



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И КЛИНИЧНА
ФАРМАКОЛОГИЯ

НИКОЛАЙ БОРИСОВ ЯНЧЕВ

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ФАРМАКОЛОГИЧНО
ПРОУЧВАНЕ НА ЕКСТРАКТ ОТ
***SIDERITIS SCARDICA*, LAMIACEAE**

Автореферат

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен

"доктор"

Докторска програма

„Фармакология (вкл. Фармакокинетика и химиотерапия)“

Научен ръководител:

Доц. д-р Делян Делев, дм

Научен консултант:

Доц. д-р Илия Костадинов, дм

Пловдив, 2023

Дисертационният труд съдържа 151 стандартни машинописни страници. Онагледен е с 46 фигури, 39 таблици и едно приложение.

Цитирани са 303 литературни източника, всички на латиница.

Експерименталните изследвания са проведени в катедра „Фармакология и клинична фармакология“, катедра „Анатомия, Хистология, Ембриология“ към Медицински факултет на МУ Пловдив“, Катедра по медицинска микробиология и имунология „Проф. д-р Елисей Янев“, Фармацевтичен факултет, МУ Пловдив, катедра „Органична и неорганична химия“ - Университет по хранителни технологии, Пловдив.

Дисертационният труд е одобрен и насочен за официална защита от разширен Катедрен съвет на Катедрата по Фармакология и клинична фармакология при Медицински факултет на Медицински университет – Пловдив на 31.08.2022 г, Протокол № 97.

Дисертантът е отчислен с право на защита със заповед Р – 2411/07.10.2022 на Ректора на Медицински Университет Пловдив.

Дисертационният труд е насрочен за защита пред научно жури в състав:

Чл. кор. проф. д-р Мила Василева Власковска, дм, дмн

Проф. д-р Стефка Василева Вълчева-Кузманова, дмн

Проф. д-р Иванка Илиева Костадинова, дм

Проф. д-р Румен Павлов Николов, дм

Доц. д-р Илия Димитров Костадинов, дм

Публичната защита на дисертационния труд пред научно жури ще се състои на 06.07.2023 от 11 часа във II аудитория на Аудиторния комплекс на Медицински университет – Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15А, гр. Пловдив.

Материалите по защитата са на разположение в Научния отдел на МУ-Пловдив, бул. „Васил Априлов“ 15А, гр. Пловдив и са публикувани на интернет страницата на университета.

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на съкращенията.....	4
ВЪВЕДЕНИЕ	7
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО	8
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	9
РЕЗУЛТАТИ	19
ОБОБЩЕНИЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ	41
ОБСЪЖДАНЕ	43
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	49
ИЗВОДИ	50
ПРИНОСИ	51
Списък на научните публикации	52
Участия в конференции и симпозиуми	53

Списък на съкращенията

Латински

Ab – бета амилоид

ABTS - метод за оценка на антиоксидантна активност чрез имерване на абсорбция на азино бис етилбензотиазолин сулфонова киселина

AChE - Ацетилхолинестераза

AD - болест на Алцхаймер

ADAM - 10 Адисинтегрин и металопротеаза домен съдържащ протеин

ALAT - аланинамино трансфераза

ALS - амиотрофична латерална склероза

AMPA - алфа аминоксидрокси метил изоксацоленпропионова киселина

ANOVA - Дисперсионен анализ

APP - амилоиден прекурсор протеин

ASAT - спартатаминотрансфераза

Bcl10 - Б-клетка лимфом ген

BCL2 - Б-клетка лимфом ген

BDNF - мозъчен невротрофичен фактор

Ca - Калций

CCL2 - C-C – мотив хемокинов лиганд 2

CCL5 C-C – мотив хемокинов лиганд 5

CGN - карагенан

Cho - Холестерол

COX-2 - циклооксигеназа 2

CRE - цикличен аденозин монофосфат отговарящ елемент

CREB - цикличен аденозин монофосфат отговарящ елемент свързващ протеин

CUPRAC - метод за оценка на антиоксидантна активност чрез измерване на абсорбция на меден неocupроин

CWT - Цветен тест с думи

CXCL1 - C-X-C – мотив хемокинов лиганд 1

CXCL2 - C-X-C – мотив хемокинов лиганд 2

CXCL8 C-X-C – мотив хемокинов лиганд 8

CYP - Цитохром P

DA - Допамин

DPPH - метод за оценка на антиоксидантна активност чрез имерване на абсорбция на дифенил пикрил хидразил хидрат

DZP - диазепам

ELISA - Ензимно-свързан имуносорбентен анализ

EPM - повдигнат кръстосан лабиринт

ERK - екстрацелуларна сигнал регулирана киназа

FA – Форситозид А

FRAP - метод за оценка на антиоксидантна активност чрез редукция на железни йони

FST - Тест за принудително плуване

GABA - Гама аминоксидна киселина

GAE - Еквиваленти на галусна киселина

Glu - Глюкоза

GPX4 - глутатион пероксидаза 4

GSH – глутатион синтетаза

HCT - Хематокрит

HD - болест на Хънтигтън

HE – хематоксилин- еозин

HG - високо глюкозен
HGB - Хемоглобин
HIF - Хипоксия индуциран фактор
HPLC - Високоэффективната течна хроматография
HPLC - Хроматография под високо налягане
5-HT 5- Хидрокситриптамин (серотонин)
IFN- γ - интерферон гама
IL-10 – интерлевкин десет
IL-1 β – интерлевкин ендо бета
IL-4 - интерлевкин 4
IL-6 – интерлевкин шест
iNOS - индуцируема азотен оксид синтаза
IRF-1 - интерферонов регулаторен фактор 1
IUCN - Международен съюз за опазване на природата и природните ресурси
I κ B (IKK) - И капа бе киназа
JNK - c – jun – n терминал киназа
K0 - негативна контрола
K+ позитивна контрола
KC - кератоцинов хемоатрактант
LDH - лактат дехидрогеназа
LPS - липополизахарид
LTP - дълготрайна потенциация
M1 - мускарин рецептор 1
M2 - мускарин рецептор 2
MAO - Моноаминоксидаза
MAPK - митогенактивирана протеин киназа
MCH - средно съдържание на хемоглобин в един еритроцит
MCHC - средна концентрация на хемоглобин в еритроцитите
MCI - леко когнитивно увреждане
MCP-1 - моноцитен хемоатрактантен протеин 1
MCP-1 - моноцитен хемотактичен протеин
MCV - среден обем на еритроцитите
MDA – малондиалдехид
MIP-2 - макрофагов възпалителен протеин
miRNA - Микро рибонуклеиновакиселина
MMP12 - матрична метало протеиназа
MS - мултиплена склероза
MTT - метод за измерване на клетъчна жизнеспособност чрез колориметрично измерване на диметилтиазол диметилтетразол
NA - Норадреналин (Норепинефрин)
NF- κ B – нуклеарен фактор капа B
NF- κ B - Ядрен фактор-капа B
NGF - фактор на невроналния растеж
NMDA - N метил D аспартат
NO - Азотен оксид
Nox2 - никотинамид аденин динуклеотид фосфат оксидаза 2
Nox4 - никотинамид аденин динуклеотид фосфат оксидаза 4
Nrf2 - нуклеарен еритроид зависим фактор
ODDD - кислородно зависима деградация домен
p38 - p 38 митоген активирана киназа

PD - болест на Паркинсон
PGE2 - простагландин E2
PKC - Протеинкиназа C
PLT - Тромбоцити
PRR - рецептор
PSQ - въпросник за оценка на стрес
QE - Еквиваленти кверцетин
RBC - Еритроцити
ROS - реактивни кислородни единици
Rpm - обороти в минута
SIRT – Сиртуин
STAT1- сигнален трансдюсер и активатор на транскрипция 1
TE - Тролокс еквиваленти
Tgc - Триглицериди
TGF- β - трансформиращ растежен фактор бета
TLR4 - Toll-like рецептор 4
TNF- α Тумор некроза фактор алфа
Ua - Урати
VEGF – Васкуларен ендотелиален растежен фактор
WBC - Левкоцити
WMI - индекс на работната памет

Български

ГАМК - гама аминокиселина
ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина
ЕД50 - ефективна доза 50 %
K0 - негативна контрола
K+ - позитивна контрола
ЛПЗ – липополизахарид
НСПВС – нестероидни противовъзпалителни средства
ЦНС - централна нервна система

ВЪВЕДЕНИЕ

Sideritis scardica, популярен като гръцки планински чай, Мурсалски, или Пирински чай, южноевропейски *Lamiaceae*, се използва от векове в етнофармакологията при белодробни заболявания, простуда и стомашно-чревни оплаквания. Още в своята "Materia Medica" (1-ви век) Педаний Диоскурид описва растения, наречени "Sideritis". Името произлиза от гръцката дума "*sideros*", "желязо" или "този, който е или има желязото". В българските Родопи билката е известна още като "чай за дълголетие" поради множеството си ефекти.

От 1989 г. *Sideritis scardica* е включен в Червения списък на България, а IUCN (Международен съюз за опазване на природата и природните ресурси) класифицира растението като потенциално застрашено през 2001 г.

Досега са идентифицирани над 100 различни компоненти на етеричното масло. Монотерпени, сесквитерпени, дитерпени, както и мастни киселини и техните естери могат да бъдат открити във всички изследвани популации. Освен това в дрогата се откриват тритерпени и повече от 40 полифеноли и флавоноиди. Съдържа също производни на бензоена, хининова и канелена киселина, ферулова киселина и фенилетаноидни гликозиди. Точният състав зависи от местоположението и начинът на култивиране на растението.

През последните години се наблюдава отново засилен интерес към култивираното производство на тази култура, който, придружен с резултатите от научни трудове, описващи ефекти на билката върху ЦНС, мотивира идеята за научен труд, целящ да установи адаптогенните, невропротективните и подобряващи когницията свойства на това ендемично за България растение. Данните от изследванията могат да се използват при избор на дизайн на клинични проучвания, свързани с редица социално значими заболявания, при които терапевтичните възможности са ограничени - неврокогнитивни нарушения, деменция, болест на Алцхаймер, депресивни разстройства, хиперкинетично разстройство с нарушение на вниманието.

Характерът на изследванията предполага проучване на остра и хронична токсичност у опитни животни и изработване на хистологични препарати от различни органи, изследване на поведение и определяне на нивата на проинфламаторни цитокини при два модела на стрес и липополизахарид-индуцирано невровъзпаление, изследване на процесите на обучение и памет в три модела на увредена памет.

Лабораторно отглежданите бели плъхове са най-подходящия и най-често използван животински вид за провеждане на съответните експерименти и това се основава на данните от специализираната научни материали. В достъпната научна литература има данни, които доказват, че стресът причинява изменение на нивата на цитокините (IL-6, IL-1 β , IL-10, TNF- α) в серума на плъхове и хора. Данните от експериментални и клинични проучвания установяват връзка между променените нива на цитокини под

влияние на стреса и развитието на заболявания като депресия и неврокогнитивни дегенеративни изменения. Цитокините могат да служат като надежден маркер, с който да се отчете влиянието на стреса върху организма и да се направи оценка на ефикасността на терапията с адаптогенни растителни екстракти.

Представеният дисертационен труд предлага научни изследвания с фундаментален и приложен характер, изградени върху оценка на биологично активни вещества от природен произход и с потенциал за приложение като адаптогенни средства за превенция и лечение.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

Целта на този труд е да се осъществи системно изследване на токсичността и различни фармакологични ефекти на екстракт от мурсалски чай (*Sideritis scardica*) – противовъзпалителен, анксиолитичен и невропротективен.

За постигането на целта са поставени са следните задачи:

1. Фитохимичен анализ на екстракта и определяне на антиоксидантна активност.
2. Определяне на остра и хронична токсичност на сух екстракт от *Sideritis scardica*, изследване на хематологични и биохимични параметри, както и хистологични препарати за морфологични изменения в бъбрек, стомах, кора на мозък, черен дроб.
3. Изследване на поведение на опитни животни, третирани със сух екстракт от *Sideritis scardica* при модел на остър и хроничен стрес за оценка на тревожност, депресивно поведение, разпознавателна памет
4. Определяне на промените в нивата на цитокини на опитни животни, третирани със на сух екстракт от *Sideritis scardica* при модел на остър стрес след 14 дневно перорално приложение и модел на хроничен стрес в продължение на 8 седмици.
5. Определяне на промените в нивата на цитокини в нивата на цитокини на опитни животни, третирани със сух екстракт от *Sideritis scardica*, при инжектиране на липополизхарид
6. Изследване на ефектите върху когницията у опитни животни, третирани със сух екстракт от *Sideritis scardica*, при 3 модела на увредена памет в поведенчески тестове.
7. Изследване на антиинфламаторен ефект на екстракт от *Sideritis scardica* при инжектиране на карагенан.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Растителен материал и екстракт

Изсушен растителен материал от култивиран мурсалски чай (*Sideritis scardica*) бе закупен от NW Health Ltd, България. Екстрактът бе произведен чрез воднометанолова мацерация (70% v/v) и процесирание посредством разпръсквателна сушилка при температура под 45°C във фирма Vesselino Ltd., Казанлък.

Фитохимичен анализ

Фитохимичните изследвания бяха проведени в лабораторията на катедра „Органична и неорганична химия“ - Университет по хранителни технологии, Пловдив.

Определяне на общи феноли

Количеството на общите феноли в получените екстракти е определено по метода на Folin–Ciocalteu. Към екстрактът от мурсалски чай (0.2 ml) се добавя 1 ml реактив на Folin-Ciocalteu (разреден 5 пъти) и 0.8 ml 7.5% Na₂CO₃. След 20 минути абсорбцията се измерва при 765 nm срещу празна проба. Резултатите се представят като милиграм еквиваленти галова киселина за грам (mg GAE/g) сухо вещество.

Определяне на общи флавоноиди

Съдържанието на общи флавоноиди в екстрактите също е определено спектрофотометрично с използване на Al(NO₃)₃. Резултатите са представени като милиграм еквиваленти кверцетин за грам (mg QE/g) сухо вещество.

Определяне на антиоксидантна активност

Изследваният екстракт (0.15 ml) се смесва с 2.85 ml прясно приготвен разтвор на DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (0.1 mM в метанол). Реакционната смес се инкубира на тъмно за 15 min при 37°C. Редукцията на абсорбцията се отчита спектрофотометрично при 517 nm.

ABTS метод

ABTS радикалът се приготвя чрез смесване в еквимоларни количества ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (7 mM в д. H₂O) и калиев персулфат (2,45 mM във вода) и престой за 16 h на тъмно. Преди анализ 2 ml от ABTS радикала се разтварят в метанол в съотношение 1:30 до получаване на крайна адсорбция 1,0÷1,1 при 734 nm. За анализа 0,15 ml от изследвания екстракт се смесват с 2,85 ml прясно приготвен разтвор на ABTS радикала. Реакционната смес се инкубира на тъмно за 15 min при 37°C. Редукцията на адсорбцията се отчита спектрофотометрично при дължина на вълната 734 nm.

FRAP метод

Реактивът се приготвя от смесването на предварително приготвени 0.3 M ацетатен буфер с pH 3.6, 10 mM 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) и 20 mM FeCl₃×6H₂O в съотношение 10:1:1. Изследваният екстракт (0.1 ml) се добавя към 3 ml FRAP реагент. Реакционната смес се инкубира за 5 min при 37°C

на тъмно. Абсорбцията на формираното цветно съединение се измерва при дължина на вълната 593 nm. Резултатите от антиоксидантната активност се изразяват като mM Trolox еквиваленти за грам суха суровина (mM TE/g).

CUPRAC метод

Инициирането за протичане на реакцията започва чрез смесване на 1 ml $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 ml Neocuproin (7,5 mM в метанол), 1 ml 0,1 M амониев ацетатен буфер с pH 7; 0,1 ml от изследвания екстракт и 1 ml дестилирана H_2O . Реакционната смес се инкубира за 20 min при 50°C на тъмно. След охлаждане на сместа абсорбцията на полученото съединение се отчита при 450 nm. Резултатите и от четирите метода са представени като милимола Trolox еквиваленти (mM TE).

Всеки от разгледаните методи за анализ на антиоксидантна активност се основава на различен механизъм и се прилага при точно определени условия (pH, температура), поради което за определяне на пълния антиоксидантен капацитет на дадено съединение е необходимо да се приложат няколко успоредни метода.

Определяне на захари

Хроматографските анализи се провеждат на високоефективен течен хроматограф (HPLC) Elite Chrome Hitachi, оборудван с помпа LC-20 AD, колонен термостат, рефрактометричен детектор Chromaster 5450 и софтуерна програма. За хроматографското разделяне и количественото определяне на захари в екстракт от мурсалски чай се използва колона Shodex® Sugar SP0810 (300 mm × 8.0 mm i.d.) с Pb^{2+} и предколона Shodex SP - G (5 μm , 6 × 50 mm) и мобилна фаза д. H_2O . Мобилната фаза се филтрува под вакуум през 0,2 μm мембранен филтър (Sartorius AG, Goettingen, Germany). Всички проби преди инжектиране се филтруват през филтри ISOLab (Germany) с диаметър 4 mm и размер на порите 0,45 μm . Обемът на инжектираната проба е 20 μl . Пробите са анализирани със скорост на потока 0,5 mL/min, температура на колоната 80°C, температура на детектора 35°C. Концентрациите се изчисляват като площите на получените пиковете се заместят в уравнения на стандартните прави.

Лабораторни предклинични експерименти

Определяне на остра токсичност

Използвани са мъжки полови зрели плъхове порода Wistar албинос, с тегло около 180 грама, предоставени от Вивариум на Медицински университет Пловдив. Всяка експериментална група включва по 6 животни, и получава еднократна доза от екстракта. Дозите са 1000, 2000, 5000 и 10000 mg/kg телесно тегло (тт).

Определяне на субхронична токсичност.

Опитните животни - 24 мъжки плъха Wistar албинос са получени от Вивариум на Медицински университет Пловдив. Животните се настаняват в помещение, осигуряващо вентилация с температурен диапазон от $25 \pm 2^\circ\text{C}$ при 12-часов цикъл светлина-тъмнина. Храненето се състои от стандартна хранителна диета и предоставяне на чешмяна вода *ad libitum*. Животните са разделени на четири групи, всяка група се състои от 6 плъха.

