

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ

ФАРМАЦЕВТИЧЕН ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА "ХИМИЯ И БИОХИМИЯ"

МАРИАНА КАЦАРОВА

**ХИМИЧЕН СЪСТАВ, АНТИОКСИДАНТЕН ПОТЕНЦИАЛ И
БИОЛОГИЧНА АКТИВНОСТ НА РАСТЕНИЯ С
АНКСИОЛИТИЧНО ДЕЙСТВИЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „Доктор”
по докторска програма

Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активни вещества

Научен ръководител: Доц. Людмил Луканов, дх

Рецензенти:

Проф. Магдален Златанов, дт

Проф. Пантелей Денев, дхн

Пловдив 2017

Дисертационният труд е написан на 125 страници и е онагледен с 16 фигури и 17 таблици. Цитирани са 293 литературни източника. Експерименталните изследвания са проведени в катедрите „Химия и биохимия“ на ФФ при МУ Пловдив, в катедра „Фармакология и клинична фармакология“ на МФ при МУ Пловдив и „Институт по органична химия с център по фитохимия–БАН“, филиал Пловдив.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен катедрен съвет на катедра „Химия и биохимия“ на ФФ при МУ-Пловдив, състоял се на 10.04.2017 г.

Научно жури в състав:

доц. Людмил Луканов, дх, проф. Магдален Златанов, дт, проф. Пантелей Денев, дхн, доц. Стоянка Атанасова, дх, доц. д-р Илия Костадинов, дм

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на
в аудитория на МУ-Пловдив от часа.

Съдържание

I. Въведение	4
II. Цел и задачи	5
III. Материали и методи	6
IV. Резултати и обсъждане	10
V. Изводи	44
VI. Приноси	45
VII. Публикации по темата на дисертацията	46
VIII. Участия в научни форуми	47

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

АО	Антиоксидант
АОА	Антиоксидантна активност
АС1	Моделен екстракт 1
АС2	Моделен екстракт 2
АФК	Активни форми на кислорода
АФА	Активни форми на азота
БАВ	Биологично активни вещества
МАО	Моноамин оксидаза
<i>C. monogyna</i>	<i>Crataegus monogyna</i>
GABA	Гама аминокиселина
GAE	Галова киселина
HORAC	Hydroxyl Radical Averting Capacity
HPLC	Високоэффективна течна хроматография
<i>H. perforatum</i>	<i>Hypericum perforatum</i>
LOD	Граница на откриване
LOQ	Граница на определяне
<i>M. Officinalis</i>	<i>Melissa officinalis</i>
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
RSD	Коефициент на вариация
<i>S. coronata</i>	<i>Serratula coronata</i>
<i>V. officinalis</i>	<i>Valeriana officinalis</i>

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Тревожните разстройства и депресивните състояния се считат за една от основните причини за множество заболявания в световен мащаб. Те включват генерализирано тревожно разстройство, състояния като фобии, стрес в постменопауза, посттравматичен синдром, както и соматична и когнитивна дисфункция. Статистическите изследвания прогнозироват, че до 2020 година депресивните разстройства ще заемат второ място при психиатричните заболявания. Голяма част от тях се свързват с действието на оксидантите, които включват активните форми на кислород, азот, хлор, сяра и др. Свръхпроизводството на свободни радикали и нарушението в равновесието между про- и антиоксиданти води до процеси увреждащи клетките и предизвикващи заболявания, като стареене, депресия, различни злокачествени процеси, хронични възпаления, СПИН, захарен диабет, атеросклероза, хепатит, грип, последствия от инфаркт и инсулт, катаракт, невродегенеративни заболявания, грипна вирусна инфекция, бъбречни заболявания и много други. Конвенционалната терапия с анксиолитични лекарствени средства се счита за ефективна, безопасна и широкоспектрна, но страничните ефекти често намаляват желанието на пациентите за живот и ги обезсърчават да следват предписаната терапия. Поради това се предпочита употребата на природни антиоксиданти и растения с анксиолитично действие.

Лечебните растения се използват за лечение на тревожност и стрес и свързаните с тях нарушения, но не съществуват достатъчно токсикологични и фармакологични доказателства за това. Поради тази причина е необходимо провеждане на предклинични и клинични изследвания за качеството и действието на биологично активните вещества в лечебните растения и техни комбинации, както и съпоставянето им със синтетични анксиолитични лекарства.

Липсата на достатъчно информация за системно изследване на лечебните растения, по отношение на техния антиоксидантен потенциал и свързаните с него биологични активности, ни насочи към проучване на някои лечебни растения с анксиолитичен ефект и възможността за комбинираното им приложение при лечение на стрес, тревожни разстройства и функциите на нервната и сърдечно-съдовата система.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящата работа е:

Проучване състава на екстракти от валериана корен (*Valerianae radix*), маточина стрък (*Melissae herba*), глог цвят и лист (*Crataegi folium cum flore*), жълт кантарион стрък (*Hyperici herba*), сератула стрък (*Serratula herba*) и на получени от тях моделни екстракти AC1 и AC2, изследване на антиоксидантния им потенциал и доказване анксиолитичното им действие *in vivo* върху опитни животни.

За реализирането на тази цел бяха поставени следните задачи:

1. Разработване на хроматографски методи за определяне съдържанието на различни групи биологично активни вещества, които по European Pharmacopoeia 8.0 трябва да се съдържат в екстрактите от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba*, *Serratula herba*.

2. Валидиране на методите за определяне съдържанието на биологично активните вещества в екстрактите от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba*, *Serratula herba* и в моделните екстракти AC1 и AC2.

3. Изследване на антиоксидантната активност на моделните екстракти AC1 и AC2 и на включените в тях екстракти от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba*, *Serratula herba*.

4. Фармакологични изследвания *in vivo* върху опитни животни за доказване анксиолитичното действие на моделните екстракти AC1 и AC2 и на включените в тях екстракти от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba*, *Serratula herba*.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. **Растителен материал** - Валериана (*Valerianae radix*) корен, маточина (*Melissae herba*) стрък, глог (*Crataegi folium cum flore*) цвят и лист, жълт кантарион (*Hyperici herba*) стрък, сератула (*Serratula herba*) стрък. Дрогите са събрани през юли 2014 г. от Родопите-България и изсушени при спазване изискванията на European Pharmacopoeia 8.0. Моделният екстракт AC1 (Антистрес1[®]) е комбинация от растителните дроги *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore* и *Serratula herba* в съотношение 4:3:3:1, а моделният екстракт AC2 (Антистрес2[®]) – *Valerianae radix*, *Hyperici herba* и *Serratula herba* в съотношение 4.5:4.5:1. Дрогите и сухите екстракти са любезно предоставени от фирма „АВИЦЕНА ХЕРБ“ ООД.

1.2. **Опитни животни** - В опитите са използвани 250 мъжки плъха порода Wistar с тегло 180-200г (90 от животните за изследване на остра токсичност и 160 за анксиолитичен ефект). Животните са отглеждани при стандартни лабораторни условия: 12:12 часа тъмно-светъл цикъл, 45% относителна влажност на въздуха, температура 26.5±1°C и свободен достъп до храна и вода. Експериментите са одобрени от Комисията по етика към животните на Българската агенция по безопасност на храните с разрешително №127 и решение на етичната комисия при МУ-Пловдив с протокол №3/21.04.2016г.

2. Химични методи за екстракция

2.1. Екстракция в **лабораторни условия** - 200 mg изсушен и смлян растителен материал от всяка дрога се екстрахира с по 10 ml дестилирана вода, 40% и 70%-ен етилов алкохол по метода на мацерация в продължение на 4 часа при стайна температура или при 50°C.

2.2. Екстракция в **промишлени условия** - Екстрактите от отделните билки са получени по промишлена технология, разработена от фирма „ЕКСТРАКТФАРМА“ ЕООД гр. София.

3. Аналитични методи за анализ

3.1 Хроматографското определяне се провежда на HPLC система Varian, състояща се от помпа модел ProStar 230 и PDA детектор модел 335.

Разработени са два **HPLC метода**. По **Метод I** са определени розмаринова, р-кумарова, ферулова, кафеена киселини, рутин, кверцетин, апигенин, витексин и хиперозид, а по **Метод II** - валеренова киселина, борнил ацетат,

хиперицин и 20-хидроксибекдизон. Идентификацията на веществата се извършва по времената на задържане на стандартите. Количественото определяне е осъществено по метода на абсолютната калибровка.

3.2. Валидирането на HPLC методите е извършено по следните параметри: линейност, граница на откриване (LOD), граница на определяне (LOQ), точност и прецизност.

3.3. Определянето на общото количество полифенолни съединения се основава на редуциращото им действие върху смес от фосфоволфрамова ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) и фосфомолибденова ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) киселини, които се превръщат в смес от оксиди: вофлрамово синьо (W_8O_{23}) и молибденов оксид (Mo_8O_{23}). Полученото синьо оцветяване има максимална абсорбция при λ - 765 nm и е пропорционално на количеството на фенолните съединения (Singleton and Rossi, 1965).

3.4. Определянето на общото количество проантоцианидини е спектрофотометрично по метода на Sarneckis et al. (2006). Измерва се абсорбцията при 280 nm на танините преди и след тяхното утаяване с метилцелулоза.

3.5. Методи за определяне на антиоксидантна активност

3.5.1. Чрез Oxygen Radical Absorbance Capacity-метод се измерва способността на даден антиоксидант да неутрализира пероксидни радикали индуцирани от термичното разлагане на 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) при 37°C. Методът се основава на инхибирането в спада на флуоресценцията на флуоресцеин при окислението му в присъствие на антиоксидант (Ou et al., 2001).

3.5.2. При прилагане на Hydroxyl Radical Averting Capacity-метод се измерва комплексообразуващата способност на даден антиоксидант в условия на реакция на Fenton, предизвикана от взаимодействие между Co(II) и H_2O_2 . За една HORAC единица се приема площта под затихващата крива на флуоресценция на разтвор на галова киселина с концентрация 1 μM (Ou et al., 2002).

3.5.3. Определянето на антиоксидантната активност по Електрохимичен метод се състои в снемане на волтампереграма на катодна електроредукция на кислорода с помощта на "Анализатор АОА"(RU.C.31.113.A N28715), свързан с персонален компютър. Антиоксидантната активност на изследваните проби се оценява по кинетичен критерий K ($\mu\text{mol/l.min}$), който

отразява количеството на прореагиралите с пробата кислородни форми във времето (Korotkova et al., 2002).

4. ***In vivo* експериментални изследвания върху опитни животни на фармакологичните ефекти на моделните екстракти AC1 и AC2 и на включените в тях екстракти от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba*, *Serratula herba*.**

4.1. При изследване за **остра токсичност** на растителните екстракти са използвани 90 опитни животни, разделени в 15 групи по 6 животни. Животните се третира перорално еднократно с екстрактите в дози 5 и 10g/kg b.w. чрез използване на сонда. Отчита се преживяемостта на животните след 24 часа.

4.2. За **изследване на анксиолитичното действие** на комбинациите AC1 и AC2 и самостоятелните растителни екстракти са използвани 160 мъжки плъха порода Wistar, разделени в 23 групи. Дизайнът на експеримента е показан на табл.1.

След 14 дневно третиране с дестилирана вода, с двете комбинации и петте самостоятелни растителни екстракта в дози 100, 250 и 500 mg/kg b.w. на 15-я ден опитните животни (с изключение на контролата без стрес) се поставят в хладилник при температура 5°C в продължение на 1 час (модел на остър студов стрес). За изследването на анксиолитично действие се използва теста „Повдигнат кръстосан лабиринт” (Pellow and File, 1986). Изследванията се провеждат в апарат, показан на фиг. 1.



Фигура 1. Изображение на апарат Повдигнат кръстосан лабиринт за изследване на тревожността при плъхове

Критерии за анксиолитичен ефект на дадено изследвано вещество са: повишаване времето на престой в откритите рамена, намаляване времето на

престой в закритите рамена, повишаване броя влизания в откритите рамена, по-големи стойности на съотношението брой влизания в откритите рамена/общ брой влизания в откритите и закритите рамена.

