

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
КАТЕДРА „ФАРМАКОЛОГИЯ И КЛИНИЧНА ФАРМАКОЛОГИЯ“



МАГ. ФАРМ. ЛИЛИЯ ВЛАДИМИРОВА ВАСИЛЕВА

**ПРОУЧВАНЕ ЕФЕКТИТЕ НА ЕКСТРАКТИ  
ОТ RHODIOLA ROSEA L. И CURCUMA LONGA L.  
И ТЕХНИТЕ АКТИВНИ КОМПОНЕНТИ  
САЛИДРОЗИД И КУРКУМИН  
ВЪРХУ МОДЕЛ НА ХРОНИЧЕН СТРЕС**

АВТОРЕФЕРАТ

за присъждане на образователна и научна степен „доктор“  
Докторска програма „Фармакология  
(вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“

Научен ръководител:  
Проф. д-р Дамянка П. Гетова-Спасова, дмн

Пловдив, 2017

Дисертационният труд е написан на 134 страници. Той е онагледен с 29 фигури и 13 таблици. Цитирани са 231 литературни източника.

Дисертационният труд е одобрен и насрочен за защита от разширен катедрен съвет на катедра „Фармакология и клинична фармакология“ на МУ – Пловдив, състоял се на ..... година.

Докторантът е отчислен с право на защита със Заповед № Р-..... година на Ректора на МУ – Пловдив чл.-кор. проф. д-р Стефан Костянев, дмн.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... от ..... часа във ..... аудитория на Аудиторен комплекс на МУ – Пловдив.

Материалите по защитата са на разположение в катедра „Фармакология и клинична фармакология“ на МУ – Пловдив и са публикувани на интернет страницата на МУ – Пловдив.

## СЪДЪРЖАНИЕ

<b>ВЪВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>5</b>
<b>ЦЕЛ .....</b>	<b>7</b>
<b>ЗАДАЧИ .....</b>	<b>7</b>
<b>МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ .....</b>	<b>8</b>
<b>РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ .....</b>	<b>15</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>38</b>
<b>ИЗВОДИ .....</b>	<b>40</b>
<b>ПРИНОСИ .....</b>	<b>41</b>
<b>СОБСТВЕНИ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ .....</b>	<b>42</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>45</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ.....</b>	<b>48</b>

## **ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА БЪЛГАРСКИ ЕЗИК**

СССР – съюз на съветските социалистически републики

ЯМР – ядреномагнитен резонанс

## **ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ НА АНГЛИЙСКИ ЕЗИК**

°C – градус по Целзий

CMS – chronic mild stress – хроничен лек стрес

COX – cyclooxygenase – циклооксигеназа

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay – ензимносвързан имуносорбентен тест

EMA – European Medicines Agency – Европейска агенция по лекарствата

FDA – Food and drug administration – Американската агенция за храни и лекарства

HPA – hypothalamic-pituitary-adrenal axis – хипофизо-хипоталамо-адренална ос

IL-6 – interleukin 6 – интерлевкин 6

IL-1 $\beta$  – interleukin 1 $\beta$  – интерлевкин 1 бета

LPS – lipopolysaccharide – липополизахарид

MWM – Morris water maze – воден лабиринт на Морис

NMDA – N-methyl-D-aspartate – N-метил-D-аспартат

OFT – open-field test – тест „открито поле“

TNF- $\alpha$  – tumor necrosis factor alpha – тумор некрозен фактор алфа

## ВЪВЕДЕНИЕ

Стресът обикновено се дефинира като състояние на нарушена хомеостаза в организма. Отговорът на организма при стрес има за цел да възстанови нормалните физиологични параметри на хомеостазата или да осъществи адаптация, като достигне нови нива на хомеостаза – състояние на алостаза (McEwen, 2007). В зависимост от интензитета на стресовия фактор и продължителността на стреса, той може да се разглежда като остър или хроничен стрес. Промените в организма предизвикани от острия и хроничния стрес се различават. Докато състоянието на остър стрес често се компенсира от възможностите на организма за адаптация, то при състоянието на хроничен стрес с времето могат да възникат редица усложнения за физическото, психично и емоционално здраве на индивида.

В наши дни състоянието на хроничен стрес е актуален здравен проблем, който включва в себе си завишен риск от развитие на различни болестни състояния като неинсулинозависим диабет, хипертонична болест, депресивни състояния, синдром на хроничната умора, повишена тревожност и нарушена имунна защита. Всички тези патологични състояния са свързани както с понижено качество на живот на отделния индивид, така и представляват обществено значим проблем, поради понижената работоспособност на болния.

Все повече научни изследвания потвърждават връзката между хроничния стрес, развитието на депресия и хроничните възпалителните процеси. Въпреки широката разновидност от лекарствени групи за терапия на депресията, тя все още е значим клиничен проблем. Тенденция в терапията на депресивните и стрес-индуцираните състояния е да се търсят ефективни препарати от растителен произход, с добър профил на безопасност при хронична употреба.

Адаптогенни вещества са тези, които имат капацитет да нормализират функциите на тялото и да подсилват системите на организма, засегнати при стрес. Растителните адаптогени се определят още като вещества, повишаващи възможностите на организма да се адаптира към факторите на околната среда и да избегне увреждането от тях.

Концепцията за адаптогенното действие е предложена от Лазарев през 1947г. и по-късно развита посредством множество експериментални и клинични изследвания в бившата СССР в търсене на вещества, повишаващи устойчивостта на организма към различни увреждащи фактори с физична, химична или биологична природа. През 1998 г.

Американската агенция по храни и лекарства (Food and drug administration – FDA) и през 2007 г. Европейската агенция по лекарствата (European Medicines Agency – EMA) възприемат термина адаптоген за оценка действието на традиционни растителни лекарствени средства (напр.: *Ginseng* spp., *Eleutherococcus* spp., *Rhodiola rosea* L., *Schisandra chinensis* L. и др.) (EMA, 2008).

*Rhodiola rosea* L. (сем. Crassulaceae) или златен корен е растителен адаптоген традиционно използван за повишаване устойчивостта на организма към стресови условия. Корените от *Rhodiola rosea* L. и основният му активен компонент салидрозид (Salidroside) са изследвани в множество предклинични и клинични проучвания. Екстрактът от златен корен е с доказан антиоксидантен потенциал и положителен ефект при състояние на хронична умора.

*Curcuma longa* L. (сем. Zingiberaceae) или куркума е растение произхождащо от Индия, което се използва широко в традиционната медицина и като подправка в източната диета. Екстрактът от корени на *Curcuma longa* L. и основният му активен компонент куркумин (Curcumin) показват мощно антиоксидантно, противотуморно, антиинфламаторно, имуномодулиращо, невропротективно и хепатопротективно действия.

Проучването на ефектите на стандартизирани екстракти от корени на *Rhodiola* и *Curcuma* и основните им активни съставки – Salidroside и Curcumin върху експериментален модел на хроничен стрес при животни, според нас ще бъде не само с теоретичен принос, но и с потенциална клинична интерпретация за приложението им в терапията на депресивни състояния и стрес-предизвикани увреждания. От значение, ще бъде и потвърждаването на противовъзпалителната активност на приложените препарати, при модел на системно възпаление на фона на хроничен стрес. В достъпната ни литература до момента няма данни за комбинирано приложение или сравняване действието на посочените два растителни екстракта и съответните им активни компоненти, върху модел на хроничен стрес и установяване на техните адаптогенни ефекти.

## ЦЕЛ

Изследване на фармакологичните ефекти на два растителни екстракта – *Rhodiola rosea* L. и *Curcuma longa* L. и комбинацията им, както и на съответните им активни компоненти салидрозид (Salidroside) и куркумин (Curcumin) и комбинацията им при модел на хроничен стрес у плъхове.

## ЗАДАЧИ

1. Фитохимична характеристика на екстракти от *Rhodiola rosea* L. и *Curcuma longa* L.
2. Пилотно проучване на противовъзпалителната активност на екстракти от *Rhodiola rosea* L. и *Curcuma longa* L.
3. Изследване ефектите на екстракти от *Rhodiola rosea* L., *Curcuma longa* L. и комбинация от тях върху физиологични и поведенчески показатели на плъхове, подложени на модел на хроничен стрес.
4. Изследване ефектите на екстракти от *Rhodiola rosea* L., *Curcuma longa* L. и комбинация от тях върху процесите на обучение и памет при тест воден лабиринт на плъхове, подложени на модел на хроничен стрес.
5. Изследване ефектите на екстракти от *Rhodiola rosea* L., *Curcuma longa* L. и комбинация от тях при модел на LPS-индуцирано възпаление чрез определяне нивата на цитокините tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) и interleukin-6 (IL-6) в серуми на плъхове, подложени на модел на хроничен стрес.
6. Изследване ефектите на активните компоненти от растенията - Salidroside и Curcumin и комбинацията им върху физиологични и поведенчески показатели на плъхове, подложени на модел на хроничен стрес.
7. Изследване ефектите на Salidroside, Curcumin и комбинация от тях върху процесите на обучение и памет при тест воден лабиринт на плъхове, подложени на модел на хроничен стрес.
8. Изследване ефектите на Salidroside, Curcumin и комбинация от тях при модел на LPS-индуцирано възпаление чрез определяне нивата на цитокините tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) в серум и мозък и interleukin-6 (IL-6) в серум на плъхове, подложени на модел на хроничен стрес.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. Вид животни, разрешителни и условия на отглеждане

Всички експерименти са проведени съгласно изискванията и правилата за работа с лабораторни животни. За проучването е получено разрешително за използване на животни в опити №98/22.05.2014 година от БАБХ към Министерство на земеделието и храните и от Комисия по научна етика към Медицински университет – Пловдив с протокол №2752/09.11.2015.

Използвани са 152 мъжки плъхове порода Wistar с тегло между 190 и 230 грама. Животните са отглеждани при стандартни лабораторни условия: 12:12 часа цикъл светло-тъмно,  $45 \pm 5\%$  относителна влажност на въздуха,  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  температура и свободен достъп до храна и вода, освен когато експерименталната постановка изискваше друго.

### 2. Екстракти, фитохимична характеристика и субстанции

#### 2.1. Екстракти

Стандартизиран екстракт от корени на растението *Rhodiola rosea* L., произведен от Nature`s Way (Nature`s Way Products LLC, Green Bay, USA) всяка капсула съдържа 250 mg сух екстракт, всяка опаковка по 60 капсули.

Стандартизиран екстракт от корени на растението *Curcuma longa* L. произведен от Phyto Wave (Fact Products Inc, Salt Lake City, USA) всяка капсула съдържа 500 mg сух екстракт, всяка опаковка по 60 капсули.

#### 2.2. Фитохимична характеристика

Качественият състав на екстракта от *Rhodiola* е анализиран посредством ЯМР-метабономика. Допълнително чрез ВЕТХ са определени количествено салидрозид и фенилпропаноиди в препаратите от златен корен. Съдържанието на активното вещество куркумин е определено количествено в екстракта от *Curcuma* чрез ВЕТХ.

Получените спектри са автоматично редуцирани до ASCII файлове със софтуер АМІХ (версия 3.7, Bruker), а корекция на фазите, базовата линия и изравняване с вътрешния стандарт TSPA до 0.0 ppm е извършено чрез софтуерна програма MestReNova (версия 6.2.1, Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Испания).

#### 2.3. Използвани субстанции, стандарти и разтворители

##### *Разтворители*

Деутериран метанол ( $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ , чистота 99.8%) и деутерирана вода ( $\text{D}_2\text{O}$ , 99.9%) са закупени от Deutero GmbH (Кастеллаун, Германия).



Деутерирана натриева сол на триметил силил пропионовата киселина (TSPA- $d_4$ ), ацетонитрил (HPLC чистота 99.9%), ледена оцетна киселина (100 %), метанол (99.9%) са доставени от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, САЩ). Дейонизираната вода е пречистена чрез система Ultrapure Water Systems Arium<sup>®</sup> 611DI (Sartorius AG, Гьотинген, Германия). Разтвор на натриев хлорид 0.9% (saline) е закупен от В. Braun Medical EOOD (София, България).

#### Стандарти и субстанции

Салидрозид ( $\geq 98\%$ ), розарин ( $\geq 98\%$ ), розавин ( $\geq 98\%$ ), розин ( $\geq 95\%$ ), куркумин ( $\geq 98\%$ ), флуоксетин хидрохлорид ( $\geq 98\%$ ), пентобарбитал натриева сол ( $\geq 98\%$ ) и карагенин са доставени от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, САЩ). Разтвор на диклофенак натрий 25 mg/ml 3 ml в ампули беше закупен като търговски продукт Diclac Sandoz от официалният им представител Hexal AG (София, България).

#### Субстанции от бактериален произход

Липополизахарид (LPS) от *Escherichia coli* щам 055:B5 е доставен от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, САЩ).

### 3. Пилотно проучване на противовъзпалителната активност на екстракти от *Rhodiola* и *Curcuma*

За проучване противовъзпалителната активност на изследваните екстракти са използвани два модела на експериментално възпаление: карагенинов оток на задна лапа и индуциране на гранулом тип „чуждо тяло“. Мъжки бели плъхове порода Wistar (n = 8) са третираны перорално чрез сонда съгласно таблицата (Табл. 1). Екстрактите са въвеждани веднъж дневно в продължение на 25 дни: 14 дни предтретиране и 11 експериментални дни. Като еталон за противовъзпалително действие е използван диклофенак натрий, който се въвежда еднократно дневно само в дните на тестиране.

Таблица 1. Многократно третиране един път дневно в продължение на 25 дни (включително и по време на тестиране)

Група №	48 мъжки плъха Wistar разделени в 6 групи	Дневна доза (перорално въвеждане)
1	Контролна група – дестилирана вода	10 ml/kg bw
2	Позитивна контрола – Diclofenac sodium	25 mg/kg bw
3	<i>Rhodiola</i>	250 mg/kg bw
4	<i>Rhodiola</i>	500 mg/kg bw
5	<i>Curcuma</i>	250 mg/kg bw
6	<i>Curcuma</i>	500 mg/kg bw

#### 4. Дизайн на експеримента с модел на хроничен лек стрес (Chronic Mild Stress-CMS)

##### 4.1. Групи животни

Мъжки бели плъхове порода Wistar ( $n = 8$ ) са третирани перорално чрез сонда веднъж дневно. Прилаганите екстракти или субстанции се разтварят или суспендират в дестилирана вода като носител до обем 10 ml/kg. Експериментът е разделен в две серии съответно за изследване ефектите на растителните екстракти (Табл. 2) и на съответните им активни компоненти (Табл. 3).

