



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛОВДИВ  
MEDICAL UNIVERSITY – PLOVDIV

**ФАРМАЦЕВТИЧЕН ФАКУЛТЕТ**

**КАТЕДРА “ФАРМАКОЛОГИЯ, ТОКСИКОЛОГИЯ И ФАРМАКОТЕРАПИЯ”**

**АС. МАГИСТЪР-ФАРМАЦЕВТ**

**КРИСТИНА ЮЛИАНОВА СТАВРАКЕВА**

**ТЕМА**

**ПРОУЧВАНЕ НА БИОЛОГИЧНИ ЕФЕКТИ НА МЕТАНОЛОВ ЕКСТРАКТ  
ОТ *MICROMERIA FRIVALDSZKYANA* (DEGEN) VELEN. (LAMIACEAE)**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд  
за присъждане на образователна и научна степен  
**“Доктор”**

Докторска програма:

**“Фармакология (вкл. Фармакокинетика и химиотерапия)”**

Професионално направление: 7.3 **“Фармация”**

**Научни ръководители:**

**Доц. Елисавета Апостолова, дм**

**Проф. д-р Анелия Биволарска, дб**

**Пловдив, 2025 г.**

Дисертационният труд се състои от 132 страници. Той е онагледен с 44 фигури и 12 таблици. Цитирани са 257 литературни източника.

Докторантът работи като асистент в катедра “Фармакология, токсикология и фармакотерапия” към Фармацевтичен факултет на Медицински университет – Пловдив.

Експерименталните изследвания са извършени в катедра “Фармакология, токсикология и фармакотерапия” и катедра “Медицинска биохимия” към Фармацевтичен факултет на Медицински университет – Пловдив.

Дисертационният труд е одобрен и насрочен за публична защита от разширен катедрен съвет на Катедрата по фармакология, токсикология и фармакотерапия към ФФ на МУ-Пловдив, състоял се на 04.10.2024 година.

Докторантът е отчислен с право на защита със Заповед № Р-899/31.10.2024 г. на зам.-ректор по НИД на МУ-Пловдив – Проф. д-р М. Токмакова, дм.

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

Доц. Калин Иванов, дф

Доц. д-р Илия Костадинов, дм

Проф. д-р Петко Маринов, дм

Проф. д-р Снежана Златева, дм

Проф. Вирджиния Цанкова, дф

Резервни членове:

Доц. Весела Кокова, дм

Доц. Йордан Йорданов, дф

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 24.04.2025 г. от 11:00 ч. във Втора аудитория на Аудиторен комплекс на МУ-Пловдив на заседание на научно жури.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел и катедрата по фармакология, токсикология и фармакотерапия на МУ-Пловдив, на интернет страницата на МУ-Пловдив, както и при поискване на e-mail: [Kristina.Stavrakeva@mu-plovdiv.bg](mailto:Kristina.Stavrakeva@mu-plovdiv.bg).

## СЪДЪРЖАНИЕ

<b>ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ</b> .....	6
<b>ВЪВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>ЦЕЛ</b> .....	8
<b>ЗАДАЧИ</b> .....	8
<b>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b> .....	9
<b>РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ</b> .....	18
<b>1. Фитохимичен състав</b> .....	18
<b>2. Лабораторни тестове</b> .....	23
<b>2.1. Остра токсичност</b> .....	23
<b>2.2. Изследване на аналгетичен ефект</b> .....	23
2.2.1. Тест с механичен натиск на лапата (аналгезиметър) .....	23
2.2.2. Тест гореща плоча .....	23
<b>2.3. Изследване на противовъзпалителен ефект при модел на възпаление на задна лапа на гризач</b> .....	25
<b>2.4. Методи за изследване на влияние върху когнитивните функции</b> .....	28
2.4.1. Activity cage.....	28
2.4.2. Метод на активно обучение - Two-way active avoidance test (Тест за активно двупосочно избягване с наказателно подкрепление).....	29
2.4.3. Step-through passive avoidance test (Тест за пасивно избягване с наказателно подкрепление) .....	29
2.4.4. Step-down passive avoidance test (Тест за пасивно избягване с наказателно подкрепление) .....	30
2.4.5. Y-maze .....	31

2.4.6. Кръстосан лабиринт (X-maze) .....	31
2.4.7. Оpozнавателен тест.....	32
<b>2.5. Изследване на хепатопротективно действие на екстракта.....</b>	<b>34</b>
2.5.1. Промени в серумните нива на биомаркери при хепатотоксичност, индуцирана от парацетамол .....	36
2.5.1.1. Общ и директен билирубин .....	36
2.5.1.2. AST.....	37
2.5.1.3. ALT.....	38
2.5.2. Определяне на маркери за оценка на чернодробната функция при хепатотоксичност, индуцирана от парацетамол в чернодробен хомогенат.....	39
2.5.2.1. Каталаза (CAT).....	39
2.5.2.2. Редуциран глутатион (GSH).....	40
2.5.2.3. Малондиалдехид (MDA).....	41
2.5.2.4. 8-OH-dG .....	42
2.5.2.5. Интерлевкин 6.....	43
2.5.2.6. Тумор некротизиращ фактор-алфа (TNF- $\alpha$ ) .....	44
2.5.3. Промени в серумните нива на биомаркери при t-BHP- индуцирана хепатотоксичност .....	45
2.5.3.1. Общ и директен билирубин .....	45
2.5.3.2. AST.....	45
2.5.3.3. ALT.....	46
2.5.4. Определяне на маркери за оценка на чернодробната функция при t-BHP-индуцирана хепатотоксичност в чернодробен хомогенат .....	47
2.5.4.1. Каталаза .....	47
2.5.4.2. Редуциран глутатион .....	48
2.5.4.3. Малондиалдехид .....	49
2.5.4.4. 8-OH-dG .....	50
<b>2.6. Антиоксидантно действие.....</b>	<b>53</b>

<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>55</b>
<b>ИЗВОДИ .....</b>	<b>56</b>
<b>ПРИНОСИ .....</b>	<b>57</b>
<b>СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД .....</b>	<b>58</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ .....</b>	<b>59</b>

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ДНК - дезоксирибонуклеинова киселина

РК - розмаринова киселина

ЦНС - централна нервна система

8-OH-dG - 8-хидрокси дезоксигуанозин

ABTS - 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid) - 2,2-азино-бис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонова) киселина

ALT - аланин аминотрансфераза

AST - аспартат аминотрансфераза

CAT - каталаза

CCl<sub>4</sub> - тетрахлорметан

COX-1 - циклооксигеназа 1

COX-2 - циклооксигеназа 2

DPPH - 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl - 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил

FRAP - ferric reducing antioxidant power

GSH - редуциран глутатион

IL-1 $\alpha/\beta$  - интерлевкин 1 $\alpha/\beta$

IL-6 - интерлевкин 6

IL-8 - интерлевкин 8

IL-12 - интерлевкин 12

МАРК - митоген-активирани протеин кинази

MDA - малондиалдехид

NAPQI - N-acetyl-p-benzoquinone imine - N-ацетил-пара-бензохинонимин

NF- $\kappa$ B - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells - ядрен фактор –  $\kappa$ B

NO - азотен оксид

Nrf2 - nuclear factor erythroid 2-related factor 2 - свързан с ядрото еритроид фактор-2

PPT - pain pressure threshold

SOD - супероксид дисмутаза

t-BHP - бутил хидропероксид

TNF- $\alpha$  - тумор некротизиращ фактор алфа

## ВЪВЕДЕНИЕ

В последните години се наблюдава повишен интерес към растителните лекарствени продукти и хранителни добавки. Около 80 % от населението по света прилага средства от растителен произход за профилактика и лечение на здравословни проблеми. Едва 5 - 15 % от висшите растения на Земята са проучени и използвани като източник на биологично активни вещества. Тези тенденции стимулират изследването на нови растителни видове с цел разкриване на техния терапевтичен потенциал ([Schuster, 2001](#); [Ekor, 2014](#)).

Видове от род *Micromeria* са показали антиревматично, антисептично, антимикробно, антиоксидантно, гастропротективно, хепатопротективно, противовъзпалително, антихолинестеразно, стимулиращо централната нервна система (ЦНС) и общо тонизиращо действие. *Micromeria frivaldszkyana* представлява ендемично за България растение и данните за вида в достъпната литература са ограничени. Наличните данни касаят фитохимични изследвания върху метаболитите на растението и неговото антиоксидантно и антимикробно действие. *M. frivaldszkyana* се отличава с много високо съдържание на розмаринова киселина и флавоноиди, от които хесперидинът е в най-голямо количество. Литературните данни за розмариновата киселина показват разнообразни биологични ефекти – антиоксидантно, противовъзпалително, невропротективно, антиноцицептивно, хепатопротективно действие. За хесперидин са установени антиоксидантно, противовъзпалително, аналгетично, хепатопротективно действие. Въз основа на тези данни можем да предположим, че тотален извлек от растението ще проявява сходни биологични ефекти ([Vukelic, 2015](#); [Nikolova et al., 2017](#); [Mladenova et al., 2021](#)).

Обогатяване на информацията относно фитохимичното съдържание на *M. frivaldszkyana* ще доведе до увеличаване на познанията относно състава му и ще подпомогне характеризирането на биологичния му потенциал. Разкриването на непознати свойства може да послужи като източник за синтезиране на нови лекарствени средства или хранителни добавки, съдържащи екстракт от растението. Изследването на неговата токсичност ще определи неговата пригодност за употреба и приложение. Настоящото експериментално проучване се състои от изучаване на качествен, количествен състав на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana*, остра токсичност, аналгетично, противовъзпалително действие, влияние върху когнитивните функции и хепатопротективно действие.

## ЦЕЛ

Цел на изследването е получаване на метанолов екстракт от надземните части на *Micromeria frivaldszkyana* (Lamiaceae), изследване на химичния състав на екстракта и определяне на някои биологични ефекти на получения екстракт.

## ЗАДАЧИ

1. Получаване на метанолов екстракт от надземни части на изследвания растителен вид.
2. Определяне на химичния състав на получения екстракт.
3. Определяне на остра токсичност на екстракта при перорално приложение на плъхове.
4. Сравнително изследване на аналгетично действие на екстракта и стандарт розмаринова киселина при плъхове.
5. Сравнително изследване на противовъзпалително действие на екстракта и розмаринова киселина (стандарти) при плъхове.
6. Сравнително изследване на ефекти на екстракта върху процесите обучение и памет при плъхове.
7. Изследване на хепатопротективно действие на екстракта при модели на хепатотоксичност при плъхове.

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

## 1. МАТЕРИАЛИ

### 1.1. Растителен материал

Надземни части от *M. frivaldszkyana* са събрани през месец юни (по време на пълен цъфтеж) вегетационен период 2019-2020 г. от Природен парк „Българка“, флористичен район Стара планина (средна) в областта на връх Шипка. Хербариен образец е депозиран в хербариума на Аграрен университет - Пловдив (SOA) под № 062648.

#### 1.1.1. Фитохимичен анализ

Първичните и вторични метаболити се анализират от полярната фаза, а изследванията на липидите се извършват използвайки органична фаза.

Общо 500  $\mu\text{L}$  водно-метанолова смес (3:1 v/v) се използва за фазово разделяне. 400  $\mu\text{L}$  от горната липофилна фаза се изсушава, ресуспендира се в смес от ацетонитрил/изопропанол (7:3) и се анализира на Orbitrap LC-MS система (Exactive, Thermo Scientific). Първичните метаболити са анализирани с GC-MS със задължителна стъпка на дериватизация, извършена по метода на Lisec и съавтори (Lisec et al., 2006). За специализираните (вторични) метаболити, водно-метаноловите екстракти са прехвърлени в стъклени епруветки за LC-MS и анализирани с помощта на Thermo Q Exactive Focus (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) с колона C18 за обратнофазова хроматография. Идентификацията на метаболитите, анализирани чрез GC-MS, се извършва, използвайки Golm Metabolome Database (Kopka et al., 2005).

Представените данни са базирани на изследване на 6 проби. За анализите на първичните и вторичните метаболити се използва версия 4.3.0 на R (R Core Team, 2023). Пакетът `_ggplot2_` (Kassambra, 2022) се използва за подготовка на графиките тип "boxplot". Определят се и подреждат по средна концентрация 20-те най-разпространени метаболита. Данните от липидомиката се импортират в Microsoft Excel, като се изчислява процентното съдържание на всяко съединение спрямо общото съдържание на липиди, а представените данни са средните стойности от шестте проби.

### 1.2. Използвани животни

Експериментите се провеждат върху мъжки плъхове порода Wistar със средно тегло 150-270 g. След придобиване от Вивариума на МУ-Пловдив

животните се разпределят в клетки по групи от 8 броя съгласно изискванията на Българската Агенция по Безопасност на Храните (БАБХ) с разрешително № 352/ 30 Май 2023 и с протокол № 6/05 Октомври 2023 от Етичната комисия към МУ-Пловдив. Те получават стандартна лабораторна храна и вода *ad libitum*, а в помещенията се поддържат стандартни лабораторни условия (температура  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , влажност на въздуха 45% и 12-часов цикъл светло/тъмно). Преди започване на експериментите плъховете се оставят за 24 часа да се адаптират към новата обстановка. Експериментите се провеждат при спазване на изискванията на Хелзинкската конвенция и Наредба № 20 от 01 Ноември 2012.

## 2. МЕТОДИ

### 2.1. Подготовка на растителния материал

Прясно нарязаните растения се сортират, изсушават се в сушилня с активна вентилация при  $30^\circ\text{C}$  и се съхраняват при стайна температура на тъмно. Растителният материал се смела с помощта на механична мелница до размер на праховите частици по-малко от  $400 \mu\text{m}$ . Пробите от смления материал се съхраняват в хартиени пликове до извършване на анализа.

Десет грама изсушен и смлян растителен материал се екстрахира с 70% метанол (1:10 w/v) в продължение на 24 часа при стайна температура  $25^\circ\text{C}$  в колба защитена от светлина. След това е извършена трикратна ултразвукова екстракция, състояща се от 3 цикъла по 15 min на  $30^\circ\text{C}$ . След центрофугиране на 6000 rpm за 15 min, полученият екстракт е филтриран през филтърна хартия Whatman No.1. Същата процедура на екстракция е повторена двукратно върху останалия растителен материал. Трите екстракта се обединяват, а разтворителят се изпарява чрез ротационен вакуум-изпарител (Heidolph, Germany) на  $50^\circ\text{C}$  до постигане на пълно изсушаване.

Изсушеният екстракт се разтваря във вода до достигане на съответните концентрации необходими за експериментите.

### 2.2. Остра токсичност на екстракта и определяне на $LD_{50}$ при перорално приложение на плъхове

Изследването на остра токсичност се провежда по метода, описан от Zheleva-Dimitrova и сътрудници (2019) с малки модификации (Zheleva-Dimitrova et al., 2019). Осем групи от по три животни (160-270 g) са третирани орално с метанолов екстракт в дози от 5000, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400 и 200 mg/kg. Животните се наблюдават в рамките на 24 часа за

смъртност и знаци на токсичност. На 24-тия час се отчита смъртността във всяка група.

$LD_{50}$  се определя по формулата  $LD_{50} = \frac{[M_0 + M_1]}{2}$ , където

$M_0$  е най-високата доза, при която няма смъртност сред третираните, а  $M_1$  е най-ниската доза, при която се наблюдава смъртност сред третираните животни.

Броят на плъховете се избира според настоящия принцип за 3R за хуманно третиране на лабораторни животни (Replacement, Reduction and Refinement). За да се намали броя на животните използвани в експерименти, се ангажират групи от 3 според скорошно изследване. След определянето на  $LD_{50}$  изследванията за биологични ефекти продължават с дози 1/10 и 1/20 от установената  $LD_{50}$  (Zheleva-Dimitrova et al., 2019; Hanafy et al., 2016).

### **2.3. Изследване на аналгетично действие**

#### **2.3.1. Тест с термичен стимул “гореща плоча”**

Тест гореща плоча се провежда с апарат Hot Plate на фирмата Ugo Basile, Italy. Животните (n= 8) се третират с изследваните вещества в продължение на 14 дни както следва:

1 група (контрола): 0.1 ml/100 g т.м. физ. р-р

2 група: метамизол 150 mg/kg т.м.

(прилага се еднократно в деня на изследването)

3 група: метанолов екстракт в доза 250 mg/kg т.м.

4 група: метанолов екстракт в доза 400 mg/kg т.м.

5 група: метанолов екстракт в доза 500 mg/kg т.м.

6 група: розмаринова киселина 30 mg/kg т.м.

Непосредствено след последното приложение на веществата се провежда тестът при постоянна температура на плочата 55°C (±5°C), като се отчита времето за вокализация, избягване или облизване на задната лапа в секунди /sec/. Извършват се още три тествания - 60, 120 и 180 min след инжектирането. Максималното време за престой на животното върху плочата е 30 sec.

#### **2.3.2. Тест с механичен стимул „Аналгезиметър“**

Животните се третират с посочените в точка 2.2.1. вещества в продължение на 14 дни.

Тридесет минути след последното приложение се извършват изследвания с апарат Analgesymeter (Ugo Basile, Italy). Тестът се изразява в прилагането на постепенно увеличаващ се механичен натиск върху задната лапа на плъх. Животното отдръпва крайника при достигане на болковия праг. Отчита се силата на натиска (в относителни единици PPT-pain pressure threshold по линейната скала на апарата), при която настъпва двигателната реакция. Тестванията се извършват непосредствено след инжектирането и 60, 120 и 180 min след приложението на медикаментите.

#### **2.4. Изследване на противовъзпалително действие при модел на възпаление на задна лапа на гризач**

Мъжки Wistar плъхове с тегло между 150-180 g се разделят в 6 групи (n= 8) и се третират перорално както следва:

1 група (контрола): 0.1 ml/100 g т.м. физ. р-р

2 група (позитивна контрола): диклофенак натрий в доза 25 mg/kg т.м.

3 група: метанолов екстракт в доза 250 mg/kg т.м.

4 група: метанолов екстракт в доза 400 mg/kg т.м.

5 група: метанолов екстракт в доза 500 mg/kg т.м.

6 група: розмаринова киселина 30 mg/kg т.м.

Физиологичният разтвор, както и екстрактите от *M. frivaldszkyana* и РК се прилагат перорално за 14 дни, докато диклофенак се прилага еднократно в деня на експеримента по същия път на въвеждане. Един час след последното приложение, 1 % разтвор на карагенан във физиологичен разтвор (0.1 ml) се инжектира подкожно в дясната задната лапа на животните. Определянето на отока на лапата се извършва посредством апарат „Плетизмометър” (Ugo Basile, Italy) непосредствено преди изследването и на 1<sup>-ви</sup>, 2<sup>-ри</sup>, 3<sup>-ти</sup>, 4<sup>-ти</sup>, 5<sup>-ти</sup> час след инжектирането.

Процентът на увеличаване на отока на задната лапа се определя по формулата:

$$(\%) = [(V_n - V_0) / V_0] \times 100$$

Където:

$V_n$  – оток на дясна лапа измерен след инжектирането на карагенан на n-тия час;

$V_0$  – оток на същата лапа на същото животно измерен преди инжектирането на карагенан

## **2.5. Изследване на влияние върху когнитивните функции**

Животните (по 10 в група) се третират перорално в продължение на 14 дни както следва:

1 група (контрола): 2 ml (животно) дневно дестилирана вода

2 група: метанолов екстракт в доза 250 mg/kg т.м

3 група: метанолов екстракт в доза 400 mg/kg т.м.

4 група: метанолов екстракт в доза 500 mg/kg т.м.

