларната сигнал- регулирана киназа

КРФ- кортикотропин-рилизинг фактор

МАО- моноаминооксидаза

НДР- нарушен денонощен ритъм

ПСХМ- плодов сок от *Chaenomeles maulei*

ТБК- тиобарбитурова киселина

ТБКРС- субстанции реагиращи с тиобарбитуровата киселина

ХЕБ- хематоенцефалната бариера

ЦНС- централна нервна система

Съдържание

I. ВЪВЕДЕНИЕ	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	8
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	9
1. Материали	9
1.1. Експериментални животни.....	9
1.2. Плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i>	9
2. Методи	11
2.1. Метод за изследване на двигателната активност и изследователското поведение - тест открито поле (open field test, OFT)	11
2.2. Методи за изследване на тревожността	11
2.3. Метод за изследване на депресивно поведение - тест принудително плуване (forced swim test, FST)	13
2.4. Метод за изследване на паметта - тест разпознаване на обект - object recognition test (ORT).....	13
2.5. Биохимични методи	14
2.6. Статистически методи	14
IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	15
1. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху поведението на здрави/млади плъхове	15
1.1. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> в тест открито поле.....	16
1.2. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> в тест на социално взаимодействие	21
1.3. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> в тест повдигнат кръстосан лабиринт	23
1.4. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> в тест за разпознаване на обект.....	30

1.5. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> в тест принудително плуване	36
1.6. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху чернодробната и бъбречна функция	38
1.7. Обсъждане на ефектите на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> при млади/здрави плъхове	43
2. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху резерпин-индуцирана хипокинезия в плъхове.....	58
2.1. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> в тест открито поле.....	59
2.2. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> в тест принудително плуване	62
2.3. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху реагиращи с тиобарбитуровата киселина субстанции в мозък.....	63
2.4. Обсъждане на ефектите на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху резерпин-индуцирана хипокинезия в плъхове	65
3. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху плъхове, подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм (НДР)	65
3.1. Ефект на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> в тест открито после	68
3.2. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> в тест социално взаимодействие	71
3.3. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> в тест принудително плуване	72
3.4. Обсъждане на ефектите на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху плъхове, подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм (НДР)	73
V.ИЗВОДИ	81
VI.ПРИНОСИ.....	82
VII.СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	83

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Според доклад на Световната здравна организация афективните разстройства засягат над 264 милиона хора по света и са водеща причина за продължаваща с години непълноценност на живота за хората от всички възрастови групи (GBD, Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2018). Депресията е едно от най-често срещаните психиатрични разстройства, характеризиращо се с тежко протичане и висока смъртност (World Health Organization, 2020). На световно ниво нараства и броят на хората, страдащи от неврологични заболявания, като над 6 милиона годишно умират от инсулт. Над 45 милиона са пациентите, страдащи от деменция и всяка година броят им нараства с 7.7 милиона. Болестта на Алцхаймер се наблюдава в до 70% от случаите на деменция и е най-честата причина за нея.

Наблюдава се значителна корелация в морфологичните, молекулярни и биохимични механизми, които обуславят клиничната изява на психиатричните разстройства и невродегенеративните заболявания. Всички тези заболявания са често съпътствани от дисфункция на кортиколимбичната система, абнормална активност на моноаминната система и оста хипоталамус-хипофиза, нарушения в механизмите на невропластичност и наличието на оксидативен стрес (Galts et al., 2019; Schneider et al., 2011). Споделените патогенетични механизми между невродегенеративни и психиатрични заболявания може да обясни високата честота на депресия и тревожност при пациентите с болест на Алцхаймер или с болест на Паркинсон.

Понастоящем фармакотерапевтичното внимание е насочено към медицински растения, притежаващи психофармакологични ефекти, които могат да бъдат използвани като алтернатива на конвенционалните лекарства, но заедно с това могат и да допълват лечението с тях. Основна цел е комбинираната терапия на фитопродуктите с лекарства да се асоциира с по-малко на брой и тежест нежелани ефекти при запазена или подобрена полза.

В литературата до момента има твърде оскъдна информация за вида *Chaenomeles maulei*. Основните проучвания на свойствата и състава на видовете се базират главно върху *Chaenomeles sinensis*, *Chaenomeles japonica* и *Chaenomeles speciosa*. Самият *Chaenomeles maulei* се класифицира като синоним на *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach.

На база проведените изследвания върху видовете от род *Chaenomeles*, до момента са разкрити антиоксидантни, противовъзпалителни и модулиращи норадренергичната, серотонинергичната и допаминергичната невротрансмисия свойства, които могат да се окажат ценни в лечението на психиатрични и невродегенеративни заболявания. Не съществуват литературни данни, които да доказват наличие на нежелани или токсични ефекти на видовете в използваните им дози, без значение от тяхната форма - екстракт, плодов сок, етерично масло или отделни компоненти. Напротив, нараства броят на изследванията, които демонстрират органно-протективни ефекти на видовете (Kwon et al., 2015; Ma et al., 2016).

С разкриване състава на плодовия сок от *Chaenomeles maulei* (Valcheva-Kuzmanova et al., 2018), както и от литературните данни за видовете от род *Chaenomeles*, може да се очаква, че плодовият сок от *Chaenomeles maulei* ще проявява благоприятен ефект върху тревожността и депресивно-подобното поведение на опитни животни, което следва да се верифицира чрез поведенчески и биохимични методи. Макар фитопрепаратите да са възприемани като добре поносима алтернатива на конвенционалната терапия, обикновено е необходимо време докато се проявят клиничните им ефекти. Затова е важно да се направи и оценка на безопасността на плодовия сок от *Chaenomeles maulei*.

Няколко изследвания демонстрират, че главната биологична активност на рода се дължи на присъствието на полифеноли като фенолни киселини и флавоноиди, витамин С, полизахариди, пектини и някои органични киселини (Sun and Hong, 2000; Yin et al., 2006). В плодов сок от *Chaenomeles maulei* особено високи са концентрациите на фенолни киселини като ванилова и хлорогенова, флавоноиди и процианидини, както и витамин С, които са определящи за антиоксидантен потенциал.

Резултатите от настоящите експериментални проучвания биха могли да помогнат за създаване на лекарствени продукти и/или хранителни добавки с полезни за здравето свойства. Това включва и такива препарати, които да подпомагат основната терапия на заболявания, които все още представляват предизвикателство за съвременната медицина като психиатричните и невродегенеративни заболявания.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Цел на тази дисертация е да се изследват субхроничната токсичност на плодов сок от *Chaenomeles maulei*, както и неговите психофармакологични ефекти при млади/здрави плъхове и при експериментални модели на тревожно-депресивно поведение и нарушена двигателна активност.

Задачи:

1. При млади/здрави плъхове да се изследват ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* след субхронично приложение върху:
 - Двигателната активност и поведението в тест открито поле;
 - Тревожността в тест повдигнат кръстосан лабиринт и тест на социално взаимодействие;
 - Депресивното поведение в тест принудително плуване;
 - Паметта в тест разпознаване на обект.
2. При субхронично приложение да се проследят ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху показатели на чернодробната и бъбречна безопасност.
3. В модел на резерпин-индуцирана хипокинезия при плъхове да се проследят ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху:
 - Нарушената двигателна активност в тест открито поле;
 - Депресивното поведение в тест принудително плуване;
 - Оксидативния стрес в мозъка.
4. В модел на нарушен светлинен денонощен ритъм при плъхове да се изследват ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху:
 - Двигателната активност;
 - Социалното взаимодействие;
 - Депресивното поведение.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Експериментални животни

Всички описани опити са проведени върху мъжки Wistar плъхове с тегло в рамките на 250-300 гр, отглеждани в пластмасови клетки, с постоянна вентилация и температура от 20-22°, неограничен достъп до вода и храна при 12-часов режим светлина/ тъмнина.

Всички процедури по третиране на животните и експериментите с тях са извършени с получено разрешение за работа с експериментални животни от Българска агенция по безопасност на храните (Разрешение 141/23.06.2016) и в съответствие с националните и международни изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им (Европейска директива 2010/63/EU).

1.2. Плодов сок от *Chaenomeles maulei*

За целта на експерименталната работа е използван плодов сок от *Chaenomeles maulei* в различни дози.

В България плодовете от *Chaenomeles maulei* се отглеждат в района на Троян, централен Балкан. След бране, пресните плодове се смилат, намачкват и изстискват. Полученият сок се филтрира, добавя се консервиращ агент калиев сорбат (1.0 g/l) и се съхранява при 0°C до момента на използването му. Съставът на сока е определен преди използването му в настоящите експерименти от екипа на Valcheva-Kuzmanova (Valcheva-Kuzmanova et al., 2018) и е представен в таблицата по-долу. За определяне общото съдържание на фенолни вещества е използван спектрофотометричен анализ по Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965). Абсорбцията се отчита при 760 nm. Като стандарт е използвана галова киселина.

Спектрофотометричният анализ показва високо съдържание на фенолни съединения, еквивалентни на 890.00 mg галова киселина на литър сок.

Последващият HPLC-анализ потвърждава и високото съдържание на полифеноли под формата главно на процианидинови олигомери, фенолни киселини и флавоноиди (Таблица 1).

Таблица 1. Съдържание на биологично активни вещества в плодов сок от *Chaenomeles maulei*; CE-катехинови еквиваленти, (GAE)-еквиваленти галова киселина. Източник: (Valcheva-Kuzmanova, Denev & Ognyanov 2018).

Биологично активни вещества		Съдържание (мг/100 мл)
Тотални полифеноли		890.00 GAE
Тотални проантоцианидини		253.29
Процианидинови олигомери		280.52 CE
Фенолни киселини	Ванилова киселина	14.91
	Кафеена киселина	14.48
	Хлорогенова киселина	11.00
	Неохлорогенова киселина	2.44
	Р-кумарова киселина	1.52
	Ферулова киселина	1.26
Флавоноиди	Епикатехин	5.59
	Катехин	5.25
	Кверцетин-3- β -гликозид	3.58
	Кверцетин	3.43
	Рутин	2.72
Органични киселини	Ябълчена киселина	3647.0
	Лимонена киселина	51.0
	Аскорбинова киселина	22.0

От киселините в най-високи концентрации са установени ванилова, кафеена и хлорогенова киселина. Епикатехин, катехин и кверцетин са основните представители от флавоноиди, открити в плодовия сок. Процианидиновите олигомери са еквивалентни на 280.52 единици катехин в 100 мл плодов сок (Valcheva-Kuzmanova, Denev & Ognyanov 2018).

2. Методи

2.1. Метод за изследване на двигателната активност и изследователското поведение - тест открито поле (open field test, OFT)

Тестът открито поле дава уникалната възможност за проследяване изследователското поведение на плъхове, общата двигателна активност и първоначални данни за тревожно поведение. Значение за тревожността, проследявана с OFT, има най-вече социалната изолация (Lister 1990).

Откритото поле представлява затворена дървена арена с размери 100×100×40 см, с непрозрачни дървени стени, боядисани в бяло. Подът е разграфен на еднакви по размер полета със синя линия с размери 20×20 см. Резултатите се отчитат мануално. Опитното животно се поставя в центъра на полето, което се обособява като централен регион. На всяко животно се дава свобода на движение в рамките на 5 минути в откритото поле. Отчитат се броят на хоризонталните движения (полетата, които животното преминава с четирите си лапи), вертикалните движения (брой изправяния на задни лапи, включително подпирането до стените на полето с предни лапи) и времето, прекарано в централното поле в секунди.

Приема се, че централните полета се свързват със заплаха за гризачите в по-голяма степен отколкото периферията. По този начин времето, прекарано в периферията (тигмотаксис) също може да се счита за показател на нивото на тревожност (Simon, Dupuis & Costentin 1994), а удължаването на времето в централните полета е резултат от намалено ниво на тревожност. След прием на анксиолитични субстанции се повишава времето, прекарано от животните в центъра. Тестът е използван като мярка за двигателна активност и степен на тревожност.

2.2. Методи за изследване на тревожността

2.2.1. Тест за социално взаимодействие - social interaction test (SIT)

Тестът за социално взаимодействие, развит от File и Hyde (1978), дава информация за тревожно поведение, при което на животните се разрешава да контактуват свободно в отделено за целта празно пространство и времето на контакт се измерва. Обикновено животните се разделят на двойки и времето на взаимодействие на всяко едно директно се влияе от поведението на партньора

му. В случай, че тестът се провежда при едно третирано животно, а другото - контрола, тогава времето за взаимодействие, необходимо на третираното животно, се приема за правдоподобна мярка. Намаленото време на социално взаимодействие е индикация за тревожно поведение, докато повишеното време и непроменена моторна активност говорят за анксиолитичен ефект.

За целите на теста обикновено се подбират млади мъжки плъхове с относително еднакво тегло, като се избягват агресивни, доминантни, групово отглеждани плъхове, защото това може да компроментира резултатите. Прието е да се подбират плъхове, които са един групово отглеждан, а другият - изолиран или и двата непознати, но групово отглеждани, като най-добри резултати дават плъховете в самостоятелни клетки.

Преди започване на теста на плъховете се дава време да се приспособят към средата. В рамките на един ден преди самия експеримент, за 5 минутен период, животните се оставят в тестовото пространство. На 2-ия ден двойката плъхове се поставя в полето за 5 минутна сесия, като се записва времето на социален контакт за всяко животно (File 1980).

2.2.2. Тест повдигнат кръстосан лабиринт - elevated plus maze (EPM)

Този тест дава възможност да се проследи естественото поведение на плъховете при изследване на непознатата обстановка. На животното се дава възможност да избере дали да прекара време в откритите, незащитени рамена на лабиринта или в закритите, защитени рамена, издигнати на около 1 метър от пода. Животните показват тенденция на предпочитание към по-тъмните затворени пространства, избягвайки осветените рамена. Това поведение корелира пряко с промените във физиологичните нива на стресови индикатори. Приемът на вещества с анксиолитични ефекти води до повишено изследване на отворените рамена на лабиринта, без да засяга общата мотивация или двигателна активност на животните.

Оборудването включва 2 перпендикулярни рамена 30 x 5 см, пресичащи се в центъра. Две от рамената са преградени с 15 см стена, а другите две са оставени отворени.

С началото на опита всяко животно се поставя в центъра на лабиринта със свободен достъп до всяко едно от рамената в рамките на 5 минути. Броят

навлизания и времето, прекарано в открито или закрито рамо, се отчитат (Elliott, Heal & Masden 1992) (Pellow et al. 1985).

2.3. Метод за изследване на депресивно поведение - тест принудително плуване (forced swim test, FST)

Тестът за принудително плуване се използва за определяне и оценка на антидепресанти и антидепресивна активност на нови вещества. Опитните животни се поставят в предварително напълнени с вода цилиндри и се проследяват тяхното поведение и движения за оцеляване.

Необходими са стъклени цилиндри с 60 см височина и 17 см диаметър на плъх. Нивото на вода достига 30 см от дъното, като не се дава възможност на животното да може да докосва дъното с лапички или с опашка. Цилиндриите се пълнят с вода със стайна температура - 20-22 °. Животното се въвежда в цилиндъра за опашката. Обикновено тестът изисква провеждането на 2 сесии, първата от които е тренировъчна. Втората сесия е тестова и е с продължителност 5 минути като резултати се записват само от нея. Неподвижността на животните или липсата на движения, освен тези достатъчни за оцеляване във водата, се определят като депресивно-подобно поведение.

Намаляване на времето на неподвижност, без да се повишава общата двигателна активност, се интерпретира като антидепресивно-подобен ефект (Kathleen R. B. 2009), (Slattery and Cryan, 2012).

2.4. Метод за изследване на паметта - тест за разпознаване на обект - object recognition test (ORT)

Тестът е широко използван за поведенческа оценка паметта на животните, но също така и на вниманието, тревожността и предпочитанието към непознатото в гризачи (Ennaceur 2010). Тестът не разчита на външна мотивация, награда или наказание, а на природното любопитство на животните към непознат обект. Самият тест е разделен на три фази: хабитуация, опознаване и тестова фаза (Tagliabue et al. 2009). По време на фаза хабитуация, на животното се разрешава свободно да изследва открито поле при липсата на обекти в рамките на 5 минути. Деня след хабитуационната сесия, животното се поставя във вече познатото открито поле в присъствието на обект отново в рамките на 5 минути. Експерименталната фаза се осъществява 1 час след фазата на опознаване, като в откритото поле се откриват два обекта, единият от които е идентичен на

„опознатия“, а другият е нов, непознат за животното (Gaskin et al. 2010). Двата обекта се поставят в двата края на полето симетрично един спрямо друг, а животното се въвежда с гръб към тях. Експерименталната сесия е с продължителност 3 минути. Отчита се времето на активно опознаване на новия и познат обект по време на тестовата сесия.

2.5. Биохимични методи

За биохимично изследване на взетите проби се определят нивата на субстанции реагиращи с тиобарбитурова киселина в хомогенат от мозък. Реагиращи с тиобарбитуровата киселина субстанции в мозъка (ТБКРС) представлява метод, който измерва спектрофотометрично цвета, получаващ се при реакция на тиобарбитуровата киселина (ТБК) с липидни пероксиди. Методът е описан от екипа на Ohkawa et al. (Ohkawa, Ohishi & Yagi 1979).

За целите на изследването един грам от мозъчен хомогенат се смесва с 5 ml ледено студен TRIS/HCL буфер и се центрофугиран с 2000 грм при температура 4°C за 10 минути. Полученият супернатант е използван за биохимично изследване. При тази реакция, проведена в кисела среда, рН= 7.4, се образуват розови на цвят продукти, които могат да бъдат детектирани при 532 nm (Aurius 2021 UV-VIS spectrophotometer, Cecil Instruments Ltd, UK). Концентрациите на ТБКРС са измервани в pmol/g в мозък. Образуването на малонов диалдехид се използва като стандарт. Това е главният реактивен алдехид, който се асоциира с оксидативен стрес във физиологичните системи (Del Rio, Stewart & Pellegrini 2005).

2.6. Статистически методи

Получените резултати са обработени с помощта на статистически пакет GraphPad Prism (Version 5.00, GraphPad Software, Inc.). Използван е еднофакторен вариационен анализ (one-way ANOVA), последван от Dunnett's Multiple Comparison Post Test. Student's *t*-test е използван за сравняване резултатите на две независими групи. Всички резултати са представени като средна стойност ±S.E.M. Стойности, попадащи в $p < 0.05$, са приемани за статистически значими.

IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху поведението на здрави/млади плъхове

За разкриване ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei*, сокът е изследван върху 64 здрави/млади мъжки плъхове от порода Wistar. При здрави животни, приложението на плодовия сок е субхронично и е разделено на 2 периода на третиране. През първия са третирани общо 32 животни в рамките на 16 дни, а през втория още 32 животни за 32-дневен период. Плъховете са разпределени в 8 групи по 8 плъха в група. Четири от групите са третирани интрагастрално посредством сонда веднъж дневно в продължение на 16 дни, а останалите 4 са третирани в рамките на 32 дни. Групите, в които са разпределени животните са както следва: Контрола – получават физиологичен разтвор в доза 10 мл/кг; ПСХМ_{2,5} – получават ПСХМ в доза 2.5 мл/кг, разреден с дестилирана вода до 10 мл/кг; ПСХМ₅ – прилаган е ПСХМ в доза 5 мл/кг, разреден с дестилирана вода до 10 мл/кг и ПСХМ₁₀ - ПСХМ в доза 10 мл/кг.

Поведенческите тестове са проведени между 14^{ти} до 16^{ти} ден за първия период на третиране и между 30^{ти} до 32^{ри} ден за втория период.

Тестовите са проведени в следната последователност за 16-дневното третиране:

- о Ден 14: провежда се тест открито поле 60 минути след последното третиране в интервала между 9 и 12 часа и тест за социално взаимодействие в интервала от 13 до 17 часа;

- о Ден 15: провежда се тест повдигнат кръстосан лабиринт 60 минути след последното третиране между 9 и 12 часа, тест за разпознаване на обект между 13 и 16 часа и тренировъчна сесия на тест за принудително плуване в интервала от 16 до 18 часа;

- о Ден 16: провежда се тест за принудително плуване 60 минути след последното третиране в интервала от 9 до 12 часа;

- о Ден 17: животните са анестезирани, евтаназирани и са взети проби за биохимичен анализ.

Последователността на тестовите за 32-дневно третираните животни е следната:

о Ден 30: провежда се тест открито поле 60 минути след последното третиране в интервала между 9 и 12 часа и тест за социално взаимодействие в интервала от 13 до 17 часа;

о Ден 31: провежда се тест повдигнат кръстосан лабиринт 60 минути след последното третиране между 9 и 12 часа, тест за разпознаване на обект между 13 и 16 часа и тренировъчна сесия на тест за принудително плуване в интервала от 16 до 18 часа;

о Ден 32: провежда се тест за принудително плуване 60 минути след последното третиране в интервала от 9 до 12 часа;

о Ден 33: животните са анестезирани, евтаназирани и са взети проби за биохимичен анализ.

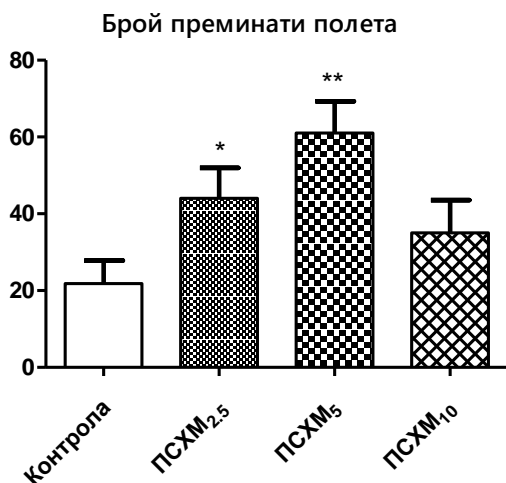
1.1. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест открито поле

1.1.1. Ефект на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест открито поле след 14-дневно приложение

Тестът открито поле се провежда на 14^{тия} ден от началото на експеримента, 1 час след последното третиране на животните. На всяко животно се предоставя 5-минутен период от време в откритата арена на теста, през което се отчитат брой преминати полета (хоризонтална активност), брой изправяния на задни лапи (вертикална активност) и време, прекарано в централните полета. Хоризонталната и вертикална активност се разглеждат като индекси за локомоция. Повишаване на времето на престой в централните полета се интерпретира като анксиолитично-подобен ефект.