Таблица 2. Първа серия – многократно третиране един път дневно в продължение на целия период на експеримента (включително и по време на CMS модела) със съответните екстракти

Група №	56 мъжки плъха Wistar разделени в 7 групи	Дневна доза (перорално въвеждане)
1	Контролна група – дестилирана вода	10 ml/kg bw
2	Моделна група CMS – дестилирана вода	10 ml/kg bw
3	CMS + <i>Rhodiola</i>	250 mg/kg bw
4	CMS + <i>Rhodiola</i>	500 mg/kg bw
5	CMS + <i>Curcuma</i>	250 mg/kg bw
6	CMS + <i>Curcuma</i>	500 mg/kg bw
7	CMS + <i>Rhodiola</i> + <i>Curcuma</i>	250 mg/kg + 250 mg/kg bw

Таблица 3. Втора серия – многократно третиране един път дневно в продължение на 8 дни от първи ден след приключване на CMS модела

Група №	48 мъжки плъха Wistar разделени в 6 групи	Дневна доза (перорално въвеждане)
1	Контролна група – дестилирана вода	10 ml/kg bw
2	Моделна група CMS – дестилирана вода	10 ml/kg bw
3	Позитивна контрола -CMS + Fluoxetine	2,5 mg/kg bw
4	CMS + Salidroside	5 mg/kg bw
5	CMS + Curcumin	20 mg/kg bw
6	CMS + Salidroside + Curcumin	5 mg/kg + 20 mg/kg bw

##### 4.2. Модел на хроничен стрес

Животните от групите с модел на хроничен стрес са подложени ежедневно в продължение на четири седмици на следните стресови стимули: силен шум, обърнат цикъл светло-тъмно, мокра подложка на

пода на клетката, поставяне на клетката под наклон (45°), защипване на опашките (за 10 минути), ограничаване от храна, ограничаване от вода (табл. 4). Стресовите стимули се прилагат в различен ред всяка седмица, за да се избегне привикването на животните към тях. Контролната група животни са отглеждани при стандартни лабораторни условия в отделно помещение. В началото на всяка седмица се регистрират промените в теглото на животните и промяната в предпочитанието им към 2% разтвор на глюкоза.

#### 4.3. Поведенчески тестове

##### *Методи за изследване на поведенчески реакции*

Спонтанна локомоторна активност се изследва по метода на „откритото поле“ (Open-field test – OFT). Автоматично с апарат “Activity cage” на Ugo Basile, Italy се отчита броя хоризонталните и вертикални движения на гризача чрез инфрачервени термо-детектори в условията на открито поле в продължение на 5 минути.

##### *Методи за изследване на процесите на обучение и памет*

Тест за пространствено обучение – Воден лабиринт на Морис (Morrist Water Maze test – MWM) – Обучението се провежда в 5 последователни дни с по 3 тренировки на ден. При всяка тренировка животното се оставя да плува свободно в кръгъл басейн за максимално време от 120 секунди с цел да открие потопената под повърхността на водата платформа. В средата на всеки квадрант на стената на басейна се поставят визуални улики или ориентирни. Два дни след последния тренировъчен ден се провежда тест за памет. Като критерии за обученост на животното се приема откриване на платформата за по-малко от 60 секунди.

Таблица 4. Дизайн на експеримента (\*важи само за втората серия на експеримента)

Период	Процедури	Понеделник	Вторник	Сряда	Четвъртък	Петък	Събота	Неделя	
Първа седмица	<b>Хроничен лек стрес (CMS)</b>	Обърнат цикъл светло/тъмно (12/12 ч.)	Шум (40 Hz, 3 ч.)	Мокра клетка (24 ч.)	Клетка под наклон (45°C, 24 ч.)	Защипани опашки (по 10 мин. на плъх)	24 ч. без храна	24 ч. без вода	
		Глюкозо-преферентен тест Определяне на тегло							
Втора седмица		Мокра клетка (24 ч.)	Клетка под наклон (45°C, 24 ч.)	Защипани опашки (по 10 мин. на плъх)	Обърнат цикъл светло/тъмно (12/12 ч.)	Шум (40 Hz, 3 ч.)	24 ч. без вода	24 h без храна	
		Глюкозо-преферентен тест Определяне на тегло							
Трета седмица		Защипани опашки (по 10 мин. на плъх)	Обърнат цикъл светло/тъмно (12/12 ч.)	Клетка под наклон (45 °C, 24 ч.)	Шум (40 Hz, 3 ч.)	Мокра клетка (24 ч.)	24 ч. без храна	24 ч. без вода	
		Глюкозо-преферентен тест Определяне на тегло							
Четвърта седмица		Клетка под наклон (45 °C, 24 ч.)	Шум (40 Hz, 3 ч.)	Мокра клетка (24 ч.)	Обърнат цикъл светло/тъмно (12/12 ч.)	Защипани опашки (по 10 мин. на плъх)	24 ч. без вода	24 h без храна	
		Глюкозо-преферентен тест Определяне на тегло							
Пета седмица	<b>Тестване</b>	Локомоторна активност Глюкозо-преферентен тест Определяне на тегло	Воден лабиринт тренировъчни дни						
Шеста седмица	<b>Тестване</b>	Тест за памет на воден лабиринт Глюкозо-преферентен тест Определяне на тегло	LPS индуцирано възпаление Отделяне на серум (*и мозък) за определяне на цитокинови нива						
		*Локомоторна активност							

#### 4.4. Методи за определяне нивата на цитокини

##### *Липополизахарид-индуцирано възпаление*

Използва се липополизахарид (LPS) на *E. coli* серотип 055:B5, който се инжектира интраперитонеално еднократно в доза 250 µg/kg. Четири часа след това се събира кръв за имунологични изследвания, която се центрофугира при 3000 оборота/минута за 10 минути. При втората серия експериментални групи непосредствено след отделяне на серум животните се анестезират дълбоко с пентобарбитал натрий. За изследване нивата на TNF-α в мозъчна тъкан плъховете се декапитират и се отделят целите мозъци. Получените проби са съхранявани при -80°C в нискотемпературен фризер (SANYO) в катедрата по Микробиология и имунология на Фармацевитчен факултет при МУ – Пловдив до измерване концентрацията на цитокините.

*Определяне на периферните нива на цитокини в серум чрез ензимно-свързан имуносорбентен метод ELISA*

Цитокини TNF-α и IL-6 са изследвани в серум от плъхове подложени на модел на хроничен стрес последван от LPS-индуцирано възпаление. Използвани са готови търговски китове за плъши серум за TNF-α и IL-6 съответно: Rat TNF-α ELISA KIT Diaclone и Rat IL-6 ELISA KIT Diaclone.

TNFα – аналитична чувствителност – минимална откриваемост 15 pg/ml

IL-6 – аналитична чувствителност – минимална откриваемост 19 pg/ml

*Определяне на нива на TNF-α в мозъчна тъкан чрез ELISA*

Нивата на цитокина TNF-α се определят и в мозъчна тъкан от плъхове подложени на модел на хроничен стрес последван от LPS-индуцирано възпаление.

Всички процедури по ELISA теста са извършени при стриктно спазване на инструкциите за работа на производителя. Използван е готов търговски кит за плъши TNF-α съответно: Rat TNF-α ELISA KIT Abcam

TNF-α – аналитична чувствителност- минимална откриваемост 25 pg/ml

#### 5. Статистически анализ

Статистическата обработка на данните е извършена с пакет IBM SPSS (Statistical Package for Social Science) 17.0 и MS Office Excel за Windows 7. За всеки от показателите са определени средната аритметична стойност (MEAN) и стандартната ѝ грешка (SEM). За проверка на разпределението е

проведен тест на Kolmogorov-Smirnov. При наличие на нормалност в разпределението между-груповите различия се сравняват посредством еднофакторен дисперсионен анализ (one-way analysis of variance – one-way ANOVA), последван от LDS (least significant difference) или Tukey *post hoc* анализ. За вътрегруповите различия е използван еднофакторен дисперсионен анализ за повтарящи се измервания (ANOVA for repeated measures), последван от Dunnet`s *post hoc* анализ. При разпределение различно от нормалното сравненията са направени посредством непараметричен тест на Mann-Whitney U. За статистическа значима разлика се приемат стойности на P равни или по-малки от 0,05 ( $P \leq 0,05$ ).

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Направените фитохимични анализи ни дават сигурност, че използваните от нас търговски препарати съдържат екстракти съответно от *Rhodiola rosea* L. и *Curcuma longa* L. Доказването на качествения състав потвърждава, че указаният на опаковката растителен вид е действително използван за производството на съответния продукт. Фитохимичният количествен анализ на екстрактите от *Rhodiola* и *Curcuma* показва количествено съдържание на активните компоненти съответно салидрозид и куркумин в тях, което отговаря на указаното от производителя (Табл. 5 и Табл. 6).

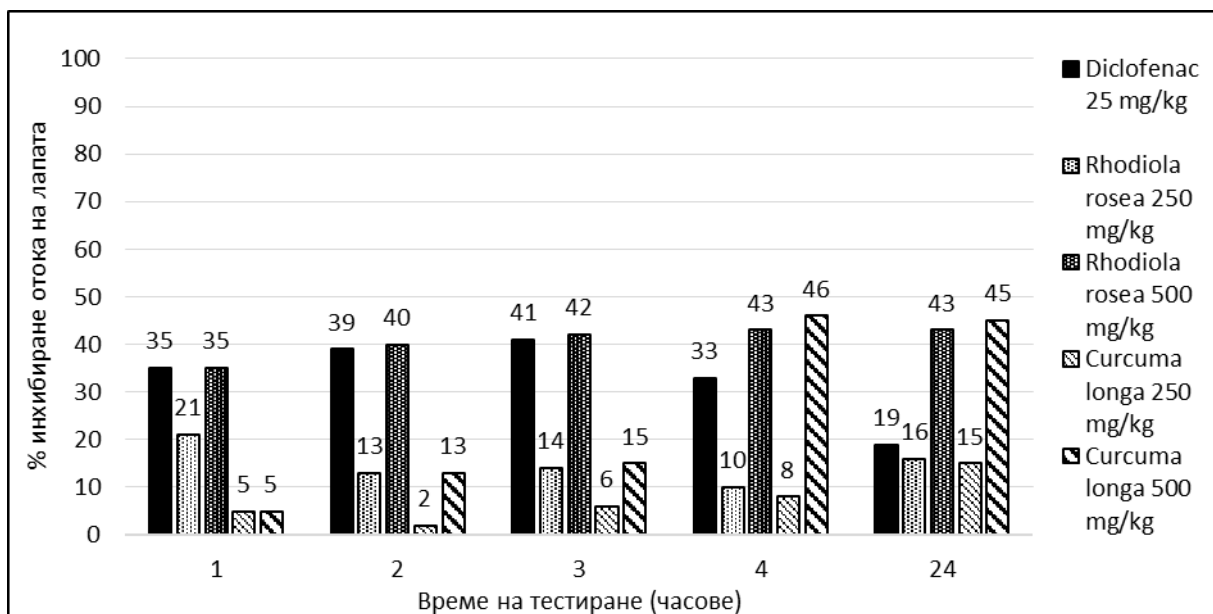
Таблица 5. Съдържание на салидрозид и розавини (mg/g продукт) в стандартизиран търговски препарат на база *R. rosea* определено чрез анализ на данните от BETX

<b>Salidroside</b>	<b>Rosarin</b>	<b>Rosavin</b>	<b>Rosin</b>
22.18 ± 0.69	3.89 ± 0.20	24.05 ± 0.76	1.54 ± 0.12

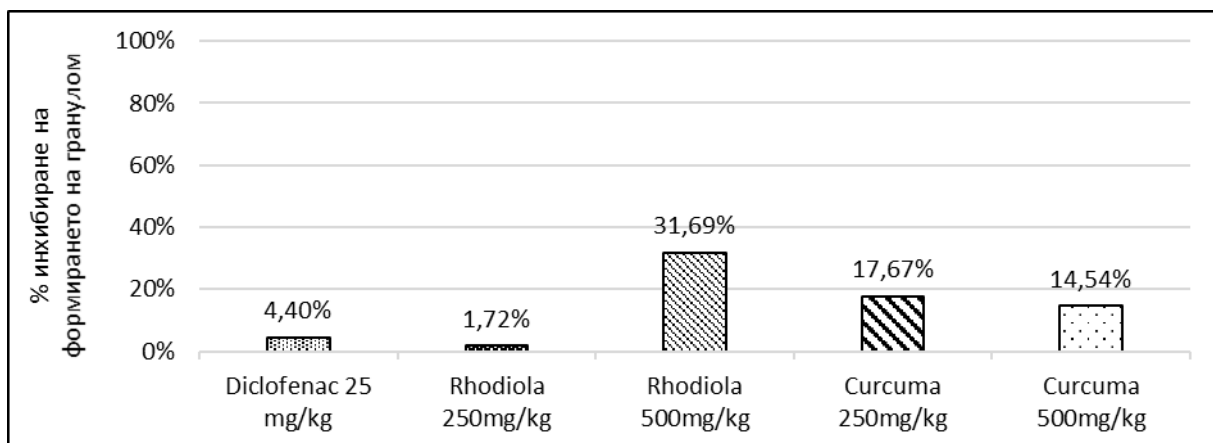
Таблица 6. Съдържание на куркумин в стандартизиран търговски препарат на базата на екстракт от *C. longa* определено чрез анализ на данните от BETX

<b>Продукт</b>	<b>Съдържание на куркумин, µg/mg продукт</b>
Phyto Wave Turmeric, Fact products Inc., USA	132.19 ± 14.80

Пилотните експерименти са проведени за изследване на противовъзпалителната активност на екстрактите от *Rhodiola* и *Curcuma*. При модела на остро ексудативно възпаление предизвикано с карагенин и двата екстракта показват изразен противовъзпалителен ефект (Фиг. 1). Данните от модела на подостро пролиферативно възпаление т.нар. „cotton pellet“ тест също потвърждават противовъзпалителна активност на използваните растителни продукти, която е особено изразена при високите прилагани дози (Фиг. 2).



Фигура 1. Противовъзпалително действие на изследваните екстракти при модел на карагенинов оток, изразен като % инхибиране на отока спрямо контролната група на съответния час



Фигура 2. Противовъзпалително действие на изследваните екстракти при модел на възпаление тип „чуждо тяло“ („cotton pellet test“) изразено в % на инхибиране формирането на гранулом

Моделът на хроничен лек стрес за плъхове е модифициран от описаното в наличната литература. За целта на настоящия дисертационен труд експериментите са разделени в две серии.