Таблица 1. Дизайн на експеримента за изследване на анксиолитичното действие на моделните екстракти АС1 и АС2 и на включените в тях екстракти от отделните растителни дроги, при модел на остър стрес

Група	Легенда	Описание	Модел на остър стрес
1	К	Перорално дестилирана вода 10 ml/kg b. w.	Да
2	К ₀	Перорално дестилирана вода 10 ml/kg b. w.	Не
3	АС1 ₁₀₀	Перорално АС1 100 mg/kg b. w.	Да
4	АС1 ₂₅₀	Перорално АС1 250 mg/kg b. w.	Да
5	АС1 ₅₀₀	Перорално АС1 500 mg/kg b. w.	Да
6	АС2 ₁₀₀	Перорално АС2 100 mg/kg b. w.	Да
7	АС2 ₂₅₀	Перорално АС2 250 mg/kg b. w.	Да
8	АС2 ₅₀₀	Перорално АС2 500 mg/kg b. w.	Да
9	СЕР ₁₀₀	Перорално <i>Serratula herba</i> 100 mg/ kg b. w.	Да
10	СЕР ₂₅₀	Перорално <i>Serratula herba</i> 250 mg/ kg b. w.	Да
11	СЕР ₅₀₀	Перорално <i>Serratula herba</i> 500 mg/ kg b. w.	Да
12	КАН ₁₀₀	Перорално <i>Hyperici herba</i> 100 mg/kg b. w.	Да
13	КАН ₂₅₀	Перорално <i>Hyperici herba</i> 250 mg/ kg b. w.	Да
14	КАН ₅₀₀	Перорално <i>Hyperici herba</i> 500 mg/ kg b. w.	Да
15	ВАЛ ₁₀₀	Перорално <i>Valerianae radix</i> 100 mg/ kg b. w.	Да
16	ВАЛ ₂₅₀	Перорално <i>Valerianae radix</i> 250 mg/ kg b. w.	Да
17	ВАЛ ₅₀₀	Перорално <i>Valerianae radix</i> 500 mg/ kg b. w.	Да
18	ГЛЮ ₁₀₀	Перорално <i>Crataegi folium cum flore</i> 100 mg/ kg b. w.	Да
19	ГЛЮ ₂₅₀	Перорално <i>Crataegi folium cum flore</i> 250 mg/ kg b. w.	Да
20	ГЛЮ ₅₀₀	Перорално <i>Crataegi folium cum flore</i> 500 mg/ kg b. w.	Да
21	МАТ ₁₀₀	Перорално <i>Melissae herba</i> 100 mg/ kg b. w.	Да
22	МАТ ₂₅₀	Перорално <i>Melissae herba</i> 250 mg/ kg b. w.	Да
23	МАТ ₅₀₀	Перорално <i>Melissae herba</i> 500 mg/ kg b. w.	Да

5. Статистическата обработка на резултатите от химичния анализ и на данните от фармакологичния експеримент се осъществява със софтуерен продукт IBM SPSS 17.0.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

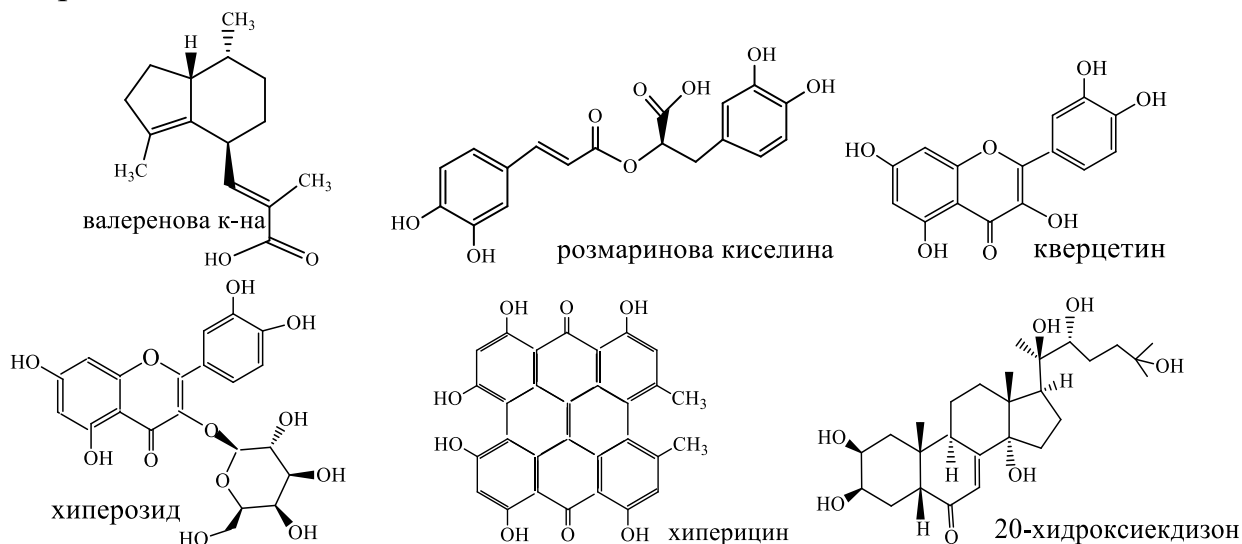
1. Разработване и валидиране на HPLC методи за определяне на биологично активни вещества в дрога и екстракти от лечебни растения

Традиционно фитопродуктите се регистрират като хранителни добавки, които не подлежат на същия контрол, както конвенционалните лекарства. За тях липсват пълни научни доказателства за безопасност и ефикасност, липсва регулаторен надзор, контрол на качеството и познания за комедикация (Cavaliere et al., 2010). Световната здравна организация подчертава необходимостта от създаване на стандарти за качество на хранителните добавки от растителен произход (WHO, 1998; Blumenthal et al., 2000). Според Calixto (2000) стандартизирането и контрола на качеството се постига трудно поради променливия химичен състав на активните вещества в суровия материал. Съдържанието на биологично активните компоненти е силно повлияно от следните фактори: генетичен (генотипове, хемотипове), физиологичен (фенология, възраст), околна среда (климат, излагане на слънчева светлина, наличие на вода, почва) и производствени условия (време на събиране, условия на съхранение и начин на обработка) (Gobbo-Neto et al., 2007; Sahoo et al., 2010). В допълнение на казаното, ефикасността и безопасността на лекарствата с растителен произход може да бъде засегната и поради погрешно им идентифициране или умишлено използване на фалшиви дроги и примеси с цел намаляване на разходите (Calixto, 2000; Sahoo et al., 2010). Petenatti и колектив (2014) съобщават за замяна на *Melissa officinalis* с *Nepeta cataria*. Първата е с високо съдържание на розмаринова киселина, доказан терапевтичен ефект и съответно висока изкупна цена, а втората съдържа минимални количества розмаринова киселина и дори някои токсични вещества. Отсъствието на контрол на природните продукти дава възможност за използване на некачествени билки, а това може да доведе до нежелани реакции и отсъствие на терапевтичен ефект. Липсата на регулаторен надзор за природните продукти е проблем както в световен мащаб, така и за България.

Качеството и автентичността на всяко лечебно растение, както и съставът на веществата определящи биологичната му активност са заложени в съответните действащи Фармакопеи. Световната здравна организация

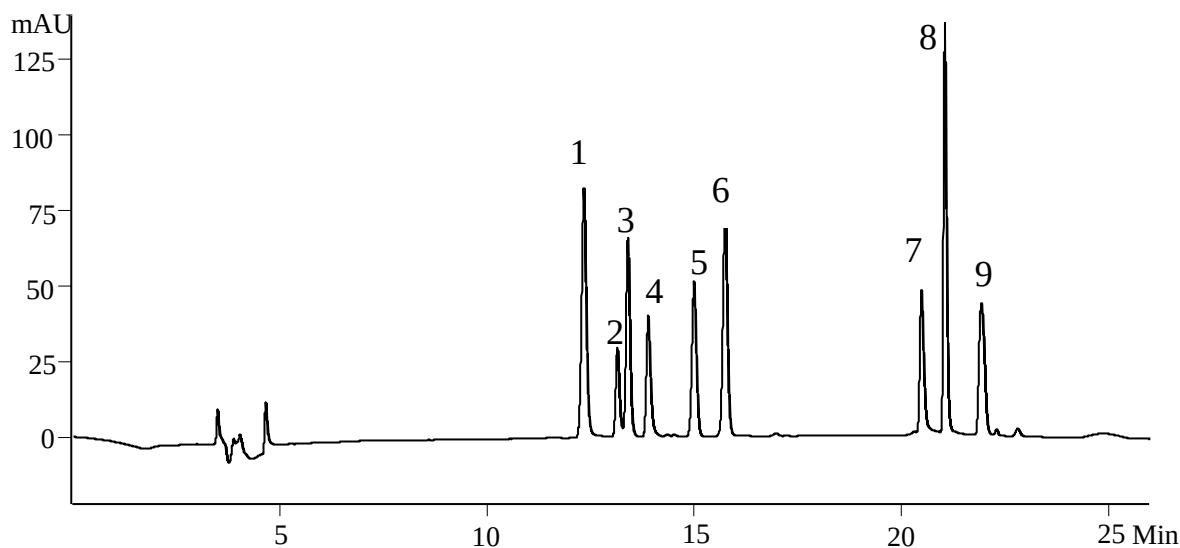
обобщава данните от различните издания за най-често използваните растения относно разпространение, механизъм на действие, токсичност, биологично активни вещества и методи за тяхното определяне. Сред най-често прилаганите методи за анализ на биологично активни вещества отговорни за това са хроматографските (Siddiqui et al., 2013). Редица автори предлагат HPLC методи за анализ на фенолни съединения (Meng et al., 2009; Pop et al., 2013), фитостероиди (Bakrim al., 2008), флаваноиди и антраценови производни (Saddiqe et al., 2011) като използват най-достъпния UV- детектор.

Въз основа описаните в литературата данни са разработени два течнохроматографски метода, чрез които количествено са определени розмаринова, валеренова, р-кумарова, ферулова и кафеена киселини, рутин, кверцетин, апигенин, витексин, хиперозид, борнил ацетат, хиперицин и 20-хидроксиекдизон в моделните екстракти AC1 и AC2 и в петте растителни дроги *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba* и *Serratula herba*. Действащата у нас European Pharmacopoeia 8.0 изисква наличието на определени количества от БАВ във всяка от drogите, с което се гарантира нейното качество и автентичност (количествено определяне само на някои от изискваните специфични биологично активни вещества). Според нея екстрактите от *Valerianae radix* трябва да съдържат 0.17 % валеренова киселина, тези от *Melissae herba* – 2.0 % розмаринова киселина, от *Crataegi folium cum flore* съответно 1.6 % общо флавоноиди, от *Hyperici herba* – 0.08 % хиперицин и *Serratula herba* – 2.0 % 20-хидроксиекдизон.



1.1. Метод I за определяне на фенолни киселини и флавоноиди

Имайки предвид структурата на веществата са подбрани подходящи колони (Hitachi LaChrom C₁₈ AQ за Метод I и Microsorb C₁₈ за Метод II) и комбинация от разтворители, което осигурява ефективно разделяне и идентифициране на търсените вещества. За определяне на съединенията от фенолен тип кафеена киселина, рутин, витексин, хиперозид, р-кумарова киселина, ферулова киселина, кверцетин, апигенин и розмаринова киселина е разработен Метод I. При описаните в частта „Материали и методи” условия за провеждане на анализа времената на задържане на веществата са съответно (min): кафеена киселина – 12.32, рутин – 13.13, витексин – 13.38, хиперозид – 13.87, р-кумарова киселина – 14.98, ферулова киселина – 15.73, кверцетин – 20.46, апигенин -21.03 и розмаринова киселина -21.91. На фиг. 2 е представена хроматограма на моделна смес с концентрация на веществата 10µg/ml.



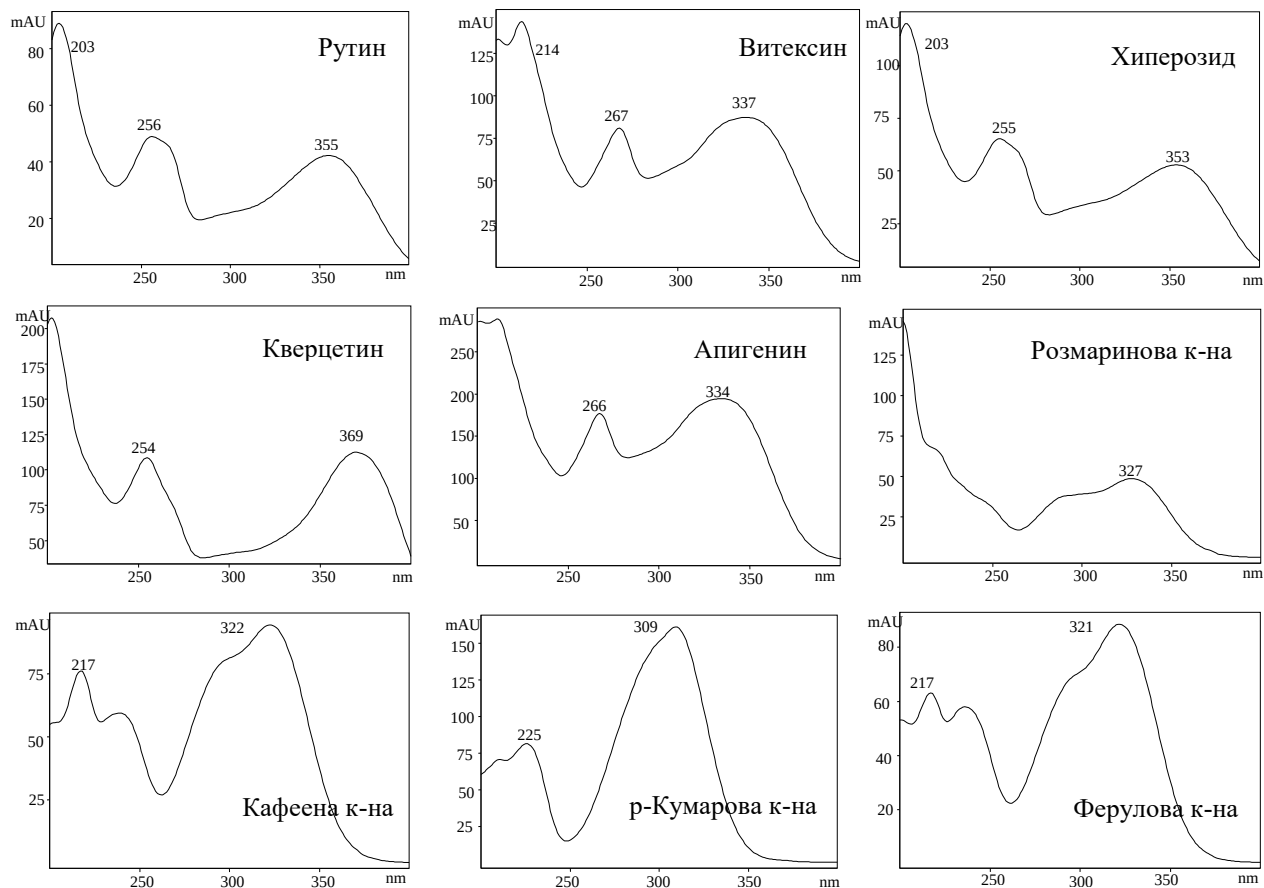
Фигура 2. Хроматограма на моделна смес от фенолни киселини и флавоноиди (кафеена к-на-1, рутин-2, витексин-3, хиперозид-4, р-кумарова к-на-5, ферулова к-на-6, кверцетин-7, апигенин-8 и розмаринова к-на-9)

Разделянето на деветте вещества е постигнато чрез градиентен режим на подаване на подвижната фаза и скорост на потока от 0.9 ml/min (табл. 2).