Група 1 представлява „шам“ група, а групи 2, 3 и 4 приемат перорално воден разтвор на хидрометанолен сух екстракт от *Sideritis scardica* в дози от 100, 200 и 400 mg/kg телесно тегло в продължение на 12 седмици. Животните гладуват 12 часа преди вземането на проби от серум и органи.

Хематологичен анализ.

Бяха взети проби от венозна кръв от югуларната вена под хуманна кондиционирана инхалативна анестезия. Тестовете бяха проведени с помощта на RT-7600 Auto Hematology Analyzer и реагенти, предоставени от производителя.

Биохимичен анализ

Проба от венозна кръв се взема от югуларната вена под хуманна кондиционирана инхалативна анестезия. Кръвните проби се събират в епруветките и се центрофугират при 4000 rpm в продължение на 10 минути. Серумът незабавно се замразява при -20°C за по-нататъшен анализ. Извършен е анализ на серия от биохимични параметри с помощта на автоматичен биохимичен анализатор Rayto Chemray-120 и комплекти от Biomaxima, Полша.

Имунологичен анализ на цитокини при модел на остър студов стрес

Проба от венозна кръв се взема от югуларната вена под хуманна кондиционирана инхалативна анестезия. Кръвните проби се събират в епруветките и се центрофугират при 4000 rpm в продължение на 10 минути. Серумът незабавно се замразява при -20°C за по-нататъшен анализ.

Имунологичен анализ на цитокини при модел на хроничен стрес

Проба от венозна кръв се взема от югуларната вена под хуманна кондиционирана инхалативна анестезия. Кръвните проби се събират в епруветките и се центрофугират при 4000 rpm в продължение на 10 минути. Серумът незабавно се замразява при -20°C за по-нататъшен анализ.

Имунологичен анализ на цитокини при модел на хронично възпаление чрез липополизахарид

Животните от експерименталните групи се третират с екстракта в дози от 100, 200, и 400 мг/кг две седмици преди началото на експеримента. След това плъховете от експерименталните групи и позитивната контрола биват системно инжектирани интраперитонеално с разтвор на липополизахарид в доза 250 микрогр/кг продължение на 5 дни, а на последния ден - един час преди получаване на серум в доза от 1 мг/кг.

Проба от венозна кръв се взема от югуларната вена под хуманна кондиционирана инхалативна анестезия. Кръвните проби се събират в епруветките и се центрофугират при 4000 rpm в продължение на 10 минути. Серумът незабавно се замразява при -20°C за по-нататъшен анализ.

In Vitro изследване на проинфламаторни цитокини

Изследванията на нивата на цитокини са извършени в катедра по Микробиология и имунология, Медицински факултет на МУ Пловдив.

Използваният метод е Ензимно-свързан имуносорбентен тест ELISA с готови търговски китове при стриктно спазване на методичните указания на производителя.

Принцип на метода:

За количественото изследване на цитокините разредените серуми от плъхове, вътрешните контроли и стандартите на теста се накапват върху твърда фаза с моноклонални антитела срещу съответния цитокин. След инкубация и измиване се поставя пероксидазен конюгат (второ антивидово анти тяло) за образуване на комплекс с цитокина. Следва второ промиване за отстраняване на несвързания конюгат. При набавяне на хромогенен субстрат за ензима настъпва цветна реакция, маркираща наличие на цитокини. Абсорбцията, която е пропорционална на цитокиновата концентрация, се измерва колориметрично чрез ELISA рийдер TECAN на 450 и 620 nm. Чрез построяване на стандартна крива (линеарна регресия) се определя концентрацията на всеки цитокин в pg/ml. Всяка експериментална и контролна група е съставена от 6 броя животни.

Модел на остър студов стрес

Животните от експерименталната група биват третирани с екстракт в доза от 100, 200, и 400 мг/кг в продължение на 30 дни. Животните от негативната и позитивната контрола се третират с дестилирана вода. На последния ден, 60 минути след третиране с екстрактите, плъховете от експерименталните групи, както и тези от позитивната контрола се поставят в пластмасови корита и се подлагат на остър студов стрес в хладилник при температура 5°C в продължение на 1 час. Непосредствено след това се провеждат поведенческите експерименти. Всяка експериментална и контролна група е съставена от 6 броя животни.

Модел на хроничен стрес

След двуседмично третиране на опитните животни от експерименталните групи с екстракта в доза от 100, 200, и 400 мг/кг започва кондиционирането на хроничния стрес. В продължение на 8 седмици животните са подложени ежедневно на различен микростресор. Такъв може да бъде лишаване от храна, лишаване от вода, намокряне на талаша, накланяне на клетката под ъгъл от 45 градуса, обръщане на светлинния режим за 24 часа – светлина или тъмнина, подаване на шум от хищник. Поредицата от стресори се варира всяка седмица, за да бъде непредвидима и да не настъпва адаптация на опитните животни. Животните от негативната контрола се третират с дестилирана вода и не са подложени на стресово влияние. Животните от позитивната контрола, както и експерименталните животни, третирани с екстракт в доза от 100, 200 и 400 мг/кг са подложени на стресори. Всяка експериментална и контролна група е съставена от 6 броя животни.

Тест за принудително плуване

Тестът за принудително плуване се използва за оценка на депресията при гризачи. Състои се от две сесии – предварителен тест и същинско тестване. Предварителният тест се прави 24 часа преди същинския тест. Всяко животно се поставя в цилиндрична тръба с 20 см ширина и 35 см височина, напълнена с 18 см воден стълб ($t^{\circ}= 25^{\circ}$) за 15 минути и след това се отстранява и прибира обратно в клетката си. Тестовата сесия се провежда 24 часа по-късно. Всеки плъх се поставя в цилиндричната тръба за 5 min и се отчита времето на неподвижност (T_0).

Животното се счита за неподвижно, когато не се бори да избяга и плава, правейки само необходимите движения, за да държи главата си над водата. Критерий за антидепресивен ефект е значително намаляване на T_0 , респективно увеличаване на времето на активно плуване. Всяка експериментална и контролна група е съставена от 6 броя животни.

Тест повдигнат кръстосан лабиринт (Elevated plus maze, EPM)

При теста повдигнат кръстосан лабиринт (EPM) животните се поставят в центъра на лабиринта и се оставят сами да изберат да прекарват времето си в отворени или затворени рамена. Лабиринтът представлява платформа от непрозрачен плексиглас, издигната 40 см над земята с две открити и две

закрити рамене. Плъховете предпочитат затворени и тъмни пространства, така че избягват осветените дялове на лабиринта. Увеличеното време на престой в откритите рамене и увеличаването на броя на влизанията в тях корелират с анксиолитичен ефект. Бяха оценени следните параметри: брой влизания на отворени и затворени рамена; време, прекарано във всяко от тях; и съотношението отворени/общи влизания в ръкавите. Всяка експериментална и контролна група е съставена от 6 броя животни.

Тест за социално взаимодействие

При теста за социално взаимодействие всеки плъх се изследва с непознат за него партньор. Поведението им се наблюдава в продължение на 5 минути. Отчита се времето на социално взаимодействие с партньора. За такова се интерпретира същински контакт, докосване на козината, качване върху другото животно. Намаленото време на социално взаимодействие (или липса на такова) е показание за тревожно поведение, докато повишеното време говори за анксиолитичен ефект. Всяка експериментална и контролна група е съставена от 6 броя животни.

Поведенчески тестове при модели на увредена памет

Животните от експерименталните групи биват третирани с екстракт в доза 100, 200 и 400 мг/тг) в продължение на 30+ дни. Животните от негативната контрола се третират с дестилирана вода, а животните от позитивната контрола с дестилирана вода и допълнително инжектиране на амнезичен агент в съответните дни на експериментална дейност или обучение. Всяка група се състои от 8 броя животни.

При моделът на увредена памет чрез диазепам животните от позитивната контрола се инжектират интраперитонеално с разтвор на диазепам 2,5 мг/кг един час преди провеждането на експериментите и обучителните сесии.

При моделът на увредена памет чрез скополамин животните от позитивната контрола се инжектират интраперитонеално с разтвор на скополамин 1мг/кг един час преди експериментите и обучителните сесии.

При моделът на увредена памет животните от позитивната контрола се инжектират интраперитонеално с разтвор на натриев нитрит 25мг/кг един час преди провеждането на експериментите и обучителните сесии.

Activity cage

Спонтанната локомоторна активност се изследва чрез автоматичен електронен апарат Acitivity cage (Ugo basile, Italy). Животното се поставя в пластмасова клетка с прозрачни стени и прозрачен капак. Регистрирането на хоризонталната и вертикалната активност на животното става чрез инфрачервени фотосензори, разположени по стените и пода на клетката. Всяко от животните се поставя в центъра на апарата и се оставя свободно да изследва полето в продължение на 5 минути еднократно. Хоризонталната и вертикална активност се отчитат в относителни единици (relative units) като броя на вертикалните преминавания трябва да бъде по-висок от този на хоризонталните. Данните са получени от експерименталните и контролни

групи, всяка от които се състои от 8 броя животни. Тестът представлява и отпавна точка за провеждането на други поведенчески тестове.

Тест Т-Лабиринт (T-maze)

Т- тестът представлява класически метод за изследване на пространствено ориентиране и работна памет. Т-лабиринтът е конструиран от черен плексиглас и се състои от три рамена под ъгъл от 90°. Тестът се провежда в продължение на 3 дни. На първия ден започва лишаването на животните от храна и хабиитуирането им към установката в сесии от по 5 мин. Втория ден продължава с хабиитуиране като из лабиринта във всяко рамо има малко количество разпръснати хранителни пелети. На третия ден се провежда същинския тест, като с всяко животно се провеждат десет преминавания. При първото преминаване животно форсирано е насочено към едното рамо на лабиринта, като в края го очаква възнаграждение под формата на хранителна пелета. При всяко следващо преминаване възнаграждението се премества в противоположното рамо на лабиринта. В тази парадигма плъховете по своята същност са склонни да сменят посещенията на рамената по време на последователни опити, което се нарича „спонтанно редуване“ Spontaneous alteration (Lalonde, 2002). Тази тенденция може да бъде подсилена чрез примамване с храна, когато животните са лишени от храна. Плъхът във всеки следващ опит винаги трябва да избира противоположно рамо на предишното си посещение, в противен случай се записва грешка в паметта. След избор на рамо без възнаграждение, се прилага процедура за самокоригиране, като хранителната пелета бива оставена и рамото, в което се намира - отворено, докато не бъде посетено, позволявайки на плъха да промени избора си. Наградата за храна остава на мястото си, докато не бъде намерена и изядена. Отчитат се следните показатели:

Правилен избор = посещение на рамо с възнаграждение.

WMI (индекс на работната памет) = брой правилни избори/брой общи опити
Получените резултати се основават на данни от експериментални и контролни групи, всяка от които е съставена от 8 броя животни.

Опознавателен/разпознавателен тест

Опитната постановка се състои от тъмна плексигласова конструкция с размери 60 x 60 x 40 см (ширина x дължина x височина). Изследването се провежда в два последователни дни. Всяка група е съставена от 8 броя животни.

Първият ден животните се поставят в клетката в продължение на 3 минути, за да изследват територията без присъствието на обектите. Това позволява хабиитуирането на животните към опитното поле. След това се поставят два еднакви обекта (A+A) и животните се оставят да изследват обектите в продължение на 5 минути.

На втория ден е същинското тестване, когато животно се поставя в същата среда с два предмета, от които единият е стар (познат, А), а другият е

различен, но подобен на познатия (A+B). Отчита се времето прекарано в обследване на новия и стария обект, за период от 5 минути. Оценяването се получава чрез дискриминационен индекс (DI), който се изчислява по формулата:

$DI = tB / (tA + tB)$, където:

tA - време за изследване на обект А

tB - време за изследване на обект В

У-лабиринт

У-лабиринтът е конструиран от черен плексиглас и се състои от три рамена под ъгъл от 120°. Всяко рамо е с размери 10см x 50см x 30см (ширина x дължина x височина). Тестът се изпълнява в следните стъпки:

1. Трите рамене се разпределят на случаен принцип:

1) рамо - А; 2) рамо - В; 3) рамо - С.

2. Гризачът се поставя в центъра на лабиринта и се оставя да се движи свободно, докато влезе в друго рамо заедно с опашката. Отбелязва се последователността на влизане в различните рамена - А, В или С.

Общият брой влизания се отчита без първото рамо, в което се поставя животното (В).

Като триада се определя последователност от три букви, а когато те са три различни в последователност се наричат алтернация. Представянето на опитните животни се определя по формула за процента на алтернациите:

(Общ брой алтернации / общ брой триади) * 100

3. Животното се наблюдава еднократно в продължение на 5 минути.

Тестът се провежда в два последователни дни. Всяка група е съставена от 8 броя животни.

Методи за активно обучение (Two-Way Active Avoidance test; Shuttle-box test)

Това е тест за двупосочно условно активно избягване, при който животните научават, че определен стимул (напр. звук, светлина, условен стимул) е надежден предсказател за предстоящо наказателно преживяване (напр. електрошок, безусловен стимул), и могат да предприемат действие, за да го избегнат. Тази задача се класифицира като условно рефлексна - животното трябва да запомни връзката между условния и безусловния стимул, за да е в очакване на условния стимул и да го избегне. Тестът се провежда в специално конструиран апарат произведен от Ugo Basile, италианска фирма за експериментална медицинска апаратура. Опитите се провеждат в клетка с размери, подходящи за този вид опитни животни. Стандартният апарат представлява автоматизирана клетка, разделена на две чрез вертикална преграда с отвор в центъра, през който преминават плъховете. Подът представлява решетка от успоредно разположени метални пръчки, отстоящи на 1 см една от друга. Таванът на клетката е от прозрачен капак, на който е монтирана лампа подаваща светлинен сигнал едновременно със звуковия дразнител (условни стимули).

Стандартната обучителна програма се състои от 30 тренировки със следните параметри: едновременно приложени светлинен и звуков дразнител (670 Hz, 70 dB) в продължение на 6 секунди, последван от 0.4 mA електрическа стимулация по решетъчния под на клетката с продължителност 3 секунди. Паузата между отделните тренировки е 12 секунди. Обучителната сесия се състои от 4 последователни дни.

Тестът за краткосрочна памет се провежда на 5-ти ден, а тестът за дълготрайни паметови следи на 12-ти ден (считано от първия ден на тренировката), по програма със същите параметри, но без електрическа стимулация. Автоматично се отчитат броя на условните отговори (авойданси, avoidances). Всяка група е съставена от 8 броя животни.

Методи за пасивно обучение (Пасивно условно избягване с наказателно подкрепление на плъхове (step-through и step-down тестове).

Step-through test

Използва се автоматичен електронен апарат за пасивен авойданс с наказателно подкрепление (Automatic set-up for passive avoidance, "step-through", Ugo Basile, Italy). Апаратът е с две отделения, светло и тъмно, разделени чрез плъзгаща се врата. Всеки експериментален ден включва 3 тренировки през 60 минути по стандартната програма на апарата със следните параметри: закъснение (delay) от 7 секунди преди да се отвори вратата, последвано от 12 секунди отворена врата. Опитното животно се поставя в светлото помещение и след латентен период от 7 сек вратата се отваря автоматично, давайки му достъп до тъмното помещение. След навлизане в тъмното помещение (латентно време), вратата се затваря зад животното и то е подложено на краткотраен наказателен стимул (електрически ток по ходилата, с интензитет 0.4 mA, за 9 сек). Ако плъхът не премине в тъмното помещение автоматично се включва брояч за време (в секунди), който отчита максимално време от 3 минути (180 ± 2 секунди). Провеждат се два дни обучителна сесия. Тестовите за запамятаване са два: тест за краткосрочна памет - 24 часа след обучителната сесия (на 3-ти ден) и тест за дълготрайно съхраняване на паметовите следи (на 10-ти ден). Всеки експериментален ден включва по 3 тренировки през 1 час. За критерий на обученост се приема престой на животното в светлото помещение на апарата в рамките на максималното време от 178 секунди при 2 последователни тренировки. Всяка група е съставена от 8 броя животни.

Step-down test

Използва се автоматичен електронен апарат за пасивен авойданс с наказателно подкрепление (Automatic set-up for passive avoidance, "step-down", Ugo Basile, Italy). Представлява стандартна клетка с пластмасова вибрираща платформа в средата и се използва зададената в електронната част на апарата програма. Всеки експериментален ден включва 2 тренировки през 60 минути. Обучителната сесия се състои от 2

последователни дни, на 3-ти ден се провежда теста за краткосрочна памет, а на 8-ми ден - за дълготрайни паметови следи.

Опитното животно се поставя върху пластмасовата платформа, която след включване на апарата вибрира вертикално. Отчита се времето за реакция (латенция) – слизане от платформата с 3 или 4 лапи. За критерий за обученост на животно се приема 60 секунди престой върху платформата при 2 последователни тренировки. Всяка група е съставена от 8 броя животни.

Оток на задната лапка на плъх, предизвикан с въвеждане на карагенин
Животните биват третиран с екстракта от мурсалски чай в дози от 100, 200 и 400 мг/кг в продължение на 30 дни.

Използва се апарат плетизмометър (Ugo Basile, Italy). Преди третирането се измерва обемът на задната дясна лапа на животните от всички групи. След това в задната дясна лапа на всички животни се инжектира 0.1 мл от 1% разтвор на карагенин в 0.9% натриев хлорид за предизвикване на карагенинов оток. Непосредствено след инжектирането на карагенин на животните от негативната контрола се инжектира интраперитонеално 0.1 мл 0.9% разтвор натриев хлорид; на животните от позитивната контролна група диклофенак в доза 25 мг/кг телесна маса, а на животните от опитните групи се инжектират интраперитонеално изследваните вещества. Всяка група е съставена от 6 броя животни. С апарат плетизмометър (Ugo Basile, Italy) се отчита обемът изместена течност от задната дясна лапа на плъха съответно 2, 3, 4 и 24 часа след третирането с карагенин. Процентът оток на лапата се изчислява по следната формула:

$$\text{Оток на лапата (\%)} = (V_t - V_o) / V_o * 100$$

V_o – среден обем на лапата преди третиране,

V_t – среден обем на лапата на съответен час

Критерий за противовъзпалителна активност е намален оток на лапата спрямо контролната група.