Първата серия изследва ефектите на екстрактите от *Rhodiola*, *Curcuma* и комбинацията им при многократно третиране включително и по време на провеждане на процедурата за хроничен стрес. Този дизайн на проучването цели да проследи потенциален профилактичен и терапевтичен



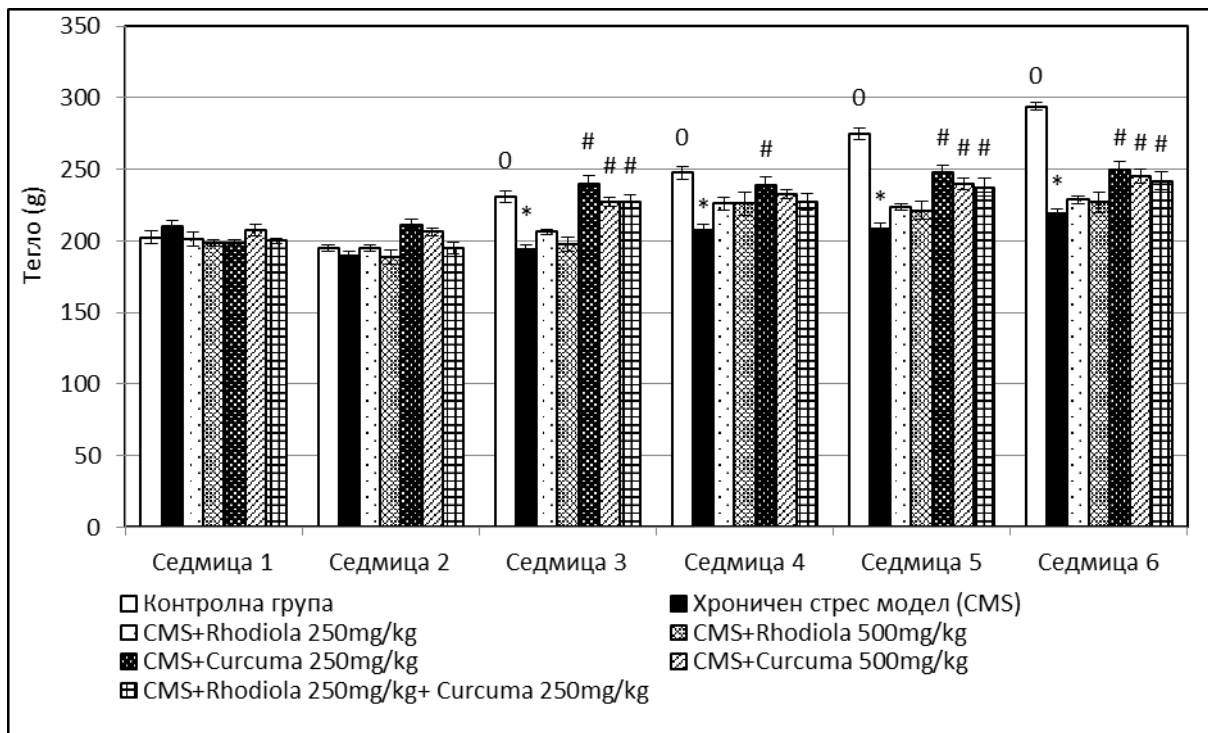
ефект от приложението на двата екстракта за облекчаване последствията от стреса.

При втората серия, която обхваща проучване ефекта на активни компоненти от *Rhodiola* и *Curcuma* съответно салидрозид и куркумин, фокусът на изследването е потенциален терапевтичен ефект. Отчитат се ефектите на веществата след еднократно и многократно приложение на фона на вече установено състояние на депресия, индуцирана от хроничния стрес.

## **1. Ефекти на многократно третиране с екстракти от *Rhodiola* и *Curcuma* и комбинацията им при поведенчески тестове след модел на хроничен стрес**

### **1.1. Ефекти върху промяната в телесното тегло на животните**

Контролната група значимо покачва ( $P < 0,05$ ) теглото си от трета седмица до края на експеримента спрямо началното тегло. Моделната група, подложена на CMS, показва значим спад в теглото ( $P < 0,05$ ) спрямо контролната група на съответния ден. Екстрактът от *Rhodiola* в двете дози не показва влияние върху теглото на животните спрямо групата с CMS модел. Животните, третирани с екстракт от *Curcuma* в доза 250 mg/kg имат значимо по-високо покачване на теглото ( $P < 0,05$ ) в сравнение с това при CMS групата от трета до шеста седмица на изследването. Тетрираните с екстракт от *Curcuma* в доза 500 mg/kg както и с комбинацията от двата екстракта показват значимо по-високо покачване на тегло ( $P < 0,05$ ) спрямо CMS групата през трета, пета и шеста седмица (Фиг. 3).



Фигура 3. Ефект на изследваните екстракти върху телесното тегло при първата серия експериментални групи (<sup>0</sup>P < 0,05 спрямо контролната група на първи ден; \*P < 0,05 моделната група спрямо контролната на съответния ден; #P < 0,05 спрямо CMS моделната група)

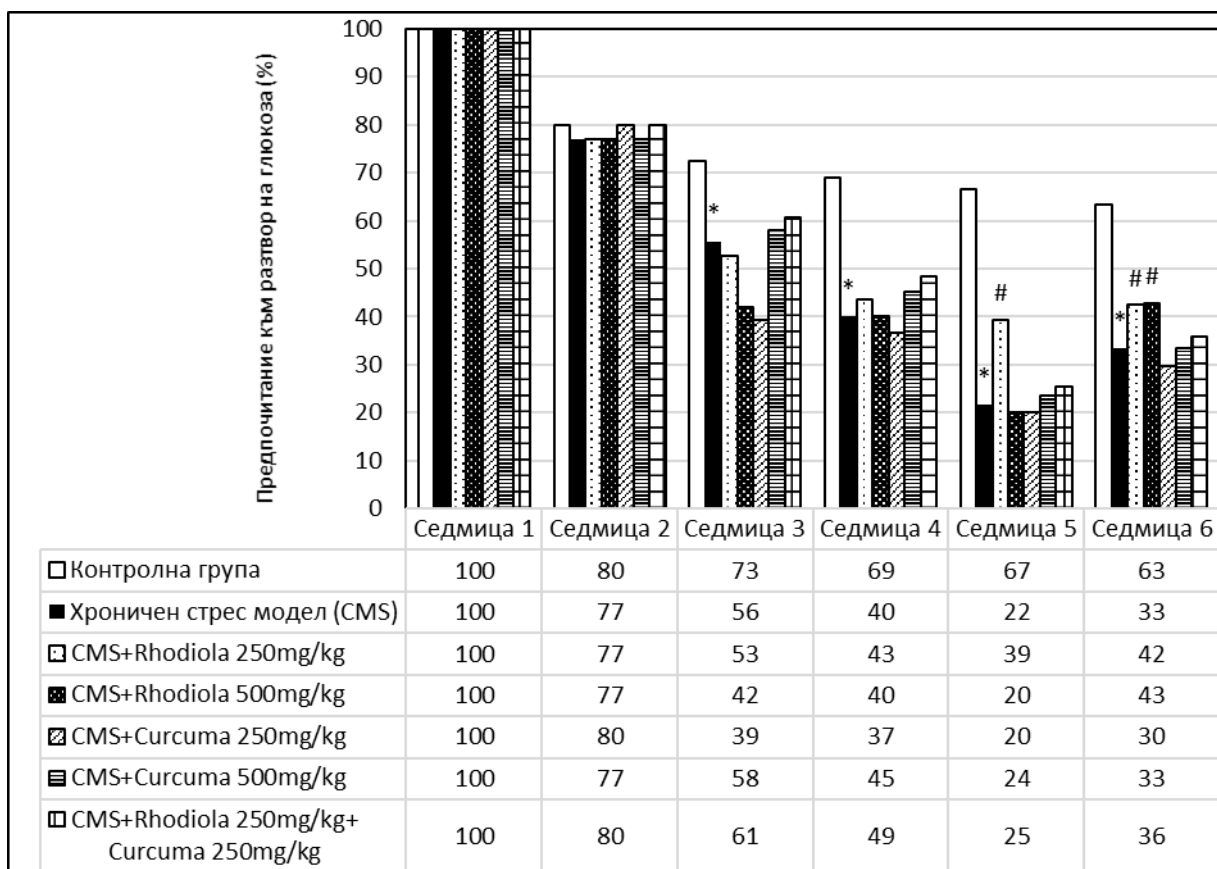
В нашето изследване ефектът на екстракта от *Rhodiola* върху плъхове, подложени на хроничен стрес се проявява в задържане на теглото без значими промени спрямо началните нива. Това показва, че животните имат нарушение в нормалното покачване на тегло, което не се повлиява от приложението на екстракта. Подобни промени са характерни за CMS модела. Екстрактът от *Curcuma* и комбинацията от двете растения проявява ефект към нормализиране в покачването на теглото. Тази тенденция на покачване в теглото е значима, но не достига стойностите, с които контролните животни покачват теглото си в хода на експеримента.

Въпреки, че в нашият експеримент екстрактът от *Rhodiola* приложен самостоятелно няма ефект върху промяната в телесното тегло при състояние на хроничен стрес, приложен в комбинация с екстракт от *Curcuma* той потенцира неговия ефект.

## 1.2. Промяна в предпочитанието към 2% разтвор на глюкоза

Предпочитанието към 2% разтвор на глюкоза при контролната група показва плавен спад от 100% при началното измерване до 63% при тестиране през последната шеста седмица. При CMS моделната група спадането от началното ниво 100% до 22% през пета седмица и 33% през

шеста седмица е значимо по-рядко ( $P < 0,05$ ) в сравнение с това на контролата. Групата третирана с екстракт от *Rhodiola* в доза 250 mg/kg показва значимо по-висок процент на предпочитание към сладкия разтвор ( $P < 0,05$ ) спрямо CMS моделната група през пета и шеста седмица от изследването. Във високата доза екстрактът от *Rhodiola* 500 mg/kg повиши процента на предпочитание към глюкоза бе значимо по-висок ( $P < 0,05$ ) спрямо моделната група само през последната шеста седмица. Животните третирани с двете дози екстракт от *Curcuma* не показаха промени в предпочитанието към 2% разтвор на глюкоза от първа до шеста седмица спрямо групата с CMS модел (Фиг. 4).



Фигура 4. Ефект на изследваните екстракти при теста за предпочитание към 2% разтвор на глюкоза при първата серия експериментални групи (\* $P < 0,05$  спрямо контролна група; # $P < 0,05$  спрямо CMS моделна група)

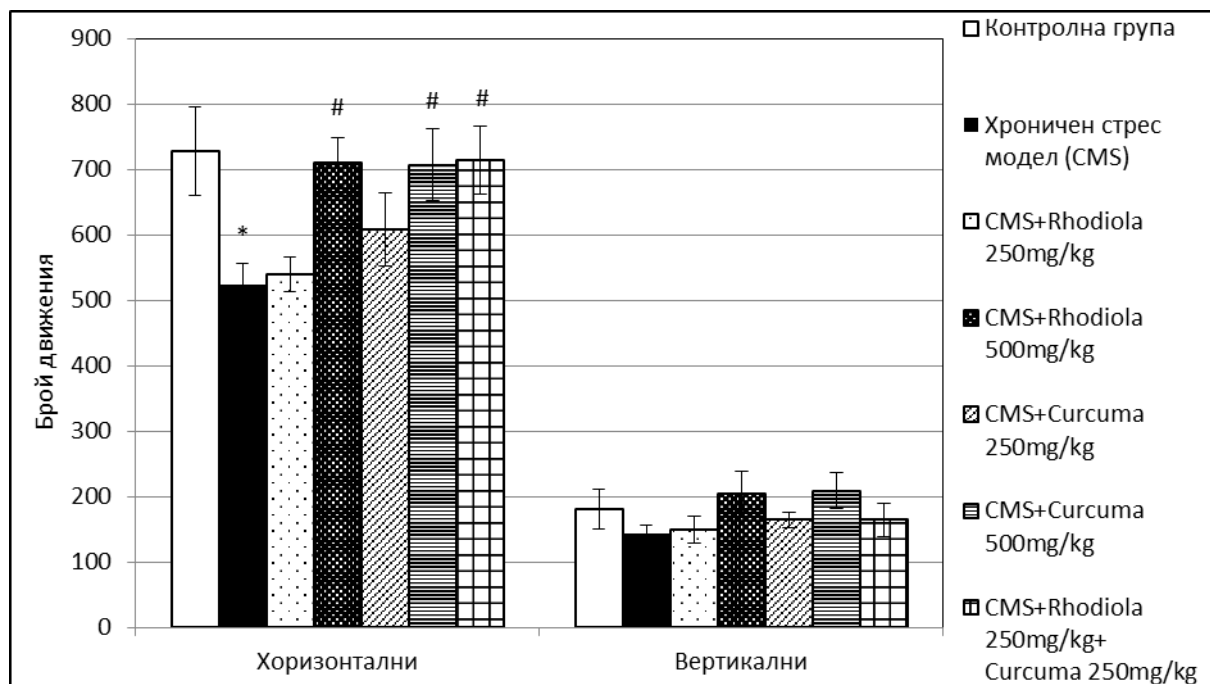
Понижението в предпочитанието към 2% разтвор на глюкоза е индикатор за достигане на състояние при гризачите, отговарящо на анхедония при хора – един от ключовите симптоми при депресия (Willner, 2005). Многократното приложение на екстракт от *Rhodiola* и в двете използвани дози повишава предпочитанието към сладкия разтвор, което е показателно за облекчаване състоянието на анхедония. Тези наши

резултати са в подкрепа на съобщенията от Chen и съавт. (2008), които показват, че екстрактът от златен корен проявява антидепресивен ефект, чрез повишаване нивата на серотонина в хипокампа на плъхове подложени на CMS модел на депресия, а също повишава и клетъчната пролиферацията в *gyrus dentatus*.

Екстрактът от *Curcuma* и в двете изследвани дози, както и в комбинация с екстракт от *Rhodiola* не повлиява развитието на анхедония у животните, подложени на хроничен стрес. Тези резултати се разминават с очакваните, тъй като има данни от други подобни изследвания, показващи потенциален антидепресивен ефект на екстракта от куркума и активния му компонент куркумин. Някои автори сравняват ефекта на екстракт от *Curcuma* в дози 35 и 70 mg/kg с този на флуоксетин 7 mg/kg при плъхове подложени на CMS модел като сочат покачване в нивата на консумация на сладък разтвор след първите три седмици от приложението на екстракта (Xia et al., 2006).

### 1.3. Промяна в локомоторната активност

При теста за отчитане на спонтанната локомоторна активност животните от CMS моделната група показват значимо по-ниска хоризонтална активност ( $P < 0,05$ ) спрямо нестресираните контролни животни. Групите третирани с двата изследвани екстракта във високите им дози и с комбинацията от *Rhodiola* и *Curcuma* значимо повишават хоризонтална активност ( $P < 0,05$ ) спрямо моделната група, като нивата на броя движение е сравним с тези на контролната група. Статистически значими разлики между групите по отношение на вертикалните движения не са намерени (Фиг. 5).



Фигура 5. Ефекти на изследваните екстракти при тест открито поле за отчитане промяната в локомоторната активност при първата серия експериментални групи (\* $P < 0,05$  спрямо контролната група; # $P < 0,05$  спрямо CMS моделната група)

Нашите резултати показват, че животните, подложени на хроничен стрес, са с намалена локомоторна активност спрямо нестресираните. Този отрицателен ефект върху изследователското поведение се явява като следствие от хроничния стрес. При прилагане на високите дози от изследваните екстракти, както и при използване на комбинацията им се отчита стимулиране на изследователското поведение спрямо това на животните от моделната група. Тези данни още веднъж потвърждават възможен синергичен ефект на комбинацията от екстрактите на *Rhodiola* и *Curcuma*. Предишни наши експерименти върху животни, без да са подложени на стрес, също показват стимулиращ ефект за *Rhodiola* върху локомоторната активност (Vasileva and Getova, 2014).

Загубата на интерес към сладкия разтвор заедно с промените в локомоторната активност и невъзможността за наддаване в теглото при животните подложени на хроничен стрес в нашите експерименти отразяват ефективността на използвания от нас CMS модел. Резултатите на моделната група в сравнение с тези на контролните животни показват, че CMS модела индуцира състояние при гризачите подобно на депресията при хора.