### **2.5.1. Изследване на локомоторната активност и опознавателен рефлекс**

Използва се автоматична клетка за отчитане на хоризонталната и вертикална активност на плъхове с помощта на фото-сензори (Activity cage). Отчитането на хоризонталната активност и вертикалните изправия става в продължение на 5 min за всяко животно по отделно. Изследването се провежда непосредствено преди първата обучителна сесия в апарат Shuttle-box (1<sup>-ви</sup> ден от експерименталната сесия), както и на 7<sup>-ми</sup> и 14<sup>-ти</sup> ден от експерименталната сесия.

### **2.5.2. Метод за активно обучение - Two-way active avoidance test (Тест за активно двупосочно избягване с наказателно подкрепление)**

Експериментите се провеждат с апарат Automatic reflex conditioner на фирмата Ugo Basile, Италия.

Провежда се първоначална обучителна сесия с продължителност 5 дни. Всеки ден плъховете се подлагат на 30 тренировки със следните параметри: 6 секунди едновременно включване на светлинен и звуков дразнител (670 Hz, 70 dB), последвано от 3 секунди електрическа стимулация (0.4 mA) по решетъчния под на клетката. Между отделните тренировки има пауза от 12 секунди. Електрическата стимулация се прекратява ако животното премине в другото помещение на клетката.

Тестът за запаметяване се провежда на 12-тия ден по програма със същите параметри, но без електрическа стимулация.

### **2.5.3. Step-through passive avoidance test (Тест за пасивно избягване с наказателно подкрепление)**

През първия ден плъховете се поставят в апарата за опознаване на обстановката за 1 минута. След това те се подлагат на 3 тренировки през

60 min по стандартната програма на апарата със следните параметри: закъснение (delay) от 7 sec преди да се отвори вратата, последвано от 12 секунди отворена врата.

Ако плъхът премине в тъмното помещение вратата се затваря и следва електрическа стимулация (0.4 mA) с продължителност 3 sec.

Ако плъхът не премине в тъмното помещение автоматично се включва брояч за време (в секунди), който отчита максимално 3 min ( $180 \pm 2$  sec).

Като критерий за обученост се приема престоя на животното в светлото помещение на апарата в рамките на максималното време от 178 sec при две последователни тренировки.

На следващия ден се провежда още една обучителна сесия. Тестът за дълготрайна памет се провежда 24 часа след обучителната сесия по същата програма, но без електрическа стимулация.

#### **2.5.4. Step-down passive avoidance test (Тест за пасивно избягване с наказателно подкрепление)**

През първия ден плъховете се поставят в апарата за опознаване на обстановката за 1 min. След това те се подлагат на 3 тренировки през 60 min по стандартната програма на апарата. Животното се поставя върху пластмасовата платформа, която след включване на апарата вибрира вертикално. При слизване на плъха от нея с 3-те или 4-те лапи следва електрическа стимулация (0.4 mA) по решетъчния под на клетката с продължителност 3 sec. На следващия ден се провежда още една обучителна сесия.

Животното се счита за обучено, ако при 2 последователни тренировки има престой върху платформата над 60 sec.

Тестът за дълготрайна памет се провежда 24 часа след обучителната сесия по същата програма, но без електрическа стимулация. Максималното време на престой върху платформата е 5 min (300 секунди).

#### **2.5.5. Изследване на пространствена работна памет (Y-maze)**

Y-maze представлява лабиринт, състоящ се от 3 рамена с дължина 50 см, ширина 10 см и височина на стената 30 см. Рамената са разположени под ъгъл  $120^\circ$ . Те се означават като А, В и С на случаен принцип. Плъховете се поставят в центъра на лабиринта и се проследява движението им в продължение на 8 min. Отчита се последователността на влизане в рамената на лабиринта. Влизане в рамото на лабиринта се отчита, когато плъхът премине в рамото с четирите лапи. Нормално се наблюдава редуване на

влизането в рамената, напр. ABC, CBA, ACB и т.н. (алтернация). Определя се броя на алтернациите на принципа на застъпването, например запис от вида A–C–B–C–A съдържа 2 алтернации. Отчита се процентът на спонтанните алтернации (СА%) по следната формула:  $СА\% = [\text{брой спонтанни алтернации}/(\text{общ брой влизания} - 2)] \times 100$ . След приключване на тестването на всеки плъх лабиринтът се почиства с 70% етанол преди да се постави следващото животно.

#### **2.5.6. Изследване на поведение на тревожност чрез повдигнат кръстосан лабиринт (X-maze)**

Повдигнатият кръстосан лабиринт се състои от две открити и две закрити кръстосани рамена на височина 50 см от пода. Животните се поставят в центъра на лабиринта и се наблюдават в продължение на 5 min като се отчитат следните показатели: престой и брой влизания в откритите рамена и закритите рамена, общ брой влизания в рамената, съотношение на броя влизания в откритите рамена към общия брой влизания. Критерий за намаляване на тревожността на животните е увеличаване на времето, прекарано в откритите рамена, увеличаване на броя влизания в откритите рамена, увеличаване на съотношението брой влизания в откритите рамена към общия брой влизания. След приключване на тестването на всеки плъх лабиринтът се почиства с 70% етанол преди да се постави следващото животно.

#### **2.5.7. Тест за разпознавателна памет (new object recognition test)**

Тестът се провежда в прозрачна пластмасова клетка (използва се постановката Activity cage). Всеки плъх се поставя в апарата за 5 min и се оставя да опознае обстановката. След всяко изваждане на животно от апарата, той се почиства с етанол за премахване на миризми преди поставянето на следващото животно. На втория ден се извършва тестването, като в противоположните краища на апарата се поставят два идентични обекта. Плъхът се поставя в апарата за 5 min и се оставя да опознае обектите. След 1.5 часа се провежда изследването за разпознавателна памет, при която единият от вече познатите обекти се заменя с нов, различен по форма и цвят. Отчита се времето, прекарано в обследване на всеки от обектите и общото време на изучаване. Показател за разпознавателната памет е дискриминационния индекс (DI). Той се определя по формулата:  $DI = \frac{\text{времето на изучаване на новия обект}}{(\text{време на изучаване на новия обект} + \text{време на изучаване на познатия обект})}$ . По-високите стойности на DI показват по-добра разпознавателна памет.

## **2.6. Изследване на хепатопротективно действие**

### **2.6.1. Модел на хепатотоксичност предизвикана от парацетамол**

Животните (n=8) се третират перорално с изследваните вещества в продължение на 7 дни както следва:

- 1 група (контрола): 0.1 ml/100 g т.м. физ. р-р **без чернодробно увреждане**
- 2 група: метанолов екстракт в доза 500 mg/kg т.м. **без чернодробно увреждане**
- 3 група: 0.1 ml/100 g т.м. физ. р-р
- 4 група: метанолов екстракт в доза 250 mg/kg т.м.
- 5 група: метанолов екстракт в доза 400 mg/kg т.м.
- 6 група: метанолов екстракт в доза 500 mg/kg т.м.
- 7 група: розмаринова киселина 100 mg/kg т.м.
- 8 група: силимарин 125 mg/kg т.м.

Вечерта на 6<sup>-ти</sup> срещу 7<sup>-ми</sup> ден животните се оставят без храна за 12 часа (имат достъп само до вода). На 7<sup>-ми</sup> ден от третирането на животните от групи 3, 4, 5, 6, 7 и 8 се прилага перорално 2000 mg/kg т.м. Paracetamol. Три часа след това се прилагат веществата. Четиридесет и осем часа (48 часа) след приложението на парацетамола животните се декапитират и се взема кръв за биохимичен анализ на показателите на чернодробната функция, както и целия черен дроб. Органите се промиват с ледено студен физиологичен разтвор, след което се хомогенизират за определяне на маркери за оксидативен стрес.

### **2.6.2. Модел на t-VHP-индуцирана хепатотоксичност**

Разпределението на животните по групи е следното:

- 1 група (контрола): 0.1 ml/100 g т.м. физ. р-р **без чернодробно увреждане**
- 2 група: метанолов екстракт в доза 500 mg/kg т.м. **без чернодробно увреждане**
- 3 група: 0.1 ml/100 g т.м. физ. р-р
- 4 група: метанолов екстракт в доза 250 mg/kg т.м.
- 5 група: метанолов екстракт в доза 400 mg/kg т.м.
- 6 група: метанолен екстракт в доза 500 mg/kg т.м.
- 7 група: розмаринова киселина 100 мг
- 8 група: силимарин 125 mg/kg

Използва се методът, описан от Yang и сътрудници (Yang et al., 2013). В продължение на 5 дни животните се третират с изследваните вещества. На 5<sup>-ти</sup> ден от третирането, 30 min след приложението на веществата на животните от групи 3, 4, 5, 6, 7 и 8 се инжектира интраперитонеално

0.5 mmol/kg t-BHP. Осемнадесет часа след приложението на t-BHP животните се декапитират и се взема кръв за биохимичен анализ на показателите на чернодробната функция, както и целия черен дроб за определяне на маркери за оксидативен стрес.

### **2.7. Определяне на маркери за оценка на чернодробната функция в серум**

За оценка на чернодробната функция се измерва ензимната активност на аланин аминотрансфераза (ALT), аспартат аминотрансфераза (AST) в серум, посредством спектрофотометричен метод. Същият метод се прилага и за определяне на общ и директен билирубин.

### **2.8. Определяне на маркери на оксидативния стрес и антиоксидантна защита**

Антиоксидантният ефект на изследваният екстракт в тъканни хомогенати на черен дроб се определя чрез нивата на редуциран глутатион (GSH) и каталаза (CAT) посредством ELISA метод. Степента на липидна пероксидация се определя в серум посредством измерване на нивото на малондиалдехид (MDA) и 8-хидрокси дезоксигуанозин (8-OH-dG) по същия метод, описан от Ohkawa и сътрудници ([Ohkawa et al., 1979](#)).

### **2.9. Определяне на нива на провъзпалителни цитокини в чернодробен хомогенат**

Нивата на провъзпалителните цитокини интерлевкин 6 (IL-6) и тумор некротизиращ фактор алфа (TNF- $\alpha$ ) в тъканни хомогенати на черен дроб на плъхове с парацетамол-индуцирана хепатотоксичност се определя чрез ELISA метод.

## **3. Статистическа обработка на получените резултати**

Резултатите от експериментите се обработват с програмата SPSS 19.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, САЩ). За всеки показател при всяка група се определят средната аритметична стойност и средната ѝ грешка (mean  $\pm$  SEM) и разликите се считат за сигнификантни при  $p < 0.05$ . Разпределението на получените резултати се установява с Kolmogorov-Smirnov test. В случай на нормално разпределение се използва вариационен анализ (one-way ANOVA). Сравняването на резултатите на опитните групи и контролата се извършва с Tukey multiple comparison test.

# РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

## 1. Фитохимичен състав

*M. frivaldszkyana* е български ендемичен вид, чийто фитохимичен състав и терапевтична активност са слабо проучени. Наличните данни са свързани предимно със съдържанието на етеричното масло във видовете от рода (Sarikurkcu et al., 2020). Липсата на достатъчно информация в научната литература насочва настоящото изследване към изучаване на фитохимичния състав на растението. Изследването на метаболома на *M. frivaldszkyana* ще допринесе за изясняване на фармакологичната активност на растението.

Смлян растителен материал от *M. frivaldszkyana* се подлага на екстракция на метаболити с помощта на 70% метанол и последващо фракциониране и изпаряване на разтворителя чрез вакуум-изпарител. Полярната фаза се използва както за GC-MS, така и за UPLC-MS-MS анализи, а неполярната фракция се използва за изследване на липидите.

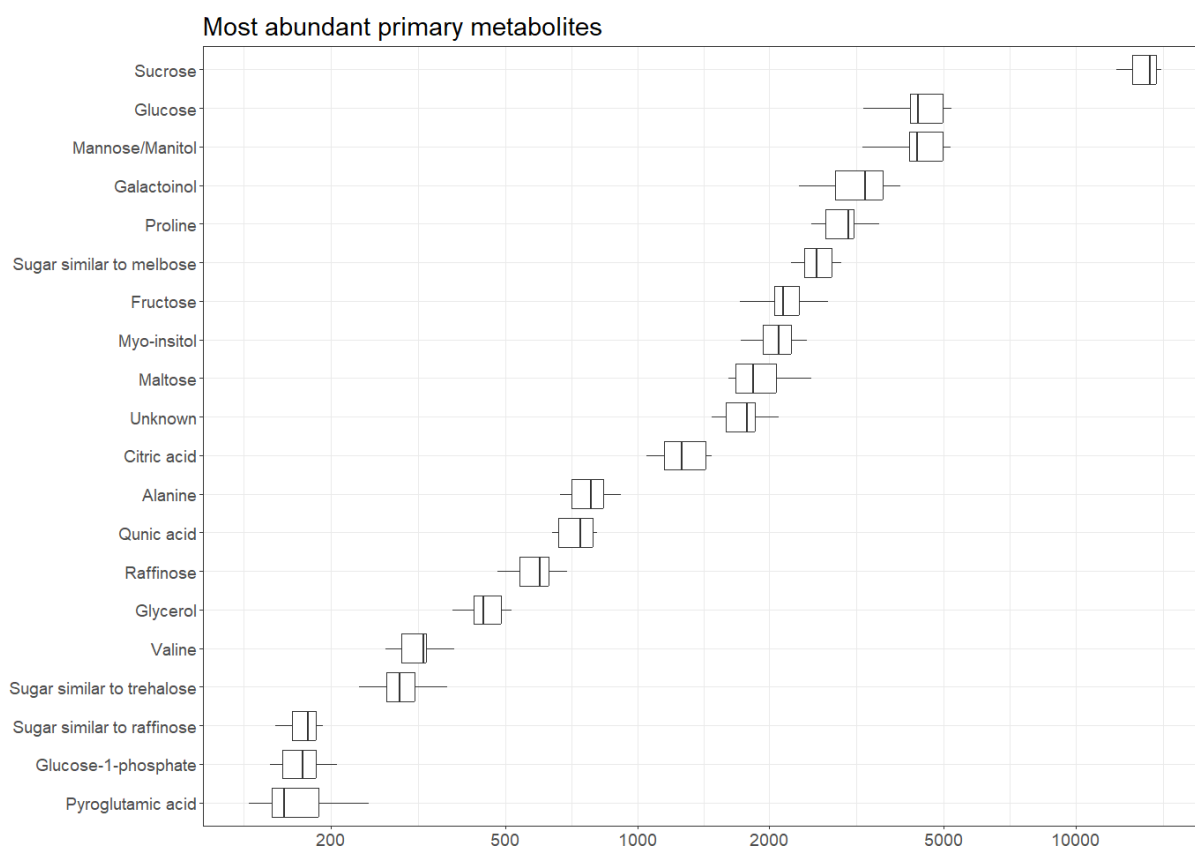
### • Анализ на първични метаболити

Първичните метаболити в растенията са есенциални за техния растеж и развитие, но нямат връзка с биологичната им активност. Изследването на първичния метаболом е включено в настоящото изследване поради връзката му с вторични биохимични пътища, които ще дадат възможност за по-задълбочено разбиране на метаболизма на растението. Допълнително беше извършен липидомичен анализ, който допълва наличните знания за активността на някои представители на този клас съединения (Hussein et al., 2017).

GC-MS анализът идентифицира 83 съединения, класифицирани като аминокиселини, органични киселини, захари и захарни алкохоли. Захарозата се откроява като най-разпространеният метаболит, следвана от различни захари и захарни алкохоли като глюкоза, маноза, фруктоза, малтоза, галактоинол, мио-инозитол и глицерол (фиг. 1). Освен това се откриват значителни количества лимонена и хининова киселина. Пролинът показва най-високи нива сред аминокиселините, следван от аланин. Относително високи количества валин и пироглутаминова киселина също се откриват в пробите. Като цяло, анализът на полярната фракция показва висока концентрация на захари и захарни алкохоли.

Липидите са основни растителни метаболити и по тази причина беше проведено и липидомично изследване на неполярната фракция. Идентифицирани бяха общо 163 липидни съединения, разпределени в 10 класа:

диацилглицероли, дигалактозилдиацилглицероли, лизофосфолипиди, лизомоногалактозилдиацилглицероли, лизодигалактозилдиацилглицероли, моногалактозилдиацилглицероли, фосфатидилхолин, фосфолипиди, сфинголипиди и триацилглицероли (фиг. 2). За по-добра визуализация на разпределението на липидните видове количеството им се представя като процент от общото съдържание на липиди за всяка липидна група. Резултатите показват, че триацилглицеролите са най-разпространената липидна група.



**Фигура 1.** Първични метаболити в *M. frivaldszkyana*, подредени според относителното им количество (RA) (x-ос). Представените данни са от шест повторения, измерени чрез GC-MS. Черните линии в рамките на кутиите показват медианите, а линиите показват горните и долните кватили.



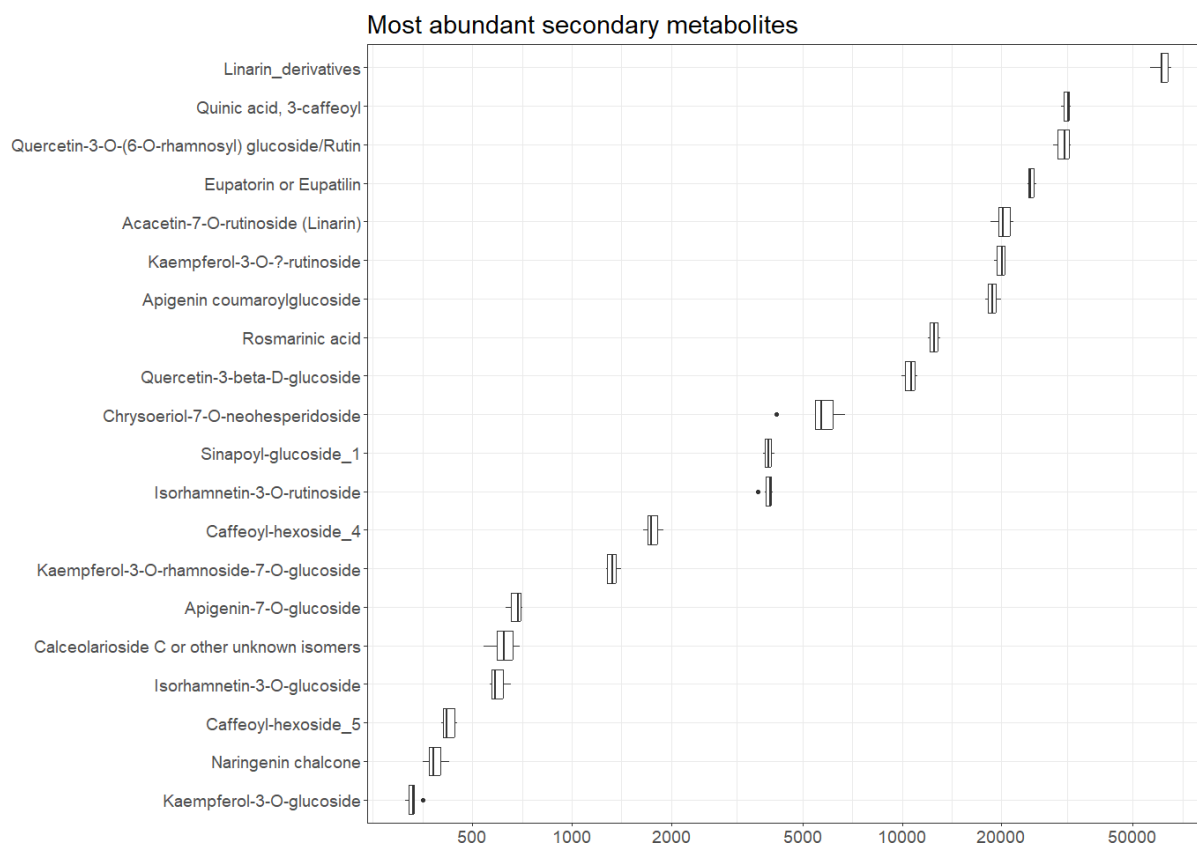
**Фигура 2.** Съдържание на липиди в *M. frivaldszkyana*. Лизофосфолипиди, лизо-моногалактозилдиацилглицероли, лизодигалактозилглицероли, фосфолипиди, фосфатидилхолин и фосфатидилетаноламин са представени като „Други“, тъй като представляват по-малко от 1% от общото количество липиди.