Хоризонтална активност

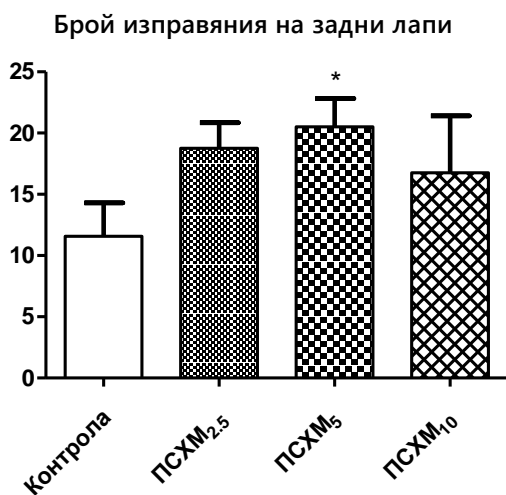
Трите дози на ПСХМ водят до повишена двигателна активност, отчетена като брой преминати полета от откритото поле. Статистически значимо повишение на хоризонталната активност се отчита за дозите на ПСХМ от 2.5 мл/кг ($p < 0.05$ спрямо контролната група) и 5 мл/кг ($p < 0.01$ спрямо контролните животни). При животните от контролната група броят на хоризонталните движения е 21.86 ± 5.96 , при животните от група ПСХМ_{2.5} тя е 44.0 ± 7.97 , при животните от група ПСХМ₅ - 61.0 ± 8.27 и при животните от група ПСХМ₁₀ се отчитат 35.0 ± 8.58 общо за 5-те минути продължителност на теста (Фигура 1).



Фигура 1. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху броя преминати полета (хоризонтална активност) на плъхове в тест открито поле след 14-дневно третиране; * $p < 0.05$ спрямо Контролата; ** $p < 0.01$ спрямо Контролата

Вертикална активност

Общо за 5-те минути продължителност на теста, броят на вертикалните движения на контролната група животни е 11.57 ± 2.72 , при група ПСХМ_{2.5} тя е 18.75 ± 2.09 , при група ПСХМ₅ - 20.5 ± 2.32 и при група ПСХМ₁₀ - 16.75 ± 4.66 .

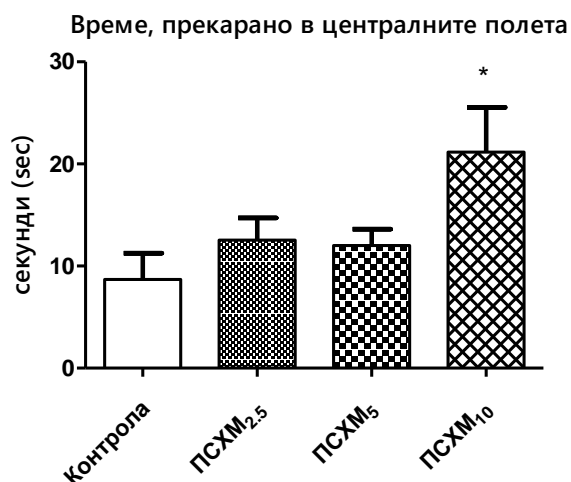


Фигура 2. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху броя повдигания на задни лапи (вертикална активност) на плъхове в тест открито поле след 14-дневно третиране; * $p < 0.05$ спрямо Контролата

След статистическа обработка на резултатите се установява, че ПСХМ в доза 5 мл/кг повишава броя изправяния на задни лапи на животните със статистическа значимост ($p < 0.05$ спрямо Контролата). Останалите групи, третирани с по-ниската и по-висока дози на ПСХМ, също демонстрират повишаване на броя изправяния на задни лапи, но тези резултати не достигат статистически значими стойности спрямо Контролата (Фигура 2).

Време, прекарано в централните полета

При групите с животни, третирани с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг и 5 мл/кг не се установяват статистически промени в резултатите спрямо Контролата. Времето, прекарано в централните полета на откритото поле за животните от контролната група, е 8.7 ± 2.56 sec, за животните, третирани с ПСХМ в доза 2.5 мл/кг, то е 12.53 ± 2.18 sec, за животните, третирани с ПСХМ в доза 5 мл/кг, то е 12.01 ± 1.6 sec и за животните, третирани с ПСХМ₁₀ - 21.18 ± 4.38 sec ($p < 0.05$ спрямо Контролата). При животните, третирани с ПСХМ в доза 10 мл/кг ($p < 0.05$ спрямо Контролата), се наблюдава най-изразено повишаване на времето, прекарано в централната зона на полето, докато за останалите дози резултатите са близки до тези на контролните животни (Фигура 3).



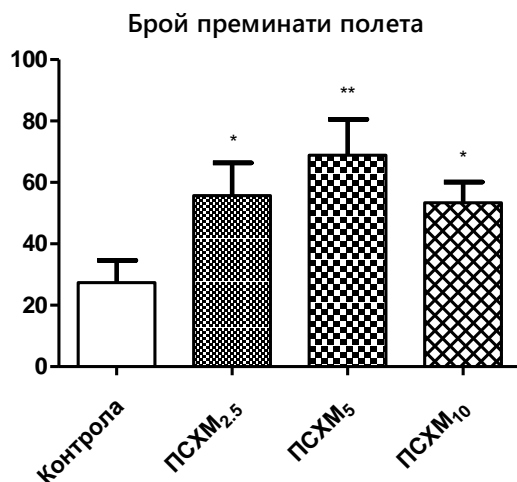
Фигура 3. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху времето, прекарано в централните полета на плъхове в тест открито поле след 14-дневно третиране; * $p < 0.05$ спрямо Контролата

1.1.2. Ефект на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест открито поле след 30-дневно приложение

Тестът открито поле се провежда на 30^{тия} ден, 1 час след последното третиране на животните, аналогично на 14-дневния период на третиране. Разпределението и броят на плъховете съответства на първия период на третиране. Отчитат се същите показатели за двигателна активност и време, прекарано в централната зона на откритото поле.

Хоризонтална активност

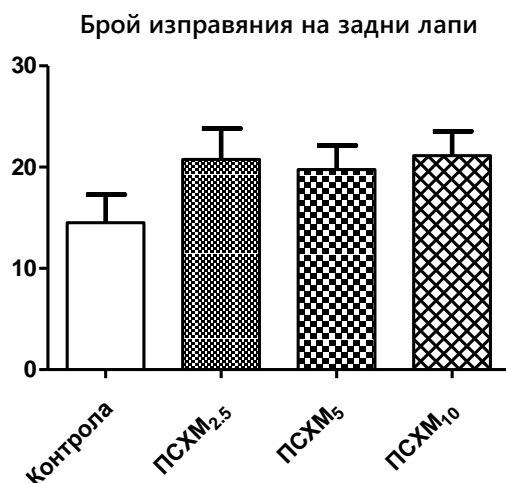
Повишен брой преминати полета в рамките на 5 минути се установяват за всички животни, третирани с ПСХМ, в сравнение с контролните, като този ефект достига статистическа достоверност (Фигура 4). Броят на хоризонталните движения при животните от Контрола е 27.4 ± 7.2 , при животните от група ПСХМ_{2.5} е 55.7 ± 10.7 ($p < 0.05$ спрямо Контролата), за животните от група ПСХМ₅ - 68.9 ± 11.7 ($p < 0.01$ спрямо Контролата) и при животните от група ПСХМ₁₀ е 53.4 ± 6.8 ($p < 0.05$ спрямо Контролата). За всички дози на ПСХМ се отчита статистически значимо повишаване в броя преминати полета, като най-изразен е този ефект за ПСХМ в доза 5 мл/кг.



Фигура 4. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху броя преминати полета (хоризонтална активност) на плъхове в тест открито поле след 30-дневно третиране; * $p < 0.05$ спрямо Контролата; ** $p < 0.01$ спрямо Контролата

Вертикална активност

Всички дози на ПСХМ водят до слабо повишаване в броя на изправянията на задни лапи в тест открито поле спрямо контролните животни. В дози 2.5 и 10 мл/кг, ПСХМ най-изразено стимулира вертикалната активност на животните без обаче да се достига статистическа значимост (Фигура 5).



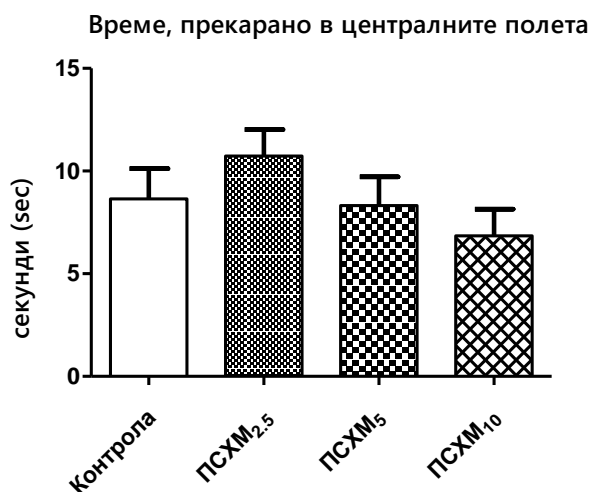
Фигура 5. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху броя повдигания на задни лапи (вертикална активност) на плъхове в тест открито поле след 30-дневно третиране

Броят изправяния на задни лапи за Контролата е 14.5 ± 2.8 , за ПСХМ_{2.5} е 20.8 ± 3.1 и за ПСХМ₁₀ е 21.1 ± 2.4 . ПСХМ в доза 5 мл/кг води до по-слабо отчетена вертикална активност, която все пак е по-висока от тази за Контролата (19.8 ± 2.4).

Време, прекарано в централните полета

Резултатите след 30-дневното приложение на ПСХМ показват, че нито една от дозите му не води до значима промяна във времето, прекарано в централните полета на откритото поле (Фигура 6). За контролните животни се установява време на престой 8.7 ± 1.5 sec, което е най-близко до това, отчетено при ПСХМ₅ – 8.3 ± 1.4 sec. При животните от група ПСХМ_{2.5} се отчита най-дълъг престой в централната зона (10.7 ± 1.3), а най-кратък е престоят при група ПСХМ₁₀ (6.8 ± 1.3) при сравнение с контролните животни. Наблюдава се доза-зависима тенденция с повишаване дозата на ПСХМ да намалява престоя в

централните полета. Най-изразено време в централните полета се отчита за животните от група ПСХМ_{2,5}, докато за ПСХМ₁₀, то е по-кратко дори от това за контролните.



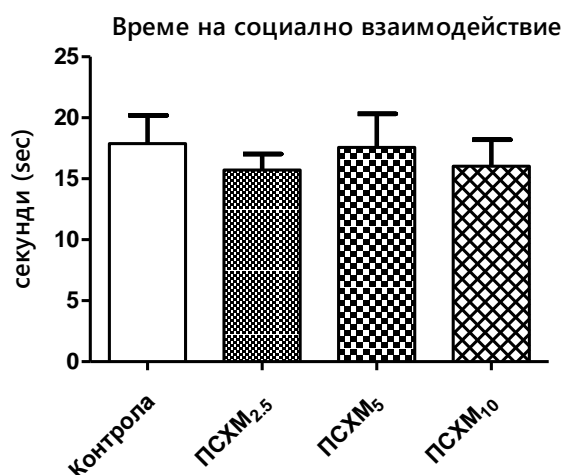
Фигура 6. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху времето прекарано в централните полета на плъхове в тест открито поле след 30-дневно третиране

1.2. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест на социално взаимодействие

Тестът на социално взаимодействие се провежда с млади/здрави плъхове на 14^{тия} и съответно на 30^{тия} ден от началото на експеримента. Поведението на всички 32 животни от първия период на третиране и 32 животни от втория се проследява един час след приключване на тест открито поле. Тъй като тестът на социално взаимодействие изисква животните да бъдат в среда с минимален стрес, той се провежда в апарата за тест открито поле. На едновременно поставени в апарата 2 плъха от различни групи се предоставят 5 минути за опознаване. За всеки плъх се отчита времето на движенията, които са свързани с активно взаимодействие между непознатите партньори. Удължено време на социална дейност се интерпретира като анксиолитично-подобен ефект.

1.2.1. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест на социално взаимодействие след 14-дневно приложение

Резултатите от теста показват, че след 14-дневно приложение ПСХМ не променя значимо времето на социален контакт между тестовите партньори. Времето на социално взаимодействие в контролната група е 17.89 ± 2.3 sec. Наблюдава се леко понижение на продължителността му до 15.71 ± 1.31 sec в група ПСХМ_{2.5}. Времето на взаимодействие се изравнява спрямо контролната група до 17.58 ± 2.75 sec в група ПСХМ₅ и леко се понижава до 16.03 ± 2.16 sec за животните от група ПСХМ₁₀ (Фигура 7) спрямо Контролата.

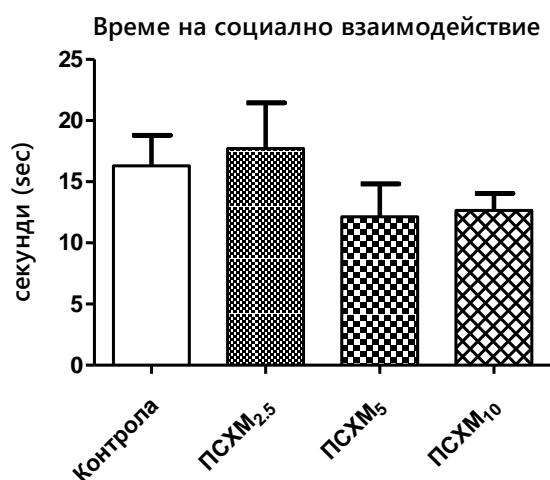


Фигура 7. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху времето на социално взаимодействие при плъхове след 14-дневно третиране

1.2.2. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест на социално взаимодействие след 30-дневно приложение

Прилаган 30 дни, ПСХМ показва само тенденция към намаляване на времето на социален контакт между тестовите партньори, което важи най-силно за група ПСХМ₅ и по-слабо за група ПСХМ₁₀. ПСХМ в доза 2.5 мл/кг води до слабо повишаване на времето на социално взаимодействие спрямо контролната група, но този ефект не постига статистическа значимост. За Контролата времето на социално взаимодействие е 16.3 ± 2.5 sec. Останалите резултати са 17.72 ± 3.7 sec, 12.13 ± 2.7 sec и 12.65 ± 1.4 sec, респективно за група ПСХМ_{2.5}, група ПСХМ₅ и група ПСХМ₁₀ (Фигура 8). Най-изразена е промяната във времето за социално

взаимодействие в групите ПСХМ₅ и ПСХМ₁₀ при сравнение със стойностите от 14-дневното третиране. Отбелязва се намаляване в това време и за двете групи в порядъка на 4 до 5 секунди.



Фигура 8. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху времето на социално взаимодействие при плъхове след 30-дневно третиране

1.3. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест повдигнат кръстосан лабиринт

Тест повдигнат кръстосан лабиринт се провежда между 9 и 12 часа на 15^{ти} и 31^{ви} ден, като всяко животно е изложено еднократно на експерименталната постановка. Тестът се провежда в тиха, осветена обстановка 60 минути след последното третиране с ПСХМ или дестилирана вода. По време на опитната сесия с продължителност 5 минути се отчитат следните показатели за всяко животно:

- брой влизания в откритите рамена,
- време, прекарано в откритите рамена,
- брой влизания в закритите рамена,
- време, прекарано в закритите рамена,
- общ брой влизания в открити и закрити рамена,
- съотношение на влизания в откритите рамена към общ брой влизания.

Повишаване на общия брой влизания и влизанията в закритите рамена, без да се променя активността в откритите, се интерпретира като показател за

неспецифична двигателна активност. Повишена активност или време на престой в откритите рамена на лабиринта е индикатор за анксиолитично-подобен ефект (Ennaceur 2014).

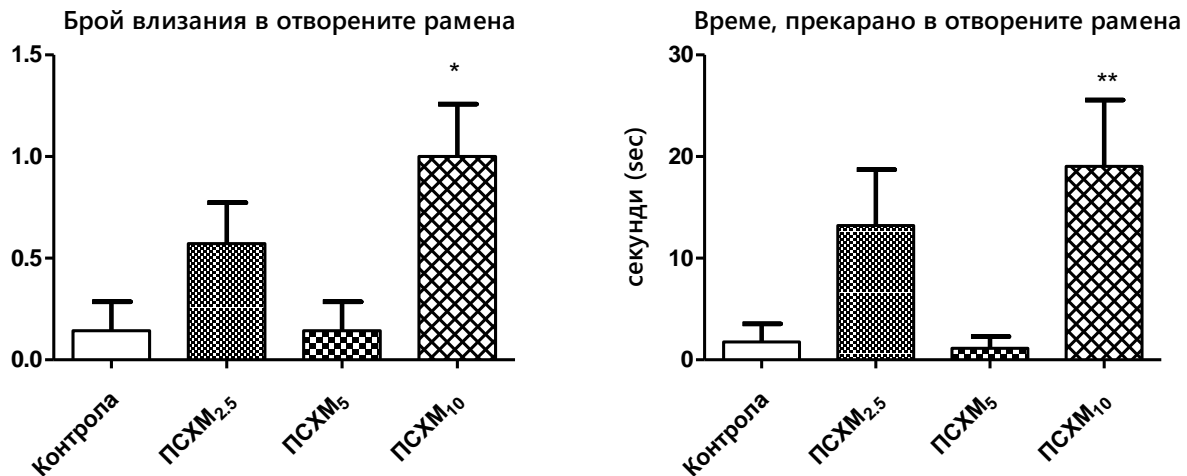
1.3.1. Ефект на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест повдигнат кръстосан лабиринт след 15-дневно приложение

Резултатите, които се регистрират по време на 5-минутната продължителност на теста, са представени в Таблица 2, Фигура 9, Фигура 10, Фигура 11 и Фигура 12. Животните, третирани с ПСХМ в доза 10 мл/кг показват статистически завишен брой навлизания ($p < 0.05$ спрямо Контролата) и престой в отворените рамена ($p < 0.01$ спрямо Контролата) на тест повдигнат кръстосан лабиринт. Приложението на ПСХМ в доза 2.5 мл/кг също води до изразено повишаване на активността в отворените рамена, което обаче не достига статистически достоверен ефект спрямо Контролата. ПСХМ в доза 5 мл/кг води до резултати, които са най-близки до контролните по отношение на броя влизания и времето, прекарано в отворените рамена на лабиринта.

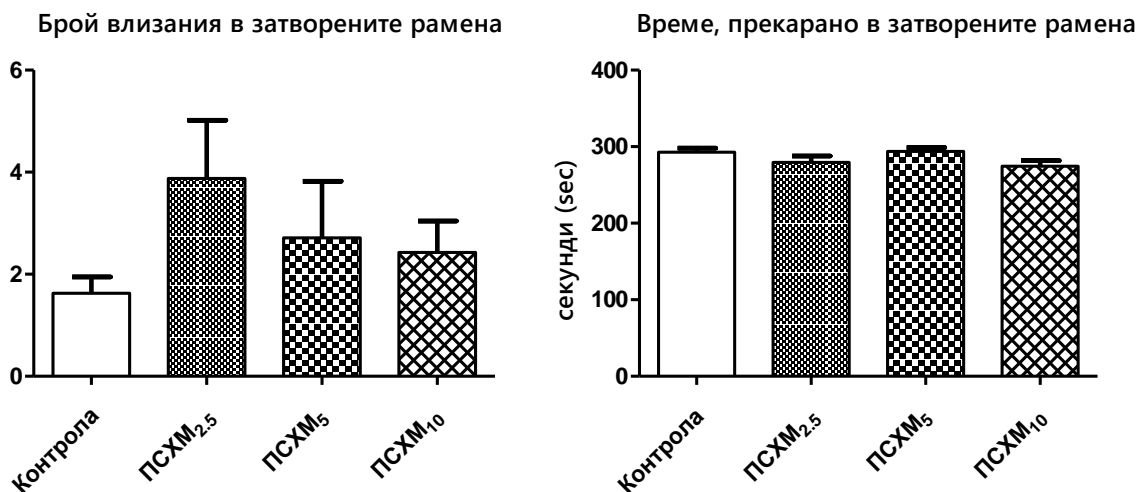
Таблица 2. Изследвани показатели в тест повдигнат кръстосан лабиринт след 15-дневно третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ спрямо Контролата. Резултатите са представени като средна стойност $\pm S.E.M.$

Група \ Показател	Контрола	ПСХМ _{2.5}	ПСХМ ₅	ПСХМ ₁₀
Брой влизания в отворени рамена	0.14 \pm 0.14	0.57 \pm 0.2	0.14 \pm 0.14	1.0 \pm 0.26*
Време на престой в отворени рамена (sec)	1.77 \pm 1.77	13.21 \pm 5.51	1.14 \pm 1.14	23.29 \pm 6.94**
Брой влизания в затворени рамена	1.625 \pm 0.32	3.88 \pm 1.14	3.63 \pm 1.32	2.43 \pm 0.61
Време на престой в затворени рамена (sec)	292.9 \pm 5.32	279.5 \pm 8.42	293.8 \pm 4.98	274.6 \pm 7.15
Общ брой влизания в отворени и затворени рамена	1.57 \pm 0.3	4.88 \pm 1.48	4.13 \pm 1.32	3.0 \pm 0.63*
Брой влизания в отворени рамена/ Общ брой влизания	0.13 \pm 0.08	0.18 \pm 0.07	0.13 \pm 0.08	0.33 \pm 0.07*

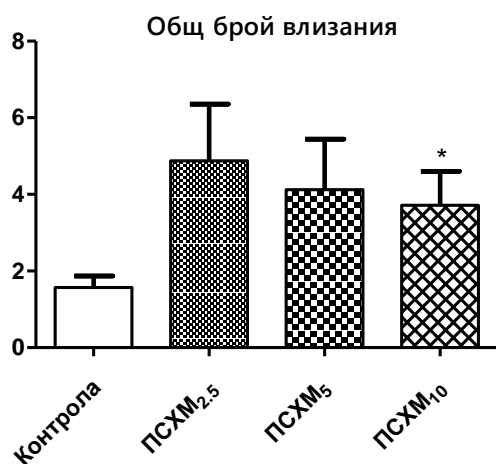
С нарастване дозата на ПСХМ се забелязва намаляване на броя влизания в затворените рамена на лабиринта. Общият брой навлизания в отворени и затворени рамена ($p < 0.05$ спрямо Контролата), както и съотношението брой влизания в отворени рамена/общ брой влизания ($p < 0.01$ спрямо Контролата) са статистически значимо повишени за най-високата доза на ПСХМ, докато при приложението на другите дози от 2.5 и 5 мл/кг не се достига до статистически различия спрямо контролната група.