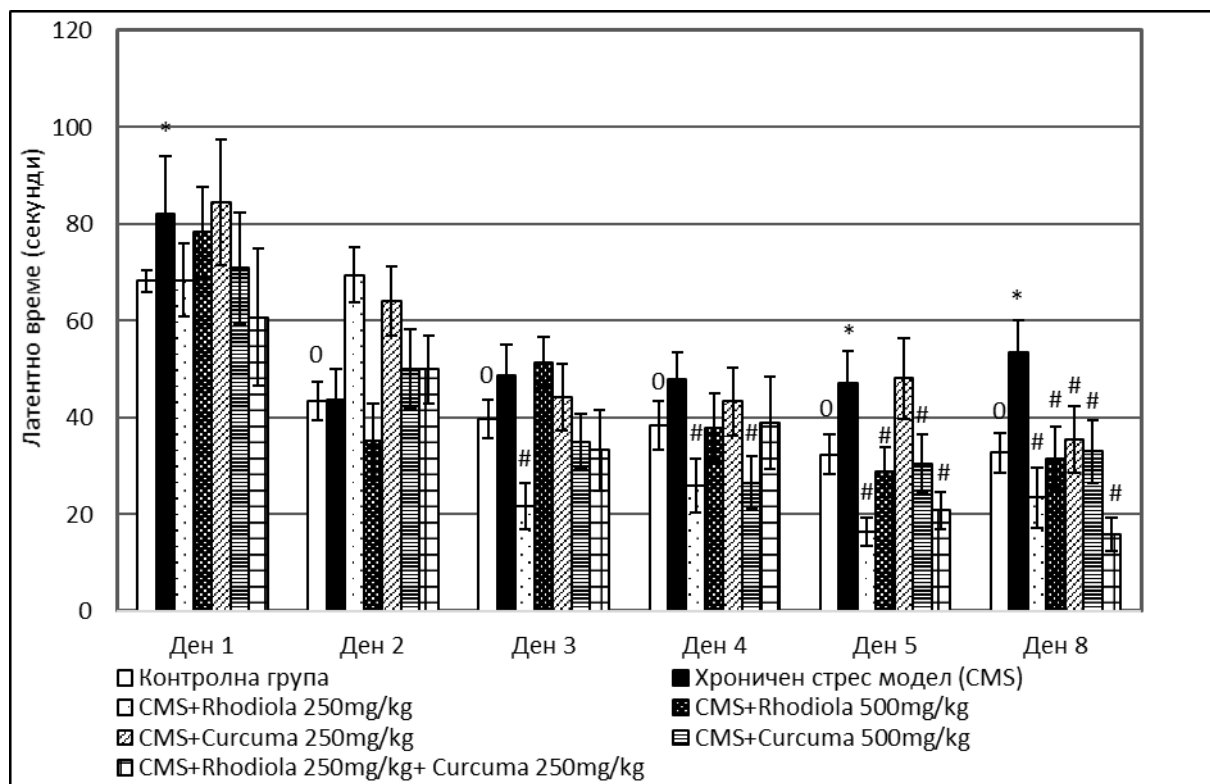
Приложението на стандартизираните екстракти от *Rhodiola* и *Curcuma* самостоятелно или в комбинация, показва потенциален терапевтичен ефект за облекчаване последиците от хроничния стрес.

## **2. Ефекти на *Rhodiola* и *Curcuma* и комбинацията им върху процесите на обучение и памет определени чрез тест воден лабиринт след модел на хроничен стрес**

Контролната група значимо намалява латентното време за откриване на платформата ( $P < 0,05$ ) през всички дни на обучителната сесия и при теста за памет на осмия ден в сравнение с първия обучителен ден. CMS моделната група удължава латентното време ( $P < 0,05$ ) на първи и пети ден от обучителната сесия и при теста за памет на осми ден спрямо контролната група на съответния ден.

Получените от нас резултати при теста „воден лабиринт“ показват, че влиянието на хроничния стрес има изразен увреждащ или амнестичен характер върху процесите на обучение и памет. MWM тестът корелира с хипокампалната синаптична пластичност и отразява функцията на глутаматните NMDA рецепторите (Vorhees and Williams, 2006). Някои автори сочат, че състоянието на депресия е свързано с увреждане на хипокампалната функция (Heine et al., 2004). Продължителното излагане на хроничен стрес също е свързано с увреждане в хипокампа (McEwen, 2007).

Животните третирани с екстракт от *Rhodiola* в двете прилагани от нас дози значимо понижават времето за откриване на платформата ( $P < 0,05$ ) спрямо моделната група по време на обучителната сесия и при теста за памет на осми ден. Групите, третирани с екстракт от *Curcuma* в двете използвани от нас дози значимо понижават латентното време ( $P < 0,05$ ) спрямо моделната група, като по-ниската доза показва ефект само при теста за памет, докато по-високата – през последните два дни от обучителната сесия и при теста за памет. Животните третирани с комбинацията от двата екстракта показват значимо понижение в латентното време ( $P < 0,05$ ) спрямо моделната група на пети ден от обучителната сесия и при теста за памет на осми ден (Фиг. 6).



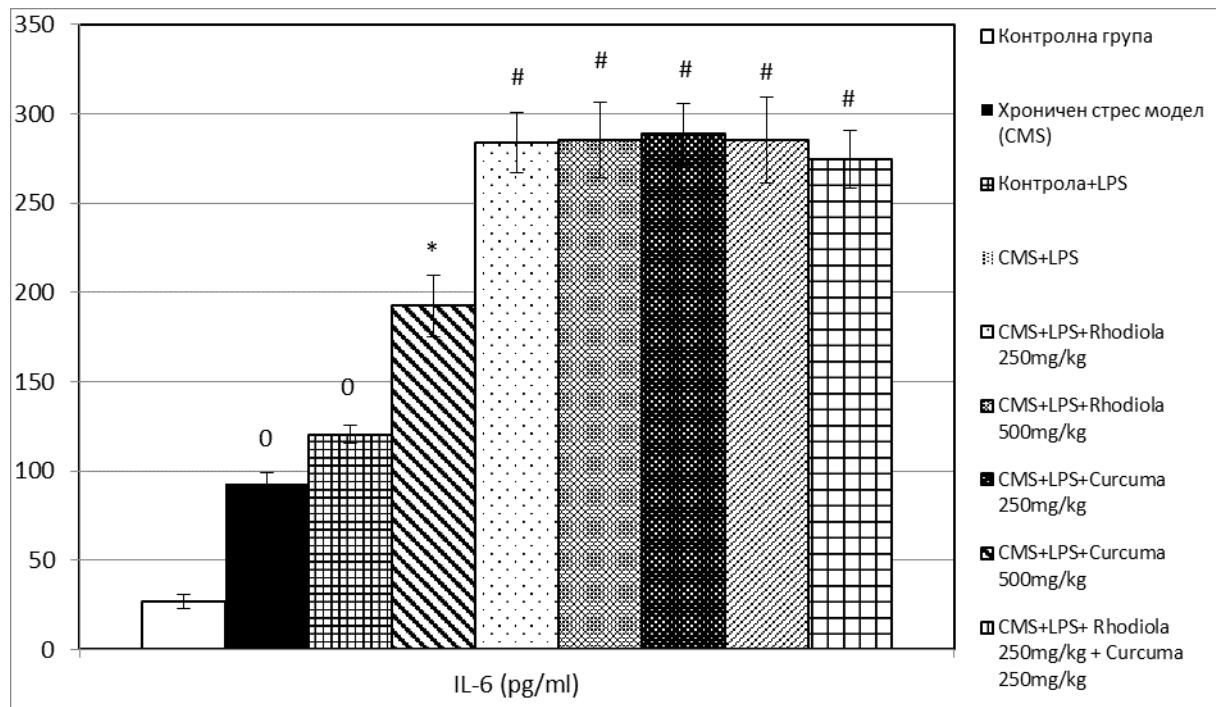
Фигура 6. Ефекти на изследваните екстракти при тест воден лабиринт при първата серия експериментални групи ( $^0P < 0,05$  спрямо контролната група на първи ден;  $*P < 0,05$  моделна група спрямо контролна група;  $\#P < 0,05$  спрямо CMS моделна група)

Ефектът от приложението на екстрактите от *Rhodiola* и *Curcuma* и комбинацията им е нормализиране на стрес-индуцирано паметово увреждане. Изразеният адаптогенен ефект на златния корен премахва увреждащите последици върху паметта от хроничния стрес при нашето изследване. В подкрепа на получените от нас данни е проучване, показващо, че *Rhodiola* стимулира обучението и паметта при модел на увреждане на хипокампа чрез инжектиране на стрептозотозин (Qu et al., 2009). Хроничното третиране с *Curcuma* в нашето изследване подобрява обучението и паметта ефект. Намалването на увреждането от хроничния стрес вероятно се дължи на модулиране функцията на НРА ос. Комбинацията от двата екстракта проявява по-силно изразен стимулиращ паметта ефект.

### 3. Ефекти на екстракти от *Rhodiola*, *Curcuma* и комбинация от тях върху периферните нива на някои цитокини

Групите с модел на CMS и с модел на LPS-индуцирано възпаление показват значимо повишени ( $P < 0,05$ ) серумни нива на IL-6 спрямо контролната група. При групата с комбиниран модел на CMS + LPS се

отчитат значимо повишени нива ( $P < 0,05$ ) за цитокина спрямо самостоятелно приложение на CMS и LPS. Всички групи подложени на комбинирания CMS + LPS модел и третирани с изследваните екстракти и комбинация от тях показват значимо завишени ( $P < 0,05$ ) нива на IL-6 спрямо моделната CMS + LPS група (Фиг. 7).



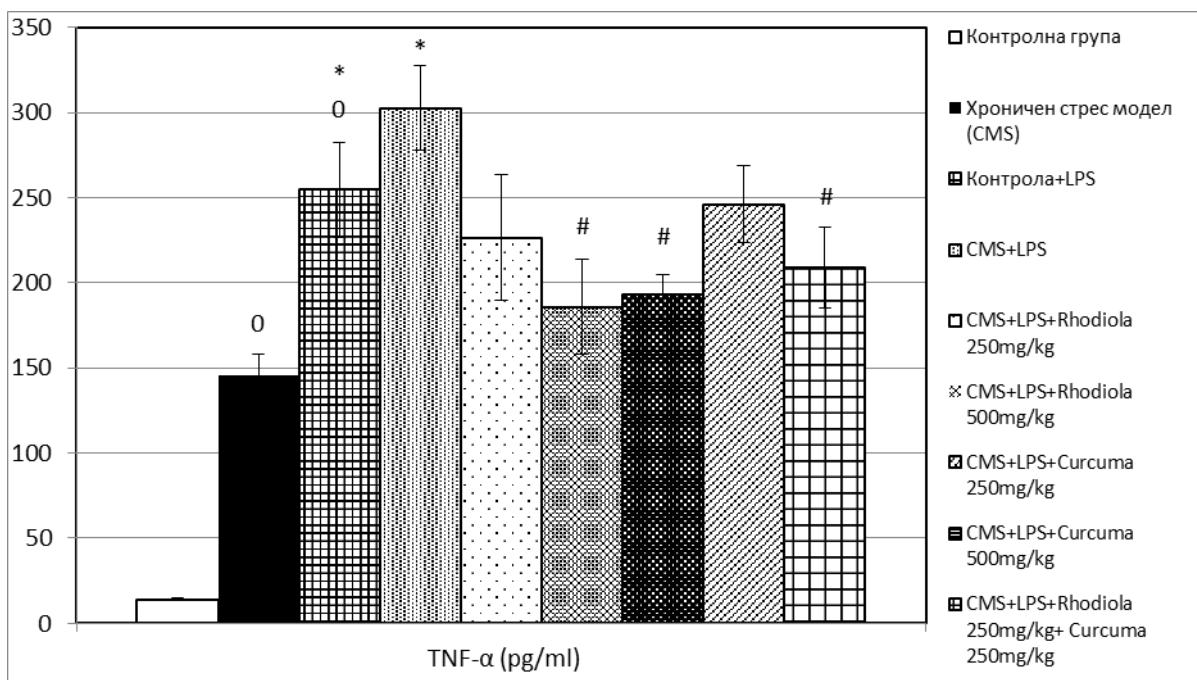
Фигура 7. Ефекти на изследваните екстракти върху нивата на IL-6 в серуми от плъхове с модел на хроничен стрес, последван от LPS-индуцирано възпаление при първата серия експериментални групи ( $^0P < 0,05$  сравнено с контролна група;  $*P < 0,05$  сравнено с CMS моделна група;  $\#P < 0,05$  сравнено с група с комбиниран модел на CMS + LPS;)

Въпреки, че е описван предимно като провъзпалителен цитокин, IL-6 проявява и някои противовъзпалителни ефекти. IL-6 индуцира ендогенния синтез на кортикостероиди и може да инхибира продукцията на IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  *in vinto* и *in vivo* (Aderka et al., 1989; Schindler et al., 1990; Woloski et al., 1985). Изследваните от нас екстракти и комбинацията им изразено повишават нивата на IL-6 при комбинирания модел на CMS и LPS. Това ни дава право да предположим, че в настоящия експеримент IL-6 проявява противовъзпалителен ефект, който е стимулиран от приложението на екстрактите.

Групата с модел на CMS показва значимо повишени ( $P < 0,05$ ) серумни нива на TNF- $\alpha$  спрямо контролната група. Групата с LPS-индуцирано възпаление показва значимо повишени ( $P < 0,05$ ) серумни нива на TNF- $\alpha$  спрямо контролната група и спрямо CMS моделната група.



Групата с модел на CMS и LPS показва значимо повишени нива ( $P < 0,05$ ) спрямо самостоятелно приложение на CMS. Групите подложени на комбинирания CMS + LPS модел и третирани с *Rhodiola* в доза 500 mg/kg, *Curcuma* в доза 250 mg/kg и комбинация от двата екстракти в дози 250 mg/kg значимо понижават ( $P < 0,05$ ) нивата на TNF- $\alpha$  спрямо моделната CMS + LPS група. Останалите групи показват само тенденция към понижаване на нивата на TNF- $\alpha$  спрямо CMS + LPS моделната група (Фиг. 8).



Фигура 8. Ефекти на изследваните екстракти върху нивата на TNF- $\alpha$  в серуми от плъхове с модел на хроничен стрес, последван от LPS-индуцирано възпаление ( $^0P < 0,05$  сравнено с контролна група;  $*P < 0,05$  сравнено с CMS моделна група;  $\#P < 0,05$  сравнено с група с комбиниран модел на CMS + LPS)

Получените от нас резултати показват значимо по-високи нива на провъзпалителните цитокини TNF- $\alpha$  и IL-6 при животните подложени на комбинирания модел на CMS и LPS в сравнение с приложението на хроничен стрес или ендотоксин самостоятелно.