- **Анализ на вторични метаболити**

Растенията синтезират голямо разнообразие от вторични метаболити, сред които има съединения с потенциална биологична активност ([Guerriero et al., 2018](#)). Основните групи вторични метаболити са подложени на анализ с цел идентифициране на съединенията, които определят терапевтичните характеристики на *M. frivaldszkyana*.

UPLC-MS-MS анализът на проби от метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* доведе до откриването на 192 съединения. Броят на идентифицираните съединения е 123, докато 69 остават неизвестни. Вторичните метаболити с най-високи концентрации са флавоноиди, предимно флавоноидни гликозиди. Най-високи нива сред пробите се регистрират за линарин и неговите деривати, хининова киселина,

кверцетин-3-О-рутинозид, кемпферол-3-О-рутинозид, нарингенин и апигенин. Розмариновата киселина е сред най-значимите открити вещества, поради което е избрана като референтно съединение в експерименталния дизайн (фиг. 3).



**Фигура 3.** Вторични метаболити в *M. Frivaldszkyana*, измерени чрез UPLC-MS-MS и подредени спрямо тяхното относително количество (n=6). Черните линии в кутиите показват медианите, страничните линии извън кутиите бележат високи и ниски квартали, а черните точки показват отклоненията.

Наблюдаваните резултати се различават от докладваните за други видове от същия род. В пробите от *M. frivaldszkyana* се наблюдава значително по-високо съдържание на  $\text{Ca}^{2+}$  (13 223 mg/kg) и  $\text{Na}^{+}$  109 mg/kg), вероятно под влияние на специфичните природни условия в местообитанието на вида. Съдържанието на други елементи (K, Zn, Mn)

също се отличава с по-високи нива в сравнение с *M. croatica* и *M. pseudocroatica* (Kremer et al., 2012).

Резултатите от извършеното метаболомно изследване потвърждават значителна част от наличните публикувани данни по отношение на съдържанието на захари и органични вещества (фиг. 1) (Mladenova et al., 2021), но дават допълнителна информация за полифенолното съдържание на метаноловия екстракт от растението.

Линарин или акацетин 7-О-рутинозид и негови деривати са сред вторичните метаболити в най-голямо количество, заедно с розмариновата киселина и други флавоноидни гликозиди (фиг. 3). Флавоноидите и техните гликозиди са описани в литературата като съединения с различни биологични функции и ниска токсичност (Yang et al., 2018).

Sarikurkcu и колеги (2020) установяват, че основни феноли във водния и метанолов екстракт на растението *M. myrtifolia* са: розмаринова, хлорогенова, кафеена киселина. В етилацетатния екстракт същите учени докладват розмаринова киселина и апигенин като главни съединения (Sarikurkcu et al., 2020).

Al-Hamwi et al. също откриват наличието на хлорогенова киселина в етанолов екстракт на *M. barbata* (Al-Hamwi et al., 2015).

В проучване на качествения състав на видове от *Micromeria*, Nikolova и сътрудници (2017) съобщават, че основни компоненти на ацетоновия екстракт на *M. cristata* и *M. juliana* са апигенин, лутеолин и техни производни, докато хлорогенова киселина се отчита в метаноловите екстракти на *M. dalmatica* и *M. frivaldszkyana* (Nikolova et al., 2017).

Метанолов екстракт от *M. fruticosa* е изследван от Abu-Gharbieh et al. (2016), които откриват високо съдържание на фенолни киселини и флавоноиди, сред които кверцетин-3-О-рутинозид и розмаринова киселина са в най-голям процент, последвани от рутин, кемпферол-3-О-рутинозид и апигенин (Abu-Gharbieh et al., 2016).

Vladimir-Knežević и сътрудници (2011) определят и сравняват полифенолното съдържание на видовете *M. croatica*, *M. juliana*, *M. thymifolia*. Данните, които получават за етаноловите екстракти от растенията, корелират с нашите резултати. Сред флавоноидите се откриват производни на акацетин, апигенин и лутеолин. Сред фенолните киселини преобладават розмаринова и хлорогенова киселина, с превес на розмариновата киселина (Vladimir-Knežević et al., 2011).

При идентификацията на полифенолни съединения в етанолов екстракт от *M. graeca* също са докладвани розмаринова, кафеена, хлорогенова и галова киселина, сред които водеща е РК. По отношение на флавоноидното съдържание, основните доказани съединения са апигенин, апигенин-7-гликозид и диосмин (Brahmi et al., 2017).

## 2. Лабораторни тестове

### 2.1. Остра токсичност

Не бяха регистрирани токсични ефекти след еднократно перорално приложение на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* в дози 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000 и 5000 mg/kg т.м. На базата на тези резултати, определихме дозите за по-нататъшно изследване на ефектите на екстракта: 250 и 500 mg/kg. Според Hanafy и сътрудници (2016), подходящите дози за изследване на фармакологични ефекти на екстракти от натурален произход са 1/10 и 1/20 от определената LD<sub>50</sub> (5000 mg/kg т.м. в случая) (Hanafy et al., 2016). Добавихме средната доза 400 mg/kg с цел придобиване на подробна информация за потенциалния ефект на екстракта.

Доколкото е известно на автора, това е първото изследване на токсичност на екстракт от *M. frivaldszkyana in vivo*. Резултатите показват липса на токсичност след перорално приложение на метанолов екстракт от растението на мъжки плъхове Wistar. Допълнителни експерименти са необходими, за да се екстраполират тези резултати върху други биологични видове.

### 2.2. Изследване на аналгетичен ефект

#### 2.2.1. Тест с механичен натиск на лапата (аналгезиметър)

Не се отчита антиноцицептивен ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* в трите изследвани дози (250 mg/kg; 400 mg/kg; 500 mg/kg т.м.) след 14-дневно приложение при тест с механичен натиск на лапата при плъхове

#### 2.2.2. Тест гореща плоча

Както се вижда от таблица 1, екстрактът от растението не показва аналгетично действие след 14-дневно приложение при тест с термичен болков стимул.

**Таблица 1.** Антиноцицептивен ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* при тест гореща плоча при плъхове

час	<i>H0</i>	<i>H1</i>	<i>H2</i>	<i>H3</i>
<i>групи</i>				
<b>контрола</b>	6.45 ± 0.51	8.14 ± 0.68	7.14 ± 0.54 ⌘⌘⌘	6.75 ± 0.47 ⌘⌘⌘
<b>метамизол 150 mg/kg</b>	9.44 ± 1.18	10.48 ± 0.35	10.64 ± 0.54	10.21 ± 0.36
<b>м. екстракт 250 mg/kg</b>	7.88 ± 0.88	9.19 ± 1.35	8.11 ± 0.73 ⌘	7.59 ± 0.45 ⌘⌘⌘
<b>м. екстракт 400 mg/kg</b>	9.08 ± 0.47	8.64 ± 0.76	7.85 ± 0.35 ⌘	7.74 ± 0.49 ⌘⌘
<b>м. екстракт 500 mg/kg</b>	7.95 ± 0.48	7.01 ± 0.41 ⌘	6.97 ± 0.65 ⌘⌘⌘	6.54 ± 0.49 ⌘⌘⌘
<b>розмаринова киселина 30 mg/kg</b>	6.49 ± 0.43	7.10 ± 0.67 ⌘	7.50 ± 0.57 ⌘⌘	6.53 ± 0.21 ⌘⌘⌘

*Забележка:* Представени са средните стойности за групата ± SEM.

⌘ p<0.05 спрямо метамизол; ⌘⌘ p<0.01 спрямо метамизол;

⌘⌘⌘ p<0.001 спрямо метамизол

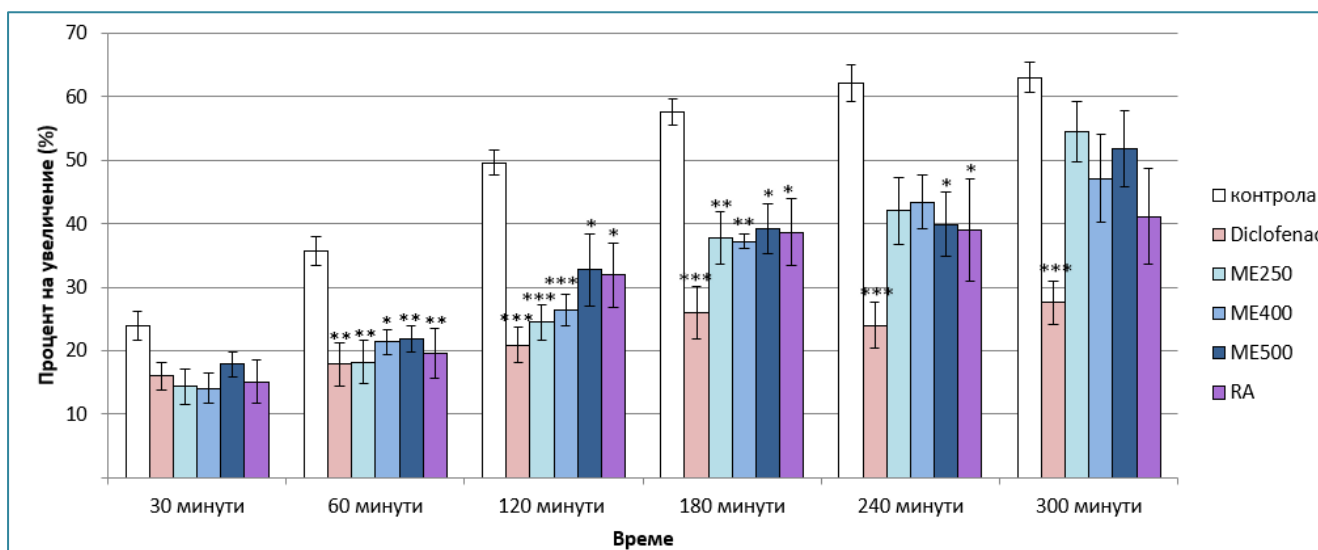
В научната литература не бяха открити данни за аналгетично действие на видовете от род *Micromeria*. Розмариновата киселина, която се намира в голямо количество в метаноловия екстракт на *M. frivaldszkyana*, проявява антиноцицептивно действие след перорално приложение на мишки при абдоминален констрикторен тест с оцетна киселина, тест гореща плоча и формалинов тест (Lucarini et al., 2013; Boonyarikpunchai et al., 2014). Rahbardar G и сътрудници (2017) установяват подобряване на симптомите на невропатична болка, предизвикана от лигатура на *n. ischiadicus* след 14-дневно третиране на плъхове. Регистрирани са и понижени нива на редица проинфламаторни цитокини (NO, IL-1β, PGE-2, COX-2, и матриксни металопротеинази 2) при животните, третирани с розмаринова киселина (Rahbardar et al., 2017).

Нашите резултати (таб. 2 и 3) демонстрират липса на аналгетично действие при тест гореща плоча и аналгезиметър, което вероятно се дължи предимно на въздействието на екстракта върху възпалителните процеси (Lucarini et al., 2013; Rahbardar et al., 2017). Получените данни се подкрепят

от изследването на Criscensia et al. (2023), където проучваният еупаторин не демонстрира аналгетичен ефект при тест гореща плоча и тест „tail-flick“ (Criscensia et al., 2023). Смята се, че подобно на изследвания еупаторин, който се съдържа в голямо количество в *M. frivaldszkyana*, механизмът е периферен, а не централен (Gupta et al., 2005). Възможно е периферната аналгетична активност на еупаторин, както на метаноловия екстракт от *M. frivaldszkyana*, да е резултат от повлияване на болка от възпалителен произход (Chai et al., 2014).

### 2.3. Изследване на противовъзпалителен ефект при модел на възпаление на задна лапа на гризач

Индуцираният от карагенан оток на задна лапа на плъхове е модел на възпаление, широко използван в изучаването на нови противовъзпалителни агенти. Този модел беше избран в дисертационния труд поради възможността, която предоставя за оценка на специфичната фаза на възпаление, в която екстрактът е активен. В зависимост от регистрираната активност в дадена фаза може да се прогнозира възможните таргетни молекули, с които е свързана тази активност.



**Фигура 4.** Ефекти на метанолов екстракт от *Micromeria frivaldszkyana* при оток на задна лапа индуциран от карагенан при плъхове.

*Забележка:* \* $p < 0.05$  в сравнение с контролата в същия час; \*\* $p < 0.01$  в сравнение с контролата в същия час; \*\*\* $p < 0.001$  в сравнение с контролата в същия час.

Според фигура 4, не се регистрират статистически значими разлики в обема на лапата 30 min след приложението на карагенан. Стандартното

противовъзпалително лекарство диклофенак сигнификантно намалява отока на задната лапа във следните времеви точки: 60, 120, 180, 240, 300 минута на експеримента спрямо контролната група ( $17.87 \pm 3.38$  vs.  $35.72 \pm 2.28$ ,  $p < 0.01$ ;  $20.87 \pm 2.78$  vs.  $49.61 \pm 1.96$ ,  $p < 0.001$ ;  $25.89 \pm 4.15$  vs.  $57.57 \pm 2.08$ ,  $p < 0.001$ ;  $23.99 \pm 3.56$  vs.  $62.12 \pm 2.88$ ,  $p < 0.001$ ;  $27.57 \pm 3.43$  vs.  $63.04 \pm 2.33$ ,  $p < 0.001$ ), като тази тенденция се установява още на 30<sup>-та</sup> минута от въвеждането ( $15.98 \pm 2.20$  vs.  $23.85 \pm 2.28$ ).

На първия час от изследването се наблюдава значимо понижение на стойностите на метаноловия екстракт от *M. frivaldszkyana* във всички изследвани дози - 250 mg/kg, 400 mg/kg, 500 mg/kg в сравнение с контролната група ( $18.21 \pm 3.38$  vs.  $35.72 \pm 2.28$ ,  $p < 0.01$ ;  $21.33 \pm 1.89$  vs.  $35.72 \pm 2.28$ ,  $p < 0.05$ ;  $21.85 \pm 1.99$  vs.  $35.72 \pm 2.28$ ,  $p < 0.01$ ).

Същата тенденция се отчита и на втория час от експеримента при групи ME250, ME400 и ME500 спрямо контролата ( $24.46 \pm 2.84$  vs.  $49.61 \pm 1.96$ ,  $p < 0.001$ ;  $26.42 \pm 2.45$  vs.  $49.61 \pm 1.96$ ,  $p < 0.001$ ;  $32.70 \pm 5.66$  vs.  $49.61 \pm 1.96$ ,  $p < 0.05$ ).

Тенденцията се запазва и на третия час при плъховете, третирани в дози 250 mg/kg, 400 mg/kg, 500 mg/kg спрямо контролната група ( $37.83 \pm 4.12$  vs.  $57.58 \pm 2.08$ ,  $p < 0.01$ ;  $37.24 \pm 1.20$  vs.  $57.58 \pm 2.08$ ,  $p < 0.01$ ;  $39.25 \pm 3.96$  vs.  $57.58 \pm 2.08$ ,  $p < 0.05$ ).

Ефектът е наличен също на 4<sup>-ти</sup> час, но статистическа значимост се отчита само за най-високата изследвана доза - 500 mg/kg в сравнение с контролата ( $39.88 \pm 5.12$  vs.  $62.12 \pm 2.88$ ,  $p < 0.05$ ).

Подобни резултати се наблюдават при розмариновата киселина, която проявява значима противовъзпалителна активност в същите времеви точки – 1<sup>-ви</sup>, 2<sup>-ри</sup>, 3<sup>-ти</sup>, 4<sup>-ти</sup> час след инжектиране в сравнение с контролната група плъхове ( $19.54 \pm 3.97$  vs.  $35.72 \pm 2.28$ ,  $p < 0.01$ ;  $31.88 \pm 5.01$  vs.  $49.61 \pm 1.97$ ,  $p < 0.05$ ;  $38.66 \pm 5.21$  vs.  $57.58 \pm 2.09$ ,  $p < 0.05$ ;  $39.05 \pm 8.08$  vs.  $62.12 \pm 2.88$ ,  $p < 0.05$ ).

Възпалителният отговор към карагенан се състои от две фази. По време на първата фаза (първият час след инжектиране), наблюдаваното възпаление се свързва с повишена продукция на хистамин, серотонин и брадикинин. Втората фаза се определя от продукцията на свободни радикали, проинфламаторни цитокини, синтез на азотен оксид, неутрофилна инфилтрация, циклооксигеназа 2 (COX-2) активация и следователно продукция на простагландини (Halici et al., 2007; Zhang et al., 2020).

Нашите резултати показват, че метаноловият екстракт от *M. frivaldszkyana*, приложен перорално за 14 дни, намалява отока на задна лапа по време на ранната фаза на възпаление (първи до трети час след

инжектиране на карагенан) (фиг. 4). Този резултат може да бъде свързан с намалена продукция на свободни радикали, намалени нива на про-инфламаторни цитокини, азотен оксид и намалена COX-2 активност. Регистрираната противовъзпалителна активност може да е свързана с антиоксидантните характеристики на екстракта (Nikolova et al., 2017).

Противовъзпалителна активност е съобщена за голяма част от съединенията, регистрирани във висок процент в метаноловия екстракт.

Противовъзпалителни свойства (намалена COX-2 активност и продукция на азотен оксид) са доказани за линарин *in vitro* (Tian et al., 2020; Mottaghipisheh et al., 2021), докато *in vivo* експерименти показват намалени нива на TNF- $\alpha$  в серума на LPS-индуциран експериментален модел (Ye et al., 2022). Нашият експеримент не включва линарин като стандарт поради слабата му резорбция след перорален прием (0.47% бионаличност) (Li et al., 2019).

Вторият метаболит, който е в най-високи нива в екстракта, е 3-О-кафеоилхинова (хлорогенова киселина), която е известна със своята противовъзпалителна активност. *In vitro* експерименти показват намалена продукция на азотен оксид и проинфламаторни цитокини (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) при модел на липополизахарид-предизвикано възпаление при гризачи (Hwang et al., 2014). Пероралният прием на съединението активира свързан с ядрото еритроид фактор-2 (Nrf2) пътя и потиска възпалението при плъхове, третирани с тиаоацетамид (Hussein et al., 2021; Magaña et al., 2021). Хлорогеновата киселина също взаимодейства с Nf- $\kappa$ B пътя и индуцира промени в нивата на провъзпалителни и противовъзпалителни цитокини (Chen et al., 2018; Murai et al., 2023).

Противовъзпалителна активност е докладвана и за рутин и негови гликозиди *in vitro* (Choi et al., 2021). Вероятните механизми включват намалени нива на IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  и инхибиране на ядрен фактор- $\kappa$ B/митоген-активирани протеин кинази (Nf- $\kappa$ B/MAPK) пътя (Muvhulawa et al., 2022). В допълнение, това съединение намалява отока в същия модел на възпаление на задна лапа при плъхове (Selloum et al., 2003).

Еупаторин също притежава противовъзпалителен ефект, установен при карагенан-индуциран оток на задна лапа на гризачи и модел на възпаление на ухо, предизвикан от 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат. Възможният механизъм е свързан със понижен синтез на TNF- $\alpha$  и COX-2 (Laavola et al., 2012; Gonzalez-Cortazar et al., 2022; Chriscensia et al., 2023).

