

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ**

Стела Тошкова Драгоманова

**ФАРМАКОЛОГИЧНИ, ТОКСИКОЛОГИЧНИ И
НЕВРОБИОЛОГИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА МИРТЕНАЛ –
БИЦИКЛИЧЕН МОНОТЕРПЕНОИД ОТ ПРИРОДЕН ПРОИЗХОД**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР“

Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт
Професионално направление: 7.1. Медицина
Научна специалност: „Фармакология“

**Научен ръководител:
Проф. д-р Любка Танчева, ИНБ – БАН**

София, 2020

Дисертационният труд съдържа 255 стандартни машинописни страници. Онагледен е със 118 фигури и 9 таблици. Библиографската справка обхваща 534 източника.

Експерименталната работа, свързана с изложените в представения дисертационен труд резултати, е извършена основно в лабораториите на Института по невробиология – БАН. Част от изследванията са проведени в Медицински университет – Варна, Военномедицинска Академия – София и МУ – София.

Вътрешната защита на дисертационния труд е проведена на 30.06.2020 г. на разширено заседание на Научни направления „Поведенческа невробиология“ и „Синаптична сигнализация и комуникации“ в Института по невробиология – БАН.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 28.08.2020 г. от 11.00 ч. В Заседателната зала на Института по невробиология при БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 23, ет. 2, на открито заседание на Научното жури.

Научно жури в състав:

1. Проф. Красимира Якимова, д.м.н., Медицински университет – София, външен член на Научното жури

2. Проф. Иванка Костадинова, д.м., Медицински университет – Пловдив, външен член на Научното жури

3. Доц. Юличка Събева, д.м., Медицински университет – Варна, външен член на Научното жури

4. Проф. Николай Лазаров, д.м.н., Институт по невробиология – БАН, вътрешен член на Научното жури

5. Доц. Мария Папазова, д.м., Институт по невробиология – БАН, вътрешен член на Научното жури

Резервни членове:

1. Доц. Румен Николов, д.м., Медицински университет – София, външен резервен член на Научното жури

2. Проф. Росица Замфирова, д.б., Институт по невробиология – БАН, вътрешен резервен член на Научното жури

Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на Института по невробиология на БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 23, ет. 2.

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на най-често използваните съкращения	4
Въведение	5
Цел и задачи	8
Материали и методи	10
Резултати и обсъждане	21
Изводи	86
Приноси	88
Публикации във връзка с дисертационния труд	89
Съобщение по темата на дисертационния труд	89
Участия в научни проекти по темата на дисертационния труд	91
Цитирания на статиите от дисертационния труд	91

Списък на най-често използваните съкращения

На кирилица:

БА	–	Болест на Алцхаймер
ЛПО	–	липидна пероксидация
ЛК	–	липоева киселина
М	–	миртенал
НО	–	начално обучение
ХБ	–	хексобарбитал
ХЕБ	–	хемато-енцефална бариера
ЦНС	–	централна нервна система

На латиница:

ACh	–	ацетилхолин
AChE	–	ацетилхолинестераза
CAT	–	каталаза
ChAT	–	холинацетилтрансфераза
CYP450	–	цитохром P450
DA	–	допамин
EMA	–	Европейска лекарствена агенция
GABA	–	гама-аминомаслена киселина
GPx	–	глутатион пероксидаза
GR	–	глутатион редуктаза
GSH	–	глутатион
MDA	–	малондиалдехид
ROS	–	реактивни кислородни видове
SOD	–	супероксид дисмутаза
tGSH	–	тотален глутатион

I. ВЪВЕДЕНИЕ

През вековете хората са натрупвали емпирични знания за лечебните свойства на растенията. И в днешно време немалка част от населението на Земята използва предимно продукти от природен произход за първично лечение на различни болести. Лечебните дроги съдържат висок процент биологично-активни вещества. Богати са на разнообразни химични съединения като алкалоиди, гликозиди, сапонини, полизахариди, танини, флавоноиди, лигани, кумарини, етерични масла, терпени, феноли, витамини, органични и неорганични киселини, микроелементи и баластни вещества. Всички тези активни компоненти оказват мощно влияние върху метаболитните процеси при човека, на което се дължи постоянно нарастващия интерес към тях. От друга страна, е стремежа за ограничаване на синтетичните и полусинтетичните лекарствени препарати, в резултат на доказани техни нежелани ефекти и по-висока токсичност. Голяма част от съвременните лекарствени средства са синтезирани в лабораторна среда аналози на растителни биологично-активни вещества. По данни на Newman and Cragg (2007) за период от 25 години (1981 - 2006 г.), благодарение на усилията за разработване на натурални продукти като потенциални терапевтици, в практиката са въведени редица лекарства с природен произход, които съставляват 63 % от всички регистрирани фармакотерапевтични агенти. Изследването на фармакологичния профил на малко познати и/или недостатъчно проучени досега биологично-активни вещества, е стъпка към въвеждането на нови и по-ефективни лекарствени продукти в клиничната практика.

След идентифицирането на Болестта на Алцхаймер през 1906 г. много научни екипи работят върху терапевтичното повлияване, но независимо от това все още не е разработено ефективно средство за лечение на невродегенеративните заболявания. Най-важната причина за това е комплексността на болестния процес, който включва различни патогенетични механизми, в т. ч. такива, свързани с околната среда и с генетични предразположения. Тези заболявания имат многообразен характер поради различните фактори, допринасящи за тяхното прогресиране или т. нар. мултифакторна патоетиология. На този етап наличните и използвани лекарствени продукти са ефективни в известна степен при симптоматичното повлияване на невродегенеративните изменения. Ето защо, откриването на биологично-активни вещества с потенциални ефекти за терапия и превенция на невродегенеративните увреждания, в т. ч. Болестта на Алцхаймер, е важно направление в съвременната експериментална наука.

Лечебното действие на растенията в преобладаващата част от случаите се дължи на компоненти на етеричните им масла. Етерично-маслените растения намират широко приложение във фармацевтичната и хранително-вкусовата промишленост, в парфюмерията и козметиката (лавандулово, розово, лайково, ментово, здравецово и други етерични масла) (Strehle et al., 2006), в ароматерапията, както и в различни области на медицината. В етеричните масла се съдържат активни принципи с разнообразно фармакологично действие (противовъзпалително, диуретично, спазмолитично,

антисептично, карминативно, успокояващо). Дразнещите свойства на някои от тях върху лигавицата на гастро-интестиналния тракт засилва слюнчената и стомашната секреция, с което се подобрява храносмилането (канела, карамфил, джоджен и други). Етеричните масла от розмарин и бор, включени в състава на някои лекарства, се прилагат външно при простудни заболявания.

Терпените (терпеноиди, изопреноиди) са най-голямата група от природни продукти, представени във всички класове живи организми. Терпеноиди, които притежават биологична активност, се използват като лекарствени продукти – таксаните притежават противотуморна активност, артемизин – антималярийна, а други – противовъзпалителна, антибактериална и противовирусна активност. Широко използван при заболявания на горните дихателни пътища например, е лекарственият продукт GeloMyrtol (капсули), съдържащ стандартизирана смес от терпените лимонен, цинеол и α -пинен. С подобно приложение е Tavipec (капсули), съставен от лавандулово масло. Algesal (крем при мигалгия) е лекарствен продукт за прилагане върху кожата, в състава на който е включен локалният анестетик Myrtecaine (конюгат на Lidocaine с монотерпеноида миртенал, метаболит на α -пинен). Терпеноидите гинзенозиди, гинколиди и канабиноиди показват обещаващи *in vitro* и *in vivo* биологични активности, но при тях все още липсват клинични проучвания (Wang et al., 2010). Освен това, други терпеноиди, включително иридоидни гликозиди, олеанолова киселина, тенуифолин, криптотаншинон и урсолова киселина, са в предклиничен етап на изследване (*in vitro* и *in vivo* върху животински модели). Механизмите им на действие са различни – повлияване активността на ацетилхолинестеразата, намаляване $A\beta$ -агрегацията, намаляване на оксидативния стрес по различни механизми и други (Yoo and Park, 2012).

Интересен и перспективен обект за по-обстойни проучвания е класическият представител на нискомолекулните монотерпени – миртенал, вторичен метаболит на α -пинена. Съдържа се в етеричните масла на редица растения – *Myrtus communis*, *Artemisia spp.*, *Origanum majorana*, *Origanum vulgare*, *Glycyrrhiza glabra*, *Rozmarinus officinalis*, *Thymus spp.*, *Salvia officinalis*, *Lavandula spp.*, както и в пчелния клей (прополиса).

Изследванията върху биологичните свойства на миртенала и свързаните с тях ефекти, са насочени предимно към повлияване експериментални модели на различни заболявания – диабет, тумори, псориазис и други. В експериментални условия са открити бронходилататорни, противовъзпалителни, антиагрегантни и антихемолитични, антибактериални, а също противотуморни, анти-ацетилхолинестеразни и антималярийни фармакологични активности. Установено е индуциране на вазодилатация, намаляване на сърдечната честота, наблюдавани са и хипотонични ефекти.

В областта на невронауките монотерпеноидът е сравнително малко изучен. Информацията за невробиологичните свойства на миртенал са оскъдни. През последните години се появяват нови единични съобщения за позитивни ефекти на етерични масла, съдържащи миртенал, върху паметта на експериментални гризачи. Съществува хипотеза за наличие на ефекти на миртенал, а също и на негови новосинтезирани аналози върху ЦНС, в резултат на взаимодействието с GABAА-рецептори при гризачи. С вероятен

централен механизъм на действие се свързват и наблюдаваните анксиолитични свойства на етеричното масло от мирта, сравними с тези на бензодиазепиновия препарат Diazepam.

Нарастват доказателствата в подкрепа на твърдението, че невродегенеративните разстройства, като Болестта на Алцхаймер, се медиират от разрушаване на холинергичните неврони и повишен оксидативен стрес. По тези причини вниманието е съсредоточено върху търсенето на антиоксидантни природни вещества с комбиниран механизъм на действие за превенция и/или лечение на Болестта на Алцхаймер, способни да укрепят холинергичната функция и капацитета на антиоксидантна защита. Особен интерес предизвиква потенциалът на миртенала за повлияване трасмитерната медиация в мозъка, но наличната в литературата достоверна информация за ефектите му върху нивата на основни мозъчни невротрансмитери е твърде ограничена. Установените *in vitro* инхибиторни ефекти на монотерпеноида върху активността на ацетилхолинестеразата – ензимът, отговорен за регулиране нивата на ацетилхолин в холинергичния синапс, са основание да се предположи наличието на позитивни ефекти върху паметта на гризачи с индуцирана деменция. Към този момент не са намерени данни за въздействието на миртенал върху експериментални животински модели на невродегенерация.

Провеждането на различни по вид изследвания – фармакологични, токсикологични и невробиологични, особено важни за изучаване ефектите на миртенала при здрави гризачи и при експериментален модел на деменция от Алцхаймеров тип може да бъде принос, както за верификация и допълването на данни от съществуващи проучвания, така също и за разкриване на нови механизми на действие на монотерпеноида при невродегенеративни увреждания.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на дисертационния труд е фармакологично, токсикологично и невробιологично охарактеризиране на миртенал в експериментални условия *in vivo*, проучване на превантивните му ефекти и изследване механизмите на невропротективно действие при модел на индуцирана деменция от Алцхаймеров тип при гризачи.

От така формулираната цел произтичат следните задачи:

I. Проучване ефектите на миртенал при здрави гризачи

1. Токсикологични изследвания на миртенал

- Определяне на средна летална доза (LD₅₀ i.p.) за мишки
- Проучване на пролонгираната токсичност при мишки, след третиране с токсични дози

2. Изследване на основни фармакологични ефекти на миртенал върху ЦНС при лабораторни гризачи (мишки и плъхове)

- Ефекти при комбинирано приложение с потискащи ЦНС моделни медикаменти
- Анксиолитични свойства на миртенал
- Обезболяващи ефекти на миртенал при различни модели на болка

3. Изследване невробιологичните ефекти на миртенал с поведенчески тестове при лабораторни гризачи (мишки и плъхове)

- Ефекти върху паметта и обучението, нервно-мускулната координация и проучвателната активност

-

4. Биохимични ефекти на миртенал в мозък на експериментални гризачи

- Антиоксидантна активност
- Промени в активността на ацетилхолинестеразата
- Проучване невромодулаторните свойства на миртенал

II. Верификация на модел на скополамин-индуцирана деменция

1. Поведенческа, биохимична и хистопатологична верификация на модела на скополамин-индуцирана деменция при лабораторни мишки и плъхове

III. Проучване ефектите на миртенал при гризачи с индуцирана от скополамин деменция

1. Оценка на превантивните ефекти на миртенал върху две модификации на експериментален модел на деменция при гризачи

- Невропротективно действие на миртенал при *мишки* в нарастващи дози
- Невропротективно действие на миртенал при *плъхове* в различни експериментални постановки

2. Механизми на невропротективното действие на миртенала

- Ефекти върху холинергичната медиация: изследване активността на AChE и нивата на медиатора ACh в мозък на дементни гризачи
- Ефекти върху оксидативния статус в мозък на дементни гризачи

IV. Сравняване ефектите на миртенала при здрави и при дементни експериментални гризачи

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Експериментални животни

Опитите са проведени върху мъжки половозрепи ICR мишки (18 ÷ 22 g) и мъжки половозрепи плъхове от порода Wistar (180 ÷ 220 g). Животните са отглеждани при стандартни лабораторни условия в пластмасови клетки – 12-часов цикъл светло/тъмно, неограничен достъп до питейна вода и храна за гризачи, осигурени оптимална температура, влажност и вентилация на помещенията. Експерименталните процедури са извършени в съответствие с правилата за работа с експериментални животни на Комисията по етика на БАБХ и на националните закони и правила (Наредба № 20 от 01.11.2012 г. за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им, в сила от 01.01.2013 г., издадена от Министерство на Земеделието и храните, Обн. ДВ бр. 87 от 09.11.2012 г.), основаващи се на Европейската директива и в съответствие с правилата за работа с лабораторни животни на Комисията по етика на Институт по невробиология към Българска академия на науките.

За целите на проучването са използвани 228 мишки и 154 плъха (общо 382 експериментални животни).

2. Фармакологични средства

В експерименталните процедури са използвани следните вещества и разтвори:

- **Алфа-липоева киселина** (Alfa-lipoic acid, Thioctic acid) – инжекционен разтвор 600 mg/50 ml флакони Thiogamma Turbo-Set (WÖRWAG PHARMA), Lot: 16J171
- **Барбитал натрий** (Barbital Sodium) – предоставен от ИНБ – БАН
- **Галантамин** (Galantamine) – инжекционен разтвор 10 mg/ml, ампули 1 ml Nivalin (Sopharma), Lot:11215
- **Диазепам** (Diazepam) – предоставен от ИНБ – БАН
- **Миртенал** – (-)-Myrtenal 98 %, ACRÔS Organics, Lot: A0363097
- **Оцетна киселина (ледена)** (Acetic acid) – ч.з.а., чистота ≥ 99.8 %, 2.5L, Sigma-Aldrich
- **Скополамин** (Scopolamine) – ACRÔS Organics, Lot: A0354964
- **Физиологичен разтвор** (0.9% NaCl) – банка 0.9 % NaCl, 500 ml, BRAUN
- **Флумазенил** (Flumazenil) – инжекционен/инфузионен разтвор с концентрация 0.1 mg/ml, 5 ml, Anexate, Рош България ЕООД
- **Хексобарбитал натрий** (Hexobarbital Sodium) – предоставен от ИНБ – БАН

3. Експериментален модел на химически-индуцирана деменция при опитни гризачи

Експерименталният протокол за предизвикване на химически-индуциран модел на деменция от Алцхаймеров тип включва ежедневно интраперитонеално третиране на лабораторните животни със скополамин по едно и също време на денонощието, за период от 11 дни, в дози, съответно 0.5, 1.0, 1.5 и 3.0 mg/kg т.м. при мишки и 1.0 mg/kg т.м. – при плъхове. С цел имитиране на нелинейна прогресия на предизвиканите увреждания допълнително е разработена дозова комбинация при плъхове, при която скополаминът се прилага в доза 0.1 mg/kg за 8 дни, а на 9-я, финален ден – еднократно в доза 20.0 mg/kg. Стандартно при мъжките зрели ICR мишки скополаминът се въвежда в обем 0.1 ml/10 g, а при мъжките Wistar плъхове – в обем 0.5 ml/100 g с индивидуални спринцовки при отделни инокулации.

Експериментът включва поведенчески тестове, използвани за проследяване състоянието на животните – за памет и обучение, пространствена ориентация и нервно-мускулна координация; биохимични и хистопатологични (в кора и хипокамп) изследвания. За проучване ефектите на холиноблокера върху телесните маси на гризачите, както и изменението в относителните тегла на важни органи (мозък и черен дроб), след приключване на поведенческите тестове в края на третирането гризачите се евтаназират, при спазване на изискванията за хуманно отношение към експерименталните животни. Мозъците на мишките и на плъховете се отпрепарират бързо, претеглят се веднага след декапитацията и се подготвят (по описаните методики) за съответните изследвания – биохимични и хистопатологични (в кора и хипокамп).

4. Изследване ефектите на миртенал при здрави мишки и плъхове

4.1. Определяне на остра и пролонгирана токсичност на миртенал при мишки след интраперитонеално приложение в еднократна висока доза

Определянето на средната летална доза (LD_{50} i.p.) на миртенал за мишки е извършено по метода на Litchfield and Wilcoxon (1949). Изчисленията и построяването на логаритмичната регресионна права са направени на база съотношението на двете променливи величини – установения ефект (смъртността, %) от приложената доза или броя загинали животни в група от приложената доза (Thompson and Weil, 1952; Alaoui et al., 1998). Използвана е функцията Logit Analysis for MS Excell. Животните ($n = 12$) са инжектирани еднократно с три високи дози (170, 200 и 220 mg/kg) от изследваното вещество, най-ниската от които е установената LD_{50} на миртенал за мишки при интравенозно приложение. Наблюдавани са 7 денонощия. Екзитиралите гризачи, след дисекция, са изследвани макроскопски *post mortem* за установяване причините за смъртта.

4.2. Проучване ефектите на миртенал върху телесните маси и относителните тегла на важни органи при експериментални гризачи

- Ефекти върху телесните маси и относителните мозъчни и чернодробни тегла при *мишки* след многократно 5- и 11-дневно приложение на миртенал в доза 20 mg/kg
- Ефекти върху телесните маси при *плъхове* след многократно 5-дневно приложение на миртенал в доза 30 mg/kg
- Ефекти върху телесните маси при *плъхове* след многократно 9-дневно приложение на миртенал в доза 40 mg/kg

4.3. Проучване ефектите на миртенала върху ЦНС:

Изследвани са свойствата на миртенал да потенцира потискащите ЦНС ефекти на барбитурати и бензодиазепини.

- Потенциране ефектите на барбитуратите – използваните плъхове (n = 24), са разпределени в група по 6 броя. Животните от всяка група са третирани, съответно с хексобарбитал (100 mg/kg); комбинация от хексобарбитал и миртенал (20 mg/kg); барбитал (225 mg/kg); комбинация от барбитал и миртенал (20 mg/kg). Изследването е извършено по метода на Simon et al. (1982)

- Ефекти при комбиниране с Diazepam – плъховете (n = 16) са разпределени в 2 групи по 8 броя: контроли, инжектирани с Diazepam и група животни, третирани с комбинация от Diazepam и миртенал (30 mg/kg). За проследяване състоянието на животните при възстановяване от хипноза на половината плъхове от втората група, по време на събуждане от сън, е приложен Flumazenil (бензодиазепинов анатагонист) в доза 0.5 mg/kg

Оценен е анксиолитичният потенциал на миртенал при самостоятелно приложение.

- Проучване ефектите на миртенал върху ЦНС при самостоятелно приложение – изследване анксиолитичната му активност при *мишки* след остро и многократно (7- и 14-дневно) приложение в доза 30 mg/kg с Тест със заравяне на топчета (*Marble burying test*) (Njung'e and Handley, 1991)

4.4. Проучване обезболяващите ефекти на миртенала при *мишки* след остро и многократно 7- и 14-дневно приложение в доза 30 mg/kg – модел на болка с централен механизъм с Тест с нагорещена плоча (*Hot plate test*) и модел на висцерална болка с Тест за периферна болкова сетивност (*Acetic acid writhing test*)

4.5. Проучване ефектите на миртенала върху паметта и обучението, нервно-мускулната координация и изследователското поведение при здрави животни

- Ефекти на миртенал при *мишки* след остро и многократно 5- и 11-дневно приложение в доза 20 mg/kg върху паметта и обучението (*Step through test*), нервно-мускулната координация (*Rota rod test*) и проучвателната активност/пространствена ориентация (*Hole board test*)

- Ефекти на миртенал при *плъхове* след остро и многократно 5-дневно приложение в доза 30 mg/kg върху паметта и обучението (*Step through test*), и нервно-мускулната координация (*Rota rod test*)

4.6. Проучване ефектите на многократното приложение на миртенала върху основни биохимични параметри в мозъка – определяне концентрация на продуктите на ЛПО, активността на мозъчната АСhЕ и концентрацията на медиатора АСh в мозъка на гризачите

5. Изследване ефектите на миртенал при модел на невродегенеративно увреждане

За сравняване свойствата на миртенала да коригира измененията, предизвикани от токсичния агент скополамин, са използвани референтите галантамин (антихолинестеразен препарат) и липоева киселина (антиоксидант).

За проучване ефектите на миртенала върху паметта и обучението е използван *Step through test*, върху разпознавателната памет – *Novel object recognition test*, за нервно-мускулната координация при мишките и плъховете със скополамин-индуцирана деменция – *Rota rod test*, за проучвателната активност/пространствената ориентация – *Hole board test* и *Open field test*.

5.1. Проучване ефектите на миртенала при експериментални мишки със скополамин-индуцирана деменция

- Проучване измененията в телесните маси, състоянието на паметовите и обучителните способности, координацията и изследователското поведение на мишките, след многократно 11-дневно третиране със скополамин в доза 1.5 mg/kg; скополамин (1.5 mg/kg) и миртенал в дози 10, 20 и 30 mg/kg; скополамин (1.5 mg/kg) и ЛК в доза 30 mg/kg (самостоятелно или в комбинация с миртенал)

- Проучване измененията в телесните маси, състоянието на паметовите и обучителните способности, оксидативния статус в мозъка на мишките с проследяване

нивата на продуктите на ЛПО, tGSH и активността на ензимите CAT, SOD и GPx, след многократно 14-дневно третиране със скополамин (1.0 mg/kg); скополамин (1.0 mg/kg) и миртенал в дози 30, 40 и 50 mg/kg; скополамин (1.0 mg/kg) и ЛК в доза 30 mg/kg (самостоятелно или в комбинация с миртенал)

5.2. Проучване ефектите на миртенала при експериментални плъхове със скополамин-индуцирана деменция

- Проучване състоянието на паметта, обучителните способности и изследователското поведение на плъховете, след многократно 11-дневно третиране със скополамин (1.0 mg/kg); скополамин (1.0 mg/kg) и миртенал в доза 40 mg/kg; скополамин (1.0 mg/kg) и галантамин в доза 1.0 mg/kg; скополамин (1.0 mg/kg) и ЛК в доза 30 mg/kg (самостоятелно или в комбинация с миртенал)

- Проучване измененията в телесните маси, състоянието на паметовите и обучителните способности, двигателната активност, оксидативния статус в мозъка на плъховете с проследяване нивата на продуктите на ЛПО, tGSH и активността на ензимите CAT, SOD и GPx; изследване на невромодулаторните ефекти на миртенал чрез определяне нивата на базовия мозъчен невротрансмитер ACh в мозъка; хистопатологични изследвания в мозъчни срези при дементните плъхове, след многократно 9-дневно третиране със скополамин в дозова вариация (0.1 mg/kg в 8 последователни дни и еднократна доза 20 mg/kg в последния 9-и ден); скополамин (дозова вариация) и миртенал в доза 40 mg/kg; скополамин (дозова вариация) и галантамин в доза 1.0 mg/kg (самостоятелно или в комбинация с миртенал); скополамин (дозова вариация) и ЛК в доза 30 mg/kg (самостоятелно или в комбинация с миртенал).

5.3. Проучване ефектите на многократното приложение на миртенал върху основни параметри на оксидативния стрес в мозъка – определяне концентрация на продуктите на ЛПО, съдържание на tGSH, активност на антиоксидантните ензими SOD, CAT и GPx

5.4. Изследване състоянието на холинергичната трансмисия – определяне активността на мозъчната AChE и концентрацията на медиатора ACh

6. Поведенчески експериментални протоколи при здрави животни

6.1. Методи за изследване ефектите на миртенала върху ЦНС

6.1.1. Метод за изследване на тревожността (*Marble burying test, MBT*) (Njung'e and Handley, 1991)

Моделът се използва за изследване на безпокойството. Основава се на наблюдението, че плъхове и мишки заравят вредни или непознати за тях предмети, което се възприема като знак за тревожност – неофобия. Броят заровени топчета – преди и след прилагане на фармакологично-активните субстанции, е показател за нивата на тревожност. След третиране на експерименталните гризачи с анксиолитични вещества (например бензодиазепини), броят на заровените обекти намалява.

Проучването за наличие на собствени ефекти на миртенал върху ЦНС е проведено на три етапа – остро, 7- и 14-дневно третиране на експерименталните гризачи с миртенал в доза 30 mg/kg т.м. Експериментът е проведен с мъжки ICR мишки.

6.1.2. Метод за изследване наличието на потискащи ефекти върху ЦНС (Simon et al., 1982)

Наличието на потискащи ефекти върху ЦНС се оценява чрез измерване времето за настъпване на сън (латентно време) и продължителността на съня при мъжки полово зрели Wistar плъхове.

След еднократно остро приложение на хипнотичния препарат (барбитурати, бензодиазепини) се отчита времето, за което всяко животно, поставено деликатно по гръб, губи рефлекс си за изправяне – латентно време. Отбелязва се времето на събуждане, проявяващо се с изправяне на гризача. Продължителността на съня (мин) се изразява като времеви интервал между загубата на рефлекс и възстановяването му.

6.2. Методи за изследване на болковата сетивност

6.2.1. Тест за периферна болкова сетивност при мишки (*Acetic acid writhing test*) (Koster et al., 1959; Collier et al., 1968)

Тестът с ледена оцетна киселина, по същество, представлява химически метод, използван за предизвикване на болка от периферен произход при мишки. В случая, аналгетичният ефект се оценява чрез индуциране на висцерална болка и по-конкретно, на абдоминални спазми (традиционно стимулирано от болка поведение). При изследване ефектите на тестваното вещество при остро и/или многократно 7- и 14- дневно приложение (пре-третиране), 30 минути след третирането, се индуцира болка чрез интраперитонеално инжектиране на разтвора на оцетната киселина в обем 0.1 ml/10 g т.м. Мишките се наблюдават в продължение на 20 минути, като броят на абдоминалните спазми се отчита на 5-та, 10-та, 15-та и 20-та минута след въвеждането на киселината. Показател за аналгетичната активност на тестваното съединение е намаляване честотата на спазмите.