На фона на LPS-предизвиканото възпаление след модел на CMS многократното приложение на екстрактите от двете растения, както и комбинацията от тях показва изразен противовъзпалителен ефект. Смята се, че екстрактът от *Curcuma* действа като COX и NF- $\kappa$ B инхибитор и регулира нарушенията в НРА ос, като по този начин понижава продукцията на TNF- $\alpha$  (Bhutani et al., 2009; Tizabi et al., 2014; Xia et al.,

2006). Екстрактът от *Rhodiola* в нашият експеримент също проявява изразено противовъзпалително действие. Както за екстракта от куркума, така и за златния корен е известно, че нормализира функциите на HPA ос, което оказва влияние на нивата на TNF- $\alpha$  (Panossian et al., 2008; Perfumi and Mattioli, 2007). Lee и съавт. (2013) също наблюдават намаляване в нивата на TNF- $\alpha$  при LPS-индуцирано възпаление у мишки третирани перорално с *Rhodiola* 500 mg/kg.

Наблюдава се обратна зависимост между нивата на цитокините TNF- $\alpha$  и IL-6 при приложението на екстрактите в нашето изследване. Вероятно при нашия експеримент IL-6 има противовъзпалителна роля и неговото стимулирането е свързано с потискането на продукцията на TNF- $\alpha$  от приложението на *Rhodiola* и *Curcuma*.

Комбинацията от двата екстракта показва противовъзпалителен ефект при имунологичните тестове, което предполага синергизъм. Това наше твърдение е подкрепено от всички поведенчески тестове проведени през първата серия на експеримента, които също сочат синергизъм в ефектите на комбинацията от *Rhodiola* и *Curcuma*.

#### **4. Ефекти на Salidroside и Curcumin и комбинацията им при поведенчески тестове след модел на хроничен стрес**

##### **4.1. Ефекти върху промяната в телесното тегло на животните**

Контролните животни значимо покачват ( $P < 0,05$ ) теглото си от третата до шеста седмица от изследването. Групата, подложена на хроничен стрес, не променя значимо теглото си по време на експеримента спрямо началните стойности. Средното тегло на CMS моделната група е значимо по-ниско ( $P < 0,05$ ) спрямо контролата след втора седмица до края на изследването. Групите третирани с Fluoxetine, Salidroside, Curcumin и комбинацията от Salidroside и Curcumin не показват значими промени в теглото независимо от приложената доза в сравнение с CMS моделната група (Табл. 7).

По отношение на промяна в теглото нито едно от изследваните вещества не показва ефект както след еднократно, така и след многократно третиране. За флуоксетин е очаквана липсата на ефект върху телесното тегло. Нашите данни за ефекта на куркумин върху теглото при хроничен стрес са подкрепени от литературата. Хронично приложение на куркумин в доза 10 mg/kg при плъхове Wistar подложени на хроничен стрес също не води до значими промени в теглото (Jiang et al., 2013; Liu et al., 2014). В

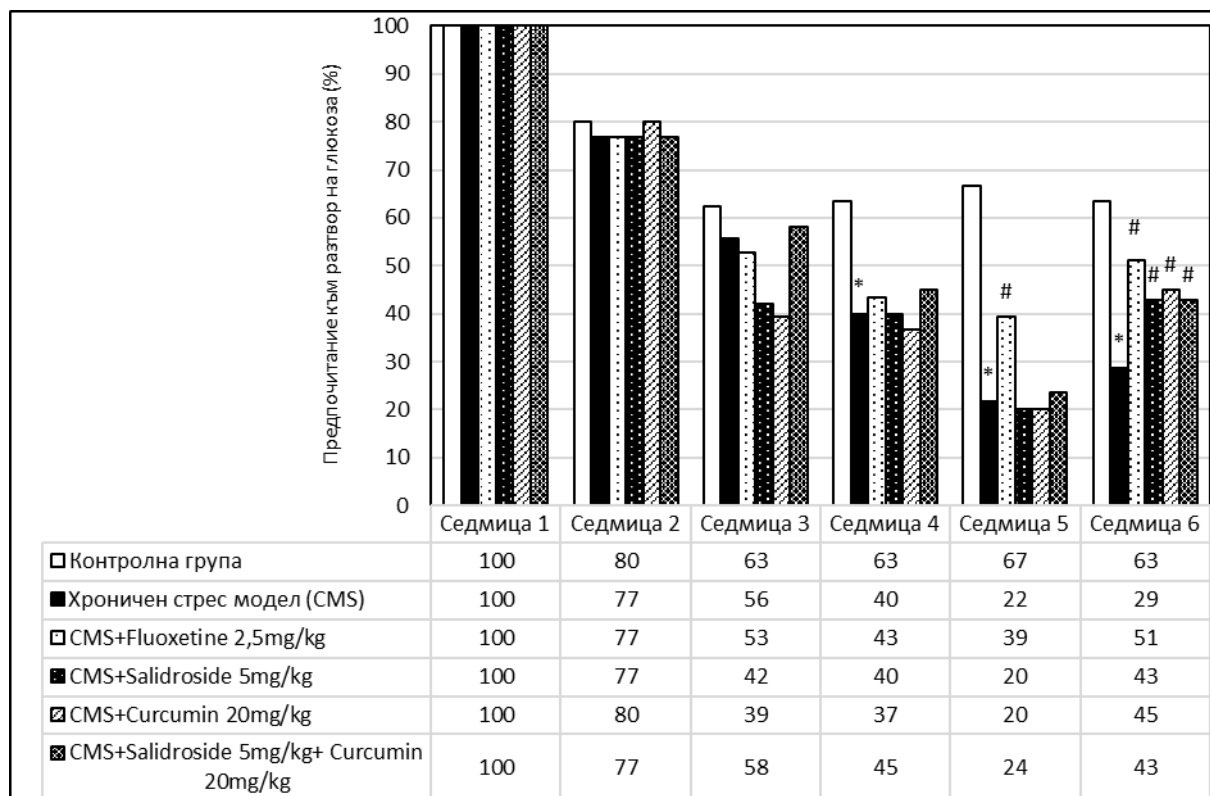
нашето изследване салидрозид проявява антистресов и антидепресивен ефект, без да повлиява теглото.

Таблица 7. Промени в телесното тегло на опитните животни при втората серия експериментални групи ( $^{\#}P < 0,05$  спрямо контролната група на първи ден;  $^*P < 0,05$  моделната група спрямо контролната на съответния ден)

Време на тестиране	Телесно тегло, g (mean $\pm$ SEM)					
	Първа седмица	Втора седмица	Трета седмица	Четвърта седмица	Пета седмица	Шеста седмица
Контролна група	158,75 $\pm$ 6,105	175,625 $\pm$ 6,299 $^{\#}$	196,875 $\pm$ 7,376 $^{\#}$	215,625 $\pm$ 6,439 $^{\#}$	225,625 $\pm$ 7,285 $^{\#}$	240 $\pm$ 7,50 $^{\#}$
CMS	149,38 $\pm$ 5,382	139,375 $\pm$ 3,946 $^*$	158,125 $\pm$ 4,426 $^*$	165,625 $\pm$ 4,575 $^*$	164,375 $\pm$ 4,057 $^*$	167,5 $\pm$ 2,988 $^*$
CMS + Fluoxetine 2,5 mg/kg	148,75 $\pm$ 4,407	133,75 $\pm$ 5,57	151,25 $\pm$ 3,75	156,88 $\pm$ 3,652	158,13 $\pm$ 4,719	171,88 $\pm$ 5,743
CMS + Salidroside 5 mg/kg	148,75 $\pm$ 3,374	147,5 $\pm$ 3,273	155 $\pm$ 4,33	161,25 $\pm$ 5,57	160,63 $\pm$ 5,382	168,75 $\pm$ 5,65
CMS + Curcumin 20mg/kg	143,75 $\pm$ 3,239	135 $\pm$ 6,05	146,88 $\pm$ 5,17	153,13 $\pm$ 7,192	156,88 $\pm$ 8,708	164,38 $\pm$ 8,683
CMS + Salidroside 5 mg/kg + Curcumin 20 mg/kg	151,25 $\pm$ 6,25	141,25 $\pm$ 6,731	152,50 $\pm$ 6,050	160,63 $\pm$ 6,777	162,50 $\pm$ 7,319	174,38 $\pm$ 8,986

#### 4.2. Промяна в предпочитанието към 2% разтвор на глюкоза

При контролната група предпочитанието към 2% разтвор на глюкоза спада от 100% при началното измерване до 63% през трета седмица и до края на изследването запазва близки нива. CMS моделната група значимо понижава ( $P < 0,05$ ) предпочитанието към сладкия разтвор спрямо контролната група през 4-та, 5-та и 6-та седмица. Групата, третирана с Fluoxetine в доза 2,5 mg/kg, използвана като позитивна контрола по отношение на антидепресантното действие, статистически значимо повишава предпочитанието към глюкоза ( $P < 0,05$ ) както след еднократно, така и след многократно 8 дневно приложение в сравнение с моделната група. Групите третирани с веществата Salidroside в доза 5 mg/kg, Curcumin в доза 20 mg/kg и комбинацията от тях показват значимо повишение в нивата на предпочитание към разтвор на глюкоза ( $P < 0,05$ ) спрямо моделната група само след многократно 8 дневно приложение (Фиг. 9).



Фигура 9. Ефекти на изследваните вещества при теста за предпочитание към 2% разтвор на глюкоза при втората серия експериментални групи (\* $P < 0,05$  спрямо контролна група; # $P < 0,05$  спрямо CMS моделна група)

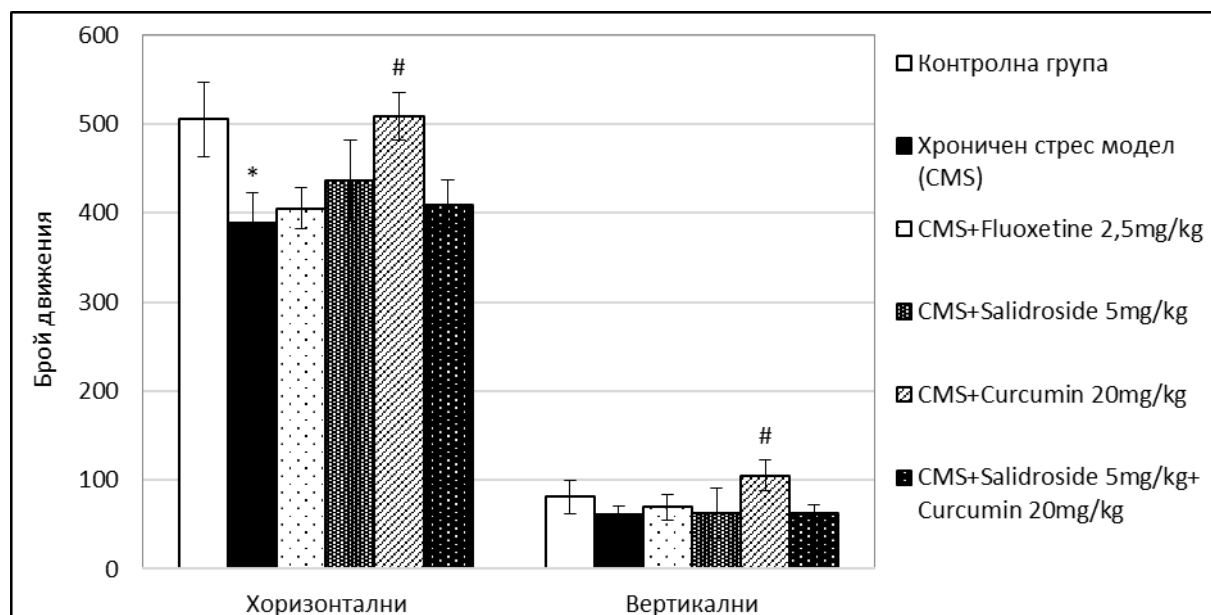
Състоянието на анхедония предизвикано от модела на хроничен стрес при еднократно приложение на веществата се повлиява само от флуоксетин. Вероятно този бърз ефект се дължи на повлияване на стрес индуцираната секреция на кортикостерон при теста за предпочитание към захароза/глюкоза (Kubera et al., 2013). Имайки предвид краткия полуживот на салидрозид, вероятно при използваната от нас доза не се достига достатъчна концентрация, за да се прояви анти-стресов ефект след еднократно приложение. Подобно предположение може да се даде и за липсата на ефект при еднократно приложение на куркумин. В наличната ни литература не са открити данни от подобни изследвания за салидрозид, куркумин или комбинацията им, разглеждащи ефекта от еднократното им приложение при стрес и депресия.

След многократно осемдневно третиране нашите резултати по отношение на анхедонията показват изразен ефект на изследваните вещества салидрозид и куркумин сравним в този на флуоксетин. Флуоксетин очаквано засилва антидепресантния си ефект, свързано вероятно с повлияване на серотониновата медиация. Салидрозид и куркумин проявяват еднакво значим антидепресивен ефект както

самостоятелно, така и в комбинация. По отношение на ефекта на салидрозид при модел на депресия данните в научната литература са оскъдни. Ефектът на куркумин за намаляване на анхедонията в нашето изследване може да се обясни с регулиране в активността на НРА ос и повлияване в нивата на стрес хормоните – главно кортикостерон.

#### 4.3. Промяна в локомоторната активност

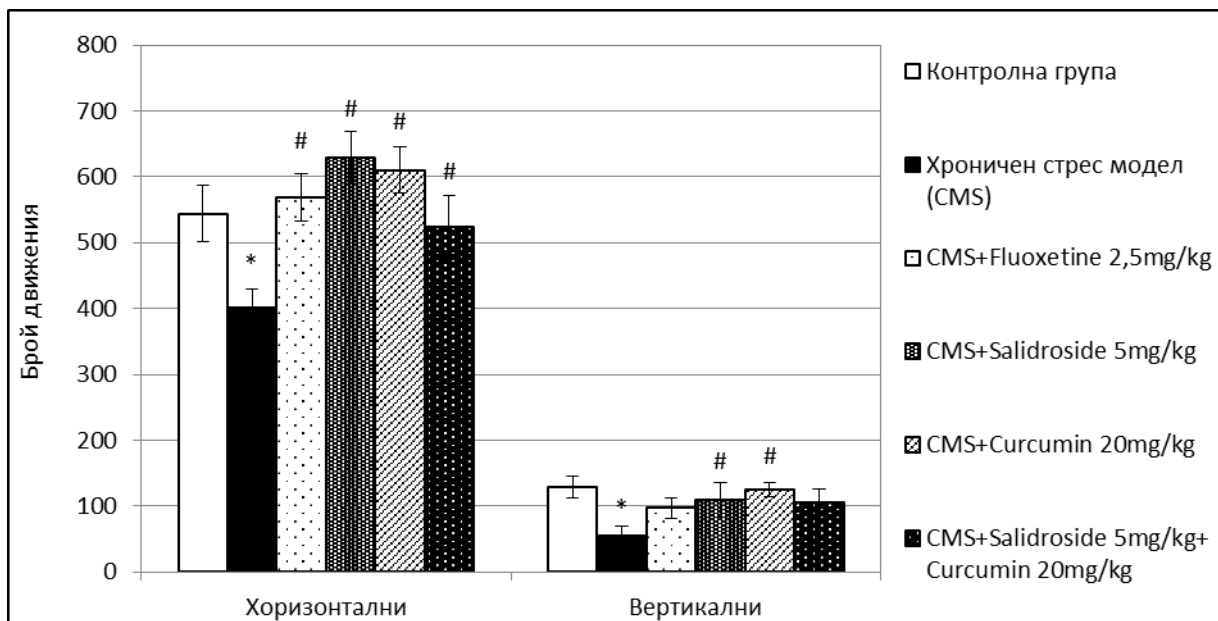
При теста за локомоторна активност на първия ден от пета седмица CMS моделната група показва значимо понижени ( $P < 0,05$ ) хоризонтални движения в сравнение с контролната група. Животните, подложени на CMS и третирани с Curcumin в доза 20 mg/kg еднократно, показват значимо по-високи стойности ( $P < 0,05$ ) както за хоризонталните така и за вертикалните движения в сравнение с моделната група. Групите, подложени на CMS и третирани еднократно съответно с Fluoxetine в доза 2,5 mg/kg, Salidroside в доза 5 mg/kg и комбинация от двете вещества не показват значима разлика в хоризонталната или вертикална активност спрямо моделната група (Фиг. 10).