Таблица 2. Работна програма на помпата за хроматографско разделяне на фенолни киселини и флавоноиди

Време, min	Елуенти, %	
	А	В
0	90	10
16	60	40
18	10	90
23	10	90
26	90	10

Записът на хроматограмата е направен при 335nm. При тази дължина на вълната изследваните вещества имат оптимална абсорбция (фиг.3). Освен по времената на задържане те са идентифицирани и чрез сравняване на абсорбционните им спектри с тези на стандартните вещества.

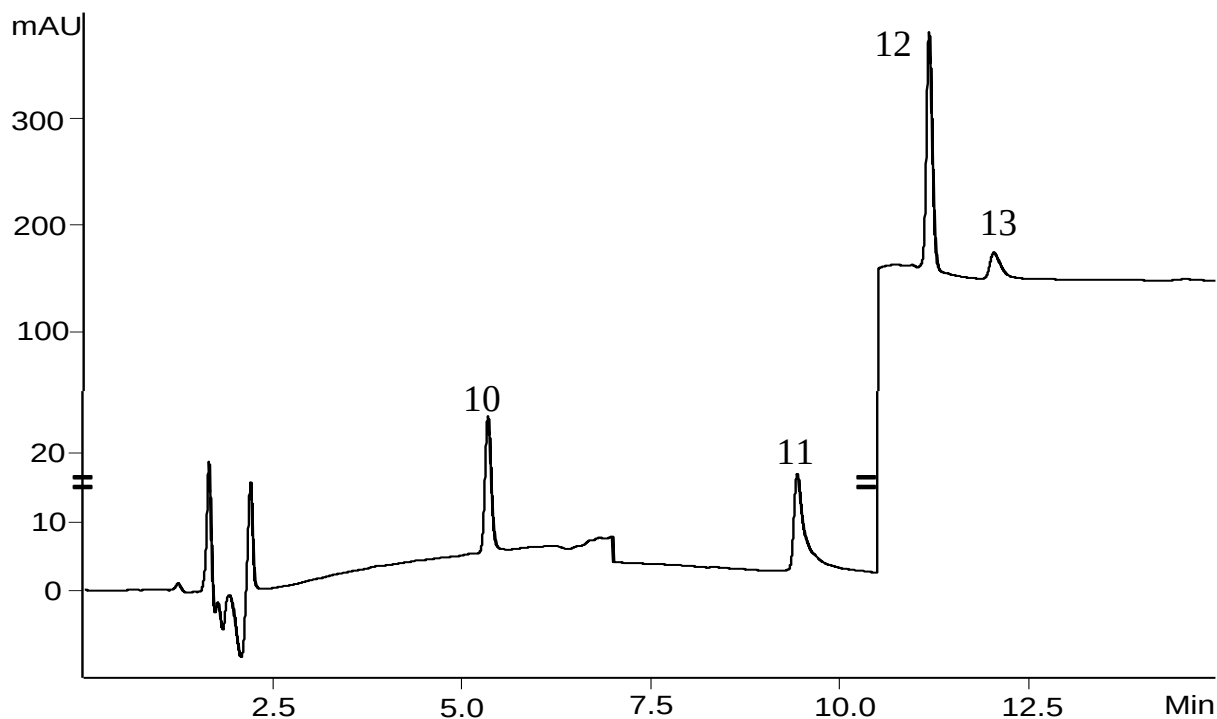


Фигура 3. Абсорбционни спектри на анализираните по Метод I вещества

Гликозидите рутин, витексин и хиперозид са с по-кратко време на задържане, отколкото агликоните кверцетин и апигенин, които се детектират след осемнадесетата минута, когато ацетонитрилът е 90% от подвижната фаза. Така също и киселините: кафеена, р-кумарова и ферулова се задържат по-слабо за разлика от розмариновата, която е депсид и се регистрира в края на анализа.

1.2. Метод II за определяне на терпени, фитостерол и антрахинон

Описаният по-горе Метод I позволява разделяне и доказване на част от изследваните съединения. За определяне съдържанието на останалите компоненти от екстрактите бе разработен Метод II. Чрез него се постига определяне на полихидроксистерола 20-хидроксиекдизон; кондензираното антрахиноново производно хиперицин, както и терпеновите производни – борнил ацетат и валеренова киселина. Техните времена на задържане са съответно (min): 20-хидроксиекдизон - 5.33, хиперицин - 9.39, борнил ацетат - 11.14 и валеренова киселина - 11.98 (фиг. 4).



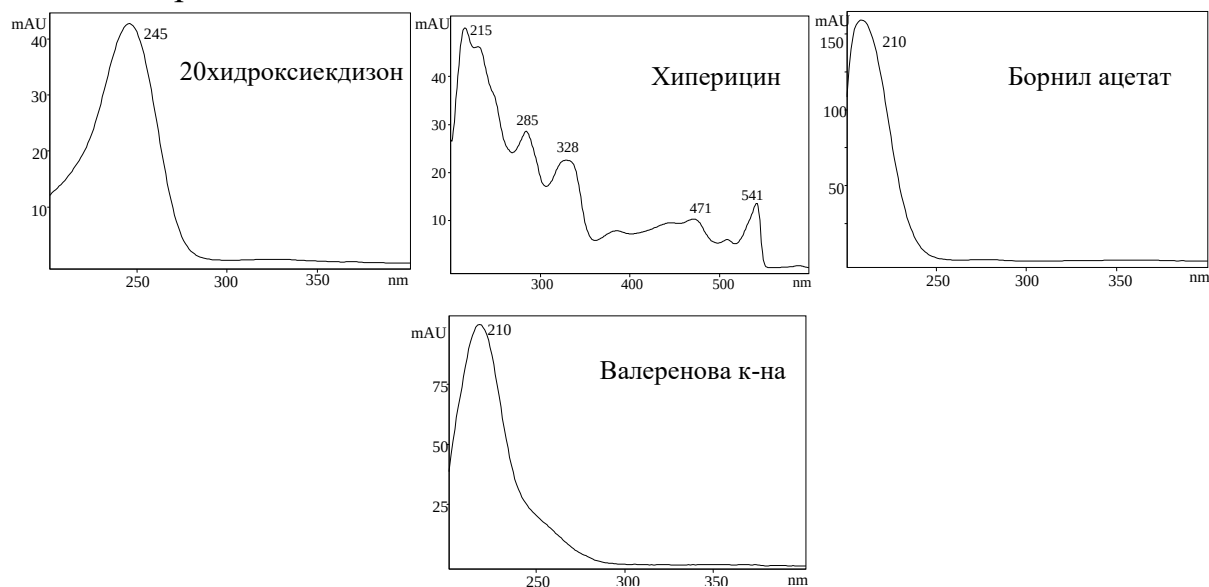
Фигура 4. Хроматограма на моделна смес от 20-хидроксиекдизон-10, хиперицин-11, борнил ацетат-12 и валеренова киселина-13

За тяхното разделяне е използвана колона Microsorb-MV C₁₈, която е по-къса и по-малко полярна в сравнение с използваната при Метод I. В замяна на това е увеличена полярността на подвижната фаза В, която е смес от метанол и ацетонитрил. Варирането в съотношението на различни по полярност разтворители във времето осигурява максимално добро разделяне на търсените вещества (табл. 3).

Таблица 3. Работна програма на помпата за хроматографско разделяне на 20-хидроксиекдизон, хиперицин, борнил ацетат и валеренова киселина

Време, min	Елуенти, %	
	А	В
0	80	20
4	50	50
8	10	90
13	10	90
15	80	20

Записът на хроматограмата е направен за желаната дължина на вълната, съответстваща на $\lambda_{\max}$ на изследваното съединение (фиг. 5) в специфичното му време на задържане. Детектирането на 20-хидроксиекдизон се извършва при 245nm, хиперицин при 285nm и борнил ацетат и валеренова киселина при 210nm.



Фигура 5. Абсорбционни спектри на анализираните по Метод II вещества

1.3. Валидиране на Метод I и Метод II

Анализирани са три серии стандартни разтвори на чистите вещества при посочените условия и е установено, че в избраните концентрационни интервали (табл. 6 колона 2) съществува линейна зависимост между концентрация (x) и площ (y) на хроматографския пик ($r^2=0.9889\div 0.9999$). Това показва, че посочените методи може да се използват за количествено определяне на изследваните вещества. Концентрационните нива на калибрационните разтвори, регресионните уравнения на стандартните прави, корелационните коефициенти (r^2), LOD и LOQ са посочени в таблица 4.

Таблица 4. Параметри за валидиране на HPLC методите

Анализирано вещество	Концентрации (µg/ml)	Регресионни уравнения	r^2	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Кафеена к-на	2, 5, 10, 15, 20, 25	$y=5.7695e+005x$	0.9995	0.099	0.332
р-Кумарова к-на	2, 5, 10, 15, 20, 25	$y=3.9031e+005x$	0.9992	0.078	0.250
Ферулова к-на	2, 5, 10, 15, 20, 25	$y=5.8325e+005x$	0.9889	0.086	0.284
Розмаринова к-на	2, 5, 10, 15, 20, 25	$y=3.8561e+005x$	0.9953	0.075	0.248
Рутин	1, 2, 5, 10, 15, 20	$y=2.0570e+005x$	0.9959	0.094	0.274
Витексин	1, 2, 5, 10, 15, 20	$y=5.3534e+005x$	0.9980	0.101	0.304
Хиперозид	1, 2, 5, 10, 15, 20	$y=3.0164e+005x$	0.9948	0.084	0.261
Кверцетин	1, 2, 5, 10, 15, 20	$y=3.5782e+005x$	0.9967	0.144	0.439
Апигенин	1, 2, 5, 10, 15, 20	$y=7.9215e+005x$	0.9996	0.092	0.272
20хидроксикдизон	2, 5, 10, 15, 20, 25	$y=2.4190e+005x$	0.9942	0.320	0.422
Хиперицин	2, 5, 10, 15, 20, 25	$y=4.3129e+005x$	0.9962	0.241	0.795
Борнил ацетат	2, 5, 10, 15, 20, 25	$y=3.1566e+006x$	0.9938	0.189	0.627
Валеренова к-на	2, 5, 10, 15, 20, 25	$y=5.9107e+005x$	0.9999	0.264	0.818

Проведен е експеримент за надеждност на метода чрез определяне на възпроизводимостта на резултатите. За целта е анализирана по една проба с позната концентрация за всяко от веществата. Коефициентите на вариация както и резултатите за намерената концентрация (осреднени от три измервания) са дадени в таблица 5.

Таблица 5. Параметри за точност и прецизност на HPLC-методите

Параметри Вещества	RSD(%)	Реална конц., µg/ml	Намерена конц., µg/ml	Възпроизводимост, %±0.1
Кафеена к-на	6.888	12	12.34	102.9
р-Кумарова к-на	6.170	12	11.89	99.1
Ферулова к-на	6.936	12	12.01	100.1
Розмаринова к-на	7.433	12	11.93	99.4
Рутин	5.387	8	8.06	100.7
Витексин	4.990	8	7.90	98.8
Хиперозид	7.653	8	8.29	103.6
Кверцетин	4.499	8	7.93	99.1
Апигенин	6.593	8	7.99	99.9
20хидроксиекдизон	7.451	12	11.98	99.8
Хиперицин	7.104	12	12.22	101.8
Борнил ацетат	6.150	7	6.83	97.6
Валеренова к-на	5.544	12	11.77	98.1

Коефициенти на вариация между 4.5 и 7.7 % и постигнатата възпроизводимост в граници от 97.6 до 103.6% са показатели за точността и прецизността на разработения метод.

Имайки пред вид резултатите представени в таблици 4 и 5, може да се направи заключението, че методите са точни, прецизни и достатъчно чувствителни за едновременно количествено определяне на розмаринова, валеренова, р-кумарова, ферулова и кафеена киселини, рутин, кверцетин, апигенин, витексин, хиперозид, борнил ацетат, хиперицин и 20-хидроксиекдизон в растителни дроги, сухи екстракти, или хранителни добавки. Използвана е достъпна апаратура и анализите са кратки, което позволява прилагането им при рутинна работа за контрол на качеството както на дроги, така и на готови фитопрепарати.