Фигура 9. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху броя влизания и времето, прекарано в отворените рамена на тест повдигнат кръстосан лабиринт след 15-дневно третиране; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо Контролата

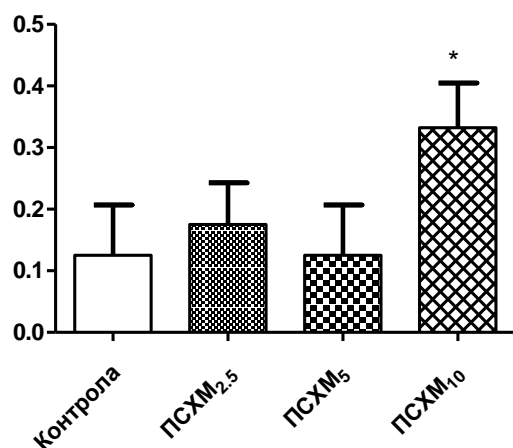


Фигура 10. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху броя влизания и времето, прекарано в затворените рамена на тест повдигнат кръстосан лабиринт след 15-дневно третиране



Фигура 11. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху общия брой влизания в рамената в тест повдигнат кръстосан лабиринт след 15-дневно третиране; * $p < 0.05$ спрямо Контролата

Влизания в отворените рамена към общ брой влизания



Фигура 12. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху съотношението на влизания в отворените рамена към общия брой влизания в рамената в тест повдигнат кръстосан лабиринт след 15-дневно третиране; * $p < 0.05$ спрямо Контролата

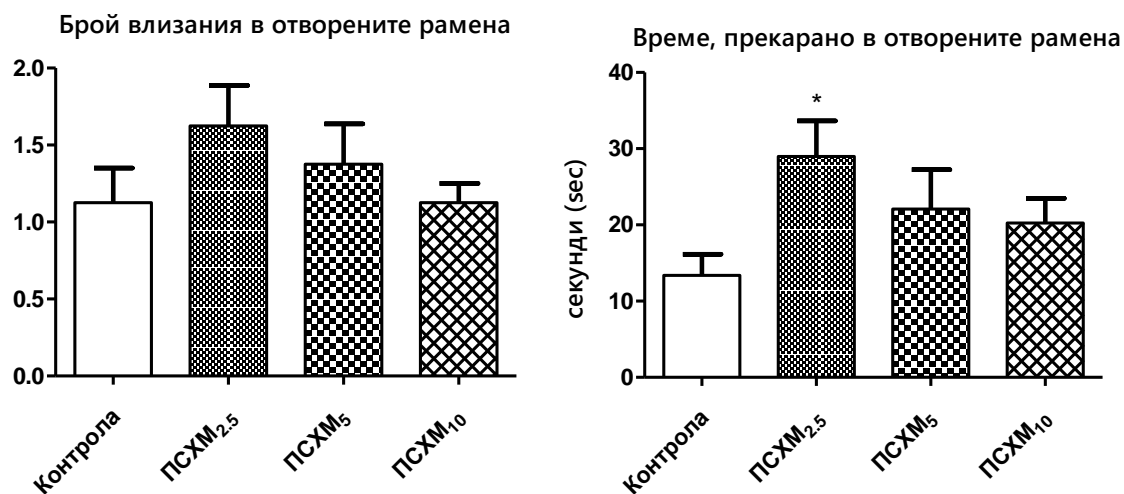
1.3.2. Ефект на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест повдигнат кръстосан лабиринт след 31-дневно приложение

Резултатите, получени след 31-дневно третиране, са представени в Таблица 3 и Фигура 13, Фигура 14, Фигура 15 и Фигура 16. Приложението на ПСХМ в

доза 2,5 мл/кг се съпровожда с най-изразено повишаване на активността в отворените рамена на повдигнатия лабиринт. Времето, прекарано в тях достига до статистическа достоверност при сравнение с контролната група ($p < 0.05$). Забелязва се, че с повишаване на дозата, намаляват броя и времето, прекарано в отворените рамена на лабиринта.

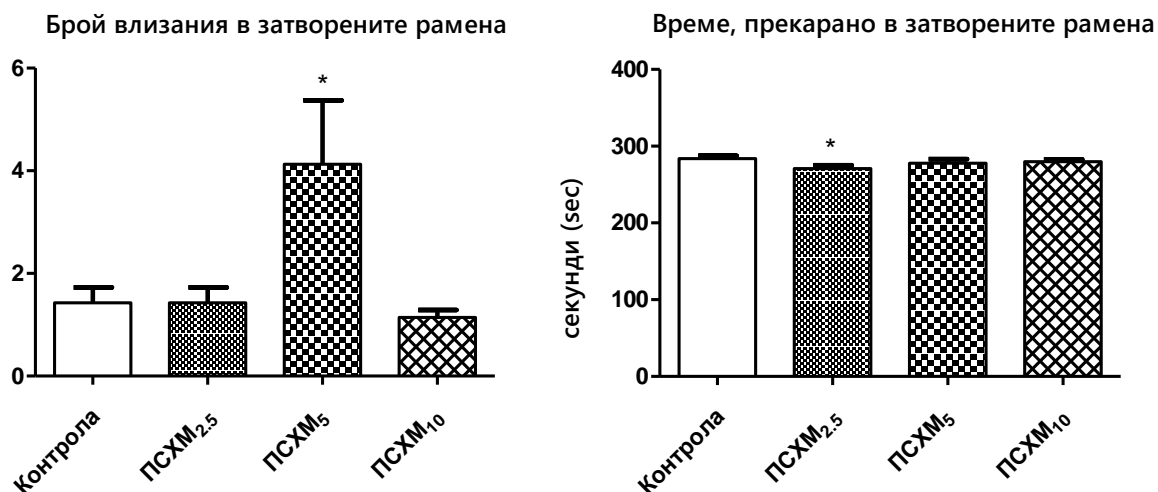
Таблица 3. Изследвани показатели в тест повдигнат кръстосан лабиринт след 31-дневно третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг; * $p < 0.05$ спрямо Контролата

Показател \ Група	Контрола	ПСХМ _{2.5}	ПСХМ ₅	ПСХМ ₁₀
Брой влизания в отворените рамена	1.13±0.23	1.63±0.26	1.14±0.14	1.13±0.13
Време на престой в отворените рамена (sec)	16.06±3.61	28.99±4.68*	17.94±3.6	20.26±3.24
Брой влизания в затворените рамена	1.43±0.3	1.43±0.3	4.13±1.25*	1.14±0.14
Време на престой в затворените рамена (sec)	283.9±3.64	270.7±4.47*	277.9±5.17	279.8±3.24
Общ брой влизания в отворените и затворени рамена	2.43±0.37	3.5±0.68	5.5±1.28*	2.29±0.18
Брой влизания в отворените рамена/ Общ брой навлизания	0.37±0.07	0.49±0.04	0.34±0.07	0.46±0.05



Фигура 13. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху броя влизания и времето, прекарано в отворените рамена на тест повдигнат кръстосан лабиринт след 31-дневно третиране; * $p < 0.05$ спрямо Контролата

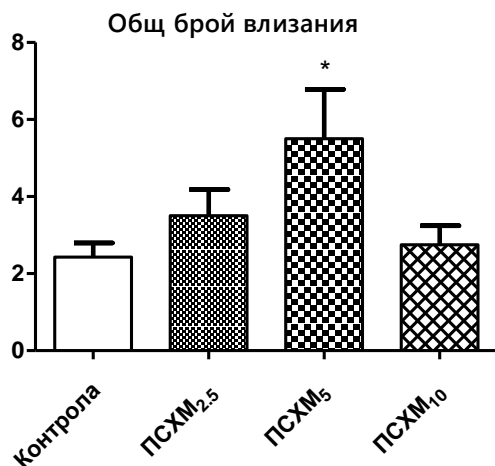
Броят влизания в затворените рамена на лабиринта е значително повишен за животните от група ПСХМ₅ ($p < 0.05$) спрямо Контролата. В останалите дози на ПСХМ се наблюдават резултати, които са много близки до тези на контролната група животни.



Фигура 14. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху броя влизания и времето, прекарано в затворените рамена на тест повдигнат кръстосан лабиринт след 31-дневно третиране; * $p < 0.05$ спрямо Контролата

В група ПСХМ_{2.5} се установява статистически значимо понижаване на времето, прекарано в затворените рамена на лабиринта ($p < 0.05$) при сравнение с

Контролата. В останалите групи времето на престой също е редуцирано, като с нарастване на дозата на плодовия сок, се отчита тенденция към изравняване с резултатите, получени за контролната група (283.9 ± 3.64). За ПСХМ₁₀ тези стойности достигат 279.8 ± 3.24 секунди (Фигура 14).

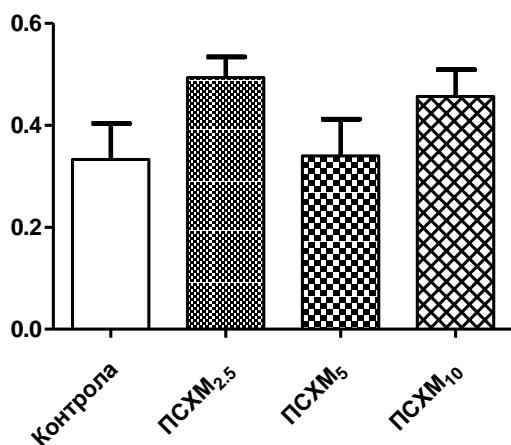


Фигура 15. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху общия брой влизания в рамената в тест повдигнат кръстосан лабиринт след 31-дневно третиране; * $p < 0.05$ спрямо Контролата

Общият брой влизания представлява сбора от влизанията в отворените и затворени рамена на лабиринта. Най-ниската и средна доза на ПСХМ водят до завишен общ брой навлизания, като само за група ПСХМ₅, този ефект достига статистическа достоверност ($p < 0.05$) спрямо Контролата (Фигура 15). В група ПСХМ₁₀ се наблюдава дори понижаване на общия брой влизания (2.29 ± 0.18) спрямо тези за контролната група (2.43 ± 0.37).

При оценка съотношението влизания в отворени рамена към общ влизания, се наблюдават повишени стойности за групи ПСХМ_{2.5} (0.49 ± 0.04) и ПСХМ₁₀ (0.46 ± 0.05) спрямо контролните. За група ПСХМ₅ (0.34 ± 0.07) не се отчита съществена разлика от стойностите получени за Контролата (0.37 ± 0.07). Нито една доза на ПСХМ не постига статистическа достоверност за този показател на кръстосания лабиринт спрямо контролната група (Фигура 16).

Влизания в отворените рамена към общ брой влизания



Фигура 16. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху съотношението на влизания в отворените рамена към общия брой влизания в рамената в тест повдигнат кръстосан лабиринт след 31-дневно третиране

1.4. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест за разпознаване на обект

За изследване ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху паметта и обучението на млади/зdravi плъхове, е използван тест за разпознаване на обект.

Тестът за разпознаване на обект се провежда 60 минути след тест повдигнат кръстосан лабиринт на 15^{тия} и 31^{вия} ден от началото на експеримента. Тестът се състои от 3 сесии- една на хабитуация, една тренировъчна (или опознавателна сесия) и една тестова (или експериментална сесия). Хабитуационната сесия се провежда на 14^{тия} ден по времето на тест открито поле. За теста за разпознаване на обект се използва същата дървена арена с цел да се намали влиянието на външни фактори и стрес. По време на сесията на хабитуация на животното се предоставят 5 минути да опознае пространството. На 15^{тия} ден, точно 24 часа след хабитуацията, се провеждат опознавателната и тестовата сесия. При 32-дневно третираните животни, хабитуационната сесия съвпада с теста открито поле на 30^{тия} ден, а тренировъчната и тестовата сесия се провеждат на 31-вия ден, точно 24 часа след сесията на хабитуация.

Опознавателната сесия е с продължителност 5 минути. По време на нея до една от стените на арената се оставя непознат обект без да се засича времето, което животното прекарва в опознаването му. Тестовата сесия се провежда 1 час по-късно и е с времетраене от 3 минути. По време на тестовата сесия в двата ъгъла на арената се поставят обект, еднакъв по форма до първоначалния и втори, напълно различен нов обект. Регистрира се времето, което животните прекарват при новия обект, времето, което прекарват при познатия по форма обект и общо времето, прекарано в изследване на двата обекта.

Проследени и анализирани са следните показатели за всеки един от двата периода на третиране:

- Индекс на разграничение (discrimination index);

Индексът на разграничение отразява продължителността на опознаване на новия обект спрямо познатия като пропорция от общото време на опознаване. Индексът на разграничение се изчислява по следната формула:

$$DI = \frac{d1}{t(total)} \quad \text{където } DI - \text{ индекс на разграничение;}$$

$d1$ – разликата между времето на опознаване на новия обект и познатия обект в тестовата сесия;

$t(total)$ – общо време на опознаване на новия и познат обект в тестовата сесия;

- Тотално време на опознаване на новия и познатия обект (sec);
- Индекс на опознаване (recognition index);

Силно зависи от времето за опознаване на познатия обект, предоставено на животното по време на тренировъчната сесия. Изчислява се по следната формула:

$$RI = \frac{d2}{t(total)} \quad \text{където } RI - \text{ индекс на опознаване в условни единици;}$$

$d2$ – времето на опознаване на новия обект, разделено на тоталното време на опознаване в тестовата сесия.

1.4.1. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест за разпознаване на обект след 15-дневно приложение

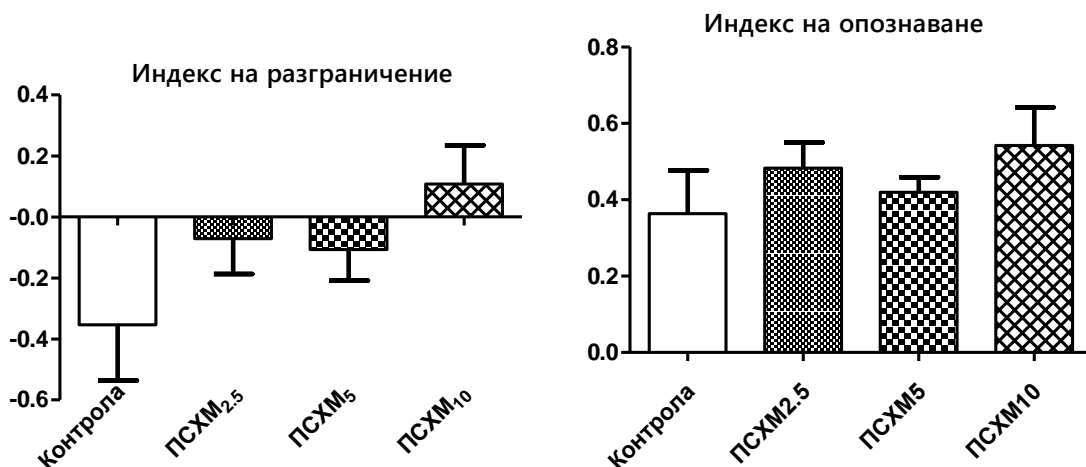
Резултатите, които са регистрирани по време на теста след 15-дневно третиране, са представени както следва в Таблица 4, Фигура 17 и Фигура 18.

Индексът на разграничение има най-ниски стойности в контролната група (-0.35 ± 0.18), предполагащи най-дълго време, прекарано с познатия обект. Ниските и средни дози на ПСХМ водят отново до отрицателни стойности на този индекс, без обаче да се наблюдава статистическа достоверност в този резултат. ПСХМ в доза 10 мл/кг постига положителни стойности на индекса на разграничение, които не са статистически значими (-0.35 ± 0.18) спрямо Контролата.

Индексът на опознаване е още един критерий за оценка предпочитанието на животните към познат или нов обект. Отчита се статистически незначимо повишаване в индекса на опознаване за групите, третирани с ПСХМ в доза 2.5 мл/кг (0.48 ± 0.07) и ПСХМ в доза 10 мл/кг (0.54 ± 0.1) спрямо контролните животни (0.36 ± 0.11). При плъховете от група ПСХМ₅ се наблюдава най-слабо повишаване (0.42 ± 0.04) в индекса на опознаване спрямо Контролата.

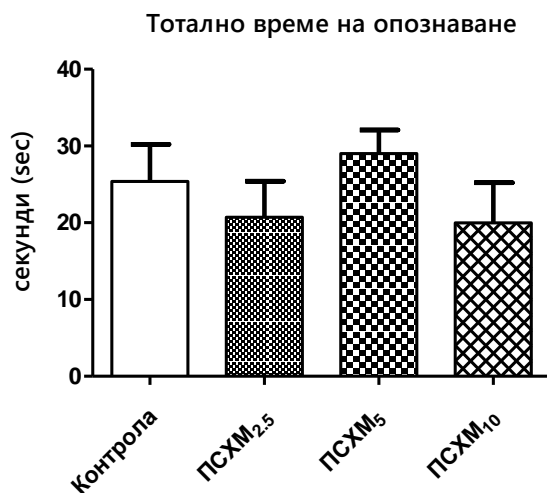
Таблица 4. Изследвани показатели в тест за разпознаване на обект след 15-дневно третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг. Резултатите са представени като средна стойност $\pm S.E.M.$

Група \ Показател	Контрола	ПСХМ _{2.5}	ПСХМ ₅	ПСХМ ₁₀
Индекс на разграничение	-0.35 ± 0.18	-0.07 ± 0.12	-0.11 ± 0.11	-0.35 ± 0.18
Тотално време на опознаване (sec)	25.39 ± 4.85	20.70 ± 4.72	29.01 ± 3.07	19.99 ± 5.24
Индекс на опознаване	0.36 ± 0.11	0.48 ± 0.07	0.42 ± 0.04	0.54 ± 0.1



Фигура 17. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху индекса на разграничение и индекса на опознаване в тест за разпознаване на обект при плъхове след 15-дневно третиране

Резултатите за тоталното време на опознаване на нов и познат обект също не достигат статистическа достоверност в групите животни, третирани с ПСХМ. Наблюдава се намалено време на опознаване в групи ПСХМ_{2.5} (20.70 ± 4.72) и ПСХМ₁₀ (19.99 ± 5.24) спрямо Контролата. В група ПСХМ₅ времето на опознаване е слабо повишено (29.01 ± 3.07) спрямо това за контролната група (25.39 ± 4.85).



Фигура 18. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху тоталното време на опознаване на нов и познат обект в тест за разпознаване на обект при плъхове след 15-дневно третиране

1.4.2. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест за разпознаване на обект след 31-дневно приложение

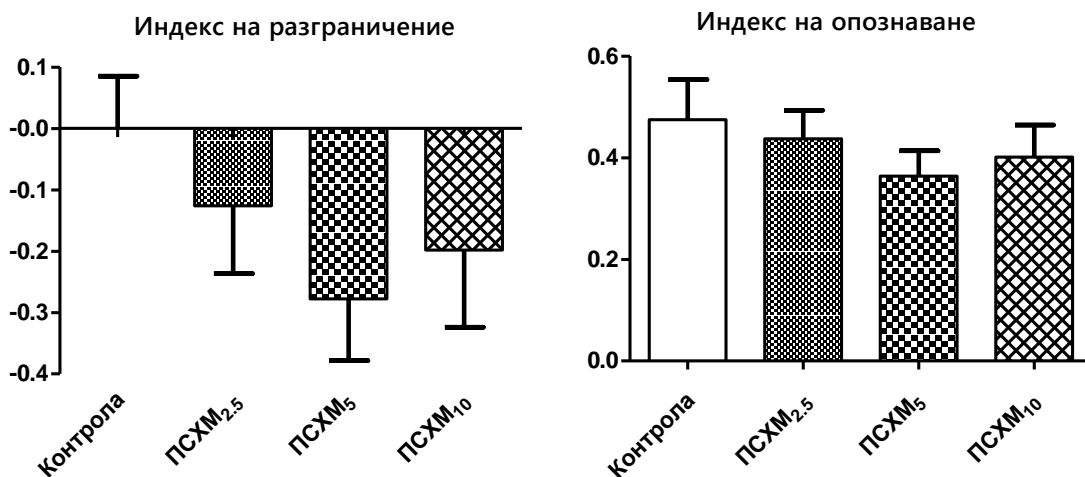
Резултатите, които са регистрирани по време на теста след 31-дневно третиране са представени както следва в Таблица 5, Фигура 19 и Фигура 20.

Индексът на разграничение има най-високи стойности в контролната група (0.0002 ± 0.08), предполагащи най-дълго време, прекарано с непознатия обект. Всички дози на ПСХМ водят до отрицателни стойности на индекса, без обаче да се достига до статистическа значимост в този ефект. ПСХМ в доза 5 мл/кг постига най-изразените отрицателни стойности на индекса на разграничение, които не са статистически значими (-0.28 ± 0.10) спрямо Контролата.

При отчитане резултатите за индекса на опознаване, се установяват най-високи стойности за контролната група (0.48 ± 0.08). В групите, третирани с ПСХМ, се наблюдават много близки до контролните стойности и съответно липсва статистическа значимост на този ефект. Най-нисък е индексът на опознаване в група ПСХМ₅ (0.36 ± 0.05).