Фигура 10. Ефекти на изследваните активни компоненти при тест открито поле за отчитане промяната в локомоторната активност след еднократно третиране с изследваните вещества (\* $P < 0,05$  спрямо контролната група; # $P < 0,05$  спрямо CMS моделната група)

При теста за локомоторна активност на първия ден от шеста седмица CMS моделната група значимо понижава ( $P < 0,05$ ) броя хоризонтални и вертикални движения в сравнение с контролната група. Групите,

подложени на CMS и третирани многократно в продължение на 8 дни съответно с Fluoxetine в доза 2,5 mg/kg, Salidroside в доза 5 mg/kg, Curcumin в доза 20 mg/kg и комбинация от двете растителни вещества, значимо повишават ( $P < 0,05$ ) хоризонталната локомоторна активност в сравнение с моделната група. След осемдневно третиране повишаване във вертикалната активност е отчетено за всички експериментални групи в сравнение с моделната група, но то е статистически значимо ( $P < 0,05$ ) само за групите третирани със Salidroside в доза 5 mg/kg и Curcumin в доза 20 mg/kg (Фиг. 11).



Фигура 11. Ефекти на изследваните активни компоненти при теста открито поле за отчитане промяната в локомоторната активност след многократно 8-дневно третиране с изследваните вещества (\* $P < 0,05$  спрямо контролната група; # $P < 0,05$  спрямо CMS моделната група)

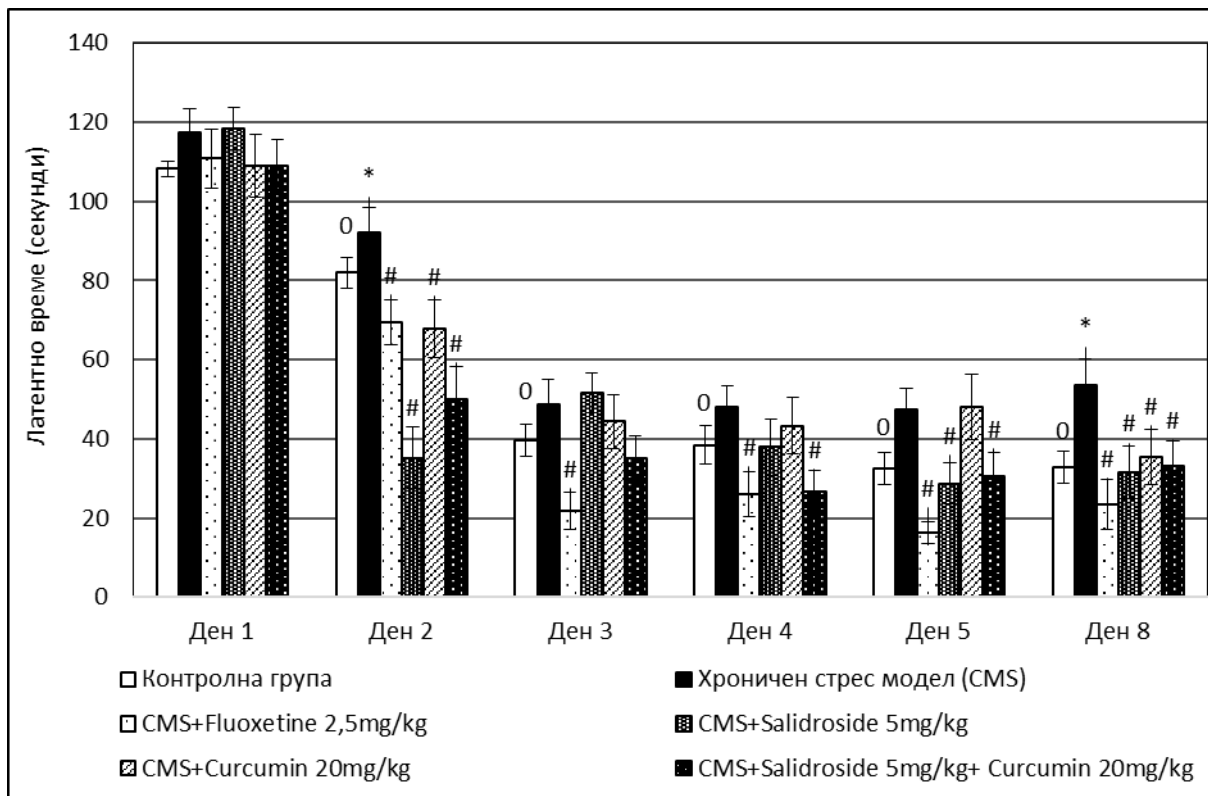
Нашите резултати от теста за оценка на двигателната активност показват потискане на хоризонталните и вертикалните движения, индуцирано от модела на хроничен стрес, което се запазва и седмица след прекратяване на стреса. Известно е, че хроничният стрес потиска общата двигателна активност (Willner, 2005). Това стрес-индуцирано поведение е повлияно благоприятно при еднократно третиране с куркумин. Куркуминът повишава както вертикалната, така и хоризонталната активност след остро приложение. Това предполага бърз стимулиращ ефект върху общата двигателна активност, вероятно дължащ се на бързо понижаване в стрес хормоните.

След многократно приложение не само куркумин, но и флуоксетин и салидрозид премахват стрес-индуцираното нарушение в двигателната активност. Салидрозид и куркумин, прилагани самостоятелно или в комбинация, повишават интензитета на хоризонталните и вертикални движения в степен надвишаваща тази на флуоксетин, а също и тази на контролните животни. Това предполага, че освен антистресов и антидепресивен ефект, двете вещества притежават и собствен стимулиращ ефект.

Като обобщение на резултатите от поведенческите тестове след модела на хроничен стрес можем да кажем, че при многократно осемдневно приложение салидрозид и куркумин проявяват изразен антидепресивен ефект както самостоятелно, така и в комбинация. Този антидепресивен ефект е сравним с действието на класическия антидепресант флуоксетин. Най-силен стимулиращ двигателната активност ефект проявява куркумин.

#### **5. Ефекти на Salidroside и Curcumin и комбинацията им върху процесите на обучение и памет при тест воден лабиринт след модел на хроничен стрес**

Контролната група значимо понижава латентното време за откриване на платформата ( $P < 0,05$ ) през всички дни на обучителната сесия и при теста за памет, в сравнение с първия обучителен ден. CMS моделната група показва по-високи стойности на латентното време спрямо контролната група на съответния ден, но статистически значими ( $P < 0,05$ ) бяха разликите на 2-ри и 8-ми ден. Животните третираны Fluoxetine в доза 2,5 mg/kg значимо понижават времето за откриване на платформата ( $P < 0,05$ ) спрямо моделната група по време на обучителната сесия и при теста за памет. Третираните със Salidroside в доза 5 mg/kg значимо съкращават латентно време ( $P < 0,05$ ) спрямо моделната група на 2-ри, 5-ти и 8-ми ден. Групата, третирана с Curcumin в доза 20 mg/kg, значимо понижава латентното време ( $P < 0,05$ ) спрямо моделната група на 2-ри ден от обучението и при теста за памет. Животните, третираны с комбинация от Salidroside в доза 5 mg/kg и Curcumin в доза 20 mg/kg, значимо понижават времето за откриване на платформата ( $P < 0,05$ ) спрямо моделната група на 2-ри, 4-ти и 5-ти ден от обучителната сесия и при теста за памет (Фиг. 12).



Фигура 12. Ефекти на изследваните активни компоненти при тест воден лабиринт при втората серия експериментални групи ( $P < 0,05$  моделна група спрямо контролна група; # $P < 0,05$  спрямо CMS моделна група)

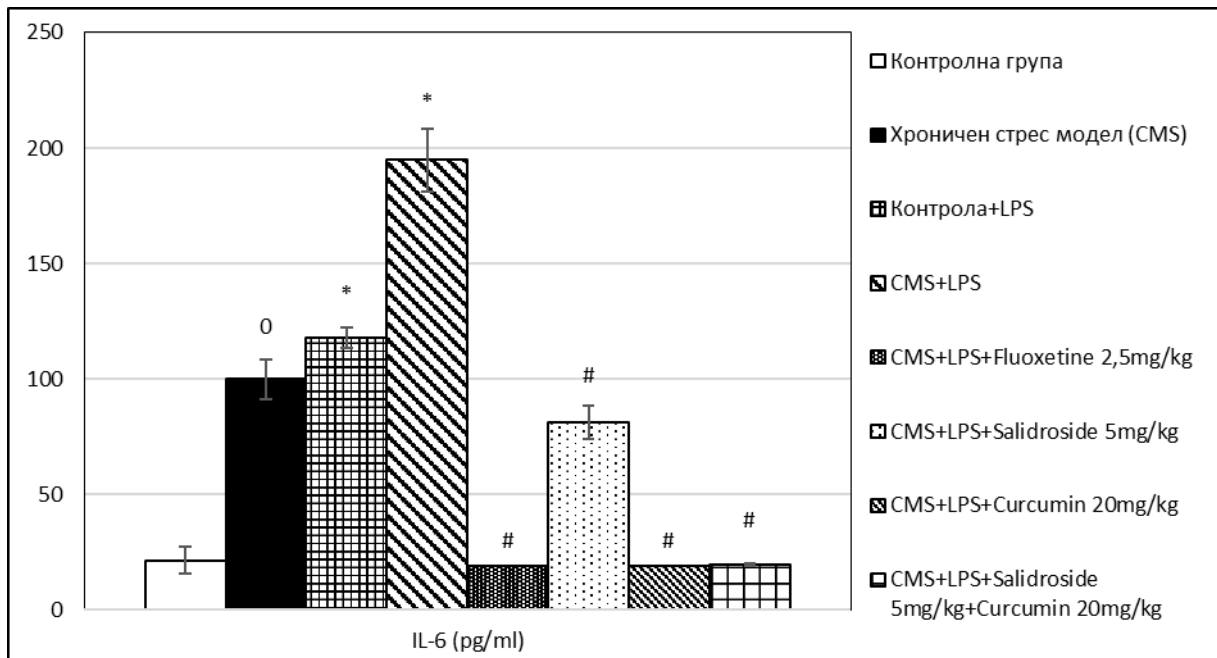
В нашето изследване флуоксетин подобрява процеса на обучение и засилва извикването на паметови следи. Получените от нас данни са подкрепени от намерените в литературата. Експериментални данни на други автори също показват положителния ефект на флуоксетин върху пространствената ориентация и паметта при тест воден лабиринт при наивни животни и при животни подложени на хроничен стрес (Gumuslu et al., 2013; Valluzzi and Chan, 2007). Салидрозид и куркумин, както и комбинацията им, премахват стрес-индуцираните паметови увреждания след многократно осемдневно третиране и дори може да предположим, че стимулират паметта. Този ефект на веществата е сравним с ефекта на флуоксетин. При комбинирано приложение веществата въздействат положително върху обучението и паметта по-бързо и в по-висока степен.

#### 6. Ефекти на Salidroside, Curcumin и комбинация от тях върху нивата на някои цитокини

Групите с модел на CMS и с LPS-индуцирано възпаление значимо повишават ( $P < 0,05$ ) серумни нива на IL-6 спрямо контролната група. Групата с модел на CMS и LPS показва значимо повишени нива на IL-6 ( $P < 0,05$ ) спрямо самостоятелно приложение на CMS и LPS. Групите, подложени на комбинирания CMS + LPS модел и третирани Salidroside в

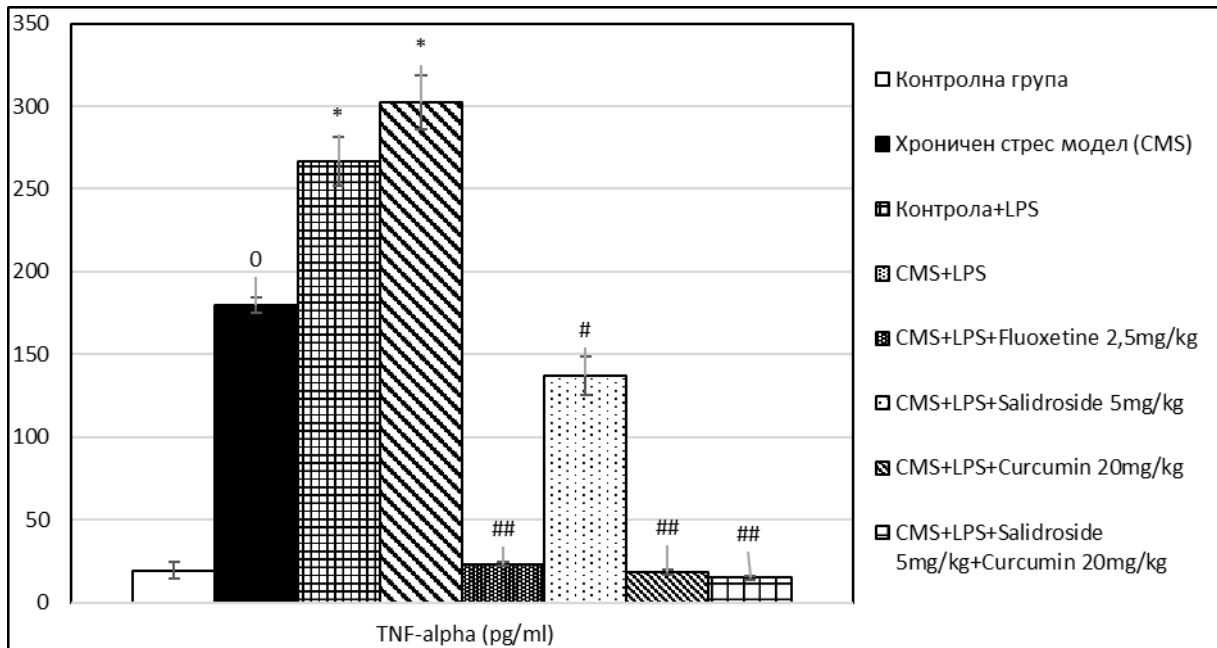


доза 5 mg/kg, и комбинацията от Salidroside в доза 5 mg/kg и Curcumin в доза 20 mg/kg значимо понижават ( $P < 0,05$ ) нивата на IL-6 спрямо моделната CMS + LPS група. Групите, подложени на комбинирания CMS + LPS модел и третирани Fluoxetine в доза 2,5 mg/kg и Curcumin в доза 20 mg/kg показват значимо понижени ( $p < 0,01$ ) нива на IL-6 спрямо моделната CMS + LPS група (Фиг. 13).