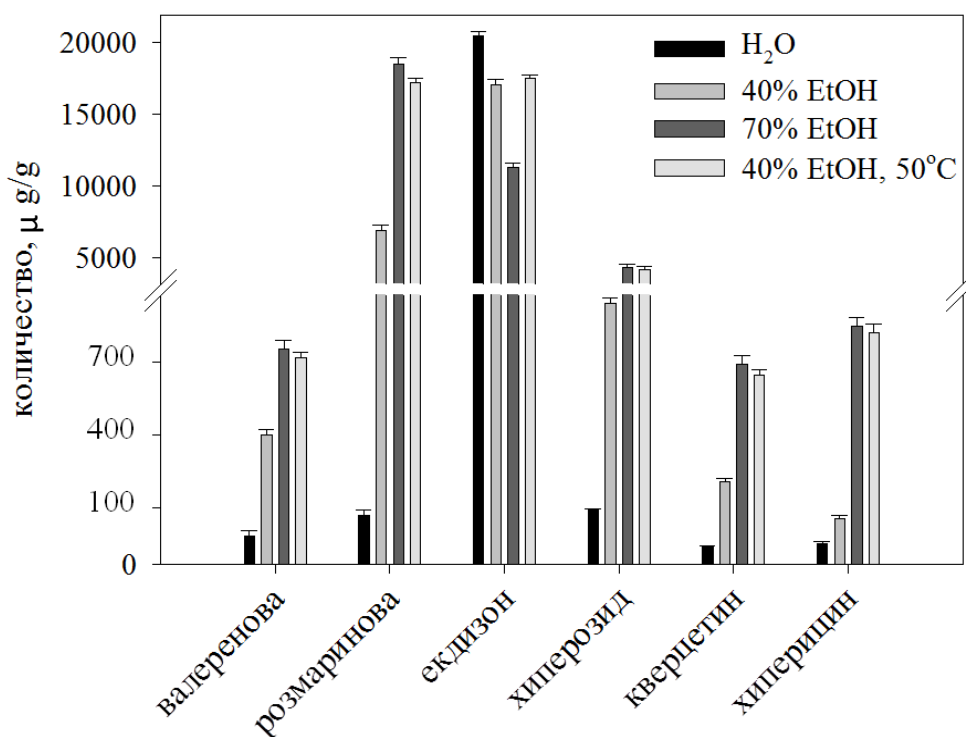
2. Приложение на разработените методи за охарактеризиране на дрога и екстракти от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba* и *Serratula herba*

2.1. Охарактеризиране на дрогите *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba* и *Serratula herba*

Проведена е лабораторна екстракция с дестилирана вода, 40 и 70%-ен етанол при стайна температура и с 40%-ен при 50°C в продължение на четири часа от дрогите *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba* и *Serratula herba*. Проследени са екстрахираните количества от изследваните вещества на всеки час чрез разработените от нас HPLC методи. При стайна температура и 70% етанол на първия час получените количества вещества са както следва - валеренова киселина 350 µg/g дрога, розмаринова киселина 10550 µg/g, кверцетин 273 µg/g, хиперозид 2600 µg/g и хиперицин 480 µg/g. На втория час стойностите се увеличават – валеренова киселина 665 µg/g, розмаринова киселина 16250 µg/g, кверцетин 668 µg/g, хиперозид 3590 µg/g и хиперицин 675µg/g. Максимално извличане на активните съединения се постига на третия час, съответно валеренова киселина 750 µg/g, розмаринова киселина 18500 µg/g, кверцетин 700 µg/g, хиперозид 4375 µg/g и хиперицин 830µg/g. За същото време почти два пъти по-ниски са стойности при екстракция с 40% етанол - валеренова киселина 450 µg/g, розмаринова киселина 6900 µg/g, кверцетин 290 µg/g, хиперозид 1035 µg/g и хиперицин 60 µg/g. Незадоволителни резултати за тези вещества се получават при екстракция с дестилирана вода. Единствено 20-хидроксиекдизон се екстрахира най-добре с вода (20550 µg/g), докато с етанол количеството е 17100 µg/g за 40%-ен и 11350 µg/g за 70%-ен. Няма разлика в количеството екстрахирани вещества на третия и четвъртия час.

При провеждане на екстракцията при 50°C с 40%-ен етанол още на първия час извлечените количества от търсените съединения са съизмерими с тези при стайна температура за 3 часа със 70%-ен етилов алкохол - валеренова киселина 730 µg/g, розмаринова киселина 18100 µg/g, кверцетин 670 µg/g, хиперозид 4300 µg/g и хиперицин 810 µg/g. На втория и на третия час от екстракционния процес при същите условия няма промяна в количествата. Следователно е постигнато пълно извличане на активните вещества още на първия час. По-високата температура позволява скъсяване времето за екстракция, както и използването на 40%-ен етанол вместо 70%-ен. На фигура 6 са показани количествата валеренова киселина, розмаринова киселина, кверцетин, хиперозид, 20-хидроксиекдизон и

хиперицин от дрогите, екстрахирани с дестилирана вода, 40 и 70%-ен етилов алкохол на 3-ия час, както и с 40%-ен етилов алкохол при 50°C на 1-ия час.



Фигура 6. Количества екстрахирани биологичноактивни вещества от дрогите *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba* и *Serratula herba*

Редица автори изследват съдържанието на биологично активни вещества в растителна биомаса и установяват, че количествата им варират в много широки граници. Silva et al. (2005) отчитат количества хиперицин от порядъка на 620 и 871 µg/g суха дрога и кверцетин - 4084 µg/g в етанолов екстракт от *H. perforatum*. В друга тяхна публикация относно същото растение докладват количества от 570 µg/g за хиперицин и 5128 µg/g кверцетин (Silva et al., 2008). При проведено от Wang et al. (2011) изследване на листа от глог се установява съдържание на рутин 20 µg/g, витексин 350 µg/g и хиперозид 800 µg/g. Petenatti et al. (2014) доказват автентичността на *M. officinalis* чрез HPLC и FTIR, като измерват високо съдържание на розмаринова киселина 40235 µg/g в дрога, с което категорично я отличават от двойника ѝ *Nepeta cataria*. Чрез HPLC метод Kulikov (2012) определя

сескитерпенови киселини и отчита стойности на валеренова киселина в границите от 0.087 до 0.099% в суха дрога от корен и коренище на *V.officinalis*, както и 0.177-0.213% в сух екстракт. Punegov et al. (2008) определят 20-хидроксиекдизон в дрога от *S.coronata* и намират количества от 11600 µg/g.

В таблица 6 са дадени получените от нас резултати от екстракцията на растителна дрога в лабораторни условия с дестилирана вода, 40 и 70%-ен етилов алкохол на 3-ия час, както и с 40%-ен етилов алкохол при 50°C на 1-ия час. Освен валеренова киселина, розмаринова киселина, кверцетин, хиперозид, 20-хидроксиекдизон и хиперицин, отговорни за автентичността на всяка от дрогите са определени още и фенолните киселини кафеена, ферулова, р-кумарова, флавоноидите рутин, апигенин и витексин, както и борнилацетат, които според коментираните до момента литературни данни допринасят за антиоксидантната активност на екстракти от дроги.

Направените изследвания потвърждават, че съпоставянето на регистрирани количества биологично активни вещества в дадена дрога при едни или други проучвания е относително. Това е така защото количествата на биологично активните вещества зависи от факторите: местообитание, сорт, сезон, климатични особености, експозицията на светлина, както и производствени условия, свързани със събиране, съхранение и обработка на дрогите.

Таблица 6. Количества розмаринова, валеренова, р-кумарова, ферулова и кафеена киселини, рутин, кверцетин, апигенин, витексин, хиперозид, борнил ацетат, хиперицин и 20-хидроксиекдизон, екстрахирани от сух растителен материал в µg/g

Вещество, µg/g Дрога, р-л		Кафеена к-на	Рутин	Витексин	Хиперозид	р- кумарова к-на	Ферулова к-на	Кверцетин	Апигенин	Розмари- нова к-на	20- хидрокси екдизон	Борнил ацетат	Валере- нова к-на	Хипери- цин
Valerianae radix	A	150±7	следи	-	-	следи	следи	39±2	-	100±5	-	30±2	100±3	-
	Б	110±4	следи	-	110±3	70±3	следи	30±1	-	300±9	-	27±1	450±8	-
	В	90±3	следи	-	90±3	70±3	25±1	60±2	-	335±8	-	25±1	750±25	-
	Г	110±3	30±1	-	90±3	70±2	30±1	55±2	-	350±10	-	30±2	730±23	-
Melissae herba	A	следи	-	-	следи	-	следи	300±23	50±2	1000±68	-	-	-	-
	Б	109±3	-	-	130±4	-	следи	300±25	250±14	6900±145	-	-	-	-
	В	120±3	следи	-	170±10	следи	следи	300±18	190±11	18500±563	-	-	-	-
	Г	123±4	25±1	-	200±11	следи	следи	300±22	200±12	18100±547	-	-	-	-
Crataegi folium cum flore	A	145±6	235±8	45±2	450±18	-	-	55±3	-	130±4	-	-	-	-
	Б	70±2	460±15	90±4	1035±29	-	-	290±15	-	770±34	-	-	-	-
	В	100±4	675±22	70±3	4375±45	-	-	700±34	-	575±24	-	-	-	-
	Г	150±4	650±20	65±2	4300±78	-	-	670±32	-	560±29	-	-	-	-
Serratula herba	A	160±6	-	50±2	50±2	-	-	370±13	240±12	-	20550±438	-	-	-
	Б	100±3	-	30±1	следи	-	-	500±24	150±10	-	11350±276	-	-	-
	В	90±2	-	35±1	следи	-	-	450±23	151±11	-	17100±334	-	-	-
	Г	95±3	-	35±1	30±1	-	-	480±19	185±14	-	17500±329	-	-	-
Hyperici herba	A	-	10000±343	-	3000±78	-	-	1200±54	970±45	-	-	-	-	70±3
	Б	-	12700±350	-	4650±102	-	-	5250±102	1050±33	-	-	-	-	60±2
	В	-	25400±467	-	14350±567	-	-	2700±113	1450±38	-	-	-	-	830±35
	Г	-	30100±610	-	14500±534	-	-	3100±126	1400±43	-	-	-	-	810±33

А-дестилирана вода, трети час; Б-40%EtOH, трети час; В-70%EtOH, трети час; Г-40%EtOH, 50 °C, първи час

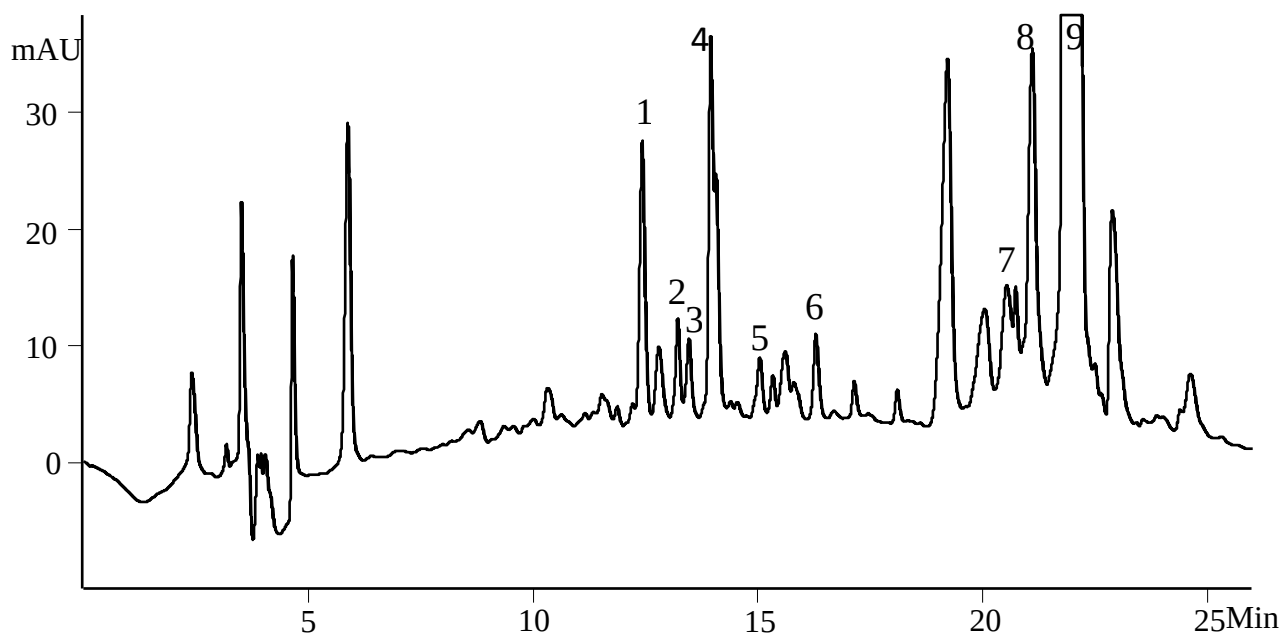
Получените резултати дават възможност да се подберат и препоръчат подходящи параметри за преработка на дрогата, при които в промишлени условия ще се извлекат в най-голяма степен биологичноактивните вещества, отговорни за качеството и терапевтичния ефект на крайния продукт. Още повече такъв предварителен анализ на растителните дроги ще даде информация за качеството на изходната суровина. Това е изключително важно от гледна точка получаването на качествен екстракт.

2.2. Определяне количествата биологичноактивни вещества в екстракти от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba*, *Serratula herba* и моделните екстракти AC1 и AC2 преди таблетирание

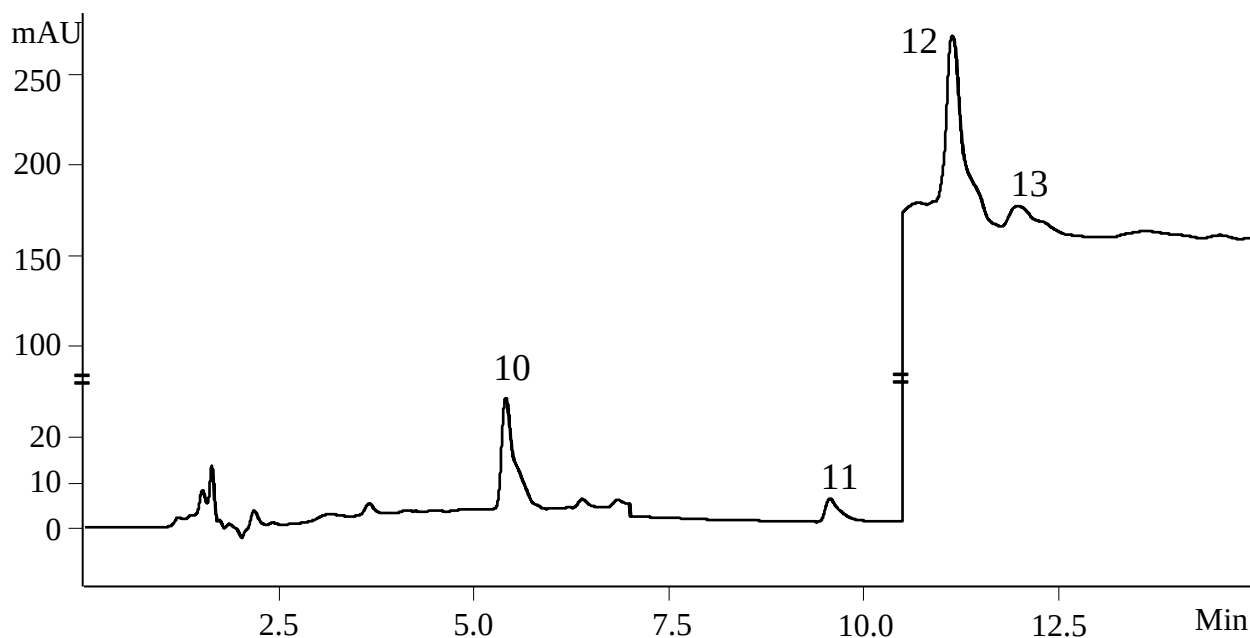
При екстракция в промишлени условия с 40%-ен етанол и 50°C са получени стандартизирани екстракти от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba*, *Serratula herba* и комбинираните моделни екстракти AC1 и AC2 по съдържащите се в тях количества розмаринова, валеренова, р-кумарова, ферулова и кафеена киселини, рутин, кверцетин, апигенин, витексин, хиперозид, борнил ацетат, хиперицин и 20-хидроксиекдизон. Количествата биологичноактивни вещества установени по създадените от нас HPLC методи са посочени в таблица 7, а реалните хроматограми на моделните екстракти AC1 и AC2 са показани на фигури 7 и 8.