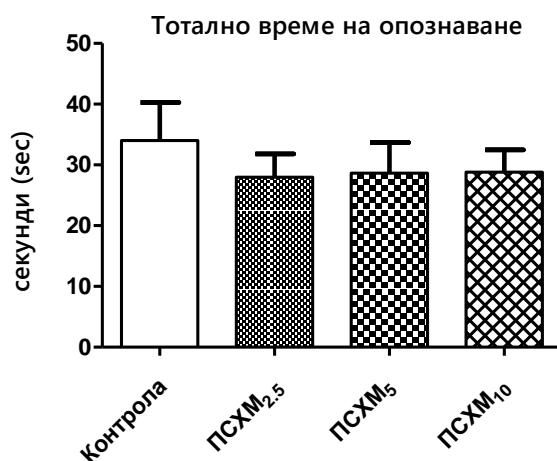
Таблица 5. Изследвани показатели в тест за разпознаване на обект след 31-дневно третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг. Резултатите са представени като средна стойност $\pm S.E.M.$

Група	Контрола	ПСХМ _{2.5}	ПСХМ ₅	ПСХМ ₁₀
Показател				
Индекс на разграничение	0.0002 ± 0.08	-0.13 ± 0.11	-0.28 ± 0.10	-0.20 ± 0.13
Тотално време на опознаване (sec)	34.04 ± 6.24	27.98 ± 3.82	28.64 ± 5.05	28.80 ± 3.70
Индекс на опознаване	0.48 ± 0.08	0.44 ± 0.06	0.36 ± 0.05	0.40 ± 0.06



Фигура 19. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху индекса на разграничение и индекса на опознаване в тест за разпознаване на обект при плъхове след 31-дневно третиране

Тоталното време на опознаване след 31-дневно третиране показва най-високи стойности за контролната група (34.04 ± 6.24). Третирането с различни дози на ПСХМ не води до статистически значими разлики от отчетеното за Контролата време. Демонстрира се обаче тенденция за доза-зависимо повишаване на тоталното време на опознаване. Стойностите за група ПСХМ₁₀ са най-близки (28.80 ± 3.70) до тези за Контролата.



Фигура 20. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху тоталното време на опознаване нов и познат обект в тест за разпознаване на обект при плъхове след 31-дневно третиране

След еднофакторен ANOVA анализ, последван от Dunnett's Multiple Comparison Post Test, се забелязва, че получените резултати не показват статистическа значимост за фактора доза, нито за фактора време. Стойностите на всяка една от групите са много близки и не се наблюдава значима промяна в индекса на разграничение и индекса на опознаване спрямо контролните животни. След unpaired *t*-test нито една от стойностите не достига статистическа достоверност спрямо контролната група. Също така нито една от дозите на ПСХМ не води до статистически значима промяна в тоталното време на опознаване на новия и познат обект.

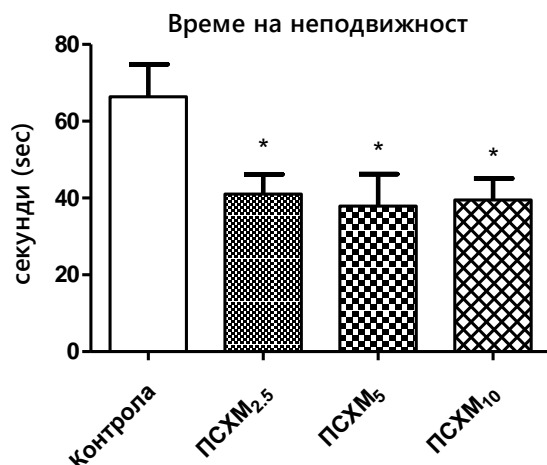
1.5. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест принудително плуване

Тестът за принудително плуване се провежда на 16^{тия} и 32^{рия} ден от началото на експеримента. Тестът се състои от 2 сесии – тренировъчна и тестова, които се провеждат в 2 последователни дни. Тренировка за принудително плуване се прави на 15^{тия} и 31^{вия} ден, 1 час след провеждане на тест за разпознаване на обект и е с продължителност 5 минути. Тестовата сесия е с времетраене от 5 минути и се провежда на 16^{тия} и 32^{рия} ден, 1 час след последното третиране на животните с ПСХМ или дестилирана вода. По време на тестовата сесия се измерва времето на неподвижност на животните. По-дългото време на неподвижност се интерпретира като показател за поведение на отчаяние.

1.5.1. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест принудително плуване след 16-дневно приложение

Резултатите от третирането с ПСХМ в тест принудително плуване са представени на Фигура 21.

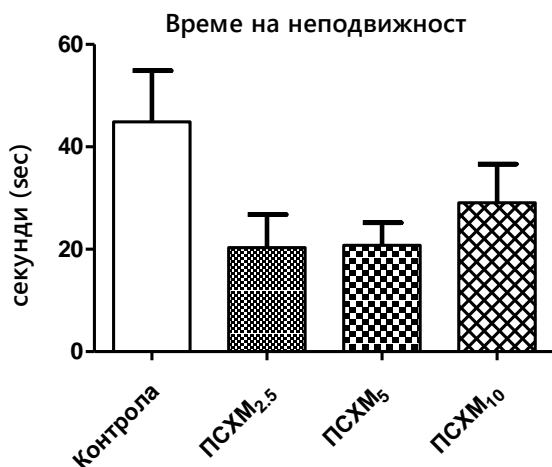
При 16-дневно приложение, ПСХМ предизвиква статистически значимо понижаване на времето на неподвижност във всички групи с животни ($p < 0.05$ спрямо Контролата). За група ПСХМ_{2.5} се отчитат 41.0 ± 5.2 sec ($p < 0.05$), за животните от група ПСХМ₅ времето на неподвижност е 37.9 ± 8.3 ($p < 0.05$) и за група ПСХМ₁₀ е 39.5 ± 5.6 sec ($p < 0.05$). Резултатите на контролната група са 66.4 ± 8.4 sec.



Фигура 21. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху времето на неподвижност в тест принудително плуване след 16-дневно третиране; * $p < 0.05$ спрямо Контролата

1.5.2. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест принудително плуване след 32-дневно приложение

В тест принудително плуване животните, третирани с ПСХМ в дози от 2.5 и 5 мл/кг, показват най-изразено понижаване във времето на неподвижност. Тези резултати обаче не достигат статистическа значимост спрямо Контролата (Фигура 22). Отчитат се 20.3 ± 6.5 sec за група ПСХМ_{2.5} и 20.8 ± 4.4 sec за животните от група ПСХМ₅. За контролната група животни, времето на неподвижност е 44.9 ± 10.0 sec. Забелязва се, че приложението на най-високата доза на ПСХМ води до слабо удължаване на времето на неподвижност, чиито стойности обаче са много по-ниски от тези за контролната група. За група ПСХМ₁₀ времето на неподвижност на животните е 39.5 ± 5.6 sec.



Фигура 22. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху времето на неподвижност в тест принудително плуване след 32-дневно третиране

1.6. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху чернодробната и бъбречна функция

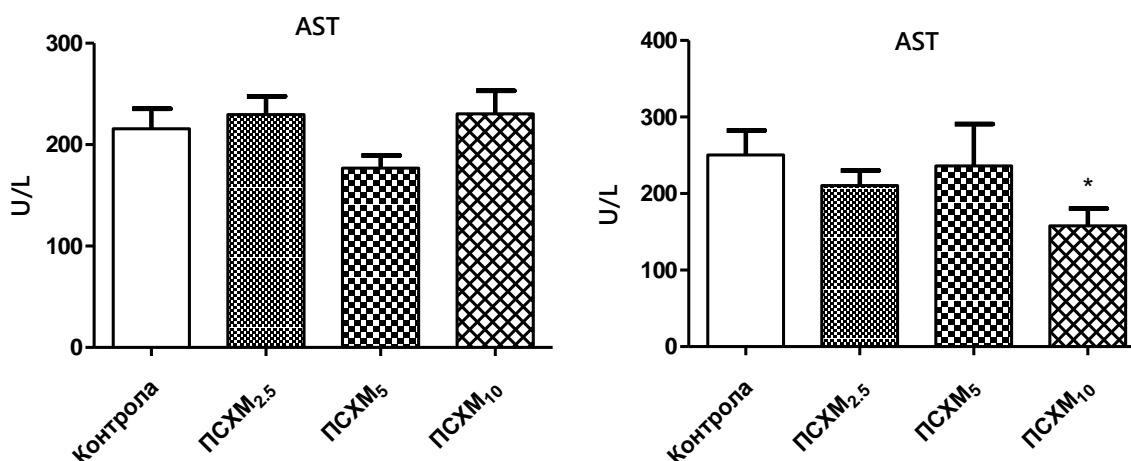
За проследяване безопасността на ПСХМ са анализирани бъбречната и чернодробна функция на 64 здрави мъжки плъха, които са третирани перорално за 16 и за 32 дни. На 17-тия и 33-тия ден животните са анестезирани и са взети проби от серум за биохимичен анализ. В деня на взимане на проби животните не са третирани с дестилирана вода или плодов сок. Използваните маркери за чернодробна функция са аспартат аминотрансфераза (AST), аланин аминотрансфераза (ALT) и алкална фосфатаза (ALP). Показателите за бъбречна функция са серумните концентрации на креатинин и урея от 16- и 32-дневното третиране. Нивата им са установени чрез спектрофотометричен анализ (Aurius 2021 UV-VIS, Cecil Instruments Ltd, UK) и стандартни маркери. Повишени нива на горепосочените показатели се асоциират с чернодробна или бъбречна токсичност.

1.6.1 Нива на аспартат аминотрансфераза (AST)

Серумните нива на AST след 16-дневно приложение на ПСХМ не са променени значително при сравнение с Контролата. Слабо понижение в нивата на AST се наблюдава при животните от група PCXM₅ (176.9 ± 12.5 U/L) при

сравнение със стойностите на Контролата - 215.5 ± 19.9 U/L. Групите ПСХМ_{2.5} и ПСХМ₁₀ имат стойности на AST 229.5 ± 18.1 U/L и 230.4 ± 22.8 U/L съответно.

Приложението на ПСХМ в рамките на 32 дни води до значително намаляване нивата на AST в група ПСХМ₁₀ (157.8 ± 22.8 U/L, $p < 0.05$) спрямо Контролата (250.3 ± 32.2 U/L). Резултатите за групи ПСХМ_{2.5} (210.3 ± 19.9 U/L) и ПСХМ₅ (236.2 ± 54.8 U/L) са близки до контролните (Фигура 23).



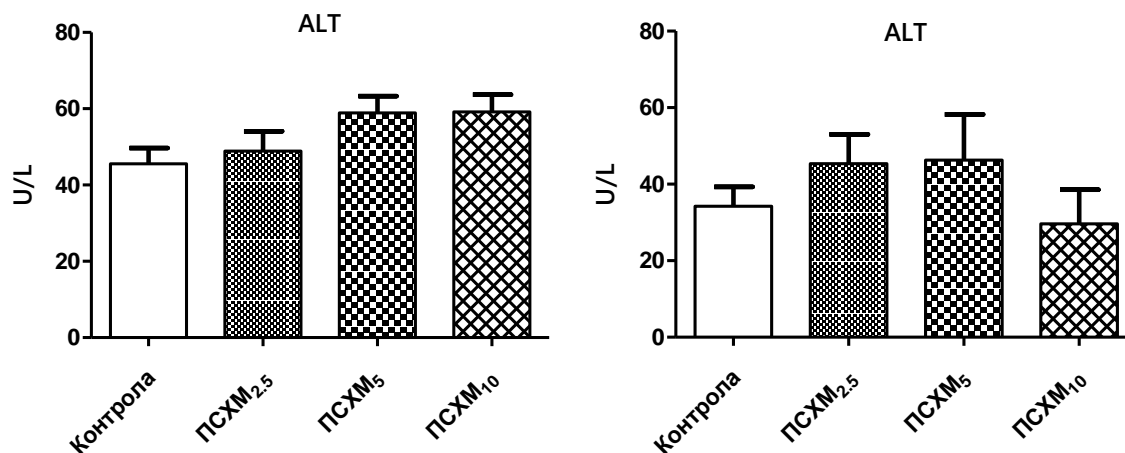
Фигура 23. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху серумните нива на аспартат аминотрансфераза (AST) при плъхове след 16- и 32-дневно третиране; * $p < 0.05$ спрямо Контролата

1.6.2 Нива на аланин аминотрансфераза (ALT)

След 16-дневно приложение на ПСХМ не се наблюдават статистически значими промени в нивата на ALT в изследваните групи (Фигура 24). Отчетени са следните резултати: за контролните животни - 45.6 ± 4.1 U/L, за група ПСХМ_{2.5} - 48.9 ± 5.2 U/L, за група ПСХМ₅ - 58.9 ± 4.4 U/L и 59.2 ± 4.5 U/L за животните от група ПСХМ₁₀.

Без статистически значителна промяна в нивата на ALT са и групите след 32-дневно приложение на ПСХМ в трите дози. Само при група ПСХМ₁₀ (29.6 ± 8.9 U/L) се забелязва слабо понижаване в нивата на ALT при сравнение с Контролата

(34.3 ± 5.1 U/L). За групи ПСХМ_{2.5} и ПСХМ₅ нивата на ALT са съответно 45.5 ± 7.6 U/L и 46.3 ± 12.0 U/L.

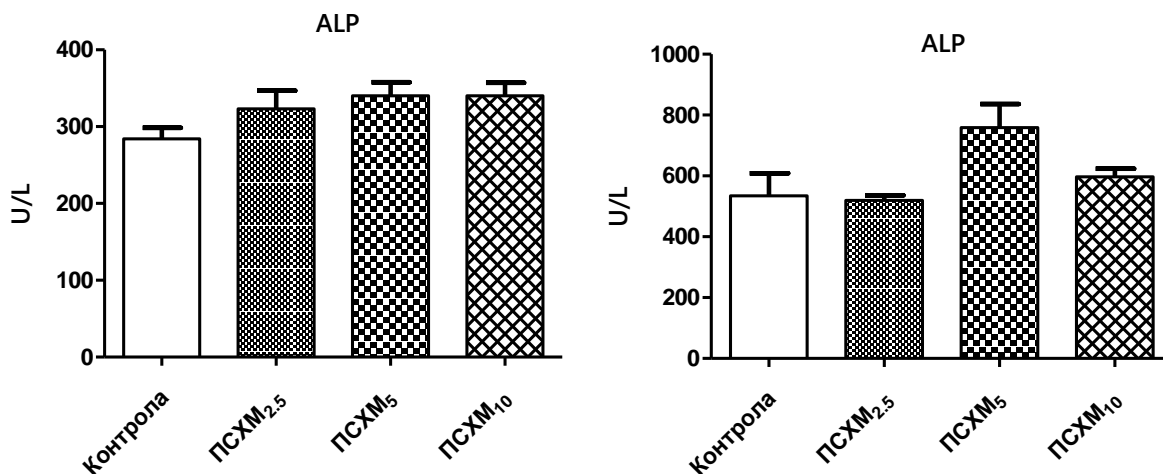


Фигура 24. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху серумните нива на аланин аминотрансфераза (ALT) при плъхове след 16- и 32-дневно третиране

1.6.3 Нива на алкална фосфатаза (ALP)

Групите третирани с ПСХМ за 16-дневен период не показват статистически значими разлики в нивата на ALP при сравнение с контролната (284.2 ± 14.1 U/L). За животните от трите групи ПСХМ се отчитат следните резултати: 323.3 ± 23.4 U/L за ПСХМ_{2.5}, 340.1 ± 17.6 U/L за ПСХМ₅ и за ПСХМ₁₀ - 340.1 ± 17.1 U/L.

След 32-дневно третиране с ПСХМ също не се установяват значими разлики в серумните концентрации на ALP, като за Контролата те са 534.4 ± 74.7 U/L. За останалите групи са отчетени: 519.9 ± 16.3 U/L за ПСХМ_{2.5}, 688.8 ± 45.1 U/L за група ПСХМ₅ и за група ПСХМ₁₀ са 597.1 ± 26.7 U/L (Фигура 25).

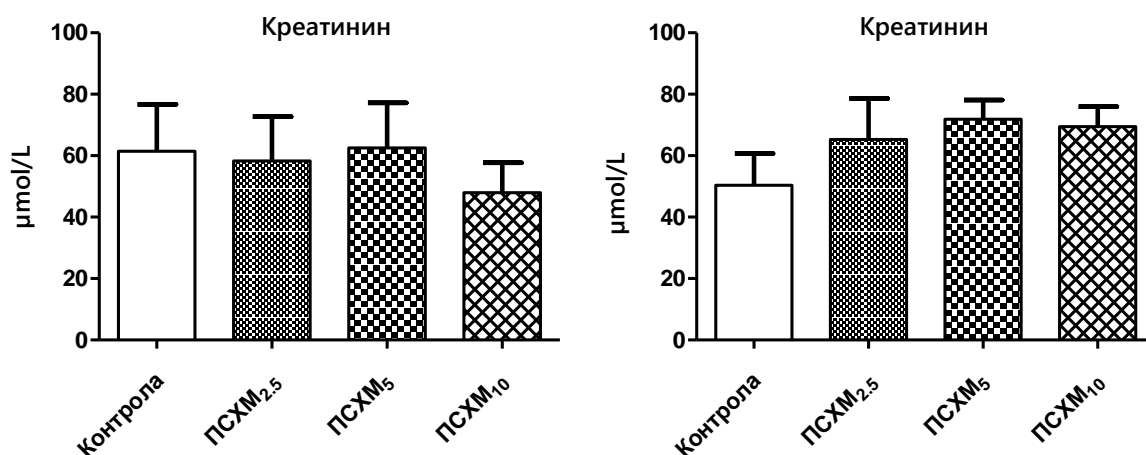


Фигура 25. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху серумните нива на алкална фосфатаза (ALP) при плъхове след 16- и 32-дневно третиране

1.6.4. Нива на креатинин

За 16 дни приложение на ПСХМ в три нарастващи дози не се наблюдават статистически значими промени в бъбречната функция на животни, измерена чрез нивата на креатинин при сравнение с Контролата ($61.5 \pm 15.3 \mu\text{mol/L}$). При всички групи животни се наблюдават сходни резултати, като тези за група ПСХМ_{2.5} ($58.3 \pm 14.1 \mu\text{mol/L}$) и група ПСХМ₅ ($62.5 \pm 14.7 \mu\text{mol/L}$) са най-близки до контролните. За група ПСХМ₁₀ се отчитат серумни нива $47.9 \pm 9.7 \mu\text{mol/L}$ (Фигура 26).

След 32-дневното приложение нито една доза на ПСХМ не води до статистически значими разлики в нивата на креатинин в сравнение с Контролата ($50.4 \pm 10.3 \mu\text{mol/L}$). За третираните с ПСХМ животни са отчетени следните резултати: за група ПСХМ_{2.5} - $65.3 \pm 13.4 \mu\text{mol/L}$, за група ПСХМ₅ - $71.9 \pm 6.2 \mu\text{mol/L}$ и $69.5 \pm 6.5 \mu\text{mol/L}$ за група ПСХМ₁₀.

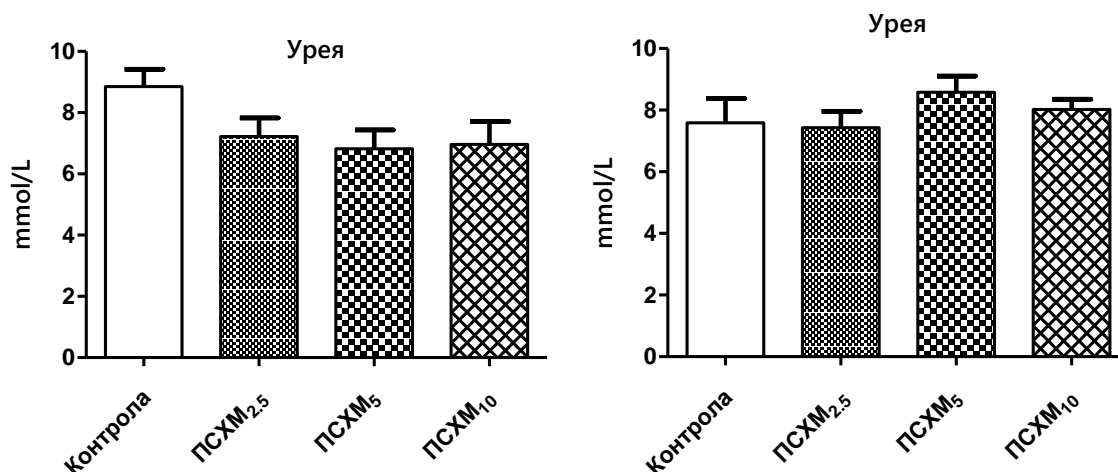


Фигура 26. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху серумните нива на креатинин при плъхове след 16- и 32-дневно третиране

1.6.5. Нива на урея

Уреята е друг показател за бъбречна функция и след 16 дни приложение на различни дози ПСХМ не се отчитат значими промени в нивата ѝ при сравнение с контролните резултати (8.6 ± 0.6 mmol/L). За група ПСХМ_{2.5} са отчетени нива 7.2 ± 0.6 mmol/L, за животните от група ПСХМ₅ - 6.8 ± 0.6 mmol/L и 7.0 ± 0.7 mmol/L за група ПСХМ₁₀.

Нивата на урея след 32-дневен период на приложение на ПСХМ са също много близки до тези на Контролата (7.6 ± 0.8 mmol/L). За група ПСХМ_{2.5} са регистрирани 7.4 ± 0.5 mmol/L, за група ПСХМ₅ са 8.6 ± 0.5 mmol/L и за група ПСХМ₁₀ - 8.0 ± 0.3 mmol/L. Получените резултати за двата периода на третиране са представени на Фигура 27.