В научната литература се срещат изследвания на противовъзпалителната активност на кемпферол-3-О-рутинозид и апигенин – съединения, които също присъстват във високи нива в метаноловия екстракт от

*M. frivaldszkyana*. Тяхната активност *in vitro* и *in vivo* е описана в голям брой обзорни статии, част от които също включват резултати от клинични изпитвания (Ali et al., 2017; Ginwala et al., 2019; Alam et al., 2020; Yoon et al., 2023).

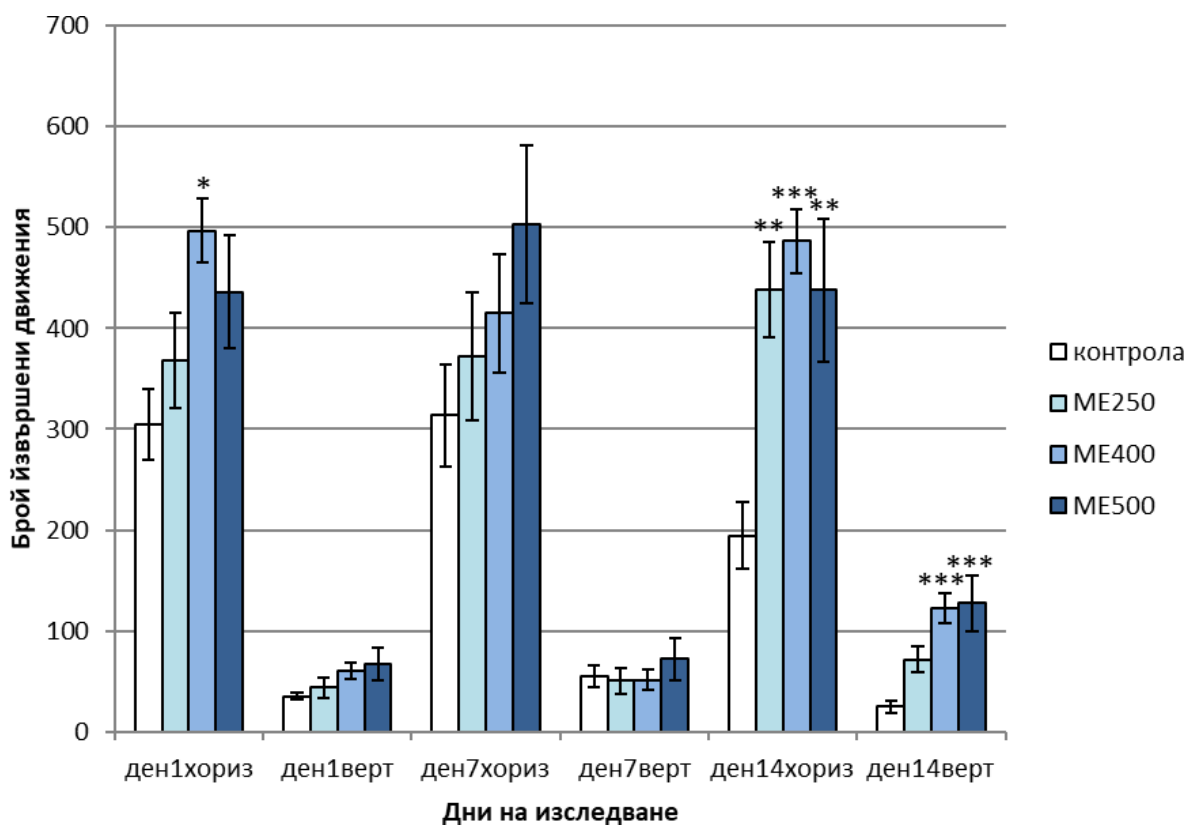
Съединението с най-добре известна противовъзпалителна активност, което се намира в голямо количество в екстракта, е РК. Установено е значително понижаване на отока на задна лапа на мишки, предизвикан от инжектиране на карагенан (Boonyarikpunchai et al., 2014). Сходни резултати са получени и от други автори при този модел на възпаление при плъхове. Освен повлияване на отока, те докладват и понижени нива на провъзпалителните цитокини IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  в серум на гризачи, третирани с РК (Usha et al., 2014). *In vitro* изследвания също показват понижени нива на проинфламаторните цитокини TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 (Yoo et al., 2016). Други възпалителни заболявания, при които е установен противовъзпалителен ефект на РК са артрит, индуциран с адювант на Фройнд и колаген (Youn et al., 2003; Gautam R et al., 2019), колит (Zhao et al., 2018), пародонтит (Zdarilova et al., 2009; Luo C et al., 2020).

Може да се заключи, че регистрираната противовъзпалителна активност на екстракта вероятно е резултат от високото съдържание на флавоноиди, за които са докладвани такива характеристики (хлорогенова киселина, рутин, еупаторин, кемпферол-3-О-рутинозид, апигенин, розмаринова киселина и др.)

## **2.4. Методи за изследване на влияние върху когнитивните функции**

### **2.4.1. Activity cage**

Резултатите от изследването на двигателната активност при групите, третирани с екстракт от *M. frivaldszkyana* (фиг. 5) показват тенденция за повишаване спрямо контролната група. Групата, третирана с метанолов екстракт в доза 250 mg/kg т.м. показва сигнификантно повишение в хоризонталните движения на 1<sup>-ви</sup> ден от изследването ( $368.1 \pm 47.02$  vs.  $304.7 \pm 35.0$ ,  $p=0.02$ ). Тази тенденция се отчита и при хоризонталните движения на 14-ти ден при групите, третирани съответно с метанолов екстракт 250, 400 и 500 mg/kg спрямо контролната група ( $438.3 \pm 47.85$  vs.  $194.7 \pm 33.17$ ,  $p=0.006$ ;  $486.8 \pm 31.65$  vs.  $194.7 \pm 33.17$ ,  $p=0.001$ ;  $437.7 \pm 70.85$  vs.  $194.7 \pm 33.17$ ,  $p=0.006$ ). Наблюдава се и значително повишение във вертикалната активност при групите, третирани с метанолов екстракт 400 mg/kg и 500 mg/kg на 14<sup>-ти</sup> ден ( $122.6 \pm 14.47$  vs.  $24.9 \pm 6.18$ ,  $p=0.001$ ;  $127.6 \pm 27.58$  vs.  $24.9 \pm 6.18$ ,  $p=0.001$ ).



**Фигура 5.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху броя на хоризонтални и вертикални движения при плъхове, изследвани с апарат Activity cage

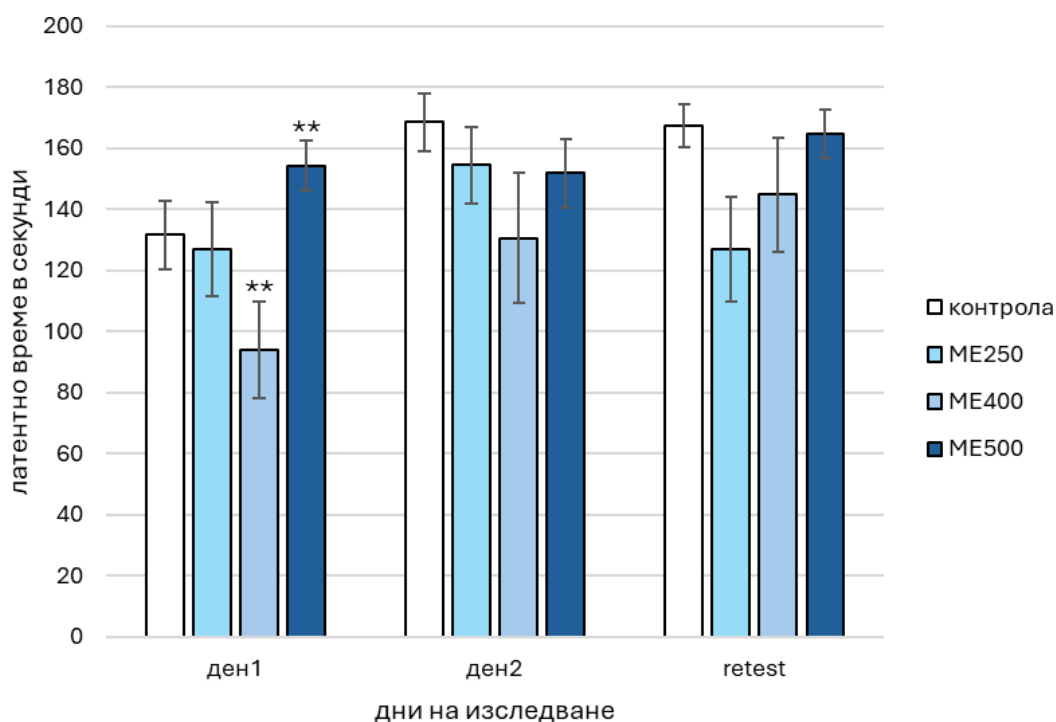
Забележка: \* $p < 0.05$  в сравнение с контролата; \*\* $p < 0.01$  в сравнение с контролата; \*\*\* $p < 0.001$  в сравнение с контролата.

#### 2.4.2. Метод на активно обучение - Two-way active avoidance test (Тест за активно двупосочно избягване с наказателно подкрепление)

Изследването на ефектите на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* в три дози (250 mg/kg, 400 mg/kg и 500 mg/kg т.м.) върху броя условни, безусловни отговори, междутренировъчните преминавания и латентното време при плъхове, изследвани с апарат Shuttle box не показва статистически значима разлика между отделните групи и контролата.

#### 2.4.3. Step-through passive avoidance test (Тест за пасивно избягване с наказателно подкрепление)

Изследването на пасивно обучение (фиг. 6) показва скъсяване на латентното време при групата, третирана с метанолов екстракт в доза 400 mg/kg ( $93.96 \pm 15.82$  vs.  $131.62 \pm 11.12$ ,  $p = 0.01$  спрямо контролата и удължаване при 500 mg/kg ( $154.32 \pm 8.14$  vs.  $131.62 \pm 11.12$ ,  $p = 0.01$  през първия ден на обучителната сесия).



**Фигура 6.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху латентното време в секунди при плъхове, изследвани с апарат Step-through

Забележка: \*\*  $p=0.01$  в сравнение с контролата

#### 2.4.4. Step-down passive avoidance test (Тест за пасивно избягване с наказателно подкрепление)

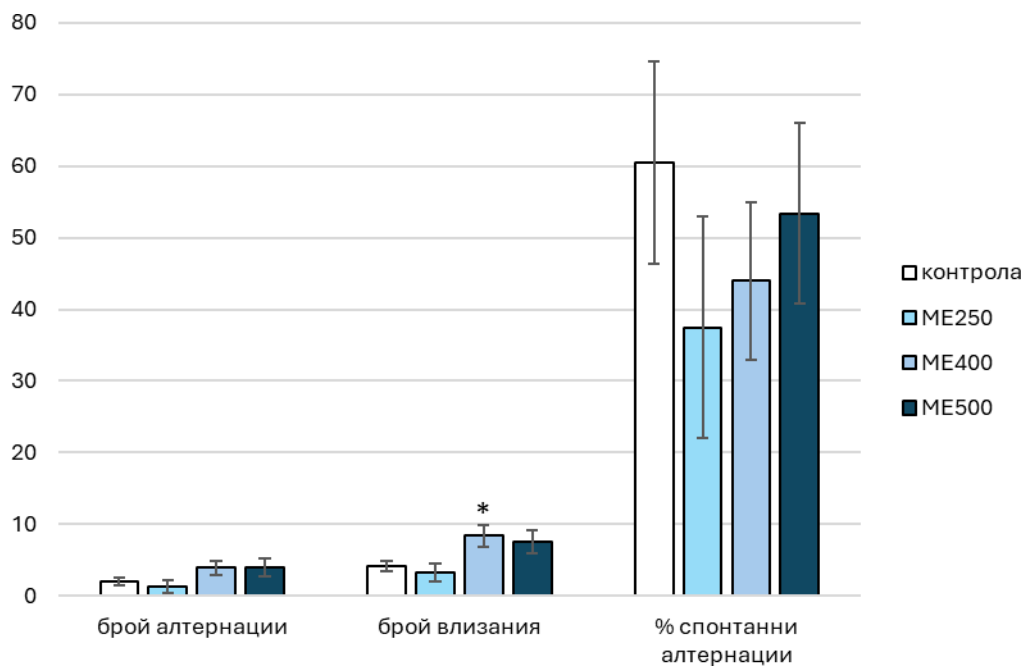
Изследването с апарат Step-down (табл. 2) не показва статистически значима разлика в латентното време на третираните групи спрямо контролата.

**Таблица 2.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху латентното време в секунди при плъхове, изследвани с апарат Step-down

групи	ден	1	2	Retest
контрола		17.96±3.31	25.77±5.76	40.57±4.91
м. екстракт 250 mg/kg		23.12±3.81	36.73±6.71	46.64±3.81
м. екстракт 400 mg/kg		23.42±3.99	38.71±5.26	43.28±4.69
м. екстракт 500 mg/kg		24.61±5.41	41.63±4.74	53.32±3.10

Забележка: Представени са средните стойности за групата ± SEM.

### 2.4.5. Y-maze



**Фигура 7.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* при постановка Y-maze

Забележка: \*  $p < 0.05$  в сравнение с контролата.

Резултатите от експеримента за пространствена памет (фиг. 7) показват значително по-голям брой влизания при групата, третирана с метанолов екстракт в доза 400 mg/kg спрямо контролната група ( $8.4 \pm 1.52$  vs.  $2.00 \pm 0.61$ ,  $p=0.046$ ). Този резултат вероятно се дължи на повишената двигателна активност на животните, третирани с екстракт от *M. frivaldszkyana*. Едновременно с това не се наблюдават значими разлики в броя алтернации, което подкрепя тезата за стимулиращото действие на екстракта върху моторните функции на животните. Повишена двигателна активност се отчита и с теста Activity cage (т. 2.4.1.).

### 2.4.6. Кръстосан лабиринт (X-maze)

Наблюдава се тенденция на увеличаване на съотношението брой влизания в откритите рамена към общия брой влизания при групите, третирани с трите дози екстракт. Тази тенденция е дозозависима, но статистически значима разлика спрямо контролата се отчита само при групата, третирана с метанолов екстракт 500 mg/kg ( $0.63 \pm 0.08$  спрямо  $0.32 \pm 0.06$ ;  $p=0.032$ ) (табл. 3). Резултатите показват потенциално анксиолитично действие на екстракта след 14-дневно приложение при плъхове.

**Таблица 3.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* при постановка X-maze

<i>групи</i>	<i>секунди престой на открито</i>	<i>секунди престой на закрито</i>	<i>брой влизания в открити рамена</i>	<i>общ брой влизания</i>	<i>съотношение брой влизания в откритите рамена към общия брой влизания</i>
<i>контрола</i>	142.0± 30.16	158.0± 30.16	1.7± 0.52	3.9± 0.98	0.32± 0.06
<i>м. екстракт 250 mg/kg</i>	106.7± 23.07	193.3± 23.07	2.0± 0.54	4.7± 1.17	0.41± 0.07
<i>м. екстракт 400 mg/kg</i>	104.7± 25.89	195.3± 25.89	2.7± 0.47	5.9± 1.06	0.45± 0.07
<i>м. екстракт 500 mg/kg</i>	67.30± 22.67	232.7± 22.67	3.3± 0.86	6.4± 1.72	0.63± 0.08 *

*Забележка:* Представени са средните стойности за групата ± SEM. \* p<0.05

#### 2.4.7. Оpozнателен тест

Изследването не показва статистически значима разлика в дискриминационните индекси на контролата и експерименталните групи (табл. 4).

**Таблица 4.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* при опознателен тест

<i>групи</i>	<i>секунди за изучаване на нов обект</i>	<i>Дискриминационен индекс</i>
<i>контрола</i>	3.40 ± 0.62	0.55±0.08
<i>м. екстракт 250 mg/kg</i>	11.3±4.29	0.58±0.08
<i>м. екстракт 400 mg/kg</i>	18.3±7.78	0.56±0.07
<i>м. екстракт 500 mg/kg</i>	16.7±4.06	0.73±0.06

*Забележка:* Представени са средните стойности за групата ± SEM.

В научната литература не бяха открити данни за въздействието на видове от род *Micromeria* върху когницията.

Линарин, който е основният вторичен метаболит в екстракта, показва инхибираща активност спрямо ензима АСhЕ. Инхибирането на АСhЕ се смята за обещаваща стратегия в лечението на заболявания, характеризирани се с ниски нива на ензима като: глаукома, миастения гравис и болест на Алцхаймер (Feng et al., 2015).

Mirza FJ и сътрудници (2021) изследват влиянието на РК върху когнитивен дефицит при амилоид  $\beta_{1-42}$  експериментален модел на Алцхаймер при гризачи. Болестта на Алцхаймер е невродегеративно заболяване, което се характеризира с акумулация на амилоид  $\beta$  плаки и неврофибриларни възли. Амилоид  $\beta_{1-42}$  индуцира невротоксичност чрез повишаване на вътреклетъчните калциеви нива, оксидативен стрес и разрушителни ефекти върху синаптичното предаване. Поведението на изучаване и тревожността са оценени с помощта на постановка повдигнат кръстосан лабиринт, който показва антидепресантен и анксиолитичен ефект на РК чрез увеличаване на времето, прекарано в откритите рамена. Смята се, че РК проявява своя невропротективен ефект чрез намаляване на невроналната увреда, дължаща се на оксидативен стрес (Mirza et al., 2021).

Hasanein и Mahtaj (2015) изследват подобряващия ефект на РК върху индуцирано от скополамин нарушение на паметта. Холинергичният дефицит е свързан с когнитивна дисфункция и загуба на памет при животински модели на болест на Алцхаймер. Скополаминът, който е антихолинергично средство, също инхибира холинергичната активност и нарушава процесите на обучение и памет. Резултати при модел на пасивно избягване-step-through passive avoidance test показват, че приемът на РК има положителен ефект върху паметта и третирането понижава негативното влияние на скополамин. Известно е, че розмариновата киселина повишава нивата на ацетилхолин и намалява холинестеразната активност в мозъка на гризачи, което е възможен механизъм за подобряване на паметта. Тъй като оксидативния стрес има съществена роля в развитието на нарушения на паметта, демонстрираните ефекти може да се дължат на антиоксидантните и невропротективни характеристики на РК (Hasanein and Mahtaj, 2015).

Друг модел на нарушение на паметта, индуциран от липополизахарид (LPS), изследва влиянието на РК при тест Y-maze. Резултатите показват статистически значимо понижение на % спонтанни алтернации при групата, третирана с LPS, в сравнение с контролната група. Приложението на РК води до повишаване на % спонтанни алтернации, което показва протективния ефект на РК, който е възможно да се дължи на понижената активност на АСhЕ. Приемът на LPS генерира високи нива на оксидативен стрес, което се изразява с понижени нива на GSH и повишени нива на MDA. РК

възстановява понижените нива на GSH и повишените нива на MDA. Експозицията на LPS предизвиква повишени нива на IL-6 и TNF- $\alpha$ . Post-hoc Tukey анализ потвърждава понижението в стойностите на IL-6 и TNF- $\alpha$  при прием на РК спрямо LPS-третираната група (Thingore et al., 2021).

Тези данни корелират с получените от нас резултати при постановка step-through passive avoidance test, където на първия ден от обучителната сесия, се наблюдава значимо удължаване на латентното време при групите третирани с метанолов екстракт в дози 400 и 500 mg/kg (фиг. 6). Резултатите, които получаваме при лабиринт Y-maze за сигнификантно по-голям брой влизания при групата, третирана с 400 mg/kg метанолов екстракт (фиг. 7), също са в съответствие с установените в литературата данни. Статистически значимо повишаване в двигателната активност установихме и при теста Activity cage (фиг. 5). Вероятно наблюдаваните ефекти се дължат на антидепресантния потенциал на розмариновата киселина, но са необходими допълнителни изследвания в тази област за изясняване на потенциалния механизъм.