Статистическа обработка на данните

Статистическата обработка на получените резултати се осъществява чрез софтуерен пакет IBM SPSS 19.0. За определяне на разпределението се провежда 1 Sample Kolmogoroff – Smirnoff тест. За всеки показател се определя средна аритметична стойност и стандартна грешка на средната аритметична. Сравняването на резултати между групите се осъществява с ANOVA тест, тест за хомогенност на разпределението между групите Levine, като резултатите за сигнификантност се представят чрез post-hoc тест LSD при наличие на хомогенност и Games-Howell при липса на хомогенност. За статистически значими се приемат резултати при ниво на значимост $p < 0,05$.

РЕЗУЛТАТИ

Фитохимичен анализ и антиоксидантна активност.

Резултатите от фитохимичния анализ и антиоксидантна активност на изследвания екстракт са представени в Таблица 1. Антиоксидантната активност е определена по четири метода DPPH, ABTS, FRAP и CUPRAC.

Таблица 1. Фитохимичен анализ.

Параметър	Стойност
Захароза g/100 g	13.30
Глюкоза g/100 g	4.61
Фруктоза g/100 g	4.30
Тотални захари g/100 g	22.21
Тотални полифеноли, mg GAE/g	88.66±2.57
Тотални флавоноиди, mg QE/g	22.01±1.23
Антиоксидантна активност, mM TE/g	
DPPH	693.89±3.61
ABTS	1009.60±13.82
FRAP	552.66±5.65
CUPRAC	1418.60±23.39

Резултати от хематологични изследвания.

Резултатите от хематологичните изследвания (Таблица 2) не показват статистически достоверни изменения при нито един параметър. Наблюдава се намаление на тромбоцитите, но то е в рамките на описаните за вида референтни стойности (Charles River Laboratories Preclinical Services Montreal Inc., 2008).

Таблица 2. Хематологичен анализ след 12-седмично третиране.

Параметър	K0	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
WBC 10 ⁹ /L	4±0.70	4.01±1.2	3.74±0.84	4.11±1.26
RBC 10 ¹² /L	7.93±0.46	7.44±0.71	7.33±0.6	7.57±0.52
HGB g/L	147.67±8.87	143.83±8.86	140.5±8.85	140.33±7.87
HCT L/L	0.42±0.02	0.41±0.02	0.34±0.14	0.4±0.02
MCV fL	52.53±1.04	54.63±2.35	53.48±1.65	52.6±1.17
MCH pg	18.63±0.33	19.37±0.83	18.32±1.3	18.53±0.48
MCHC g/L	354.67±3.27	355±2.68	342.83±25.5	352.33±3.33
PLT 10 ⁹ /L	680.67±186.45	546.17±315.58	520.67±179.29	569.83±241.87

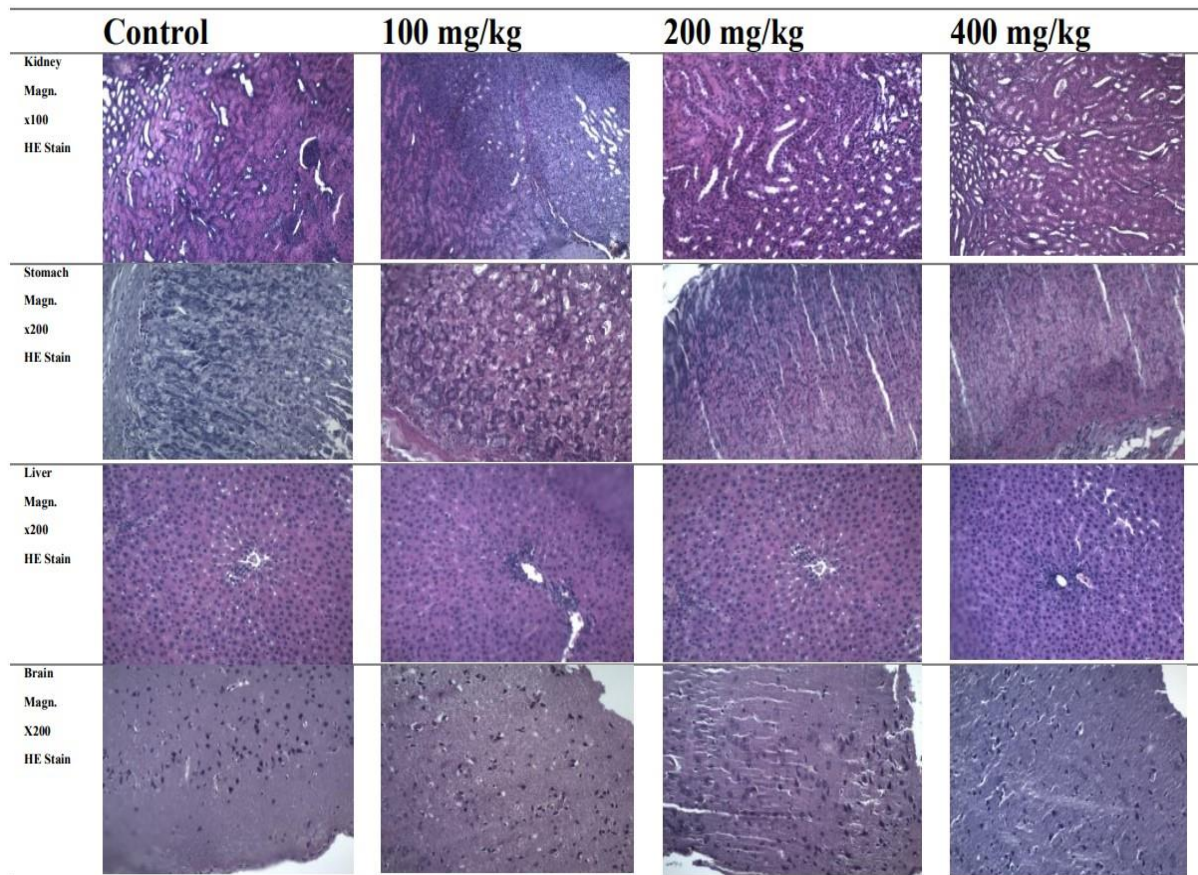
Резултати от биохимични изследвания

Резултатите от биохимичните изследвания (Таблица 3) показват статистически достоверно намаление на триглицеридите и калция. Въпреки това документираните стойности са в описания за породата референтен диапазон (Charles River Laboratories Preclinical Services Montreal Inc., 2008).

Таблица 3. Биохимични параметри след 12 – седмично третиране

Параметър	K0	100 mg/kg	200 mg/kg	400 mg/kg
Glu mg/dL	65.5±11.43	81.17±19.05	80.33±14.36	83.83±17.94
ASAT U/L	135.83±16,5	133±25.57	117.17±23.18	135.33±18.61
ALAT U/L	5.5±1.05	7.33±2.73	5.67±1.37	6.17±1.94
Cho mg/dL	69.79±13.11	78.33±6.76	72.82±15.94	66.54±10.31
Ua mg/dL	1.73±0.73	1.82±0.67	1.85±1.50	1.92±0.44
Tgc mg/dL	78.5±14.32	62.67±9.54	52.33±20.51*L	47±10.26*L
Ca mg/dL	8.23±0.23	7.97±0.27	7.2±0.74*	7.7±0.30

Резултати от хистологични изследвания



Фигура 1. Препарати от хистологични изследвания след 12 - седмично третиране.

Проведеното хистологично проучване демонстрира, че органите на животните от всички изследвани групи са с нормална морфология (Фигура 1).

Бъбрек. Не са наблюдавани промени в микроструктурата на кората и медулата на третираните животни. Това важи както за гломерулите, така и за всички канални системи.

Стомаш. Наблюдаваните изображения не показват разлики в стомашната лигавица или жлеза на третираните и контролните групи животни.

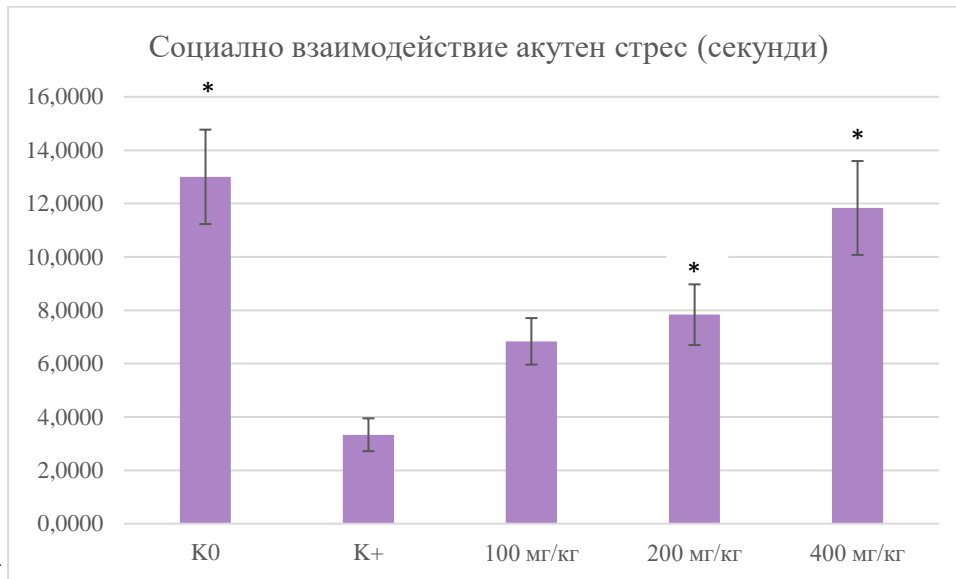
Черен дроб. Чернодробните лобули са добре дефинирани, с непокътната граница и структура на v. centralis, триади и клетки. Хепатоцитите не показват никакви промени от нормалната морфология.

Мозък. Примерните изображения на експерименталните животни показват нормална структура и липса на ремоделиране на мозъчната кора.

Тест за социално взаимодействие при модел на остър стрес

Експерименталните данни от теста са представени във Фигура 2. Сравняването на двете контроли показва, че при група K0 се наблюдава значимо по-висока стойност на параметъра време на социално

взаимодействие спрямо K+. Това показва, че избраният тест за социално взаимодействие е подходящ за оценка на поведенческите промени при модел на остър стрес. Прави впечатление, че стойността на отчетения показател време за социално взаимодействие при доза 400 мг/кг (11,8333) се доближава до тази за K0 (13,0000). При всички групи, третирани с екстракта се наблюдава дозозависимо подобряване на параметъра, като то е статистически сигнификантно при доза от 200 мг/кг, $p=0,023$ и 400 мг/кг $p<0,001$.

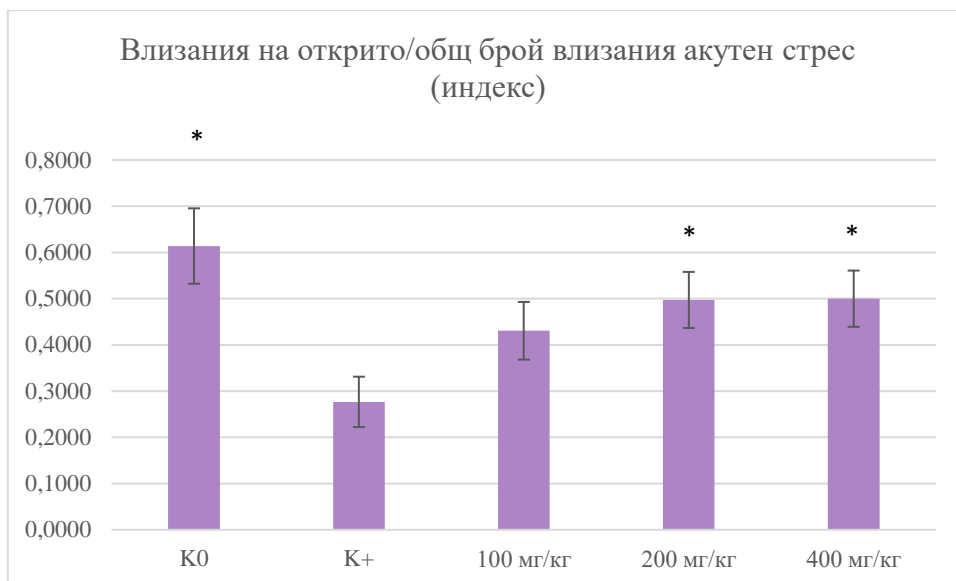


Фигура 2. Резултати от тест за социално взаимодействие при модел на остър стрес.

Резултати от издигнат лабиринт при модел на остър стрес

При сравняването на двете контроли, за група K0 се наблюдава значимо по-висока стойност на параметъра време прекарано в откритите рамене на лабиринта. Това показва, че избраният тест издигнат кръстосан лабиринт е подходящ за оценка на поведенческите промени при модел на остър стрес. При всички групи, третирани с екстракта се наблюдава подобряване на параметъра, но то не е статистически достоверно, поради това данните не са представени.

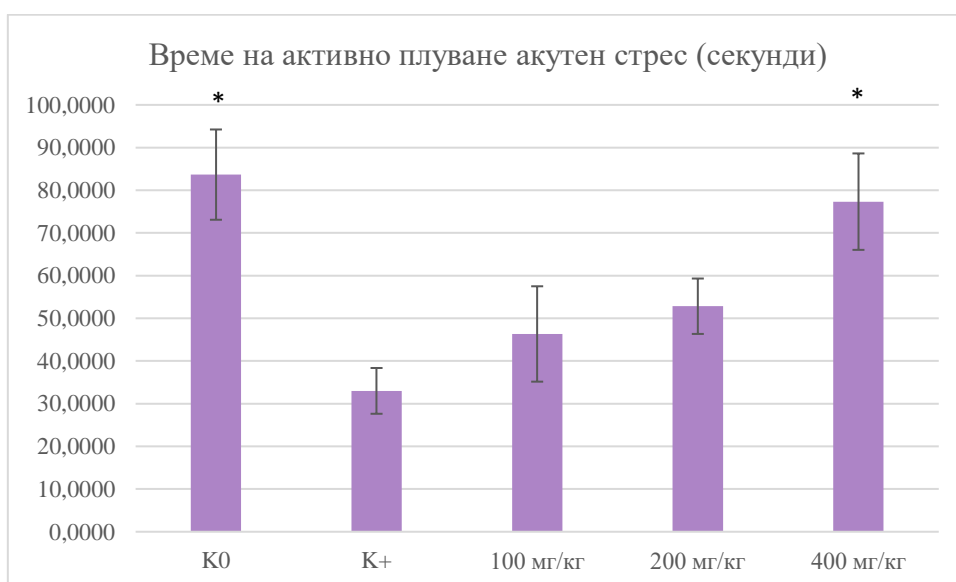
Във Фигура 3 са представени резултатите от теста издигнат кръстосан лабиринт при модел на остър стрес за параметъра брой влизания на открито/общ брой влизания в рамене на лабиринта. При всички групи, третирани с екстракта се наблюдава подобряване на параметъра, като то е статистически сигнификантно при доза от 200 мг/кг, $p=0,024$ и 400 мг/кг $p=0,022$.



Фигура 3. Резултати от тест издигнат кръстосан лабиринт при модел на остър стрес

Резултати от FST при модел на акутен стрес

При сравняването на двете контроли, се установява значимо по-висока стойност на параметъра активно време на плуване при група K0 (Фигура 4). Това показва, че избраният тест за принудително плуване е подходящ за оценка на поведенческите промени при модел на остър стрес. При всички групи, третирани с екстракта се наблюдава дозозависимо подобряване на параметъра, като то е статистически сигнификантно при доза и 400 мг/кг $p=0,002$.

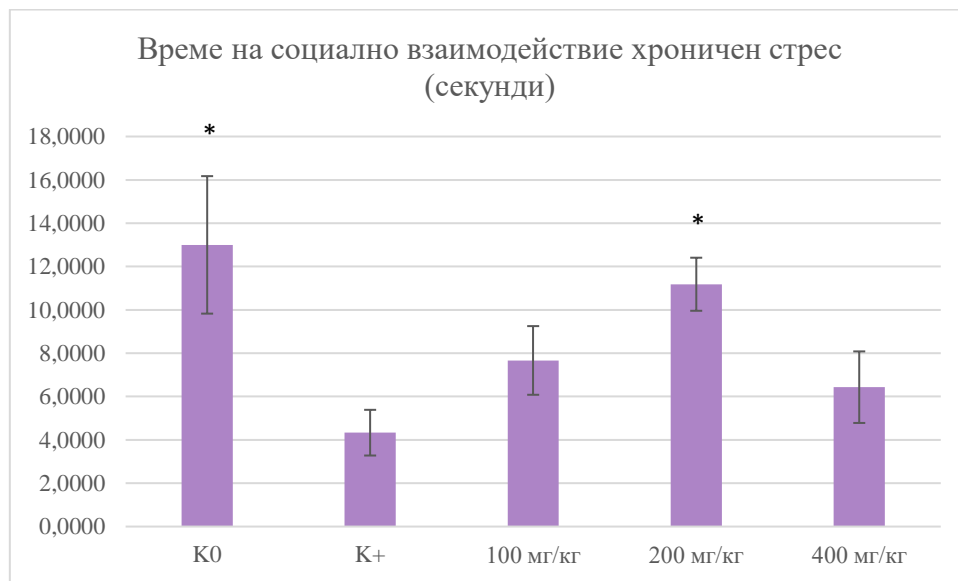


Фигура 4. Резултати от тест принудително плуване при модел на акутен стрес

Резултати от Тестове за хроничен стрес.

Резултати от тест за социално взаимодействие при модел на хроничен стрес

При сравняването на контролните групи се наблюдава, значимо повишаване на параметъра време на социално взаимодействие при група К0 спрямо К+ (Фигура 5). Това показва, че избраният тест за социално взаимодействие е подходящ за оценка на поведенческите промени при модел на хроничен стрес. Освен при К0, при всички групи, третирани с екстракта се наблюдава подобряване на параметъра, като то е статистически сигнификантно при доза от 200 мг/кг, $p=0,017$.