6.2.2. Тест с нагорешена плоча (*Hot plate test*) (Eddy and Leimbach, 1953)

Тестът се използва в базовите изследвания на термично индуцирана болкова чувствителност от наркотичен тип/болка с централен произход и нейното повлияване при гризачи. Регистрират се ноцицептивните отговори при мъжки ICR мишки, поставени върху нагряваема суха повърхност, при поддържане на постоянна температура 55 C° (± 3 C°). Изследването се провежда след еднократно приложение на изследваното вещество, както и 24 часа след последното въвеждане при продължително третиране. Тестването започва 60 минути след инжектирането. Отчитат се броя облизвания на задните лапи и скоковете на гризача за определен период от време. Наблюдаваните реакции на индуцирания термичен стимул се считат за супраспинални. По отношение аналгетичните свойства на нови вещества показателно се явява, както облизването на лапите, така и намаляването броя на скоковете, което по-често отразява локомоторните ефекти. Скачането представлява по-сложен отговор и включва емоционалния компонент на бягството (Espejo and Mir, 1993).

7. Поведенчески експериментални протоколи при здрави и дементни гризачи

7.1. Методи за изследване на паметовите способности

7.1.1. Тест за памет и обучение (*Step through/Passive Avoidance test*) (Jarvik and Kopp, 1967)

При този тест, за да избегне електрически ток в стъпалата, гризачът трябва да се научи да остава в ярко осветеното отделение на апарата и да не влиза в предпочитаното тъмно отделение. За целите на проучването са използвани мъжки полово зрели ICR мишки и Wistar плъхове. Измерва се латентното време, т. е. времето, след което животното се придвижва в тъмното помещение. Латентно време от 180 секунди се използва като критерий за обученост. Тестът се провежда в два етапа – начално обучение преди третирането с изследваните вещества и финално тестване на 24-ия час след края на приложението им.

7.1.2. Тест за разпознаване на нови обекти – състояние на разпознавателната памет (*Novel object recognition test*) (Aggleton, 1985; Ennaceur and Delacour, 1988)

Тестът изследва работната памет – базира се на разпознаването на познати и нови обекти, и се счита за слабо повлиян от неспецифични двигателни стимули. Използва се вроденото любопитство на гризачите, при което се разчита предимно на склонността им

да изследват нещо ново, непознато за тях. Експериментът се провежда с мъжки полово зрели Wistar плъхове. Отчита се времето, отделено за проучване на непознатия (нов) предмети за период от 5 минути, което отразява състоянието (степената на използване) на разпознавателната памет. Изчислява се т. нар. дискриминационен индекс, който представлява съотношение между времето (t), отделено за изследване на новия обект и сбора от времената за изследване на стария и новия, или: $ДИ = t(\text{стар}) / t(\text{стар} + \text{нов})$. Стойностите на ДИ варират от 0 до 1. $ДИ > 0.5$ означава, че субектите помнят и различават предметите, а $ДИ < 0.5$ е показателен за увреждане на разпознавателна памет.

7.1.3. Методи за изследване на двигателната и проучвателната активност

7.1.3.1. Тест на откритото поле (*Open field test, OFT*) (Walsh and Cummins, 1976)

Методът осигурява едновременно отчитане на двигателната и изследователската активност на изследвания субект. Високата честота на наблюдаваните поведенчески феномени (брой на пресичанията на обозначените върху полето линии и на изправяне на животните на задни лапи) показва повишена двигателна и изследователска активност. Тестът се извършва върху мъжки полово зрели Wistar плъхове. Провежда се начално обучение. Повторното тестване, което се извършва на 24-я час след края на третирането с изследваните вещества, позволява да се оцени базовата активност на животните и нейната промяна в отговор на приложението им.

7.1.3.2. Тест за нервно-мускулна координация (*Rota rod test*) (Jones and Roberts, 1968)

По време на тестването гризачите се подлагат на принудителна двигателна активност. Използват се мъжки, полово зрели Wistar плъхове и ICR мишки. Отчита се времето на престоя им (до 180 sec) преди да паднат от въртящия се цилиндър. Продължителността на задържане е мярка за баланс, издръжливост, моторна координация и физическо състояние на гризачите. На всяко животно се провежда първоначално обучение преди началото на инжектирането с изследваните вещества. Тестът за отчитане на измененията в баланса и координацията за периода на наблюдение (до 180 sec) се провежда отново – 24 часа след последното третиране, чрез измерване времето на задържане върху въртящата се ос.

7.1.3.3. Тест за пространствена ориентация (*Hole board test*) (Boissier and Simon, 1964)

Експерименталният протокол се базира на вроденото изследователско поведение на гризачите, поставени в нова среда – стереотипа на „потопяне“ на главата до ушите в дупките, разположени по пода на постановката. Проследява се честотата на тази активност и нейните вариации. При повтарящи се опити степента на изучаване на обстановката и

ориентирането в пространството (разпознаване на позната обстановка) намалява, което е показател за познаване (памет). Тестът се провежда с мъжки полови зрели ICR мишки и Wistar плъхове в два етапа – начално обучение и тестова фаза, 24 часа след последното третиране.

8. Биохимични изследвания

Гризачите (мишки и плъхове), след провеждане на тестовете, са евтаназирани с въглероден диоксид и са изследвани основни биохимични показатели в мозъка.

8.1. Методи за изследване на мозъчния оксидативен статус

Изследванията са извършени в лаборатория „Свободно – радикални процеси“ при ИНБ – БАН, под ръководството на доц. д-р А. Александрова.

Определени са белтък (Lowry (1951), нива на продуктите на липидна пероксидация (Hunter et al., 1963), тотален глутатион (Tietze, 1969), активност на супероксиддисмутаза (Beauchamp and Fridovich, 1971), активност на каталаза (Aebi, 1970) и активност на глутатионпероксидаза (Gunzler et al., 1972).

8.2. Метод за определяне нивата на медиатора ацетилхолин (Fellman, 1969; Козлов, 1999)

Изследванията са извършени във Факултет по медицина при Медицински университет – София, от м. ф. Р. Клисуров, д. ф.

8.3. Метод за определяне активността на ензима ацетилхолинестераза в мозък (Ellman et al., 1961)

Изследванията са извършени в Научно-изследователска лаборатория по военна токсикология (НИЛВТ) при ВМА – София, Катедра „Бедствия и аварии“, под ръководството на проф. д-р Иван Съмналиев, д. м. н. и с активното съдействие на проф. д-р Христофор Дишовски, д. м. н.

8.4. Определяне на липиден профил

Пробите от кръвен серум на плъхове са обработени в медицинска лаборатория „Цибалаб“ – София, по стандартни методики. Изследвани са нивата на общ холестерол (Chol), триглицериди (TG), липопротеини с ниска плътност (LDL) и липопротеини с висока плътност (HDL).

9. Софтуерни докинг – изследвания

Изследванията са извършени от гл. ас. Марияна Атанасова, д. ф., в Лаборатория по лекарствен дизайн и биоинформатика при Фармацевтичен факултет, МУ – София.

9.1. Проучване афинитета на миртенал към ензима AChE

9.2. Проучване афинитета на миртенал към GABA_A-рецептора

10. Хистопатологични изследвания

Изследванията са извършени в Хистологична лаборатория към Катедра „Анатомия и клетъчна биология“ при Медицински университет – Варна, с разработен от доц. д-р Стоян Павлов, д. м., алгоритъм за софтуерна обработка на образите, получени от хистологичните проби от мозъка на експерименталните плъхове. Използвани са гризачите с деменция, индуцирана от предложената дозова модификация на скопламина, третирани с миртенал в доза 40 mg/kg за 9 дни.

За хистологичната оценка от мозъците на избрани, на случаен принцип, животни от всяка група, са изготвени серийни срези от мозъчните хемисфери с дебелина 10 μm , които са оцветени с Cresyl-violet по Kluwer-Barrera. Оцветените препарати са заснети с помощта на микроскоп Zeiss AxioImager Z2 с обектив Zeiss Neo-Fluar (ув. 20x; NA = 0.5) и камера AxioCam MR rev.3 при латерална резолюция на получените образи 0.3225 $\mu\text{m}/\text{px}$.

Хистопатологичното изследване на плъшите мозъци е проведено в определени области от крайния мозък, а именно: кора и хипокампадна формация. Морфологичната оценка на белезите за дегенерация (качествен анализ) е извършена от двама изследователи. Количественият анализ на оцветените с Cresyl-violet препарати включва: оценка на средната дебелина на кората; определяне средния брой на клетките на единица площ – измерена е средната обемна фракция на Cresyl-violet позитивните структури и средната гъстота (брой/ mm^2) на обектите, разделени в два класа според площта си (по-голяма или по-малка от $\sim 31 \mu\text{m}^2$).

Резултатите от измерванията са анализирани с линейна регресия в среда и език за статистическо моделиране R (R language and environment for statistical computing).

11. Статистически анализ

11.1. Анализ на хистопатологичните резултати – R Language and environment for statistical computing (version 3.5.2, July 2018)

Количественият анализ от хистопатологичните изследвания е извършен с помощта на R Language and environment for statistical computing (version 3.5.2, July 2018). Средните стойности на дебелина на кората, оптична плътност, обемна фракция и гъстота на профилите са сравнени между отделните групи животни с помощта на генерализиран линеен модел, в който категоричната независима променлива – “група според третирането”, е кодирана с фиктивни променливи (0 и 1) за всяка категория.

11.2. Математически модели за анализ на резултатите

На статистическа обработка са подложени два масива от данни (отнасящи се за здравите и за увредените гризачи), всеки от които се състои от множество групи и подгрупи поведенчески и биохимични показатели, получени в хода на експерименталното изследване върху плъхове и мишки. Като най-подходящ за обработката на този тип резултати е избран непараметричният метод и критерий на Ман-Уитни-Уилкоксон, неизползващ информация за статистическото разпределение и допускащ работа с малки бройки ($n \geq 3$). Критерият на Ман-Уитни-Уилкоксон е приложим за всички типове данни, които могат да се ранжират по някакъв признак, в т. ч. и за параметричните данни, с които разполагаме. Статистическият анализ, реализиран чрез програмния статистически пакет „R” и статистическите функции в „Excel 2016”, обхваща следните методи: *описателна статистика (диаграми и таблици)*, *непараметричен вариационен анализ* за сравняване на 2 параметрични променливи по критерия на Ман-Уитни-Уилкоксон, *директен едностранен вероятностен анализ по метода на Бернули* при бинарните променливи, *двустранно сравняване на относителните дялове* на качествени (непараметрични) показатели. Междугруповото и вътрешно-груповото сравняване на тези дялове се извършва по критерия на Стюdent (при предположение, че изследваните признаци се подчиняват на нормалното разпределение), и *корелационен анализ, рангов критерий на Спирмен*.

При сравняването на ефектите на изследваното вещество при здрави и при дементни животни е използван следния подход: големината на ефекта му при контролни условия се изчислява като разлика от средната стойност на изследваните параметри при здравите животни и единичните стойности за третираните с миртенал гризачи, аналогично и за гризачите с индуцирано увреждане се получава извадка от разликата на средната стойност при скополаминовите контроли и единичните стойности при дементните животни, третирани с миртенал. Двете извадки са сравнени статистически чрез t-Test за независими извадки с различна дисперсия и двустранно разпределение.

При всички проведени статистически анализи се приема допустимо ниво на доверителна вероятност $P < 0.05$, разделено на три възходящи класа: $P < 0.05$, $P < 0.01$ (висока сигнификантност) и $P < 0.001$ (много висока сигнификантност).

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Биологични и токсични ефекти на миртенал върху здрави експериментални гризачи

Предклиничните проучвания върху метаболизма на монотерпеноида и неговата безопасност са ограничени. Токсикологичната характеристика на миртенала не е достатъчно пълна и дава информация единствено за отсъствието на генотоксичност. Това, както и липсващи данни за острата и субхроничната токсичност при някои пътища на въвеждане са основание за провеждане на тези експерименти.

1.1. Токсикологични изследвания при миртенал. Определяне на LD₅₀ за мишки при интраперитонеално приложение

LD₅₀ е еднократната доза от конкретно вещество, която предизвиква смъртност при 50 % от експерименталните животни (Gehring, 1973). Към момента са установени средни летални дози (LD₅₀) на миртенал за мишки – 170 mg/kg след венозно приложение, за плъхове – 2300 mg/kg при перорално прилагане и за зайци > 5000 mg/kg при дермално третиране.

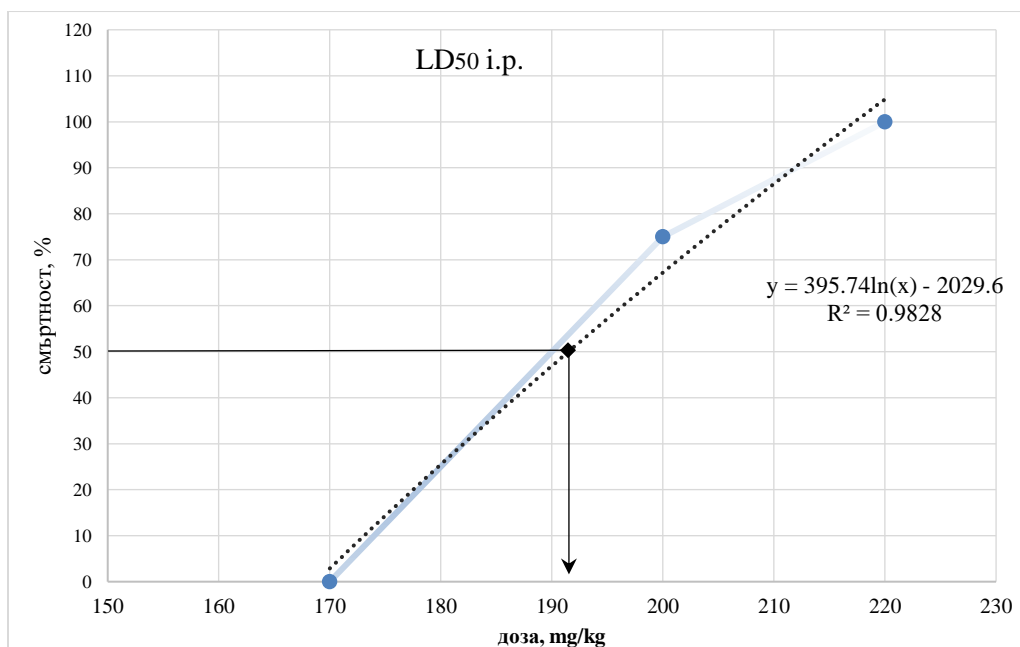
Не е определена LD₅₀ на миртенал за мишки при интраперитонеално въвеждане, което провокира настоящото изследване. За целта са използвани здрави мъжки половозрели ICR мишки. Миртеналът е инжектиран интраперитонеално под формата на емулсия, приготвена *ex tempore*. При спазване на основния принцип за намаляване броя на животните при *in vivo* експериментите (Up and Down процедура (UDP), Guideline 425, 1998 на ЕМА), лабораторните мишки (n = 12), разпределени в 3 групи по 4 броя, са третирани еднократно с високи дози от изследваното вещество, съответно 170, 200 и 220 mg/kg телесна маса. Изборът на дозите е съобразен с данните при другите пътища на въвеждане (Food and Chemical Toxicology, 1988), както и с наличната в литературата информация. Миртеналът е въвеждан в допустимите за мишки обеми 0.1 ml/10 g т.м., съгласно БДС.

Животните са наблюдавани в продължение на 7 дни, като преживяемостта в групите е отчетена на 1-я и 24-я час, на 5-я, 6-я и 7-я ден след еднократното третиране. На 1-я и на 24-я час липсва смъртност при всички приложени дози. Дозата от 170 mg/kg миртенал не се отразява на виталитета на изследваните животни до края на наблюдението, а тази от 200 mg/kg до 5-я ден не предизвиква смъртност, но на 6-я и 7-я ден състоянието на мишките се променя динамично – в края на периода за наблюдение преживелите в групата са 25 %. Най-високата доза от веществото (220 mg/kg) предизвиква рязко понижаване на преживяемостта още на 5-я ден (25 %), а на 6-я ден всички животни екзистират.

В литературата не се среща описание на симптомите при остро отравяне с миртенал при мишки. В проведения от нас експеримент картината на острата интоксикация, в резултат на еднократното третиране с различни токсични дози миртенал, включва

симптоми (преходни при по-ниските дози) като вокализация, цианоза, пристъпни гърчове, редуващи се с атаксия и абдоминални спазми вероятно поради локално дразнене. Причина за смъртта на мишките е предизвиканата асфикция с гърчове. Наблюдаваните токсични симптоми при парентералното приложение на миртенала, са сходни с описаната картина на острата токсичност при перорално приложение на високи дози α -пинен, чийто метаболит е миртенала.

Оценката на даните от експеримента и определянето на средната летална доза на миртенал след интраперитонеално приложение, са извършени по метода на Litchfield and Wilcoxon (1949). Изчисленията и построяването на логаритмичната регресионна права са направени на база съотношението на двете променливи величини – установения ефект (смъртността, %) от приложената доза (Фиг. 1) (Logit Analysis for MS Excell) (Thompson and Weil, 1952; Alaoui et al., 1998).



Фиг. 1. Изчисляване LD_{50} i.p. на миртенал за мишки при отчитане на смъртността (%) (експериментална линия – в синьо; логаритмична права – в черно)

Стойността на R^2 (коренът от средноквадратичното отклонение, rmsd – root mean square deviation) е статистически показател за това колко близо са данните от експеримента до регресионната линия. $R^2 = 1$ (100 %) или близки стойности, доказва, че моделът обяснява цялата променливост на данните за отговора около средната стойност.

Изчислената интраперитонеална LD_{50} на миртенал за мишки, на база на резултатите от острия опит и използваната методика, е 191.50 mg/kg. Според критериите за количествена оценка на токсичността, основана на средната летална доза, миртеналът при интраперитонеално приложение се определя като токсично вещество по класификацията

на Stallard and Whitehead (при $LD_{50} = 25 \div 200$ mg/kg) и като умерено токсично според тази на Hodge and Sterner (при $LD_{50} = 50 \div 500$ mg/kg).

Разликата в средната летална доза при венозно (170 mg/kg) и интраперитонеално (190 mg/kg) приложение на един и същ животински вид (мишки), разкрива възможно взаимодействие със структури на бариерните системи, които молекулата трябва да преодолее при резорбцията си. Тази особеност потвърждава наличните данни за афинитет на миртенала към мембранни структури на клетката и евентуална локализация на действието му.

1.2. Ефекти на миртенал върху телесните маси при експериментални гризачи

Промяната в общата телесна маса, както и в относителните тегла на важни органи при опитните животни, е един от основните показатели за оценка на токсикологичните свойства/особености на изследваното вещество.

Наблюдавани са мишки, третирани многократно (5 и 11 дни) с миртенал в доза 20 mg/kg. На 5-я ден се отчита повишение в изследвания показател, а на 11-я ден гризачите увеличават значимо (с 10.6 %) телесната си маса в сравнение с контролната група ($p < 0.05$). Подобно на мишките и плъховете, третирани с миртенал в доза 30 mg/kg за период от 5 дни, наддават нормално и дори с по-бързи темпове, в сравнение с контролите.

Особеностите в динамиката на телесните тегла позволяват да се изключи токсичен ефект при по-продължително 11-дневно приложение на монотерпеноида при мишки и насочват към нисък риск от токсичност при многократно 5-дневно приложение при плъхове. Това говори и за липса на анорексигенен ефект при здрави гризачи като нежелан ефект от повтарящото се ежедневно приложение на веществото.

По-продължителното 9-дневно приложение на изследваното вещество в по-високата доза (40 mg/kg), при плъховете предизвиква статистически значимо понижение в теглата на третираните с миртенал животни, в сравнение с контролната група ($p < 0.001$). Според нас загубата на тегло се дължи на потискане на апетита при плъховете, типично за повечето етерични масла. В малки дози те засилват слюнчената и стомашната секреция и подобряват храносмилането. Приложението им във високи дози обаче, предизвиква противоположни ефекти.

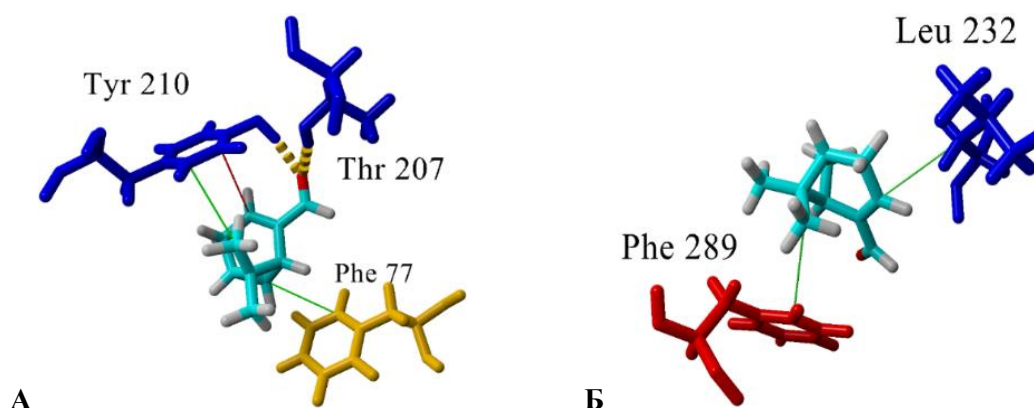
Проведените изследвания за първи път разкриват ефекти на миртенала при здрави гризачи – мишки и плъхове. Към този момент проучванията за изясняване механизмите на действие на монотерпеноида в световен мащаб са предимно върху модели на увреждане (посочени в литературния обзор).

2. Изследване ефектите на миртенал върху ЦНС при здрави експериментални гризачи

2.1. Докинг изследвания – човешки GABA_A-рецептор

Понастоящем поради липсата на известен конкретен таргет се приема, че действието на монотерпените е неспецифично. Çiçek (2018) обобщава потенциала на природни вещества с различни химични структури да повлияват GABA-рецепторите. Според автора монотерпените, между които и такива, които са метаболитно свързани с миртенала, като α -пинен и миртенол, притежават необходимите свойства за положителната или отрицателната модулация на GABA-рецептора (Çiçek, 2018).

На фигура 2 са представени междумолекулните взаимодействия на миртенала в двете места на свързване – класическото за бензодиазепините (А) и мястото на свързване с по-нисък афинитет (Б).



Фиг. 2. Междумолекулни взаимодействия на миртенала в БДЗ място на свързване (А) и в МС с по-нисък афинитет (Б)

Аминокиселинните остатъци от $\gamma 2$ -C⁻, $\alpha 1$ -D⁺ и $\beta 3$ -E⁺ веригите на GABA_A-рецептора са оцветени съответно, в жълто, синьо и червено; водородните връзки са представени чрез жълти прекъснати линии; р- π взаимодействието – чрез червена линия и Ван дер Ваалсовите взаимодействия – чрез зелени линии

Вижда се, че в класическото за бензодиазепините място на свързване миртеналът образува две водородни връзки с Thr207 и Tyr210 от $\alpha 1$ -D⁺ веригата. Въглеродният атом ³Csp² от двойната връзка на пиненовата структура на миртенала участва в р- π взаимодействие с Tyr210. Позицията допълнително е стабилизирана от две по-слаби Ван дер Ваалсови взаимодействия с Tyr210 и Phe77 от $\gamma 2$ -C⁻ веригата.

В мястото на свързване с по-нисък афинитет миртеналът образува слаби Ван дер Ваалсови взаимодействия с Leu232 от $\alpha 1$ -D⁺ веригата и Phe289 от $\beta 3$ -E⁺ веригата на GABA_A-рецептора.

В заключение миртеналът, подобно на Diazepam, участва в по-здрави междумолекулни взаимодействия, като водородни връзки и р- π контакти в класическото

за бензодиазепините място на свързване, което се отразява и на по-високата стойност на оценъчната функция. Това предполага по-висок афинитет на миртенала в бензодиазепиновото място на свързване.

2.2. Взаимодействие на миртенал с потискащи ЦНС медикаменти при плъхове

За изучаване ефектите на изследвания от нас монотерпеноид върху ЦНС, установени при други етерично-маслени компоненти, миртеналът е приложен при експериментални плъхове съвместно с потискащи ЦНС медикаменти (барбитурати и бензодиазепини), притежаващи различни механизми на действие.

2.2.1. Взаимодействие на миртенал с барбитурати

За целите на изследването, в качеството им на референти, са използвани два представителя на групата – хексобарбитал (Hexobarbital Sodium) и барбитал (Barbital Sodium). Те се характеризират с обща химична структура, но различните им субституенти определят разликите във фармакокинетиката, респективно във фармакотерапевтичните им ефекти. Поради седативните си свойства намират приложение като моделни субстрати за фармакологично изследване ефектите на нови вещества, приложени съвместно с тях. Този фармакологичен подход позволява да се определи дали ефектът на проучваното вещество се дължи на централни или на метаболитни механизми на взаимодействие с приложения барбитурат.

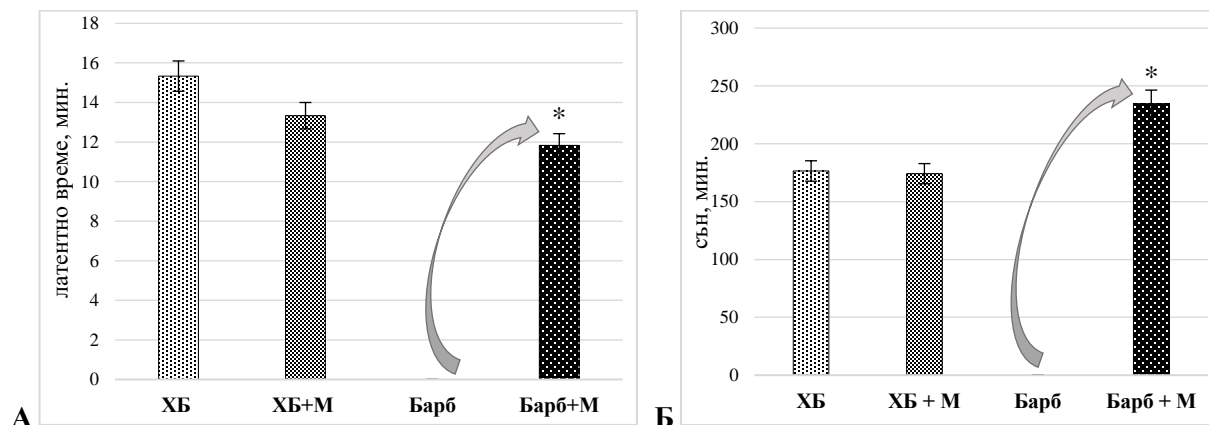
Хексобарбиталът (ХБ) претърпява екстензивен хепатален метаболизъм и е типичен субстрат на чернодробните CYP450-зависими монооксигенази. Всяко отклонение в продължителността на съня при комбинирането му с ново вещество ще означава, че последното също е субстрат на монооксигеназите, поради което ще промени биотрансформацията на ХБ, отчетено чрез разликите в предизвикания сън. В сравнение с хексобарбитала, барбиталът (Барб) не претърпява чернодробен метаболизъм и се излъчва около 98 % непроменен чрез урината (Stolman, 1965). Удължаване продължителността на наркозата при комбинирането му с друго вещество би означавало, че същото проявява предимно централни механизми на действие.

Различията в биотрансформацията на двата барбитурата са използвани в проведения от нас експеримент за проучване механизма на взаимодействие на миртенала с референтите и по-конкретно, да се отговори на въпроса: Променя ли миртеналът барбитуровия сън на ниво хепатален метаболизъм или зад това стоят централни ефекти.