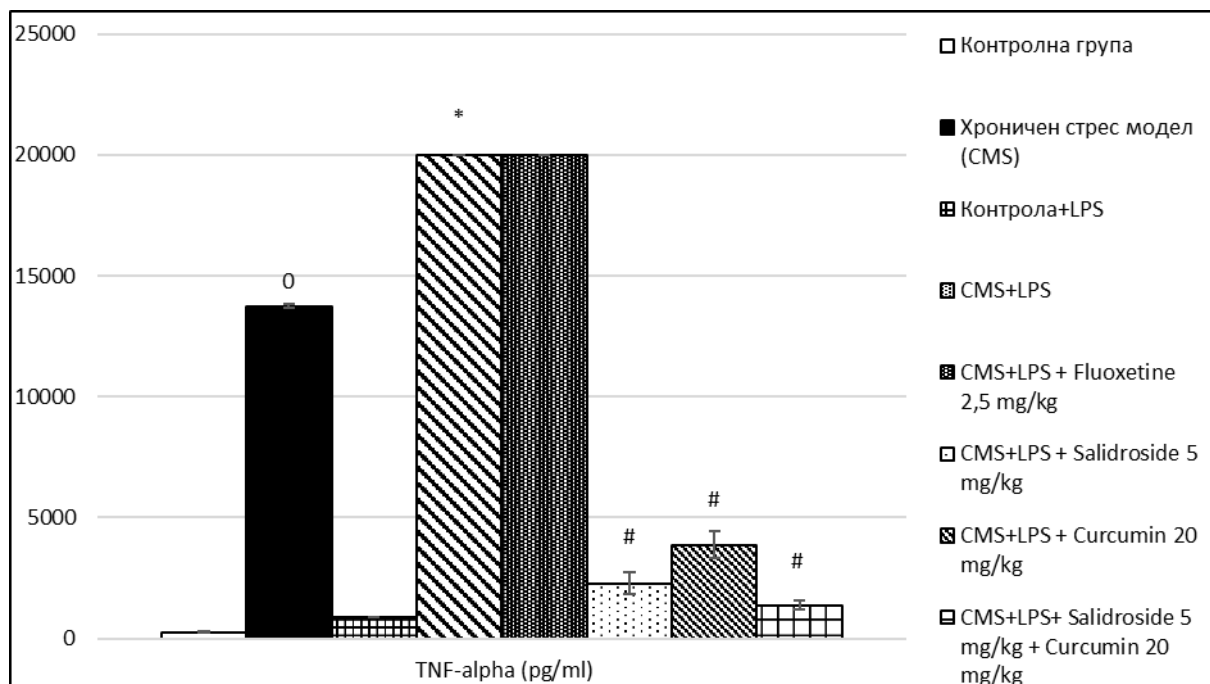
Фигура 13. Промяна в нивата на IL-6 в серуми от плъхове с модел на хроничен стрес, последван от LPS-индуцирано възпаление под влияние на изследваните активни компоненти ( $^0P < 0,05$  сравнено с контролна група;  $*P < 0,05$  сравнено с CMS моделна група;  $\#P < 0,05$  сравнено с група с комбиниран модел на CMS + LPS)

Групите с модел на CMS и с LPS-индуцирано възпаление значимо повишават ( $P < 0,05$ ) серумните нива на TNF- $\alpha$  спрямо контролната група. Групата с комбиниран модел на CMS последван от инжектиране на LPS показва значимо повишени нива на TNF- $\alpha$  ( $P < 0,05$ ) спрямо самостоятелно приложение на CMS. Групата, подложена на комбинирания CMS + LPS модел и третирана Salidroside в доза 5 mg/kg значимо понижава ( $P < 0,05$ ) нивата на TNF- $\alpha$  спрямо моделната CMS+LPS група. Групите, подложени на комбинирания CMS + LPS модел и третирани Fluoxetine в доза 2,5 mg/kg, Curcumin в доза 20 mg/kg и комбинацията от Salidroside и Curcumin значимо понижават ( $p < 0,01$ ) нивата на TNF- $\alpha$  спрямо моделната CMS+LPS група (Фиг. 14).



Фигура 14. Промени в нивата на TNF- $\alpha$  в серуми от плъхове с модел на хроничен стрес, последван от LPS-индуцирано възпаление под влияние на изследваните компоненти (<sup>0</sup>P < 0,05 сравнено с контролна група; \*P < 0,05 сравнено с CMS моделна група; #P < 0,05 сравнено с група с комбиниран модел на CMS + LPS; ##p < 0,01 сравнено с група с комбиниран модел на CMS+LPS)

Групата с комбиниран модел на CMS и LPS показва значимо повишени нива на TNF- $\alpha$  (P < 0,05) спрямо самостоятелно приложение на CMS или LPS както и спрямо контролната група в хомогенат от мозъчна тъкан (Фиг. 15). Групите, подложени на комбинация CMS + LPS модел и третирана със Salidroside в доза 5 mg/kg, Curcumin в доза 20 mg/kg и комбинацията от Salidroside в доза 5 mg/kg и Curcumin в доза 20 mg/kg показват значимо понижени (P < 0,05) нива на TNF- $\alpha$  спрямо моделната CMS + LPS група в мозъчни хомогенати. Животните подложени на комбинация CMS + LPS модел и третирани Fluoxetine в доза 2,5 mg/kg не показват значими промени в нивата на TNF- $\alpha$  в мозък спрямо моделната CMS + LPS група (Фиг. 15).



Фигура 15. Промени в нивата на TNF- $\alpha$  в хомогенат от мозъчна тъкан от плъхове с модел на хроничен стрес, последван от LPS-индуцирано възпаление под влияние на изследваните компоненти салидрозид и куркумин ( $^0P < 0,05$  сравнено с контролна група;  $*P < 0,05$  сравнено с CMS моделна група;  $\#P < 0,05$  сравнено с група с комбиниран модел на CMS + LPS)

При сравняване на данните за нивата на TNF- $\alpha$  в серум и мозък се откроява значимата разлика между контролните животни и животните от моделната група с CMS. При предизвикване на имунна реакция чрез инжектиране на LPS на фона на CMS стойностите на цитокина допълнително се повишават значимо както спрямо контролните, така и спрямо CMS моделната група.

След многократно осемдневно третиране с Fluoxetine 2,5 mg/kg значимо се понижават нивата на TNF- $\alpha$  в серум, но не и в мозък. Експерименталните групи третирани с изследваните вещества салидрозид и куркумин понижават TNF- $\alpha$  след осемдневно третиране както в серум, така и в мозък. Комбинацията от двете вещества показва още по-изразен противовъзпалителен ефект върху нивата на TNF- $\alpha$  както периферно, така и централно (Табл. 8).

Таблица 8. Сравнителна таблица на нивата на TNF- $\alpha$  в серум и хомогенат от мозъчна тъкан от плъхове с модел на хроничен стрес, последван от LPS-индуцирано възпаление под влияние на изследваните компоненти салидрозид и куркумин. (<sup>0</sup>P < 0,05 сравнено с контролна група; \*P < 0,05 сравнено с CMS моделна група; #P < 0,05 сравнено с група с комбиниран модел на CMS+LPS; ##P < 0,01 сравнено с група с комбиниран модел на CMS + LPS)

	TNF- $\alpha$ , pg/ml (mean $\pm$ SEM)	
	Серум	Мозък
Контролна група	19,332 $\pm$ 5,157	251,50 $\pm$ 27,54
Хроничен стрес модел (CMS)	180 $\pm$ 4,658 <sup>0</sup>	13733,92 $\pm$ 567,8 <sup>0</sup>
Контрола + LPS	266,8 $\pm$ 14,496	877,58 $\pm$ 77,95
CMS + LPS	302,2 $\pm$ 16,460 *	20000 $\pm$ 0 *
CMS + LPS + Fluoxetine 2,5 mg/kg	23,394 $\pm$ 1,435 ##	20000 $\pm$ 0
CMS + LPS + Salidroside 5 mg/kg	136,88 $\pm$ 11,79 #	2286,90 $\pm$ 442,44 #
CMS + LPS + Curcumin 20 mg/kg	18,455 $\pm$ 1,745 ##	3877,056 $\pm$ 544,07 #
CMS + LPS + Salidroside 5 mg/kg + Curcumin 20 mg/kg	15,038 $\pm$ 1,358 ##	1374,60 $\pm$ 198,68 #

На фона на комбинирания модел на CMS+LPS след многократно осемдневно приложение най-силно изразен противовъзпалителен ефект проявяват флуоксетин и куркумин. За флуоксетин е известно от множество предклинични и клинични проучвания, че потиска продукцията на провъзпалителни цитокини (Kubera et al., 2011; Liu et al., 2011; Maes, 2001; Song et al., 2009). Флуоксетин намалява продукцията на TNF- $\alpha$  *in vitro* след приложение на LPS (Liu et al., 2011). Куркумин в нашето изследване силно потиска продукцията на TNF- $\alpha$  и IL-6 периферно и централно. Показания от нас противовъзпалителен ефект вероятно има роля в осъществяване на антидепресантен ефект при хроничен стрес. Нашите резултати са в съгласие с данни от други автори (Goel et al., 2008; Lopresti et al., 2014; Rinwa et al., 2013; Wang et al., 2014). Tizabi и съавт. (2014) доказват протективен ефект на куркумин при LPS-индуцирано възпаление *in vitro* и отдават антидепресивните му свойства на изразената му противовъзпалителна активност. Салидрозид приложен самостоятелно или в комбинация с куркумин също намалява нивата на изследваните от нас цитокини в значителна степен. Нашите данни за салидрозид показват вероятна имуномодулираща активност на салидрозид изразена в умерено потискане на възпалителната реакция при хроничен стрес. Приложението на салидрозид *in vitro* има положителен ефект върху имунната реакция.

Zhao и съавт. (2013) показват, че салидрозид стимулира както клетъчния, така и хуморалния имунитет.

Приложени в комбинация салидрозид и куркумин в нашето изследване показват силен синергизъм по отношение на противовъзпалителен ефект при LPS предизвикана имунна възпалителна реакция както периферно така и в мозък.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въведеният от нас модел на лек хроничен стрес на плъхове е удачен за изследване на поведенческите ефекти на стандартизираните екстракти от растенията *Rhodiola rosea* L. и *Curcuma longa* L., тъй като индуцира при гризачи състояние, подобно на депресията при хора. Един от ключовите симптоми на депресията е т. нар. анхедония, т.е. липса на удоволствие от живота. Установените от нас ефекти на изследваните растителни екстракти и техните активни компоненти салидрозид и куркумин и способността им да антагонизират поведенческите феномени, съответстващи на прояви на анхедония, са от съществено значение не само като теоретичен факт, но и с потенциална клинична значимост. Тези вещества се произвеждат индустриално и са разрешени за употреба в редица държави.

Интересен е установеният от нас факт, че растителните екстракти от *Rhodiola rosea* L. и *Curcuma longa* L. проявяват стимулиращ ефект върху локомоторната активност на плъхове с модел на лек хроничен стрес, вероятно дължащ се на стимулиране продукцията на биогенни амини в мозъка на гризачите и то предимно на норадреналина. Намерените данни с потвърдителен характер за ефекта на екстракта от *Rhodiola rosea* L. върху паметовите процеси са нови поради факта, че е използван метод, различен от този в литературните източници – воден лабиринт, показващ повлияване на хипокампа като водеща мозъчна структура за запаметяване на пространствената ориентация. Намалването на ефекта на хроничния стрес от прилагането на екстракт от *Curcuma longa* L. върху пространствената памет е ново, неописано до сега в литературата. Ефектът на комбинацията на тези два екстракта е синергичен, което представлява не само експериментален, но също и клиничен интерес.

Изследваните от нас активни компоненти салидрозид и куркумин проявяват стимулиращ ефект върху локомоторната активност, както и върху пространственото ориентиране на гризачите с модел на стрес. Особено благоприятен е факта, че ефектът от комбинирането им е синергизъм.

Напоследък в литературата се срещат множество данни, сочещи участието на имунната система и промяна в продукцията на цитокини при депресивните състояния и състоянията на хроничен стрес. Установеното в нашите експерименти потискане на продукцията на IL-6 и TNF- $\alpha$  от

растителните екстракти на *Rhodiola rosea* L. и *Curcuma longa* L., както и на активните им компоненти салидрозид и куркумин, е в подкрепа на тези твърдения. Те предполагат възможното лечебно приложение на тези екстракти или техните активни компоненти при състояния на продължителен лек хроничен стрес като адаптогени и фито-антидепресанти.

## ИЗВОДИ

1. Екстрактите от *Rhodiola rosea* L. и *Curcuma longa* L., проявяват противовъзпалителен ефект върху модел на карагенин-индуциран оток и антипролиферативно действие при теста “cotton pellet”.
2. Екстрактът от *Rhodiola rosea* L. инхибира поведенческите и физиологични феномени, предизвикани от модела на хроничен стрес, докато екстрактът от *Curcuma longa* L. не показва такъв ефект. Комбинацията от тях проявява синергичен ефект.
3. Изследваните растителни екстракти и комбинацията им антагонизират потиснатата хоризонтална двигателна активност, но не променят вертикалните движения при животни, подложени на хроничен стрес.
4. Екстрактите от *Rhodiola rosea* L. и *Curcuma longa* L., както и комбинацията им премахват стрес предизвиканото увреждане на пространствената памет при модел на хроничен стрес на плъхове, като ефектът на комбинацията е по-силен.
5. Върху модел на хроничен стрес и LPS-предизвикано възпаление изследваните екстракти и комбинацията от тях оказват противовъзпалителен ефект, като повишават нивата на IL-6 и в същото време потискат нивата на TNF- $\alpha$  в серум.
6. Салидрозид и куркумин, както и комбинацията им не променят телесното тегло на плъхове с модел на стрес нито при еднократно, нито при многократно прилагане, но антагонизират стрес-индуцираното потискане на проявите на анхедония, като предпочитанието към глюкозен разтвор при 8 дневно прилагане.
7. Салидрозид и в по-голяма степен куркумин, приложени самостоятелно предизвикаха стимулиращ ефект върху локомоторната активност на плъхове с модел на стрес.
8. Салидрозид и в по-малка степен куркумин показаха подобряващ ефект върху пространственото ориентиране и запаметяване на плъхове с модел на хроничен стрес. Ефектът на комбинацията им е синергичен.
9. Активните вещества салидрозид, куркумин и комбинация от тях показват противовъзпалителен ефект като потискат имунната реакция при модел на LPS-индуцирано възпаление при плъхове с модел на хроничен стрес като понижават нивата на IL-6 в серум и TNF- $\alpha$  в серум и мозъчна тъкан.