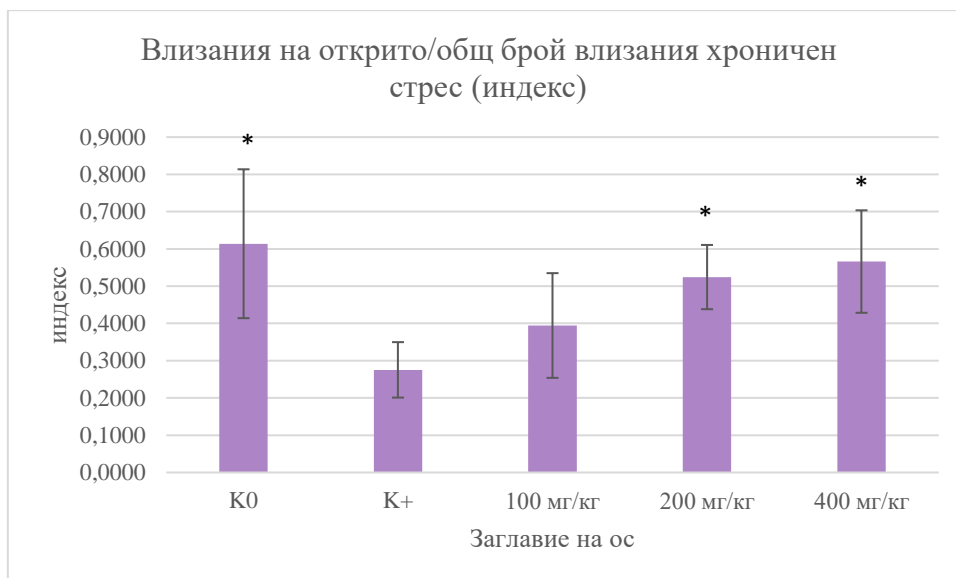


Фигура 5. Резултати от тест социално взаимодействие при модел на хроничен стрес.

Резултати от ЕРМ при модел на хроничен стрес

При сравняването на двете контроли, за група К0 се наблюдава значимо повишаване на параметъра време прекарано в откритите рамене на лабиринта, което доказва, че избраният тест издигнат кръстосан лабиринт е подходящ за оценка на поведенческите промени при модел на хроничен стрес. При всички групи, третирани с екстракта се наблюдава подобряване на параметъра, но то не е статистически достоверно и затова тези данни не са обобщени във фигура.

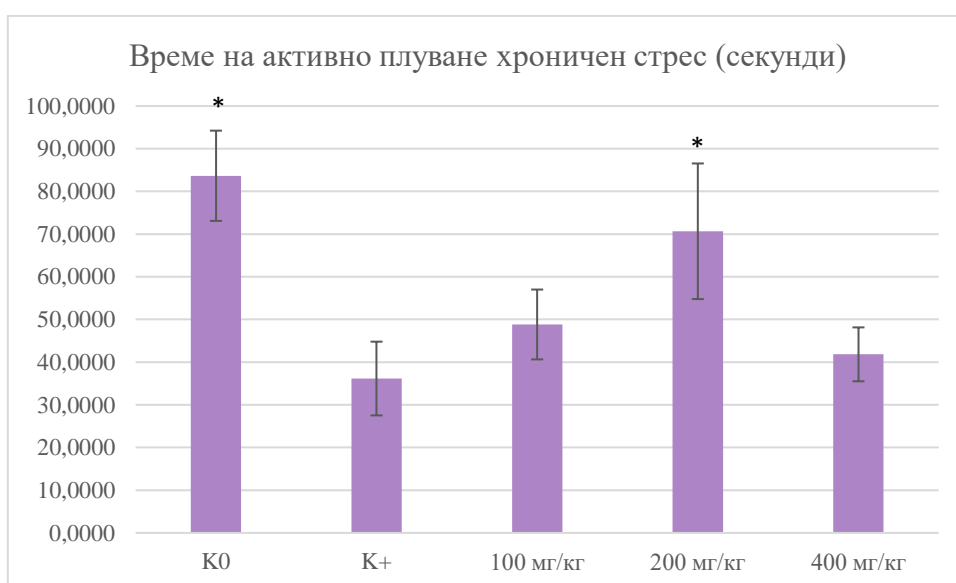
При параметъра брой влизания на открито/общ брой влизания в рамене на лабиринта (Фигура 6), при всички групи, третирани с екстракта се наблюдава подобряване на параметъра, като то е статистически сигнификантно при доза от 200 мг/кг, $p=0,004$ и 400 мг/кг $p=0,001$.



Фигура 6. Резултати от тест издигнат кръстосан лабиринт при модел на хроничен стрес

Резултати от тест за принудително плуване при модел на хроничен стрес

Данните от проведения експеримент (Фигура 7) показват, че при група K0 се отчита максимална стойност (83,6667) на параметъра време на активно плуване в сравнение с K+ (36,1667). Това показва, че избраният тест за принудително плуване е подходящ за оценка на поведенческите промени при модел на хроничен стрес. Освен при K0, при всички групи, третирани с екстракта се наблюдава подобряване на параметъра, като е важно да се отбележи, че то е статистически сигнификантно само при доза 200 мг/кг (70,6667) $p=0,028$.



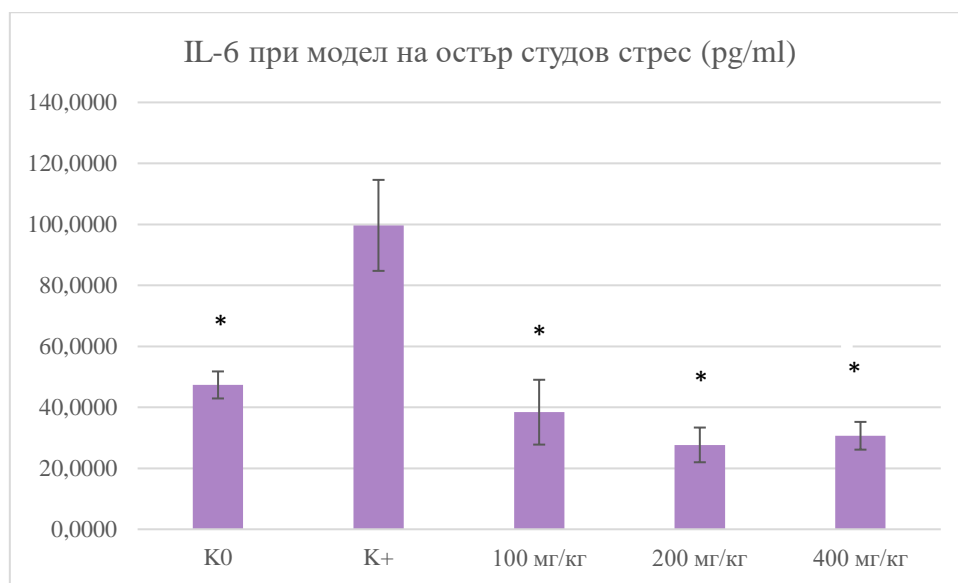
Фигура 7. Резултати от тест издигнат принудително плуване при модел на хроничен стрес

Проинфламаторни цитокини при модел на остър стрес

Нива на IL 6 при модел на остър стрес

Моделът на остър студов стрес успешно статистически достоверно доказва повишаване нивата на IL 6 спрямо K0 (Фигура 8). При третираните с екстракт групи се наблюдава статистически релевантно намаление на концентрацията на IL 6 при всички дози на екстракта при $p < 0,001$.

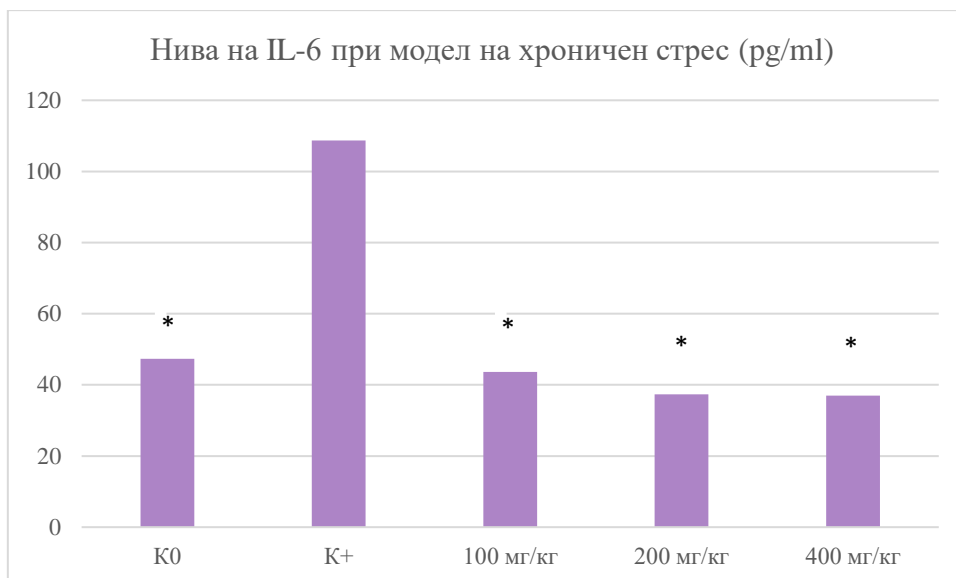
Важно е да се отбележи, че отчетените стойности на IL 6 за всички третираните с екстракта групи са по-ниски в сравнение с K0 и това може да бъде интерпретирано като доказателство за неговата ефективност.



Фигура 8. Нива на IL-6 при модел на остър стрес.

Нива на IL 6 при модел на хроничен стрес

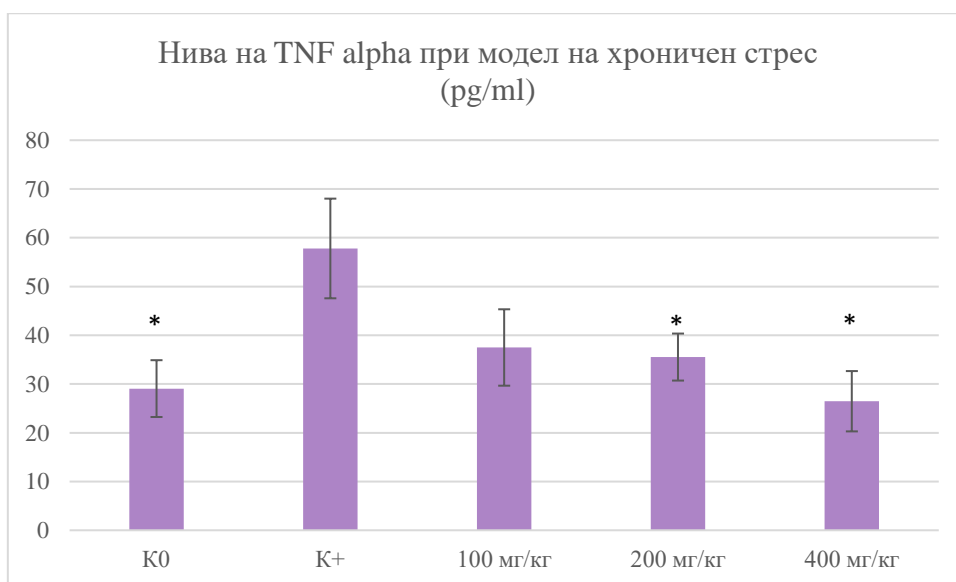
Моделът на хроничен стрес успешно статистически достоверно води до повишаване нивата на IL 6 спрямо K0 (Фигура 9). При третираните с екстракт групи се наблюдава статистически релевантно намаление на концентрацията на IL 6 при всички дози, съответно при $p=0,023$, $p=0,014$, $p=0,015$. В допълнение, установените стойности на IL 6 за всички третираните с екстракта групи са по-ниски, но не статистически значимо, в сравнение с K0.



Фигура 9. Нива на IL-6 при модел на хроничен стрес.

Проинфламаторни цитокини при модел на хроничен стрес Нива на TNF alpha при модел на хроничен стрес

Моделът на хроничен стрес успешно статистически достоверно води до повишаване нивата на TNF alpha спрямо K0 (Фигура 10). При третираните с екстракт групи се наблюдава статистически релевантно намаление на концентрацията на TNF при доза от 200 мг/кг $p=0,039^*L$ и 400 мг/кг $p=0,007^*L$.



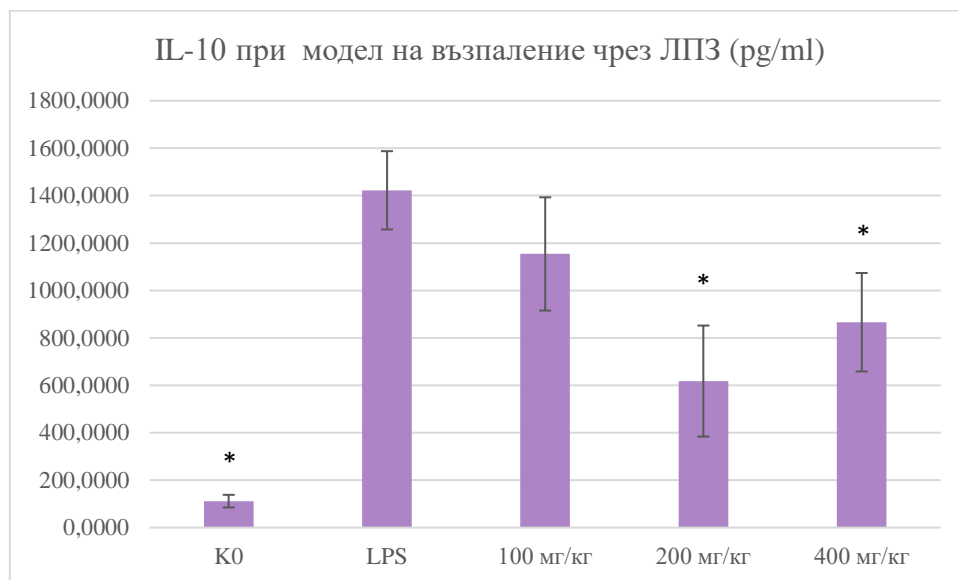
Фигура 10. Нива на TNF alpha при модел на хроничен стрес.

Резултати при модел на хронично възпаление чрез липополизахарид

Резултати за Интерлевкин 1 бета при възпаление през ЛПЗ

Липополизахаридът успешно статистически достоверно увеличи нивата на интерлевкин едно бета спрямо К0. При групите, третирани с екстракт се наблюдава намаление на нивата спрямо позитивната контрола, но то не е статистически сигнификантно (данните не са представени).

Резултати за Интерлевкин 10 при възпаление чрез ЛПЗ

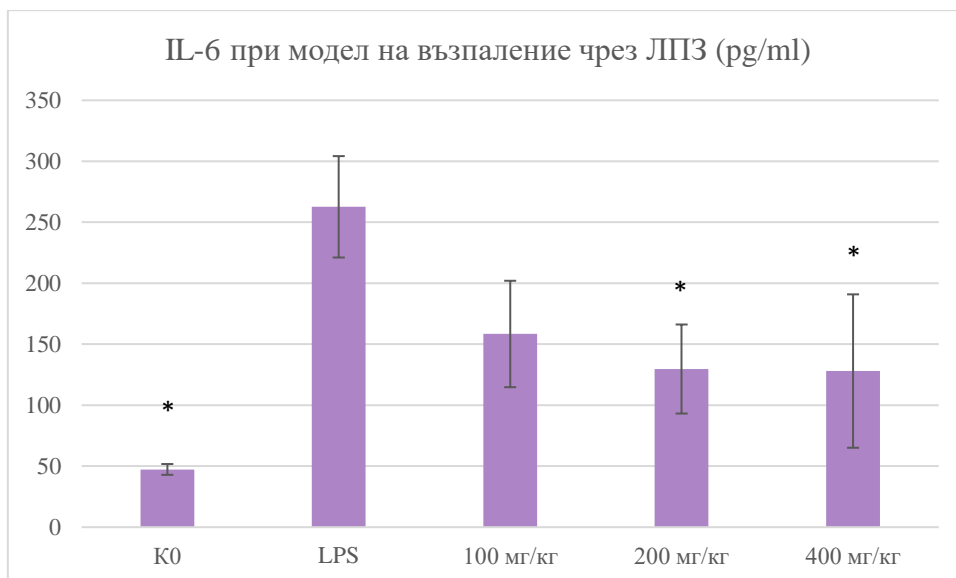


Фигура 11. Нива на IL-10 при модел на ЛПЗ възпаление.

Системното инжектиране на липополизахарид успешно статистически достоверно увеличи нивата на интерлевкин 10 в серума. От резултатите, представени във Фигура 11 е видно, че при всички групи, третирани с екстракт се наблюдава намаление на концентрацията на интерлевкин 10, като то е статистически достоверно при доза от 200 мг/кг $p=0,007$ и 400 мк/кг $p=0,0045$

Резултати за Интерлевкин 6 при модел на възпаление чрез ЛПЗ

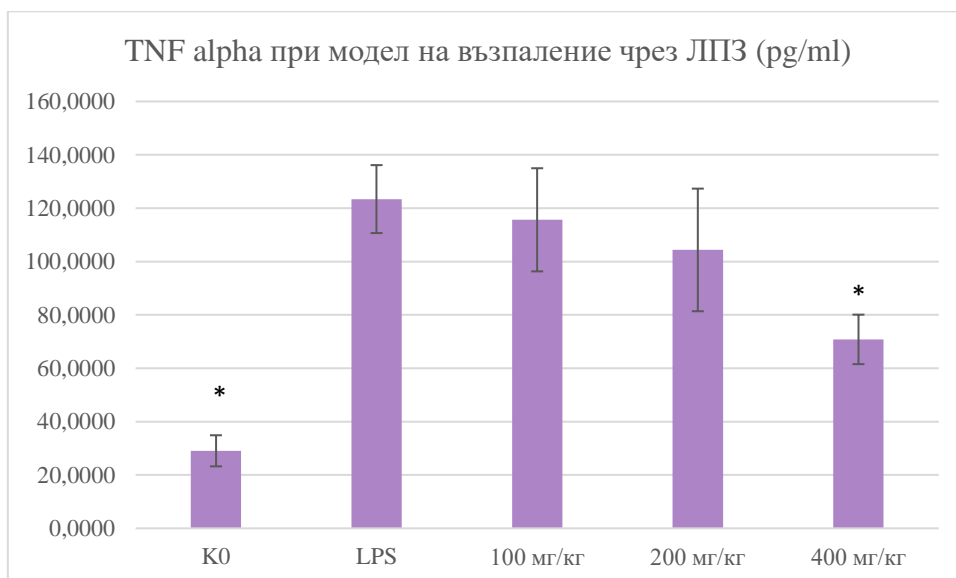
Увеличените нива на интерлевкин интерлевкин-6 в серума след системното инжектиране на липополизахарид са доказани статистически достоверно (Фигура 12). При всички групи, третирани с екстракт се наблюдава намаление на концентрацията на IL 6 спрямо контролата с липополизахарид, като то е с ниво на достоверност $p<0,05$ при доза от 200 мг/кг $p=0,024$ и 400 мк/кг $p=0,029$.