След еднократно остро приложение на двата референта, самостоятелно и в комбинация с миртенал (М), са проследени: времето за настъпване на съня (латентно време) и продължителността на предизвикания сън (времето на събуждане). За целта плъховете (n = 24) са разделени в 4 групи. Сравнена е продължителността на съня при

групите, третирани с двата барбитурата в ефективните им хипнотични дози (100 mg/kg за ХБ и 225 mg/kg за Барб).

Резултатите от острото приложение на референтите (самостоятелно и в комбинация с миртенал в доза 20 mg/kg) са представени на фигура 3.



Фиг. 3. Повлияване хипнотичните ефекти при плъхове след остро приложение на барбитурати (самостоятелно и в комбинация с миртенал в доза 20 mg/kg) – отчитане на латентно време (мин) (А) и продължителност на съня (мин) (Б) (*P < 0.05 спрямо Барб) (t-Test)

При проследяване на времето, необходимо за заспиване (латентно време) е установено, че миртеналът при комбинирането му с ХБ намалява недостоверно показателя – с 13.05 % (Фиг. 3 А), без да повлияе продължителността на съня (Фиг. 3 Б). Барбиталът, приложен самостоятелно предизвика силна седация, без наркоза. Животните са трудно подвижни, но при обръщане по гръб възстановяват позицията на тялото си. Комбинирането му с миртенал обаче, индуцира наркоза с по-голяма продължителност (с 34.7 %) от тази, предизвикана при едновременното приложение на миртенала с хексобарбитал (Фиг. 3 Б). Отчетеното латентното време при групата плъхове, третирани едновременно с Барб + М е по-кратко с 11.25 % в сравнение с това при групата, инжектирани с ХБ + М.

Обобщените резултати са основание да бъде отхвърлена съществуваща хипотеза за взаимодействие на хексобарбитала с монотерпеноида на ниво чернодробен метаболизъм.

Отсъствието на значими ефекти на миртенала върху хексобарбиталовия сън и удължаващия му ефект върху барбиталовия сън, в условията на нашия експеримент, са в подкрепа на предположението, че механизмът на наблюдавания ефект е по-скоро централен, отколкото метаболитен.

2.2.2. Взаимодействие на миртенал с бензодиазепини

Бензодиазепините представляват група психоактивни вещества с анксиолитичен, седативен, антиконвулсивен и миорелаксиращ ефект. Diazepam е положителен алостеричен модулатор (на ниво GABA_A), потенциращ ефектите на GABA, което води до увеличаване честотата на отваряне на хлорните канали, респективно до хиперполяризация на невроналната мембрана. Поради това, че този клас лекарства, приложени самостоятелно, трудно предизвикват хипноза, за постигане на ефекта се препоръчва комбинирането на Diazepam с Ketamine Hydrochloride (общ анестетик).

Целта на експеримента, подобно на предходния, проведен с барбитуратите, е да се изясни капацитета на миртенала да повлиява ЦНС при комбинирането му с фармакологични агенти, чийто таргет е GABA_A-рецептора. Стандартната седативна доза на Diazepam е 3.0 ÷ 5.0 mg/kg. За постигане на по-дълбока седация и потискане на ЦНС при нашите опитни гризачи, която същевременно да не представлява риск за тях, е подбрана доза на Diazepam по-висока от стандартната. Съгласно протокола плъховете (n = 16) са разпределени в 2 групи по 8 броя – контролни, инжектирани с Diazepam в избраната от нас доза 30 mg/kg и група животни, третирани с комбинация от Diazepam и миртенал в доза 30 mg/kg. Монотерпеноидът е въведен 60 минути преди бензодиазепина, поради по-бавното действие на емулсията е по-бавно.

Както при третирането с барбитуратите, са отчитани настъпването на съня (латентно време) и продължителността на индуцираната хипноза, след остро приложение на изследваните вещества. Според очакванията гризачите, инжектирани само с Diazepam, са сериозно седирани, но без достигане на пълна хипноза. При 75 % (6 броя) от плъховете, третирани едновременно с Diazepam и миртенал, е наблюдавана хипноза със средна продължителност на съня от 16 минути.

За проследяване състоянието на животните при възстановяване от хипноза на половината плъхове от втората група, по време на събуждането от сън, е приложен бензодиазепиновия анатагонист Flumazenil, в доза 0.5 mg/kg (Suzuki et al., 1991). Поради структурното си сходство с бензодиазепините, последният има свойството да се конкурира с тях за мястото на свързване върху GABA_A-рецепторите. Това позволява да се проучи предполагаема взаимовръзка между GABA-ергичната медиация и монотерпеноида. След въвеждането на Flumazenil, още при първите симптоми на пробуждане, се наблюдава рязко ободряване и бързо възстановен мускулен тонус – без влачене на лапите и без атаксия.

В резултат на тези експерименти може да се предположи, че ефектите на миртенала се дължат и на взаимодействие на ниво GABA_A-рецептор. Подобни хипотези за повлияване на GABA-ергичната невротрансмисия във връзка с механизма на действие на новосинтезирани производни на миртенала са докладвани в литературата. Известна е и модулираща GABA-рецепторите активност на α -пинена (чийто метаболит е миртенала), осъществена чрез свързване с бензодиазепиновия локус (Yang H et al., 2016). Moreira et al. (2014) наблюдават анксиолитични ефекти на хидроксилното производно миртенол (друг метаболит на α -пинена) при плъхове. Експерименталните животни се възстановяват под

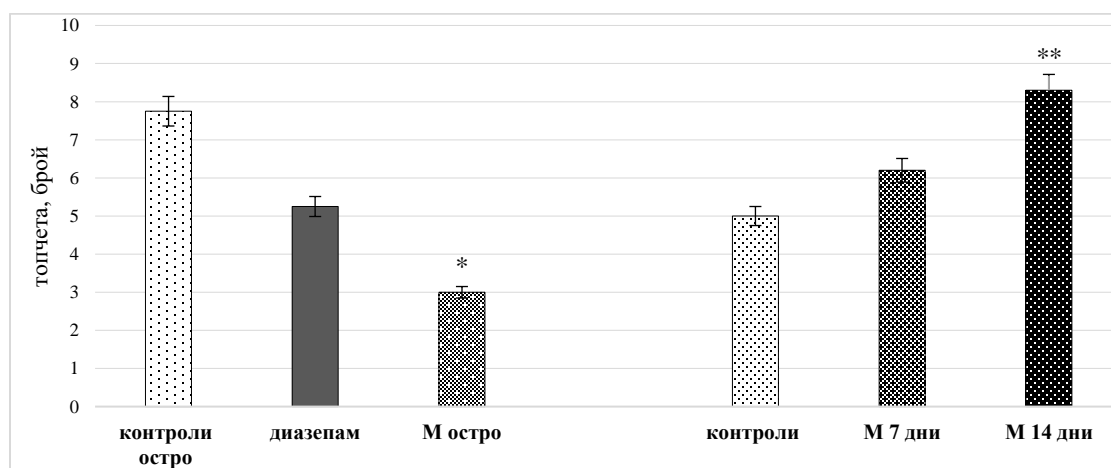
въздействието на Flumazenil, което според тях е показателно за афинитета на миртенола към GABA-рецепторите.

Резултатите от проведения остър опит с миртенал след приложение и на Flumazenil, които са аналогични на тези от проучванията с други кислород-съдържащи монотерпени, на практика насочват към възможни анксиолитични свойства на изследваното вещество.

2.3. Изследване ефектите на миртенал върху ЦНС при самостоятелно приложение. Проучване анксиолитичната активност на миртенал при мишки

Изследването е проведено в три етапа – остро, 7- и 14-дневно третиране на експерименталните гризачи с миртенал в доза 30 mg/kg. За оценяване на анксиолитичната активност е използван теста със заравяне на топчета (*Marble burying test*). При острото приложение мишките (n = 18) са разделени в 3 групи – контролна и 2 групи инжектирани, съответно с Diazepam в доза 1.0 mg/kg (*литературни данни*) и с миртенал в определената доза. След 30 минути е отчетен броя на заравените топчета.

Резултатите са представени на фигура 4.



Фиг. 4. Анксиолитична активност при мишки след остро и многократно 7- и 14-дневно приложение на миртенал в доза 30 mg/kg – отчитане брой заравени топчета (*P < 0.05, **P < 0.01 спрямо контролите)

При острия опит референтът Diazepam понижава гранично достоверно показателя – с 32.3 % спрямо контролите, докато при миртенала намаляването на броя заравени обекти (с 61.3 %) е статистически достоверно (p < 0.05). Регистрираното понижение при групата животни, третирани с миртенал, спрямо инжектираните с Diazepam, е с 42.8 %. Резултатите потвърждават по-силния афинитет на изследваното вещество към GABA_A-рецептора в сравнение с референта, установен при докинг-изследванията.

В литературата, до този момент, не е открита информация за възможни анксиолитични свойства на монотерпеноида.

Получените от нас резултати за наличие на анксиолитична активност на миртенала след еднократно прилагане при мишки, са подобни на тези, съобщени от Kapitsa et al. (2012), които установяват, че производните на миртенал с аминоксамантан демонстрират анксиолитична активност при мъжки мишки.

При многократното приложение, на 7-я ден, се наблюдава повишаване на показателя с 24 %. (Фиг. 4). Тенденцията се запазва, като най-силно изразена е на 14-я ден, когато при животните, третирани с миртенал, е установено статистически достоверно увеличаване на броя заровени топчета (със 66 %) спрямо контролните ($p < 0.01$). Това насочва към повишени нива на тревожност, в резултат на по-продължителното приложение.

На този етап липсват изследвания в посока повлияване на тревожността при субхронично приложение на монотерпеноида и/или на негови аналози. Получените резултати при експерименталните мишки показват, че за разлика от острия опит, миртеналът най-вероятно не проявява анксиолитични свойства след многократно приложение при теста със заравяне на топчета.

Извършеното проучване при експерименталните гризачи потвърждават данните от докинг-изследването за наличие на ефекти на миртенала върху ЦНС чрез повлияване на ГАВА-ергичната невротрансмисия.

3. Изследване неврофармакологичната активност на миртенал при здрави експериментални гризачи

В литературата не са открити данни за ефектите на миртенала върху болковата чувствителност при експериментални гризачи.

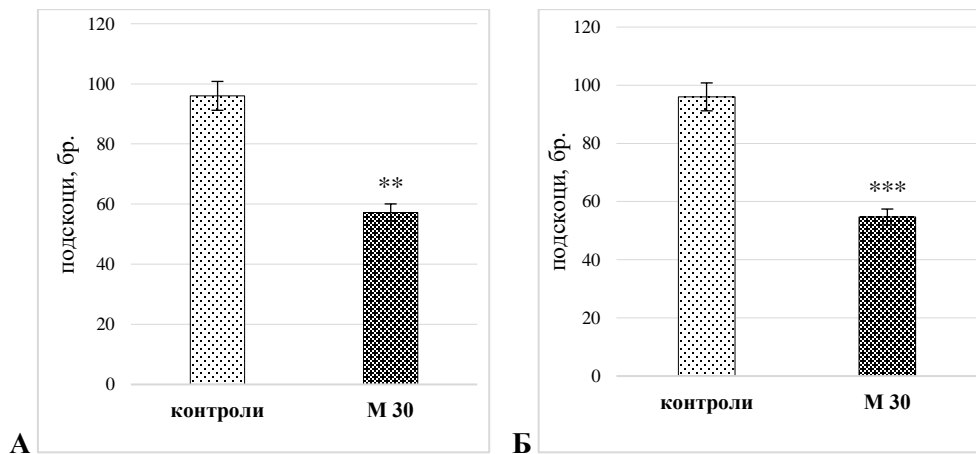
3.1. Изследване обезболяващата активност на миртенал при мишки, след остро и многократно приложение в доза 30 mg/kg – модел на болка с централен механизъм (*Hot plate test*)

При острото приложение мишките са инжектирани с миртенал в доза 30 mg/kg. Другите два етапа от експеримента включват ежедневно пре-третиране с монотерпеноида в същата доза, за период от 7 и 14 дни. Тестването е извършено 60 минути след въвеждането. Отчетени са броя облизвания на задните лапи и скоковете на гризача за период от 3 минути.

Наблюдаваните реакции спрямо индуцирания термичен стимул при теста с нагорещената плоча се считат за супраспинални (Parkhouse et al., 1975). Облизването на лапите е по-показателно спрямо аналгетичните свойства на нови вещества, докато намаляването броя на подскоците често отразява локомоторните ефекти. Скачането, от

друга страна, представлява по-сложен отговор и включва емоционалния компонент на бягството.

Еднократното третиране с миртенал не води до съществени промени в броя на подскоците спрямо тези при контролните мишки – понижението е с 3.12 % при липса на достоверност, докато многократното 7- и 14- дневно приложение предизвиква по-голямо изменение в показателите (Фиг. 5).



Фиг. 5. Ефекти на миртенал при мишки след 7-дневно (А) и 14-дневно (Б) приложение в доза 30 mg/kg – отчитане брой подскоци (P < 0.01 спрямо контролите, ***P < 0.001 спрямо контролите)**

В сравнение с контролната група е регистрирано статистически достоверно намаляване броя на подскоците – с 40.4 % при 7-дневното третиране ($p < 0.0$) (Фиг. 5 А) и с 43 % при 14-дневното ($p < 0.001$) (Фиг. 5 Б).

Резултатите и за двата периода на изследването показват наличие на аналгетичен ефект на миртенала при по-продължителното приложение, изразяващ се в потисната локомоторна реакция по отношение на термичния стимул.

В заключение проведените тестове при многократното 7- и 14- дневно третиране с миртенал потвърждават повлияването на локомоторната активност на животните за избягване на болковия дразнител. Намаленият брой подскоци отразява емоционалната компонента на реакцията, което е подкрепено от резултатите за анксиолитичната активност на миртенала. Възможно е също така наблюдаваната аналгетична активност да е свързана по-скоро с мембраностабилизиращите ефекти на монотерпеноида (*литературни данни*), а не с потискане на ЦНС.

В световната литература не са открити данни за аналгетичен потенциал на терпени при многократно системно приложение.

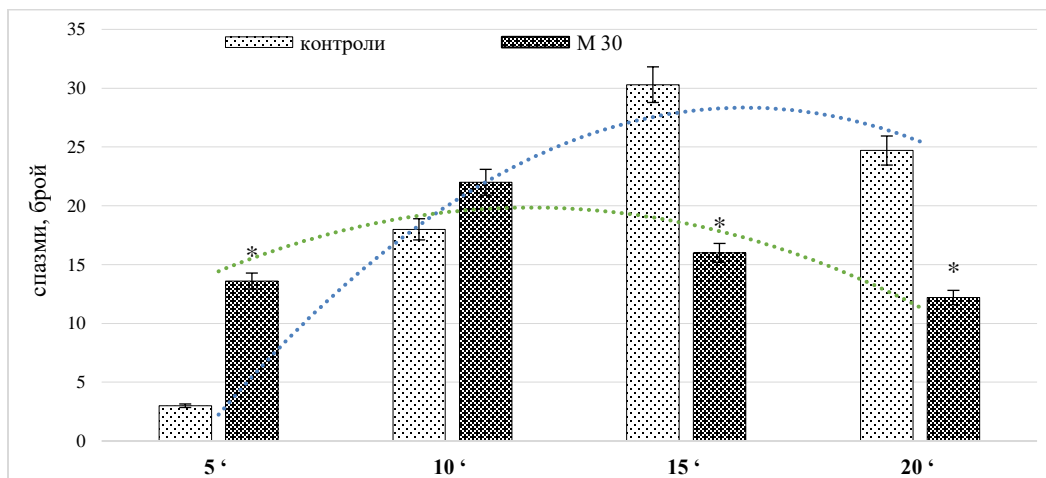
3.2. Изследване обезболяващата активност на миртенал при *мишки*, след остро и многократно приложение в доза 30 mg/kg – модел на висцерална болка (*Acetic acid writhing test*)

Периферната болкова сетивност е изследвана чрез индуциране на висцерална болка с разтвор на ледена оцетна киселина (*Acetic acid writhing test*).

При еднократното приложение мишките ($n = 12$) са разделени в 2 групи – контролна и група, третирана с миртенал в доза 30 mg/kg.

Другите два етапа от експеримента включват ежедневно пре-третиране с монотерпеноида в същата доза. Мишките ($n = 24$) са разделени в 4 групи – 2 контролни и 2 групи, инжектирани с миртенал за период, съответно от 7 и 14 дни. 30 минути след последното въвеждане на миртенала е индуцирана болка и животните са наблюдавани в продължение на 20 минути, като броят на спазмите е отчитан на всеки 5 минути през 20-минутния интервал.

Резултатите от еднократното третиране на мишките с определената доза миртенал са представени на фигура 6.



Фиг. 6. Аналгетичен ефект на миртенал при мишки след еднократно приложение в доза 30 mg/kg (* $P < 0.05$ спрямо контролите)

При първото отчитане (на 5-та минута) се установява 3.5 пъти по-висока честота на спазмите спрямо контролната група, докато на 15-та и 20-та минута се наблюдава обратното – достоверно понижаване на техния брой, съответно с 47.2 % и с 50.7 % ($p < 0.05$). Вероятно тези ефекти се дължат на кинетичните особености на миртенала, свързани с липофилните му свойства.

Нашите данни са в съответствие с тези на Silva et al. (2014), които получават подобни резултати при изследване аналгетичната активност на хидроксилното производно на миртенала – миртенол, при мишки. Острото приложение на ментол (друго хидроксилно

производно, представител на монотерпените) също показва обезболяваща активност при провеждане теста с оцетна киселина (Galeotti et al., 2002).

Важно е да се отбележи, че след многократното приложение на миртенала, противоположно на резултатите от острото третиране, във всички отчетени времеви интервали на експеримента, честотата на спазмите, в сравнение с контролната група, е повишена. При 7-дневния експеримент повишението на наблюдавания показател спрямо контролите на 5-та минута, е със 150 % ($p < 0.05$), на 10-та минута – с 14.4 %, на 15-та – с 32.9 % и на 20-та – с 27.9 %. При 14-дневния, на 5-та минута се отчита нарастване броя на спазмите със 137.5 %, в сравнение с контролите ($p < 0.05$), а в останалите времеви интервали показателят не се променя съществено.

Обобщените резултати от извършените изследвания за оценяване аналгетичния ефект на миртенала, приложен в доза 30 mg/kg при мишки, чрез повлияване на периферната (висцерална) болка и по-конкретно, индуцирането на абдоминални спазми, показват:

1. Както при острото, така и при продължителното третиране, на 5-та минута се наблюдава увеличаване броя на спазмите, което е възможно да се дължи на локално дразнене от въвежданата емулсия;

2. При еднократното приложение на 15-та и 20-та минута миртеналът достоверно намалява спазмите, подобно на други кислород-съдържащи монотерпени;

3. При продължителното инжектиране (7- и 14-дневно) миртеналът не проявява обезболяваща активност при тестването с оцетна киселина.

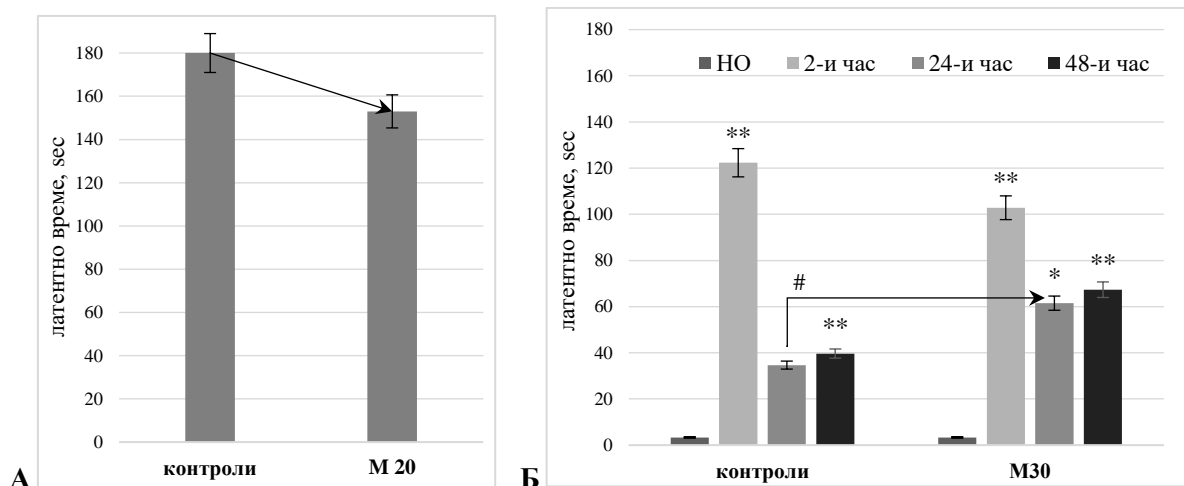
Получените резултати от теста за периферна болкова сетивност, след еднократното приложение на миртенала, потвърждават данните за наличие на обезболяващи свойства (*мембраностабилизиращи ефекти*) на монотерпеноида, докато многократното третиране не предизвиква подобни ефекти.

3.3. Ефекти на миртенал върху поведението при експериментални гризачи

3.3.1. Ефекти на миртенал върху паметовите способности на *мишки и плъхове* след остро и многократно приложение (*Step through test*)

▪ *Остро приложение на миртенал*

Отчетено е латентното време за навлизане в тъмната част на полето – при мишките, третирани с миртенал в доза 20 mg/kg (Фиг. 7 А) и при плъховете, третирани с изследваното вещество в доза 30 mg/kg (Фиг. 7 Б).



Фиг. 7. Ефекти върху паметовите способности при гризачи след еднократно приложение на миртенал – отчитане на латентното време (sec)

А – Мишки, третираны еднократно с миртенал в доза 20 mg/kg

Б – Плъхове, третираны еднократно с миртенал в доза 30 mg/kg (*P < 0.05, **P < 0.01 спрямо НО, #P < 0.05 спрямо контролите), Wilcoxon Rank Test - "R" софтуер

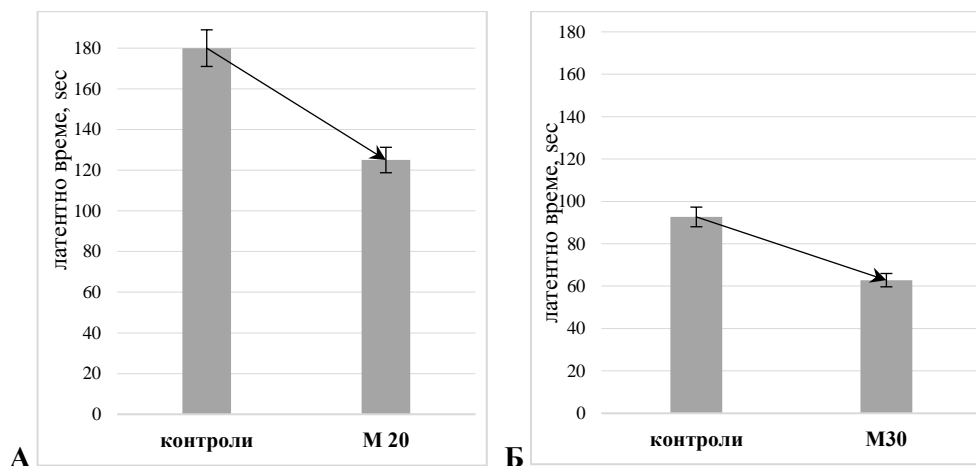
Резултатите показват, че всички мишки от контролната група помнят обстановката и не навлизат в тъмната част на полето, което се интерпретира като добра краткосрочна памет (Фиг. 7 А). Латентното време при животните, инжектирани с миртенал, е понижено с 15 % в сравнение с контролите.

При плъховете стойностите на показателя за определяне състоянието на паметовите способности (латентното време за навлизане в тъмната част на постановката) са отчетени на 2-я, 24-я и 48-я час, след еднократното третиране (Фиг. 7 Б). Резултатите разкриват някои особености в наблюдавания ефект на монотерпеноида във времето, по всяка вероятност свързани с неговите фармакокинетични характеристики – миртеналът, като липофилно вещество, проявява по-бавно настъпващи, но по-продължителни ефекти върху паметовите способности. На 24-я и на 48-я час изследваното вещество показва по-добри резултати по отношение на латентното време в сравнение с контролите. На 24-я час стойностите на показателя са статистически достоверно повишени (с 35.86 %) в сравнение с контролната група ($p < 0.05$). В последния разглеждан интервал (48-я час) животните от миртеналовата група демонстрират по-добри обучителни способности – разликата в латентното време спрямо това при контролите е 74.7 %, а на 48-я час в сравнение с 2-я, намалението в стойностите е с 34.52 %.

Резултатите от експеримента показват, че при острото еднократно приложение миртеналът подобрява обучителните способности при *плъховете* за период, по-голям от 24 часа. Дозата 30 mg/kg, приложена на плъховете, повлиява възможностите за запаметяване в положителна посока, докато дозата 20 mg/kg не предизвиква подобни ефекти при мишки.

▪ **Многократно приложение на миртенал**

И тук е отчетено латентното време за навлизане в тъмната част на полето – при мишките, третирани с миртенал в доза 20 mg/kg за 11 дни (Фиг. 8 А), а при плъховете, третирани с изследваното вещество в доза 30 mg/kg за 5 дни (Фиг. 8 Б). Резултатите са представени на фигура 8.



Фиг. 8. Ефекти върху паметовите способности при гризачи след многократно приложение на миртенал – отчитане на латентното време (sec)

А – Мишки, третирани с миртенал в доза 20 mg/kg за 11 дни

Б – Плъхове, третирани с миртенал в доза 30 mg/kg за 5 дни

Всички мишки от контролната група не навлизат в тъмната част на постановката (помнят), докато 50 % от тези, третирани с миртенал влизат, т. е. не демонстрират добро състояние на дългосрочната памет (Фиг. 8 А). Латентното време при животните от миртеналовата група е понижено с 30.6 % спрямо контролите.

При плъховете 5-дневното приложение на миртенала в доза 30 mg/kg не показва подобри ефекти върху паметта в сравнение с контролната група – стойността на показателя е недостоверно понижена с 32.2 % (Фиг. 8 Б).

Както при острото, така и при многократното приложение на миртенал не се отчита положително въздействие върху паметта при експерименталните *мишки*, спрямо контролната група. При *плъховете* многократното третиране с миртенал също не подобрява паметовите способности, докато еднократното му приложение повлиява възможностите за запамяване в положителна посока.

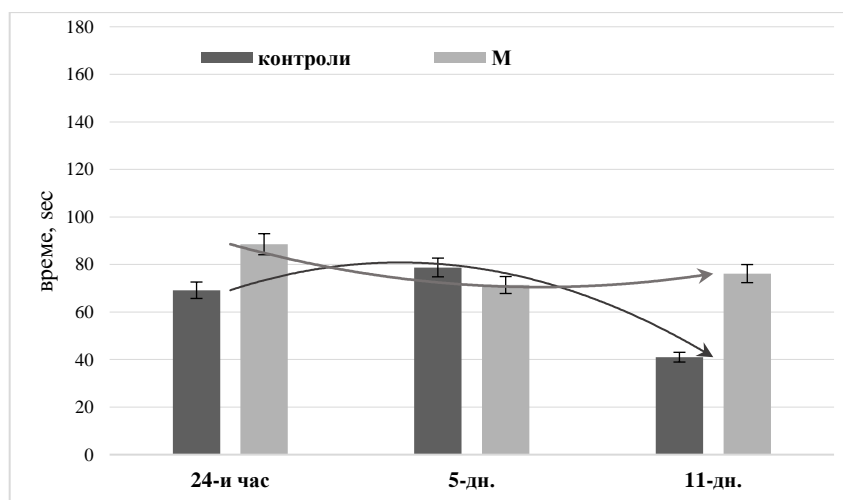
Получените от нас резултати потвърждават установеното потискане функцията на ЦНС чрез повлияване на GABA_A-рецептора, като възможен механизъм на действие. Подобни хипомнезични ефекти са характерни и за острото приложение на класическия седативно-анксиолитичен препарат Diazepam.