## ПРИНОСИ

### С предимно теоретичен характер

1. Доказано е благоприятно повлияване от изследваните растителни екстракти от *Rhodiola rosea* L. и *Curcuma longa* L. на поведението, телесното тегло, локомоторната активност и пространственото ориентиране на плъхове, подложени на хроничен стрес.
2. За първи път е показан синергичен ефект на комбинацията от два растителни екстракта върху поведението, локомоторната активност и пространственото ориентиране на плъхове, подложени на хроничен стрес.
3. За първи път са изследвани ефектите на растителните екстракти от *Rhodiola rosea* L. и *Curcuma longa* L. и комбинацията им върху нивата на цитокините IL-6 и TNF- $\alpha$  в серум и мозъчна тъкан на плъхове с модел на хроничен стрес.
4. Доказано е благоприятно повлияване от активните компоненти на изследваните растителни екстракти – салидрозид и куркумин по отношение на поведението, телесното тегло, локомоторната активност и пространственото ориентиране на плъхове, подложени на хроничен стрес.
5. За първи път са доказано благоприятно повлияване от салидрозид и куркумин върху пространствената памет на плъхове с модел на хроничен стрес, както и потискане на имунната реакция и проявата на противвъзпалително действие при комбинирането им.

### С предимно приложен характер

1. Адаптиран и въведен е модел на лек хроничен стрес на плъхове, удобен за изследване на вещества с потенциален адаптогенен и антидепресантен ефект.
2. Стандартизираните екстракти от *Rhodiola rosea* L. и *Curcuma longa* L. могат да намерят потенциално приложение при лечението на състояние на лек хроничен стрес в клинични условия.
3. Активните принципи на изследваните растителни екстракти – салидрозид и куркумин са подходящи за приложение при състояния на лек хроничен стрес поради изразеното си адаптогенно, антистресово и противвъзпалително действия.

## СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

### Научни статии

1. **Vassileva L**, Getova D. (2014). Effects of *Rhodiola rosea* L. standardized extract on nociceptive reactions and locomotor activity. *Trakia Journal of Sciences*, 12, (1), 119-122.
2. **Vasileva L**, Getova D. (2016) Herbal medicines in the treatment of post-traumatic stress disorder: a review. *IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR)*, 6(7):34-38.
3. **Vasileva L.**, Saracheva K., Sucuoglu E., Getova D. (2016) Establishment of chronic mild stress protocol as new animal model for the department of Pharmacology in Medical University Plovdiv, Conference book from Scientific Conference “Science and Youth 2016”, Medical University Plovdiv, Plovdiv, Bulgaria, 12-14 May 2016, pp. 23-27
4. Papagianni E., **Vasileva L.**, Dimitrova D. (2016), Anxiety and stress models in rodents, Conference book from Scientific Conference “Science and Youth 2016”, Medical University Plovdiv, Plovdiv, Bulgaria, 12-14 May 2016, pp. 12-18
5. **Vasileva L.**, Saracheva K., Ivanovska M., Petrova A., Sucouglu E., Murdjeva M., Getova D. (2017) Beneficial effect of chronic treatment with extracts from *Rhodiola rosea* L. and *Curcuma longa* L. on the immunoreactivity of animals subjected to chronic mild stress model. *Folia Medica* (in press)

### Публикувани разширени резюмета с импакт фактор

1. **Vassileva L.**, Getova D. (2015) Antinociceptive Effect of Two Adaptogenic Medicinal Plants in Rats. Poster presentation on 28th ECNP Congress 29.08.-01.09.2015, Amsterdam, Netherlands. Abstract in: *European Neuropsychopharmacology*, 25, suppl.2, P1.g.012, S244, **IF=4,369**
2. **Vasileva L.**, Getova D. (2016) Effect of Standardized Extracts from *Rhodiola rosea* L. and *Curcuma longa* L. in Chronic Mild Stress Model in Rats. Poster presentation on 29<sup>th</sup> ECNP Congress 17.09-20.09.2016, Vienna, Austria. Poster number P.4.c.004. Abstract in *European Neuropsychopharmacology*, 26, suppl.2, P.4.c.004, S614-615, **IF=4,409**

## **Съобщения, представени на научни форуми (конгреси, конференции и други)**

- 1. Vassileva L, Getova D. (2014).** Experimental study of standardized extract of *Rhodiola rosea* L. on cognitive functions in naive rats. Poster presentation on International workshop for young scientists in section “Stress and cognition: From Basic Mechanisms to Psychopathology” within Radboud Summer School 2014, Nijmegen, Netherlands, August 10-15, 2014.
- 2. Василева Л., Гетова Д. (2015)** Анти-ноцицептивен ефект на стандартизирани екстракти от *Rhodiola rosea* L. и *Curcuma longa* L. при плъхове. Устна презентация в рамките на Юбилейна научна конференция „Наука и Здраве“ по повод 70 годишнина от създаването на МУ Пловдив – Май 2015, Пловдив, България
- 3. Vassileva L., Getova D. (2015)** Evaluation of anti-inflammatory effect of two adaptogens: *Rhodiola rosea* L and *Curcuma longa* L. Poster presentation on 2<sup>nd</sup> International Conference on natural product utilization: From plants to pharmacy shelf (ICNPU) 14.10.-16.10.2015, Plovdiv, Bulgaria. Abstract in 2<sup>nd</sup> International Conference on natural product utilization, p.318, poster number 227.
- 4. Vasileva L., Saracheva K., Sucuoglu E., Getova D. (2016)** Establishment of chronic mild stress protocol as new animal model for the department of Pharmacology in Medical University Plovdiv, Oral presentation in Scientific Conference “Science and Youth 2016”, Medical University Plovdiv, Plovdiv, Bulgaria, 12-14 May 2016
- 5. Василева Л., Гетова Д. (2016)** Ефект на салидрозид и куркумин при модел на хроничен лек стрес при плъхове. Постерно съобщение в рамките на VI-ти Конгрес по Фармация, 13-16 Октомври 2016, гр. Сандански, България

## **Цитирания**

- 1. Vassileva L, Getova D. (2014).** Effects of *Rhodiola rosea* L. standardized extract on nociceptive reactions and locomotor activity. *Trakia Journal of Sciences*, 12, (1), 119-122.

**Цитирана от:** Desiga-Campos, M., Gonzalez-Trujano, M.E., Ventura-Martinez, R., Montiel-Ruiz, R.M., Angeles-Lopez, G.E., Brindis, F., 2016. Antihyperalgesic Activity of *Rhodiola rosea* in a Diabetic Rat Model. *Drug Dev. Res.* 36, 29–36. doi:10.1002/ddr.21289

**Научен проект по линия на „Старт на докторски програми“:**

- 1.** Водещ изследовател в СПД15/2015 на тема „Фармакологични ефекти на екстракти от две адаптогенни растения (*Rhodiola rosea* L и *Curcuma longa* L.) и активните им компоненти“ с ръководител проф. д-р Д. Гетова, дм, дмн

## SUMMARY

Stress is typically defined as a state of altered homeostasis. The stress response of the body is to restore normal physiological parameters of homeostasis or implement adaptation, reaching new levels of homeostasis - a state of allostasis (McEwen, 2007). Depending on the intensity of the stress factor and the duration of the stress, it can be divided into acute and chronic stress. While the state of acute stress is often compensated by the possibilities of the body to adapt, in the state of chronic stress over time may occur a number of physical, mental and emotional health complications.

More and more scientific data confirm the link between chronic stress, the development of depression and chronic inflammation. Despite the wide variety of drug classes for the treatment of depression, it is still a significant clinical problem. Current trend in the treatment of depression and stress-induced conditions is to look for effective plant preparations for the purpose of influencing them with a good safety profile in chronic use.

Adaptogenic substances are those which have the capacity to normalize body functions and enhance the body's systems that are affected by stress. Plant adaptogens are defined as substances that enhance the possibilities of the organism to adapt to environmental factors and avoid damage from such factors. The concept of adaptogenic action was proposed by Russian scientist Lazarev in 1947 and later on was developed through numerous experimental and clinical studies in the former Soviet Union in search of substances that increase the body's resistance to various damaging factors of physical, chemical or biological nature. In 1998 the US Food and Drug Administration (FDA) and in 2007 the European Medicines Agency (EMA) adopted the concept of adaptogenic action as a term for evaluation of traditional herbal medicinal preparations (eg.: Ginseng spp., Eleutherococcus spp., *Rhodiola rosea* L., *Schisandra chinensis* L., etc.) (EMA, 2008a).

*Rhodiola rosea* L. from the plant family Crassulaceae also known as golden root, is a plant adaptogen traditionally used to increase the organism's resistance to stress conditions. The roots of *Rhodiola rosea* L. and its major active component salidroside have been studied in numerous preclinical and clinical studies and have proven antioxidant potential and beneficial impact in a state of chronic fatigue.

*Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) or turmeric is a plant originating from India widely used in traditional medicine and as a spice in eastern diet. Roots of *Curcuma longa* L. and its main active component curcumin demonstrate a potent antioxidant, anticancer, antiinflammatory, neuroprotective and hepatoprotective activities.

Evaluation of the effects of standardized extracts of both plants and their main active ingredients in an experimental model of chronic stress in animals

will be not only a theoretical contribution, but also with potential clinical implementation in the treatment of depression and stress induced pathologies. Confirmation of the anti-inflammatory action of the studied extracts and their active substances in a model of systemic inflammation would be of a great significance. No evidence was found in the available literature for the combination of or comparing the effects of these two plant extracts and their active components.

In the scientific literature there was relatively few data on the pharmacological effects of extracts of *Rhodiola* and *Curcuma* and their active ingredients for treatment of cognitive deficits and inflammatory processes in chronic stress and depression, in particular the processes of learning and memory and the secretion of cytokines in experimental conditions. Similar data from Bulgarian authors was not found.

The aim of the present study was to investigate the pharmacological effects of the two plant extracts - *Rhodiola rosea* L. and *Curcuma longa* L. and their combination, as well as their respective active components salidroside and curcumin and their combination in a model of chronic mild stress in rats.

Our research will contribute to clarify the adaptogenic effects of the two herbal extract of *Rhodiola rosea* L. and *Curcuma longa* L. and their active components - Salidroside and Curcumin on the model of chronic mild stress, depression and inflammation. The effects of these adaptogenic plants on the levels of some cytokines will contribute to elucidate the molecular mechanisms of their action.

For the purpose of the study the following tasks were formulated:

1. Phytochemical characterization of the extracts of *Rhodiola rosea* L. and *Curcuma longa* L.
2. Pilot study of the anti-inflammatory action of the extracts of *Rhodiola rosea* L. and *Curcuma longa* L.
3. Study the effects of extracts of *Rhodiola rosea* L., *Curcuma longa* L., and combination of both plants on some physiological and behavioral parameters in rats subjected to chronic stress model.
4. Study the effects of extracts of *Rhodiola rosea* L., *Curcuma longa* L., and combination of them on learning and memory in rats exposed to chronic stress model.
5. Study the effects of extracts of *Rhodiola rosea* L., *Curcuma longa* L., and their combination in a model of LPS-induced inflammation by determining the levels of the cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin -6 (IL-6) in sera of rats exposed to chronic stress model.
6. Study the effects of the active ingredients from the plants - Salidroside and Curcumin and their combination on some physiological and behavioral parameters in rats subjected to chronic stress model.

7. Study the effects of Salidroside, Curcumin and a combination of both substances on processes of learning and memory in rats exposed to chronic stress model.

8. Study the effects of Salidroside, Curcumin and their combination in a model of LPS-induced inflammation by determining the levels of the cytokines tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in the sera of rats subjected to the model of chronic stress.

Our model of chronic mild stress in rats proved to be feasible to study effects of standardized extracts of *Rhodiola rosea* L. and *Curcuma longa* L., since it induces depression-like state in rodents. One of the key symptoms of depression is anhedonia, i.e. lack of enjoyment of life or lack of interest to rewarding stimuli. We have found that the studied extracts of both plants and their active components salidroside and curcumin possess the ability to antagonize the behavioral phenomena corresponding to the events of anhedonia.

Interestingly, our findings suggest that the plant extracts of *Rhodiola rosea* L. and *Curcuma longa* L. exhibit stimulatory effects on locomotor activity of rats in model of chronic mild stress, probably due to stimulation of the production of biogenic amines in the brain of rodents, mainly noradrenaline. This data about the effect of the extract of *Rhodiola rosea* L. on the memory processes is important because of the different method used for its evaluation. The water maze test is showing the influence of the hippocampus as a leading brain structure of storing spatial orientation. Attenuated symptoms of chronic stress by application of an extract of *Curcuma longa* L. on spatial memory is a new, not described up to now in the literature. These two extracts had synergistic effect, in spite of their different mechanisms of action, which could be not only of experimental but also of clinical interest. The studied active components salidroside and curcumin showed a stimulating effect on locomotor activity and spatial orientation of rodents.

Recently in the literature increasing amount of data is found indicating the involvement of the immune system and the change in cytokine production in depression and chronic stress. In our experiments we have established that the extracts of *Rhodiola rosea* L. and *Curcuma longa* L. stimulates the production of IL-6 and suppress the production of TNF- $\alpha$  in rats' sera. Furthermore, the active components salidroside and curcumin suppress the production of IL-6 in rats' sera and TNF- $\alpha$  in both serum and brain tissue.

This data suggests a possible therapeutic application of these extracts and their active components in conditions of prolonged chronic stress as adaptogens and natural antidepressants.

## **БЛАГОДАРНОСТИ КЪМ:**

Моят научен ръководител проф. д-р Д. Гетова, днм за високия ѝ професионализъм, академичност и експертиза в научната ѝ област, както и за подкрепата и проявеното търпение, без които този дисертационен труд не би бил възможен. За всичко, на което ме е научила и за възможностите, които отвори пред мен, сърдечно ѝ благодаря.

Членовете на научното жури – за отзивчивостта, високата им обективност и градивните коментари по дисертационния труд.

Ръководителите на катедрите по „Фармакология и клинична фармакология“ МФ и „Фармакология и лекарствена токсикология“ на ФФ при МУ – Пловдив и колегите ми за проявеното разбиране и по-специално на маг. фарм. К. Сарачева за помощта ѝ при осъществяване на експериментите.

Й. Коликова, В. Желязкова, Т. Томова и А. Манашилова за прецизната работа при осъществяване на експериментите и за това, че ми предадоха от своя опит и ме научиха на внимателно отношение към лабораторните животни.

Колегите от Катедрата по микробиология и имунология и по-специално на проф. д-р М. Мурджева, дм, д-р М. Ивановска и д-р А. Петрова за помощта при осъществяването на имунологичните експерименти.

Колегите от Института по Микробиология „Стефан Ангелов“ към БАН и по-специално на доц. М. Георгиев, дб и А. Марчев за помощта при осъществяване на фитохимичния анализ на изследваните екстракти.

Ръководството на ДЗЗД „Технологичен център по спешна медицина“, гр. Пловдив за съдействието при провеждане на тестовете за обучение и памет на животните.

Академичното ръководство на МУ – Пловдив за институционалната подкрепа и специално на ректора на МУ – Пловдив чл.-кор. проф. д-р Стефан Костянев, дмн и зам.-ректора по НИД проф. д-р Виктория Сарафян, дмн.

Моето семейство и близки за моралната подкрепа и проявеното търпение по време на написването на този дисертационен труд.