Фигура 12. Нива на IL-6 при модел на възпаление чрез ЛПЗ

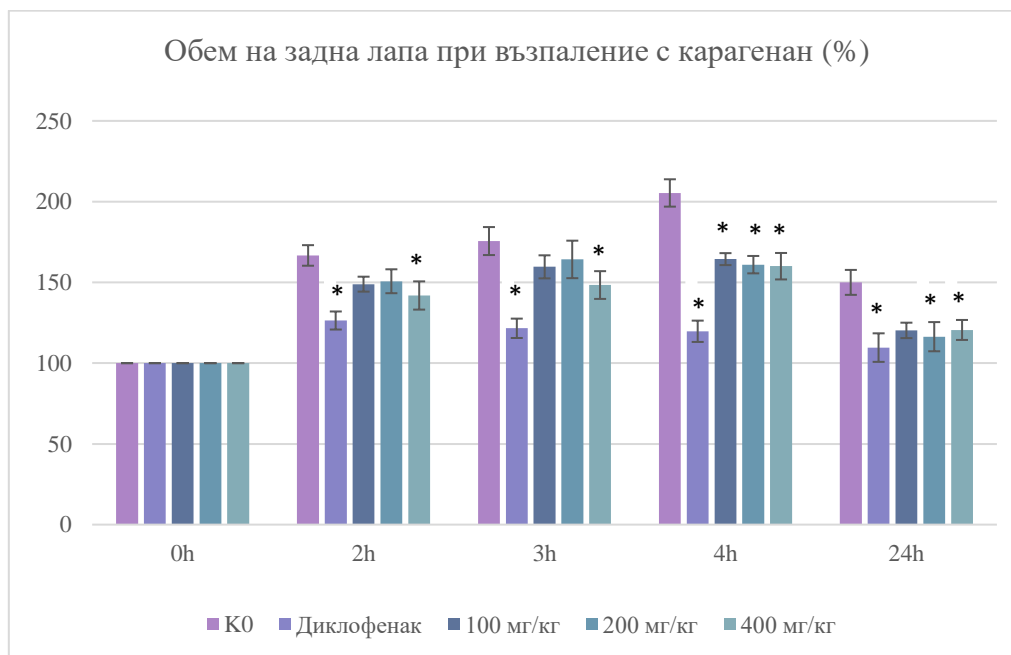
Резултати за Туморнекроза фактор алфа при модел на възпаление чрез ЛПЗ

Системното инжектиране на липополизахарид демонстрира увеличени нива на тумор некроза фактор алфа в серума спрямо негативната контрола като разликата е статистически значима (Фигура 13). При всички групи, третирани с екстракт, се наблюдава намаление на концентрацията на тумор некроза фактор алфа спрямо K⁺, като то е статистически значимо при доза 400 мг/кг $p=0,0017$.



Фигура 13. Нива на TNF alpha при ЛПЗ.

Резултати от експеримент с оток на задна лапа, причинен с карагенан
 Инжектирането на карагенан показва статистически достоверно увеличение на обема на задната лапа при група К0 във всеки момент на измерване, в сравнение с контролата, третирана с диклофенак (Фигура 14). Документирано е статистически сигнификантно намаляване на обема на лапата при доза от 400 мг/кг във всеки час на отчитане, както и във всички дози на 4-ти и 24-ти час.

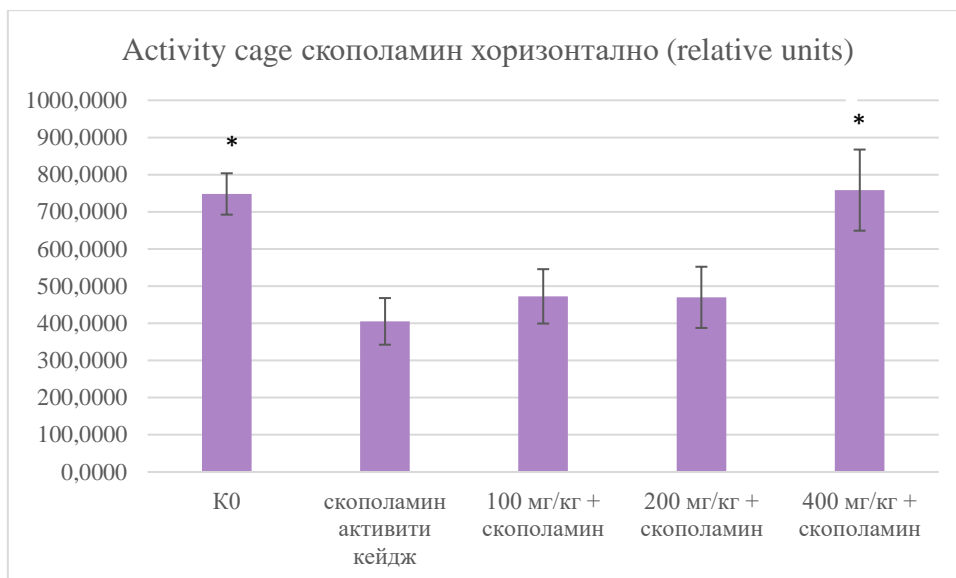


Фигура 14. Резултати при модел на възпаление чрез карагенан

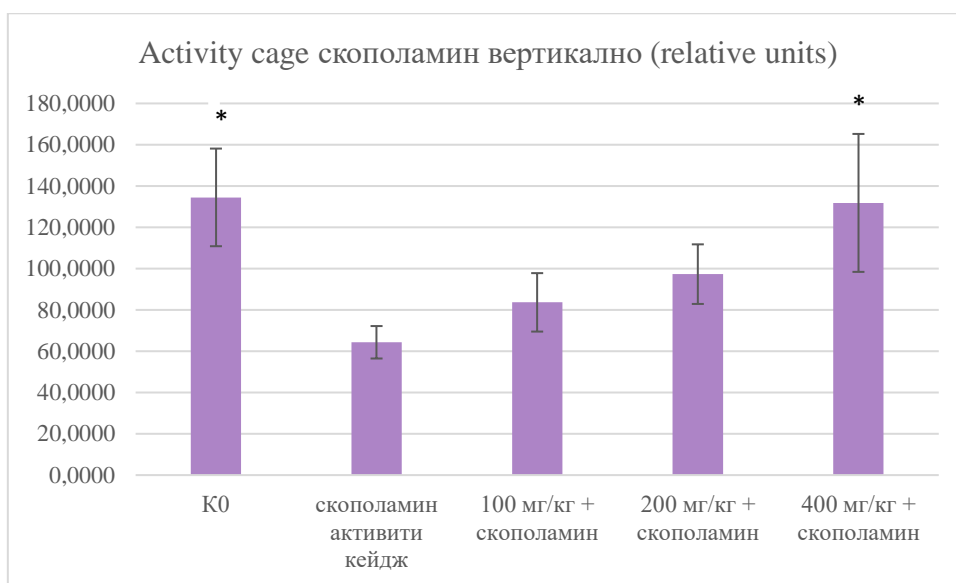
Резултати от експерименти за обучение и памет при три модела на увредена памет

Резултати от експеримент Activity cage

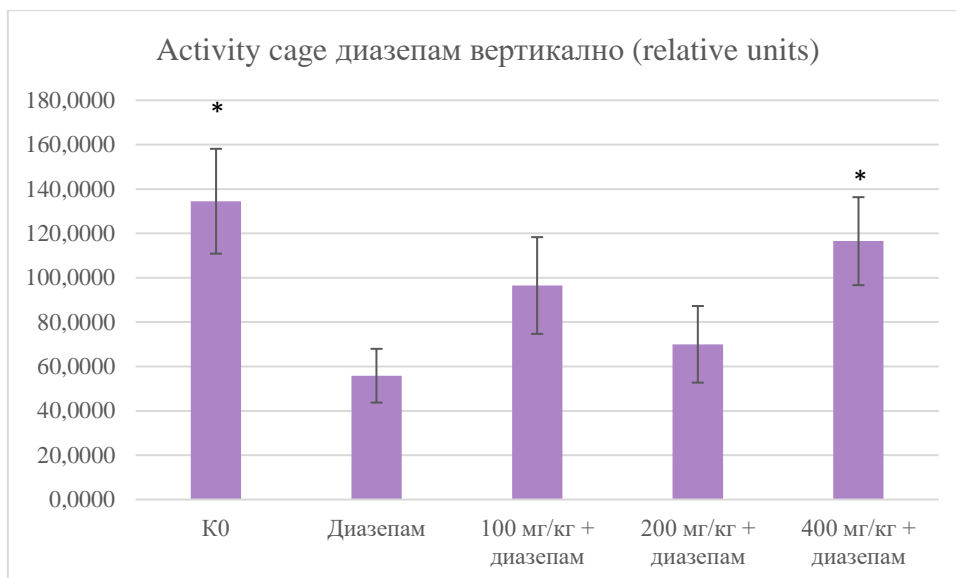
При модела на увредена памет чрез скополамин се наблюдава статистически значимо намаление на хоризонталните и вертикалните движения на животните от контролната група, третирани със скополамин спрямо К0. При групите, третирани с екстракт е отбелязано увеличение на параметрите спрямо позитивната контрола във всички дози, като то е статистически достоверно при доза от 400 мг/кг $p=0,004$ при параметъра за хоризонтални и вертикални движения (Фигури 15, 16). Освен това хоризонталните движения при всички групи са повече от вертикалните, което е изискване за нормална локомоторна активност и предпоставка за провеждането на следващи експерименти.



Фигура 15. Резултати от експеримент Activity cage при модел на увредена памет чрез скополамин хоризонтално.

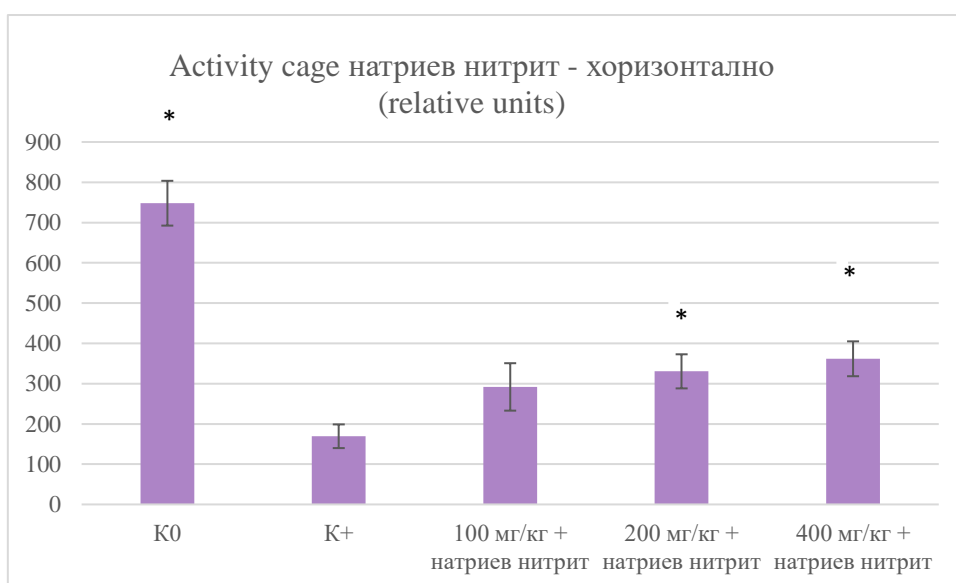


Фигура 16. Резултати от експеримент Activity cage при модел на увредена памет чрез скополамин вертикално.



Фигура 17. Резултати от експеримент Activity cage при модел на увредена памет чрез диазепам вертикално.

При моделът на увредена памет чрез диазепам се наблюдава статистически значимо намаление на хоризонталните и вертикалните движения на животните от контролната група, третирани с диазепам спрямо К0. При групите, третирани с екстракт се отбелязва увеличение на параметрите спрямо позитивната контрола във всички дози, като то е статистически достоверно при доза от 400 мг/кг $p=0,036$ при параметъра за вертикални движения (Фигура 17). Освен това хоризонталните движения при всички групи са повече от вертикалните, което е изискване за нормална локомоторна активност и предпоставка за провеждането на следващи експерименти.



Фигура 18. Резултати от експеримент Activity cage при модел на увредена памет чрез натриев нитрит хоризонтално.

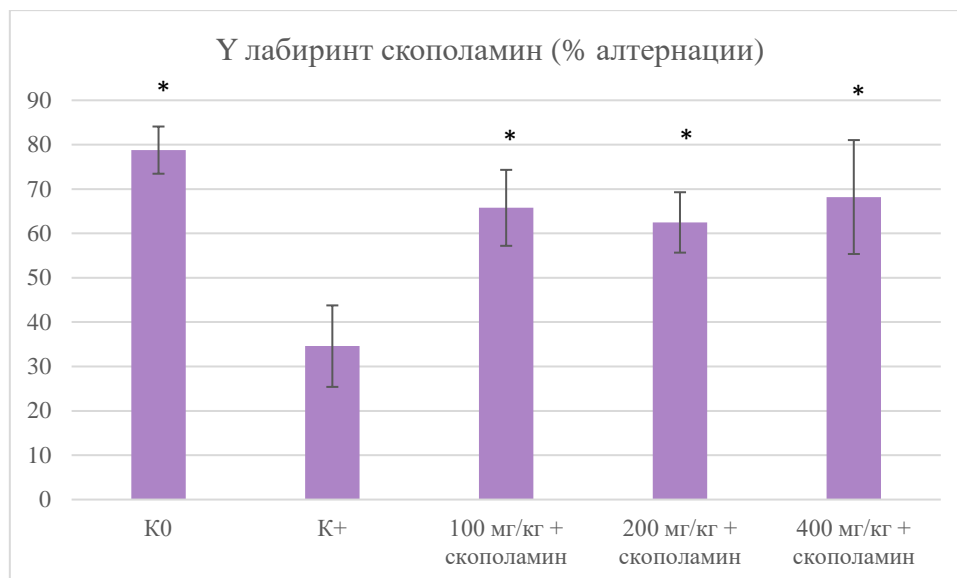
При модела на увредена памет чрез натриев нитрит се наблюдава статистически значимо намаление на хоризонталните и вертикалните движения на животните от контролната група с натриев нитрит спрямо К0. При групите, третирани с екстракт е отбелязано увеличение на параметрите спрямо позитивната контрола във всички дози, като то е статистически достоверно при доза от 200 мг/кг $p=0,023$ и 400 мг/кг $p=0,008$ при параметъра за хоризонтални движения (Фигура 18). Освен това хоризонталните движения при всички групи са повече от вертикалните, което е изискване за нормално локомоторна активност и предпоставка за провеждането на следващи експерименти.

Резултати от експеримент Y лабиринт

В експеримента Y-Лабиринт при модел на увредена памет чрез скополамин (Фигура 19) се наблюдава статистически значимо подобряване на работния индекс при К0 спрямо позитивната контрола. Това показва, че избраният тест е подходящ за оценяване на работна и пространствена памет. Освен при К0, статистически релевантно подобряване на изследвания параметър се наблюдава при групите, третирани с екстракт при доза от 100 мг/кг $p=0,018$, 200 мг/кг $p=0,034$, и 400 мг/кг $p=0,012$.

В експеримента Y-Лабиринт при модел на увредена памет чрез диазепам (данните не са представени) се установява статистически значимо подобряване на работния индекс при К0 спрямо позитивната контрола. Това показва, че избраният тест е подходящ за оценяване на работна и пространствена памет. Освен при К0, подобряване на изследвания параметър се наблюдава при групите, третирани с екстракт, но резултатите не са статистически сигнификантни.

В експеримента Y-Лабиринт при модел на увредена памет чрез натриев нитрит (данните не са представени) е отчетено статистически значимо подобряване на работния индекс при К0 спрямо позитивната контрола. Това показва, че избраният тест е подходящ за оценяване на работна и пространствена памет. Освен при К0, подобряване на изследвания параметър се наблюдава при групите, третирани с екстракт, но резултатите не са статистически сигнификантни.



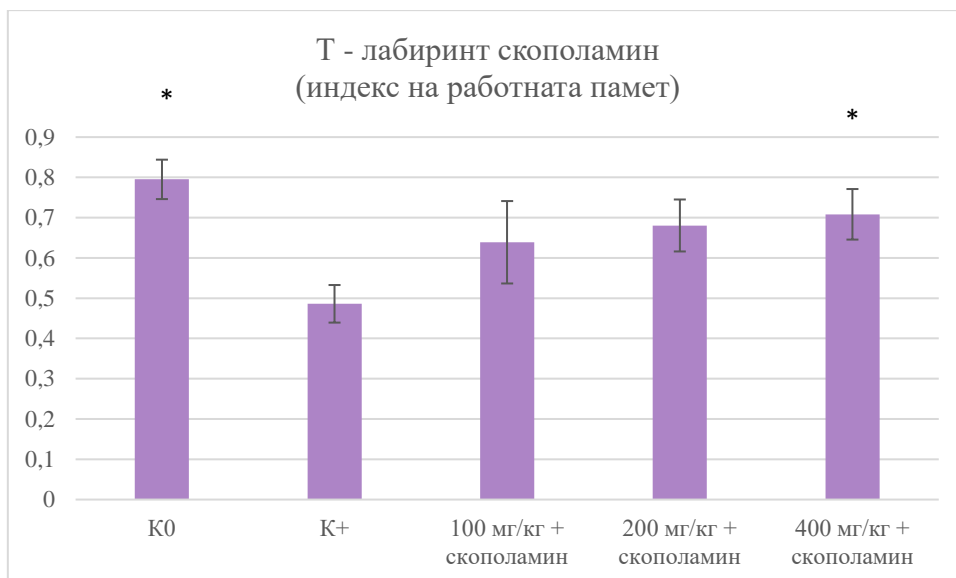
Фигура 19. Резултати от експеримент Y лабиринт при модел на увредена памет чрез скополамин.