3.3.2. Ефекти на миртенал върху нервно-мускулната координация на *мишки и плъхове* след остро и многократно приложение (*Rota rod test*)

Тестът за нервно-мускулна координация се счита за ориентиран (скринингов) по отношение потенциала на различни субстанции за повлияване на издръжливостта, баланса, моторната координация и физическото състояние при експериментални гризачи, а при повтарящо се тестване – и за обучителните им възможности.

По време на тестването гризачите са подложени на принудителна двигателна активност върху рамото на хоризонтална, въртяща се с постоянна скорост, цилиндрична ос. Измерено е времето на задържането им (до 180 sec) преди да паднат от въртящия се цилиндър.

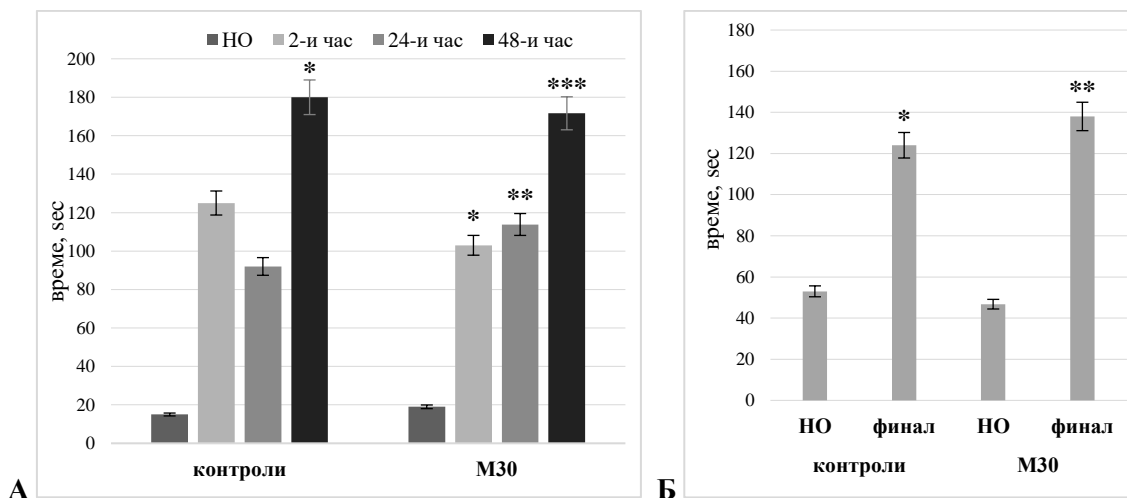
Резултатите от теста при експерименталните мишки са представени на фигура 9.



Фиг. 9. Ефекти върху нервно-мускулната координация при мишки след еднократно и многократно (5- и 11-дневно) приложение на миртенал в доза 20 mg/kg – отчитане времето на задържане (sec)

На 24-я час животните, еднократно третирани с миртенал, показват недостоверно повишение във времето на задържане върху въртящото се рамо на постановката (с 19.4 %), в сравнение с контролната група. След 5-дневното приложение на изследваното вещество мишките са много активни „акробати“ – проявяват любопитство, без влошаване на нервно-мускулната координация, като времето за престой спрямо контролите е незначително намалено (с 9.38 %). Многократното 11-дневно третиране предизвиква по-чувствително подобряване на баланса и координацията при животните – времето на престоя им върху въртящата се ос е повишено с 85.8 %, но въпреки това е статистически недостоверно спрямо контролните. Според Galeotti et al. (2002), еднократното системно приложение на монотерпена ментол при мишки не предизвиква промени в координацията при провеждането на *Rota rod test*.

На фигура 10 са представени резултатите от теста, проведен с експерименталните плъхове.



Фиг. 10. Ефекти върху нервно-мускулната координация при плъхове след остро (А) и 5-дневно (Б) приложение на миртенал в доза 30 mg/kg (*P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 спрямо НО), Wilcoxon Rank Test - "R" софтуер**

При острия опит времето за престой на плъховете от двете групи върху въртящото се рамо на оста, преди падането, в сравнение с началното ниво, се променя динамично (Фиг. 10 А).

След еднократното приложение при контролната група, спрямо началното обучение, показателят е достоверно повишен на 48-я час ($p < 0.05$). При третираните с миртенал животни се наблюдават значими изменения във времето за престой спрямо началното ниво, като на 48-я час стойностите са близки до тези на контролите, с нива на достоверност $p < 0.001$ спрямо НО. Промените в показателя (%) при отделните групи, спрямо началното ниво (автоконтрола), изразено чрез повишение в стойностите, показва подобрена нервно-мускулна координация. Резултатите при плъховете от миртеналовата група са близки до тези на контролните на 24-ия час, докато на 2-и и 48-и час наблюдаваните ефекти са по-слабо проявени.

Освен като инструмент за оценка на координацията и баланса за времето на наблюдение, при повтарящо се тестване, експериментът е показателен, както за стимулирано нервно-мускулно предаване, така също и за стимулиране на ЦНС като цяло.

При животните, третирани с миртенал за период от 5 дни, в края на теста се наблюдава тенденция към по-продължително задържане върху постановката (с 11.3 %) в сравнение с контролната група, но разликите не са статистически достоверни (Фиг. 10 Б). Moreira et al. (2014), изучавайки механизма да действие на (-)-миртенол (хидроксилното производно на миртенала) в експеримент с плъхове, също не отчитат промени във времето на задържане при *Rota rod test*, респективно не установяват наличие на анксиолитични

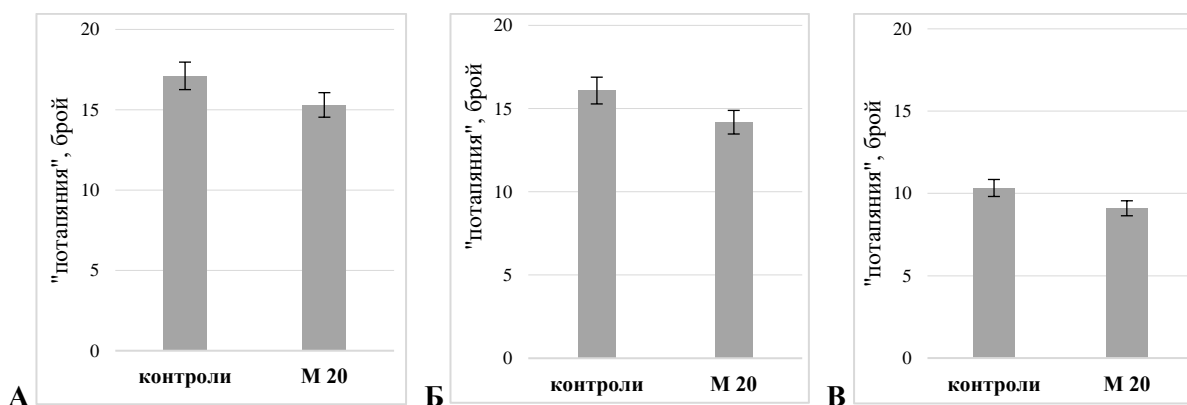
свойства. В заключение може да се обобщи, че както при остро, така и при многократното приложение, не се установява увреждащо действие на миртенала върху нервно-мускулната координация при мишките и плъховете. Получените резултати кореспондират с проучванията на Galeotti et al. (2002) и Moreira et al. (2014) върху свойствата и действието на монотерпени при експериментални гризачи, които не показват наличие на ефекти на миртенала върху моториката на лабораторните животни.

Според нас по-забавената динамика по отношение намаляване времето на задържане върху оста на прибора при третираните с миртенал гризачи спрямо контролите, се дължи на липофилността на изследваното вещество, която е предпоставка за особености в неговата кинетика.

3.3.3. Ефекти на миртенал върху изследователското поведение на *мишки* след остро и многократно приложение (*Hole board test*)

Експерименталният протокол е базиран на вроденото изследователско поведение на гризачите, поставени в нова среда – стереотипа на „потаяне“ на главата до ушите в дупките, разположени по пода на постановката (Rogers et al., 1999). Проучвателното поведение на мишки и плъхове при този тест се отличава от общата локомоция – броят опити на животното да влезе в дупките е индикатор не само за проучвателна активност, но и за пространствена ориентация (File, 2001). За отчитане поведението в обучителната фаза, експериментът се повтаря. С всяко следващо тестване, броят потаяния на главата намалява, поради опознаване на обстановката.

Експериментът с мишките е проведен в три етапа – остро, 5-дневно и 11-дневно приложение на миртенал в доза 20 mg/kg (Фиг. 11). Тестването е извършено на 24-я час след третирането (еднократно или многократно), като преди това гризачите преминават първоначално обучение. Броят на опитите на животното да влезе в дупките (брой „потаяния“ на главата) е отчетен за период от 3 минути.



Фиг. 11. Ефекти на миртенал върху проучвателната активност при мишки след остро (А) и многократно 5- и 11-дневно приложение (Б и В) в доза 20 mg/kg – отчитане на брой „потопания“ на главата

Проследяването на общия брой „потопания“ на главата за целия период от време показва, че при остро (еднократно) приложение на миртенала не се регистрират значими промени в проучвателното поведение в сравнение с контролната група. Аналогични са резултатите и при многократното 5- и 11-дневното третиране, където намаляването на изследователската активност, съответно с 11.5 % и с 11.91 %, е без статистическа достоверност.

Динамиката на изследвания параметър през целия времеви интервал от експеримента е изразена чрез броя „потопания“ по минути (1-ва, 2-ра и 3-та минута).

В сравнение с контролните животни, при острия опит миртеналът води до недостовременно понижаване на броя „потопания“. При многократното 5-дневно приложение проучвателната активност на 1-та минута е идентична с тази на контролната група, докато на 2-та и на 3-та минута се отчита понижаване, съответно с 13.46 % и със 17.7 %.

Резултатите показват, че проучвателната активност на мишките на 1-та минута от експериментите и при еднократното, и при продължителното третиране с миртенал, е достоверно по-ниска. В сравнение с остро приложение в първия пункт (1') броят на „потопанията“ е статистически достоверно понижен, както при 5-дневния ($p < 0.05$), така също и при 11-дневния опит ($p < 0.01$). На 2-та и 3-та минута при животните от миртеналовата група различията между острия и 5-дневния експеримент са несъществени, докато при 11-дневното приложение, намаляването в стойностите на показателя е ясно изразено – с 34.5 % на 2-та и с 33.1 % на 3-та минута.

Считаме, че получените резултати могат да се разглеждат като потвърждение на хипотезата за наличие на ефекти при миртенала, подобряващи пространствената ориентация при по-продължително третиране.

Проучвателна активност на изследваните животни и в трите етапа на експеримента (еднократно, 5- и 11-дневно приложение), в трите времеви пункта (1-ва, 2-ра и 3-та минута) следва тенденция, еднаква както при контролите, така и при третираните мишки, при отсъствие на значителни различия. Това означава, че изследваното вещество не променя нормалната хабитуация на животните, наблюдавана при контролите.

От получените резултати може да се направи извода, че многократното приложение на монотерпеноида понижава изследователския интерес при гризачите, което се свързва със стимулирана пространствена ориентация (Таблица 1).

Таблица 1. Изменение в изследователската активност при мишки след остро, 5- и 11-дневно приложение на миртенал в доза 20 mg/kg, в сравнение с контролната група

	24-и час	5-и ден	11-и ден
Изменение спрямо контролите (%)	↓ 10.6	↓ 11.5	↓ 11.91

Протоколът за изследване на проучвателната активност и пространствената памет е използван в експерименталната фармакология за определяне наличието на анксиолитична активност при мишки (Takeda et al., 1998). Тази особеност на наблюдаваното поведение при многократното приложение на миртенала потвърждава наличието на анксиолитичен потенциал, установен при другите опитни постановки.

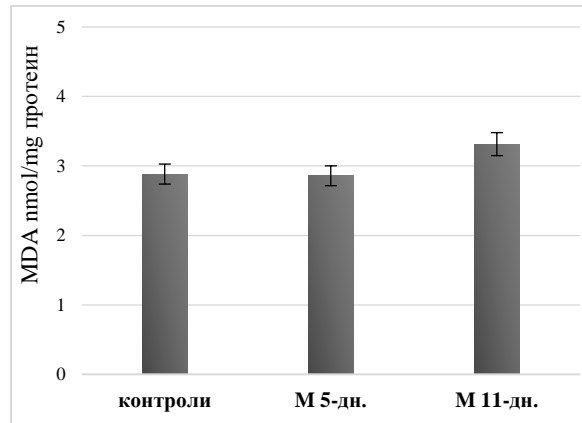
4. Биохимични изследвания в мозъка при здрави гризачи след приложение на миртенал

Целта на проучването е изясняване потенциала на монотерпеноида за подобряване паметта при интактни лабораторни гризачи чрез изследване на анти-холинестеразните и антиоксидантните му свойства. Основание за това е налична в литературата информация за способността на миртенала да потиска активността на AChE при *in vitro* изследвания (Kaufmann et al., 2011), както и за проявата на антиоксидантни свойства при модели на колоректален карцином и захарен диабет, разгледани в направения обзор.

Определени са нивата на продуктите на ЛПО и активността на мозъчната AChE в мозъка на мишки, третирани с миртенал в доза 20 mg/kg. Проучени са невромодулаторните ефекти на монотерпеноида върху съдържанието на ACh в мозъка на плъхове, след 11-дневното му приложение в доза 40 mg/kg.

4.1. Определяне нивата на продуктите на липидната пероксидация в мозъка на мишки след многократно 5- и 11-дневно приложение на миртенал в доза 20 mg/kg

Промените в нивата на продуктите на липидната пероксидация в мозъка на мишките са проследени в два времеви интервала – 5 и 11 дни. Резултатите са представени на фигура 12.



Фиг. 12. Ефекти върху нивата на продуктите на липидна пероксидация в мозъка при мишки след 5- и 11-дневно приложение на миртенал в доза 20 mg/kg

На 5-я ден не са установени различия в изследвания параметър между групата мишки, третираны с миртенал и контролната група. На 11-я ден се отчита повишение (с 14.95 %) в нивата на продуктите на ЛПО спрямо контролите, което е на границата на достоверността.

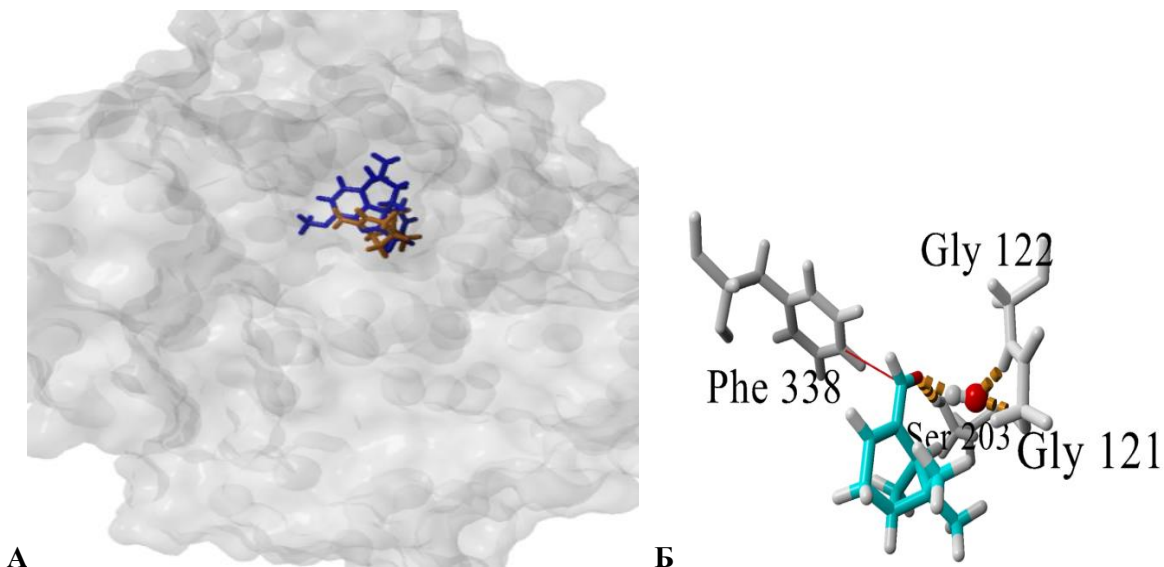
Наблюдаваните ефекти на миртенала по отношение нивата на MDA са подобни на установените при редица антиоксиданти, които при определени условия придобиват про-оксидантна активност. Като пример могат да служат витамините, които осъществявайки антиоксидантното си действие чрез редукция на свободните радикали, могат да проявят противоположни свойства. Витамин С, който е с доказана антиоксидантна активност, намалява нивата на кислород-съдържащите свободни радикали като водороден пероксид (Duarte and Lunec, 2005). Едновременно с това, понижава концентрациите на метални йони, което води до образуването на свободни радикали (чрез реакцията на Фентон). По тези причини е прието, че витаминът проявява предимно антиоксидантно действие в организма (Carr and Frei, 1999). Налични са ограничени данни и за други антиоксиданти, набавяни екзогенно, като някои полифеноли (Halliwell, 2007), цинк (Hao and Maret, 2005) и витамин Е (Schneider, 2005).

4.2. Ефекти на миртенал върху активността на мозъчната ацетилхолинестераза

Проучвания, базирани на молекулярният докинг, прогнозираят, че един от основните таргети за действието на миртенала и други монотерпени, е ензимът AChE (Taktak and Badawy, 2019).

4.2.1. Докинг-изследвания с ензима ацетилхолинестераза

Докинг-изследванията върху способността на миртенала да повлиява активността на АСhЕ, са извършени чрез сравнение с галантамин като стандарт за антихолинестеразна активност. Резултатите са представени на фигура 13.



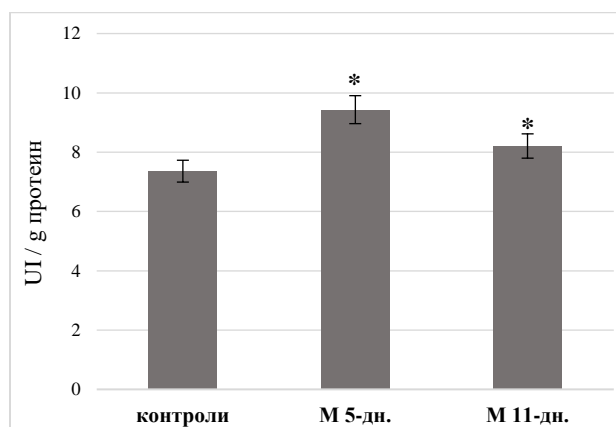
Фиг. 13. Суперпозирани галантамин (*тъмносиньо*) и миртенал (*оранжево*) в активния център на АСhЕ (А); Междумолекулни взаимодействия на миртенал в активния център (Б): водородните връзки са представени чрез оранжеви прекъснати линии; *p*- π взаимодействието – чрез червена линия, структурната водна молекула в активния център – чрез сфери и пръчки

От фигурата се вижда, че миртеналът образува една водородна връзка със Ser203 от каталитичния център в мястото на свързване, а така също и водородна връзка със структурната вода, която служи като мост между ензима и лиганда, посредством мрежа от водородни връзки. Въглеродният атом C_{sp^2} при алдехидната група на изследваното вещество участва в *p*- π взаимодействие с Phe338 аминокиселинен остатък от анионния джоб в мястото на свързване.

В заключение миртеналът би могъл да се свърже с АСhЕ в по-слаба степен в сравнение с галантамина. Той навлиза дълбоко в активния център, достигайки каталитичния регион като образува две водородни връзки и едно *p*- π взаимодействие.

4.2.2. Изследване активността на мозъчната ацетилхолинестераза при мишки след многократно третиране с миртенал

Промените в активността на АСhЕ в мозъка на мишките, след приложение на миртенал в доза от 20 mg/kg, са проследени в два времеви интервала – 5 и 11 дни (Фиг. 14).



Фиг. 14. Ефекти върху активността на мозъчната AChE при мишки след 5- и 11-дневно приложение на миртенал в доза 20 mg/kg (*P < 0.05 спрямо контролите), Wilcoxon Rank Test – "R" софтуер

Установена е статистически достоверно повишена ензимна активност при мишките, третирани с миртенал, спрямо контролите и за двата интервала – с 28.2 % на 5-я и с 11.53 % на 11-я ден ($p < 0.05$).

Потенциалът за повлияване холинергичната медиация на различни природно-активни вещества, в т. ч. монотерпени, които притежават афинитет към AChE, е обект на вниманието на редица изследователи. Известна е анти-холинестеразната активност на α -пинена, чийто метаболит е миртенала (Russo, 2011). В тази посока са и цитираните по-горе *in vitro* изследвания на Kaufmann et al. (2011) за анти-холинестеразните свойства на миртенала.

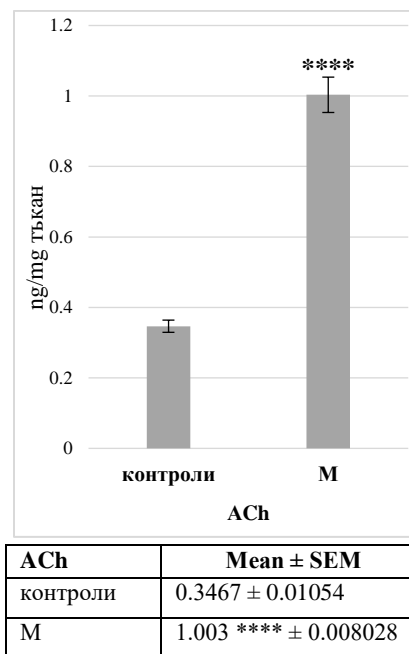
Нашите резултати от проучване активността на мозъчната AChE при *in vivo* експериментите с мишки не потвърждават наличието анти-холинестеразни свойства, а напротив – показват достоверно повишена ензимна активност, в резултат на приложението на миртенала.

Наблюдаваната повишена активност на мозъчната AChE при мишките, след третиране с изследвания монотерпеноид, е основание за определяне нивата на основни медиатори в мозъка на експериментални гризачи и в частност на ацетилхолина (ACh) – от една страна, поради връзката му с AChE и от друга – заради функциите на медиатора като невротрансмитер и невромодулятор в централната нервна система, с водеща роля за паметовите способности.

4.3. Ефекти върху нивата на мозъчния ацетилхолин при плъхове след многократно приложение на миртенал

За целта на изследването плъховете ($n = 12$) са разпределени в 2 групи – контролна и група, третирани с миртенал в доза 40 mg/kg, ежедневно, в продължение на 11 дни. В края

на опита животните са евтаназиран и мозъците им са отделени за определяне нивата на ACh. Резултатите са представени на фигура 15.



Фиг. 15. Ефекти върху нивата на ACh в мозъка при плъхове след 11-дневно приложение на миртенал в доза 40 mg/kg (****P < 0.0001 спрямо контролите) (*t*-Test)

Установено е значимо повишение в съдържанието на ACh в мозъка на плъховете, в резултат на многократното приложение на миртенала, спрямо контролната група. Изменението от 189.4 % е с висока статистическа достоверност ($p < 0.0001$). Ацетилхолинът е един от медиаторите с водеща роля, не само в паметовите процеси, но така също и в патофизиологичните процеси, съпътстващи невродегенеративните заболявания.

Силно повишените нива на невротрансмитера се свързват с механизъм на стимулиране на екзоцитозата му в синапсите. Друга възможна причина за повишената концентрация на мозъчния ACh е стимулиране активността и/или повишаване нивата на холинацетилтрансферазата – ензим, отговорен за синтеза на ACh в невроните. В проучванията си Lee et al. (2017) установяват, че ефектите на α -пинена върху паметовите функции при плъхове се дължат на повишена експресия на mRNA (информационна/матрична РНК) на ChAT в мозъчната кора.

Считаме, че високите нива на невротрансмитера ACh могат да обяснят установената от нас повишена мозъчна AChE-активност, в комбинация с наблюдаваните ефекти върху паметта и поведението на експерименталните мишки.

Проведените поведенчески опити и биохимични изследвания при здравите лабораторни мишки и плъхове, а също и докинг-проучванията, показват афинитета на миртенала към активния център на мозъчната AChE и към GABA_A-рецептора.

Наблюдаваните потенциращи ефекти на монотерпеноида върху ЦНС при комбиниране с класически седативно-сънотворни фармакологични агенти (Hexobarbital, Barbital и Diazepam) потвърждават възможностите му да оказва влияние върху функциите на главния мозък. Опитно установената ЦНС потискаща активност при самостоятелното му приложение при при мишките, е в съответствие с посочения от теоретичното изследване по-голям афинитет на миртенала към бензодиазепиновия локус в GABA_A-рецептора, в сравнение с Diazepam.

В заключение миртеналът при здравите експериментални гризачи не показва увреждащи ефекти върху паметта и обучението, нервно-мускулната координация и пространствената ориентация. Предизвиква потискане на ЦНС, вероятно чрез повлияване на GABA-ергичната невротрансмисия и демонстрира невромодулаторни свойства, проявени чрез повишаване нивата на основния мозъчен медиатор ацетилхолин.

Според нас изложеното е сериозно основание за разширяване на проучването в посока изучаване ефектите на монотерпеноида върху модели на нарушени паметови функции и експериментална деменция.

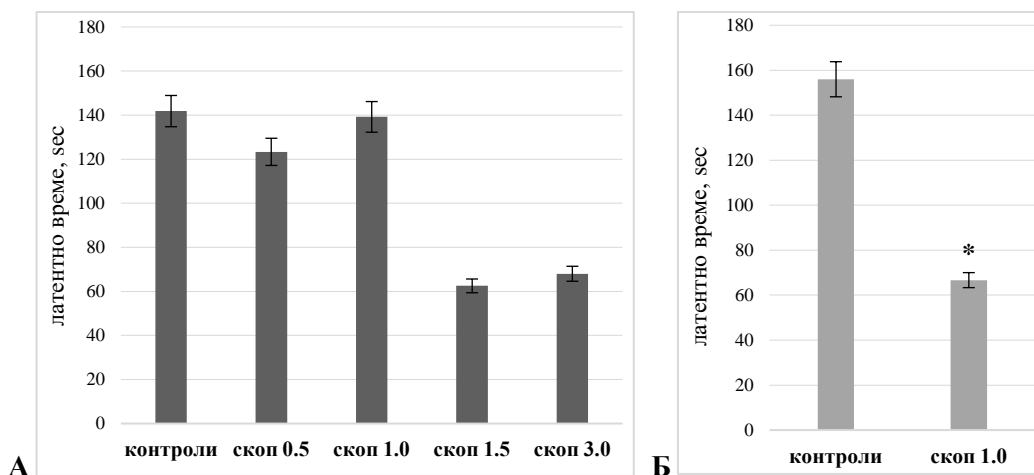
5. Изследване ефектите на миртенал при модел на невродегенеративно увреждане

5.1. Верификация на модела на скополамин-индуцирана деменция

Верификацията на модела на химически-индуцирана деменция от Алцхаймеров тип е извършена съгласно експерименталният протокол (Гл. III, т. 3), който включва ежедневно 11-дневно третиране на лабораторните животни със скополамин, по едно и също време на денонощието, в дози, съответно – за мишки 0.5, 1.0, 1.5 и 3.0 mg/kg и за плъхове – 1.0 mg/kg. Ефективните дози са подбрани след анализ на данните от литературния обзор. Проведени са поведенчески и биохимични изследвания. Допълнително, за имитиране на нелинейна прогресия в предизвиканите увреждания, процесът на индуциране на паметовите увреждания е модифициран чрез подбрана от нас дозовата комбинация за плъхове, при която гризачите са третирани със скополамин многократно за 8 дни в доза 0.1 mg/kg, а на 9-я, финален ден – с еднократната доза 20.0 mg/kg. Проведени са поведенчески, биохимични и хистологични изследвания в мозъка на опитните животни.