Фигура 27. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху серумните нива на урея при плъхове след 16- и 32-дневно третиране

1.7. Обсъждане на ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* при млади/здрави плъхове

Плодовете на видове от род *Chaenomeles* намират широка употреба като медицински растения с разнообразни и повлияващи благоприятно здравето свойства. Това твърдение се подкрепя от пряката връзка между богатия полифенолен състав на ПСХМ и нивото на антиоксидантна активност. Счита се, че фитопродуктите, богати на антиоксиданти, са безопасна алтернатива на конвенционалните лекарства или могат да бъдат подпомагащ терапията компонент, който води до по-малко нежелани ефекти. Видовете от род *Chaenomeles* и по-специално *Chaenomeles maulei* са слабо проучени по отношение на техните психофармакологични ефекти и безопасност (Zhang et al., 2014).

Тест открито поле

Тестът открито поле представлява подходящ метод за изследване на двигателната активност, изследователското поведение и любопитството на животни като реакция към непозната среда. Повишена локомоция в теста се отчита чрез оценка броя на преминалите полета и изправяния на задни лапи. Тъй като плъховете изпитват страх от открити и осветени пространства, повишено

време в централните полета се интерпретира като анксиолитично-подобен ефект (Valvassori et al., 2017).

За оценка ефектите на ПСХМ върху локомоцията, сокът е изследван в тест открито поле. След 14-дневно третиране на здрави мъжки плъхове с ПСХМ се установява повишаване на общата двигателна активност на животните, изразена като съвкупност от вертикалните и хоризонтални движения в тест открито поле. Резултатите от теста показват, че статистически значимо повишаване на хоризонталната активност се наблюдава при ПСХМ в дози 2.5 и 5 мл/кг спрямо Контролата. Броят изправяния на задни лапи е статистически достоверно повишен само в група ПСХМ₅ спрямо контролната група след 14-дневно приложение.

Статистически достоверно повишение на хоризонталната активност се регистрира при всички дози на ПСХМ, приложен в рамките на 30 дни, като при животните, третирани с ПСХМ в доза 5 мл/кг, този ефект е най-силно изразен. Наблюдава се минимално повишаване на вертикалната активност при всички групи животни след 30-дневно приложение на ПСХМ, но без да се достига до статистическа значимост спрямо контролните.

Повишената двигателна активност може да бъде обяснена със стимулиращо действие върху ЦНС, докато понижени хоризонтална и вертикална активност се свързват със седативни ефекти (Prut and Belzung, 2003). Резултатите от настоящото изследване показват, че ПСХМ повишава локомоцията и не проявява седативен ефект върху млади/здрави плъхове. Тетрираните с ПСХМ животни демонстрират подобрена двигателна активност след 14- и 30-дневно приложение. Получените резултати дават основание да се предположи наличието на психостимулиращ ефект на ПСХМ, приложен върху млади/здрави плъхове. Литературните данни показват, че двигателната активност може да бъде повишена от веществата, действащи като психостимуланти (Cuhna and Masur, 1978). Повишената спонтанна локомоция може да се дължи на повишена възбудимост на централната нервна система, което да е пряко свързано с модулация на моноаминната система, например чрез повишаване нивата на допамин в ЦНС.

Приложението на психостимуланти като кофеин и Modafinil, също води до повишена двигателна активност, подобряване на когнитивните способности и настроението (Cappelletti et al., 2015). Тези ефекти на кофеин са доза-зависими,

като в по-ниските си дози кофеин показва анксиолитични ефекти и повишава двигателната активност в по-високите дози (Yamada et al., 2014). Механизмът на действие на Modafinil е чрез инхибиране транспортера за обрано връщане на допамин, да повишава нивата на този медиатор в префронталния кортекс, с което се обяснява и повишената двигателна активност при приложението му (Minzenberg and Carter, 2008; Rasetti et al., 2010). Приложението на комбинация от Modafinil и кофеин в плъхове води до повишена двигателна активност в тест открито поле и редуцирани нива на възпалителни цитокини (Wadhwa et al., 2018). Приложението само на Modafinil води и до доза-зависимо повишаване в екстрацелуларните нива на серотонин главно във фронталния кортекс (Ferraro et al., 2002). При приложението на ПСХМ се наблюдава подобрена локомоция в плъхове, която може да се дължи на психостимулиращ ефект. Възможно е механизмът на действие на ПСХМ да се осъществява чрез блокиране на допаминовия обратен транспорт, което се наблюдава при приложение на други видове от род *Chaenomeles* (Zhao et al., 2008). Вследствие на това се повишават нивата на допамин и се наблюдава повишена локомоция (Dobbs et al., 2016).

Възможно е хлорогеновата киселина и нейният главен метаболит, кафеената киселина, които се детектират в ПСХМ, да са отговорни за наблюдаваната психостимулация. Има данни, които посочват, че приложението на хлорогенова киселина води до психомоторна стимулация. По-изразена такава се наблюдава при приложението на кафеена киселина (Ohnishi et al., 2006). Комбинираното приложение на хлорогенова киселина с кофеин води до доза-зависимо централно стимулиращо действие (Czok and Lang, 1961). Хлорогеновата и кафеена киселина в доза 2.8 mmol/kg водят до изразена локомоторна активация в мишки, 10 до 60 минути след приложението им (Ohnishi et al., 2006). Приложението на хлорогенова киселина стимулира спонтанната двигателна активност и подобрява когнитивните функции в скополамин-индуциран модел на когнитивно нарушение (Kwon et al., 2010). Антиоксидантните свойства на хлорогенова киселина показват невропротективен потенциал в модели на невродегенеративни заболявания, при които се засяга моторната функция като болест на Алцхаймер и болест на Паркинсон (Heitman and Ingram, 2017).

За оценка ефектите на ПСХМ върху тревожността, е измерено времето на престой в централните квадрати на откритото поле. След 14-дневно третиране времето на престой в централното поле статистически значимо се повишава при животните, третирани с ПСХМ в доза 10 мл/кг. Повишаване на времето,

прекарано в централните полета, може да се интерпретира като анксиолитично-подобен ефект. Следователно ПСХМ в доза 10 мл/кг проявява анксиолитично-подобен ефект след 14-дневно третиране. Възможно е този ефект на ПСХМ да се обясни с БАВ в състава му. Претретирането на плъхове с ванилова киселина, която се открива в най-високи концентрации в ПСХМ, води до подобряване на сензорните моторни функции, намаляване на мозъчната хиперемия и стимулиране на анксиолитично-подобно поведение (Khoshnam et al., 2018).

Нито една доза на ПСХМ след 30-дневно приложение не води до статистически значими промени във времето на престой в централните полета спрямо Контролата. Възможно е статистически непромененото време в централните полета да се обясни и с превалиране на повишената двигателна активност на животните над анксиолитичния ефект след 30-дневно приложение на ПСХМ. Тъй като във всяка доза на ПСХМ се наблюдава повишаване на броя преминати полета, може да се предположи, че с нарастване периода на третиране анксиолитично-подобния ефект се измества от психомоторна стимулация.

Тест за социално взаимодействие

Тестът за социално взаимодействие (File and Hyde, 1978) представлява поле, в което се оставят двойка опитни животни и се проследява времето, което прекарват в социален контакт. Избират се животни от различни групи, така че партньорите да бъдат непознати. Тъй като взаимодействието на всеки един от партньорите пряко зависи от поведението на другото животно, то се счита, че двойката се брой за една единица. Анксиолитично-подобно поведение се наблюдава, когато времето за социално общуване се повишава, докато общата двигателна активност остава непроменена. Обратно, понижено време на социален контакт предполага анксиогенно-подобно поведение (Bailey and Crawley, 2009).

Резултатите от теста за социално взаимодействие показват липсата на анксиолитичен ефект както след 14-, така и след 30-дневно третиране. Нито една доза на ПСХМ не води до повишена социална активност спрямо контролните животни.

Веществата, които действат като психостимуланти, също показват разнопосочно взаимодействие с компоненти на социалното поведение (Sommers et al., 2006). Methamphetamine води до понижаване на социалното поведение, съпроводено с повишаване двигателната активност и повишено освобождаване

на допамин (Clemens et al., 2007). Острото приложение на Methamphetamine намалява доза-зависимо времето на социално взаимодействие между животните (Šlamberová et al., 2010). С повишаване нивата на допамин се обяснява само повишената локомоция, тъй като социалното поведение включва взаимодействието между няколко невромедиаторни системи, сред които опиоидната, допаминергичната и серотонинергична. Така че предпочитанието на животните към несоциални дейности може да се дължи на намалена мотивация или интерес към социално взаимодействие (Trezza et al., 2011).

Важно е да се отбележи, че поведението в тест за социално взаимодействие може да бъде повлияно индиректно от повишената двигателна активност. Така че наблюдаваното намалено социално взаимодействие при приложението на психостимуланти може да е поне частично следствие от повишената локомоция и изследователско поведение (Šlamberová et al., 2015). В същото време с приложението на ПСХМ също се повишават статистически значимо индексите за двигателна активност спрямо Контролата, но социалното взаимодействие не се променя значимо. Тези резултати са статистически достоверни както за 14-, така и за 30-дневното му приложение. Интересно е, че ниските дози психостимуланти също повишават локомоцията, но без да променят значимо социалната активност (Sams-Dodd, 1998). С повишаване дозата на психостимуланта, животните показват изразено предпочитание към несоциални активности, което предполага хипервъзбудимост/хиперактивност (Šlamberová et al., 2015). При психостимуланти механизмите, които подчертават ефектите им върху социалното поведение и двигателната активност, са свързани с модулиране на моноаминергичната система в мозъка (Iversen et al., 2014).

Вероятно някои от сложните механизми на ниските дози психостимуланти лежат в основата на ефектите на ПСХМ, сред които селективно повлияване нивата на невромедиатори като серотонин, норадреналин и допамин. В резултат на това при приложението на ПСХМ се наблюдава ефект подобен на ниски дози психостимуланти – повишена двигателна активност и непроменена социална активност.

Тест повдигнат кръстосан лабиринт

Повдигнатият кръстосан лабиринт е ефективен метод за оценка на поведенческия профил на експериментални животни. Показателите, които изследва този тест, са полезни при характеризиране нивото на тревожност на

експерименталните животни. Естественото предпочитание на животните към слабо осветени пространства е показател за страх и нужда от сигурност. Анксиолитично действащите лекарства се характеризират със способността да повишават както навлизанията, така и времето, прекарано в отворените рамена на лабиринта, без да водят до промени в двигателната активност (Ennaceur, 2014). Този ефект на анксиолитици се подчертава от естествената склонност на гризачите да отбягват високи и открити пространства (Schmidt-Mutter et al., 1998).

В този експеримент се установява, че 15-дневното третиране с ПСХМ в доза 10 мл/кг води до статистически значимо повишаване на активността на здрави животни в отворените рамена на лабиринта. Повишени са както броя навлизания, така и времето, прекарано в откритите пространства на лабиринта. В същото време третирането с ПСХМ₁₀ не променя статистически достоверно броя навлизания и времето, прекарано в затворените рамена на лабиринта. Общият брой влизания в отворените и затворени рамена на лабиринта, както и съотношението на влизанията в отворените рамена спрямо общия брой влизания е повишено със статистическа достоверност за животните от група ПСХМ₁₀ спрямо контролните. Тези резултати се дължат главно на повишаване активността на животните в отворените рамена на лабиринта и може да се интерпретират като анксиолитично-подобен ефект след 15-дневно приложение на ПСХМ в доза 10 мл/кг.

При 30-дневно третираните животни се отчита, че ПСХМ в доза 2.5 мл/кг повишава времето, прекарано в отворените рамена на лабиринта със статистическа значимост спрямо Контролата. Времето на престой в затворените рамена след приложение на ПСХМ в доза 2.5 мл/кг е статистически значимо намалено спрямо контролната група. Повишеното време на престой в отворените рамена и намаленото време в затворените предполага, че ПСХМ в доза 2.5 мл/кг проявява анксиолитично-подобен ефект след 30-дневно приложение.

Третирането с ПСХМ в доза 5 мл/кг води до статистически достоверно повишен брой влизания в затворените рамена на лабиринта спрямо Контролата след 30-дневно приложение. Общият брой влизания също е повишен и постига статистическа достоверност спрямо контролните животни. Повишеният общ брой влизания при приложението на ПСХМ в доза 5 мл/кг, се дължи на повишената активност в затворените рамена на лабиринта, което е свързано с

повишена двигателна активност, проявяваща се главно като психомоторна стимулация.

Описаният по-горе анксиолитично-подобен ефект на ПСХМ в дози 2.5 и 10 мл/кг се съпровожда с повишена активност в отворените рамена на лабиринта. Възможна причина за наблюдаваният анксиолитично-подобен ефект на ПСХМ е високото съдържание на полифеноли в състава на плодовия сок. От тях вероятни носители на фармакологична активност са фенолните киселини ванилова, хлорогенова и нейният метаболит, кафеена киселина. Установено е, че кафеената киселина проявява антидепресивно-подобни и анксиолитично-подобни ефекти, които се дължат на индиректна модулация на адренергичните α_{1A} -рецептори (Takeda et al., 2003). Хлорогенова киселина демонстрира повишен брой влизания и време на престой в отворените рамена на тест повдигнат кръстосан лабиринт. Установява се, че тези резултати се антагонизират при приложението на бензодиазепинов антагонист (Bouayed et al., 2007). Следователно анксиолитичните ефекти на хлорогенова киселина се дължат на стимулиране на бензодиазепинови рецептори. Не е напълно изяснено взаимодействието на хлорогенова киселина с ГАМК_A-рецептора, но се знае, че влиянието ѝ върху тревожността не е свързано с антиоксидантния ѝ потенциал. Хлорогеновата киселина проявява анксиолитично-подобен ефект, който е измерим с този на стандарт като Diazepam (Heitman and Ingram, 2017).

Проучване ефектите на полифеноли от други растителни видове показват потенциал за успешно повлияване на тревожност, най-вече поради високо съдържание на флавоноиди. Влиянието на флавоноидите се отчита главно върху ГАМК-рецепторите (Kavvadias et al., 2004). Счита се, че някои флавоноиди дължат анксиолитичните си свойства на модулация на ГАМК_A и ГАМК_C-рецептори (Goutman et al., 2003). Приложението на епигалокатехин води до поведенчески отговори, които се описват като бензодиазепин-подобни. Счита се, че епигалокатехин взаимодейства с ГАМК_A-рецепторите и на това се дължат анксиолитично-подобните му свойства (Vignes et al., 2006). Друг флавоноид, който демонстрира значителни анксиолитични ефекти в тест повдигнат кръстосан лабиринт, е кверцетин. Интересно е, че този ефект се наблюдава в по-ниския диапазон от дози, при които е изследван и само след орално приложение. Счита се, че анксиолитичната му активност се дължи на модулация на ГАМК-ергичната система (Grundmann et al., 2008).

Намаляване времето, прекарано в отворените рамена и броят навлизания в тях, се разглеждат като индикатори за тревожно-подобно поведение в тест повдигнат кръстосан лабиринт. Счита се, че това поведение може да се обясни с повишаване нивата на серотонин в различни региони на мозъка (Prajapati et al., 2019). Повишената серотонинергична медиация води до намалено активиране на допаминергични неврони (Di Giovanni et al., 2008). Има данни, че полифеноли дължат някаква част от анксиолитичните си ефекти на допаминергична активация, без да предизвикват промени в нивата на норадреналин и серотонин (Kita et al., 2019). По-вероятно е полифенолите от ПСХМ да повишават нивата на моноамини в хипокампа чрез инхибиране ензимната активност на МАО (Nabavi et al., 2017). Възможно е част от наблюдаваните ефекти на ПСХМ в повдигнатия лабиринт да са свързани именно с инхибиране на транспортера за обратно връщане на допамин и норадреналин (Zhao et al., 2008). Установен е анксиолитично-подобен ефект в тест повдигнат кръстосан лабиринт при приложението на допаминов агонист, като този ефект не се обяснява с повишена локомоция в други поведенчески тестове (Garcia et al., 2005). Активиране на допаминергичната медиация е и механизъмът на действие на някои психостимуланти, водещи до подобро навлизане в отворените рамена на повдигнатия лабиринт и повишена двигателна активност в откритото поле (Wang et al., 2015).

Интересно е, че психостимуланти като Methamphetamine, които въздействат главно върху допаминергичната система, с промяна на дозата могат да проявяват анксиолитично-подобен ефект в тест повдигнат кръстосан лабиринт или да не проявяват никакъв ефект. При приложението на психостимуланта се наблюдава повишаване двигателната активност в откритото поле, намалено социално взаимодействие и липса на промени в повдигнатия кръстосан лабиринт (Schutová et al., 2010). Според екипа на Herbert and Hughes, приложението на Methamphetamine в плъхове намалява тревожно-подобното поведение в тест открито поле, но само в ниските му дози (Herbert and Hughes, 2009). В тези дози на психостимуланта, при които се отчита анксиолитично-подобен ефект в откритото поле, обаче се наблюдава завишен брой навлизания в затворените рамена на теста повдигнат кръстосан лабиринт. Това предполага, че анксиолитично-подобния му ефект се дължи на повишената локомоция (Loxton and Canales, 2017). С повишаване дозата на психостимуланта превалират психомоторните ефекти над анксиолитично-подобните.

Възможно е разнопосочните ефекти на психостимуланти в поведенческите тестове да се дължат не само на дозата, но и на продължителността на приложение. Острото приложение на Methamphetamine се свързва с повишено освобождаване на допамин, докато при хроничното се наблюдава намаление на нивата на допамин в хипокампа и развитието на зависимост (Melo et al., 2012). При острото приложение се наблюдава повишена активност на плъхове в отворените рамена на лабиринта, което предполага анксиолитично-подобен ефект, докато хроничното приложение се свързва с повишена локомоция и прояви на тревожност (Tamaki et al., 2008). Анксиолитично-подобен ефект се наблюдава за ПСХМ₁₀ в по-краткия период на третиране от 15 дни. Възможно е най-високата доза на ПСХМ след 15-дневно приложение да постига комбинация от механизма на действие на ниски дози психостимуланти при остро приложение и ГАМК-модулиращите свойства на полифеноли. Анксиолитично-подобен ефект се наблюдава и след 30-дневното третиране с ПСХМ_{2.5}. Възможно е в по-ниската доза на ПСХМ и с удължаване периода на третиране да превалират ГАМК-модулиращите ефекти на полифенолите. С повишаване дозата на ПСХМ след 30-дневно приложение се отчита превалиране на психомоторната активност без анксиолитично-подобен ефект. Може да се предположи, че приложението на ПСХМ₅ се свързва с повишаване главно нивата на допамин и по-слабо повлияване на ГАМК-трансмисията. В тази доза на ПСХМ е най-изразена двигателната активност както в тест открито поле така и в тест повдигнат кръстосан лабиринт.

Тест за разпознаване на обект

Поведенческите тестове, целящи да оценят способността на животно да разпознае вече представян стимул, спадат към моделите на амнезия при човека (Baxter, 2010). Тестът за разпознаване на обект е поведенчески метод за изследване паметта, който разчита на естественото любопитство на плъхове при липсата на награда. Но също така може да се тълкува и като подход за отчитане на работна памет, внимание и предпочитание към новото (Silvers et al., 2007). Тестът за разпознаване на обект е ефикасен метод, съпровождащ се с относително ниски нива на стрес и позволяващ детектирането на невропсихологически промени след фармакологични, биологични или генетични манипулации (Goulart et al., 2010).

Важно е да се отбележи, че този тест се прави еднократно и има чувствително отношение към епизодичната памет, много по-изразено отколкото

към когнитивните функции, при което се изискват неколкократно повторения на опитните постановки. За детектиране на епизодичната памет, този тест разчита на структури от медиалния темпорален лоб, най-вече на хипокампа (Fole et al., 2015).

Тестът за разпознаване на обект може да се раздели на 3 фази - фаза на хабитуация, опознаване и тестова. По време на хабитуацията, на всяко животно се дава възможност да се запознае с откритата арена. Целта на тази фаза е да се намали наличието на стреса от новата среда. Оpoznavателната фаза включва въвеждане на нов обект в арената, като по време на тестовата фаза се използва подобен обект и допълнително нов обект. Нормално, животните прекарват повече време в проучване на новия обект и когато тази склонност се наблюдава през тестовата фаза, се приема, че животното е запомнило познатия обект (Antunes and Biala, 2012). Приема се, че наличието на мозъчно увреждане или действието на лекарство водят до промени в моторната функция, следователно повлияват изследването на новия и познатия обект по един и същи начин, независимо от периода на пауза между опознавателната и експерименталната сесия.

Съществуват няколко индекса за оценка поведението на животните: индекс на разграничение, тотално време на опознаване и индекс на опознаване.

Индексът на опознаване е въведен с цел оценка на времето, прекарано в изследване на новия обект спрямо тоталното време на опознаване (Gaskin et al., 2010). Разпознаването на нов обект се влияе много силно от околната среда. Възможно е предпочитанието към който и да е обект в тестовата сесия да се дължи на реплики или подобни форми от околната среда, с които животното да прави асоции (Bevins et al., 2002). Разграничаването на нов обект изисква повече когнитивни умения, отколкото отчитането на предпочитание към него (Ennaceur, 2010). При никоя от групите животните, третирани с ПСХМ не се постига статистически значимо отклонение в индекса на опознаване спрямо Контролата.

Третирането с ПСХМ в нито една доза не води до статистически значими промени в индекса на разграничение. Индексът на разграничение позволява да се проследи разликата във времето на опознаване на нов обект спрямо познат обект. Тази разлика след това се дели на сумата от време прекарано с новия и познатия обект. Получават се числа вариращи между +1 и -1, като отрицателните

стойности предполагат повече време прекарано с познатия обект (Burke et al., 2010).

Тоталното време на опознаване на новия и познат обект също не се променя статистически значимо спрямо Контролата при приложението на ПСХМ. Възможно е това да се дължи на психомоторна стимулация, поради която животните да прекарват малко време при който и да е от обектите в арената. Такава психомоторна стимулация е в съответствие с данните от тест открито поле и предполага ефекти на ПСХМ върху двигателната активност.