Резултати от експеримент T- лабиринт

В експеримента T-Лабиринт при модел на увредена памет чрез скополамин се наблюдава статистически значимо подобряване на работния индекс при K0 спрямо позитивната контрола (Фигура 20). Това показва, че избраният тест е подходящ за оценяване на работна памет. Освен при K0, подобряване на изследвания параметър се наблюдава при групите, третирани с екстракт при доза от 400 мг/кг $p=0,027$.

Експериментът T-Лабиринт при модел на увредена памет чрез диазепам (данните не са представени) демонстрира статистически значимо подобряване на работния индекс при K0 спрямо позитивната контрола. Това показва, че избраният тест е подходящ за оценяване на работна и пространствена памет. Освен при K0, подобряване на изследвания параметър се наблюдава при групите, третирани с екстракт, но резултатите не са статистически сигнификантни.

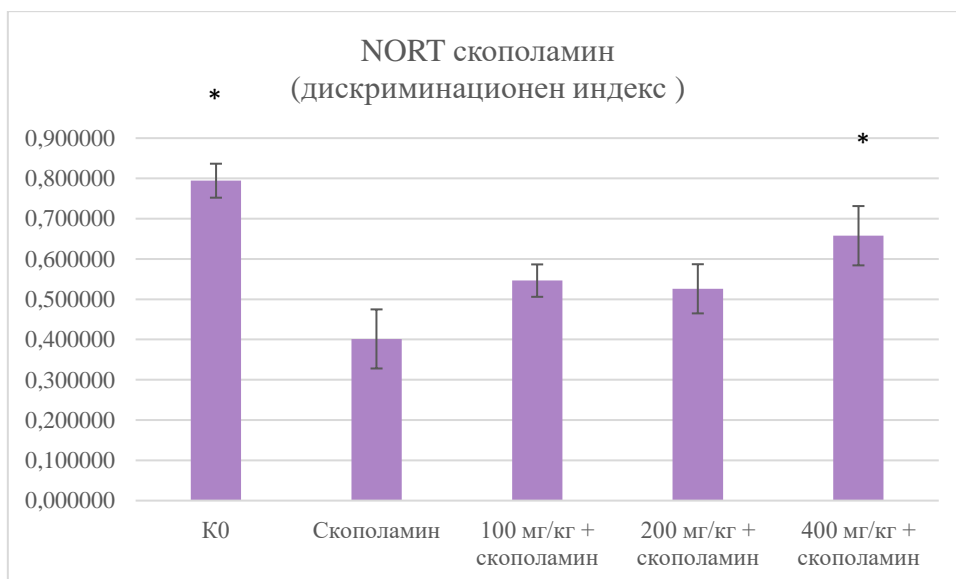
В експеримента T-Лабиринт при модел на увредена памет чрез натриев нитрит (данните не са представени) също се наблюдава статистически значимо подобряване на работния индекс при K0 спрямо позитивната контрола. Това показва, че избраният тест е подходящ за оценяване на работна и пространствена памет. Освен при K0, подобряване на изследвания параметър се наблюдава при групите, третирани с екстракт, но резултатите не са статистически сигнификантни.



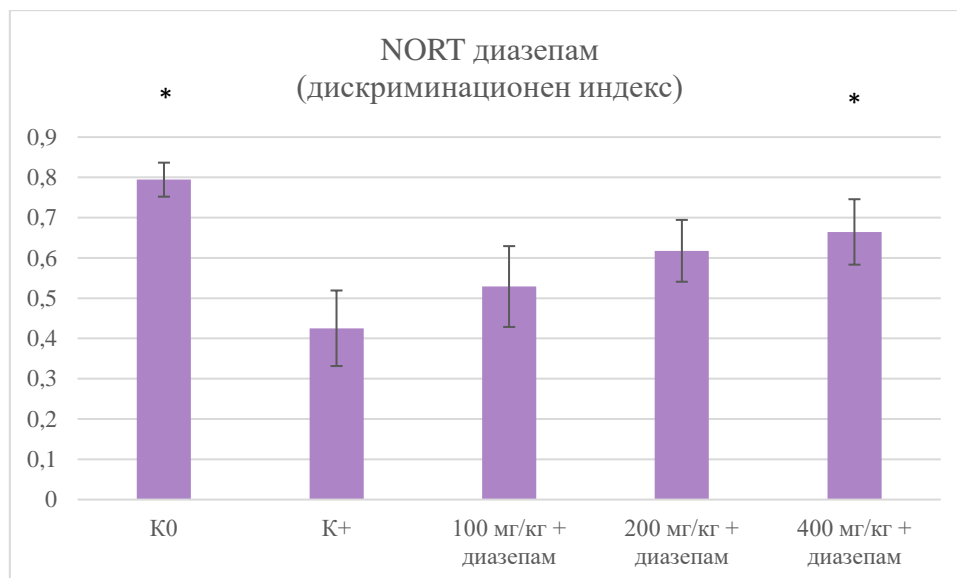
Фигура 20. Резултати от експеримент Т лабиринт при модел на увредена памет чрез скополамин.

Резултати от експеримент NORT

Експериментът за разпознаване на нов обект - NORT при модел на увредена памет чрез скополамин (Фигура 21) демонстрира статистически достоверно повишение на измервания индекс за работна памет между K0 и позитивната контрола. Освен това, е отбелязано подобряване на параметъра при всички групи, третирани с екстракт спрямо K+, като то е статистически сигнификантно при доза 400 мг/кг $p=0,005$.



Фигура 21. Резултати от експеримент NORT при модел на увредена памет чрез скополамин.



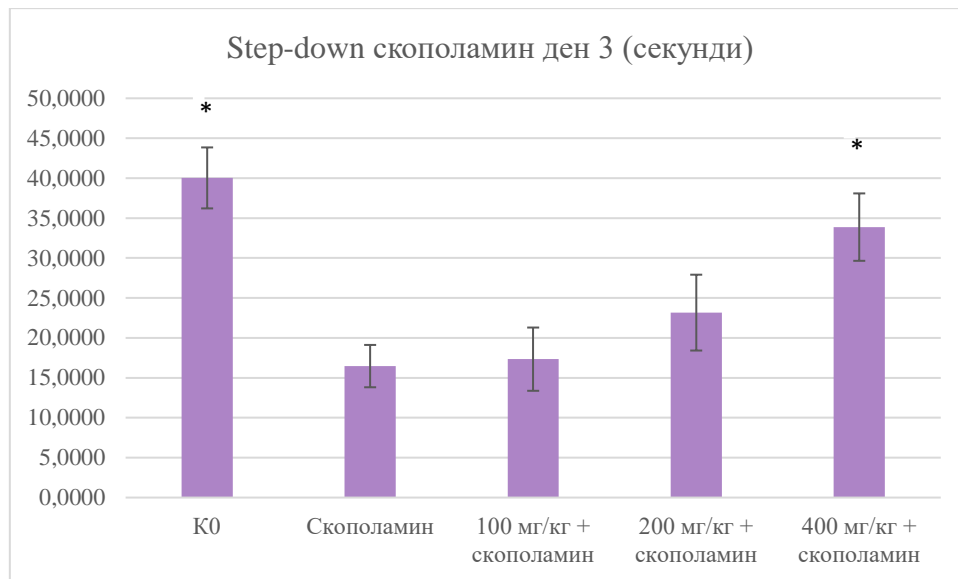
Фигура 22. Резултати от експеримент NORT при модел на увредена памет чрез диазепам.

Експериментът за разпознаване на нов обект NORT при модел на увредена памет чрез диазепам (Фигура 22) демонстрира статистически достоверно повишение на измервания индекс за работна памет между K0 и позитивната контрола. Освен това, е отбелязано подобряване на параметъра при всички групи, третирани с екстракт, спрямо K+, като то е статистически сигнификантно при доза 400 мг/кг $p=0,045$.

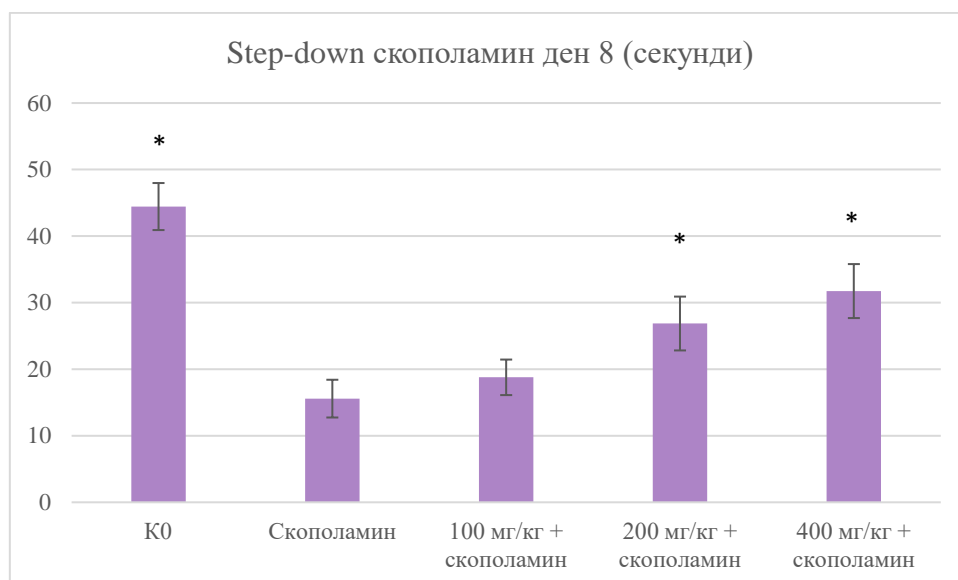
Експериментът NORT не демонстрира статистическа достоверност на резултатите при модела на увредена памет чрез натриев нитрит (данните не са представени).

Резултати от експеримент Степ даун

Резултатите от експеримента за пасивно избягване на наказателен стимул – степдаун при модел на увредена памет чрез скополамин демонстрират статистически значима разлика в латентното време като параметър между K0 и позитивната контрола на 3-ти (Фигура 23) и 8-ми ден (Фигура 24). Получените данни показват, че експериментът е подходящ за изследване на краткотрайна и дълготрайна памет. Освен при K0, е документирано подобряване на параметъра при всички дози, като то е статистически релевантно на ден 3 при доза от 400 мг/кг $p = 0,003$, както и на ден 8 при доза от 200 мг/кг $p=0,025$ и 400 мг/кг $p = 0,002$.

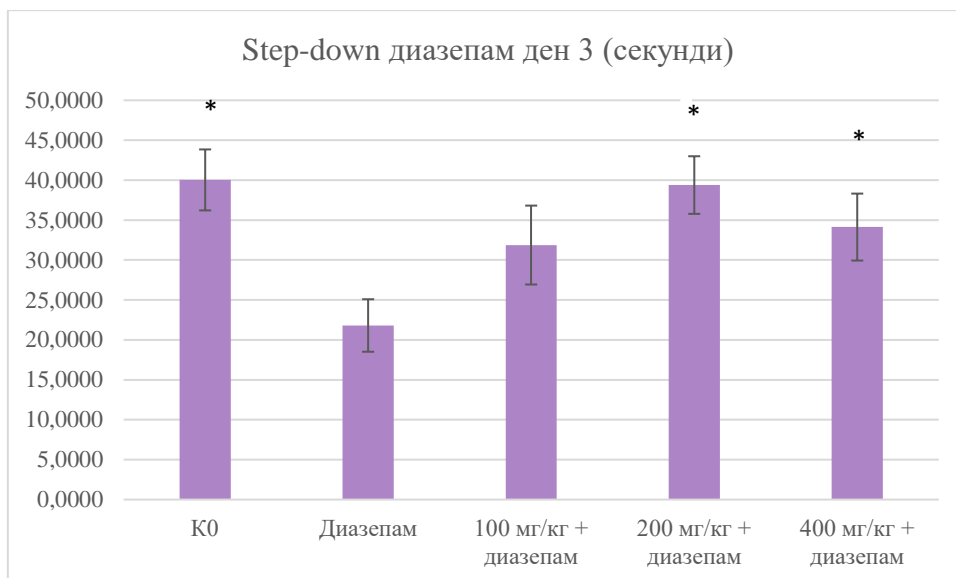


Фигура 23. Резултати от експеримент Степдаун при модел на увредена памет чрез скополамин – краткотрайна памет.



Фигура 24. Резултати от експеримент Степдаун при модел на увредена памет чрез скополамин – дълготрайна памет.

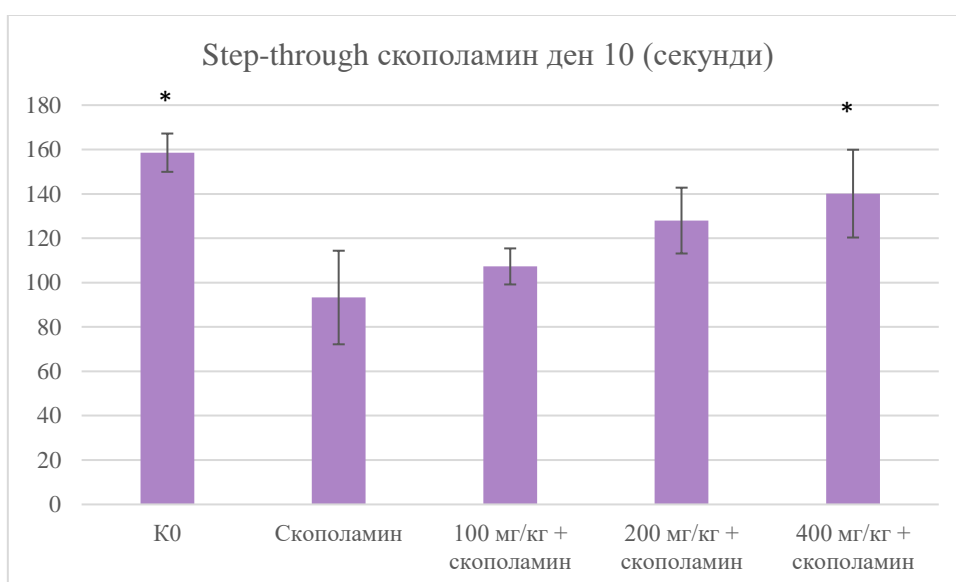
Резултатите от експеримента за пасивно избягване на наказателен стимул – степдаун при модел на увредена памет чрез диазепам демонстрират статистически значима разлика в латентното време като параметър между K0 и позитивната контрола на 3-ти (Фигура 25) и 8-ми ден (данните не са представени). Това показва, че експериментът е подходящ за изследване на краткотрайна и дълготрайна памет. Освен при K0, е документирано подобряване на параметъра при всички дози, като то е статистически релевантно на ден 3 при дози от 200 мг/кг $p=0,003$ и 400 мг/кг $p = 0,033$.



Фигура 25. Резултати от експеримент степдаун при модел на увредена памет чрез диазепам - краткотрайна памет

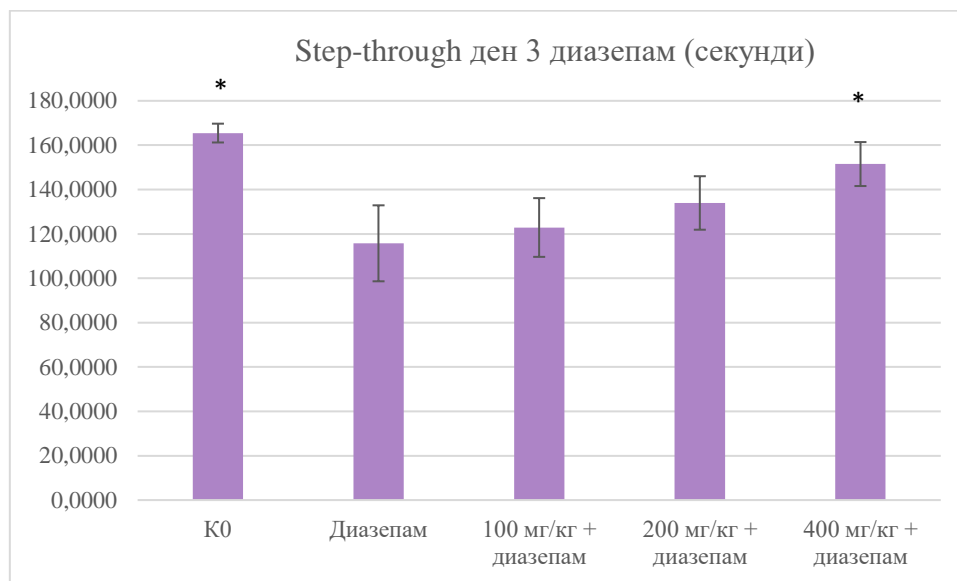
Резултатите от експеримент степ даун при модел на увредена памет чрез натриев нитрит не показаха статистически достоверно изменение между K0 и позитивната контрола (данните не са представени), като това вероятно се дължи на постигането на тежка хипоксия и инертност на опитните животни, третирани системно с натриев нитрит, което доближава резултатите на контролната група до тези на обучените животни и ги маскира.

Резултати от експеримент Степ тру



Фигура 26. Резултати от експеримент стептру при модел на увредена памет чрез скополамин - дълготрайна памет

Резултатите от експеримента за пасивно избягване на наказателен стимул – стептру при модел на увредена памет чрез скополамин демонстрират статистически значима разлика в латентното време като параметър между К0 и позитивната контрола на 3-ти (данните не са представени) и 10-ти ден (Фигура 26). Това показва, че експериментът е подходящ за изследване на краткотрайна и дълготрайна памет. Освен при К0, е документирано подобряване на параметъра при всички дози, като то е статистически релевантно на ден 10 при доза от 400 мг/кг $p = 0,039$.