5.1.1. Ефекти на скополамина върху паметта и обучението при експериментални гризачи (*Step through test*)

Експерименталната постановка е като тази, използвана при тестването на здравите гризачи. Резултатите са представени на фигура 16.



Фиг. 16. Ефекти върху паметовите способности при мишки, третирани със скополамин в нарастващи дози (0.5, 1.0, 1.5 и 3.0 mg/kg) (А) и при при плъхове, третирани със скополамин в доза 1.0 mg/kg (Б) (*P < 0.05 спрямо контролите) (t-Test)

Вижда се, че в сравнение с контролната група, латентното време при мишките, многократно третирани със скополамин в подбраните ефективни дози, е променено в различна степен (Фиг. 16 А). Дозата 0.5 mg/kg предизвиква понижение на показателя с 13 %, а тази от 1.0 mg/kg – с 1.9 %. Различават се резултатите при групите, получили високите дози (1.5 и 3.0 mg/kg), където се отчита значително, но недостоверно намаляване на латентното време в сравнение с контролите – съответно, с 55.9 % и с 52.1 %.

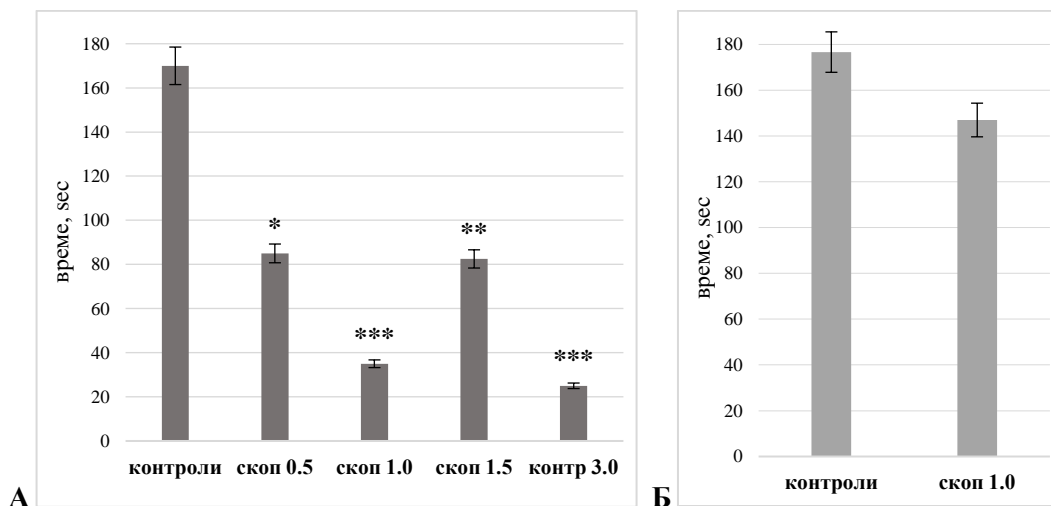
Според Golechha et al. (2012) еднократното интраперитонеално приложение на скополамин в доза 1.0 mg/kg при мишки предизвиква достоверно намаляване на латентното време със 75 %. От друга страна, Kumar et al. (2012) установяват, че еднократното третиране на мишки със скополамин в доза 2.0 mg/kg не води до забележими изменения в показателя.

При плъховете, третирани със скополамин в доза 1.0 mg/kg, се наблюдава значимо понижение в латентното време спрямо контролната група ($p < 0.05$) (Фиг. 16 Б). Това показва, че токсичният агент в приложената доза, след многократно третиране, предизвиква увреждане на паметта при този вид гризачи, докато при мишките не повлиява съществено паметовите способности, което вероятно е резултат от по-интензивния им метаболизъм.

Много проучвания установяват увреждащия ефект на неселективния М-холиноблокатор върху паметта при плъхове, подложени на теста с пасивно избягване (*Step through test*) (Doyle and Regan, 1993; Foley et al., 2004; Popović et al., 2015). Считаме, че докладваните от нас резултати, които кореспондират и с налични в литературата данни, потвърждават становището за време- и доза-зависими увреждащи ефекти на токсичния агент върху вниманието и паметта при експериментални животни (Ebert et al., 1998).

5.1.2. Ефекти на скополамина върху нервно-мускулната координация (*Rota rod test*)

Експерименталната постановка е като тази, използвана при тестването на здравите животни. Резултатите са представени на фигура 17.



Фиг. 17. Ефекти върху нервно-мускулната координация при мишки, третирани със скополамин в нарастващи дози (0.5, 1.0, 1.5 и 3.0 mg/kg) (А) и при плъхове, третирани със скополамин в доза 1.0 mg/kg (Б) (*P < 0.05, **P < 0.01, *P < 0.001 спрямо контролите)**

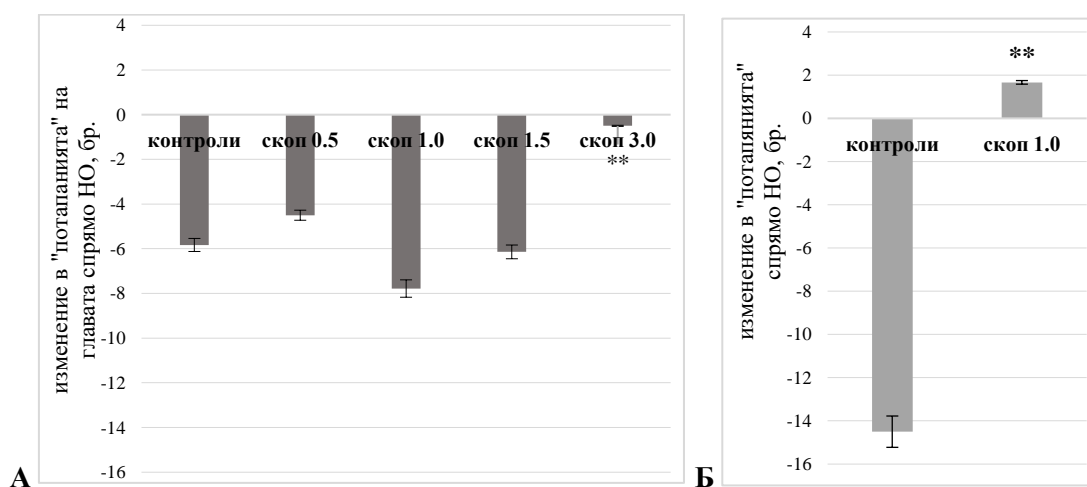
При мишките скополаминът във всички приложени дози предизвиква статистически достоверно понижение във времето на престой върху въртящата се ос спрямо контролите (Фиг. 17 А). Тези резултати са в съответствие с установеното от Goverdhan et al. (2012) потискане на двигателната активност при мишки, инжектирани интраперитонеално със скополамин в доза 1.4 mg/kg за 9 дни.

При плъховете от скополаминовата група недостоверно пониженото време на задържане (с 16.8 %) върху опитната постановка в сравнение с контролната група, показва, че токсичният агент не оказва съществено влияние върху нервно-мускулната координация на животните при 11-дневното третиране (Фиг. 17 Б). Достоверно увреждане на моторната координация при плъхове, проявено с понижение във времето на задържане при *Rota rod test* спрямо контролите, установяват Asgharzade et al. (2015), прилагайки скополамин в същата доза 1.0 mg/kg i.p., но за по-дълъг за период от 20 дни. Според изследванията на Сарасио et al. (1992) скополаминът, приложен еднократно в различни дози, не повлиява двигателната координация при плъхове. Анализът на литературните данни и получените резултати позволяват да се направи извода, че за предизвикване увреждане на нервно-мускулната координация при плъховете е необходимо по-продължително приложение на холиноблокера.

В условията на нашия експеримент различните ефекти на скополамина, приложен в еднаква доза при мишки и при плъхове, вероятно се дължат на видови различия.

5.1.3. Ефекти на скополамина върху пространствената ориентация/ изследователското поведение (*Hole board* и *Open field test*)

Постановката и методиката за провеждането на *Hole board test* са същите като тези, използвани при експеримента със здравите животни. Резултатите са представени на фигура 18.



Фиг. 18. Ефекти върху пространствената ориентация и изследователското поведение при мишки, третираны със скополамин в нарастващи дози (0.5, 1.0, 1.5 и 3.0 mg/kg) (А) и плъхове, третираны със скополамин в доза 1.0 mg/kg (Б) – отчитане изменението в общия брой „потопяния“ на главата в сравнение с НО (**P < 0.01 спрямо контролите)

При всички групи мишки, с изключение на тези, получили най-високата доза от токсичния агент (3.0 mg/kg), се регистрира достоверно понижение в изследователската активност спрямо началното обучение, което означава, че токсичният агент в по-ниски дози предизвиква незначително увреждане на ориентацията (Фиг. 18 А). При високата доза скополамин (3.0 mg/kg) разликата в пространствената ориентация спрямо началното ниво намалява, което се интерпретира като липса на памет по отношение на обстановката/запомняне на ситуацията и дезориентация при животните. Нашите резултати потвърждават тези на Shannon and Peters (1990), които установяват, че холиноблокерт, приложен в дози от 0.3 до 10.0 mg/kg при мишки, предизвиква дозо-зависимо нарастване на проучвателната активност, с максимален ефект при 3.0 mg/kg.

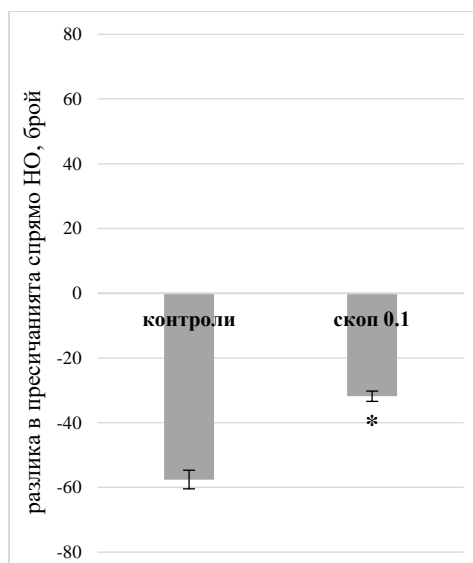
При плъховете, след многократното приложение на холиноблокера се наблюдава статистически достоверно повишение в броя „потопяния“ в сравнение с контролите (p < 0.01) и липса на изменение спрямо началното обучение. Подобно поведение се счита за

проява на дезориентация при животните. Наблюдаваните от нас поведенически реакции са подобни на резултатите, получени от други изследователи. В публикация от 1972 година, Swonger and Rech съобщават за свойството на скополамина да потиска процесите на хабитуация при плъхове.

Сравнението между двата вида гризачи показва, че при плъховете скополаминът предизвиква изменение в изследователското поведение след приложение в доза 1.0 mg/kg, докато подобни ефекти при мишките се наблюдават при дозата 3.0 mg/kg.

Тестът на откритото поле (*Open-field test*) осигурява едновременно отчитане на двигателната и изследователската активност на гризачите. Експерименталната постановка е същата като тази при теста за разпознаване на нови обекти.

Изследвани са ефектите на скополамина върху проучвателната активност при плъховете, третирани с доза 0.1 mg/kg за 8 дни (Фиг. 19).



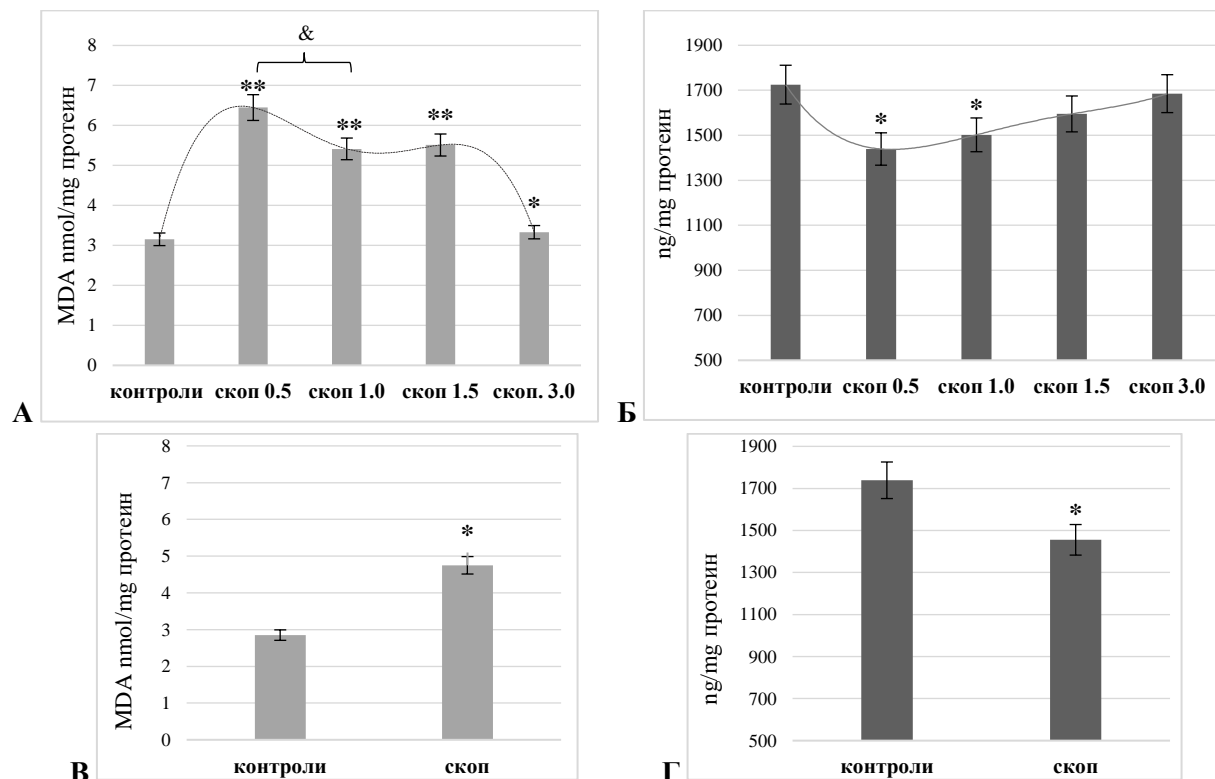
Фиг. 19. Ефекти върху проучвателната активност при плъхове след 8-дневно приложение на скополамин в доза 0.1 mg/kg – отчитане изменението в активността спрямо НО (*P < 0.05 спрямо контролите) (*t-Test*)

При контролните плъхове повтарящото се тестване на 8-я ден, води до понижаване в двигателната активност (броя пресичания на квадрантите), което се тълкува като нормална хабитуация и запазена пространствена ориентация (Cerbone and Sadile, 1994). Статистически достоверното намаляване на броя пресичания на квадрантите при животните от скополаминовата група спрямо контролната ($p < 0.05$) може да се приеме като проява на увреждащото действие на токсичния агент.

5.1.4. Изследване влиянието на скополамина върху основни биохимични показатели в мозъка при експериментални гризачи

▪ Оксидативен статус в мозъка на *мишки и плъхове* след приложение на скополамин

Проследено е съдържанието на продуктите на липидна пероксидация и на тотален глутатион (Фиг. 20).



Фиг. 20. Ефекти върху оксидативния статус в мозъка при мишки и плъхове
А и Б – мишки, третирани със скополамин в нарастващи дози (0.5, 1.0, 1.5 и 3.0 mg/kg) – определяне нивата на продуктите на ЛПО (А) и tGSH (Б) (*P < 0.05, **P < 0.01 спрямо контролите)
В и Г – плъхове, третирани със скополамин в дозова комбинация (0.1 mg/kg за 8 дни + 20 mg/kg на 9-я ден) – определяне нивата на продуктите на ЛПО (В) и tGSH (Г) (*P < 0.05 спрямо контролите)

Установено е, че скополаминът предизвиква оксидативен стрес в мозъка при всички животни, проявен чрез статистически достоверно повишение в нивата на продуктите на ЛПО спрямо тези на контролната група ($p < 0.01$) (Фиг. 20 А). Най-малката доза (0.5 mg/kg) повишава в най-голяма степен показателя ($p < 0.01$), като стойността е значимо по-висока от тази при дозата 1.0 mg/kg ($p < 0.05$). При най-високата доза (3.0 mg/kg) измененията са

с по-ниска достоверност ($p < 0.05$). Ефектите на дозата 1.5 mg/kg върху прекисното окисление на липидите са сходни с тези, докладвани от Goverdhan et al. (2012), които след третиране на експериментални мишки със скополамин в доза 1.4 mg/kg i.p. установяват значително повишение в нивата на ЛПО в сравнение с контролите.

От фигура 20 (Б) се вижда, че по-ниските дози скополамин (0.5 и 1.0 mg/kg) предизвикват достоверно понижени нивата на tGSH ($p < 0.05$), за разлика от по-високите (1.5 и 3.0 mg/kg). Наблюдава се „доза-ефект“ зависимост ($R^2 = 0.9878$, R-squared value on chart) – с нарастване на дозата на токсичния агент намалява изменението в концентрацията на tGSH спрямо контролите. Установеното от нас статистически достоверно понижени нивата на tGSH при гризачите, третирани със скополамин в дозите 0.5 и 1.0 mg/kg, спрямо контролната група ($p < 0.05$), потвърждава индуцирания от скополамина оксидативен стрес след многократното му приложение при мишки, което е свързано с повишените нива на продуктите на ЛПО.

В заключение резултатите от изследванията върху мозъчния оксидативен статус, проведени при многократно приложение на скополамин в различни дози, показват най-значимо повишение в прекисното окисление на липидите при ниските дози скополамин и намалява с нарастването им. От друга страна, очаквано, концентрациите на tGSH са най-изразено понижени при ниските дози скополамин, което е свързано с високите нива на продуктите на окислението.

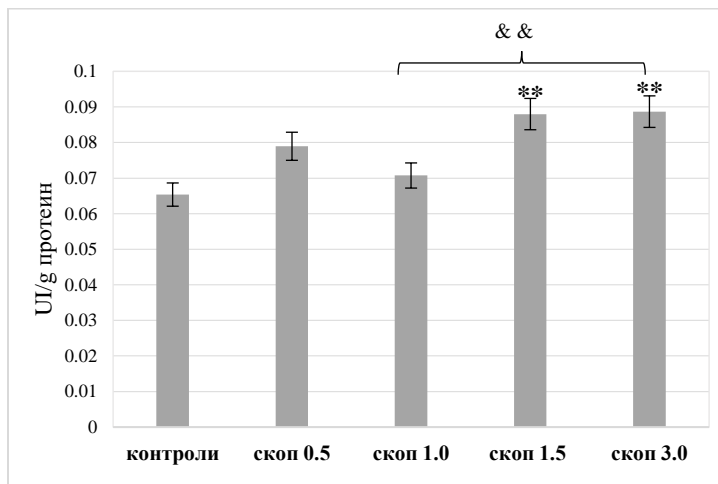
В сравнение с контролната група, при плъховете, третирани със скополамин, нивата на ЛПО в мозъка, която се свързва с наличието на оксидативен стрес, са статистически достоверно повишени с 66.67 % ($p < 0.05$) (Фиг. 20 В). Считаме, че получените резултати, кореспондиращи с тези на други екипи, потвърждават увреждащото действие на токсичното вещество върху способността за запаметяване и обучение. В същата посока са и данните от изследването на Rahimzadegan and Soodi (2018), които сравняват нарушенията на паметта и нивата на оксидативния стрес в мозъка на плъхове, след прилагане на единични и на повтарящи се дози скополамин. Според авторите, в сравнение с еднократната доза, при многократното третиране функцията на паметта се нарушава по-интензивно и по-продължително, като вероятния увреждащ механизъм е хроничният оксидативен стрес.

Приложената дозова вариация на скополамина предизвиква закономерно понижени концентрации на tGSH, в пряка зависимост с нивата на продуктите на ЛПО при същите животни. Показателят е статистически достоверно понижен с 16.3 % в сравнение с контролните плъхове ($p < 0.05$) (Фиг. 20 Г).

Проведените експерименти потвърждават водещата роля на предизвикания оксидативен стрес в увреждащото действие на токсичния агент при експериментални гризачи.

▪ *Активност на мозъчната ацетилхолинестераза при мишки след приложение на скополамин в нарастващи дози*

Ацетилхолинестеразата е ензим, отговорен за разграждането на освободения в холинергичния синапс медиатор – АСh, и в експерименталната практика е показател за функционирането на холинергичната медиация. Резултатите от проведеното изследване върху активността на мозъчната АСhЕ при мишките са представени на фигура 21.



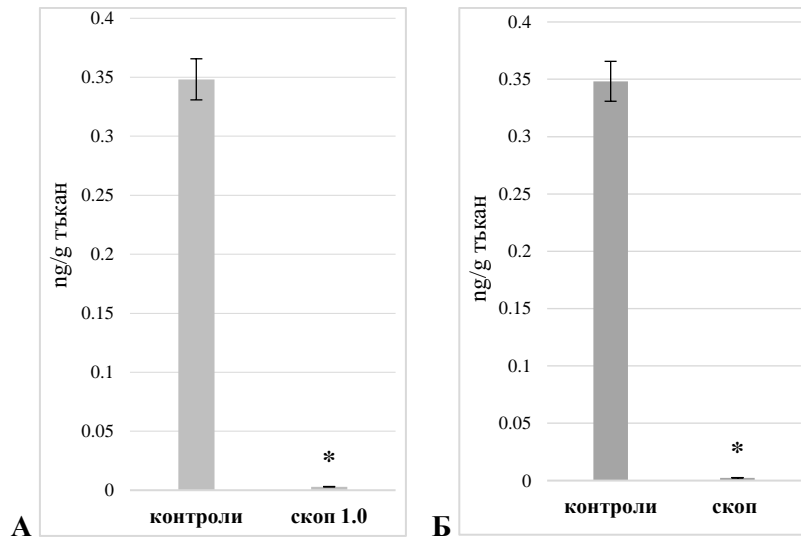
Фиг. 21. Ефекти върху активността на мозъчната АСhЕ при мишки след 11-дневно третиране със скополамин в нарастващи дози (0.5, 1.0, 1.5 и 3.0 mg/kg) (P < 0.01 спрямо контролите)**

Установената статистически достоверно по-висока активност на АСhЕ в мозъка на мишките след 11-дневно третиране с по-глемите дози от токсичния агент (1.5 и 3.0 mg/kg) в сравнение с контролите, съответно с 35.38 % ($p < 0.01$) и с 36.09 % ($p < 0.01$), напълно съответства на докладваното от Goverdhan et al. (2012) значително повишение в активността на ензима при многократно (9-дневно) приложение на скополамин в доза 1.4 mg/kg i.p. при мишки.

Получените от нас резултати и обобщените данни от литературния обзор са в подкрепа на становището, че високата доза скополамин предизвиква повишение в активността на АСhЕ, съпроводено с влошени паметови и обучителни способности на животните.

- *Ефекти на скополамин върху нивата на медиатора ацетилхолин при плъхове*

Изменението в концентрациите на мозъчния АСh при плъховете е представено на фигура 22.



Фиг. 22. Ефекти върху нивата на ACh в мозъка при плъхове след 11-дневно третиране със скополамин в доза 1.0 mg/kg (A) и след третиране с дозовата комбинация (B) (*P < 0.05 спрямо контролите), Wilcoxon Rank Test - "R" софтуер

Скополаминът, приложен в доза 1.0 mg/kg за 11 дни, предизвиква значимо понижение в нивата на ACh ($p < 0.05$) (Фиг. 22 A), което е в пряка връзка с установеното от нас активиране на ензима AChE в мозъка на здрави мишки, отговорен за разграждането му. Предполага се, че стимули, предизвикващи освобождаване на ACh инициират свръхекспресия на AChE на принципа на обратната връзка, за да се предотврати прекомерното активиране на невротрансмисията (Kaufner et al., 1998). Получените от нас резултати са сходни с тези на Haider et al. (2016), които прилагат интраперитонеално скополамин в доза 1.0 mg/kg за 14 дни при плъхове и установяват понижение в концентрацията на ACh, аналогично на наблюдаваните от нас изменения в нивата на медиатора. Така също, според проучванията на Bhuvanendran et al. (2018), 9-дневното интраперитонеално инжектиране на скополамин в доза 1.0 mg/kg при плъхове предизвиква понижение в нивата на ацетилхолина.

Холиноблокертът в дозовата комбинация – субтоксична (0.1 mg/kg) и финална еднократна (20 mg/kg), предизвиква достоверно изменение в нивата на изследвания мозъчен медиатор, подобно на дозата от 1.0 mg/kg, приложена за 11 дни (Фиг. 22 B).

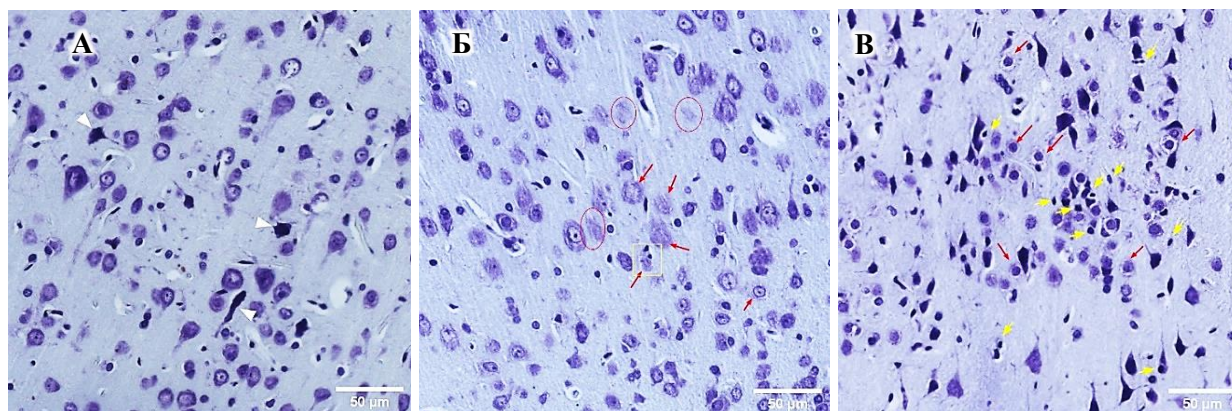
Аналогичните изменения, наблюдавани и при двата протокола, са основание да се предположи, че ефектите на многократното приложение на скополамина върху нивата на медиатора ACh не са в пряка зависимост от приложената доза.

1.1.2.4. Хистологични изследвания на мозъчна тъкан при експериментални плъхове със скополамин-предизвикани увреждания

Изследванията са проведени по описаната методика (Гл. III, т. 10) с мозъците на плъховете, използвани в експеримента за проучване ефектите на скополамин в дозовата комбинация – многократно 8-дневно приложение на скополамин в доза 0.1 mg/kg и последващо еднократно третиране с доза 20 mg/kg на 9-я ден.