Подобно поведение с липса на промени в теста за разпознаване на нов обект се наблюдава при приложението на психостимуланти (García-Pardo et al., 2017). Приложението на MDMA в плъхове не води до промени в показателите за памет в теста за разпознаване на обект (Piper and Meyer, 2006). Хроничното му приложение обаче води до по-продължително време в изследване на познатия обект и това предполага засягане на епизодичната памет (Cohen et al., 2005). При приложението на ПСХМ не се наблюдава предпочитание към познатия обект, което предполага, че ПСХМ не повлиява паметта при млади/здрави плъхове. Приложението на друг психостимулант, Methamphetamine, също не води до промени в индексите на теста за разпознаване на обект (Fialová et al., 2015).

Някои психостимуланти намират приложение за лечението на синдром на хиперактивност с дефицит на вниманието, като подобряват вниманието чрез повишаване нивата на допамин без да намаляват хиперактивността (Carmack et al., 2014). Установено е, че с повишаване нивата на допамин не се подобрява епизодичната памет освен ако в експерименталната постановка не участва стимул или награда (McNamara et al., 2014). Възможно е наблюдаваната липса на ефект в теста за разпознаване на обект да се дължи на повишена локомоция. Последната може да се очаква при въздействие на БАВ, откриващи се в ПСХМ, върху нивата на допамин.

Литературните проучвания демонстрират, че флавоноидът кверцетин и неговите метаболити стимулират пресинаптичното навлизане на прекурсори на катехоламините, сред които и на допамин (Dhiman et al., 2019; Samoilenko et al., 2010). Възможно е чрез селективно стимулиране на моноаминергичната трансмисия, полифенолите от ПСХМ да повишават двигателната активност на животните без да повлияват паметта, което би допринесло за терапията на невродегенеративни заболявания като болест на Паркинсон.

Тест принудително плуване

Тестът принудително плуване дава възможност да се изследва реакцията на животните в обстановка на безпомощност, от която няма как да се спасят. Времето на неподвижност на животното се отчита като състояние, наподобяващо примирението и отчаянието при депресивно болните пациенти. Времето на неподвижност е сумарното време, през което животното не изследва цилиндъра с вода и не се опитва да избяга. Това са само движенията необходими да поддържа главата си над водното ниво. Антидепресивно действие на лекарство се отчита чрез намаляване времето на неподвижност по време на теста, ако то не повишава двигателната активност на животното в други поведенчески тестове. От друга страна, скъсено време на неподвижност може да бъде и в резултат на повишена двигателна активност.

Този тест е въведен отдавна и все още служи като широко застъпен метод в изследването на депресивно-подобно поведение в плъхове. Едно от предимствата му е, че животните са подложени на стрес, който подобрява възможността за развитие на характерните симптоми на клинична депресия (Doron et al., 2014). Патогенезата на депресията се свързва до голяма степен с моноаминната теория, която обаче не е способна да обясни бавно настъпващите клинични ефекти при третиране (Slattery et al., 2004). Главният проблем на съвременната антидепресивна терапия е, че трудно постига пълно възстановяване на пациентите и поради продължителността на лечението, често се наблюдават нежелани ефекти.

Настоящите резултати показват, че ПСХМ в доза 2.5 мл/кг и 5 мл/кг води до статистически значимо намаляване на времето на неподвижност спрямо Контролата след 16-дневно приложение. Това са двете дози на ПСХМ, при които се наблюдава и статистически достоверно повишаване на двигателната активност в тест открито поле след 14-дневно приложение. Може да се предположи, че 16-дневното приложение на ПСХМ_{2.5} и ПСХМ₅ води до антидепресивно-подобен ефект, който обаче може да се дължи и на повишаване двигателната активност на животните. В същия период на третиране, ПСХМ₁₀ води до статистически значимо намаляване на времето на неподвижност, без да се наблюдава промяна в индексите за двигателна активност в тест открито поле. ПСХМ в доза 10мл/кг проявява антидепресивно-подобен ефект.

При 32-дневно третираните с ПСХМ в трите дози животни, нито една доза на ПСХМ не скъсява статистически значимо времето на неподвижност в тест за принудително плуване. Може да се забележи обаче, че приложението на ПСХМ води до тенденция към намаляване времето на неподвижност. Тези резултати показват, че след 30-дневно третиране, ПСХМ не проявява антидепресивно-подобен ефект.

Наблюдаваните резултати при приложението на ПСХМ в доза 10 мл/кг в теста за принудително плуване показват антидепресивно-подобен ефект за краткосрочния период на третиране. Възможно е наблюдаваният антидепресивно-подобен ефект да се дължи на фармакологичните свойства на полифеноли, съдържащи се в ПСХМ. Литературните данни сочат, че полифеноли имат способността да инхибират активността на глиалната MAO, което се свързва с намалено ензимно разграждане на серотонин и повишеното му освобождаване (Mazzio et al., 1998). Един от флавоноидите, които се откриват във висока концентрация в ПСХМ, е катехин. Установено е, че третирането с катехин подобрява депресивно-подобното и тревожно-подобното поведение в плъхове. Приложението му води до модулация на моноаминната система и се изразява в намалено време на неподвижност в тест принудително плуване (Lee et al., 2013). Възможно е антидепресивно-подобният ефект на ПСХМ да се дължи частично и на повишаване нивата на допамин. Чрез завишаване нивата на серотонин и допамин действат някои антидепресанти. При тяхното приложение също се отчита значително понижено време на неподвижност в тест за принудително плуване (Lee et al., 2017).

Установено е, че вещества с психофармакологична активност могат да имат разнопосочни ефекти върху депресивното поведение в зависимост от дозата и срока си на приложение. Литературните данни показват, че психостимуланти като Ketamine могат да подобрят депресивната симптоматика в рамките на няколкото часа от приложението му (Zarate et al., 2006). В ниските си дози, Ketamine проявява антидепресивно-подобни ефекти, които се наблюдават като намалена неподвижност в теста за принудително плуване (Thelen et al., 2016). Счита се, че ниските дози на Ketamine стимулират серотонинергичната активност в хипокампа и са отговорни за антидепресивно-подобните ефекти (Gigliucci et al., 2013; Li et al., 2010). Повишаването на дозата му води до доза-зависима двигателна хиперактивност (Imre et al., 2006), която се дължи на повишаване нивата на допамин в ЦНС (McCullough and Salamone, 1992). Антидепресивен ефект на Ketamine се наблюдава само при острото му

приложение, докато хроничната му употреба в същата доза не променя депресивно-подобното поведение (Kara et al., 2017).

Биохимични показатели за чернодробна и бъбречна безопасност

Едни от основните индекси за правилна функция или токсичност на черния дроб и сърцето са серумните нива на аминотрансферази, чиито нива се повишават при увреждане на чернодробните клетки (Lehmann-Werman et al., 2018). Това може да се дължи на тъканна некроза, сърдечно-съдово увреждане или неалкохолен стеатохепатит (Nathwani et al., 2005). Нивата на AST и ALT могат да нараснат 20 до 50 пъти при наличието на патология и често се използва отношението AST/ALT за предсказване кой точно орган е увреден (Jacobs, 1996). Лабораторните тестове, които проследяват нивата на AST и ALT имат важно клинично значение, но имат и своите ограничения. Чернодробните трансаминази не са с абсолютна чернодробна специфичност, понеже AST се открива експресиран и в сърдечната мускулатура, бъбреците, мозъка, панкреаса и белия дроб. ALT присъства главно в черния дроб и бъбреците, а концентрациите му в миокарда и скелетната мускулатура са ниски, но могат да са показател за сърдечно-съдово заболяване (Ndrepera et al., 2019). И двата ензима представляват биологични катализатори, като ALT е вътреклетъчен ензим, чийто нива се поддържат от обновяването на клетките.

От двата маркера по-голяма роля за тъканното увреждане има ALT, понеже е фактор за оценка на мембранния интегритет (Shahjahan et al., 2004). 16-дневното приложение на ПСХМ не предизвиква статистически значими промени в нивата на AST, ALP или ALT при сравнение с контролната група. След 32-дневно третиране с ПСХМ се забелязва значимо намаляване на серумните нива на AST в група ПСХМ₁₀. Нивата на ALT и ALP остават близки до контролните след 30-дневно приложение на всички дози на ПСХМ.

Алкалната фосфатаза е мембранно свързан ензим, чийто стойности в серума се повишават при развитие на раково, сърдечно или чернодробно заболяване (Shamban et al., 2014). Приложението на ПСХМ в нито един от двата тестови периода не предизвика промени в нивата на алкалната фосфатаза. Тези резултати показват не само чернодробната безопасност на плодовия сок, но и възможността за хепатопротективно действие при субхронично приложение. В настоящия експеримент, приложението на ПСХМ е върху здрави животни, но дава възможност да се оцени хепатопротективния му потенциал и безопасност

без наличието на увреда. Потенциал да предпазват от чернодробно увреждане показват някои БАВ, които се откриват и в ПСХМ. Например, установено е, че кафе с високо съдържание на хлорогенова киселина намалява развитието на неалкохолна чернодробна стеатоза в плъхове (Panchal et al., 2012). Консумацията на кафе се свързва с намалени нива на чернодробни ензими, което може да се дължи на наличието на полифеноли в него (Ikeda et al., 2010).

За БАВ, които се откриват в ПСХМ също има данни за хепатопротективен ефект при наличието на чернодробно увреждане. В модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност, хлорогеновата киселина значително намалява нивата на AST и ALT, чиито стойности са повишени от парацетамол. Също така, хлорогеновата киселина намалява апоптозата и оксидативния стрес, като ефектите и се дължат главно на повлияване метаболизма на парацетамол и на антиоксидантните и свойства (Pang et al., 2015). Приложението на естер на кафеената киселина също намалява хепатотоксичността, предизвикана от алкохол и високомастна диета чрез подобряване на чернодробната архитектура и намаляване нивара на билирубин, ALT и AST. Наблюдават се още намаляване нивата на оксидативен стрес и повишаване тъканните нива на глутатион (Li et al., 2015; Meydan et al., 2019).

Хепатопротективен ефект се наблюдава при други видове от род *Chaenomeles*. Третиране с плодов екстракт от *Chaenomeles thibetica* води до намаляване на патологично завишените нива на AST, ALT, алкална фосфатаза и билирубин, както и до повишаване на антиоксидантни фактори като супероксид дисмутаза, каталаза и глутатион. Счита се, че наблюдаваната хепатопротективна активност се дължи на високото съдържание на фенолни съединения, флавоноиди и проантоцианидини (Ma et al., 2016).

Серумните нива на креатинин и урея са широко използвани маркери за оценка на бъбречна функция. Креатининът се получава при разграждането на креатин фосфата в мускулите и неговите нива зависят от вида и функцията на мускула, степента на движение, диетата и здравния статут (Banfi and Del Fabbro, 2006; Zuo et al., 2008). Често използван индекс е за филтрационната способност на бъбреците и позволява проследяването на бъбречна увреда. Кумулацията на креатинин води до невротоксичност и сърбеж (Nisha et al., 2017). Уреята е краен продукт от метаболизма на протеини и нейните нива нарастват при бъбречна недостатъчност, проявяваща се с уремия (Entedhar and Nawal, 2016).

През двата експериментални периода на третиране с ПСХМ не се наблюдават отклонения в нивата на креатинин нито на урея при сравнение с Контролата. Тези резултати предполагат, че използваните дози ПСХМ са напълно безопасни и не компрометиращи бъбречната функция. В подкрепа на това съществуват данни, които доказват наличието на нефропротективен ефект на екстракт от *Chaenomeles sinensis* в мишки с хиперурикемия (Zhang et al., 2018).

От БАВ, които се откриват в ПСХМ, кафеената киселина показва нефропротективни свойства, които се изразяват в антиоксидантен ефект и намаляване нивата на креатинин в толуен-индуцирана нефротоксичност в плъхове (Meydan et al., 2016). Подобни ефекти са описани и за хлорогенова киселина в модели на цисплатин- и арсен-индуцирана бъбречна токсичност. Приложението ѝ намалява нивата на серумен креатинин и урея, потиска оксидативния стрес, възпалението, апоптозата и стимулира бъбречната регенерация (Al-Megrin et al., 2020; Domitrović et al., 2014).

2. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху резерпин-индуцирана хипокинезия в плъхове

Общо 50 мъжки Wistar плъхове са разпределени в 5 групи от по 10 животни. Разпределението на животните става в следните групи: Контрола, Р (Резерпин), Р+ПСХМ_{2.5}, Р+ПСХМ₅ и Р+ПСХМ₁₀. На всички животни, с изключение на контролните, е прилаган еднократно, интраперитонеално резерпин в доза 6мг/кг (разтворен в 5% диметил сулфоксид - ДМСО, в обем 1 мл/кг). Контролата са инжектирани еднократно, интраперитонеално само с 5% ДМСО в обем 1 мл/кг. Животните, спадащи в групите Р+ПСХМ_{2.5}, Р+ПСХМ₅ и Р+ПСХМ₁₀, получават орално различни дози ПСХМ. Животните от група Р+ПСХМ_{2.5} са третирани с ПСХМ в доза 2.5 ml/kg (разтворен с вода до общ обем 10 ml/kg), тези от Р+ПСХМ₅ - с ПСХМ в доза 5 ml/kg (разтворен с вода до общ обем 10 ml/kg), а група Р+ПСХМ₁₀ - с ПСХМ в доза 10 ml/kg. Животните от група Р и Контролата са третирани с дестилирана вода в обем 10 мл/кг.

Експерименталният протокол се провежда в рамките на 4 последователни дни.

Първи експериментален ден

Животните от групи Р, Р+ПСХМ_{2.5}, Р+ПСХМ₅ и Р+ПСХМ₁₀ са инжектирани с резерпин, а контролните животни - с 5% ДМСО. Непосредствено след инжектирането и на 19^{тия} час животните са третираны интрагастрално с ПСХМ или дестилирана вода.

Втори експериментален ден

На следващия ден, точно 23 часа след инжектирането, животните са третираны за трети път с ПСХМ или дестилирана вода. Един час след третирането е проведен тест открито поле. Един час след приключването му се състои тренировъчна сесия на тест принудително плуване.

Трети експериментален ден

Около 24 часа след последното третиране, животните получават за последно ПСХМ и дестилирана вода. Точно 1 ден след тренировъчната сесия на тест принудително плуване е проведена тестовата сесия.

Четвърти експериментален ден

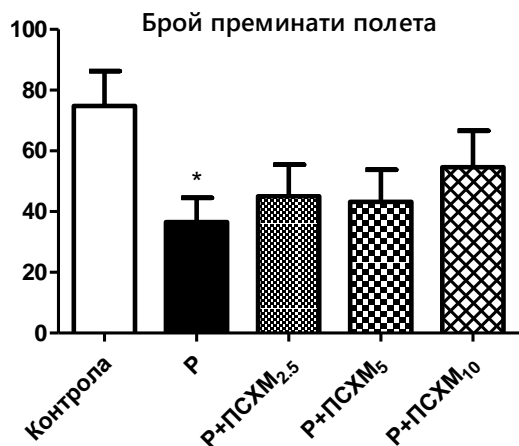
През последния експериментален ден всички животни са анестезирани и след умъртвяване е взета мозъчна тъкан за изследване. На получените резултати е направен еднофакторен ANOVA анализ, последван от Dunnett's Multiple Comparison Post Test. Две независими групи са сравнявани посредством Student's *t*-test.

2.1. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест открито поле

Хоризонтална активност

Резултатите от хоризонталната активност, измерена като брой преминати полета в откритото поле, са показани на Фигура 28. Преминатите полета за животните от група Контрола възлиза на 74.8 ± 11.5 . Приложението на резерпин води до статистически значимо понижение в хоризонталната активност (36.6 ± 8.0 ; $p < 0.05$ спрямо Контролата).

Приемът на ПСХМ частично антагонизира ефектите на резерпин върху двигателната активност, като група Р+ПСХМ₁₀ (56.6±12.0) показва най-близки резултати до тези на Контролата. Броят преминати полета за животните от група Р+ ПСХМ_{2.5} е 45.0±10.5, а за група Р+ПСХМ₅ е съответно 43.2±10.5. Нито една доза на ПСХМ не води до статистически значими промени в хоризонталната активност спрямо Контролата.

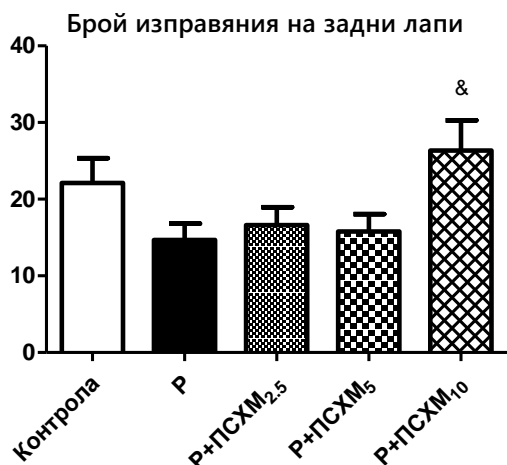


Фигура 28. Ефекти на ПСХМ в дози 2.5, 5 and 10 мл/кг и резерпин (Р) върху броя преминати полета (хоризонтална активност) и броя изправяния на задни лапи (вертикална активност) на плъхове в тест открито поле; * $p < 0.05$ спрямо Контрола

Вертикална активност

Установява се намалена вертикална активност за животните от група Р (14.7±2.1) спрямо Контролата (22.1±3.2), но този ефект не постига статистически значима разлика. Третирането с ниските и средни дози на ПСХМ води до резултати, които са сходни до тези за група Р (Фигура 29).

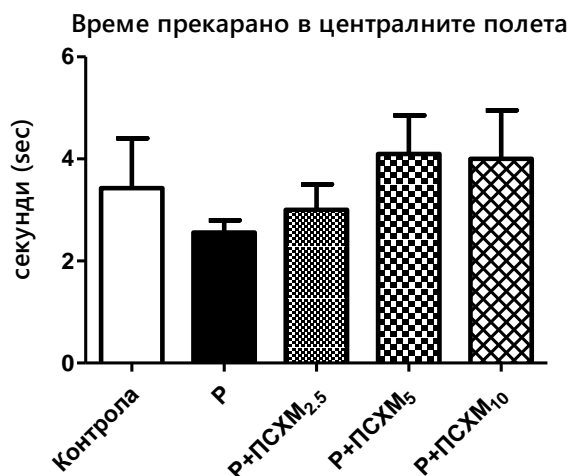
Резултатите, които се отчитат, са съответно 16.6±2.3 за животните принадлежащи към група Р+ПСХМ_{2.5} и 15.8±2.3 за тези от група Р+ПСХМ₅. Най-високата доза на ПСХМ (10мл/кг) води до статистически значимо повишаване на вертикалната активност спрямо група Р (26.3±4.0; $p < 0.05$ спрямо група Р).



Фигура 29. Ефекти на ПСХМ в дози 2.5, 5 and 10 мл/кг и резерпин (P) върху броя преминати полета (хоризонтална активност) и броя изправяния на задни лапи (вертикална активност) на плъхове в тест открито поле; &p<0.05 спрямо група P

Време, прекарано в централните полета

Приложението на резерпин води до понижаване на времето, прекарано в централните полета на теста (2.6 ± 0.2 sec), но този ефект не е статистически достоверен при сравнение с Контролата (3.4 ± 1.0 sec). При животните от група P+ПСХМ_{2.5} се отчитат близки резултати до тези на група P (3.0 ± 0.5 sec). За животните от група P+ПСХМ₅ се установява най-дълго време, прекарано в централната част на откритото поле (4.1 ± 0.8 sec), но този резултат не е статистически значим спрямо група P, което е представено на Фигура 30. Резултатите на животните от група P+ПСХМ₁₀ (4.0 ± 1.0 sec) са сходни до тези на животните третираните с ПСХМ в доза 5 мл/кг и статистически незначими при сравнение с група P. Наблюдава се обаче тенденция по-високите дози на ПСХМ да повлияват изразено активността на животните в централните полета на теста спрямо третираните с резерпин.

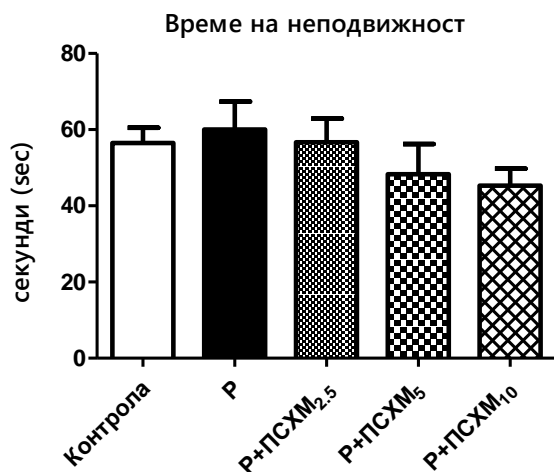


Фигура 30. Ефекти на ПСХМ в дози 2.5, 5 and 10 мл/кг и резерпин (P) върху времето прекарано в централните полета на плъхове в тест открито поле

2.2. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест принудително плуване

В тест принудително плуване времето на неподвижност за група P (60.0 ± 7.4 sec) не се различава статистически значимо от времето, проследено за Контролата (56.5 ± 4.0 sec). Приложението на ПСХМ в различни дози предизвиква тенденция на намаляване неподвижността на плъхове с нарастване на дозата. Резултатите за животните, третирани с ПСХМ, са както следва 56.7 ± 6.2 sec за група P+ПСХМ_{2.5}, 48.3 ± 7.9 sec за група P+ПСХМ₅ и 45.3 ± 4.4 sec за животните от група P+ПСХМ₁₀, съответно.

Времето на неподвижност за група P+ПСХМ₁₀ достига стойности по-ниски дори от тези на контролната група, но без да се наблюдава статистическа разлика спрямо Контролата или резерпиновата група (Фигура 31).