## 2.5. Изследване на хепатопротективно действие на екстракта

За улеснение при създаването на фигурите са използвани следните означения на експерименталните групи:

- 1 група – **контрола**: 0.1 ml/100 g т.м. физ. р-р  
без чернодробно увреждане
- 2 група – **ME500**: метанолов екстракт в доза 500 mg/kg т.м.  
без чернодробно увреждане
- 3 група – **P/t-BHP**: 0.1 ml/100 g т.м. физ. р-р  
+ Paracetamol/t-BHP
- 4 група – **ME250-P/ME250-t-BHP**: метанолов екстракт в доза 250 mg/kg т.м.  
+ Paracetamol/t-BHP
- 5 група – **ME400-P/ME400-t-BHP**: метанолов екстракт в доза 400 mg/kg т.м.  
+ Paracetamol/t-BHP
- 6 група – **ME500-P/ME500-t-BHP**: метанолов екстракт в доза 500 mg/kg т.м.  
+ Paracetamol/t-BHP
- 7 група – **RA-P/RA-t-BHP**: розмаринова киселина 100 mg/kg т.м.  
+ Paracetamol/t-BHP
- 8 група – **Sil-P/Sil-t-BHP**: силимарин 125 mg/kg т.м.  
+ Paracetamol/t-BHP

Парацетамолът, още известен като ацетаминофен, е широко използвано лекарствено средство с антипиретични и аналгетични характеристики. Приемът на високи дози парацетамол води до тежка хепатотоксичност при хора и експериментални животни (Brune et al., 2015). При метаболизиране, 60% от парацетамол се конвертира в глюкуронова киселина с помощта на ензима глюкуронил трансфераза. Тридесет и пет процента се подлагат на сулфониране и около 2% парацетамол се екскретира с урината непроменен. Останалото малко количество парацетамол се конвертира до N-ацетил-парабензохинонимин (NAPQI) от цитохром P-450 ензимите. NAPQI е реактивна електрофилна молекула, която се свързва ковалентно с цистеиновите части на вътреклетъчните протеини като образува 3-(цистеин-S-ил) хелати. Тези хелати причиняват тъканно увреждане. Когато е приет в терапевтични дози, NAPQI взаимодейства с глутатиона и се елиминира. Предозирането на парацетамол увеличава количеството на NAPQI и изчерпва депата на глутатион в черния дроб. Смята се, че тези метаболити се свързват със сулфхидрилните групи и глутатиона и образуват конюгати, които увеличават оксидативния стрес в черния дроб. Този потенциален механизъм очертава основния път на парацетамол-индуцираната хепатотоксичност (Bessems and Vermeulen, 2001).

В последните години се наблюдава популяризиране на употребата на натурални продукти за превенцията и лечението на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност при *in vivo* животински модели (Ahmad et al., 2019).

Терт-бутил хидропероксид (t-BHP) е органичен хидропероксид, който може да се метаболизира до t-бутоксил и метилов радикал. Получените свободни радикали могат да предизвикат липидно перокисление, изчерпване на глутатиона, повишена пропускливост на клетъчните мембрани и дезоксирибонуклеинова киселина (ДНК) увреждане. Редица изследователи използват t-BHP за оценка на антиоксидантната активност на различни съединения чрез проследяване на активността на AST, ALT и нивата на MDA, GSH, CAT (Oh et al., 2012; Zhu et al., 2022).

Сред референтните субстанции за антиоксидантно действие, която използвахме за проследяване на хепатопротективното действие, е силимарин. Силимаринът е флавоноид, който се съдържа в растението *Silybum marianum*. Съществуват данни, че силимарин проявява също сигнификантна невропротективна активност, която вероятно се дължи на способността му да инхибира оксидативен стрес, апоптоза и възпаление (Onaolapo et al., 2016).

## 2.5.1. Промени в серумните нива на биомаркери при хепатотоксичност, индуцирана от парацетамол

### 2.5.1.1. Общ и директен билирубин

**Таблица 5.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху серумните нива на общ и директен билирубин при модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност

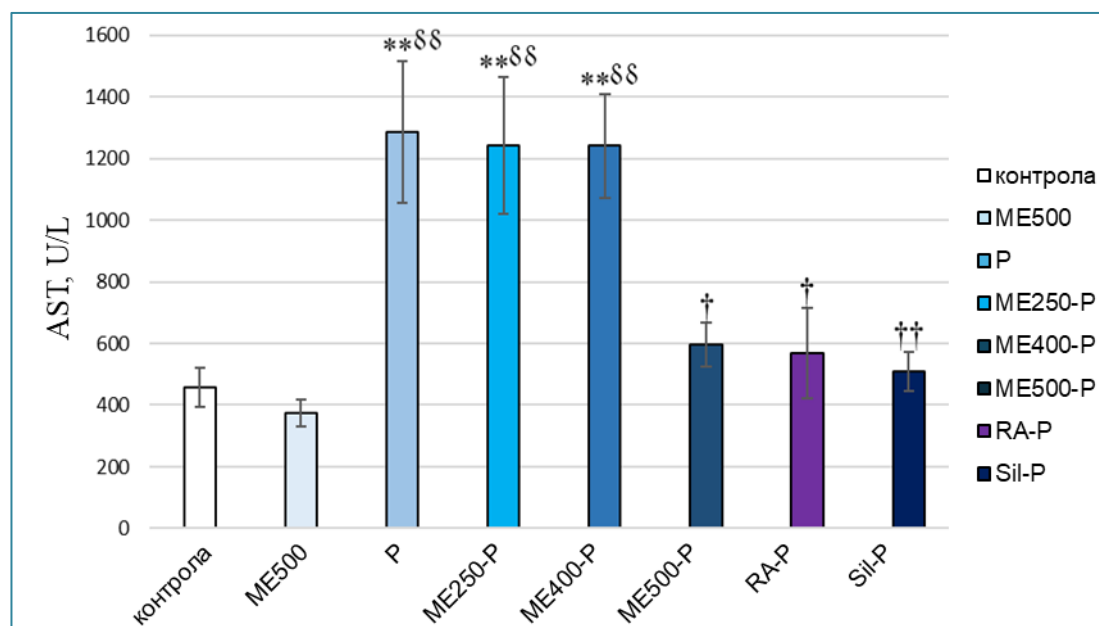
групи	общ билирубин	директен билирубин
контрола <i>0.1 ml/100 g т.м. физиологичен разтвор</i>	6.54±1.27	1.33±0.63
<i>м. екстракт 500 mg/kg без чернодробно увреждане</i>	4.57±0.83	0.41±0.91
<i>0.1 ml/100 g т.м. физ. разтвор + парацетамол</i>	6.12±0.57	1.70±0.53
<i>м. екстракт 250 mg/kg + парацетамол</i>	5.47±0.33	1.77±0.48
<i>м.екстракт 400 mg/kg + парацетамол</i>	6.58±0.58	2.81±1.21
<i>м.екстракт 500 mg/kg + парацетамол</i>	5.97±0.37	1.94±0.63
<i>розмаринова киселина 100 mg/kg т.м + парацетамол</i>	8.08±0.21 §§	2.22±0.40
<i>силимарин 125 mg/kg т.м. + парацетамол</i>	8.25±0.72 §§	2.22±0.59

Забележка: Представени са средните стойности за групата ± SEM.

§§  $p < 0.01$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg;

Резултатите от изследването (табл. 5) показват статистически значимо повишение в нивата на общия билирубин при групата, третирана с розмаринова киселина ( $p=0.009$ ) и групата, третирана със силимарин ( $p=0.005$ ) спрямо групата, третирана с метанолов екстракт в доза 500 mg/kg без чернодробно увреждане. Не се отчита статистически значимо отклонение в нивата на директния билирубин.

### 2.5.1.2. AST



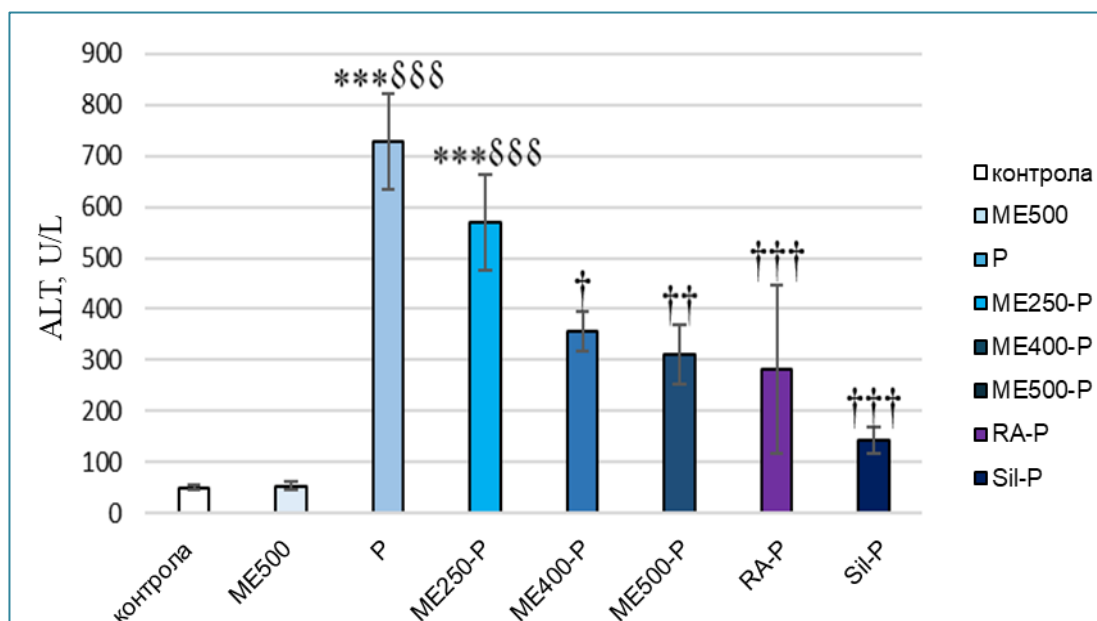
**Фигура 8.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху серумните нива на аспартат аминотрансфераза при модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност

Забележка: \*\*  $p < 0.01$  спрямо контролата;  $\delta\delta$   $p < 0.01$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg; †  $p < 0.05$  спрямо парацетамол; ††  $p < 0.01$  спрямо парацетамол

Според проведеня анализ (фиг. 8) се открива значимо повишение в нивата на AST в серума на плъховете от групи P, ME250-P и ME400-P в сравнение с плъховете без чернодробно увреждане, третирани с физ. разтвор ( $1284.94 \pm 229.22$  vs.  $457.46 \pm 63.68$ ,  $p=0.004$ ;  $1241.21 \pm 222.14$  vs.  $457.46 \pm 63.68$ ,  $p=0.008$ ;  $1240.38 \pm 169.8$ , vs.  $457.46 \pm 63.68$ ,  $p=0.008$ ). Подобни резултати се откриват спрямо група ME500 ( $1284.94 \pm 229.22$  vs.  $373.84 \pm 44.15$ ,  $p=0.002$ ;  $1241.21 \pm 222.14$  vs.  $373.84 \pm 44.15$ ,  $p=0.004$ ;  $1240.38 \pm 169.8$  vs.  $373.84 \pm 44.15$ ,  $p=0.004$ ).

Сравнението между групите с модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност показва значимо понижение на нивата на серумен AST при групите третирани с розмаринова киселина и силимарин при съпоставка с нивата при плъховете, третирани само с парацетамол - група P ( $568.43 \pm 148.36$  vs.  $1284.94 \pm 229.22$ ,  $p=0.02$ ;  $509.03 \pm 62.36$  vs.  $1284.94 \pm 229.22$ ,  $p=0.025$ ). Тенденция към понижение пък се открива и при животните от група ME500-P ( $568.43 \pm 148.36$  vs.  $1241.21 \pm 222.14$ ,  $p=0.009$  спрямо група P).

### 2.5.1.3. ALT



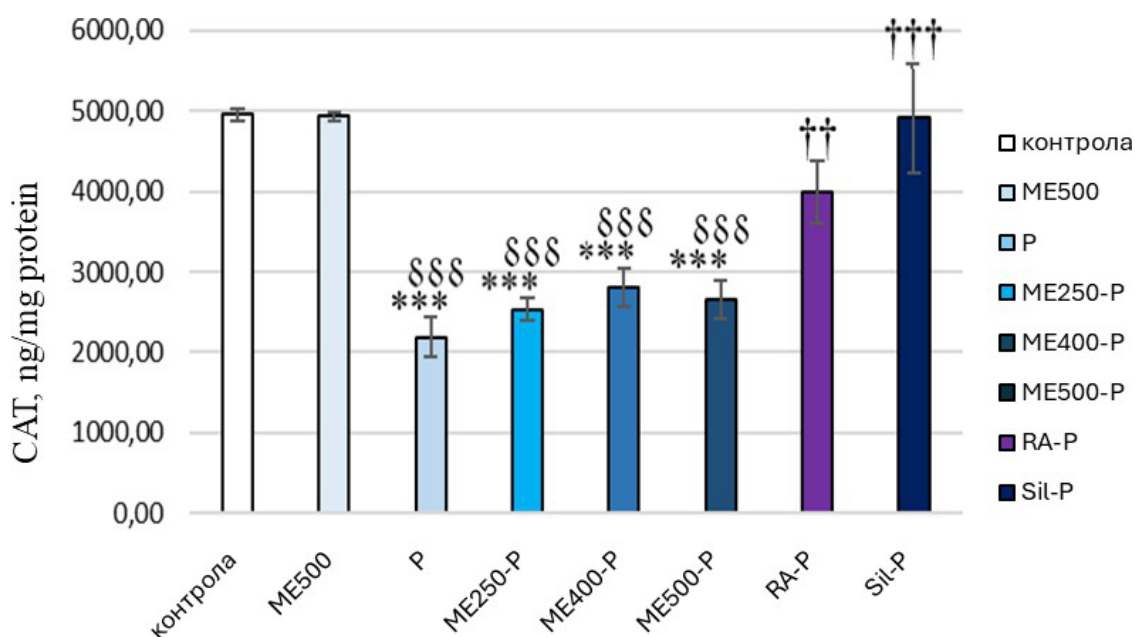
**Фигура 9.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху серумните нива на аланин аминотрансфераза при модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност

*Забележка:* \*\*\*  $p < 0.001$  спрямо контролата; §§§  $p < 0.001$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg; †  $p < 0.05$  спрямо парацетамол; ††  $p < 0.01$  спрямо парацетамол; †††  $p < 0.001$  спрямо парацетамол

От фигура 9 се вижда, че приложението на екстракт от *M. frivaldszkyana* индуцира дозозависимо понижаване на серумните нива на ALT в сравнение с група P. Статистическият анализ демонстрира значимо понижаване при групи контрола, ME500, ME400-P, ME500-P, RA-P и Sil-P в съпоставка с група P ( $50.63 \pm 5.07$  vs.  $728.9 \pm 93.94$ ,  $p < 0.001$ ;  $53.61 \pm 8.32$  vs.  $728.9 \pm 93.94$ ,  $p < 0.001$ ;  $536.34 \pm 39.09$  vs.  $728.9 \pm 93.94$ ,  $p = 0.04$ ;  $311.88 \pm 58.31$  vs.  $728.9 \pm 93.94$ ,  $p = 0.01$ ;  $281.81 \pm 165.88$  vs.  $728.9 \pm 93.94$ ,  $p = 0.005$ ;  $142.76 \pm 25.59$ ,  $p < 0.001$ ).

## 2.5.2. Определяне на маркери за оценка на чернодробната функция при хепатотоксичност, индуцирана от парацетамол в чернодробен хомогенат

### 2.5.2.1. Каталаза (CAT)



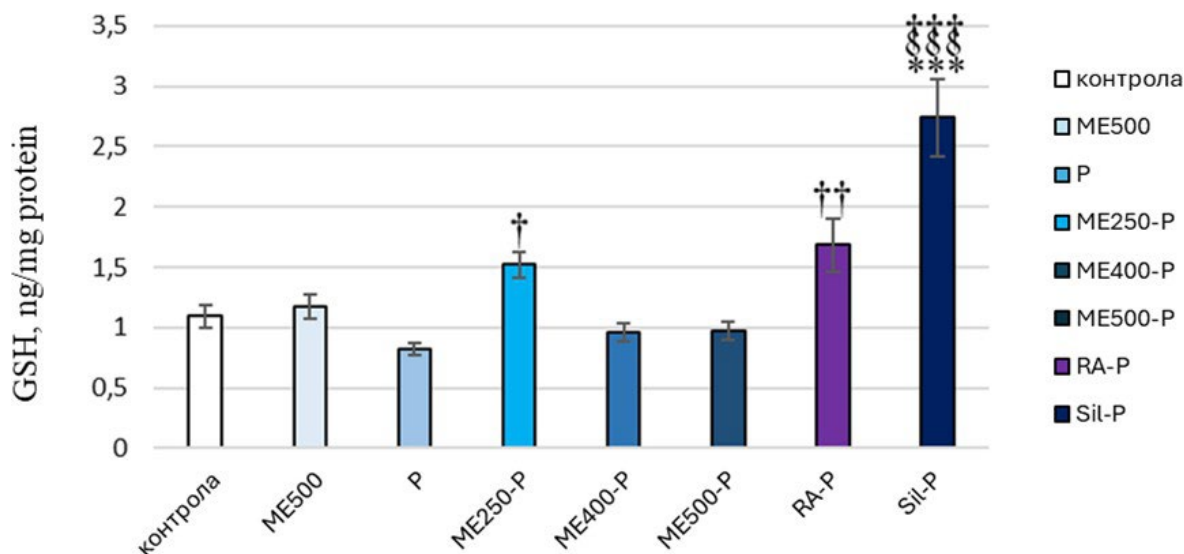
**Фигура 10.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху нивата на каталаза при модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност

*Забележка:* \*\*\*  $p < 0.001$  спрямо контролата; \$\$\$  $p < 0.001$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg; ††  $p < 0.01$  спрямо парацетамол; †††  $p < 0.001$  спрямо парацетамол

Проведеният анализ (фиг. 10) демонстрира значимо повишение в стойностите на ензима каталаза при групата плъхове, третирани със силимарин и розмаринова киселина в сравнение с група P ( $4907.14 \pm 683.10$  vs.  $2212.23 \pm 254.01$ ,  $p < 0.001$ ) и ( $3986.52 \pm 387.38$  vs.  $2212.23 \pm 254.01$ ,  $p = 0.07$ ).

Отчитат се също значително по-високи нива на САТ при контролната група спрямо групи P ( $4951.56 \pm 71.55$  vs.  $2212.23 \pm 254.01$   $p < 0.001$ ), ME250-P ( $4951.56 \pm 71.55$  vs.  $2529.66 \pm 142.52$ ,  $p < 0.001$ ), ME400-P ( $4951.56 \pm 71.55$  vs.  $2807.60 \pm 243.82$   $p < 0.001$ ), ME500-P ( $4951.56 \pm 71.55$  vs.  $2653.84 \pm 245.31$ ,  $p < 0.001$ ).