При контролните плъхове във всички области на интерес (кора и хипокамп) тъканта е със структура, клетъчен състав и морфология, характерни за здрави животни

В мозъчната кора на животните, третирани със скополамин, се проявяват белези на усилена невронална дегенерация (Фиг. 23). В кората се наблюдават видима глиоза и множество неврони с фина вакуолизация на цитоплазмата и подчертана загуба на Нислови грануляции (хроматолиза). Тези изменения са локализирани основно в трети и пети слой от кората, но засягат и останалите. Срещат се и невронни сенки, както и участъци на агрегация на микроглия – индиректни белези за невронална смърт, както и неврони с пикноза или с периневронална микроглиоза (близка апозиция между тяло на неврон и няколко малки ядра на невроглия).



Фиг. 23. Патологични изменения в мозъчната кора при плъхове, третирани със скополамин в дозовата комбинация

А – Контроли. Нормална морфология на невроните в слой V от моторната кора (бели стрелки – артифициални изменения, настъпващи *post mortem*, които често се бъркат с патологични);

Б – Скополаминова група. Хроматолиза (червени стрелки), „сенки“ на неврони (червени елипси) и глиоза в слой V от ретроспленичната кора* (жълт правоъгълник – обозначава периневронална микроглиоза);

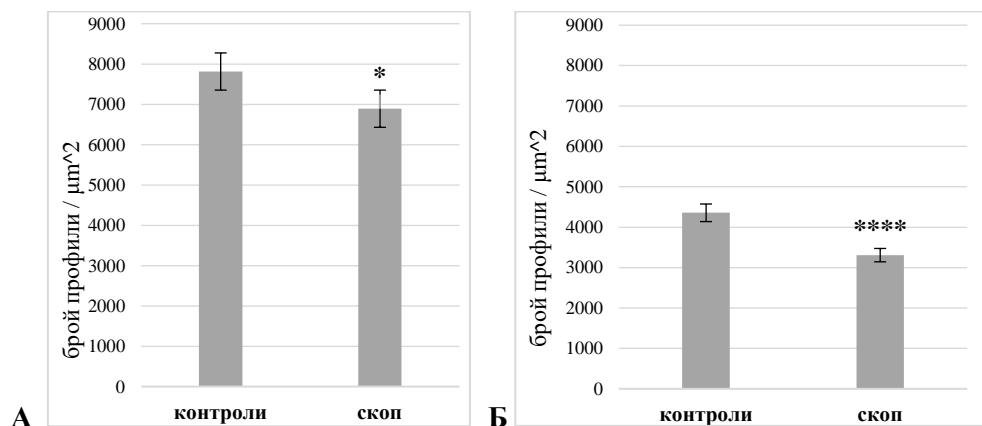
В – Скополаминова група. Вакуолизация и хроматолиза (червени стрелки) и масивна глиоза (жълти стрелки – глиални клетки) в слой III-IV от сетивната кора (S1)

Дължина на лентата на мащаба – 50 µm

*Тази част от кората вероятно участва в зрително-пространствената асоциация и интеграция и може би има отношение към епизодичната памет

При плъховете от скополаминовата група измененията в хипокампалната формация са значително по-слабо изразени от тези в кората, където се наблюдават само единични неврони с хроматолиза и пикноза на ядрата.

След изследване гъстотата (брой) на всички профили в кората, абсорбиращи повече от 20 % от светлината, при третираните със скополамин плъхове се наблюдава достоверно намаление на показателя в сравнение със здравите контроли ($p = 0.0182$) (Фиг. 24 А).



Фиг. 24. Ефекти на скополамин върху общия брой профили (гъстота) (А) и върху броя профили (гъстота) с площ, по-голяма от 31 μm^2 (Б), в кората при плъхове, третирани със скополамин (дозова мадификация) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.0001$ спрямо контролите)**

При изследване на профилите с площ по-малка от 31 μm^2 , принадлежащи на фрагменти и/или невроглия, не се откриват съществени различия в сравнение с контролите. От друга страна, при профилите с по-голяма площ, отговарящи основно на неврони, се наблюдава значимо понижаване на средната гъстота в резултат приложението на скополамина ($p = 3.713 \times 10^{-5}$; $R^2 = \eta^2 = 0.30$) (Фиг. 24 Б).

При проследяване общия брой дегенериращи неврони с пикнотична и кондензирана ядрена морфология, Palle and Neerati (2017), наблюдават увреждащи ефекти на скополамина в мозъка на плъхове след еднократно приложение в доза 20 mg/kg i.p..

Скополаминът като мускаринов антагонист от групата на тропановите алкалоиди, потиска редица ЦНС функции, в т. ч. памет, обучителна способност и други, и често се използва в експериментални проучвания за предизвикване на моделно когнитивно увреждане (Klinkenberg and Blokland, 2010). Считаме, че проведените от нас експерименти допълват големия брой проучвания, които утвърждават индуцираната от холиноблокера деменция при животни, като надежден експериментален модел, предизвикващ проследими поведенчески и биохимични изменения.

На база получените резултати в предизвикването на моделно увреждане, както в паметовите способности на животните, така и в биохимичните показатели, по-нататъшните ни изследвания са извършени със скополамин в дози от 1.0 и 1.5 mg/kg, и

вариацията от многократно приложение на субтоксична доза (0.1 mg/kg) в комбинация с последващо еднократно третиране с висока доза от токсичното вещество (20 mg/kg).

5.1. Ефекти на миртенал върху гризачи с експериментална деменция от Алцхаймеров тип

Редица изследвания предоставят доказателства в потвърждение на хипотезата за ролята на холинергичната медиация в процесите на учене, памет и познание (Contestabile, 2011). Наред с това, според много клинични и предклинични проучвания, основният фактор за неврологичните нарушения и свързаните с тях невродегенеративни заболявания, в т. ч. БА е повишеният оксидативен стрес, потвърден от заключенията, че протеиновите странични вериги са модифицирани или директно от реактивни видове кислород (ROS), или от реактивни видове азот (RNS), или косвено – от продуктите на ЛПО (Jomova et al., 2010).

На тази информация е базирана експерименталната постановка за проучване превантивните ефекти на монотерпеноида миртенал при скополамин-индуциран модел на деменция от Алцхаймеров тип при лабораторни гризачи. Чрез поведенчески тестове са изследвани паметовите и обучителните способности, нервно-мускулната координация и пространствената ориентация при мишки и плъхове. Определени са нивата на оксидативния стрес и тяхното повлияване от миртенал, както и невромодулаторните способности на изследваното вещество чрез измерване нивата на мозъчния невротрансмитер ACh при експерименталните животни. Извършен е хистопатологичен анализ на срези от мозъчна тъкан на плъхове.

Съгласно експерименталния протокол са проведени 2 експеримента с мишки и 2 – с плъхове.

Експериментални мишки

I-ви опит – проследяване на измененията в телесните тегла, състоянието на паметовите и обучителните способности, координацията и изследователското поведение на животните, след 11-дневно третиране със следните вещества:

- скополамин (скоп.) – 1.5 mg/kg
- скополамин (1.5 mg/kg) и миртенал в дози 10, 20 и 30 mg/kg
- скополамин (1.5 mg/kg) и липоева киселина (референт с антиоксидантна активност) (ЛК) в доза 30 mg/kg (самостоятелно или в комбинация с миртенал)

II-ри опит – проследяване на измененията в телесните маси, състоянието на паметовите и обучителните способности, оксидативния статус в мозъка на мишките с проследяване нивата на продуктите на ЛПО, tGSH и активността на ензимите CAT, SOD и GPx, след 14-дневно третиране със:

- скополамин – 1.0 mg/kg
- скополамин (1.0 mg/kg) и миртенал в дози 30, 40 и 50 mg/kg

- скополамин (1.0 mg/kg) и липоева киселина в доза 30 mg/kg (самостоятелно или в комбинация с миртенал)

Експериментални плъхове

I-ви опит – проследяване състоянието на паметта, обучителните способности и изследователското поведение на животните, след 11-дневно третиране със:

- скополамин – 1.0 mg/kg
- скополамин (1.0 mg/kg) и миртенал в доза 40 mg/kg
- скополамин (1.0 mg/kg) и галантамин (референт с антихолинестеразна активност) (Гал) в доза 1.0 mg/kg
- скополамин (1.0 mg/kg) и липоева киселина в доза 30 mg/kg (самостоятелно или в комбинация с миртенал)

II-ри опит – проследяване на измененията в телесните маси, състоянието на паметовите и обучителните способности, двигателната активност, оксидативния статус в мозъка на плъховете с проследяване нивата на продуктите на ЛПО, tGSH и активността на ензимите CAT, SOD и GPx; изследване на невромодулаторните ефекти на миртенал чрез определяне нивата на базовия мозъчен невротрансмитер ACh в мозъка; хистопатологични изследвания в мозъчни срези при дементните плъхове, след 9-дневно третиране със:

- скополамин – (дозова вариация 0.1 mg/kg в 8 последователни дни и еднократна доза 20 mg/kg в последния 9-и ден)
- скополамин (дозова вариация) и миртенал в доза 40 mg/kg
- скополамин (дозова вариация) и галантамин в доза 1.0 mg/kg (самостоятелно или в комбинация с миртенал)
- скополамин (дозова вариация) и липоева киселина в доза 30 mg/kg (самостоятелно или в комбинация с миртенал)

5.2.1. Изследване ефектите на миртенал върху телесните маси при гризачи със скополамин-индуцирана деменция

При мишките с предизвикано от скополамина увреждане, приложен в доза 1.5 mg/kg за 11 дни, измененията в телесните маси на животните от всички групи, са близки до тези на групата, третирани само със скополамин. Монотерпеноидът в избраните дози (10, 20 и 30 mg/kg) не подобрява състоянието при дементните гризачи, отчетено чрез ръста на наддаване на теглото. Резултатите са в противовес на тези при здравите мишки, третирани с миртенал в същата доза и продължителност, при които се регистрира статистически достоверно повишение в телесните тегла, както спрямо спрямо началото на опита ($p < 0.01$), така и спрямо контролите ($p < 0.05$).

Резултатите от втория, по-продължителен 14-дневен експеримент при мишките, третирани със скополамин в доза 1.0 mg/kg, показват, че миртеналът в по-високите дози (40 и 50 mg/kg) проявява протективни ефекти спрямо холиноблокера, като нарастването на

телесните маси е достоверно по-голямо, в сравнение със скополаминовата група с нива на достоверност, съответно $p < 0.05$ и $p < 0.01$.

Тези резултати позволяват да се направи извода, че само високите дози от миртенала (40 и 50 mg/kg) антагонизират анорексигенните свойства на скополамина при дементните мишки, докато при здравите животни и по-ниската доза (20 mg/kg) е достатъчно ефективна да предизвика достоверно повишение на показателя спрямо контролите.

Важно е да се подчертае, че при плъховете, третирани само с предложената от нас 9-дневна дозова комбинация на скополамина, не се наблюдава промяна на телесните маси в сравнение с контролите, което в случая не показва токсично действие. От друга страна, приложението на миртенал в доза 40 mg/kg води до достоверно понижение в теглата, за разлика от ефектите при дементните мишки, където същата доза миртенал води до повишаване на телесните тегла с 58.2 % в сравнение със скополаминовата група ($p < 0.05$). По неясни за нас причини едновременното приложение на референта галантамин с миртенал предизвиква засилен анорексигенен ефект, проявен с понижение в показателя, като разликата е статистически достоверна, както в сравнение със скополаминовата група ($p < 0.01$), така и спрямо контролната, при която се отчита много висока сигнификантност ($p < 0.001$).

Понижение в телесните тегла е характерно и за здравите плъхове, третирани с миртенал в същата доза и продължителност (40 mg/kg за 9 дни), докато по-ниската доза от 30 mg/kg на изследваното вещество, приложена за по-кратък период от 5 дни не води до анорексигенни ефекти.

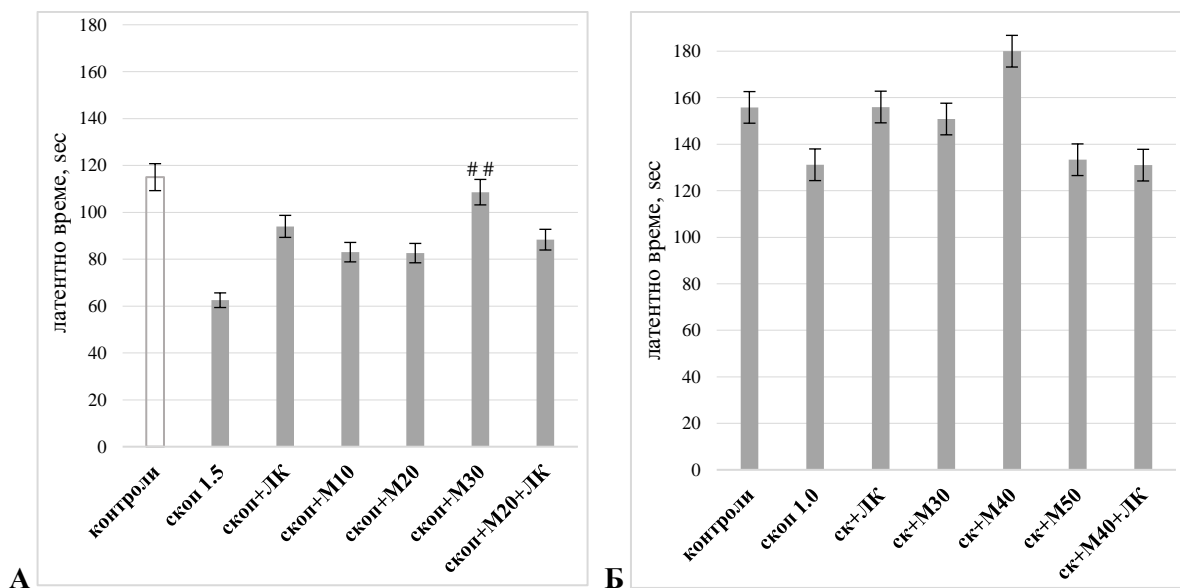
Считаме, че проявените неблагоприятни ефекти на миртенала при плъховете, наблюдавани при по-високите дози, вероятно се дължат на по-бавния им метаболизъм в сравнение с този при мишките.

5.2.2. Ефекти на миртенал върху паметта и обучението при гризачи със скополамин-индуцирана деменция

Постановката е същата като тази при здравите гризачи. Експерименталните животни са подложени на обучение преди началото на третирането. Тестването е извършено 24 часа след последното инжектиране на изследваните вещества. Отчетено е латентното време, свързано с обучителните способности на опитните животни.

5.2.2.1. Ефекти на миртенал върху паметта и обучителните възможности при мишки със скополамин-индуцирана деменция (*Step through test*)

Резултатите от теста за памет и обучение, проведен след 11-и и 14-дневно третиране със скополамин в дози 1.5 mg/kg и 1.0 mg/kg, с миртенал в различни дози и с референта липоева киселина в избраната доза, са представени на фигура 25.



Фиг. 25. Ефекти върху паметовите способности при мишки със скополамин-индуцирана деменция след 11-дневно третиране със скополамин (1.5 mg/kg) и миртенал в дози 10, 20 и 30 mg/kg (А), и след 14-дневно третиране със скополамин (1.0 mg/kg) и миртенал в дози 30, 40 и 50 mg/kg (Б), и сравняването им с тези на референта ЛК, приложен самостоятелно или в комбинация с миртенал (^{##}P < 0.01 спрямо групата, инжектирана със скополамин)

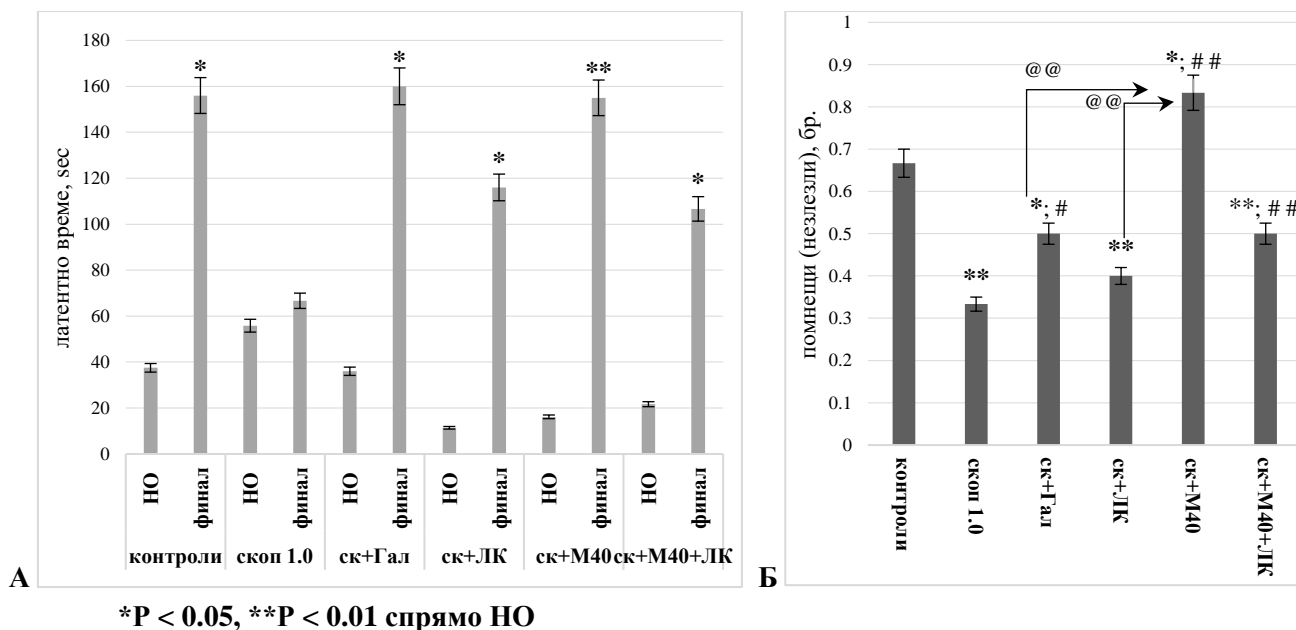
При 11-дневното третиране с изследваните вещества при мишките с деменция, индуцирана от 1.5 mg/kg скополамин, миртеналът, приложен в доза 30 mg/kg, води до най-голямо и статистически достоверно повишение на латентното време – със 73.76 %, в сравнение с това при групата животни, третирани само със скополамин ($p < 0.01$) (Фиг. 25 А). Спрямо тази група удължаването на латентното време при мишките, при които е използван референта ЛК е с 50.4 %, а при групите, третирани с миртенал в дози 10 и 20 mg/kg, повишението е съответно с 32.8 и 32.16 %. При едновременното приложение на миртенала (в доза 20 mg/kg) с ЛК латентното време е повишено с 41.33 %, без статистическа достоверност, което означава отсъствие на адитивен ефект.

Резултатите от 14-дневния експеримент с мишките, третирани с холиноблокера в доза 1.0 mg/kg, показват, че по-продължителното му приложение предизвиква дезориентация при животните (Фиг. 25 Б). Те стоят неподвижно, без да проучват полето, което е показателно за влошената им хабикуация. Установеното недостоверно понижение на латентното време спрямо активните контроли е проява на увреждащото действие на токсичния агент. Наблюдаваните ефекти върху паметовите способности са аналогични на тези, проявени при изследване влиянието на скополамина върху нервно-мускулната координация, където дозата 1.0 mg/kg предизвиква достоверно понижение на времето на престой върху въртящия се лост ($p < 0.01$). Най-добри са резултатите при животните, третирани със средната доза миртенал (40 mg/kg), като всички мишки в групата демонстрират запазени паметови и обучителни способности с нормална активност.

Латентното време при тях е увеличено спрямо дементните животни с 37.2 % (с гранична достоверност). Референтът ЛК повишава недостоверно показателя в сравнение със скополаминовата група с 18.9 %, като стойностите са близки до тези на контролите. Едновременното приложение на ЛК и миртенал в доза 40 mg/kg не подобрява паметовите способности при мишките със скополамин-предизвикана деменция.

5.2.2.2. Ефекти на миртенал върху паметта и обучителните възможности при плъхове със скополамин-индуцирана деменция (*Step through test*)

Резултатите от теста за памет и обучение, проведен след 11-дневно третиране със скополамин в доза 1.0 mg/kg, с миртенал в доза 40 mg/kg и с референтите липоева киселина и галантамин в избраните дози, са представени на фигура 26.



Фиг. 26. Ефекти върху обучителните (А) и паметовите способности (Б) при плъхове със скополамин-индуцирана деменция (1.0 mg/kg) след 11-дневно третиране с миртенал в доза 40 mg/kg и сравняването им с тези на референтите ЛК и Гал (*P < 0.05, **P < 0.01 спрямо контроли; #P < 0.05, ##P < 0.01 спрямо скоп. група; @@P < 0.01 спрямо групата, инжектирана със скополамин и миртенал)

В сравнение с началното обучение, с изключение на дементните плъхове (третирани само със скополамин), при всички други групи се наблюдава статистически достоверно повишение в латентното време, което е проява на запазени паметови/обучителни способности (Фиг. 26 А). Повишението в показателя е най-голямо при групите, третирани референта ЛК ($p < 0.05$) и с миртенала ($p < 0.01$), като стойностите са близки до тези на контролите. Комбинацията от двете вещества при дементните плъхове не води до

подобряване на паметовите способности в сравнение с ефектите, наблюдавани при самостоятелното им приложение. Тези различия насочват към сходен антиоксидантен механизъм на повлияване, който може да се счита като основен за проявените протективни ефекти миртенала.

Като допълнителен критерий за оценка на паметовите способности при изследваните плъхове, е определен броя на невлезлите в тъмната част на постановката плъхове. И тук най-добри са резултатите при групата животни, третирани с миртенал, което говори за запазена памет (Фиг. 26 Б). Показателят е статистически достоверно повишен в сравнение със скополаминовата група ($p < 0.01$) и в сравнение с групите, третирани с двата референта ($p < 0.01$), а така също и спрямо контролната – с 24.9 % ($p < 0.05$).

При дементните *мишки* от 11-дневния експеримент, третирани с миртенал в най-високата доза 30 mg/kg, е регистрирано достоверно повишение на латентното време спрямо групата гризачи, третирани само със скополамин (1.5 mg/kg), до стойности, близки до тези на контролите ($p > 0.01$). Аналогични са ефектите и при по-продължителното 14-дневно третиране с токсичния агент в по-ниската доза 1.0 mg/kg, при което миртеналът, приложен в доза 40 mg/kg повишава латентното време, в сравнение със скополаминовата група мишки.

При *плъховете* същата доза на миртенала 40 mg/kg води до сходни резултати по отношение на паметовите способности на животните, с ниво на достоверност $p > 0.01$ спрямо референтите (липоева киселина и галантамин).

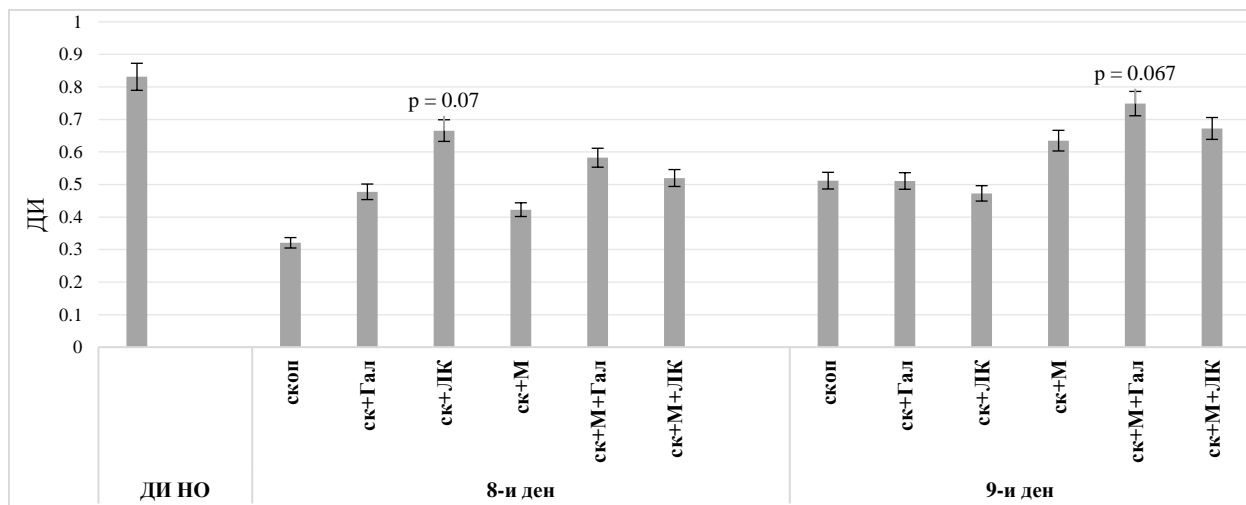
В заключение може да се обобщи, че при многократно приложение миртеналът проявява протективни ефекти върху паметовите способности на гризачи със скополамин-индуцирана деменция при *Step through test*. Подобряващи паметта на дементните гризачи свойства, установяват Lee GY et al. (2017), изследвайки протективните ефекти на α -пинен, чийто метаболит е миртенала, върху паметовите способности при мишки след еднократно третиране със скополамин в доза 1.0 mg/kg. Според авторите по-високите дози на α -пинен предизвикват достоверно увеличение в латентното време при *Passive avoidance test* ($p < 0.01$).

5.2.2.3. Ефекти на миртенал върху паметта и обучителните възможности при плъхове със скополамин-индуцирана деменция (*Novel object recognition test*)

Тестът с разпознаване на нов обект е проведен след 9-дневно третиране с дозовата комбинация на скополамин, едновременно с миртенал в доза 40 mg/kg и с референтите липоева киселина и галантамин.

Ефектите на миртенала върху състоянието (степената на използване) на разпознавателната памет са оценени чрез дискриминационния индекс (ДИ).

Резултатите от тестването на експерименталните плъхове са представени на фигура 27.



Фиг. 27. Ефекти върху разпознавателната памет при плъхове със скополамин-индуцирана деменция (дозова модификация) след 9-дневно третиране с миртенал в доза 40 mg/kg и сравняването им с тези на референтите ЛЖ и Гал

При дементните (скополаминовите) контроли липсва изявена динамика в ДИ на 9-ия спрямо 8-ия ден, което говори за дезориентация и потисната разпознавателна памет в резултат на еднократното инжектиране на високата доза скополамин. Нашите резултати са сходни с тези на El-Marasy et al. (2012), според които еднократното приложение на скополамин в доза 16 mg/kg при мъжки плъхове значително потиска не-пространствената функционална памет при теста с разпознаване на обекти.

При плъховете, третирани с галантамин, на 8-я ден се наблюдава известно повишение в стойностите на ДИ в сравнение със скополаминовата група. На 9-я ден обаче, референтът не проявява ефект, достатъчен да антагонизира уврежданията върху разпознавателната памет, предизвикани от високата доза скополамин. Прилагането на другия референт – антиоксидантът липоева киселина, също повишава ДИ (гранично достоверно) спрямо скополаминовата група. И тук най-добри са резултатите на 8-я ден, но при високата доза от токсичния агент на 9-я ден референтът не проявява необходимата ефективност.