Фигура 31. Ефекти на ПСХМ в дози 2.5, 5 and 10 мл/кг и резертин (P) върху времето на неподвижност на плъхове в тест принудително плуване

2.3. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху реагиращи с тиобарбитуровата киселина субстанции в мозък

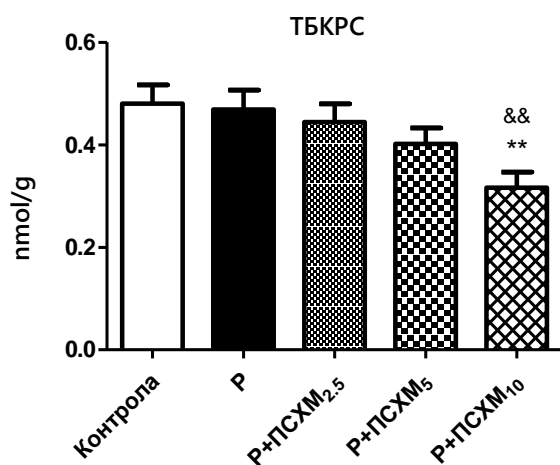
Реагиращи с тиобарбитуровата киселина субстанции в мозъка (ТБКРС) представлява метод, който измерва спектрофотометрично цвета, получаващ се при реакция на тиобарбитуровата киселина (ТБК) с липидни пероксиди. Методът е описан от екипа на Ohkawa et al. (Ohkawa, Ohishi & Yagi 1979). За целта един грам от мозъчен хомогенат е смесен с 5 ml ледено студен TRIS/HCL буфер и е центрофугиран с 2000 грт при температура 4°C за 10 минути. Полученият супернатант е използван за биохимично изследване. При тази реакция, проведена в кисела среда, рН= 7.4, се образуват розови на цвят продукти, които могат да бъдат детектирани при 532 nm (Aurius 2021 UV-VIS spectrophotometer, Cecil Instruments Ltd, UK).

Концентрациите на ТБКРС са измервани в pmol/g в мозък. Образоването на малонов диалдехид се използва като стандарт. Това е главният реактивен алдехид, който се асоциира с оксидативен стрес във физиологичните системи (Del Rio, Stewart & Pellegrini 2005). Получените резултати са представени в Таблица 6 и Фигура 32.

Таблица 6. Нива на ТБКРС (nmol/g) в мозък на плъхове, третирани с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 ml/kg след инжектиране на резерпин (P)

Група	Контрола	Резерпин	P+ПСХМ _{2.5}	P+ПСХМ ₅	P+ПСХМ ₁₀
Показател					
ТБКРС (nmol/g)	0.48±0.04	0.47±0.04	0.44±0.04	0.4±0.03	0.32±0.03

ANOVA анализът на резултатите показва, че нивата на ТБКРС в мозъка на животните от група P и на тези от контролната група са много близки. Концентрациите на ТБКРС в мозъците на плъхове, третирани с ПСХМ, също са близки до тези на Контролата, но само за групи ПСХМ_{2.5} и ПСХМ₅. При животните от група ПСХМ₁₀ се наблюдава значимо понижение в нивата на ТБКРС спрямо Контролата и резерпиновата група ($p < 0.01$), както е представено на Фигура 32. Може да се отчете тенденция за намаляване нивата на ТБКРС с повишаване дозата на ПСХМ. За група ПСХМ_{2.5} се установяват най-близки стойности (0.44 ± 0.04) до тези на резерпиновата група (0.47 ± 0.04).



Фигура 32. Ефекти на ПСХМ в дози 2.5, 5 and 10 ml/kg и резерпин (P) върху нивата на реагиращи с тиобарбитурова киселина субстанции (ТБКРС) в мозък на плъхове; ** $p < 0.01$ спрямо Контрола, && $p < 0.01$ спрямо група P

2.4. Обсъждане на ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху резерпин-индуцирана хипокинезия в плъхове

Резерпин е добре познато лекарство, използвано в миналото за лечението на хипертония. Скоро след въвеждането му в клиничната практика се установяват нежелани ефекти, включващи депресия и поведенчески промени. Биохимичната основа лежаща зад тях показва намалени нива на норадреналин, допамин и 5-хидрокситриптамин, вследствие изпразване на везикулите им. Този ефект е особено изразен първите 24 до 48 часа след приложението на резерпин и може да продължи над 7 дни (Pirch et al., 1967). Наблюдаваните клинични промени се изразяват в нарушена моторна функция (хипокинезия, тремор и мускулна ригидност), нарушена температурна регулация (хипотермия) и намален апетит (Calderon et al., 2011; Nammi et al., 2005). Тези прояви са много близки до симптомите на депресия при човека и дават основание за въвеждането на резерпин-индуциран модел при животни, като множество проучвания доказват неговата валидност (Minor and Hanff, 2015).

С резерпин-индуцираната хипокинезия се потвърждава и моноаминната хипотеза за невробиологичния произход на депресията (Elhwuegi, 2004). Ефектите на резерпин могат да се разглеждат и като Паркинсон-подобни с намалена двигателна активност. Болестта на Паркинсон и депресията споделят общи патогенетични механизми като намалени нива на моноамини и най-вече на допамин и норадреналин (Chaudhury et al., 2013).

Приложението на резерпин води до намаляване броя преминати полета в тест открито поле и този ефект постига статистическа достоверност при сравнение с Контролата. Нито една доза на ПСХМ не повишава хоризонталната активност на животните със статистическа достоверност спрямо група Резерпин. При животните, третирани с резерпин, не се наблюдава намаляване в броя изправяния на задни лапи, което да постига статистическа значимост спрямо Контролата. Броят на изправянията на задни лапи е статистически достоверно завишен при животните, третирани с ПСХМ в доза 10 мл/кг спрямо група Резерпин. Отчетената вертикална активност е по-висока дори от тази за Контролата.

Наблюдаваното възстановяване в двигателната активност на животните може да се дължи на блокиране активността на MAO и по този начин противопоставяне на резерпин-индуцираното намаляване в нивата на моноаминни медиатори. Възможно е възстановяването на двигателната

активност при приложението на ПСХМ₁₀ да се дължи и на повишаване нивата на допамин. Такъв механизъм е описан от екипа на Zhao (Zhao et al., 2008) за вида *Chaenomeles speciosa* и се осъществява чрез блокиране обратното поемане на допамин. С инхибиране на допаминовия транспортер в substantia nigra се избягва лекарство-индуцирана дискинезия, а в мезолимбичната система - се антагонизира състояние на ахедония (Willner et al., 2005). Блокери на допаминовото обратно поемане, както и агонисти на рецепторите за допамин водят до повишена двигателна активност в опитни животни (Schindler and Carmona, 2002). Тези данни са в съответствие с наблюдаваните ефекти на ПСХМ върху двигателната активност на плъхове в доза 10 мл/кг.

В тест открито поле приложението на резерпин не води до статистически значими промени във времето, прекарано в централните полета, спрямо Контролата. Времето, прекарано в централните полета, не се променя статистически достоверно при приложението на която и да е доза ПСХМ.

За оценка на депресивно-подобното поведение е измерено времето на неподвижност в тест за принудително плуване. Приложението на резерпин не предизвиква значимо повишаване на времето на неподвижност в тест за принудително плуване. С повишаване дозата на ПСХМ се забелязва плавно намаляване на време на неподвижност, без този ефект да постига статистическа значимост спрямо група Резерпин. Възможно е еднократното приложение на резерпин да не повлиява достатъчно ефективно нивата на моноамини или продължителността на третиране да е недостатъчна, понеже развитието на депресия изисква време. Има данни, че поне 2-седмичен период на приложение на резерпин е необходим за развитието на депресивно-подобно поведение (Ikram and Haleem, 2017).

Резерпинът дължи депресивно-подобните си ефекти на блокиране везикуларния моноаминен транспортер, който спомага по-бързото инактивиране на моноаминните медиатори от ензими като MAO и КОМТ. При блокиране на допаминовия везикуларен транспортер може да се наблюдава формиране на допаминови хинони и хидроген пероксиди, което се дължи на окисление на допамина от MAO (Bilska et al., 2007). Тези радикали могат да се натрупват в базалните ганглии в следствие на ускорен допаминов метаболизъм и да участват в развитието на дегенеративни процеси (Fuentes et al., 2007).

Острото приложение на резерпин в настоящия експеримент не води до статистически значими промени в нивата на оксидативен стрес, измерени чрез ТБКРС, спрямо Контролата. Възможно е еднократното приложение на резерпин да не води до ефективно изчерпване на депата на медиатори и последващо натрупване на кислородни радикали. Наблюдава се намаляване в нивата на ТБКРС при приложението на ПСХМ в доза 10 мл/кг, като този ефект постига достоверност както спрямо група Резерпин, така и спрямо Контролата. Може да се отчете тенденция с повишаване дозата на ПСХМ да намаляват нивата на оксидативен стрес в мозъка на плъхове.

Получените резултати са в съответствие с тези от поведенческите тестове, при които ПСХМ₁₀ води до най-изявено антагонизиране на резерпин-индуцираната хипокинезия. Ефектите на ПСХМ₁₀ върху двигателната активност може да се обяснят с вероятния инхибиторен ефект на полифенолите в състава му върху активността на допаминовия транспортер за обратно връщане (Zhao et al., 2008). Възможно е при инхибирането обратното връщане на допамин да намаляват нивата му в пресинаптичното окончание и съответно да намалява окислението му от MAO до реактивни радикали. Възможно е този механизъм да лежи в основата на намалените нива на ТБКРС след приложението на ПСХМ₁₀.

В подкрепа на това твърдение, екипът на Valcheva-Kuzmanova et al. (Valcheva-Kuzmanova et al., 2018) изследват състава на ПСХМ и установяват високо съдържание на полифеноли в него. При сравнение на ПСХМ с плодов сок от *Aronia melanocarpa* се установява значително по-висок антиоксидантен потенциал за ПСХМ *in vitro* (Valcheva-Kuzmanova et al., 2018). Антиоксидантната му активност пряко корелира с високото съдържание на полифеноли и витамин С. Възможно е с нарастване дозата на ПСХМ да се повишава и способността му да улавя свободни радикали, което е в пряка връзка с нарастване концентрацията на полифеноли и витамин С (Miao et al., 2018).

В този модел на резерпин-индуцирана хипокинезия, най-високата доза на ПСХМ я антагонизира. Еднократното приложение на резерпин не води до оксидативен стрес, но най-високата доза на ПСХМ демонстрира свойството да предотвратява образуването на кислородни радикали, благодарение на което може да се очакват невропротективни свойства.

3. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху поведението при плъхове, подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм (НДР)

За целите на този експеримент, 50 мъжки плъха от порода Wistar са разпределени в пет групи, всяка състояща се от по 10 животни. Групите са съответно: Контрола, НДР, НДР+ПСХМ_{2.5}, НДР+ПСХМ₅ и НДР+ПСХМ₁₀.

Третирането на животните се осъществява по следния начин:

- Животните от групи Контрола и НДР са третирани еднократно дневно с вода (10 мл/кг) чрез орогастрална сонда;
- Животните от група НДР+ПСХМ_{2.5} получават 2.5 мл/кг ПСХМ, разреден с дестилирана вода до 10 мл/кг еднократно дневно;
- Животните от група НДР+ПСХМ₅ са третирани еднократно дневно с ПСХМ в доза 5 мл/кг, разреден с дестилирана вода до 10 мл/кг;
- На животните от група НДР+ПСХМ₁₀ е прилаган ПСХМ в доза 10 мл/кг еднократно дневно.

Периодът на третиране е 14 дни, през които животните от групи НДР, НДР+ПСХМ_{2.5}, НДР+ПСХМ₅ и НДР+ПСХМ₁₀ са подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм чрез непрекъснато осветяване. Животните от Контролата са с нормален режим на осветяване през продължителността на опита. На 15-тия ден от началото на експеримента е проведен тест открито поле, а 24 часа след него - тест за социално взаимодействие. Последващите два дни са отделени за тренировъчна и експериментална сесия на тест принудително плуване, отделени една от друга от 24 часа. На получените резултати е направен еднофакторен ANOVA анализ, последван от Dunnett's Multiple Comparison Post Test. Две независими групи са сравнявани посредством Student's *t*-test.

3.1. Ефект на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест открито поле

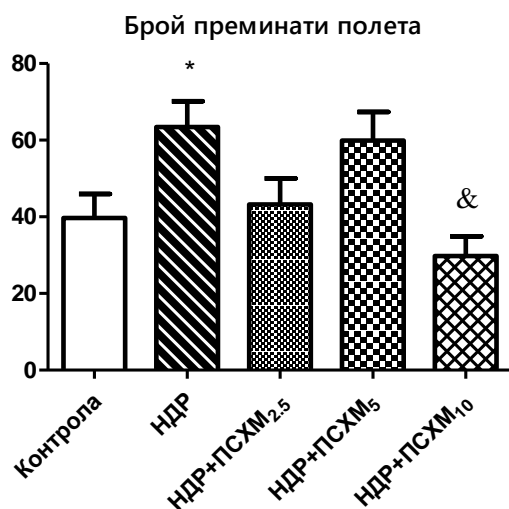
В тест открито поле са проследени показателите за двигателна активност - брой преминати полета и брой изправяния на задни лапи. Резултатите са представени в Таблица 7, Фигура 33 и Фигура 34.

Таблица 7. Проследени показатели в тест открито поле след 14-дневно третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг при пльхове с нарушен денонощен режим (НДР); * $p < 0.05$ спрямо Контролата; & $p < 0.05$ спрямо НДР

Група / Показател	Контрола	НДР	НДР+ПСХМ _{2.5}	НДР+ПСХМ ₅	НДР+ПСХМ ₁₀
Брой преминати полета	39.7±6.2	63.4±6.8*	43.2±6.8	59.9±7.5	29.8±5.2&
Брой повдигания на задни лапи	12.9±1.9	22.4±2.3*	18.3±2.1	17.5±2.4	14.3±2.2&

Хоризонтална активност

Броят хоризонтални движения в група НДР показва почти двойно завишаване спрямо резултатите, получени за контролните животни (39.7±6.2). Този ефект достига статистическа достоверност ($p < 0.05$) спрямо Контролата. С повишаване дозата на ПСХМ, се установява, че ниските (43.2±6.8) и средни дози (59.9±7.5) на плодовия сок водят до слабо повишаване на хоризонталната активност спрямо контролната група, без да постигат стойностите на група НДР.



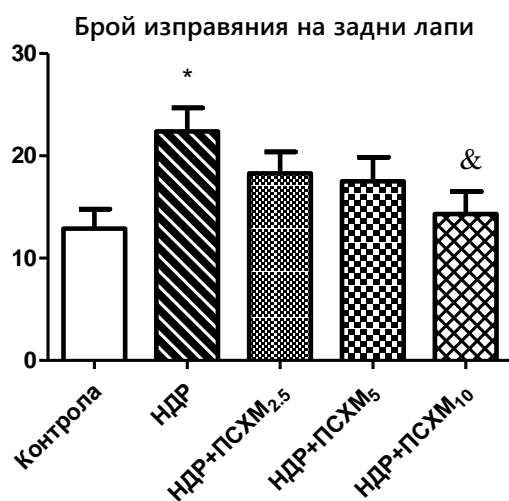
Фигура 33. Ефекти на ПСХМ в дози 2.5, 5 and 10 мл/кг върху броя преминати полета (хоризонтална активност) на пльхове с нарушен денонощен режим (НДР) в тест открито поле; * $p < 0.05$ спрямо Контрола; & $p < 0.05$ спрямо НДР

Приложението на ПСХМ₁₀ редуцира статистически значимо броя на хоризонталните движения спрямо група НДР ($p < 0.05$). Намален е броят им също

така спрямо Контролата, но без да се наблюдава достоверност в този ефект (Фигура 33).

Вертикална активност

При оценка на вертикалната активност на животни, подложени на нарушен денонощен ритъм, се наблюдават резултати съответстващи на тези за хоризонталните движения. В група НДР се отчита повишена вертикална активност (22.4 ± 2.3), достигаща статистическа разлика спрямо Контролата ($p < 0.05$). В групите, третирани с ПСХМ, се наблюдава намаляване на броя вертикални движения с повишаване дозата на ПСХМ, отразено на Фигура 34. При животните от група НДР+ПСХМ₁₀ се отчита най-ниска стойност за вертикална активност (14.3 ± 2.2), която постига статистическа достоверност спрямо група НДР ($p < 0.05$). Стойностите за НДР+ПСХМ₁₀ са близки до тези на Контролата (12.9 ± 1.9).

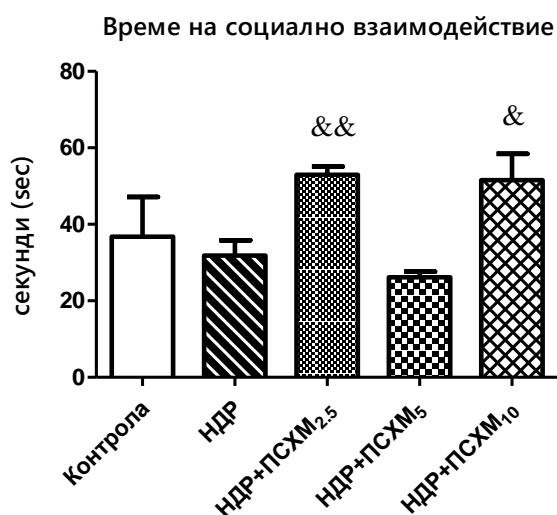


Фигура 34. Ефекти на ПСХМ в дози 2.5, 5 and 10 мл/кг върху броя изправяния на задни лапи (вертикална активност) на плъхове с нарушен денонощен режим (НДР) в тест открито поле; * $p < 0.05$ спрямо Контрола; & $p < 0.05$ спрямо НДР

3.2. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест за социално взаимодействие

Тестът за социално взаимодействие между 2 животни от различни групи се провежда на 15^{тия} ден от началото на третирането. В този тест се наблюдава слабо скъсяване на времето на взаимодействие между тестовите партньори, дължащо се на нарушения денонощен ритъм (31.8 ± 4.04 sec), но без да се отчита статистическа достоверност на този резултат спрямо Контролата (Фигура 35).

Третирането с ПСХМ в най-ниската и най-висока доза води до статистически достоверно повишаване във времето на социален контакт. За група НДР+ПСХМ_{2.5} резултатите са 52.9 ± 2.1 sec ($p < 0.01$ спрямо Контролата), докато за група НДР+ПСХМ₁₀ са 51.6 ± 6.8 sec ($p < 0.05$ спрямо Контролата). За животните от контролната група и група НДР+ПСХМ₅ са отчетени съответно 36.8 ± 10.3 и 26.1 ± 1.5 sec време на социално взаимодействие.

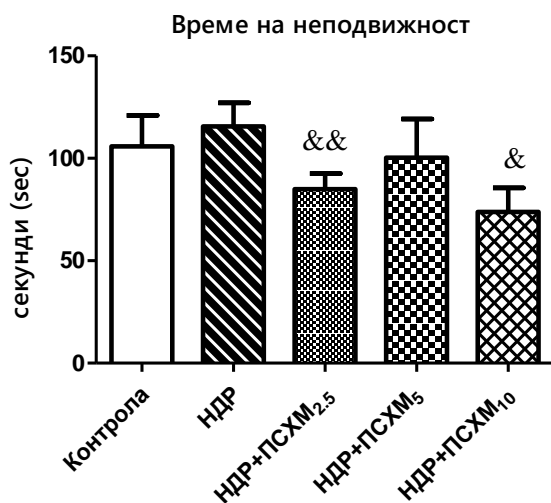


Фигура 35. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху времето на социално взаимодействие при плъхове с нарушен денонощен ритъм (НДР); &<0.05 спрямо група НДР; &&<0.01 спрямо група НДР

3.3. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест принудително плуване

Тест принудително плуване се провежда на 16^{тия} и 17^{тия} ден от началото на третирането и е обособен в тренировъчна и експериментална сесия с разлика 24 часа една от друга. Животните от контролната група и от група НДР постигат близки времена на неподвижност като резултатите за НДР са завишени, но без да постигат статистическа значимост и са съответно 105.8 ± 15.1 за Контролата и 115.6 ± 11.4 sec за група НДР.

Сходни резултати се отчитат и за животните от група НДР+ПСХМ₅ - 100.3 ± 18.9 sec (Фигура 36). В групите НДР+ПСХМ_{2.5} и НДР+ПСХМ₁₀ се наблюдава статистически значимо намаляване на времето на неподвижност, като за НДР+ПСХМ_{2.5} резултатите са 84.9 ± 7.7 sec ($p < 0.01$ спрямо Контролата), а за НДР+ПСХМ₁₀ са 73.8 ± 11.7 sec ($p < 0.05$ спрямо Контролата).



Фигура 36. Ефект на ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг върху времето на неподвижност при плъхове с нарушен денонощен ритъм (НДР) в тест принудително плуване; &<0.05 спрямо група НДР; &&<0.01 спрямо група НДР

3.4. Обсъждане на ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху поведението при плъхове, подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм (НДР)

Епифизата е главният източник на мелатонин в организма и неговата ритмична секреция модулира множество физиологични функции (Reiter et al., 2014). Излагането на светлина през нощта потиска освобождаването на мелатонин, с което се губят синхронизиращите му ефекти върху периферните клетки. Светлината е изключително важен абиотичен фактор на околната среда, който влияе на поведението и физиологията на лабораторни животни, както и на хората (Danilenko et al., 2011). Плъховете са активни през нощта и добре се приспособяват на слаба осветеност. Продължителното излагане на животни на ярка светлина води до потискане на денонощния ритъм, приема на храна и вода, кръвното налягане и телесната температура, чиято регулация се осъществява в хипоталамуса (Gorwood, 2007; Stephan and Zucker, 1972). Константното наличие на светлина повишава нивата на кортизол в мъжки и женски животни и се използва като модел на хроничен стрес (Prendergast and Kay, 2008). Нарушенията на денонощния ритъм в експериментални животни водят също така до депресивно-подобна симптоматика, тревожност и ахедония (Tapia-Osorio et al., 2013).