Таблица 7. Количества розмаринова, валеренова, р-кумарова, ферулова и кафеена киселини, рутин, кверцетин, апигенин, витексин, хиперозид, борнил ацетат, хиперицин и 20-хидроксиекдизон, определени в $\mu\text{g/g}$ сух екстракт

Экстракти Вещества, µg/g	<i>Valerianae radix</i>	<i>Melissae herba</i>	<i>Crataegi folium cum flore</i>	<i>Serratula herba</i>	<i>Hyperici herba</i>	AC1	AC2
Кафеена киселина	65±3	1230±23	следи	-	-	475±11	-
Рутин	40±1	256±8	1560±56	-	39358±337	530±9	22785±103
Витексин	следи	224±8	740±28	следи	-	283±8	-
Хиперозид	следи	504±12	984±36	599±24	15285±234	335±8	7960±297
p-кумарова киселина	65±3	45±2	следи	-	следи	38±1	-
Ферулова киселина	30±1	205±6	-	-	-	96±3	-
Кверцетин	следи	следи	5913±121	5470±119	6015±103	2135±68	3800±342
Апигенин	-	следи	следи	765±25	1700±35	79±3	350±11
Розмаринова киселина	1100±33	55600±313	3541±72	-	-	20629±89	-
20хидроксиэкдизон	-	-	-	19080±224	-	1528±93	1157±84
Хиперицин	-	-	-	-	858±36	-	390±23
Борнил ацетат	66±2	-	-	-	-	следи	следи
Валеренова к-на	775±21	-	-	-	-	265±17	388±22



Фигура 7. Хроматограма на моделен екстракт AC1 (кафеена к-на-1, рутин-2, витексин-3, хиперозид-4, р-кумарова к-на-5, ферулова к-на-6, кверцетин-7, апигенин-8 и розмаринова к-на-9), получена по Метод I



Фигура 8. Хроматограма на моделен екстракт AC2 (20-хидроксибекдизон-10, хиперицин-11, борнил ацетат-12 и валеренова киселина-13), получена по Метод II

Полученият по този начин сух екстракт е готов за влагане в подходяща лекарствена форма, при което се удължава срока му на годност. Докато за биологичната активност на екстрактите от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba* и *Serratula herba* съществуват данни, за моделните екстракти AC1 и AC2 няма такива. Поради това те са изследвани *in vitro* за АОА и *in vivo* върху опитни животни за доказване на анксиолитичното им действие.

3. Спектрофотометрично определяне на общи полифеноли и проантоцианидини в екстракти от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba* и *Serratula herba* и моделните екстракти AC1 и AC2

Експериментални данни показват, че повечето от биологичните функции на полифенолите се дължат на присъщата им антиоксидантна способност. Те осъществяват индиректна защита чрез активиране на ендогенни защитни системи и механизми като модулират клетъчни сигнални пътища: активиране на NF-kB, свързването на AP-1 с ДНК, биосинтез на глутатион, активиране на митоген активирани протеин кинази (ERK, JNK, P38) и разместване в ядрата на Nrf2 (Molina et.al., 2003; Shen et al., 2007). Редица авторски колективи дори да определят много индивидуални съединения в един екстракт (Simirgiotis, 2013; Badalica-Petrescu et al., 2014) не могат да обхванат цялата гама от полифенолни съединения, които допринасят за антиоксидантната активност на който и да е екстракт. По тази причина се определя общото полифенолно съдържание, в което се включват вещества от групите на флавоноиди, флавони, антоцианидини, танини, свободни фенолни киселини и др. Освен изследваните розмаринова, валеренова, р-кумарова, ферулова и кафеена киселини, рутин, кверцетин, апигенин, витексин, хиперозид, борнил ацетат, хиперицин и 20-хидроксибекдизон, определяни по HPLC методите, са анализирани и общите полифеноли по стандартен метод (Singleton and Rossi, 1965), както и характерните за растителните видове проантоцианидини като част от тях (Sarneckis et al., 2006). Резултатите са посочени в таблица 8.

Таблица 8. Съдържание на общи полифеноли и проантоцианидини в екстракти от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba* и *Serratula herba* и моделни екстракти AC1 и AC2

Екстракт	Полифеноли, mg/g	Проантоцианидини, mg/g
<i>Valerianae radix</i>	43.36±1.34	2.36±0.10
<i>Crataegi folium cum flore</i>	113.04±1.87	26.14±1.01
<i>Serratula herba</i>	95.24±0.26	64.72±1.15
<i>Melissae herba</i>	238.96±4.82	47.87±1.28
<i>Hyperici herba</i>	222.29±6.42	146.61±4.46
Моделен екстракт AC1	128.57±2.41	63.30±2.87
Моделен екстракт AC2	132.36±2.41	82.67±3.42

Получените от нас количества полифеноли са по-високи в сравнение с публикуваните в литературата (Škerget et al., 2005; Stefanović and Comic, 2012), тъй като ние изследваме сухи екстракти, но пък проантоцианидиновото съдържание е ниско (с изключение на екстракта от *H. perforatum*). Причината за това е, че проантоцианидините присъстват в най-голямо количество в дребните безкостилкови плодове на арония, боровинки, грозде, малини, къпини, ягоди (Gu et al., 2004), докато ние изследваме стрък, цвят и корен от дроги.

4. Определяне на антиоксидантна активност на екстракти от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba* и *Serratula herba* и моделните екстракти AC1 и AC2

Значителна част от съобщенията в научната литература подкрепят схващането за ролята на оксидативния стрес в патогенезата на много човешки заболявания и приноса на приетите с храната полифеноли за предотвратяването или забавянето им (Brenneisen et al., 2005; Scalbert et al., 2005). Епидемиологични проучвания показват, че продължителния прием на храни и фитопроductи, богати на растителни полифеноли, осигурява известна защита срещу неврологични, сърдечносъдови заболявания, диабет, остеопороза, невродегенеративни заболявания (García-Lafuente et al., 2009; Kim et al., 2013).

Тъй като няма универсален метод за определяне на антиоксидантната активност е трудно да се направи сравнение за силата на

антиоксидантите. Обикновено се прилагат няколко метода за по-пълно охарактеризиране на антиоксидантните свойства на дадено вещество или екстракт (Schlesier et al, 2002; Aguoma, 2003). Антиоксидантно действие на флавоноидите се проявява в няколко насоки: неутрализиране на свободни радикали чрез отдаване на водороден атом, хелатиране на метални йони, инхибиране на синглетен кислород и инхибиране на прооксидантни ензими (Rice Evans, 2000, Heim et al., 2002). Способността на даден антиоксидант да неутрализира пероксидни радикали се определя по методи, които се основават на пренос на водороден атом.

Един от тях е използваният от нас ORAC-метод, който покрива повечето критерии за стандартизиране на метод за определяне на антиоксидантна активност (Prior et al., 2005). Предимство на метода е, че той съчетава времето на инхибиране на реакцията и процента на инхибиране, защото окислението на флуоресцеина протича докрай. За количествена оценка на антиоксидантната активност се използва площта под затихващата крива на флуоресценция, т.е. отчита се индивидуалната кинетика на всяка проба (Niki, 2002). По HORAC метода се отчита превантивното действие на антиоксидантите. Той използва комплексобразуващите свойства на дадена проба в условията на реакция на Fenton и следователно способността ѝ да предотвратява образуване на хидроксидни радикали, които са най-реактивоспособната форма на кислорода (Ou et al., 2002). Електрохимичният метод се основава на измерването на електричния сигнал в резултат на окислението на веществото (или на сместа), които се изследват за антиоксидантна активност, на повърхността на работен електрод при определено напрежение (Korotkova et al., 2002). Могат да се изтъкнат няколко предимства на метода: ниска граница на откриване, висока селективност (определят се само тези вещества, чиито молекули могат да се окислят, като при това се определя само активната, т.е. неокислена форма на антиоксиданта), малък работен обем (0.1-5 μ l) и лесна поддръжка, подходящ както за водо- така и за липорастворими вещества (Sochor et al., 2013).

4.1. Определяне на антиоксидантна активност чрез ORAC метод

Резултатите за АОА на изследваните от нас лечебни растения, определена по ORAC-метода са посочени в таблица 9. Най-изразена според този метод е АОА на екстрактите от *Melissae herba* и *Hyperici herba*, която е следствие от високата концентрация на розмаринова киселина в първия екстракт и съответно на флавоноиди във втория (табл. 10). Те допринасят в най-голяма степен за активността на моделните екстракти АС1 и АС2 като се има предвид дяловото им участие в тях. Обяснението за ниската активност на екстрактите от *Valerianae radix* и *Serratula herba* вероятно е по-малкото съдържание на полифенолни съединения за сметка на характерните за тях съответно тритерпени и екдистероиди.

Таблица 9. Антиоксидантна активност на екстракти от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba* и *Serratula herba* и комбинациите АС1 и АС2, измерена чрез ORAC метод

Екстракт	ORAC, $\mu\text{mol TE/g}$
<i>Melissae herba</i>	6751.0 $\pm$ 214.3
<i>Hyperici herba</i>	5950.5 $\pm$ 328.4
<i>Crataegi folium cum flore</i>	3917.3 $\pm$ 227.8
Моделен екстракт АС2	3774.7 $\pm$ 99.3
Моделен екстракт АС1	3746.2 $\pm$ 180.1
<i>Serratula herba</i>	1142.7 $\pm$ 25.5
<i>Valerianae radix</i>	820.5 $\pm$ 21.9

ORAC метода е широко използван от редица колективи за анализ на АОА в дроги (Zheng and Wang, 2001) или храни и подправки (Ninfali et al., 2005). Те съобщават резултати за различни растения като: мащерка (274.26 $\mu\text{mol TE/g}$), градински чай (320.04 $\mu\text{mol TE/g}$) и маточина (59.97 $\mu\text{mol TE/g}$). Wojcikowski et al., (2007) изследват антиоксидантната активност чрез ORAC-метода на 55 медицински растения след последователна екстракция с три разтворителя. Поради тази причина, те получават по-висока активност за дрогите. Kratchanova et al., (2010) правят подобно изследване на 25 лечебни растения като сравняват АОА на воден и ацетонов извлек от дрога. Получават по-висока активност за ацетоновите екстракти от *C. monogyna*, *M. officinalis* и *H. perforatum* (2163, 1121 и 1141 $\mu\text{mol TE/g}$) спрямо водните (364, 996 и 629 $\mu\text{mol TE/g}$). Получените от нас

активности за същите растения са многократно по-високи (табл. 9), тъй като са изчислени за грам от сух екстракт.

4.2 Определяне на антиоксидантна активност чрез HORAC – метод

Комплексообразуващата способност на флавоноидите, чрез която се проявяват като АО е доказана по HORAC метода, но в научната литература е оскъдна информацията за използването му. Едва в последните години той се налага като критерий за определяне на АОА заедно с ORAC метода. Анализ на АОА на шест билкови екстракти по този метод правят Denev et al. (2014), а на двадесет и седем хранителни добавки Wasek et al., (2015). Авторските колективи използват двата метода за по-пълно охарактеризиране на свойствата на съответните обекти като същевременно определят и полифенолното им съдържание. Подобно на тях и нашият колектив използва HORAC метода за определяне на АОА на екстрактите от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba*, *Serratula herba* и моделните екстракти AC1 и AC2. Получените резултати са представени в табл. 10.

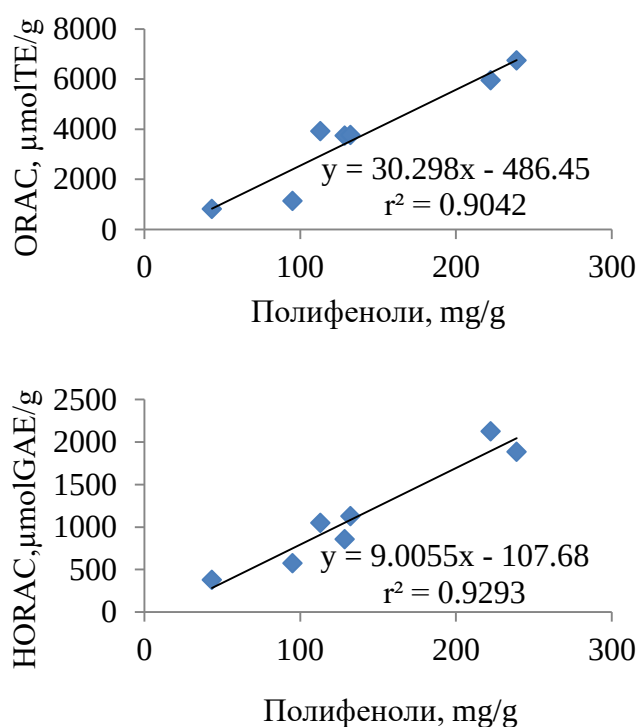
Таблица 10. Антиоксидантна активност на екстракти от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba*, *Serratula herba* и моделните екстракти AC1 и AC2, измерена чрез HORAC метод

Екстракт	HORAC, $\mu\text{mol GAE/g}$
<i>Hyperici herba</i>	2128.3 $\pm$ 200.1
<i>Melissae herba</i>	1887.8 $\pm$ 51.0
Моделен екстракт AC2	1132.4 $\pm$ 44.8
<i>Crataegi folium cum flore</i>	1052.1 $\pm$ 32.5
Моделен екстракт AC1	861.7 $\pm$ 25.2
<i>Serratula herba</i>	575.2 $\pm$ 18.8
<i>Valerianae radix</i>	381.6 $\pm$ 14.0

Най-изразена е АОА на екстракта от *Hyperici herba*, която в голяма степен се дължи на четирите главни флавоноида-рутин, хиперозид, кверцетин и апигенин с общо количество 62.36 mg/g. Високата активност на моделен екстракт AC2 респективно се дължи на това, че *Hyperici herba* е 4.5/10 от него. Екстрактът от *Melissae herba* също е с висока активност, макар че флавоноидите са 0.9 mg/g, но фенолните киселини, представени

на първо място от розмариновата, а след нея кафеена, ферулова и р-кумарова, са 57.1 mg/g.