### 2.5.2.2. Редуциран глутатион (GSH)

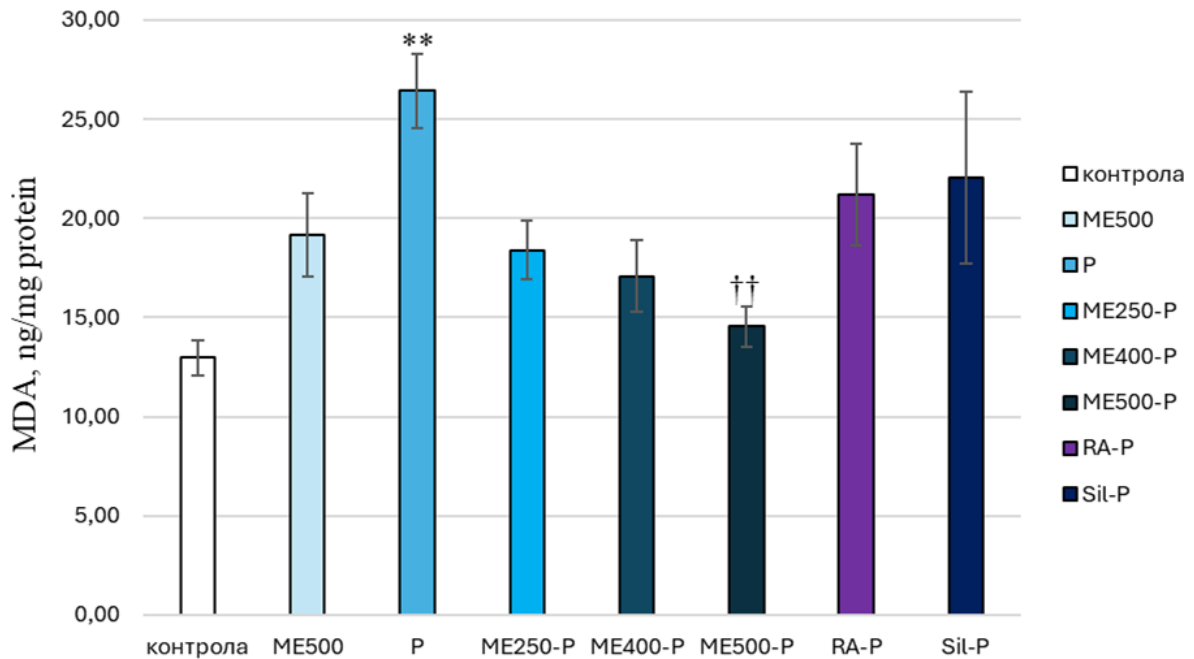


**Фигура 11.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху нивата на редуциран глутатион при модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност

*Забележка:* \*\*\*  $p < 0.001$  спрямо контролата; §§§  $p < 0.001$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg; †  $p < 0.05$  спрямо парацетамол; ††  $p < 0.01$  спрямо парацетамол; †††  $p < 0.001$  спрямо парацетамол

Проведеният статистически анализ (фиг. 11) демонстрира значимо повишение в нивата на GSH при групата на плъховете, третирани със силимарин в съпоставка с всички останали групи, включени в изпитването (Sil-P vs. контрола,  $p < 0.001$ ; vs. ME500,  $p < 0.001$ ; vs. P,  $p < 0.001$ ; vs. ME250-P,  $p < 0.001$ ; vs. ME400-P,  $p < 0.001$ ; vs. ME500-P,  $p < 0.001$ ; vs. RA-P,  $p < 0.001$ ). Повишени нива на редуциран глутатион се откриват и при група RA-P и ME250-P в сравнение с група P ( $1.68 \pm 0.22$  vs.  $0.82 \pm 0.49$ ,  $p = 0.007$  и  $1.52 \pm 0.11$  vs.  $0.82 \pm 0.05$ ,  $p = 0.049$ ).

### 2.5.2.3. Малондиалдехид (MDA)

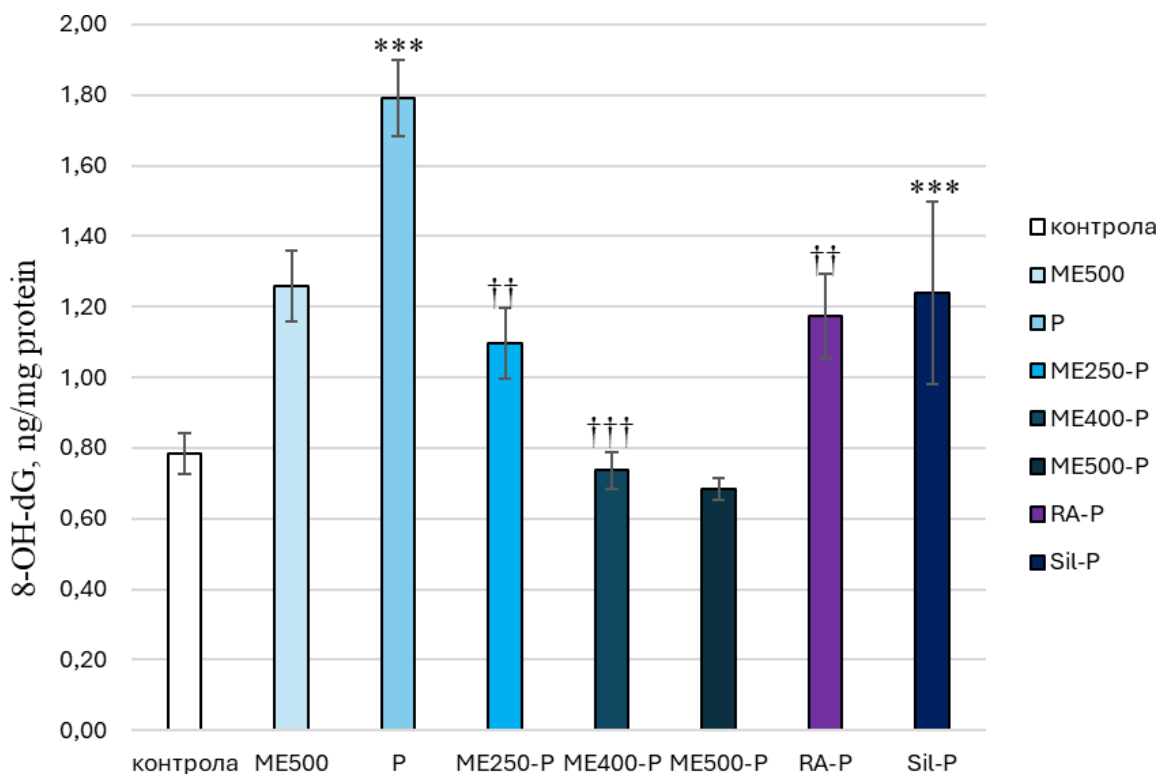


**Фигура 12.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху нивата на малондиалдехид при модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност

Забележка: \*\*  $p < 0.01$  спрямо контролата; ††  $p < 0.01$  спрямо парацетамол

Фигура 12 показва значимо повишение в стойностите за серумен MDA при група P в съпоставка с контролата ( $26.42 \pm 1.89$  vs.  $12.97 \pm 0.89$ ,  $p=0.003$ ) и в сравнение с ME500-P ( $26.42 \pm 1.89$  vs.  $14.54 \pm 1.02$ ,  $p=0.011$ ).

#### 2.5.2.4. 8-OH-dG



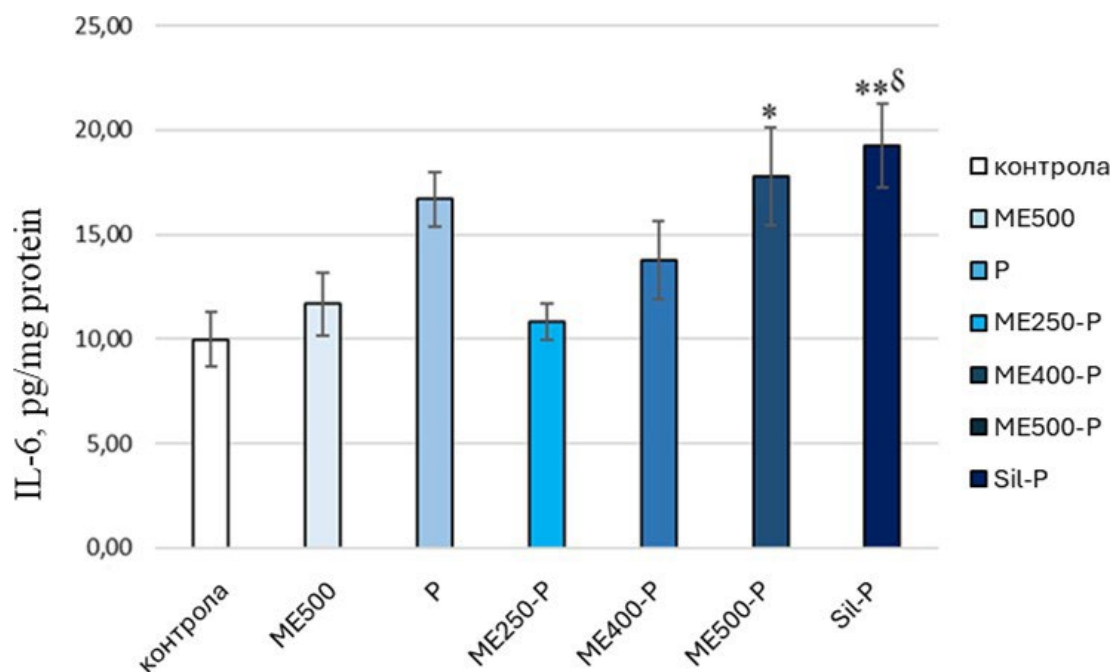
**Фигура 13.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху нивата на 8-хидрокси-дезоксигуанозин при модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност

Забележка: \*\*\*  $p < 0.001$  спрямо контролата; ††  $p < 0.01$  спрямо парацетамол; †††  $p < 0.001$  спрямо парацетамол

Статистическият анализ на получените резултати (фиг. 13) показва значимо повишение в стойностите на 8-OH-dG при група P спрямо група контрола ( $1.79 \pm 0.11$  vs.  $0.78 \pm 0.06$ ,  $p < 0.001$ ) и спрямо групи ME250-P ( $1.10 \pm 0.10$  vs.  $1.79 \pm 0.11$ ,  $p = 0.003$ ), ME400-P ( $1.79 \pm 0.11$  vs.  $0.74 \pm 0.52$ ,  $p < 0.001$ ) и ME500 ( $1.79 \pm 0.11$  vs.  $1.26 \pm 0.10$ ,  $p < 0.001$ ).

Сигнификантно повишение в стойностите на показателя е налице и при група RA-P в съпоставка с група P ( $1.17 \pm 0.12$  vs.  $1.79 \pm 0.11$ ,  $p = 0.01$ ), както и при група Sil-P спрямо групи контрола ( $1.95 \pm 0.24$  vs.  $0.78 \pm 0.06$ ,  $p < 0.001$ ), ME500 ( $1.95 \pm 0.24$  vs.  $1.79 \pm 0.11$ ,  $p = 0.002$ ), ME400-P ( $1.95 \pm 0.24$  vs.  $0.74 \pm 0.05$ ); ME500-P ( $1.95 \pm 0.24$  vs.  $0.68 \pm 0.31$ ,  $p < 0.001$ ), RA-P ( $1.95 \pm 0.24$  vs.  $1.17 \pm 0.12$ ,  $p < 0.001$ ).

### 2.5.2.5. Интерлевкин 6

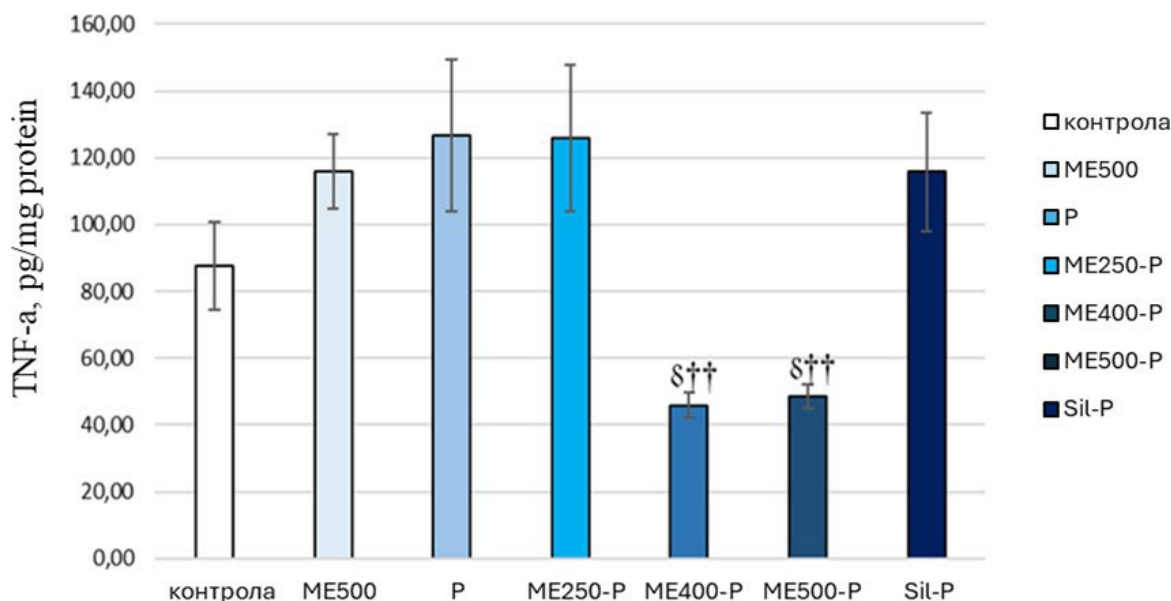


**Фигура 14.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху нивата на интерлевкин 6 при модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност

Забележка: \*  $p < 0.05$  спрямо контролата; \*\*  $p < 0.01$  спрямо контролата;  $\delta$   $p < 0.05$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg

Според проведеня анализ (фиг. 14) значимо по-ниски стойности на IL-6 се наблюдават при групи контрола, ME500 и ME250-P в сравнение с група Sil-P ( $9.99 \pm 1.29$  vs.  $19.25 \pm 2.01$ ,  $p=0.007$ ;  $11.67 \pm 1.53$  vs.  $19.25 \pm 2.01$ ,  $p=0.042$ ;  $10.81 \pm 0.86$  vs.  $19.25 \pm 2.01$ ,  $p=0.017$ ). Достоверно по-ниски нива на показателя се откриват в група контрола в съпоставка с група ME500-P ( $9.99 \pm 1.29$  vs.  $17.79 \pm 2.37$ ,  $p=0.034$ ), докато тенденция за значимо понижение се наблюдава при група ME250-P в сравнение с група ME500-P ( $10.81 \pm 0.86$  vs.  $17.79 \pm 2.37$ ,  $p=0.076$ ).

### 2.5.2.6. Тумор некротизиращ фактор-алфа (TNF- $\alpha$ )



**Фигура 15.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху нивата на тумор-некротизиращ фактор алфа при модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност

Забележка: §  $p < 0.05$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg;  
††  $p < 0.01$  спрямо парацетамол.

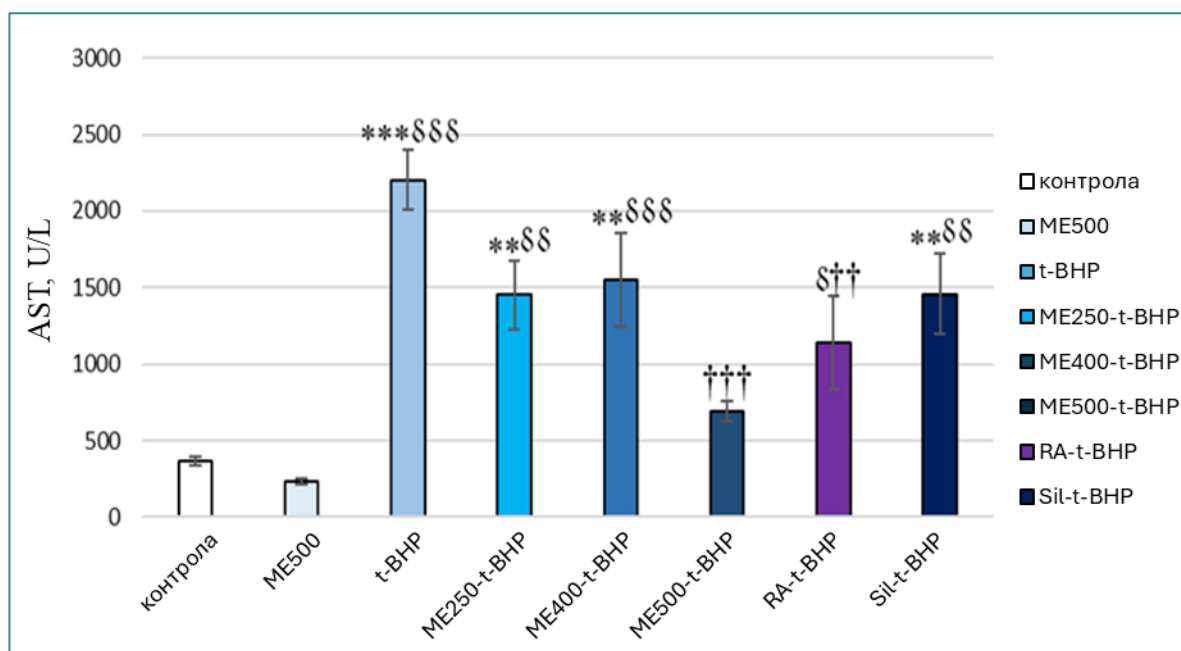
Проведеният анализ (фиг. 15) показва значимо понижаване в стойностите на TNF- $\alpha$  при групата с чернодробно увреждане, третирани с екстракт в доза от 400 mg/kg телесно тегло в съпоставка с групи ME500 ( $45.86 \pm 3.78$  vs.  $115.92 \pm 11.16$ ,  $p=0.037$ ), P ( $45.86 \pm 3.78$  vs.  $126.55 \pm 22.67$ ,  $p=0.011$ ), ME250-P ( $45.86 \pm 3.78$  vs.  $125.97 \pm 21.93$ ,  $p=0.011$ ) и Sil-P ( $45.86 \pm 3.78$  vs.  $115.74 \pm 17.69$ ,  $p=0.038$ ). Подобни резултати се откриват при група ME500-P ( $48.42 \pm 3.60$  vs.  $115.92 \pm 11.16$ ,  $p=0.05$ ;  $48.42 \pm 3.60$  vs.  $126.55 \pm 22.67$ ,  $p=0.015$ ;  $48.42 \pm 3.60$  vs.  $125.97 \pm 21.93$ ,  $p=0.016$ ;  $48.42 \pm 3.60$  vs.  $115.74 \pm 17.69$ ,  $p=0.051$ , респективно).

### 2.5.3. Промени в серумните нива на биомаркери при t-BHP-индуцирана хепатотоксичност

#### 2.5.3.1. Общ и директен билирубин

При проучването на ефектите на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* в дози 250 mg/kg; 400 mg/kg; 500 mg/kg т.м. върху общия и директния билирубин не се откриват статистически значими разлики между отделните групи и контролата.