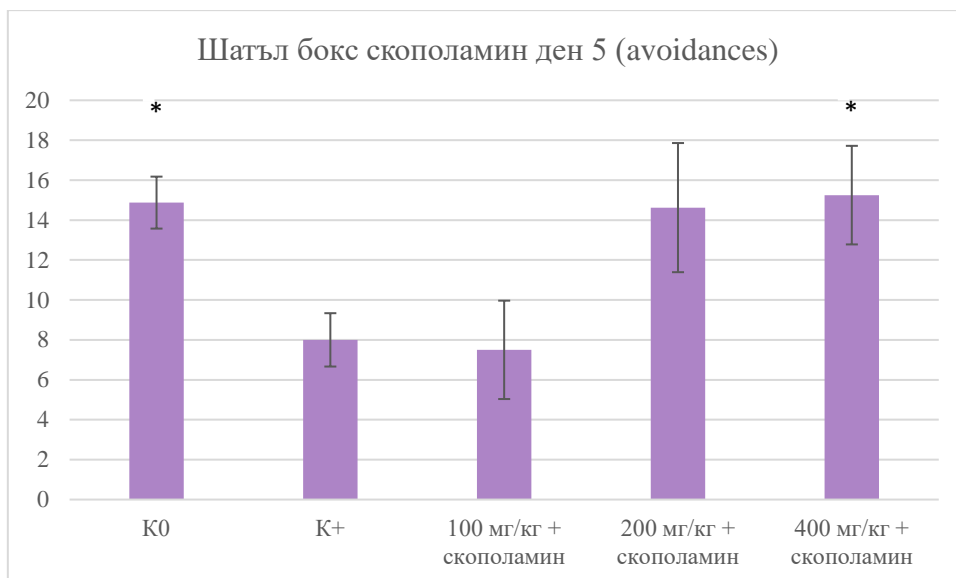


Фигура 27. Резултати от експеримент стептру при модел на увредена памет чрез диазепам - дълготрайна памет

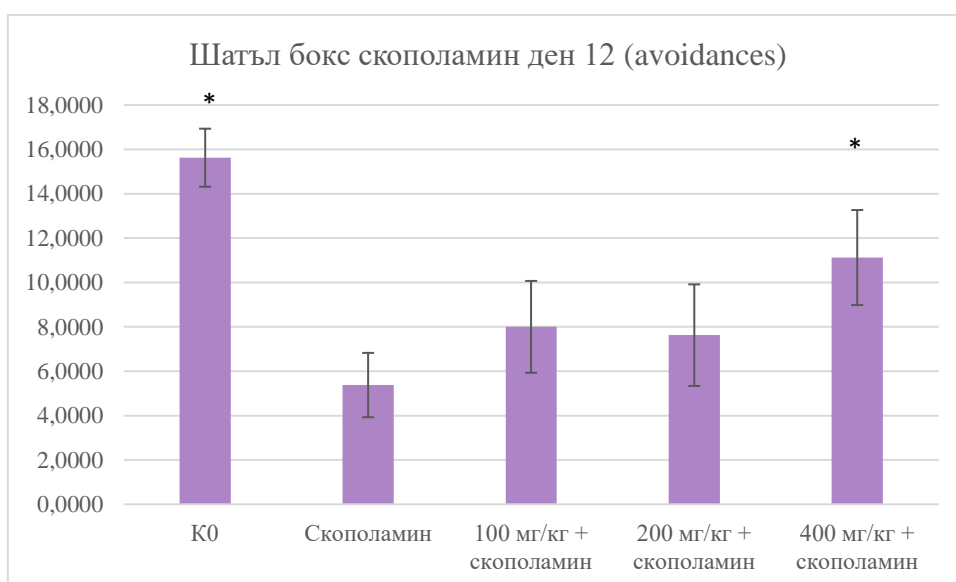
Резултатите от експеримента за пасивно избягване на наказателен стимул – стептру при модел на увредена памет чрез диазепам демонстрират статистически значима разлика в латентното време като параметър между К0 и позитивната контрола на 3-ти (Фигура 27) и 10-ти ден (данните не са представени). Това показва, че експериментът е подходящ за изследване на краткотрайна и дълготрайна памет. Освен при К0, е документирано подобряване на параметъра при всички дози, като то е статистически релевантно на ден 3 при доза от и 400 мг/кг $p = 0,044$.

Резултати от експеримент Шатъл бокс

Резултатите от експеримента за активно избягване на наказателен стимул – шатъл бокс при модел на увредена памет чрез скополамин демонстрират статистически значима разлика в броя на условните отговори (авойданси) между К0 и позитивната контрола на 5-ти (Фигура 28) и 12-ти ден (Фигура 29).



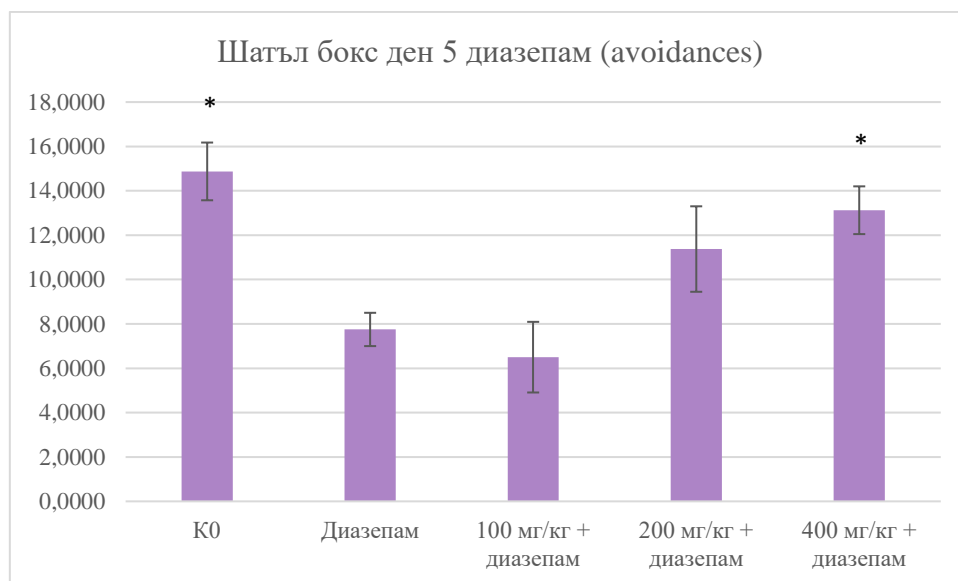
Фигура 28. Резултати от експеримент шатъл бокс при модел на увредена памет чрез скополамин – краткотрайна памет



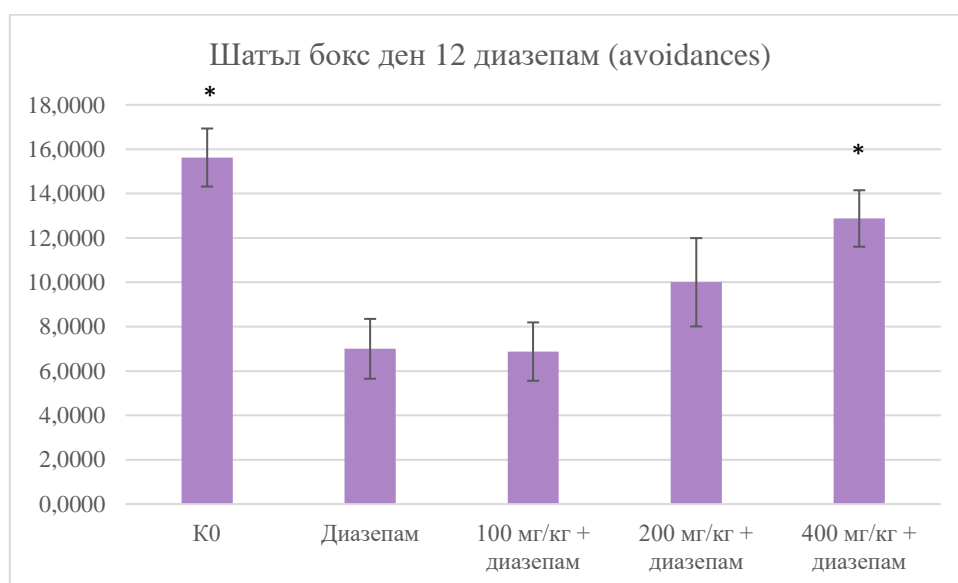
Фигура 29. Резултати от експеримент шатъл бокс при модел на увредена памет чрез скополамин – дълготрайна памет

Резултатите от експеримента за активно избягване на наказателен стимул – шатъл бокс при модел на увредена памет чрез диазепам демонстрират статистически значима разлика в броя на условните отговори (авойданси) между K0 и позитивната контрола на 5-ти (Фигура 30) и 12-ти ден (Фигура 31). Получените данни показват, че експериментът е подходящ за изследване на краткотрайна и дълготрайна памет. Освен при K0, е документирано статистически сигнификантно подобряване на параметъра в доза от 400 мг/кг на ден 5 $p=0,010$, както и на ден 12 в доза от 400 мг/кг $p=0,008$.

Резултатите от експеримента Шатъл бокс при модел на увредена памет чрез натриев нитрит не предоставиха статистически значимо изменение спрямо позитивната контрола (данните не са представени).



Фигура 30. Резултати от експеримент шатъл бокс при модел на увредена памет чрез диазепам – краткотрайна памет



Фигура 31. Резултати от експеримент шатъл бокс при модел на увредена памет чрез диазепам – дълготрайна памет

Обобщение на резултатите

В Таблицы 4, 5 и 6 са представени обобщените статистически достоверни резултати по групи експерименти относно ефекта на проучвания екстракт от *Sideritis scardica* в приложените дози.

Таблица 4. Обобщение на статистически достоверни резултати от експерименти с възпаление.

Статистически сигнификантни резултати в сравнение с контролна група К+					
Възпаление					
<i>Sideritis scardica</i> екстракт			Доза мг/кг		
			100	200	400
Карагенан	2 часа				X
	3 часа				X
	4 часа		X	X	X
	24 часа		X	X	X
LPS	IL1beta				
	IL10			X	X
	IL6			X	X
	TNFa				X

Таблица 5. Обобщение на статистически достоверни резултати от експерименти за остър и хроничен стрес.

Статистически сигнификантни резултати в сравнение с контролна група К+					
Стрес					
<i>Sideritis scardica</i> екстракт			Доза мг/кг		
			100	200	400
Остър	FST	T active			X
	SI	T social		X	X
	EPM	T open			
		Open Index		X	X
	IL1beta				
	IL10				
	IL6		X	X	X
	TNFa				
Хроничен	FST	T active		X	
	SI	T social		X	
	EPM	T open			
		Open Index		X	X
	IL1beta				
	IL10				
	IL6		X	X	X
	TNFa			X	X

Таблица 6. Обобщение на статистически достоверни резултати от експерименти за при модели на увредена памет.

Статистически сигнификантни резултати в сравнение с контролна група К+						
Обучение и памет						
<i>Sideritis scardica</i> екстракт				Доза мг/кг		
				100	200	400
Activity cage	X	Диазепам				
		Скополамин				X
		NaNO ₂			X	X
	Y	Диазепам				
		Скополамин				X
		NaNO ₂				
Tmaze	Диазепам					
	Скополамин				X	
	NaNO ₂					
NORT	Диазепам				X	
	Скополамин				X	
	NaNO ₂					
Ymaze	Диазепам					
	Скополамин		X	X	X	
	NaNO ₂					
Step down	Краткотрайна памет		Диазепам		X	X
			Скополамин			X
			NaNO ₂			
	Дълготрайна памет		Диазепам			
			Скополамин		X	X
			NaNO ₂			
Step Through	Краткотрайна памет		Диазепам			X
			Скополамин			
			NaNO ₂			
	Дълготрайна памет		Диазепам			
			Скополамин			X
			NaNO ₂			
Shuttle Box	Avoidance	Краткотрайна памет	Диазепам			X
			Скополамин		X	X
			NaNO ₂			
	Дълготрайна памет	Диазепам			X	
		Скополамин			X	
		NaNO ₂				

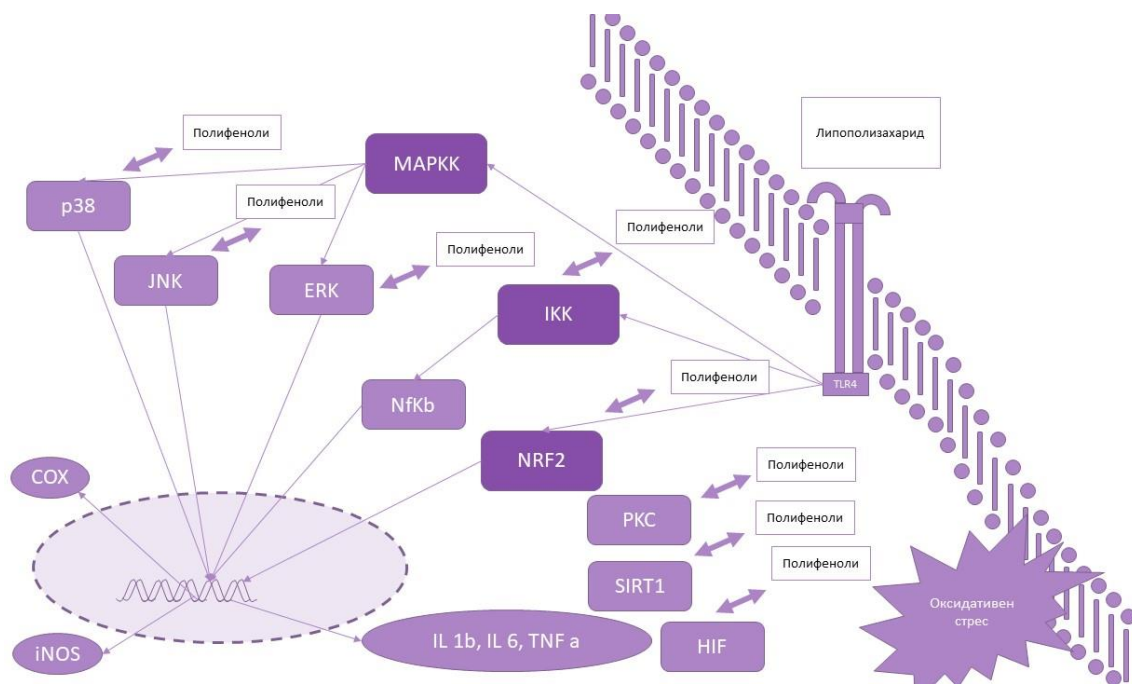
ОБСЪЖДАНЕ

In vitro проучвания от Tadic et al. включващи B16 клетки и HL-60 клетки показват, че силно липофилният диетилов етер екстракт от *S. scardica* може да прояви умерени цитотоксични ефекти (Tadić, 2012). Оценка на токсичността на четири екстракта от *Sideritis scardica*, получени чрез различни разтворители от Feistel et al. не разкрива токсичност, нито опасения за мутагенни ефекти (Feistel, 2018). В същото проучване авторите са извършили тест на Ames върху бактериални култури и не са наблюдавали мутагенен ефект, измерен чрез увеличаване на броя на ревертантните колонии в сравнение с контролния брой, за който и да е от тестваните екстракти до концентрации от 5000 µg/плака¹². Настоящото проучване на 12-седмичната субхронична токсичност не разкрива смъртност или груби патологични прояви. Като цяло значителната токсичност на растенията от семейство Lamiaceae се свързва повече с летливите компоненти като терпени, открити в маслата от различни растения, които не се натрупват значително в алкохолен воден екстракт (Rozman, 2007).

Невровъзпалението е част от имунния отговор на вредни стимули в ЦНС. Неговата функция е да премахва некротичните клетки и тъкани, предизвикани от патогени. Прекомерното невровъзпаление допринася за прогресирането на невродегенеративни заболявания като болестта на Алцхаймер (AD), болестта на Паркинсон (PD), множествена склероза (MS), болест на Хънтингтън (HD) и амиотрофична латерална склероза (ALS) (Jacobs, 2012). Карагеноанът действа по пътя на Bcl10, NF-κB, IκBα, за да активира медиаторите на възпалението. Този път първоначално включва етапи на фосфорилиране, последвани от ядрена транслокация на фосфо-NF-κB. Това задейства транскрипцията и трансляцията на възпалителни биомаркери като COX, NOS, IL-6 и др. Възпалението причинява много ефекти. Един от ефектите е вазодилатация на капилярите/кръвоносните съдове. Под повърхността, където е приложен карагеноан, възпалението причинява разширяване на капилярите под повърхността на кожата. По този начин се увеличава притока на кръв към зоната. Проявява се като подуване/зачервяване на засегнатата област. (Necas, 2013) CGN-активираните възпалителни каскади, свързани с вродения имунитет и генерирането на ROS, могат да бъдат интегрирани на нивото на ИКК, както и ИКК сигналозомата (Bhattacharyya, 2008). Това позволява интерпретация на евентуален механизъм на действие, който освен инволвирането на проинфламаторни цитокини, говори и за евентуално взаимодействие с COX, както и пряко излолиране на ROS чрез антиоксидатна активност.

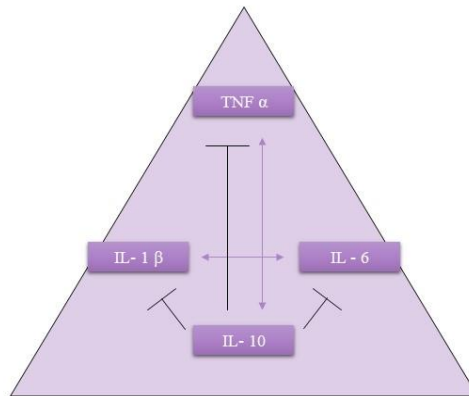
Допълнително експериментът със системно въвеждане на липополизахарид демонстрира сигнификантно намаление изследвани проинфламаторни цитокини (IL 6, IL 10, TNF alpha) и затвърждава представата за антиинфламаторен ефект на билката, познат от векове и описван при

множество представители на рода. Липополизахаридите (LPS) са ендотоксини, съставени от О-антиген, които се намират във външната мембрана на грам-отрицателни бактерии, и са докладвани като най-мощните стимули за микроглиално активиране (Henry, 2009). Toll-подобен рецептор 4 (TLR4), се експресира от микроглиални клетки (Okun, 2009) и е отговорен за възпалителната каскада в микроглията при свързване с LPS.