Миртеналът на 8-я ден не повлиява увредената от скополамина разпознавателна памет, но на 9-я ден се наблюдава повишение в стойностите на ДИ с 12 пункта спрямо дементните плъхове. Най-изразено (гранично достоверно) увеличаване на ДИ в последния ден се регистрира при комбинирането на миртенала с галантамин, което, от една страна, показва способността им в най-голяма степен да антагонизират увреждащите ефекти на високата доза скополамин и от друга, насочва към предположението, че двете вещества притежават различен механизъм за повлияване на разпознавателната памет.

Резултатите, получени при ниската (субтоксична) доза на токсичния агент показват, че предизвиканите от нея изменения в разпознавателната памет се възстановяват от антиоксидантния референт (ЛЖ). Това означава, че увреждащите ефекти от многократното въвеждане на субтоксичната доза скополамин върху състоянието и степента на използване

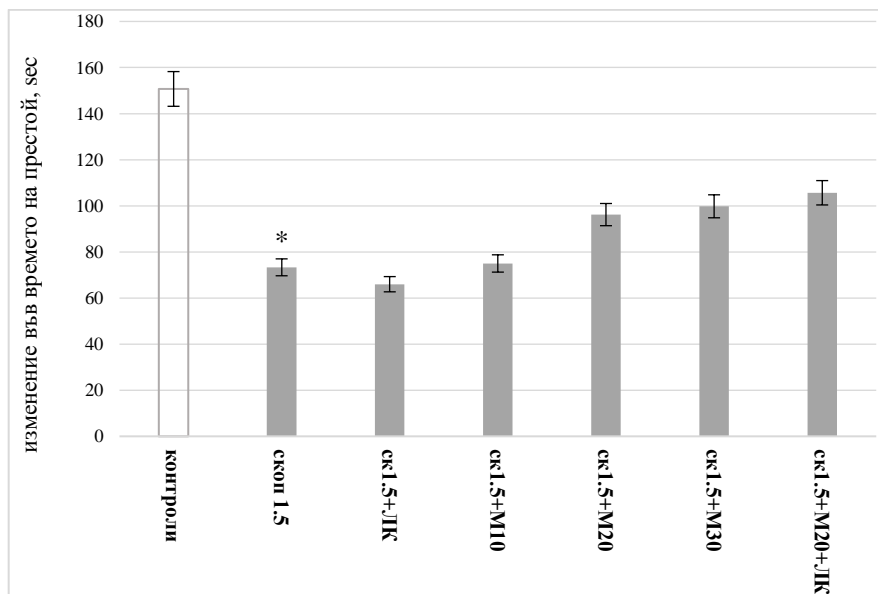
на разпознавателната памет при плъховете се дължи на предизвикания оксидативен стрес. Установено е, че както референтите (Гал и ЛК), така и миртенала, приложени самостоятелно, нямат необходимия потенциал да коригират настъпилите изменения в резултат на еднократната висока доза от холиноблокера. В този случай ефективна е само комбинацията на монотерпеноида с галантамин – референта с анти-холинестеразна активност.

Проведените експерименти потвърждават хипотезата за многофакторните етиология и патогенеза на невродегенеративните увреждания, с което подчертават значението на мултитаргетната терапия като най-удачен подход при търсенето и намирането на средство с комплексен механизъм на действие спрямо патологичния процес.

5.2.3. Ефекти на миртенал върху нервно-мускулната координация при експериментални гризачи със скополамин-индуцирана деменция

Гризачи с експериментално предизвикани увреждания на ЦНС и такива, които получават фармакологични или други агенти, могат да бъдат изследвани с *Rota rod test* за нервно-мускулна координация и двигателни дефицити. Тестовата постановка е същата като тази, използвана при здравите животни, третиран с миртенал.

Промените във времето на задържане върху въртящото се рамо на постановката при мишките с предизвикана от скополамина деменция (1.5 mg/kg), след многократно 11-дневно третиране с миртенал в различни дози и с референтите (ЛК и Гал) са представени графично на фигура 28.



Фиг. 28. Ефекти върху нервно-мускулната координация при мишки със скополамин-индуцирана деменция (1.5 mg/kg) след 11-дневно третиране с миртенал в нарастващи дози

(10, 20 и 30 mg/kg) и сравняването им с тези на референта ЛК, приложена самостоятелно или в комбинация с миртенал (*P < 0.05 спрямо контролите)

Разликите във времето на престой на мишките върху въртящата се ос са показателни за динамиката на промените при всяка група. Спрямо началното ниво, времената на задържане при всички групи, без тези, третирани само с ЛК и с миртенал в дозата 10 mg/kg, са недостоверно повишени спрямо скополаминовата, съответно с 31.2 и с 36.1 % при групите, инжектирани с миртенал в дози 20 и 30 mg/kg, и с 44.1 % – при животните, получили миртенал в комбинация с ЛК. Тези резултати показват, че както антиоксидантът ЛК, така и миртеналът (във всички дози), са недостатъчно ефективни, за да противодействат на увреждащото действие на скополамина при дементните мишки.

Тестването е проведено и при плъхове след многократно 11-дневно третиране със скополамин (1.0 mg/kg), с миртенал в доза 40 mg/kg и с референтите липоева киселина и галантамин. Единствено антихолинестеразният препарат подобрява координацията и издръжливостта при дементните плъхове. И тук миртеналът не оказва влияние върху моториката на експерименталните животни.

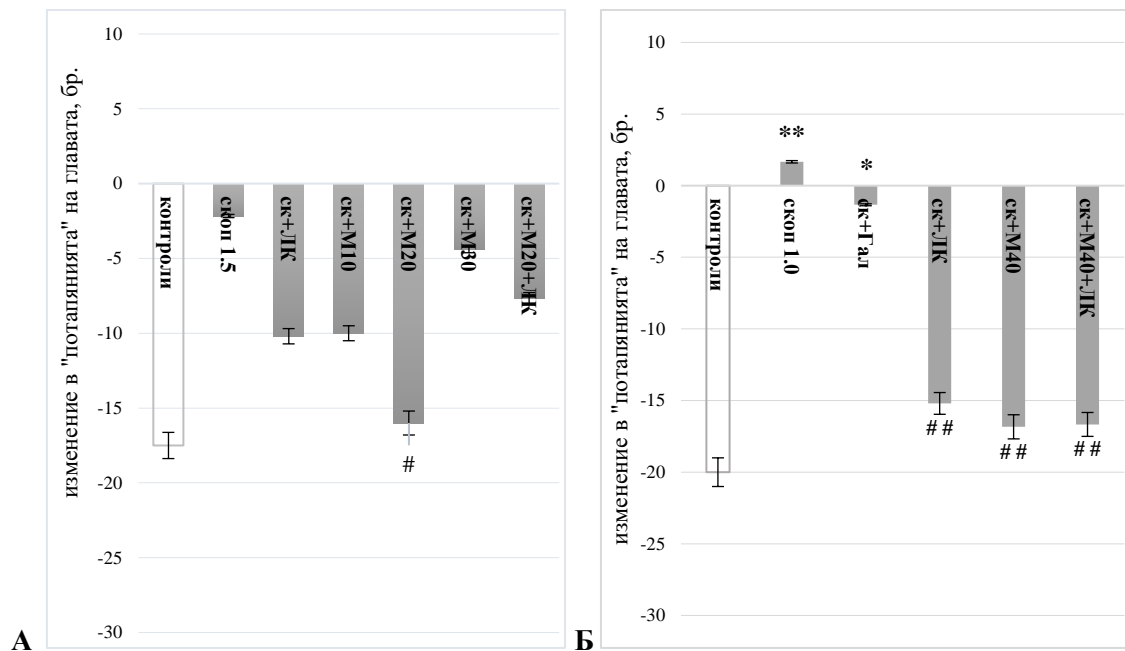
В заключение при проведените от нас експерименти с *Rota rod test* миртеналът не предизвиква подобрене в нервно-мускулната координацията и издръжливостта при дементните мишки и плъхове.

5.2.4. Ефекти на миртенал върху проучвателната активност/ пространствената ориентация при експериментални гризачи със скополамин-индуцирана деменция

▪ *Изследване ефектите на миртенал при опитни гризачи със скополамин-индуцирана деменция при Hole board test*

Тестването е проведено преди началото на експеримента (начално обучение) и 24 часа след последното третиране на животните. Броят „потапяния“ на главата в дупките, разположени по пода на полето, е отчетен за период от 3 минути. Наблюдавана е проучвателната активност при гризачите след многократно 11-дневно приложение на монотерпеноида – при *мишките* със скополамин индуцирана деменция (1.5 mg/kg), третирани с миртенал в нарастващи дози и с референта липоева киселина, и при *плъховете* с деменция, предизвикана от скополамин (1.0 mg/kg), третирани с миртенал (40 mg/kg) и с референтите липоева киселина и галантамин.

Изменението в броя „потапяния“ на главата на опитните животни спрямо НО е представено на фигура 29.



Фиг. 29. Ефекти върху проучвателната активност при гризачи със скополамин-индуцирана деменция след многократно приложение на миртенал

А – Мишки – ефекти след 11-дневно третиране с миртенал в нарастващи дози (10, 20 и 30 mg/kg) и сравняването им с тези на референта ЛК (#P < 0.05 спрямоскоп. група)

Б – Плъхове – ефекти след 11-дневно третиране с миртенал в доза 40 mg/kg и сравняването им с тези на референтите ЛК и Гал (*P < 0.05, **P < 0.01 спрямо контролите; ##P < 0.01 спрямоскоп. група)

Скополаминът уврежда хабитуацията на експерименталните мишки (Фиг. 29 А). Най-добри резултати постига миртеналът, приложен в доза 20 mg/kg, с ниво на статистическа достоверност $p < 0.05$ спрямо дементните животни, а изменението (намалването) в показателя, отчитащ активността, е подобно на това при контролите. В резултат на проведените проучвания може да се направи извода, че миртеналът в доза 20 mg/kg възстановява увредената от скополамина хабитуация на опитните мишки, изразено чрез намаляване на изследователската им активност.

Контролните плъхове понижават изследователската си активност, подобно на мишките (Фиг. 29 Б). Скополаминът води до статистически достоверно повишение в броя „потопания“ на главата спрямо контролите, което е показател за увредена хабитуация ($p < 0.01$). Антихолинестеразният референт галантамин не повлиява в достатъчна степен проучвателната активност на дементните животни. От друга страна, вторият референт – антиоксидантът ЛК, както и миртеналът възстановяват показателя до нива, близки до тези на контролите – изменението спрямо скополаминовата група е с ниво на достоверност $p < 0.01$.

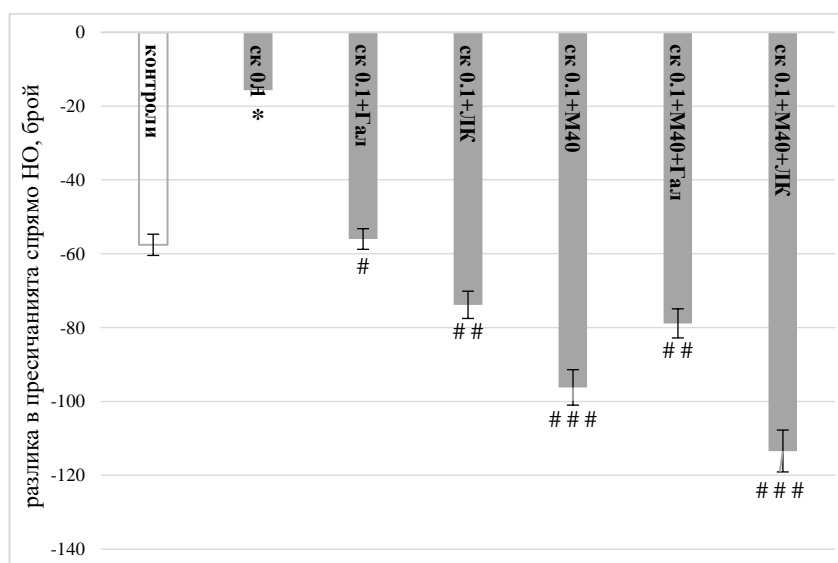
В заключение може да се обобщи, че миртеналът при мишки и плъхове с индуцирана деменция, след многократно приложение, подобрява достоверно изследователското

поведение при *Hole board test*. Наблюдаваните по-добри ефекти на ЛК върху поведението при експерименталните гризачи, в сравнение с тези на галантамина, е основание да се предположи, че оксидативният стрес, предизвикан от холиноблокера, е основният увреждащ механизъм на проучвателната активност, респективно на пространствената ориентация.

▪ *Изследване ефектите на миртенал при опитни гризачи със скополамин-индуцирана деменция при теста на откритото поле (Open-field test)*

Методът на откритото поле е използван за оценка на базовата проучвателна активност при *плъховете* с експериментална деменция, предизвикана от скополамин в субтоксична доза (0.1 mg/kg) и нейната промяна в отговор на ефекта, предизвикан от изследваните вещества. Експерименталната постановка е същата, както при теста за разпознаване на нови обекти. Тестването за установяване изменението в поведението на животните от различните групи е извършено на 24-я час след края на третирането.

Резултатите, след многократното 8-дневно приложение на миртенала в доза 40 mg/kg и на референтите липоева киселина и галантамин, са представени на фигура 30.



Фиг. 30. Ефекти върху проучвателната активност при *плъхове* със скополамин-индуцирана деменция (0.1 mg/kg) след 8-дневно третиране с миртенал в доза 40 mg/kg и сравняването им с тези на референтите ЛК и Гал – сравняване на измененията (*P < 0.05 спрямо контролите и спрямо скополамина, съответно #P < 0.05, ## P < 0.01, ###P < 0.001) (*t-Test*)

При контролната група се наблюдава очакваното нормално поведение, изразено с понижаване на проучвателната активност. *Плъховете* от скополаминовата група проявяват тревожност и обърканост, което е показател за увредена хабитуация, като изменението в изследователското поведение е достоверно по-малко в сравнение с контролните ($p < 0.05$).

Както миртеналът, така и двата референта антагонизират, но в различна степен увреждащото действие на холиноблокера. С най-високо ниво на достоверност спрямо скополаминовата група е разликата при гризачите, третирани с миртенал и с комбинацията на изследваното вещество с антиоксидантния референт ЛК ($p < 0.001$), като тези от втората група демонстрират най-голямо, но статистически недостоверно понижение в изследователската активност (с 97 %) спрямо контролите. Получените резултати насочват към известно потенциране ефектите на приложените вещества върху проучвателното поведение при дементните гризачи.

И при двата проведени теста (*Hole board* и *Open field*) за изследване състоянието на проучвателната активност при плъховете със скополамин-индуцирана деменция, холиноброкерът уврежда хабитуацията им, независимо от използваната доза (1.0 mg/kg и 0.1 mg/kg). Миртеналът, приложен в доза 40 mg/kg, антагонизира негативните ефекти на скополамина върху проучвателното поведение при плъховете и при двете експериментални постановки. При мишките средната доза миртенал (20 mg/kg) при 11-дневното третиране възстановява увредената от скополамина хабитуация на животните при *Hole board test*, като изследваният показател е с близки до контролите стойности, а изменението е достоверно спрямо скополаминовата група ($p > 0.05$).

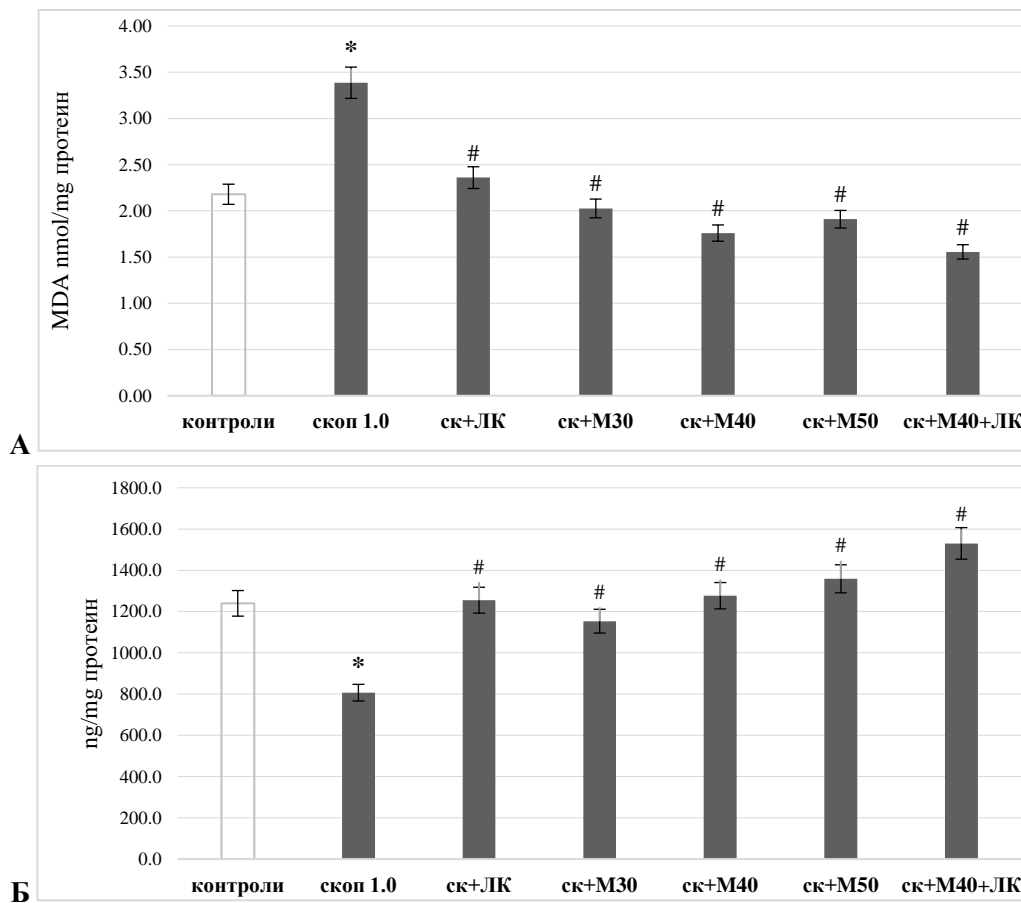
В заключение миртеналът възстановява увредената от скополамина хабитуация на опитните животни.

5.2.5. Ефекти на миртенал върху мозъчния оксидативен статус при гризачи със скополамин-индуцирана деменция

Известно е, че скополаминът генерира ROS и придивиква оксидативни промени, което дава възможност за изследване на антиоксидантния капацитет на различни субстанции при модел на скополамин-индуцирано увреждане.

5.2.5.1. Ефекти на миртенал върху мозъчния оксидативен статус при *мишки* със скополамин-индуцирана деменция

Ефектите на миртенала върху оксидативния статус при мишките с индуцирана от скополамин деменция (1.0 mg/kg), са проучени след 14-дневно третиране с миртенал в нарастващи дози и с референта ЛК. Оценката е извършена чрез определяне нивата на продуктите на ЛПО и tGSH в мозъка на опитните мишки (Фиг. 31) и чрез определяне активността на антиоксидантните ензими SOD, CAT и GPx (Фиг. 32).



Фиг. 31. Ефекти върху оксидативния статус в мозъка при мишки със скополамин-индуцирана деменция (1.0 mg/kg) след 14-дневно третиране с миртенал в нарастващи дози (30, 40 и 50 mg/kg) и сравняването им с тези на референта ЛК – определяне нивата на ЛПО (А) и tGSH (Б) (*P < 0.05 спрямо контролите; #P < 0.05 спрямо скоп.)

При мишките от групата, третирани само със скополамин в приложената доза, се наблюдава повишение в нивата на продуктите на ЛПО с 55.5 % и съответно, понижение в концентрацията на tGSH – с 35 % спрямо контролите, с нива на достоверност $p < 0.05$. В сравнение с референта ЛК, миртеналът, приложен в доза 40 mg/kg, понижава в по-голяма степен нивата на продуктите на ЛПО (с 25.5 %) (Фиг. 31 А).

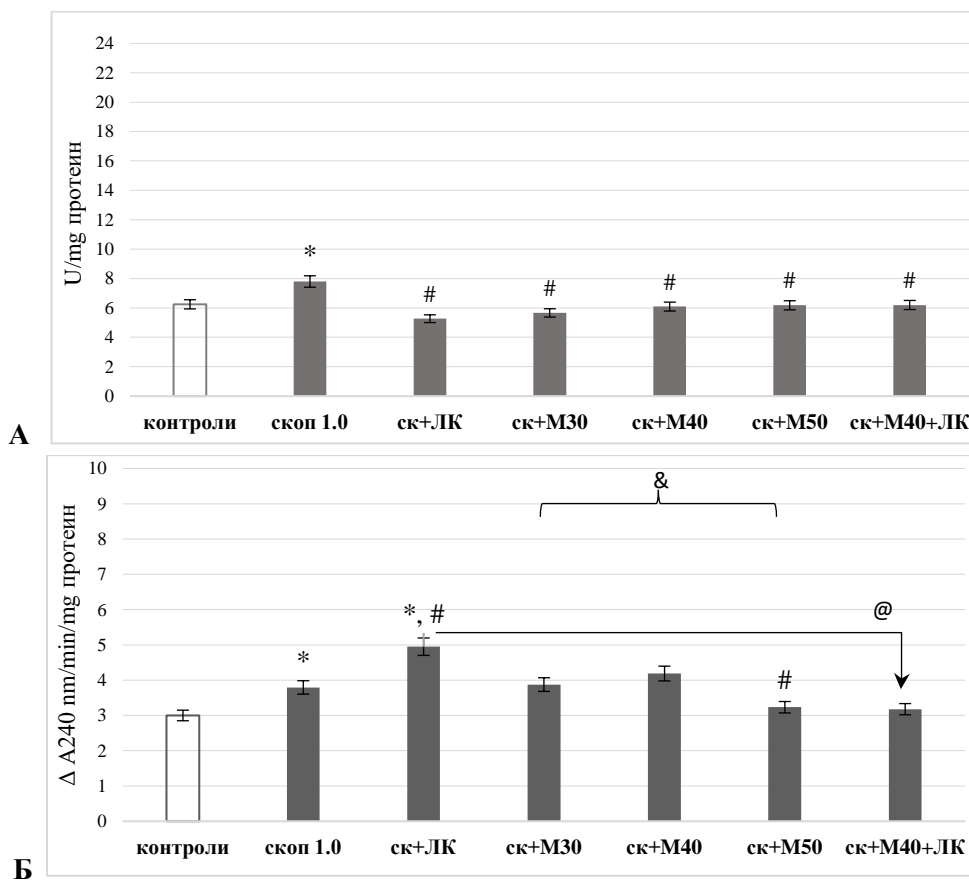
При tGSH е установена право пропорционална дозова зависимост – с нарастване на дозата миртеналът достоверно повишава нивата в мозъка на мишките, в сравнение със стойностите при животните от скополаминовата група ($p < 0.05$) (Фиг. 100 Б). При третиране с дозата 30 mg/kg концентрацията на tGSH спрямо тази група се повишава с 43 %, при дозата 40 mg/kg – с 58.3 %, а при 50 mg/kg – с 68.4 %.

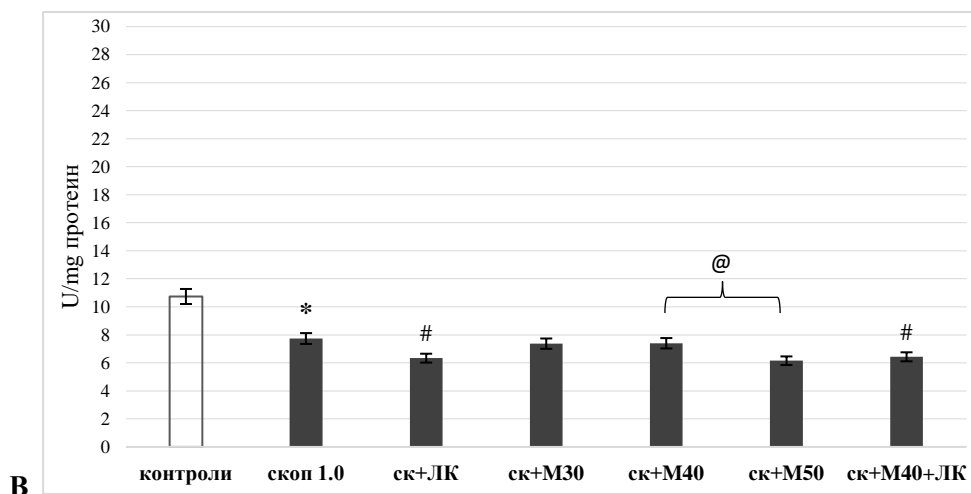
Най-добри резултати в повлияването на оксидативния стрес при дементните мишки показва групата гризачи, третирани с комбинацията миртенал и ЛК. Наблюдава се понижение в нивата на продуктите на ЛПО – с 54 % спрямо скополаминовата група, с 34 % спрямо мишките, третирани с ЛК и с 11.4 % спрямо тези, третирани с миртенал (40

mg/kg). По отношение концентрацията на tGSH резултатите са аналогични – комбинацията на миртенала с ЛК постига най-сериозно повишение в показателя – с 89.7 % спрямо скополаминовата група, с 21.9 % спрямо групата животни, третирани с ЛК и с 19.9 % спрямо тези, третирани с миртенал в доза 40 mg/kg.

Естествената антиоксидантна защита на невроналните и глиялните клетки от оксидативния стрес включва глутатиона и ензимите SOD, CAT, GPx (Gandhi and Abramov, 2012). Прогресията на невродегенеративните заболявания е съпроводена с изменение в активността и експресията на антиоксидантните ензими (Pocernich et al., 2011).

Ефектите на миртенала върху активността на антиоксидантните ензими SOD, CAT и GPx при мишките с инуцирана от скополамин деменция, са представени на фигура 32.





Фиг. 32. Ефекти върху активността на антиоксидантните ензими SOD (А), CAT (Б) и GPx (В) в мозъка при мишки със скополамин-индуцирана (1.0 mg/kg) деменция след 14-дневно третиране с миртенал в нарастващи дози (30, 40 и 50 mg/kg) и сравняването им с тези на референта ЛК (*P < 0.05 спрямо контролите, #P < 0.05 спрямо скоп.)

В резултат на предизвикания от скополамина оксидативен стрес в мозъка на гризачите активността на ензимите спрямо контролната група е повишена – на SOD с 24.8 %, на CAT с 26.3 %, а тази на GPx е статистически достоверно понижена с 29.9 % ($p < 0.05$).

Установено е, че различните компоненти на антиоксидантната защита на организма могат да действат съвместно, като например SOD и CAT, с което може да се обясни еднопосочното изменение при тези два ензима (Fridovich, 1978).

Липоевата киселина най-изразено повлиява активността на ензима SOD, което води до понижаване от 32.4 % спрямо дементната група (Фиг. 32 А). Миртеналът променя показателя по дозо-зависим начин – с нарастване на приложената доза намалява ефекта върху ензимната активност. При дозата от 30 mg/kg понижението на ензимната активност спрямо скополаминовата група е с 27.4 %, при 40 mg/kg – с 21.9 %, а при 50 mg/kg – с 20.8 %, с ниво на достоверност $p < 0.05$. И при трите дози на миртенала активността на SOD е коригирана до стойности близки до тези, характерни за контролните животни. Подобно на резултатите от нашето проучване с миртенал, при изследване невропротективните ефекти на α -пинен върху модел на скополамин-индуцирана деменция, Lee GY et al. (2017) наблюдават повишение в нивата на антиоксидантния ензим SOD в хипокампа при плъхове.