#### 2.5.3.2. AST



**Фигура 16.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху серумните нива на аспартат аминотрансфераза при модел на бутил хидропероксид-индуцирана хепатотоксичност

Забележка: \*\* p<0.01 спрямо контрола; \*\*\* p<0.001 спрямо контрола; § p<0.05 спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg; §§ p<0.01 спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg; §§§ p<0.001 спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg; †† p<0.01 спрямо t-BHP; ††† p<0.001 спрямо t-BHP

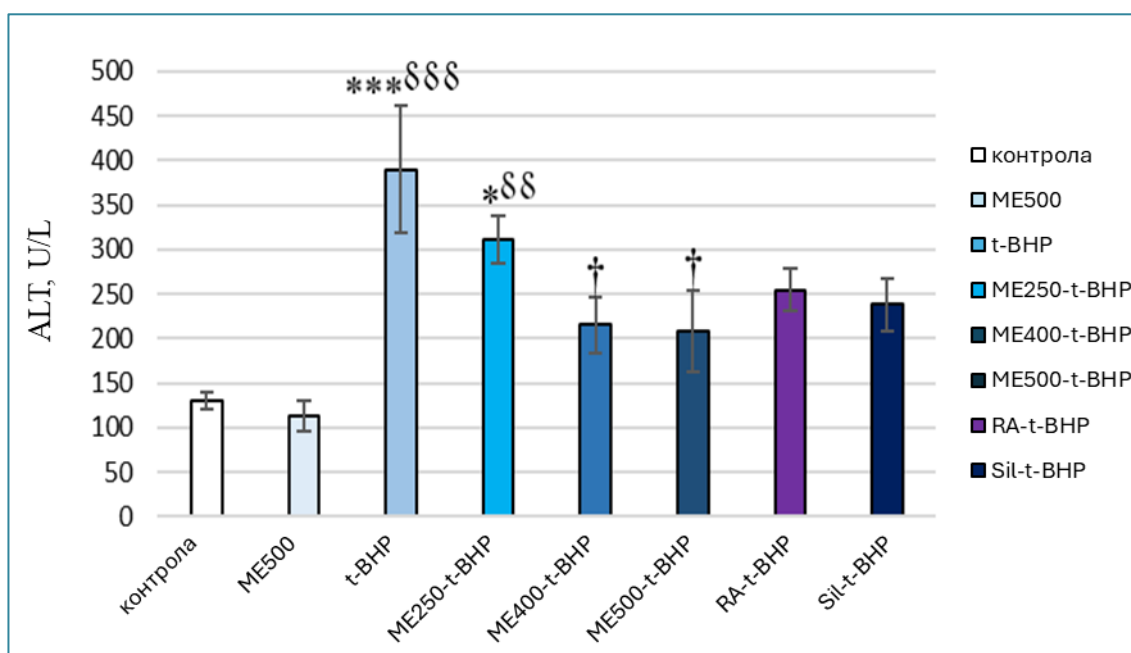
Проведеният анализ (фиг. 16) демонстрира значимо повишение в нивата на серумен AST при групи t-BHP, ME250-t-BHP, ME400-t-BHP и Sil-t-BHP в съпоставка с контролната група (2203.88 ± 194.85 vs. 368.89 ± 29.87, p<0.001; 1449.9 ± 224.7 vs. 368.89 ± 29.87, p=0.012; 1549.13 ± 303.21 vs. 368.89 ± 29.87, p=0.003; 1457.66 ± 263.73 vs. 368.89 ± 29.87, p=0.009) и група ME500 (2203.88 ± 194.85 vs. 233.55 ± 18.7, p<0.001; 1449.9 ± 224.7 vs. 233.55

$\pm 18.7$ ,  $p=0.003$ ;  $1549.13 \pm 303.21$  vs.  $233.55 \pm 18.7$ ,  $p=0.001$ ;  $1457.66 \pm 263.73$  vs.  $233.55 \pm 18.7$ ,  $p=0.002$ ). Тенденция за значимо повишение в стойностите на показателя се открива при сравнение на групи ME500 и RA-t-BHP ( $233.55 \pm 18.7$  vs.  $1142.44 \pm 304.4$ ,  $p=0.052$ ).

Значимо понижение в серумната концентрация на AST се наблюдава при група ME500-t-BHP в съпоставка с група t-BHP ( $688.84 \pm 67.87$  vs.  $2203.88 \pm 194.85$ ,  $p<0.001$ ), докато тенденция се открива при сравнение на групи ME500-t-BHP и ME400-t-BHP ( $688.84 \pm 67.87$  vs.  $1549.13 \pm 303.21$ ,  $p=0.078$ ).

Значително понижение в стойностите на показателя се открива и при група RA-t-BHP в сравнение с група t-BHP ( $1142.44 \pm 304.4$  vs.  $2203.88 \pm 194.85$ ,  $p=0.012$ ).

### 2.5.3.3. ALT



**Фигура 17.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху серумните нива на аланин аминотрансфераза при модел на бутил хидропероксид-индуцирана хепатотоксичност

Забележка: \*  $p<0.05$  спрямо контрола; \*\*\*  $p<0.001$  спрямо контрола; δδ  $p<0.01$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg; δδδ  $p<0.001$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg; †  $p<0.05$  спрямо t-BHP;

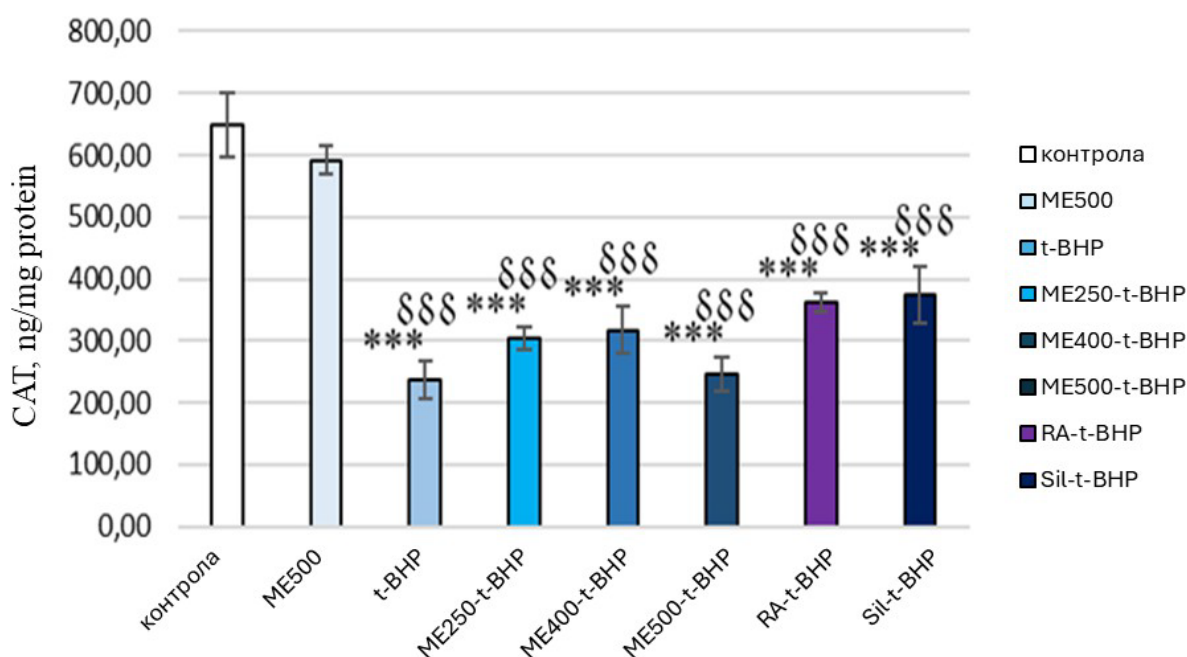
Според проведеня анализ (фиг. 17) е налице значимо понижение в стойностите на серумен ALT при група контрола в съпоставка с групи

ME250-t-BHP и t-BHP ( $129.94 \pm 10.15$  vs.  $310.5 \pm 26.86$ ,  $p=0.02$ ;  $129.94 \pm 10.15$  vs.  $390.15 \pm 71.93$ ,  $p<0.001$ ). Подобни резултати се откриват при група ME500 ( $113.38 \pm 16.91$  vs.  $310.5 \pm 26.86$ ,  $p=0.007$ ;  $113.38 \pm 16.91$  vs.  $390.15 \pm 71.93$ ,  $p<0.001$ , респективно).

Значимо понижение в нивата на ALT в серума се открива при групи ME400-t-BHP и ME500-t-BHP в сравнение с група t-BHP ( $215.33 \pm 31.54$  vs.  $390.15 \pm 71.93$ ,  $p=0.027$ ;  $207.56 \pm 46.03$  vs.  $390.15 \pm 71.93$ ,  $p=0.018$ ).

## 2.5.4. Определяне на маркери за оценка на чернодробната функция при t-BHP-индуцирана хепатотоксичност в чернодробен хомогенат

### 2.5.4.1. Каталаза



**Фигура 18.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху нивата на каталаза при модел на бутил хидропероксид-индуцирана хепатотоксичност

Забележка: \*\*\*  $p<0.001$  спрямо контрола; SSS  $p<0.001$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg

Фигура 18 демонстрира сигнификантно по-ниски нива при група t-BHP спрямо контролната група ( $237.36 \pm 29.89$  vs.  $649.97 \pm 51.64$ ,  $p<0.001$ ).

От проведения анализ се наблюдава значимо понижение в количеството на каталазата при групи ME250-t-BHP, ME400-t-BHP, ME500-t-BHP спрямо

контролната група ( $302.86 \pm 18.53$  vs.  $649.97 \pm 51.64$ ,  $p < 0.001$ ;  $316.8 \pm 37.69$  vs.  $649.97 \pm 51.64$ ,  $p < 0.001$ ;  $244.95 \pm 27.69$  vs.  $649.97 \pm 51.64$ ,  $p < 0.001$ ).

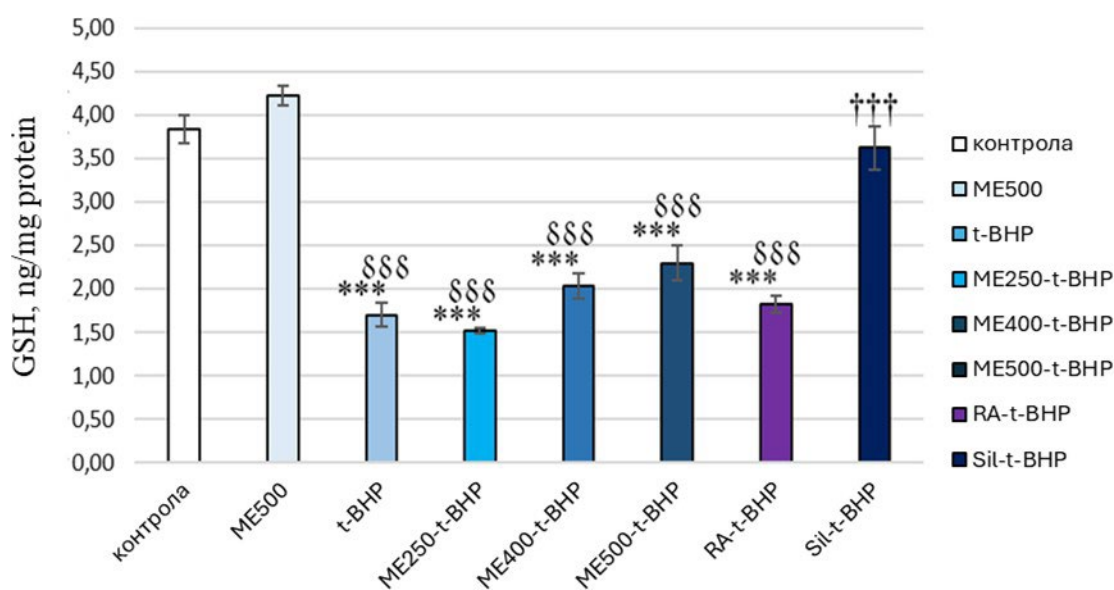
Същата тенденция се отчита при групи RA-t-BHP, Sil-t-BHP в сравнение с контролата ( $360.91 \pm 15.36$  vs.  $649.97 \pm 51.64$ ,  $p < 0.001$ ;  $374.84 \pm 45.86$  vs.  $649.97 \pm 51.64$ ,  $p < 0.001$ ).

Подобни резултати се наблюдават и при група t-BHP спрямо група ME500 ( $237.36 \pm 29.89$  vs.  $592.18 \pm 21.66$ ,  $p < 0.001$ ).

Значимост се открива и при групи ME250-t-BHP, ME400-t-BHP, ME500-t-BHP спрямо група ME500 ( $302.86 \pm 18.53$  vs.  $592.18 \pm 21.66$ ,  $p < 0.001$ ;  $316.8 \pm 37.69$  vs.  $592.18 \pm 21.66$ ,  $p < 0.001$ ;  $244.95 \pm 27.69$  vs.  $592.18 \pm 21.66$ ,  $p < 0.001$ ).

Групите RA-t-BHP и Sil-t-BHP също показват по-ниски нива в сравнение с групата ME500 ( $360.91 \pm 15.36$  vs.  $592.18 \pm 21.66$ ,  $p < 0.001$ ;  $374.84 \pm 45.86$  vs.  $592.18 \pm 21.66$ ,  $p < 0.001$ ).

#### 2.5.4.2. Редуциран глутатион



**Фигура 19.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху нивата на редуциран глутатион при модел на бутил хидропероксид-индуцирана хепатотоксичност

Забележка: \*\*\*  $p < 0.001$  спрямо контрола; §§§  $p < 0.001$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg; †††  $p < 0.001$  спрямо t-BHP

От извършения анализ (фиг. 19) за определяне количеството на глутатион се откриват значително по-ниски стойности при групата t-BHP спрямо контролната група ( $1.70 \pm 0.14$  vs.  $3.84 \pm 0.16$ ,  $p < 0.001$ ). Сходни резултати се

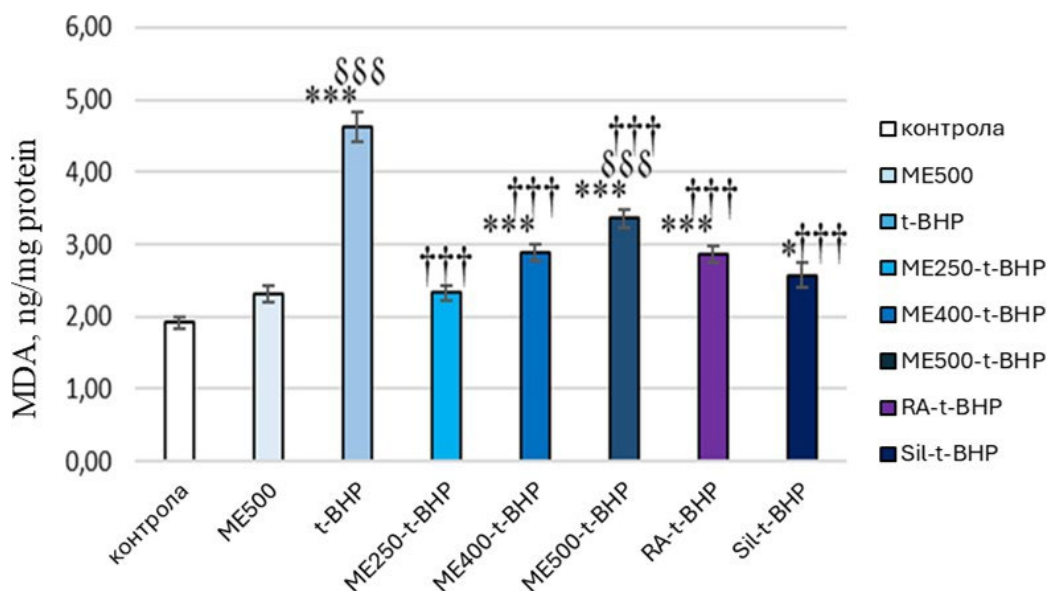
откриват при група t-BHP спрямо група ME500 и Sil-t-BHP съответно ( $1.70 \pm 0.14$  vs.  $4.22 \pm 0.11$ ,  $p < 0.001$ ;  $1.70 \pm 0.14$  vs.  $3.62 \pm 0.25$ ,  $p < 0.001$ ).

Сигнификантно по-ниски стойности се отчитат още при групите - ME250-t-BHP, ME400-t-BHP, ME500-t-BHP в сравнение с групата Sil-P ( $1.52 \pm 0.04$  vs.  $3.62 \pm 0.25$ ,  $p < 0.001$ ;  $2.03 \pm 0.15$  vs.  $3.62 \pm 0.25$ ,  $p < 0.001$ ;  $2.29 \pm 0.2$  vs.  $3.62 \pm 0.25$ ,  $p < 0.001$ ).

Значимо повишение се наблюдава при групата ME500-t-BHP спрямо тази третирана с двойно по-ниска доза ME250-t-BHP ( $2.29 \pm 0.20$  vs  $1.52 \pm 0.04$ ,  $p = 0.02$ ).

Значително по-високи стойности на GSH са забелязани при контролната група спрямо групи ME250-t-BHP, ME400-t-BHP, ME500-t-BHP, RA-t-BHP ( $3.84 \pm 0.16$  vs.  $1.52 \pm 0.04$ ,  $p < 0.001$ ;  $3.84 \pm 0.16$  vs.  $2.03 \pm 0.15$ ,  $p < 0.001$ ;  $3.84 \pm 0.16$  vs.  $2.29 \pm 0.2$ ,  $p < 0.001$ ;  $3.84 \pm 0.16$  vs.  $1.82 \pm 0.10$ ,  $p < 0.001$ ). Подобни резултати се отчитат и при ME500 спрямо групи ME250-t-BHP, ME400-t-BHP, ME500-t-BHP, RA-t-BHP ( $4.22 \pm 0.11$  vs.  $1.52 \pm 0.04$ ,  $p < 0.001$ ;  $4.22 \pm 0.11$  vs.  $2.03 \pm 0.15$ ,  $p < 0.001$ ;  $4.22 \pm 0.11$  vs.  $2.29 \pm 0.2$ ,  $p < 0.001$ ;  $4.22 \pm 0.11$  vs.  $1.82 \pm 0.10$ ,  $p < 0.001$ ).

### 2.5.4.3. Малондиалдехид



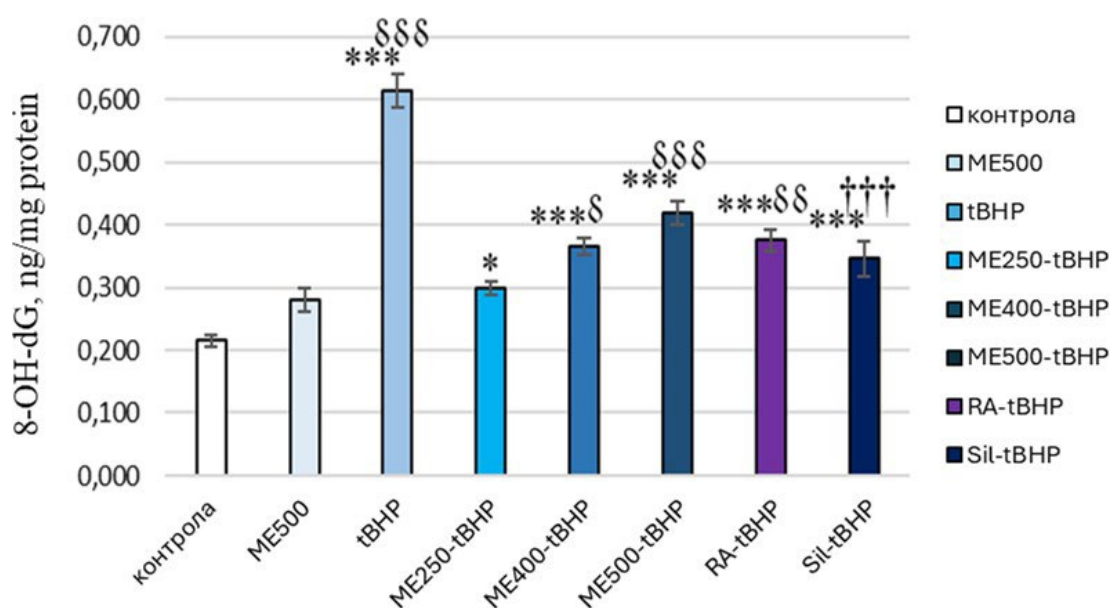
**Фигура 20.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху нивата на малондиалдехид при модел на бутил хидропероксид-индуцирана хепатотоксичност

Забележка: \*  $p < 0.05$  спрямо контролата, \*\*\*  $p < 0.001$  спрямо контролата; δδδ  $p < 0.001$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg; †††  $p < 0.001$  спрямо t-BHP

Проведеният анализ (фиг. 20) демонстрира значимо повишение в нивата на MDA при групата на плъховете, третирани със t-BHP в съпоставка с всички останали групи, включени в изпитването ( $p < 0.001$ ). Подобни резултати се откриват при група ME500-t-BHP в сравнение с групи контрола ( $3.36 \pm 0.12$  vs.  $1.92 \pm 0.07$ ,  $p < 0.001$ ), ME500 ( $3.36 \pm 0.12$  vs.  $2.31 \pm 0.11$ ,  $p < 0.001$ ), PS-t-BHP ( $3.36 \pm 0.12$  vs.  $2.57 \pm 0.17$ ,  $p = 0.003$ ) и ME250-t-BHP ( $3.36 \pm 0.12$  vs.  $2.33 \pm 0.10$ ,  $p < 0.001$ ).