В литературата са посочени данни за връзката между антиоксидантната активност и съдържанието на полифенолни съединения в дроги. Някои автори докладват добра линейна зависимост между тези два параметъра (Djeridane et al., 2006; Katalinic et al., 2006, Kratchanova et al., 2010), докато други не наблюдават такава (Kahkonen et al., 1999). При нашите експерименти се установи добра корелация между общото количество полифеноли в екстрактите и тяхната АОА, определена по ORAC с $r^2=0.9042$ и по HORAC с $r^2=0.9293$ и е представена на фигура 9.



Фигура 9. Корелация между количеството полифеноли и АОА на изследваните екстракти, определена по ORAC и HORAC методи

С нашите изследвания за първи път се прави съпоставителна оценка на ORAC и HORAC за посочените дроги, както и за моделните екстракти AC1 и AC2. Чрез определяне на антиоксидантната активност на всеки от екстрактите се дава по-голяма представа за способността им да действат самостоятелно като антиоксиданти, както и за приноса им към активността на моделните екстракти.

4.3. Определяне на антиоксидантна активност чрез Електрохимичен метод

За още по-пълно охарактеризиране на АОА на изследваните екстракти е използван и електрохимичен метод. Стойностите на кинетичния критерий **К** (количеството на прореагиралите с пробата кислородни форми във времето) за всяка от пробите и АОА, изчислена спрямо тази на Trolox са дадени в таблица 11.

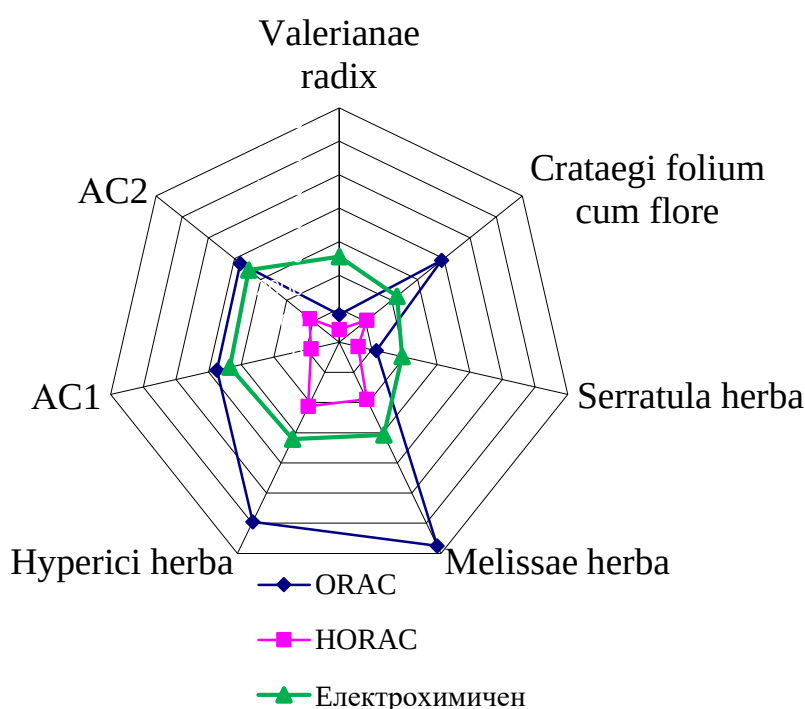
Докато АОА определена по ORAC и HORAC корелира правопрпорционално със съдържанието на полифеноли, то активността определена по електрохимичния метод не следва тази зависимост. От литературата е известно, че АО могат да действат по три механизма: чрез присъединяване на радикал към спрегната система от двойни връзки, отдаване на водород и участие в реакции с пренос на електрон (Polyakov et al., 2001). Използваният електрохимичен метод е приложим за АО, които проявяват антиоксидантно действие, осъществено по който и да е от посочените механизми. Следователно чрез него се отчита АОА на съединения не само от фенолен тип. По този метод моделните екстракти AC1 и AC2 показват най-изявена АОА. Това вероятно се дължи на синергистичния ефект между компонентите в тях - съединения от фенолен тип, тритерпенови производни, фитоестероиди, антраценови производни, витамини и други.

Таблица 11. Антиоксидантна активност на екстракти от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba*, *Serratula herba* и моделните екстракти AC1 и AC2, измерени по Електрохимичен метод

Екстракти	C, µg/ml	K, µmol/l.min±SD	АОА
AC2	100	28.795±1.125	3.551
AC1	100	27.136±1.874	3.346
<i>Melissae herba</i>	100	24.901±1.445	3.071
<i>Hyperici herba</i>	100	23.605±1.334	2.911
<i>Valerianae radix</i>	100	20.751±1.521	2.559
<i>Crataegi folium cum flore</i>	100	17.878±0.832	2.204
<i>Serratula herba</i>	100	15.643±0.761	1.929
Trolox	100	8.109±0.010	1.000

Екстрактът от *Valerianae radix* е с най-ниска активност според ORAC и HORAC методите, но според електрохимичния е на пето място. По този метод се определя цялостния антиоксидантен потенциал на дадена

проба. Yashin et al., (2010) създават база-данни за АОА на различни групи храни и напитки като използват описания метод. Според резултатите, получени от Tewari et al., (2014), комбинираните екстракти съчетават в оптимално съотношение компонентите на отделните дроги, при което отпада вероятността от предозиране при индивидуалното им приложение. На фигура 10 е показана графична зависимост между АОА, определена по трите използвани от нас метода, която нагледно отразява направените заключения.



Фигура 10. Сравнително представяне на АОА, определена по ORAC, HORAC и Електрохимичен методи

Дългогодишните изследвания на Halliwell (2012) върху свободните радикали, антиоксидантите и ролята им в организма, довеждат до извода, че *in vitro* и *in vivo* експериментите в тази област трябва да вървят ръка за ръка. Според тези резултати дори някои АО да проявяват много висока АОА в *in vitro* модели не е сигурно, че *in vivo* няма да се окажат прооксиданти.

Потвърдените данни за висока *in vitro* антиоксидантна активност дават достатъчно основание екстрактите от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba*, *Serratula herba*, както и моделните екстракти AC1 и AC2 да се изследват за токсичност и

анксиолитичен ефект в *in vivo* модели с генериран стрес при опитни животни.

5. *In vivo* изследване върху опитни животни на остра токсичност на екстрактите от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba*, *Serratula herba* и моделните екстракти AC1 и AC2

Изследвани са 90 опитни животни, разделени в 15 групи по 6 животни. При изследването за остра токсичност животните се третират перорално чрез използване на сонда със самостоятелните екстракти и моделните екстракти AC1 и AC2 в доза 5 и 10 g/kg b.w.. След 24 часа преживяемостта на животните е 100%. Следователно самостоятелните екстракти и комбинациите от тях са практически нетоксични. Това е предпоставка за продължаване на експериментите с цел доказване на анксиолитичното действие на моделните екстракти AC1 и AC2.

6. *In vivo* изследване върху опитни животни на анксиолитичното действие на моделните екстракти AC1 и AC2, както и на индивидуалните екстракти включени в тях *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba* и *Serratula herba*, при модел на остър стрес.

За изследване на анксиолитичното действие на комбинациите AC1 и AC2, както и на индивидуалните екстракти е използван теста „Повдигнат кръстосан лабиринт“. Той е най-често използваният експериментален тест за изследване тревожността при гризачи. Регистрираните показатели при използването на този тест са критерии за установяване на анксиолитичен и седативен ефект при експериментални животни. В основата на теста стои конфликта между вродения страх на животните от открити пространства и тяхното любопитство към непознатата среда. Повечето анксиолитици стимулират изследването на отворените рамена на лабиринта от животните, което се отчита с увеличение броя на влизанията в тях и удължаване на времето прекарано там. В същото време не се засилва двигателната активност на животните, която се изразява чрез общия брой влизания в отворените и затворените рамена. Важен показател за анксиолитичното действие е и увеличението на съотношението между броя влизания в отворените рамена и общия брой влизания (Pellow et al., 1986).

Използвани са 160 мъжки плъха порода Wistar, разделени в 23 групи. В продължение на 14 дни животните от отделните групи са

третираните ежедневно перорално съответно с двете комбинации и петте екстракта, а двете контролни групи с дестилирана вода. На 15-я ден опитните животни се подлагат на остър студов стрес с изключение на едната от контролните групи животни.

На таблица 12 са сравнени резултатите от теста Повдигнат кръстосан лабиринт по показателите време на престой в откритите рамена (**Totk(s)**) и време на престой в закритите рамена (**Tzak(s)**) при третиране на опитните животни с дози 100, 250 и 500 mg/kg b.w. от изследваните субстанции, сравнени с резултатите на контролната група животни (К) с модел на остър стрес.

Таблица 12 Време на престой в откритите рамена и време на престой в закритите рамена на Повдигнат кръстосан лабиринт

групи	брой животни	Време на престой в открити рамена-Totk(s)			Време на престой в закрити рамена-Tzak(s)		
		mean±SEM	U	p	mean±SEM	U	p
К	14	5.1±2.0			294±2.0		
K ₀	6	36.2±11.6	10.5	0.007*	263.8±11.6	10.5	0.007*
AC1 ₁₀₀	6	2.7±1.5	38	0.724	297.3±1.5	38	0.724
AC1 ₂₅₀	6	6.5±5.1	39.5	0.825	293.5±5.1	39.5	0.825
AC1 ₅₀₀	8	14.7±2.7	19	0.010*	285.2±2.7	19	0.010*
AC2 ₁₀₀	6	14.7±6.8	26	0.166	285.3±6.8	26	0.166
AC2 ₂₅₀	6	3.2±1.5	41	0.930	296±1.5	41	0.930
AC2 ₅₀₀	8	54.9±8.4	1	<0.001*	245.1±8.4	1	<0.001*
CEP ₁₀₀	6	11.5±7.8	39.5	0.826	288.5±7.8	39.5	0.826
CEP ₂₅₀	6	3.0±1.0	41.5	0.965	297.0±1.0	41.5	0.965
CEP ₅₀₀	8	25.2±7.6	24.5	0.026*	274.7±7.6	24.5	0.026*
КАН ₁₀₀	6	3.0±1.6	38.5	0.757	297.0±1.6	38.5	0.757
КАН ₂₅₀	6	0.5±0.5	24.5	0.103	299.5±0.5	24.5	0.103
КАН ₅₀₀	8	16.4±6.8	37	0.173	283.6±6.8	37	0.173
ВАЛ ₁₀₀	6	8.8±7.2	39	0.786	291.2±7.2	39	0.786
ВАЛ ₂₅₀	6	4.7±3.6	37	0.652	295.3±3.6	37	0.652
ВАЛ ₅₀₀	8	36.6±7	11.5	0.002*	263.4±7.0	11.5	0.002*
ГЛО ₁₀₀	6	18.3±8.8	19.5	0.055	281.7±8.8	19.5	0.55
ГЛО ₂₅₀	6	3.0±1.7	37.5	0.691	297.0±1.7	37.5	0.691
ГЛО ₅₀₀	8	45.0±8.5	2	<0.001*	255.0±8.5	2	<0.001*
МАТ ₁₀₀	6	0.5±0.5	24.5	0.103	299.5±0.5	24.5	0.103
МАТ ₂₅₀	6	23.0±7.0	15	0.021*	277.0±7.0	15	0.021*
МАТ ₅₀₀	8	27.6±9.8	15.5	0.010*	272.4±9.8	15.5	0.010*

* Разликите са статистически значими.

При сравняване на резултатите на двете контроли K_0 и K се наблюдава повишаване на времето на престой на открито и понижаване на времето на престой на закрито. Това показва, че избраният тест „Повдигнат кръстосан лабиринт“ е подходящ за оценка на поведенческите промени на животните при остър стрес.

При групите K_0 , $AC1_{250}$, $AC2_{100}$, CER_{100} , VAL_{100} , GLO_{100} и KAN_{500} се наблюдава увеличаване на времето на престой в откритите рамена по първия показател **Totk(s)** спрямо контролата K . При всички останали групи се наблюдава понижаване на показателя спрямо животните от група K . При животните от групи $AC1_{500}$, $AC2_{500}$, CER_{500} , VAL_{500} , GLO_{500} , MAT_{250} и MAT_{500} се установява статистически значимо удължаване на времето за престой на открито с изключение на тези от група KAN_{500} .

По втория показател **Tzak(s)** се регистрира статистически значимо намаляване на времето на престой на закрито при животни от група K_0 и MAT_{250} , $AC1_{500}$, $AC2_{500}$, CER_{500} , VAL_{500} , GLO_{500} , MAT_{500} спрямо група K и без статистически значима разлика при останалите групи опитни животни.

На таблица 13 са сравнени резултатите от теста Повдигнат кръстосан лабиринт по показателите брой влизания в откритите рамена (**Notk**) и броя влизания в закритите рамена (**Nzak**) с резултатите на контролната група животни.