При пациентите, диагностицирани с депресия, се откриват флукутиращи депресивни симптоми, засягащи главно съня, настроението, телесната температура и секрецията на хормони. При тези пациенти циркадианните цикли обикновено са с променен порядък, намалени са по продължителност или несинхронизирани едни с други (Tchekalarova et al., 2018), което се свързва с променена секреция и на други хормони освен мелатонин. Наблюдават се още изменения в нивата на кортизол, като промени в нивата на мелатонин и кортизол се свързват със симптоматичната природа на афективни заболявания, включително депресия и тревожност (Monteleone et al., 2011).

Примамлива особеност на режима с постоянна осветеност като модел на хроничен лек стрес е, че води до съвкупност от поведенчески и физиологични промени. Такъв е например намаленият отговор към стимули, носещи удоволствие, който кореспондира с главния симптом на депресия - ахедонията (Willner, 2016). Наблюдават се още сексуални промени и агресия, намаляване на теглото, изменения в двигателната активност. В животински модели на хроничен лек стрес често описвано в литературата е развитието на тревожно-подобно

поведение (Papp et al., 2016; Wang et al., 2014). Животните подложени на хроничен лек стрес, се повлияват добре от продължителното приложение на субстанции и процедури, които имат антидепресивна ефективност (Papp et al., 2017).

Резултатите от тест открито поле потвърждават наличието на промени в двигателната активност на опитни животни вследствие на непрекъсната осветеност. Животните, подложени на нарушен денонощен ритъм показват повишаване на броя преминати полета в тест открито поле, което е статистически значимо спрямо Контролата. При животните, третирани с ПСХМ в доза 10 мл/кг се отчита намаляване на хоризонталната активност, като този ефект е статистически достоверен спрямо група НДР. Броят изправяния на задни лапи също е значимо повишен за група НДР спрямо Контролата. ПСХМ в доза 10 мл/кг понижава вертикалната активност, като този ефект има статистическа достоверност спрямо група НДР и отчетените стойности са почти идентични с тези на контролната група. Може да се предположи, че най-високата доза на ПСХМ проявява анксиолитично-подобен ефект чрез антагонизиране на стрес-индуцираната хиперкинезия в тест открито поле. Възможно е повишената двигателна активност на животните от група НДР да се дължи на повишените нива на стрес хормони като кортизол, което да обясни тревожно-подобното им поведение. Най-високата доза на ПСХМ намалява двигателната активност, което може да се дължи на намаляване на тревожно-подобното поведение в модел на стрес. ПСХМ в доза 10мл/кг показва анксиолитично-подобен ефекти и в тест повдигнат кръстосан лабиринт при здрави животни.

За допълнителна оценка на тревожно-подобното поведение, животните са изследвани в тест за социално взаимодействие. В този тест, нарушеният денонощен режим не променя със статистическа значимост времето за социално взаимодействие спрямо Контролата. Приложението на ПСХМ в дози 2.5 и 10 мл/кг води до статистически достоверно повишаване на социалното взаимодействие при сравнение с група НДР. Повишено време на социална активност се свързва с анксиолитично-подобен ефект, който се отчита при приложението на ПСХМ в дози 2.5 и 10 мл/кг.

Наличието на стрес е един от основните фактори за развитието на психиатрични разстройства и води до стимулиране освобождаването на адренокортикотропен хормон от хипофизата (Sapolsky, 2000). Високи нива на стрес предизвикват невронална атрофия на хипокампа, която допринася за някои

от молекулните промени, наблюдавани при депресия и тревожност (Sheline et al., 1996). Проявите на тревожно-подобно поведение могат да се наблюдават при наличието на остър стрес. Литературните данни показват, че краткосрочно излагане на животни, до 2 седмици, на нарушен денонощен ритъм значително повишава нивата на кортикостерон и активира моноаминната система (Van der Meer et al., 2004). Повишените им нива се свързват с поведение за справяне със стреса и хиперреактивност (Belda et al., 2015).

Възможно е повишената двигателна активност на животните от група НДР да се обясни именно с повишените нива на моноамини и активация на НРА оста. В същото време, приложението на ПСХМ антагонизира повишената двигателна активност и проявява анксиолитично-подобен ефект. Може да се приеме, че при наличието на стрес, полифенолите от ПСХМ потискат главно активността на НРА оста. Такъв ефект е описан в литературата за полифеноли от зелен чай. Счита се, че приложението му води до потискане хиперактивност на хипоталамус-хипофизарната ос и намаляване нивата на адреноркортикотропен хормон. Този ефект не се наблюдава при нормални физиологични нива на адреноркортикотропния хормон, а само при повишени такива. (Zhu et al., 2012).

Константното излагане на светлина води до депресивно-подобно поведение и завишена реакция към стрес, изразяваща се в тревожност (Fonken et al., 2009). В тест за принудително плуване, времето на неподвижност е слабо повишено при животните от група НДР без да се постига статистическа значимост спрямо контролните животни. ПСХМ в дози 2.5 мл/кг и 10 мл/кг статистически значимо понижават този показател на теста, като в доза 2.5 мл/кг ефектът е най-изявен спрямо група НДР. В тест открито поле, тези дози на ПСХМ се свързват с понижени показатели на двигателна активност. Съчетанието на резултатите от двата теста, дават основание да се предположи, че при наличието на слаб стрес, ПСХМ в дози 2.5 и 10 мл/кг проявява антидепресивно-подобен ефект.

Развитието на депресивно-подобно поведение изисква излагане на хроничен стрес с продължителност поне 4 седмици. За този период на време се развиват типичните биохимични и поведенчески показатели на депресивно поведение при животните. Установено е, че хроничният стрес води до намалена двигателна активност в тест открито поле, която се дължи на намалени нива на допамин и серотонин в кортекса и хипокампа (Janakiraman et al., 2016). Тъй като излагането на животни на нарушен денонощен ритъм не води до депресивно-

подобен ефект, можем да приемем, че 14-дневното наличие на константна светлина не е достатъчно за развитието на депресия. Приложението на ПСХМ обаче показва потенциал да предпазва от стрес-индуцирани поведенчески промени. Намаленото време на неподвижност в тест за принудително плуване може да се обясни с полифенолите от състава на ПСХМ.

Приложението на флавоноида кверцетин в модел на хроничен лек стрес води до намаляване повишената двигателна активност и намаляване времето на неподвижност в тест за принудително плуване. Кверцетин се открива в ПСХМ и е възможно на неговата фармакологична активност да се дължат анксиолитично-подобните и антидепресивно-подобни ефекти на ПСХМ. Механизмите на действие на кверцетин се свързват с възстановяване на някои биохимични показатели като оксидативен стрес, MAO-A активността и нивата на серотонин в мозъка на животни (Singh et al., 2019).

Кверцетин също така има свойството да предпазва организма от развитието на възпалителни промени и оксидативен стрес, свързани със стрес-индуцирана депресия (Şahin et al., 2020). Приложението на кверцетин намалява нивата на глутамат, TNF α и IL-6, които се повишават при наличието на хроничен лек стрес. Кверцетин повишава и продукцията на антиоксидантни ензими в организма и нивата на серотонин (Khan et al., 2019). Възможно е комбинацията от антиоксидантни, противовъзпалителни и модулиращи моноамините свойства да е отговорна за наблюдаваните анксиолитично-подобен и антидепресивно-подобен ефект на различните дози ПСХМ.

V. ОБОБЩЕНА ДИСКУСИЯ

Плодовият сок от *Chaenomeles maulei* е богат източник на полифеноли, от които главно флавоноиди и фенолни киселини. Фенолните компоненти са едни от най-широко проучваните биологично активни вещества заради свойството им да повлияват различни заболявания, сред които и такива на ЦНС (Kam et al., 2012). От фенолните киселини най-застъпени в плодовия сок са ванилова, кафеена, хлорогенова и ферулова киселина.

Фенолните киселини, влизащи в състава на ПСХМ притежават потенциал на невропротективни агенти в модел на болест на Алцхаймер (Amin et al., 2017), приложението им се свързва с изразени антимикробни, аналгетични, противовъзпалителни и антиоксидантни свойства (Calixto-Campos et al., 2015; Delaquis et al., 2005; Tai et al., 2012).

Плодовият сок от *Chaenomeles maulei* демонстрира психофармакологични ефекти, както при млади/здрави животни, така и в експериментални модели. Много от наблюдаваните резултати са свързани с промени в поведението, които се дължат на психомоторна активация. Тя се проявява като подобрена двигателна активност след 14- и 30-дневно приложение на ПСХМ в здрави животни. Би могла да бъде обяснена с някои литературни данни, които демонстрират, че видове от род *Chaenomeles* могат да повишават допаминергичната невротрансмисия (Zhao et al., 2008). Тъй като локомоцията се повишава при всички дози на ПСХМ след 30-дневно приложение, може да се направи сравнение с механизма на действие на психостимуланти. Последните модулират моноаминергичната система. Вследствие на това, при употребата на психостимуланти се отчита повишаване нивата на допамин и се наблюдава завишена локомоция (Dobbs et al., 2016). Възможно е хлорогеновата киселина и нейният главен метаболит, кафеената киселина, които се детектират в ПСХМ, да са отговорни за наблюдаваната психостимулация. Има данни, които посочват, че приложението на хлорогенова киселина води до психомоторна стимулация. По-изразена такава се наблюдава при приложението на кафеена киселина (Ohnishi et al., 2006). Медицинската полза от подобреното на моторната функция би била в лечението на бради- и хипокинезията при болест на Паркинсон.

Приложението на ПСХМ в дози 2.5 и 10 мл/кг се съпровожда с анксиолитично-подобен ефект. Възможна причина за този ефект на ПСХМ е високото съдържание на полифеноли в състава му. От тях вероятни носители на

фармакологична активност са фенолните киселини и флавоноидите. Хлорогеновата киселина демонстрира анксиолитичен ефект, който се дължи на стимулиране на бензодиазепинови рецептори. Знае се, че влиянието ѝ върху тревожността не е свързано с антиоксидантния ѝ потенциал, а анксиолитично-подобния ѝ ефект е измерим с този на стандарт като Diazepam (Heitman and Ingram, 2017). Флавоноидите епигалокатехин и кверцетин също демонстрират анксиолитично-подобни свойства, които се дължат на взаимодействие с ГАМК_A-рецепторите (Grundmann et al., 2008; Vignes et al., 2006).

Субхроничното приложение на ПСХМ в нито една доза не води до седативни ефекти, нито повлиява паметта на животните. Възможно е чрез селективно стимулиране на моноаминергичната трансмисия, полифенолите от ПСХМ да повишават двигателната активност на животните без да повлияват паметта, което би допринесло за терапията на невродегенеративни заболявания като болест на Паркинсон.

При приложение на ПСХМ в доза 10 мл/кг се установява антидепресивно-подобен ефект, който се проявява в по-краткосрочния период на третиране. Възможно е наблюдаваният антидепресивно-подобен ефект да се обясни с присъствието на полифеноли във високи концентрации в ПСХМ. Полифенолите имат способността да инхибират активността на глиалната MAO, което се свързва с намалено ензимно разграждане на серотонин и повишеното му освобождаване (Mazzio et al., 1998). Един от флавоноидите, които се откриват във висока концентрация в ПСХМ, е катехин. Установено е, че третирането с катехин подобрява депресивно-подобното и тревожно-подобното поведение в плъхове. Приложението му води до модулация на моноаминната система и се изразява в намалено време на неподвижност в тест принудително плуване (Lee et al., 2013). Възможно е антидепресивно-подобният ефект на ПСХМ да се дължи частично и на повишаване нивата на допамин. Чрез завишаване нивата на серотонин и допамин действат някои антидепресанти (Lee et al., 2017). При тяхното приложение се отчита въздействие върху депресивно-подобното поведение на животни, подобно на наблюдаваното с приложението на ПСХМ.

Резултатите от субхроничното приложение на ПСХМ във всяка негова доза върху здрави животни показват чернодробна и бъбречна безопасност. Показателите за чернодробна функция са близки до контролните, като нивата на AST дори са значимо понижени, което може да се дължи на БАВ, откриващи се в ПСХМ. Понижаването на нивата на трансаминазите се разглежда като

потенциал за хепатопротективно действие Полифеноли от ПСХМ, намалявайки нивата на AST проявяват хепатопротективен потенциал, който може да се дължи на антиоксидантните и противовъзпалителни им свойства. Установено е, че консумацията кафе с виска концентрация на хлорогенова киселина намалява развитието на неалкохолна чернодробна стеатоза в плъхове (Panchal et al., 2012). Консумацията на кафе се свързва с намалени нива на чернодробни ензими, което може да се дължи на наличието на полифеноли в него (Ikeda et al., 2010). Индексите за бъбречна функция не търпят особено промени без значение от дозата на ПСХМ или периода на приложение, което предполага липсата на токсичност. Тези резултати показват, че използваните дози на ПСХМ са напълно безопасни и не компрометират бъбречната функция. В подкрепа на това съществуват данни, които доказват наличието на нефропротективен ефект на екстракт от *Chaenomeles sinensis* в мишки с хиперурикемия (Zhang et al., 2018). Има данни, че приложението на хлорогенова киселина намалява нивата на серумен креатинин и урея, потиска оксидативния стрес, възпалението, апоптозата и стимулира бъбречната регенерация (Al-Megrin et al., 2020; Domitrović et al., 2014).

В животни с резерпин-индуцирана хипокинезия се наблюдава антагонизиране ефектите на резерпин след приложението на ПСХМ. Наблюдаваното възстановяване в двигателната активност на животните може да се дължи на блокиране активността на MAO и по този начин противопоставяне на резерпин-индуцираното намаляване в нивата на моноаминни медиатори. Възможно е възстановяването на двигателната активност при приложението на ПСХМ₁₀ да се дължи и на повишаване нивата на допамин. Такъв механизъм е описан от екипа на Zhao (Zhao et al., 2008) за вида *Chaenomeles speciosa* и се осъществява чрез блокиране обратното поемане на допамин. С инхибиране на допаминовия транспортер в substantia nigra се подобрява лекарство-индуцираната дискинезия, а в мезолимбичната система - се антагонизира състоянието на ахедония (Willner et al., 2005). Блокери на допаминовото обратно поемане, както и агонисти на рецепторите за допамин водят до повишена двигателна активност в опитни животни (Schindler and Carmona, 2002). Еднократното приложение на резерпин не води до депресивно-подобно поведение, понеже развитието на депресия изисква време. Има данни, че поне 2-седмичен период на приложение на резерпин е необходим за развитието на депресивно-подобно поведение (Ikram and Haleem, 2017). Острото приложение на резерпин не води до значими промени в нивата на оксидативен стрес, измерени чрез ТБКРС. Наблюдава се намаляване в нивата на ТБКРС при

приложението на ПСХМ в доза 10 мл/кг и може да се отчете тенденция с повишаване дозата на ПСХМ да намаляват нивата на оксидативен стрес в мозъка на плъхове. Възможно е с нарастване дозата на ПСХМ да се повишава и способността му да улавя свободни радикали, което е в пряка връзка с нарастване концентрацията на полифеноли и витамин С в състава му (Miao et al., 2018).

Приложението на ПСХМ в модел на нарушен денонощен светлинен ритъм позволява да се изследват неговите ефекти върху поведението на животни при наличието на стрес. Животните, подложени на нарушен денонощен ритъм показват повишаване на двигателната активност. Литературните данни показват, че краткосрочно излагане на животни, до 2 седмици, на нарушен денонощен ритъм значително повишава нивата на кортикостерон и активира моноаминната система (Van der Meer et al., 2004). Приложението на ПСХМ антагонизира повишената двигателна активност и проявява анксиолитично-подобен ефект. При наличието на константна светлина, ПСХМ в дози 2.5 и 10 мл/кг проявява антидепресивно-подобен ефект. Възможно е наблюдаваните ефекти на ПСХМ при наличието на стрес да се дължат на полифенолите от състава му. Кверцетин, който се открива в ПСХМ, проявява анксиолитично-подобни и антидепресивно-подобни ефекти. Механизмите на действие на кверцетин се свързват с възстановяване на някои биохимични показатели като оксидативен стрес, MAO-A активността и нивата на серотонин в мозъка на животни (Singh et al., 2019).

VI. ИЗВОДИ

1. Субхроничното приложение на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху млади/здрави плъхове:
 - Води до повишена двигателна активност в тест открито поле след 14- и 30-дневно приложение и анксиолитично-подобен ефект след 14-дневно приложение;
 - Не повлиява поведението в тест за социално взаимодействие;
 - Демонстрира анксиолитично-подобен ефект в тест повдигнат кръстосан лабиринт след 15-дневно третиране;
 - Няма значими ефекти върху паметта след 15- и 30-дневно третиране в тест за разпознаване на обект;
 - Проявява антидепресивно-подобен ефект в тест принудително плуване след 16-дневно приложение.
 - Проявява бъбречна и чернодробна безопасност, както и хепатопротективен потенциал, като понижава нивата на аспарат аминотрансфераза; не променя значимо нивата на аланин аминотрансфераза и алкална фосфатаза и не предизвиква изменения в показателите на бъбречна функция - креатинин и урея при 32-дневно приложение.
2. При плъхове с резерпин-индуцирана хипокинезия, плодовият сок от *Chaenomeles maulei* антагонизира резерпин-индуцираното понижаване на двигателната активност в тест открито поле и намалява нивата на оксидативен стрес в мозъка на животните;
3. При плъхове, подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм, третирането с ПСХМ води до антагонизиране на тревожно- и депресивно-подобните прояви, като:
 - Намалява стрес-индуцираното повишаване на двигателната активност в тест открито поле;
 - Проявява анксиолитично-подобен ефект в тест за социално взаимодействие;
 - Намалява депресивно-подобното поведение в тест принудително плуване

VII. ПРИНОСИ

1. За пръв път е установено, че субхроничното приложение на плодов сок от *Chaenomeles maulei* при млади/здрави плъхове:
 - Повишава общата двигателна активност;
 - Води до антидепресивно-подобен ефект;
 - Не предизвиква промени в паметта;
 - Демонстрира анксиолитичен потенциал;
 - Показва чернодробна и бъбречна безопасност.
2. За пръв път е установено, че плодовият сок от *Chaenomeles maulei* антагонизира резерпин-индуцирана хипокинезия при плъхове и понижава оксидативния стрес в мозъка.
3. За пръв път е изследван ефектът на плодов сок от *Chaenomeles maulei* при животни, подложени на нарушен светлинен денонощен ритъм, като е установено, че той:
 - понижава стрес-индуцираната хиперкинезия;
 - демонстрира антидепресивно-подобни и анксиолитично-подобни ефекти.
4. Направените проучвания с плодов сок от *Chaenomeles maulei* позволяват да се хвърли нова светлина върху ефектите на познати вещества и тяхната комбинация в състава на плодовия сок може да се използва за обогатяване на фармакологичните усилия в лечението на тревожно-депресивните и невродегенеративните заболявания.

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Списък на публикациите

1. **Борисова В**, Ефтимов М, Вълчева-Кузманова С. Изследване на поведението в тест открито поле на плъхове, третирани с плодов сок от *Chaenomeles maulei*. *Варненски медицински форум* 2017(6): 375-80
2. **Borisova V**, Eftimov M, Valcheva-Kuzmanova S. Assessment of *Chaenomeles maulei* fruit juice effects in tests for depression and anxiety. *Acta Medica Bulgarica*, Vol. XLVI, 2019: 34-9
3. **Borisova V**, Eftimov M, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of *Chaenomeles maulei* fruit juice on reserpine-induced behavioral changes in rats. *Folia Medica* 2019(61) No. 4: 579-83
4. **Borisova V**, Eftimov M, Valcheva-Kuzmanova S. Biochemical evaluation of liver and kidney function after subchronic administration of *Chaenomeles maulei* fruit juice in rats. *Bulgarian Chemical Communications* 2019(51), Special Issue A: 29-34 (IF₂₀₁₇: 0.238)

Списък на участията

1. **Borisova V**, Valcheva-Kuzmanova S. Review on Central nervous system effects and antioxidant activity of *Chaenomeles* species. Jubilee Conference “*Audacity and youth in pharmacology*”. Zigov Chark, October 7 to 9, 2016, At Zigov Chark, Bulgaria;
2. **Borisova V**, Eftimov M, Valcheva-Kuzmanova S. Assessment of *Chaenomeles maulei* fruit juice effects in the forced swim test in rats, 2nd International Conference in Pharmacology: From Cellular Processes to Drug Targets, Riga, Latvia, 19-20 October 2017, *Intrinsic Activity*: 5 (Suppl. 2);

3. **Борисова В**, Ефтимов М, Вълчева-Кузманова С. Изследване на поведението в тест открито поле на плъхове, третирани с плодов сок от *Chaenomeles maulei*, Шеста Научна Сесия „75 Години Медицински Колеж - Варна“ 17 и 18 ноември 2017 *Варненски медицински форум*, т. 6, 2017, прил. 2;
4. **Borisova V**, Eftimov M, Valcheva-Kuzmanova S. Antidepressant potential of *Chaenomeles maulei* fruit juice in reserpine-induced bradykinesia in rats, 22nd International Congress PHYTOPHARM 2018, 25-27 June, 2018, Horgen and Zhaw Wädenswil, Switzerland
5. **Борисова В**, Ефтимов М, Вълчева-Кузманова С. Анксиолитично-подобни ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест повдигнат кръстосан лабиринт, Сборник статии от Национална научна конференция „15 години фармация в Медицински университет - Пловдив“ СПА хотел „Орфей“ гр. Девин, 1 - 3 юни 2018. Стр. 93 - 98
6. **Borisova V**, Eftimov M, Valcheva-Kuzmanova S. Biochemical evaluation of liver and kidney function after subchronic administration of *Chaenomeles maulei* fruit juice in rats. 2nd International Conference on Bio-antioxidants, 07-10 September 2018, Varna, *Bulgarian Chemical Communications* 2019(51), Special Issue A: 29-34;
7. **Borisova V**, Eftimov M, Valcheva-Kuzmanova S. Behavioral effects of the subchronic *Chaenomeles maulei* fruit juice administration to healthy male rats. 2nd International Conference on Bio-antioxidants, 07-10 September 2018, Varna, *Bulgarian Chemical Communications* 2019(51), Special Issue A: 18-21