Фигура 32. Каскади при възпаление и оксидативен стрес

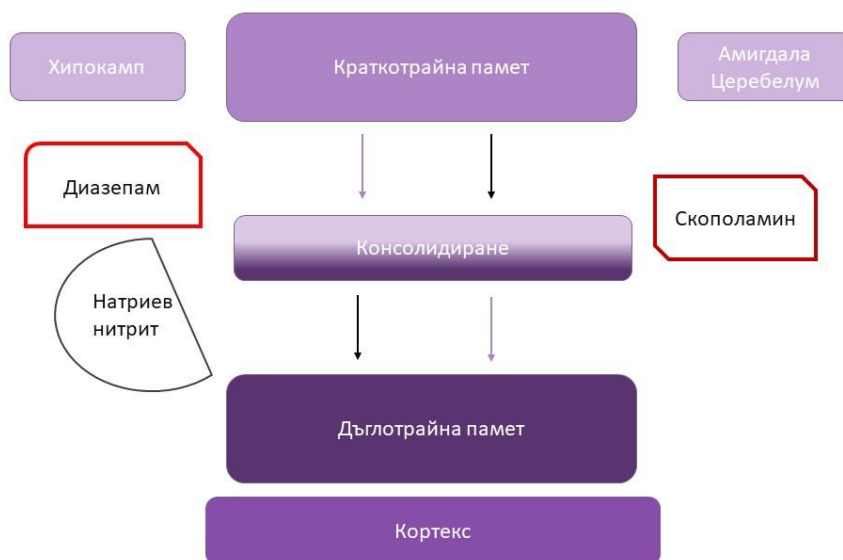
Микроглиите изглежда са основните клетки в мозъка, които експресират IL-6 рецептора и мощно секретират IL-6 по време на периферна имунна стимулация (Burton, 2013). IL-6 нокаутирани (IL-6^{-/-}) мишки са показали общо намаляване на броя на активираните мозъчни макрофаги, свързани с кортикални лезии, което предполага роля на IL-6 в оркестрацията на възпалението на централната нервна система (Penkowa, 1999). При патологични състояния микроглията освобождава големи количества TNF-α, това de novo производство на TNF-α е важен компонент на невровъзпалителния отговор, който е свързан с няколко неврологични разстройства в системата (Montgomery, 2012). Интерлевкин-1 (IL-1) е един от най-известните провъзпалителни цитокини, които действат в мозъка по време на различни инсулти и невродегенеративни заболявания.



Фигура 33. Взаимодействие на цитокини

Стандартният модел на синаптична консолидация предполага, че промените в синаптичния протеинов синтез и промените в мембранныя потенциал се постигат чрез активиране на вътреклетъчни трансдукционни каскади. Тези молекулярни каскади задействат транскрипционни фактори, които водят до промени в генната експресия. Резултатът от генната експресия е трайната промяна на синаптичните протеини, както и синаптичното ремоделиране и растеж. В кратък период от време непосредствено след обучението, молекулярната каскада, експресията и процесът както на транскрипционните фактори, така и на непосредствените ранни гени, са податливи на смущения. Смущенията, причинени от специфични лекарства, антитела и груба физическа травма, могат да блокират ефектите на синаптичната консолидация. (Roediger, 2007, Squire, 1995)

Системната консолидация е втората форма на консолидация на паметта. Това е процес на реорганизация, при който спомените от областта на хипокампа, където спомените са кодирани за първи път, се преместват в неокортекса в по-постоянна форма на съхранение (Dudai, 2015).



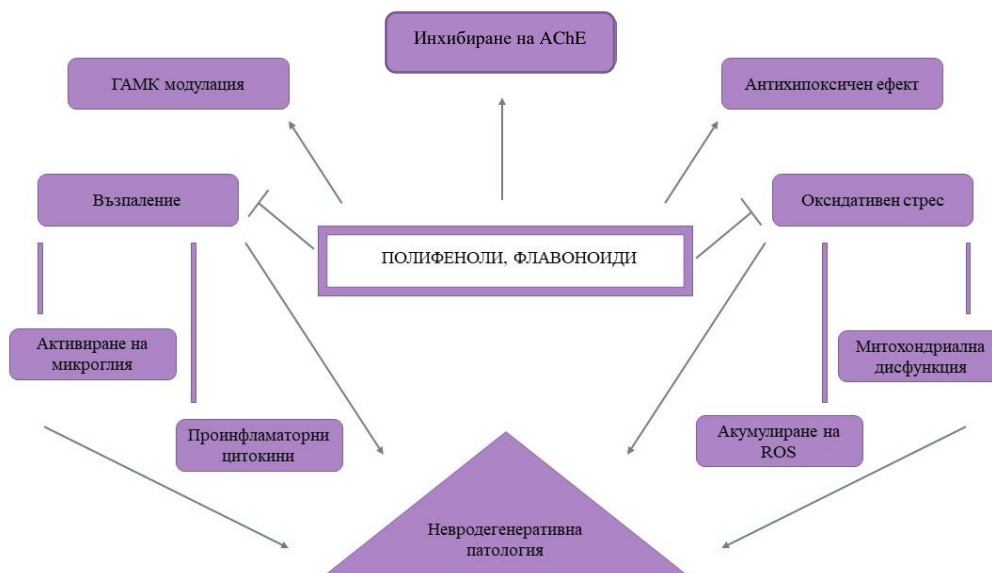
Фигура 34. Консолидиране на паметта

Освен изразената антиоксидантна активност на препарата, като постулат за протективен ефект в патофизиологията на невродегенеративните заболявания и способността да противодейства на товарът от ROS, систематичното изследване чрез различни модели позволява да се спекулират и евентуални други механизми на действие – модулация на ГАМК, антихолинестеразна активност, антихипоксичен ефект.

ACh е важен за предаването на нервните импулси и неговото фармакологично действие се прекратява основно от AChE и до известна степен от BChE (Kamal, 2015; Khan, 2018). Като цяло, родът *Sideritis* е значителен източник на естествени ензимни инхибитори. (Sarikurkcü, 2020). Инхибиране на AChE и тирозиназата е документирано за екстракти от *S. ozturkii* (Zengin et al., 2019) Също така, Celep et al. (2019) съобщават, че повече от 20% от екстрактите от *S. trojana* имат инхибиторен ефект върху α -амилазата и α -глюкозидазата. В друго проучване (Zengin et al., 2014) са разгледани инхибиторните ефекти на екстракти от *S. Galatica*, като екстрактите от етил ацетат и метанол са по-активни от водните. В допълнение към тези проучвания, няколко изследователи се фокусират върху ензимните инхибиторни свойства на някои етерични масла от *Sideritis* (Zengin et al., 2016; Tadić et al., 2017; Deveci et al., 2019). Szwajgier et al. документират антихолинестеразна активност за редица фенолни киселини, като открояват изразена активност за ферулова, пара кумарова и канелена киселина (Szwajgier, 2018). За вербаскозид, изолиран от *Verbascum mucronatum* е отразена средна ацетилхолинестеразна активност (Karhraman, 2010).

Настоящият труд показва устойчиви резултати при моделът на увредена памет чрез скополамин и диазепам, като сигнификанти стойности са регистрирани в различни параметри при дози от 200 и 400 мг/кг. Регистрирани са статистически резултати в тестове за краткотрайна и работна памет, така и за дълготрайна памет. Достъпната литература документира невропротективен ефект за множество от биологично активните вещества, открити в *Sideritis scardica*. В модел на билатерална васкуларна деменция причинена чрез перманентна билатерална оклусия на каротидната артерия Cao et al. (2016) показват сигнификантно увеличение на времето и дистанция на търсене в целевия квадрант, като същевременно намалява времето за избягване при плъхове третирани с екстракт от *Scutellaria baicalensis*, богат на скутелареинови и изоскутелареинови производни. Друг колектив насочва вниманието си към способността на исоскутелареинови глюкопиранозиди изолирани от *Stachys japonica* да инхибират ацетилхолинестеразата и бутирилхолин естеразата в имунологично изследване, като постулират невропротективен ефект (Nugoro, 2018). Кумаровата киселина дозозависимо повишава общата активност на полевия възбуден постсинаптичен потенциал (field excitatory postsynaptic potential -fEPSP) след високочестотна стимулация и отслабва индуцираната от скополамин блокада на fEPSP в CA1 областта на хипокампа. При третирани с паракумарова киселина плъхове се наблюдава подобрене на параметрите за пасивно избягване и удължаване на общата латентност и латентността спрямо целевия квадрант в теста воден лабиринт на Морис за определяне на пространствена памет (Kim, 2017). Wang et al. (2020), че вербаскозид намалява апоптозата в кората и хипокампуса на APP/PS1 мишки. Отбелязано е сигнификантно подобрене в поведението при тест открито поле, както и на пространственото познание, ученето и способността за памет, доказано е намаляване на латентното време на APP/PS1 мишки без значителна промяна в скоростта на плуване в MWM теста (Wang et al., 2020) Друго проучване изследва инхибиторната ацетилхолинестеразна активност на форситозид А на химическо и биологично ниво. Форситозид А инхибира ацетилхолинестеразата при смесен тип инхибиране (Yan, 2017). Jang et al. (2010) регистрират позитивен ефект от терапия с лутеоин преди интоксикация с липополизихарид в Neuro.2a клетки и постулират невропротективен ефект. В допълнение, четири седмична диета от 20 мкг/кг подобрява пространствената памет и нивата на инфламаторни маркери при мишки, като авторите коментират модуляция на микроглиално индуцираното възпаление (Jang S. 2010). При миши модел актеозидът значително отслабва когнитивните дефицити в Y лабиринтен тест и намалява невронното увреждане на CA1 регионите на хипокампа, индуцирано от глутамат (Ji, 2020). Модуляцията на ГАМК рецепторите предлага изгодна хипотеза за механизъм на действие, както и при интерпретацията на резултатите при модели на стрес, така и при

моделът на увредена памет чрез Диазепам. (Hanrahan, 2011) Лутеолин измества флунизепам от мястото на свързване на бензодиазепина *in vitro*, с нисък афинитет, и е демонстрирал подобни на анксиолитични ефекти, прилагани перорално при мишки.



Фигура 35. Дискутирани механизми на действие.

Експерименти показват анксиолитичните и антиоксидантните свойства на хлорогенова киселина в доза 20 мг/кг, като ефектът се редуцира от флумазенил, което предполага участие на ГАМК рецепторите в механизма на действие (Boaayed, 2007). Описани са и антихолинестеразни свойства на веществото при модел на скополамин индуцирана амнезия у мишки (Kwon et al., 2010). Не се изключва и антихипоксичен ефект на екстракта от *Sideritis scardica*, макар моделът за увредена памет чрез натриев нитрит да се откроява като твърде агресивен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изследваният екстракт от *Sideritis scardica* води до 100 % преживяемост на опитните животни 24 часа след еднократно приложение в доза до 10000 мг/кг. Не са регистрирани морфологични изменения при хистологично изследване на бъбрек, черен дроб, стомах, и мозък на плъхове третирани 12 седмици. Въз основа на получените от нас резултати и съпоставяйки ги с данни от други автори можем да заключим, че екстрактът е практически нетоксичен.

Хематологичните и биохимичните анализи показва стойности на различни параметри в референтния диапазон за съответния вид. Отбелязваме статистически сигнификантно намалени стойности на калция, което би могло да намери интерпретация при резултатите от експериментите с увредена памет.

Настоящият труд затвърждава данните достъпни в научната литература за изразените противовъзпалителни свойства на *Sideritis scardica*. Наблюдава се изявена редукция на отока на задна лапа при всички дози в късната фаза на възпалението. Екстрактът ефективно противодейства на индуцираното с липополизахарид системно възпаление и статистически значимо намалява нивата на IL-6, IL-10, и TNF alpha. Редом с изразената антиоксидантна активност, тези открития подкрепят резултатите от експериментите за стрес и увредена памет, като проинфламаторните цитокини играят ключова роля в процесите на невровъзпаление. IL-6 и TNF alpha се увеличават статистически достоверно при модел на хроничен стрес, като това откритие опосредства евентуалното им бъдещо приложение като маркери за стрес. Моделът на остър студов стрес успя да повиши статистически достоверно единствено нивата на IL-6. Същевременно, екстрактът показва ефект в поведенческите експерименти за акутен и хроничен стрес в дози от 200 и 400 мг/кг.

Системният експериментален подход при опитите за увредена памет демонстрира подобрене, както на краткотрайната, така и дълготрайната памет в дози от 200 и 400 мг/кг. Освен това откроява и евентуални допълнителни механизми на действие като модуляция на ГАМК и инхибиране на ацетилхолинестераза, което е в съответствие с достъпната литература. Не се изключва и антихипоксичен ефект, макар моделът за увредена памет чрез натриев нитрит да се откроява като твърде агресивен.

ИЗВОДИ

1. Екстрактът се характеризира с изявена антиоксидантна активност и висока концентрация на полифенолни съединения.
2. При определяне на остра токсичност не се наблюдава леталност на приложения екстракт от *Sideritis scardica* в дози до 5000 мг/кг, а при изследване на субхронична токсичност, след третиране на опитните животни с екстракт в продължение на 12 седмици, не се установяват патологични изменения в хистологични изследвания.
3. При оценката на хематологичните и биохимични показатели в експеримента за субхронична токсичност всички показатели са в референтните стойности за вида. Документирано е статистически достоверно намаление на калция и триглицеридите.
4. Приложеният модел на студов стрес достоверно увеличава нивата на TNF alpha в серума спрямо негативната контрола, екстрактът понижава тревожността в поведенчески тестове и намалява статистически достоверно нивата на IL 6 спрямо позитивната контрола и обратно.
5. Приложеният модел на хроничен стрес достоверно увеличава нивата на IL 6 и TNF alpha спрямо негативната контрола, а екстрактът води до понижаване на тревожността в поведенчески тестове при модел на хроничен стрес и намалява нивата на IL 6 и TNF alpha статистически значимо спрямо позитивната контрола.
6. Екстрактът подобрява кратотрайната и дълготрайната памет в поведенчески тестове при модел на индуцирана амнезия чрез скополамин и диазепам.
7. Екстрактът проявява изразена противовъзпалителна активност при модел на локално възпаление чрез карагенан и при системно инжектиране на липополизахард.

ПРИНОСИ

С научно – теоретично значение

1. Направен е системен анализ на експерименти за остър и хроничен стрес за установяване на анксиолитичен ефект на вещества от растителен и синтетичен произход
2. Проведен е системен анализ на експерименти за обучение и памет при различни модели на увреждане за установяване на невропротективен ефект на вещества от растителен и синтетичен произход.
3. Установена е зависимост между развитието на тревожно състояние и повишени нива на проинфламаторни цитокини в предклинични изследвания.

С научно – практическо значение

1. За първи път в България е проведено системно фармакологично проучване на противовъзпалителен, анксиолитичен и невропротективен ефект на *Sideritis scardica*
2. Определени са маркери за изследване на анксиолитичен и противовъзпалителен ефект.
3. Установена е зависимост между доза и ефект на екстракта от *Sideritis scardica*.

Списък на научните публикации

1. Янчев Н, Петкова Н, Делев Д. Химичен състав и остра токсичност на екстракт от *Sideritis scardica*, Научни трудове на Съюза на учените в България–Пловдив. Серия Г. Медицина, фармация и дентална медицина т. XXVI. ISSN 1311-9427 (Print), ISSN 2534-9392 (On-line). 2021. Scientific works of the Union of Scientists in Bulgaria Plovdiv, series G. Medicine, Pharmacy and Dental medicine, Vol. XXVI. ISSN 1311- 9427 (Print), ISSN 2534-9392 (On-line). 2021. 177-181.
2. Янчев Н, Делев Д. Противовъзпалително действие на растения от рода *Sideritis*. Обзор Научни трудове на Съюза на учените в България–Пловдив. Серия Г. Медицина, фармация и дентална медицина т. XXV. ISSN 1311-9427 (Print), ISSN 2534-9392 (On-line). 2020. Scientific works of the Union of Scientists in Bulgaria, Plovdiv, series G. Medicine, Pharmacy and Dental medicine, Vol. XXV. ISSN 1311- 9427 (Print), ISSN 2534-9392 (On-line). 2020. 245-250.
3. Янчев Н, Делев Д, Вилмош Н. Ефект на *Sideritis scardica* при оток на задна лапа, предизвикан с карагенан при Wistar плъхове Научни трудове на Съюза на учените в България–Пловдив. Серия Г. Медицина, фармация и дентална медицина т. XXVIII. ISSN 1311-9427 (Print), ISSN 2534-9392 (On-line) 2022. Scientific works of the Union of Scientists in Bulgaria, Plovdiv, series G. Medicine, Pharmacy and Dental medicine, Vol. XXVIII. ISSN 1311- 9427 (Print), ISSN 2534-9392 (On-line) 2022.
4. Янчев Н, Делев Д, Потенциал на мурсалския чай (*Sideritis scardica*, Lamiaceae) в терапията на заболявания на ЦНС, Наука фармакология 1/2021.
5. Yanchev N, Delev D, Vilmosh N, Atanasova P, Hrishev P. Subchronic toxicity of *Sideritis scardica*, Lamiaceae on male Wistar rats, Folia medica (in print).
6. Yanchev N, Petkova N, Ivanov I, Delev D. Total Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of Different Extracts from *Sideritis scardica*. Trop J Nat Prod Res. 2022; 6(7):1113-1118.

Участия на конференции и форуми

1. VIII-ма международна научна конференция на младите учени – Пловдив 2020 ICYS 2020, Противовъзпалително действие на растения от рода *Sideritis*. Обзор - постер и статия
2. 34th ECNP Congress, 2-5 October 2021 Adaptogenic effect of *Sideritis Scardica*, Lamiaceae on male Wistar rats in a chronic stress model – постер
3. Конференция „Наука и Младост 2021“ МНД Асклепий - Adaptogenic effect of *Sideritis Scardica*, Lamiaceae in an acute stress model on male Wistar rats, Yanchev N, Delev D, Vilmosh N – постер
4. „Медицина на бъдещето“ Научна конференция по случай 75 годишния юбилей на Медицински университет Антиоксидантна активност на екстракти от *Sideritis scardica*, Lamiaceae Янчев Н, Надежда Петкова Н, Делев Д – постер
5. IX международна научна конференция на младите учени – Пловдив ICYS 2022 Янчев Н, Делев Д, Вилмош Н. Ефект на *sideritis scardica* при оток на задна лапа, предизвикан с карагенан при Wistar плъхове – постер и статия
6. Национална конференция на СУБ Пловдив 2021 Химичен състав и остра токсичност на екстракт от *Sideritis scardica*, Янчев Н, Петкова Н, Делев Д - постер и статия