Статистически значимо понижение в нивата на MDA или тенденция за такова се открива при групи контрола, ME500 и ME250-t-BHP в сравнение с група ME400-t-BHP ( $1.92 \pm 0.07$  vs.  $2.89 \pm 0.12$ ,  $p < 0.001$ ;  $2.31 \pm 0.11$  vs.  $2.89 \pm 0.12$ ,  $p = 0.057$ ;  $2.33 \pm 0.10$  vs.  $2.89 \pm 0.12$ ,  $p = 0.08$ , респективно). Подобни резултати се откриват при сравнение на групи контрола и ME500 с група RA-t-BHP ( $1.92 \pm 0.07$  vs.  $2.87 \pm 0.11$ ,  $p < 0.001$ ;  $2.31 \pm 0.11$  vs.  $2.87 \pm 0.11$ ,  $p = 0.075$ , респективно).

#### 2.5.4.4. 8-OH-dG



**Фигура 21.** Ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* върху нивата на 8-хидрокси-дезоксигуанозин при модел на бутил хидропероксид-индуцирана хепатотоксичност

Забележка: \*  $p < 0.05$  спрямо контролата, \*\*\*  $p < 0.001$  спрямо контролата; §  $p < 0.05$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg; §§  $p < 0.01$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg; \$\$\$  $p < 0.001$  спрямо метанолов екстракт 500 mg/kg; †††  $p < 0.001$  спрямо t-BHP

Проведеният анализ демонстрира (фиг. 21) значимо повишение в нивата на 8-ОН-dG при групата на плъховете, третирани с t-BHP в съпоставка с всички останали групи, включени в изпитването ( $p < 0.001$ ). Подобни резултати се откриват при група ME500-t-BHP в сравнение с групи контрола ( $0.419 \pm 0.018$  vs.  $0.215 \pm 0.009$ ,  $p < 0.001$ ), ME500 ( $0.419 \pm 0.018$  vs.  $0.279 \pm 0.018$ ,  $p < 0.001$ ), и ME250-t-BHP ( $0.419 \pm 0.018$  vs.  $0.299 \pm 0.010$ ,  $p = 0.001$ ).

Значимо повишение в стойностите на 8-ОН-dG се наблюдава в групата на отрицателните контроли в съпоставка с групата на здравите плъхове, третирани с физ. разтвор ( $0.614 \pm 0.027$  vs.  $0.215 \pm 0.009$ ,  $p < 0.001$ ), докато тенденция се открива при група ME250-t-BHP в сравнение със здравите плъхове, третирани с физ. разтвор ( $0.299 \pm 0.010$  vs.  $0.215 \pm 0.009$ ,  $p = 0.053$ ).

Статистически значимо понижение в нивата на 8-ОН-dG се открива при групи контрола и ME500 в сравнение с група ME400-t-BHP ( $0.215 \pm 0.009$  vs.  $0.366 \pm 0.014$ ,  $p < 0.001$ ;  $0.279 \pm 0.018$  vs.  $0.366 \pm 0.014$ ,  $p = 0.041$ , респективно). Подобни резултати се откриват при сравнение на групи контрола и ME500 с група RA-t-BHP ( $0.215 \pm 0.009$  vs.  $0.375 \pm 0.017$ ,  $p < 0.001$ ;  $0.279 \pm 0.018$  vs.  $0.375 \pm 0.017$ ,  $p = 0.016$ , респективно).

Оксидативният стрес се смята за ключов път, по който възниква хепатоцелуларно увреждане и играе роля в прогресията на това увреждане. Връзката между оксидативните процеси и патологичните изменения се потвърждава от сигнификантно понижените нива на глутатион пероксидазата, която корелира негативно със серумните нива на ALT при цироза и хепатит ([Osman et al., 2007](#)). При хроничен хепатит се наблюдават значително по-високи стойности на MDA и 8-ОН-dG ([Zhu et al., 2012](#)).

Съществуват данни за хепатопротективен ефект на линарин при модел на тетрахлорметан ( $CCl_4$ )-индуцирана хепатална увреда. Приложението на тетрахлорометан предизвиква повишение на ензимите AST, ALT и нивата на общ билирубин. Третирването с линарин показва сигнификантен дозозависим протективен ефект с приблизително 60% редукция в серумните нива на AST и ALT и 50% намаляване на нивата на общия билирубин. Същото изследване показва сигнификантно понижаване на стойностите на MDA което се свързва с намалени нива на оксидативен стрес ([Li et al., 2023](#)). Известно е, че хлорогеновата киселина намалява чернодробния оксидативен стрес при парацетамол-индуцирана хепатотоксичност чрез активиране на ядрен фактор Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) ([Wei et al., 2018](#)). Има данни за нормализиране на високите нива на серумните AST и ALT при прием на хлорогенова киселина при

неалкохолен стеатохепатит, индуциран от хранителен режим с дефицит на метионин и холин (Miao et al., 2022).

Установено е, че кверцетин-3-О-рутинозид оказва благоприятно влияние върху чернодробното увреждане, предизвикано от парацетамол чрез възстановяване нивата на GSH и чернодробните ензими при плъхове. Известно е, че повлиява хепатореналната токсичност при плъхове чрез въздействие върху оксидативния стрес и стимулиране на митохондриалната продукция на енергия (Subramanya et al., 2018).

Съществуват данни за хепатопротективното действие на еупаторин *in vivo* (Chriscensia et al., 2023).

Goudarzi и сътрудници (2021) докладват нормализиране на нивата на ензимите AST и ALT след приложение на апигенин при модел на хепатотоксичност, предизвикан от метотрексат. Същите изследователи докладват повишени стойности на MDA след третиране с метотрексат и възстановяване на нивата след третирането с апигенин (Goudarzi et al., 2021). GSH участва в клетъчната защита срещу оксидативен стрес и химично реактивни токсични съединения (Meeran et al., 2018). Goudarzi и съавтори откриват изчерпване на GSH в групата, третирана с метотрексат в сравнение с контролата и увеличаване на нивата при групата, третирана с апигенин. Те установяват намалена активност на ензима CAT при плъховете, третирани с метотрексат и подобряване в активността на ензима при приема на апигенин. Апигенинът, който има добре изразени противовъзпалителни свойства, инхибира образуването и освобождаването на проинфламаторни цитокини (Thangaiyan et al., 2018). Тези данни се подкрепят от резултатите на Goudarzi et al., които докладват понижени нива на TNF- $\alpha$  и IL-1- $\beta$  в сравнение с групата третирана с метотрексат. Други проучвания показват, че апигенин инхибира чернодробно увреждане при експериментални методи на хепатотоксичност, предизвикани от N-нитрозодидетиламин, липополизахарид и парацетамол чрез потискане на възпалителните процеси и оксидативните увреждания при плъхове (Yang et al., 2013; Ali et al., 2014).

Редица автори съобщават антиоксидантната активност на розмариновата киселина (РК), която сигнификантно понижава плазмения ALT и GSH при експериментални модели на хепатотоксичност. Възпалението е тясно свързано с оксидативния стрес поради способността на свободните радикали да повлияват вътреклетъчната сигнална трансдукция и генна регулация. При алкохолно чернодробно заболяване, липидното перокисление причинява възпаление и фиброза, докато при хроничен хепатит се отчитат по-високи стойности на TNF- $\alpha$  и  $\beta$  (Poli, 2000). Розмариновата

киселина вероятно показва терапевтичен потенциал чрез инхибиция на NF- $\kappa$ B пътя и down-регулация на TNF- $\alpha$  и COX-2 (Moon et al., 2010).

Ahmed et al. (2019) откриват, че приемът на нарингенин при плъхове, третирани с парацетамол, редуцира повишените серумните нива на AST, ALT, TNF- $\alpha$  (Ahmed et al., 2019).

Hassan et al. (2021) изследват ефекта на нарингенин, хесперидин и тяхната комбинация при плъхове с хепатотоксичност, индуцирана от диклофенак. Ежедневното интраперитонеално инжектиране на диклофенак за 4 седмици предизвиква значимо по-високи серумните нива на проинфламаторния цитокин TNF- $\alpha$ , чернодробните ензими AST, ALT, общ билирубин и чернодробния GSH. Тези изменения отразяват чернодробна увреда и некроза, наличие на оксидативен стрес, потискане на антиоксидантната защитна система, възпаление и апоптоза. Ко-администрацията на нарингенин и хесперидин води до сигнификантно понижение в активността на изследваните маркери (Hassan et al., 2021).

## 2.6. Антиоксидантно действие

Липидното перокисление е процес, при който свободните радикали атакуват липиди, съдържащи въглерод-въглерод двойна връзка. Значими субстрати на липидното перокисление са полиненаситените мастни киселини, които са липиди с две или повече двойни връзки. Класифицират се като омега-3 (n=3) и омега 6 (n=6) мастни киселини в зависимост от локализацията на последната двойна връзка спрямо терминалния метилов край на молекулата. Основната омега-6 мастна киселина е арахидоновата киселина, която може да претърпи ензимно окисление до простагландини, левкотриени, тромбокساني и други циклооксигеназни, липооксигеназни или цитохром P-450 продукти. Арахидоновата киселина може да се метаболизира и по неензимен път до MDA и други крайни продукти на липидното окисление. Образуваните алдехиди водят до загуба на мембранния интегритет чрез изменения във флуидитета и последваща инактивация на мембранни протеини. При засилено липидно перокисление, степента на оксидативен стрес надвишава капацитета за възстановяване, което предизвиква апоптоза или некроза. Настъпилото клетъчно увреждане улеснява развитието на редица патологични състояния (Ayala et al., 2014).

Според изследване на Stojanovic G and Palic I (2008) метаноловият екстракт на *M. fruticosa* показва малко по-ниска активност в сравнение с комерсиалния антиоксидант ВНТ (бутил хидрокситолуен). Метаноловите

екстракти от *M. graeca* и *M. juliana* са сходни по антиоксидантното си действие с алфа-токоферол. Наблюдаваната активност на екстрактите се дължи вероятно на високото фенолното съдържание (Stojanovic and Palic, 2008).

Vladimir-Knežević et al. (2011) проучват антиоксидантната активност на видовете *M. croatica*, *M. juliana*, *M. thymifolia*. Трите екстракта демонстрират антиоксидантни характеристики, които се смята, че са свързани основно с високото съдържание на полифенолни съединения в състава им (Vladimir-Knežević et al., 2011).

Nikolova и сътрудници (2017) по метода 2,2-дифенил-1-пикрил-хидразил (DPPH) установяват най-силно антиоксидантно действие за метаноловите екстракти на *M. frivaldszkyana* и *M. dalmatica* в сравнение с другите изследвани видове – *M. juliana* и *M. cristata* (Nikolova et al., 2017).

Mladenova et al. (2021) изучават антиоксидантната активност на *M. frivaldszkyana* посредством няколко метода: DPPH, 2,2-азино-бис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонова) киселина (ABTS), способността за редуциране на желязни ferric reducing antioxidant power (FRAP) и медни (CUPRAC) йони, както и способността на неутрализиране на пероксидни радикали (Oxygen Radical Absorbance Capacity- ORAC) (Mladenova et al., 2021). Резултатите показват, че стойността на ORAC за *M. frivaldszkyana* е по-висока в сравнение с много други български лечебни растения (Kratchanova et al., 2010).

Посочените данни потвърждават нашите резултати относно GSH, CAT и токсичните молекули MDA и 8-OH-dG при моделите на t-BHP и парацетамол-индуцирано възпаление.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цялостният анализ на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* определя захароза, глюкоза, маноза, фруктоза и захарни алкохоли като първичните метаболити в най-голямо количество. Триацилглицеролите са липидната група в най-изобилно количество. Неорганичните елементи К, Mg, Zn и Са също са налични във високо съдържание. Преобладаваща част сред вторичните метаболити са флавоноиди и полифеноли. Екстрактът е богат на линарин, хлорогенова и розмаринова киселина, рутин, еупаторин, кемпферол-3-О-рутинозид и апигенин. *In vivo* оценката върху остра токсичност показва липса на смъртност и токсични ефекти при мъжки плъхове Wistar при перорално приложение на дози до 5000 mg/kg т.м.. В допълнение, 14-дневно перорално приложение на 250, 400 и 500 mg/kg т.м. на екстракта от *M. frivaldszkyana* разкрива противовъзпалителния потенциал при модел на карагенан-индуциран оток на задна лапа при плъхове. Тази активност може да бъде свързана с високите концентрации на флавоноиди в екстракта. Високото съдържание на фенолни съединения (хлорогенова и розмаринова киселина, рутин, еупаторин, кемпферол-3-О-рутинозид и апигенин) е вероятно да бъде основния фактор, свързан с наблюдаваната противовъзпалителна активност на екстракта. Екстрактът не проявява аналгетично действие при модел тестове “аналгезиметър” и “гореща плоча”. Изследването на модели на хепатотоксичност, индуцирана от парацетамол и t-ВНР демонстрират потенциални хепатопротективни характеристики на метаноловия екстракт от *M. frivaldszkyana*, които вероятно се дължат на антиоксидантната активност на флавоноидите в състава.

## ИЗВОДИ

### По отношение на фитохимичния състав на растението:

1. Идентифицирани са 83 съединения чрез GC-MS анализ, класифицирани като аминокиселини, органични киселини, захари и захарни алкохоли.
2. Идентифицирани са общо 163 липидни съединения, разпределени в 10 класа, чрез липидомично изследване на неполярната фракция.
3. Открити са 192 съединения – 123 идентифицирани и 69 неизвестни съединения чрез UPLC-MS-MS анализ на проби от метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana*. Вторичните метаболити с най-високи концентрации са флавоноиди, предимно флавоноидни гликозиди. Розмариновата киселина е сред най-значимите открити вещества.

### По отношение на изследваните биологични активности:

1. Метаноловият екстракт от *M. frivaldszkyana* не предизвиква токсични ефекти при перорално приложение на плъхове в дози до 5000 mg/kg телесна маса.
2. Екстрактът от растението не показва аналгетично действие при тестове с механичен и термичен болков стимул.
3. Метаноловият екстракт от *M. frivaldszkyana* и в трите изследвани дози притежава противовъзпалителен ефект при модел на остро ексудативно възпаление, предизвикано от карагенан.
4. Приложението на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* не повишава пространствената работна и епизодична памет при нативни плъхове, но на базата на фитохимичния му състав такъв ефект би могъл да се очаква при модели на увредена памет.
5. Метаноловият екстракт от *M. frivaldszkyana* повлиява оксидативния стрес при експериментални модели на хепатотоксичност предимно чрез потискане продукцията на свободни радикали (понижени маркери на оксидативен стрес), а не чрез повишаване активността на антиоксидантните ензими. Това обуславя неговата предимно превантивна роля при увреждания на черния дроб.

## ПРИНОСИ

### ПРИНОСИ С НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧНО ЗНАЧЕНИЕ

1. За пръв път е изследвана остра токсичност на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* след перорално приложение при плъхове.
2. Извършеният пълен метаболомен анализ на екстракта показва високо съдържание на фенолни киселини и флавоноиди, които вероятно определят наблюдаваните биологични активности на екстракта.

### ПРИНОСИ С НАУЧНО-ПРИЛОЖНО ЗНАЧЕНИЕ

1. За пръв път е установен потенциален хепатопротективен ефект на метанолов екстракт от *M. frivaldszkyana* при модел на чернодробна токсичност при плъхове.
2. За пръв път е установен противовъзпалителен ефект на екстракта при модел на възпаление на задна лапа на гризач.

# СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

## I. Публикации

1. **Stavrakeva K**, Metodieva K, Benina M, Bivolarska A, Dimov I, Choneva M, Kokova V, Alseekh S, Ivanova V, Vatov E, Gechev T, Mladenova T, Mladenov R, Todorov K, Stoyanov P, Gyuzeleva D, Popova M, Apostolova E. Metabolic Composition of Methanolic Extract of the Balkan Endemic Species *Micromeria frivaldszkyana* (Degen) Velen and Its Anti-Inflammatory Effect on Male Wistar Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024
2. **Stavrakeva K**, Popova M, Esad M, Apostolova E, Kokova V, Bacelova M, Alakidi A & Bivolarska A. Drug-induced liver toxicity. *Acta Medica Bulgarica*, 2024
3. **Ставракева К.** Биологичен потенциал на балканския ендемичен вид *Micromeria Frivaldszkyana* (Degen) Velen. (Lamiaceae). *Scientific Works of the Union of Scientists Plovdiv*, 2024

## II. Участия в конгреси, конференции и други научни форуми

1. Metodieva K, **Stavrakeva K**, Dimov I, Choneva M, Kokova V, Alseekh S, Ivanova V, Vatov E, Gechev T, Mladenova T, Mladenov R, Todorov K, Stoyanov P, Gyuzeleva D, Popova M, Benina M, Bivolarska A, Apostolova E. *Phytochemical characterisation of water and ethanol extract from Micromeria friwaldszkyana*. - Poster presentation. 48<sup>th</sup> Federation of European Biochemical Societies Congress 2024, 29.06-03.07.2024, Milan, Italy.
2. **Ставракева К.** Биологичен потенциал на балканския ендемичен вид *Micromeria Frivaldszkyana* (Degen) Velen. (Lamiaceae). – обзор. X международна научна конференция на младите учени – Пловдив, 20-23 юни 2024.
3. **Ставракева К**, Кокова В, Апостолова Е. *Експериментално проучване на противовъзпалителен и аналгетичен ефект на Micromeria frivaldszkyana (Degen) Velen* – обзор. VIII Национален конгрес по фармакология, клинична фармакология и терапия, Плевен, 15-17 ноември 2024.

# БЛАГОДАРНОСТИ

## Издавам своята дълбока признателност към:

- ✚ Научните ми ръководители - доц. Елисавета Апостолова, дм и проф. д-р Анелия Биволарска, дб за всеотдайността, предадените напътствия и знания, проявеното внимание, търпение и разбиране.
- ✚ Академичното ръководство на МУ-Пловдив за институционалната и финансова подкрепа при разработването на дисертационния труд и свързания с него научен проект и специално на Ректора на МУ-Пловдив - проф. д-р Ангел Учиков, дмн и заместник-ректора по НИД - проф. д-р Мария Токмакова, дм.
- ✚ Членовете на научното жури за професионализма, обективните мнения и времето, отделено за написване на рецензии и становища.
- ✚ Всички мои колеги от катедра “Фармакология, токсикология и фармакотерапия” и катедра “Фармакология и клинична фармакология” за отзивчивостта, ценните съвети и оказаната помощ за експерименталната работа и подготовката на докторската дисертация.
- ✚ Колегите от катедра “Медицинска биохимия” за сътрудничеството, топлото отношение и насоките по време на съвместната ни дейност.
- ✚ Секция по Ботаника към Катедра “Биоорганична химия” за съдействието при събиране на растителния материал.
- ✚ Семейството, близките ми и Бог за безграничния извор на вдъхновение и насърчение, без които настоящият дисертационен труд не би бил възможен.