Показателят брой влизания в откритите рамена на Повдигнат кръстосан лабиринт (**Notk**) се повишава при всички групи спрямо контролната група K , с изключение на група KAN_{250} , където се наблюдава понижаване

При групите животни K_0 , $AC1_{500}$, $AC2_{500}$, GLO_{100} , VAL_{500} , GLO_{500} , MAT_{250} и MAT_{500} увеличаването на показателя е статистически значимо. Вторият показател брой влизания в закритите рамена (**Nzak**) на „Повдигнат кръстосан лабиринт“ се увеличава статистически значимо при групите животни $AC1_{500}$, $AC2_{500}$, GLO_{100} , GLO_{500} , и MAT_{250} сравнени с контролата K .

Показателят брой влизания в откритите рамена на Повдигнат кръстосан лабиринт (**Notk**) се повишава при всички групи спрямо контролната група K , с изключение на група KAN_{250} , където се наблюдава понижаване

При групите животни K₀, AC1₅₀₀, AC2₅₀₀, ГЛО₁₀₀, ВАЛ₅₀₀, ГЛО₅₀₀, МАТ₂₅₀ и МАТ₅₀₀ увеличаването на показателя е статистически значимо. Вторият показател брой влизания в закритите рамена (**Nzak**) на Повдигнат кръстосан лабиринт се увеличава статистически значимо при групите животни AC1₅₀₀, AC2₅₀₀, ГЛО₁₀₀, ГЛО₅₀₀, и МАТ₂₅₀ сравнени с контролата К.

Таблица 13. Брой влизания в откритите рамена и брой влизания в закритите рамена на Повдигнат кръстосан лабиринт

групи	брой животни	Брой влизания в откритите рамена - Notk			Брой влизания в закритите рамена - Nzak		
		mean±SEM	U	p	mean±SEM	U	p
К	14	0.6±0.2			1.6±0.2		
K ₀	6	2.3±0.8	18.5	0.038*	2.3±0.5	27.5	0.195
AC1 ₁₀₀	6	0.8±0.4	37.5	0.684	2.0±0.8	39.5	0.815
AC1 ₂₅₀	6	1.2±0.8	39.5	0.819	2.7±0.7	26	0.155
AC1 ₅₀₀	8	2.2±0.4	15.5	0.004*	2.7±0.2	20.5	0.008*
AC2 ₁₀₀	6	1.8±0.7	26	0.156	3.8±1.5	23	0.091
AC2 ₂₅₀	6	0.7±0.3	40.50	0.891	2.7±0.7	26	0.155
AC2 ₅₀₀	6	4.7±1.0	2	0.001*	3.8±0.6	9	0.005*
СЕР ₁₀₀	6	1.0±0.5	37	0.651	1.8±0.3	35	0.529
СЕР ₂₅₀	6	0.8±0.3	34	0.466	1.2±0.2	29.5	0.223
СЕР ₅₀₀	8	1.6±0.5	31.5	0.075	2.4±0.5	37.5	0.173
КАН ₁₀₀	6	0.8±0.5	40	0.855	1.5±0.3	38	0.707
КАН ₂₅₀	6	0.3±0.3	30.5	0.276	1.0±0.0	24	0.066
КАН ₅₀₀	8	1.7±0.8	40.5	0.254	2.1±0.5	49	0.599
ВАЛ ₁₀₀	6	1.2±0.8	41	0.927	2.5±0.8	30.5	0.305
ВАЛ ₂₅₀	6	0.8±0.6	38	0.711	1.5±0.3	38	0.707
ВАЛ ₅₀₀	8	2.0±0.5	20.5	0.024*	2.5±0.5	35	0.261
ГЛО ₁₀₀	6	2.3±0.8	16.5	0.026*	3.3±0.8	16	0.021*
ГЛО ₂₅₀	6	0.7±0.3	40.5	0.891	1.0±0.0	24	0.066
ГЛО ₅₀₀	8	4.5±0.9	8.5	0.001*	3.9±0.8	20.5	0.011*
МАТ ₁₀₀	6	0.7±0.5	37.5	0.677	1.5±0.5	34	0.437
МАТ ₂₅₀	6	3.5±1.0	12.5	0.011*	5.3±1.5	16	0.023*
МАТ ₅₀₀	8	1.8±0.5	17.5	0.032*	1.7±0.3	40.5	0.891

* Разликите са статистически значими при сравняване на резултатите с контролата К

На таблица 14 са представени резултатите от теста „Повдигнат кръстосан лабиринт“ по показателя общ брой влизания в откритите и закритите рамена (**Ntot**) спрямо контролната група животни.

При изследване на общия брой влизания в откритите и закритите рамена на лабиринта, се наблюдава статистически значимо увеличаване на показателя при двете комбинации АС1₅₀₀ и АС2₅₀₀, ГЛО₁₀₀, ГЛО₅₀₀ и МАТ₂₅₀ спрямо контролната група при модел на остър студов стрес. Показателят (**Ntot**) намалява при групите животни третирани със СЕР₂₅₀, КАН₂₅₀, ГЛО₂₅₀ и МАТ₁₀₀ и се увеличава при групите К₀, АС1₁₀₀, АС1₂₅₀, АС2₁₀₀, АС2₂₅₀, СЕР₁₀₀, СЕР₅₀₀, КАН₅₀₀, ВАЛ₁₀₀, ВАЛ₅₀₀ и МАТ₅₀₀.

Таблица 14. Общ брой влизания в откритите и закритите рамена (**Ntot**) на Повдигнат кръстосан лабиринт

групи	Брой животни	Общ брой влизания в откритите и закритите рамена-Ntot		
		mean±SEM	U	p
К	14	2.3 ± 0.4		
К ₀	6	4.7 ± 1.2	21.5	0.079
АС1 ₁₀₀	6	2.8 ± 1.1	40.5	0.894
АС1 ₂₅₀	6	3.8 ± 1.3	29.5	0.276
АС1 ₅₀₀	8	5.0 ± 0.6	15.5	0.004*
АС2 ₁₀₀	6	5.7 ± 2.0	23.5	0.108
АС2 ₂₅₀	6	3.3± 0.8	29	0.258
АС2 ₅₀₀	6	8.5± 1.6	3	0.001*
СЕР ₁₀₀	6	2.8 ± 0.7	34	0.487
СЕР ₂₅₀	6	2.0 ± 0.4	41.5	0.965
СЕР ₅₀₀	8	4.0 ± 0.8	31	0.076
КАН ₁₀₀	6	2.3± 0.7	41	0.930
КАН ₂₅₀	6	1.3± 0.3	27	0.160
КАН ₅₀₀	8	3.9 ± 1.3	45	0.425
ВАЛ ₁₀₀	6	3.7 ± 1.6	35	0.543
ВАЛ ₂₅₀	6	2.3 ± 1.0	37.5	0.683
ВАЛ ₅₀₀	8	4.3± 0.9	25	0.062
ГЛО ₁₀₀	6	5.7 ± 1.5	14.5	0.019*
ГЛО ₂₅₀	6	1.7 ± 0.3	35	0.535
ГЛО ₅₀₀	8	8.4 ± 1.5	11.5	0.002*
МАТ ₁₀₀	6	1.7 ± 0.5	33.5	0.441
МАТ ₂₅₀	6	8.8± 2.5	13.5	0.015*
МАТ ₅₀₀	8	3.5 ± 0.8	25	0.145

* Разликите са статистически значими при сравняване на резултатите с контролата К

На табл. 15 са сравнени резултатите от теста „Повдигнат кръстосан лабиринт“ по показателя съотношение на броя влизания в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена (**Notn**) с резултатите на контролната група животни.

Таблица 15. Съотношение на броя влизания в откритите рамена към общия брой влизания в откритите и закритите рамена на Повдигнат кръстосан лабиринт

групи	Брой животни	Съотношение на Notk към Ntot - Notn		
		mean±SEM	U	p
К	14	0.18 ± 0.05		
K ₀	6	0.41 ± 0.09	16	0.025*
AC1 ₁₀₀	6	0.21 ± 0.11	41	0.929
AC1 ₂₅₀	6	0.18 ± 0.09	42	1.000
AC1 ₅₀₀	8	0.39 ± 0.06	20.5	0.012*
AC2 ₁₀₀	6	0.24 ± 0.09	36	0.601
AC2 ₂₅₀	6	0.15 ± 0.07	40	0.859
AC2 ₅₀₀	6	0.54 ± 0.03	4	0.001*
CEP ₁₀₀	6	0.22±0.10	37	0.658
CEP ₂₅₀	6	0.33± 0.10	25	0.135
CEP ₅₀₀	8	0.33± 0.08	34	0.118
КАН ₁₀₀	6	0.22 ± 0.11	38.5	0.757
КАН ₂₅₀	6	0.11 ± 0.11	31.5	0.327
КАН ₅₀₀	8	0.30±0.09	39.5	0.233
ВАЛ ₁₀₀	6	0.14 ± 0.09	38	0.717
ВАЛ ₂₅₀	6	0.15 ± 0.10	38.5	0.751
ВАЛ ₅₀₀	8	0.41±0.08	19.5	0.023*
ГЛО ₁₀₀	6	0.34 ± 0.08	22.5	0.095
ГЛО ₂₅₀	6	0.28 ± 0.13	33.5	0.451
ГЛО ₅₀₀	8	0.52± 0.05	10	0.001*
МАТ ₁₀₀	6	0.08 ± 0.08	30.5	0.282
МАТ ₂₅₀	6	0.35 ± 0.07	19.5	0.054
МАТ ₅₀₀	8	0.45 ± 0.10	14.5	0.018*

* Разликите са статистически значими при сравняване на резултатите с контролата К

При оценка на показателя - съотношение на влизания в откритите рамена към общ брой влизания в откритите и закритите рамена, се установява статистически достоверно повишаване при двата комбинирани

екстракта - групи АС1₅₀₀ и АС2₅₀₀, както и при самостоятелните екстракти - групи ВАЛ₅₀₀, ГЛЮ₅₀₀ и МАТ₅₀₀ спрямо контролната група К. Показателят нараства статистически значимо и при К₀ сравнено с К. Нарастването му при групите АС1₁₀₀, АС1₂₅₀, АС2₁₀₀, АС2₂₅₀, СЕР₅₀₀ и КАН₅₀₀ е минимално и без статистическа значимост.

При сравняване моделните екстракти АС1 и АС2 по показателите за анксиолитично действие регистрираме достоверно увеличение на показателите Totk, Notk, Ntot и намаляване на Tzak при доза от 500 mg/kg b.w., като при група АС2 те са по-изразени. Достоверно различие на резултатите за дози от 100 и 250 mg/kg b.w. и при двете групи не се отчита. При сравняване моделен екстракт АС1 и самостоятелните растителни екстракти, включени в състава му се установява статистически значимо увеличаване на стойностите на показател Totk и понижаване на Tzak при доза 500 mg/kg b.w. и за групите ГЛЮ и ВАЛ, сравнено с резултатите при група АС1 за същата доза. Не се установява статистически достоверна разлика при сравняване на групите в дози 100 и 250 mg/kg b.w. между АС1 и СЕР, МАТ, ВАЛ и ГЛЮ.

Когато се сравнят резултатите за анксиолитичен ефект на комбинацията моделен екстракт АС2 в дози 100, 250 и 500 mg със самостоятелните растителни екстракти, участващи в нея в същите дози, се наблюдава статистически значимо понижаване на стойностите на Totk, Notk, Ntot и Notn и повишаване на Tzak при доза 500 mg/kg b.w. за група СЕР₅₀₀ спрямо АС2₅₀₀. При КАН₅₀₀ се наблюдава понижаване на Totk, Notk, Ntot и повишение на Tzak спрямо АС2₅₀₀. При ВАЛ₅₀₀ се установява понижаване само на Notk и Ntot сравнено с резултатите при група АС2₅₀₀. Не се установява статистически достоверна разлика при сравняване на групите в дози 100 mg/kg b.w. АС2₁₀₀ със СЕР₁₀₀, КАН₁₀₀ и ВАЛ₁₀₀. Аналогични са резултатите при сравняване на АС2₂₅₀ със СЕР₂₅₀, КАН₂₅₀ и ВАЛ₂₅₀.

Подобно сравнение е направено и между резултатите за анксиолитичен ефект между различните дози (100, 250 и 500 mg/kg b.w.) моделен екстракт АС1 и между различните дози на моделен екстракт АС2. Не се установява статистически достоверна разлика в показателите при сравняване на АС1₁₀₀ с АС1₂₅₀, както и АС1₂₅₀ с АС1₅₀₀. Съпоставянето на АС1₁₀₀ и АС1₅₀₀ показва статистически значимо повишаване на Totk и Notk и понижаване на Tzak при АС1₅₀₀. Не се установява статистически

достоверна разлика в показателите при сравняване на AC2₁₀₀ с AC2₂₅₀. При сравняване на AC2₁₀₀ с AC2₅₀₀ и AC2₂₅₀ с AC2₅₀₀ се наблюдава статистически значимо повишаване на Totk, Notk, Ntot и Notn и понижаване на Tzak при AC2₅₀₀.

В достъпната литература не е намерена информация за комбинации от екстракти от растителни дроги в състав и съотношение като моделните екстракти AC1 и AC2. По тази причина анксиолитичното им действие при модел на остър студов стрес може да бъде сравнено само с това на индивидуалните екстракти, включени в състава им *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba* и *Serratula herba*, за които е известно, че притежават такъв ефект (Punegov et al., 2008; Sarris et al., 2013).

При проведеното от нас изследване на самостоятелния екстракт от *Valerianae radix* (стандартизиран по валеренова киселина и борнил ацетат табл.9) за анксиолитично действие се наблюдава зависимостта доза-ефект по отношение на повишаването на основния показател за тревожност Totk като то е най-слабо в най-ниската доза и най-силно в най-високата. Този ефект се обяснява с наличието на тритерпенови съединения (валеренова киселина, валепотриати, борнил ацетат и др.). Валереновата киселина модулира GABA_A рецепторите и подпомага анксиолитичното действие (Yuan et al., 2004). Валепотриатите потенцират отделянето и инхибират обратното захващане на основния задръжен медиатор в ЦНС – Гама-аминомаслената киселина (GABA) (Lader et al., 2006). В нашето проучване самостоятелният екстракт от *Valerianae radix* не променя статистически значимо общата двигателна активност на плъховете, аналогично на полученото от Hattesoehl и сътрудници (2008), които изследват екстракт от дрогата в същите дози, прилагани перорално. В тяхното проучване и доза от 1000 mg/kg b.w. не показва седативен или миорелаксантен ефект (Hattesoehl et al., 2008), което потвърждава изследване на Hiller et al. (1996).

При експериментите с екстракт от *Melissae herba* (стандартизиран по розмаринова киселина) също се наблюдава зависимост доза-ефект по отношение на Totk. Анксиолитичният ефект на екстракт от *Melissae herba* вероятно се дължи на розмариновата киселина, която се съдържа в растението. Тя инхибира GABA-трансаминаза – ензимът, който способства за разграждането на GABA и така потенцира задръжните ефекти в ЦНС (Awad et al., 2009). В проучване на Taiwo et al. (2012),

екстракт от *M. Officinalis* в доза 100 и 300 mg/kg b.w., приложен перорално в продължение на 15 дни, показва намаляване на тревожността при опитните животни в издигнат лабиринт, като наблюдавания ефект по отношение на Totk също е дозозависим. При нашето проучване не се отчита статистически значима промяна на общата двигателна активност в дози 100 и 500 mg/kg b.w., което говори за липса на седативен ефект. Резултатите ни по отношение на анксиолитичен ефект на екстракт от *Melissae herba* са сходни с тези на Ibarra et al. (2010).

При провеждане на проучването с индивидуалния екстракт на *Hyperici herba* (стандартизиран по хиперицин) не се наблюдава зависимост доза-ефект по отношение на следените показатели. От дозите 100, 250 и 500 mg/kg b.w. само КАН₅₀₀ показва повишаване на Totk, Notk, Nzak, Ntot и Notn, но то не е статистически значимо. Според Stansbury и колектив (2012) хиперицинът, съдържащ се в *Hyperici herba*, освен антидепресивен ефект, притежава и способността да потенцира адаптогенните и антистресови ефекти на други растителни екстракти, когато е приложен в комбинация с тях. Клинично проучване установява положителните ефекти при комбинирането на *V. officinalis* и *H. perforatum* при лечението на депресия, съчетана с тревожност (Müller et al., 2003). Предклинично изследване проведено от Patidar et al. (2012) показва анксиолитичния и седативен ефект на комбиниран екстракт и суха растителна дрога съдържащи *V. officinalis*, *H. perforatum* и *Passiflora* в доза 400 mg/kg b.w. Освен положителния ефект на комбинацията върху тревожността, се установява още, че седативният ефект на сухата дрога е по-силен от този на комбинирания екстракт (Patidar et al., 2012). Това обяснява включването на *H. perforatum* в комбинирания екстракт AC2.

Резултатите от нашето изследване върху модел на остър стрес показват, че сух екстракт от *Serratula herba* (стандартизиран по 20-хидроксиекдизон) проявява анксиолитичен ефект единствено в доза 500 mg/kg b.w. по отношение на Totk. Не се наблюдава зависимост между дозата и ефекта, тъй като повишаването на Totk и Notk е най-ниско при доза 250 mg/kg b.w. Избраните от нас дози – 100, 250 и 500 mg/kg b.w. са подобни на други автори (Vasil'ev et al., 2007). Изследване на екстракт Екдистерон-80 от *Serratula coronata* показва адаптогенен ефект на 20-хидроксиекдизон, който е една от основните съставки в *Serratula coronata* (Punegov et al., 2008). В проучената от нас литература не открихме данни

за *in vivo* ефектите на общ екстракт от растението върху тревожност. Въпреки, че в нашето проучване самостоятелният екстракт от *Serratula herba* проявява анксиолитично действие, неговото участие в моделните екстракти AC1 и AC2 е 10 пъти по-малко от дозата, предизвикваща такъв ефект. Това ни дава основание да предполагаме синергистично действие между активните вещества в екстракта от *Serratula herba* и тези от другите екстракти в комбинациите върху анксиолитичния ефект.

В нашето проучване екстрактът от *Crataegi folium cum flore* (стандартизиран по кверцетин и хиперозид) показва анксиолитичен ефект като увеличава статистически значимо изследваните показатели в най-високата доза. Той вероятно се дължи на съдържанието на флавоноиди в екстракта. Най-ниската доза показва статистически значим ефект, но по отношение само на $Notk$ без да се установява дозозависимост. Наблюдаваното повишение на общата двигателна активност, изразена с $Ntot$ говори за липса на седативен ефект. Това не съответства на резултатите, получени от Can et al. (2010), според които екстрактът от семена и пулпа в доза от 10 до 1000 mg/kg b.w. на *C. monogyna* намалява двигателната активност (Can et al., 2010). Разликите в резултатите може да се дължат на факта, че в нашето изследване екстрактът от *Crataegi folium cum flore* е получен от листата и цветовете, а не от семената и съответно е с различно съдържание на биологично активни вещества. В друго проучване етанолен екстракт на *Crataegus oxycantha* показва анксиолитичен ефект в Повдигнат кръстосан лабиринт в дози 300 и 600 mg. Механизмът на действие не е напълно изяснен, но вероятно се дължи на повлияване на GABA-ергичната невромедияция (Ankitkumar et al., 2011).

Групата животни, третирана с моделен екстракт AC1 в доза 500 mg/kg b.w. показва статистически значимо увеличаване на основните показатели за тревожност, което е показател за анксиолитичен ефект, но е по-слабо изразен в сравнение с този, при експерименталните животни приели същата доза индивидуални екстракти от растителни дроги. Резултатът е логичен като се има пред вид съотношението на самостоятелните екстракти в състава на комбинацията. Това би позволило приложението на моделен екстракт AC1 за по-дълъг период от време без да се допусне предозиране и странични ефекти. Според Awad и et al. (2009) розмаринова киселина във високи дози може да доведе до

невротоксичност при мишки, макар да е доказан нейния анксиолитичен ефект при ниски дози.

Интересен е резултатът получен за моделен екстракт AC2 приложен в доза 500 mg/kg b.w.. Наблюдава се статистически значимо повишение на показателите, с които се отчита тревожността - Totk, Notk и Notn като увеличението е по-голямо в сравнение с групите, третирани със самостоятелни екстракти от *Valerianae radix*, *Hyperici herba* и *Serratula herba*. Вероятно това се дължи на големия дял на *Hyperici herba* в състава на комбинирания екстракт и респективно на свойствата на хиперицина според заключенията на Stansbury et al. (2012).

И двете комбинации – моделен екстракт AC1 и моделен екстракт AC2 показват ефект върху модел на остър стрес само в най-високата доза, използвана в нашето проучване. Това е първо изследване на тези комбинации в посока доказване на анксиолитичното им действие.

Според Leonard и съавтори (2012) съществува връзка между тревожността, депресията и оксидативния стрес. Bouayed et al. (2009) в своя обзор обобщават данни от различни изследвания в подкрепа на тази връзка, но не обясняват точния механизъм и причинно следствената връзка между тях. Вероятната причина оксидативния стрес да предизвиква тревожност възбужда интереса към антиоксидантите. Vignes et al. (2006) използват епигалокатехин галат от зелен чай, а Bouayed et al. (2007), хлорогенова киселина от *Prunus domestica* в своите изследвания с опитни животни и доказват, че някои полифеноли от диетата могат да имат както антиоксидантна активност така и анксиолитичен ефект. Получените от нас резултати потвърждават това схващане като определените от нас количества полифенолни съединения в комбинираните моделни екстракти AC1 и AC2 са отговорни и за високата АОА и за изявеното анксиолитично действие при модел на остър стрес.

V. ИЗВОДИ

1. Разработените два HPLC метода Метод I и Метод II са точни, прецизни и достатъчно чувствителни за количествено определяне на розмаринова, ферулова, p-кумарова, валеренова и кафеена киселини, рутин, кверцетин, апигенин, витексин, хиперозид, борнил ацетат, хиперицин и 20-хидроксибекдизон
2. Разработените течнохроматографски методи са използвани за стандартизиране на екстрактите от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba*, *Serratula herba* и моделните екстракти AC1 и AC2.
3. При проведената лабораторна екстракцията на растителните дроги при 50°C с 40%-ен етанол за един час, екстрахираните количества биологично активни вещества са съизмерими с получените при стайна температура за три часа със 70%-ен етилов алкохол.
4. Екстрактите от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba*, *Serratula herba* и моделните екстракти AC1 и AC2 показват висока антиоксидантна активност, определена чрез три метода в граници както следва – ORAC от 820 до 6751 $\mu\text{mol TE/g}$, HORAC от 381 до 2128 $\mu\text{mol GAE/g}$ и електрохимичен от 15.6 до 28.7 K, $\mu\text{mol/l.min}$).
5. Екстрактите от *Valerianae radix*, *Melissae herba*, *Crataegi folium cum flore*, *Hyperici herba* и *Serratula herba*, както и моделните екстракти AC1 и AC2 са нетоксични при *in vivo* изследване за остра токсичност върху опитни животни в дози от 5 и 10 g/kg b.w..
6. Моделните екстракти AC1 и AC2 притежават анксиолитично действие само в доза 500 mg/kg b.w. при *in vivo* експеримент върху опитни животни при модел на остър стрес.

VI. ПРИНОСИ

1. Разработените и валидирани два HPLC метода са приложими при рутинен контрол на качеството на дроги, екстракти от растителни дроги и фитопрепарати.
2. За първи път е определена антиоксидантна активност на моделните екстракти AC1 и AC2 по три метода ORAC, HORAC и Електрохимичен.
3. За първи път е доказана нетоксичност и анксиолитично действие на моделните екстракти AC1 и AC2 чрез *in vivo* изследване върху опитни животни при модел на остър стрес.

VII. ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. Кацарова М, Димитрова С, Луканов Л, Садъкова Н, Садъков Ф. Екстракция на биологичноактивни вещества от лечебни растения. Научни трудове на Съюза на учените в България - Пловдив, серия Г. Медицина, фармация и дентална медицина, **2016**, том XIX, 47-51.

2. Katsarova M, Dimitrova S, Lukanov L, Sadakov F. Determination of phenolic acids, flavonoids, terpenes and ecdysteroids in medicinal plant extracts and food supplements. Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences – 2017, in press **IF: 0.233**

3. Katsarova M, Dimitrova S, Lukanov L, Sadakov F, Denev P, Plotnikov E, Kandilarov I, Kostadinova I. Antioxidant activity and nontoxicity of extracts from *Valeriana officinalis*, *Melissa officinalis*, *Crataegus monogyna*, *Hypericum perforatum*, *Serratula coronata* and combinations Antistress 1 and Antistress 2. Bulgarian Chemical Communications Special issue G, 2016, in press **IF: 0.229**

4. Kandilarov I, Zlatanova H, Delev D, Kostadinova I, **Katsarova M,** Dimitrova S, Lukanov L, Sadakov F. Anxiolytic Effect and Acute Toxicity of Two Novel Combinations of Plant Extracts - Antistress I and Antistress II on Rats. International Journal of Toxicological and Pharmacological Research. **2017**; 9(1); 39-47

VIII. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. 2-nd International conference on natural products utilization: From plants to pharmacy shelf – 14-17 octomber 2015 Plovdiv

Poster - Chemical characterization and antioxidant activity of combined extract from *Valeriana officinalis*, *Melissa officinalis*, *Crataegus monogyna* and *Serratula coronata*. **M. Katsarova**, S. Dimitrova, L. Lukanov, F. Sadakov

2. Научна конференция за студенти и докторанти “Предизвикателства в химията” – 27-28 ноември 2015г.

Постер - Екстракция на биологично активни вещества от лечебни растения. **М. Кацарова**, С. Димитрова, Л. Луканов, Ф. Садъков

3. 29th ECNP Congress, 17-20 September 2016, Viena, Austria

Poster - Effect individual *Valeriana officinalis* and *Melissa officinalis* extracts and a combination on learning, memory and locomotor activity of rats. I. Kandilarov, **M. Katsarova**, H. Zlatanova, I. Kostadinova, S. Dimitrova, L. Lukanov, F. Sadakov

4. 10-th Chemistry Conference (10cc) 9-11 October 2016, Plovdiv

Poster- Antioxidant activity of extracts of *Valeriana officinalis*, *Melissa officinalis*, *Crataegus monogyna*, *Hypericum perforatum* and *Serratula coronata* and combinations Antistress1 and Antistress2. **M. Katsarova**, S. Dimitrova, L. Lukanov, F. Sadakov, P. Denev, E. Plotnikov, I. Kandilarov, I. Kostadinova.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ПРОЕКТИ

Проект № 10/2016 с ръководител доц. Л. Луканов, дх Катедра "Химия и биохимия"

“Изследване промяната на нивата на цитокини и поведенческите реакции след прилагане на растителни екстракти с адаптогенно действие върху модели на остър и хроничен стрес на плъхове”

Издавам своята благодарност

за професионализма, търпението, доверието, колегиалността и
подкрепата на

Ръководителя

Доц. Людмил Луканов

Рецензентите

Проф. Магдален Златанов

Проф. Пантелей Денев

Доц. Стоянка Николова

Доц. д-р Илия Костадинов

Д-р Ферит Садъков

Доц. Стела Димитрова

Колегите

Проф. д-р Иванка Костадинова и Илин Кандиларов
от катедра „Фармакология и клинична фармакология” на МФ при МУ
Пловдив

Доц. Петко Денев от „Институт по органична химия с център по
фитохимия–БАН“, филиал Пловдив

Колектива

от катедра „Химия и биохимия“, МУ-Пловдив

приятелите

и

моего семейство!