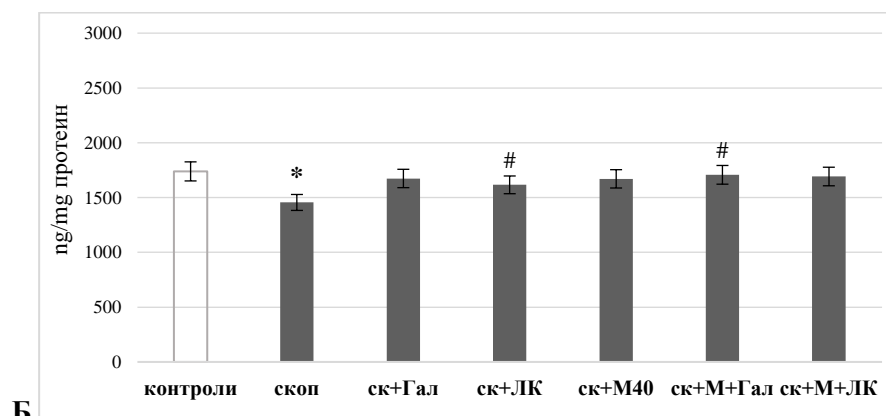
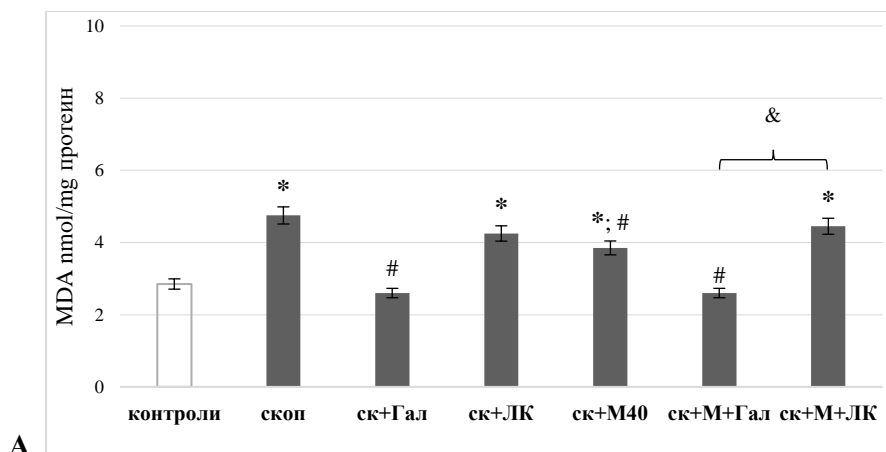
Миртеналът и в трите приложени дози не успява да възстанови активността на ензимите CAT и GPx до стойности близки с тези на контролите. Подобни са резултатите и при групата мишки, третирани с референта – спрямо CAT и GPx антиоксидантът се проявява като про-оксидант (Фиг. 32 Б и В). Тези свойства на липоевата киселина са известни. Про-оксидантна активност, а така също и антиоксидантни свойства на липоевата киселина са докладвани още през 2002 г. от Moini et al. и от Sakataу през 2006 година.

Предполага се, че способността на ЛК да функционира като анти- или про-оксидант, поне отчасти, се определя от типа на оксидативния стрес и от физиологичното състояние.

В заключение миртеналът подобрява оксидативния статус при мишките, третирани със скополамин, повлиявайки някои показатели по дозо-зависим начин. Установено е повишение в концентрациите на tGSH с нарастване на дозата, като същевременно е възстановена стимулираната от скополамина активност на SOD. Монотерпеноидът понижава съдържанието на продуктите на липидната пероксидация в мозъка на дементните гризачи в по-голяма степен от референта ЛК, като най-добри резултати постига дозата от 40 mg/kg.

5.2.5.2. Ефекти на миртенал върху мозъчния оксидативен статус при *плъхове* със скополамин-индуцирана деменция

Проучването е проведено с мозъците на плъховете с индуцирана от скополамин деменция, приложен в дозовата модификация (0.1 mg/kg за 8 дни + 20.0 mg/kg на 9-я ден), третирани с миртенал в доза 40 mg/kg и референтите липоева киселина и галантамин, в продължение на 9 дни. Изследвани са нивата на продуктите на ЛПО и на tGSH (Фиг. 33), както и активностите на антиоксидантните ензими (Фиг. 34).



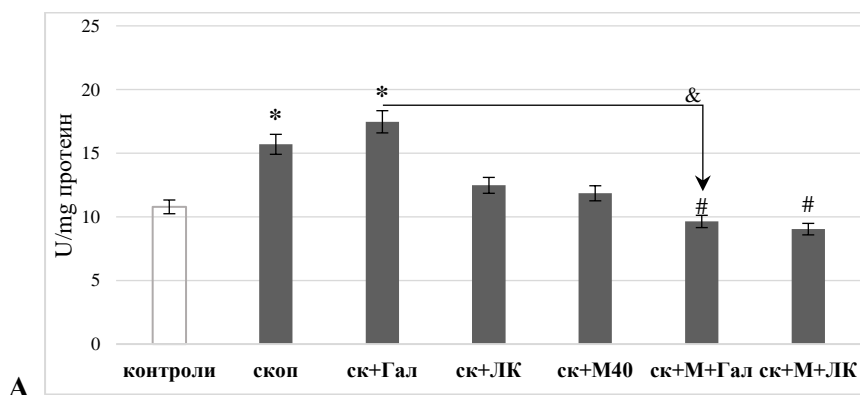
Фиг. 33. Ефекти върху оксидативния статус в мозъка при плъхове със скополамин-индуцирана деменция (дозова комбинация) след 9-дневно третиране с миртенал в доза 40 mg/kg и сравняването им с тези на референтите ЛК и Гал – определяне нивата на продуктите на ЛПО (А) и на tGSH (Б) (*P < 0.05 спрямо контролите, #P < 0.05 спрямо скоп.)

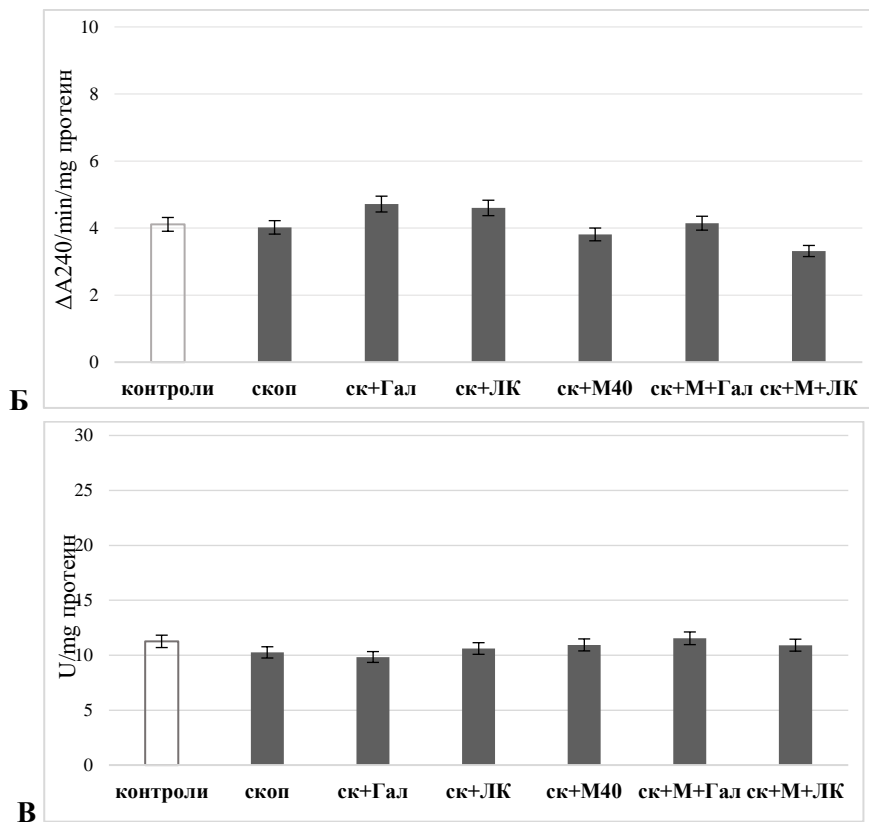
Подобно на другите изследвания върху мозъчния оксидативен статус, при дементните плъхове, скополаминът повишава с 6.67 % количеството на продуктите на ЛПО спрямо контролите и понижава концентрацията на tGSH с 16.3 %, с ниво на достоверност $p < 0.05$. Миртеналът понижава статистически значимо нивата на продуктите на ЛПО – с 19 % в сравнение с тези при скополаминовата група ($p < 0.05$) и недостоверно повишава (с 14.8 %) нивото на tGSH.

Впечатление правят резултатите от приложението на антихолинестеразния стандарт галантамин. Референтът проявява антиоксидантни свойства, които са съобщени и от други изследователи. Изследвания *in vitro* установяват активността му срещу ROS (Traykova et al., 2003). Докладвани са и други механизми на протективното действие – защита на потенциала на митохондриалната мембрана; предотвратяване на смущения в мембрания флуидитет; намаляване свръхпроизводството на ROS, в резултат от повишаване нивото на ACh поради инхибиране на AChE и алостерично потенциране на $\alpha 7$ – подтип на N-холинергичните рецептори (Tsvetkova et al., 2013). Нашите изследвания разкриват антиоксидантните свойства на галантамина при плъхове с експериментален модел на деменция.

Като потвърждение на установените от някои автори про-оксидантни свойства на ЛК, при проведените от нас проучвания, референтът проявява про-оксидантна активност, изразена чрез повишаване нивата на продуктите на ЛПО до стойности, близки с тези на скополамина. За разлика от токсичния агент, ЛК достоверно повишава концентрациите на tGSH ($p < 0.05$).

Според нас по-слабо проявените антиоксидантни свойства на монотерпеноида при този опит са свързани с високата финална доза на токсичния агент и предизвикания от нея оксидативен стрес.





Фиг. 34. Ефекти върху активността на SOD (А), CAT (Б) и GPx (В) в мозъка при плъхове със скополамин-индуцирана деменция (дозова комбинация) след третиране с миртенал в доза 40 mg/kg и сравняването им с тези на референтите ЛК и Гал, приложени самостоятелно или в комбинация с миртенал (*P < 0.05 спрямо контролите; #P < 0.05 спрямоскоп. група; &P < 0.05 спрямо групата, третирана с Гал)

Скополаминът повишава статистически достоверно активността на ензима SOD (с 45.5 %) спрямо контролите ($p < 0.05$) (Фиг. 34 А). Приложението на миртенала възстановява активността на SOD до стойности, близки до тези на контролите, а спрямо скополаминовата група понижението е с 24.5 % при липса на достоверност. Референтът галантамин не повлиява показателя, но при комбинирането му с миртенал, се наблюдава значимо понижение на активността спрямо групата животни, третирани само с галантамин ($p < 0.05$). Едновременното третиране с другия референт – ЛК, статистически достоверно понижава ензимната активност спрямо скополаминовата група ($p < 0.05$), подобно на комбинацията с антихолинестеразния стандарт.

Нашите резултати потвърждават тези на Kumar et al. (2014), според които приложението на скополамин в доза 2.0 mg/kg предизвиква оксидативен стрес в мозъка на опитни мишки, проявен с повишение в нивата на продуктите на ЛПО и в активността на ензима SOD ($p < 0.001$).

В условията на проведения експеримент с дементните плъхове, скополаминът не променя активността на CAT (Фиг. 34 Б). Миртеналът, както при самостоятелно

приложение, така и в комбинация с референтите, също не води до изменение в показателя, а галантаминът повишава активността на каталазата недостоверно спрямо скополаминовата група (със 17.3 %).

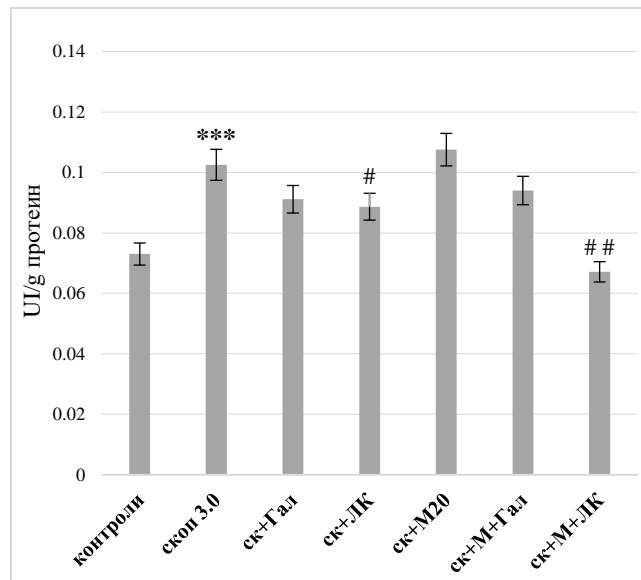
Изследваните вещества не повлияват активността на GPx (Фиг. 34 В). Ansari and Scheff (2010), при *post mortem* изследвания на супернатанта от мозъчната кора на пациенти с БА, също не установяват значителна промяна в активността на GPx.

Много терпени от растителен произход проявяват антиоксидантни свойства чрез повлияване различните не-ензимни и ензимни компоненти на антиоксидантната защита на организмите. Проведените изследвания разкриват капацитета на миртенала да повлиява оксидативния мозъчен статус при дементните *плъхове*. При тях изследваното вещество понижава количеството на продуктите на ЛПО, повишава недостоверно концентрацията на tGSH и възстановява повишената от скополамина активност на SOD (сходно с действието му при мишки), без да повлиява активностите на CAT и GPx. При дементните *мишки* миртеналът също повлиява мозъчния оксидативен статус, проявено с понижаване нивата на продуктите на ЛПО, повишаване концентрацията на tGSH и възстановяване изменените от скополамина активности на ензимите SOD и CAT до тези на контролите, като и тук не са установени ефекти върху активността на GPx.

5.2.6. Ефекти на миртенал върху холинергичната трансмисия в мозъка на гризачи със скополамин-индуцирана деменция

5.2.6.1. Ефекти на миртенал върху активността на мозъчната ацетилхолинестераза при *мишки* със скополамин-индуцирана деменция

Активността на мозъчната AChE при мишките с експериментална деменция, предизвикана от скополамин в доза 3.0 mg/kg, е изследвана след 11-дневно третиране с миртенал в доза 20 mg/kg и с референтите липоева киселина и галантамин (Фиг. 35).



Фиг. 35. Ефекти върху активността на мозъчната АСhЕ при мишки със скополамин-индуцирана деменция (3.0 mg/kg) след 11-дневно третиране с миртенал в доза 20 mg/kg (***P < 0.001 спрямо контролите; #P < 0.05, ##P < 0.01 спрямо скополаминовата група) (*t-Test*)

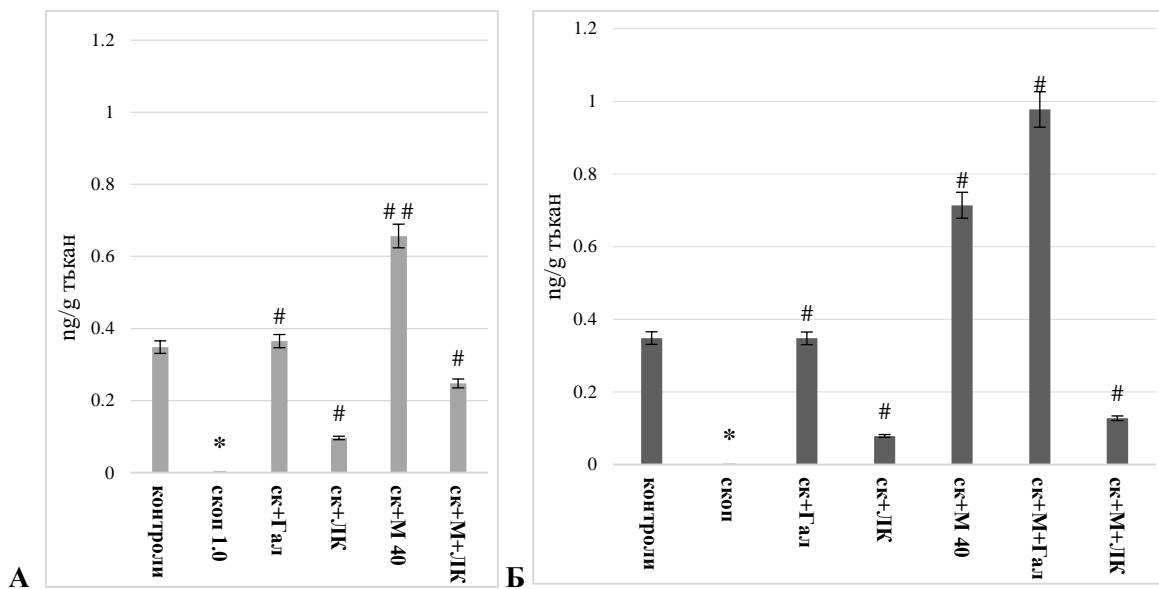
При групата мишки, третирани само със скополамин, активността на мозъчната АСhЕ в сравнение с контролната група, е повишена с 35.6 % при много висока сигнификантност ($p < 0.001$). Миртеналът не променя ефекта на скополамина върху активността ензима. Референтът галантамин инхибира недостоверно активността на АСhЕ с 11.1 %. Липоевата киселина понижава достоверно показателя спрямо скополаминовата група ($p < 0.05$), а комбинирането ѝ с миртенал намалява в най-голяма степен активността на АСhЕ ($p < 0.01$), доближавайки я до тази на контролите.

Arivazhagan et al. (2006), установяват, че ЛК потиска активността на АСhЕ в различни мозъчни участъци след 7- и 14-дневно интраперитонеално приложение в доза 100 mg/kg при млади и възрастни плъхове (на 4 и 24 месеца). Резултатите от нашите изследвания показват подобни ефекти на ЛК, приложена в доза 30 mg/kg, при скополамин-индуциран модел на деменция при мишки, проявени с корекция на повишената от холиноблокера активност на АСhЕ. Понастоящем не са открити други данни за антихолинестеразни свойства на липоевата киселина при експериментални модели на деменция.

5.2.6.2. Ефекти на миртенал върху нивата на ацетилхолин в мозъка на плъхове със скополамин-индуцирана деменция

Нивата на мозъчния АСh при плъховете с предизвикана деменция, са изследвани след 11-дневно третиране със скополамин в доза 1.0 mg/kg и след 9-дневно третиране с дозовата комбинация (0.1 mg/kg за 8 дни + 20.0 mg/kg на 9-я ден). Едновременно с това при

животните са въвеждани миртенал в доза 40 mg/kg и референтите липоева киселина и галантамин в избраните дози (Фиг. 36).



Фиг. 36. Ефекти върху нивата на АСh в мозъка при плъхове със скополамин-индуцирана деменция, третирани с миртенал в доза 40 mg/kg и сравняването им с тези на референтите ЛК и Гал (*P < 0.05 спрямо контролите; #P < 0.05 спрямо скополаминовата група)

А – скополамин, приложен в доза 1.0 mg/kg за 11 дни

Б – скополамин, приложен в дозовата комбинация за 9 дни

И при двете дози, токсичният агент предизвиква статистически достоверно понижаване в концентрацията на мозъчния медиатор, в сравнение с контролната група ($p < 0.05$). Получените резултати и при двата опита потвърждават тези на Lee S. et al. (2014), които установяват понижена концентрация на АСh и повишена активност на АСhЕ в мозъка на мишки, инжектирани интраперитонеално със скополамин в доза 1.0 mg/kg за 7 дни.

Понижените от скополамина концентрации на медиатора АСh в мозъка на експериментални гризачи не се дължат само на активиране на АСhЕ. Според литературни данни увреждащите ефекти на токсичния агент спрямо холинергичната медиация в мозъка на опитните животни са свързани и с потискане активността на ензима холинацетилтрансфераза (ChAT), отговорен за синтезата на медиатора (Neo et al., 2006).

Известно е, че ЛК увеличава производството на АСh чрез активиране на ChAT (Holmquist et al., 2007). Нашите изследвания показват, че в сравнение с галантамина, антиоксидантът по-слабо повлиява промените в концентрацията на медиатора. Комбинирането на ЛК с монотерпеноида не предизвиква засилване на действието.

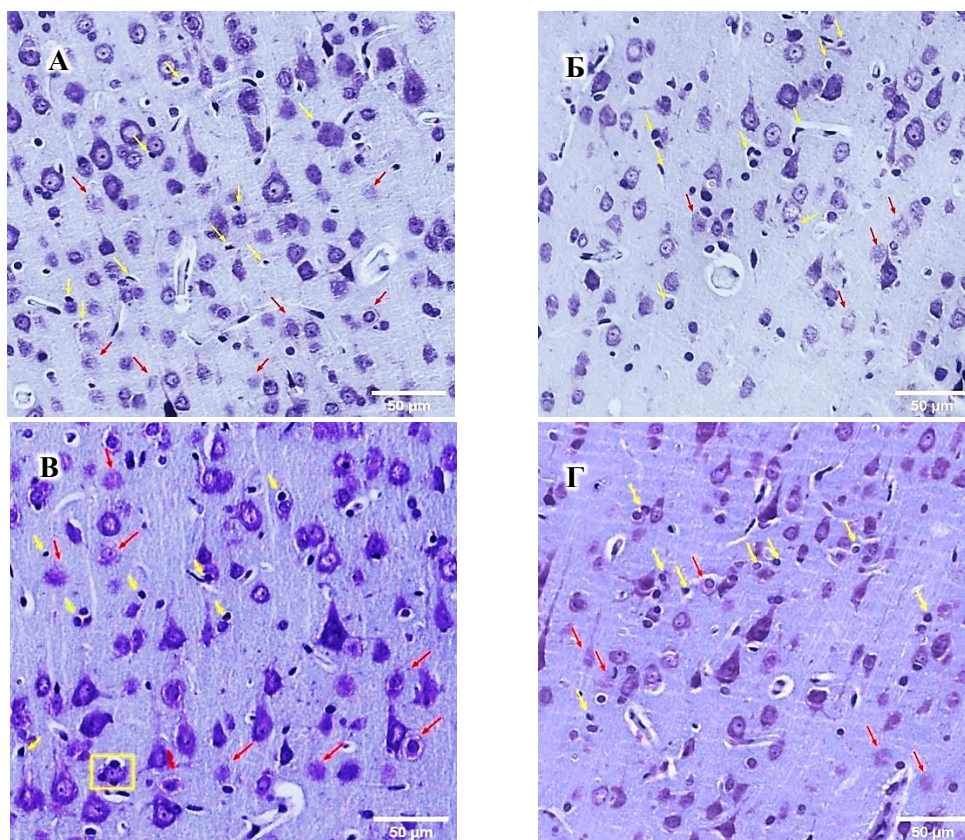
Миртеналът в доза 40 mg/kg повишава достоверно съдържанието на АСh в мозъка на дементните плъхове и при двата опита, а при дементните мишки не потиска активността на

AChE. Резултатите дават основание да се предположи, че стимулирането на активността на ензима ChAT е възможен механизъм за повишаване нивата на медиатора. В подкрепа на тази хипотеза са установените подобни свойства на α -пинена, чийто метаболит е миртенала (Lee GY et al., 2017). Комбинирането на монотерпеноида с антихолинестеразният агент галантамин най-значимо повишава съдържанието на ACh спрямо дементната група животни ($p < 0.05$), което насочва към към синергична зависимост в ефекта на двете вещества.

В заключение миртеналът стимулира активността на ChAT, а галантаминът намалява разграждането на ACh чрез потискане на езима AChE. Крайният резултат е значимо повишение в съдържанието на мозъчния ACh при дементните плъхове, което показва, че проведените експерименти могат да допринесат за изясняване механизма на действие на миртенала върху нивата на медиатора.

5.2.7. Хистопатологични изследвания

В мозъчната тъкан на животните, третирани със скополамин, се проявяват белези на усилена невронална дегенерация, описани в раздела за верификация на скополаминовия модел за предизвикване на деменция (Фиг. 23). Приложението на миртенал води до намаляване проявите на увреждане, предизвикани от холиноблокера (Фиг. 37).



Фиг. 37. Качествен анализ на мозъчна кора при плъхове със скополамин-индуцирана деменция (дозова модификация), третирани с миртенал в доза 40 mg/kg за 9 дни – сравнение на резултатите при дементните с тези, третирани едновременно с миртенал

А – Слой V от моторната кора (M1) на плъх от скополаминовата група;

Б – Слой V от моторната кора (M1) на плъх, третиран едновременно със скополамин и миртенал;

В – Слой V от сензорна кора на плъх, третиран едновременно със скополамин и миртенал.

(*Червени стрелки* – неврони с белези на хроматолиза и/или вакуолизация; *жълти стрелки* – глиални клетки; *жълт правоъгълник* – периневронална глиоза);

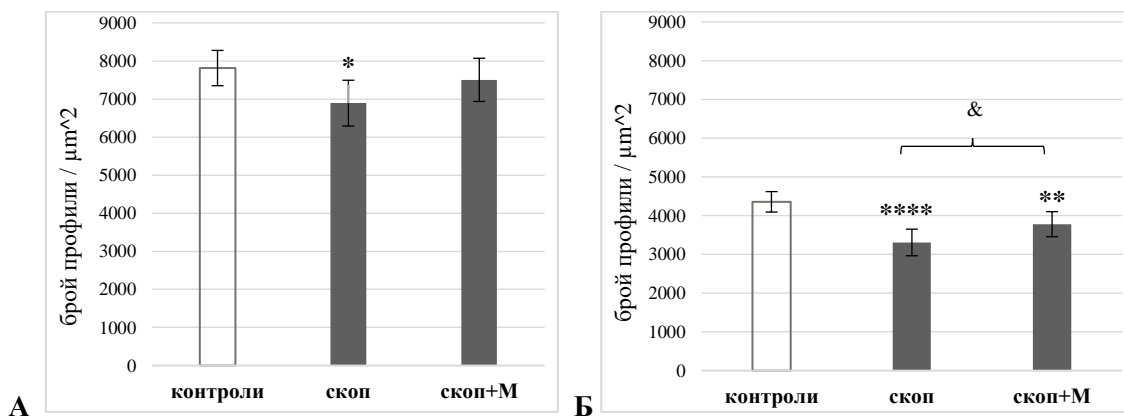
Г – Слой V от сензорна кора на плъх от скополаминовата група

Дължина на мащабната лента – 50 μm

В кората при дементните плъхове (скополаминова група) се наблюдават видима глиоза и множество неврони с фина вакуолизация на цитоплазмата и подчертана загуба на Нислови грануляции (хроматолиза). Тези изменения са локализирани основно в трети и пети слой от кората, но засягат и останалите слоеве (Фиг. 37 А и В). Срещат се и невронни сенки, както и участъци на агрегация на микроглия – индиректни белези за невронална смърт, както и неврони с пикноза или с периневронална микроглиоза (близка апозиция между тяло на неврон и няколко малки ядра на невроглия).

В групата плъхове, третирани с комбинацията скополамин и миртенал, степента на глиалната реакция изглежда сходна, но наблюдаваните признаци на дегенерация в кората са по-умерени. Основно се наблюдава вакуолизация на цитоплазмата и хроматолиза (Фиг. 37 Б и Г). Основната разлика с дементните плъхове е, че кариолиза, кариопикноза и периневронална микроглиоза в мозъчната тъкан се срещат сравнително рядко.

След изследване гъстота (брой профили на 1 mm^2) на всички профили в кората, абсорбиращи повече от 20% от светлината, при третираните със скополамин плъхове се наблюдава достоверно понижение на показателя в сравнение със здравите контроли ($p = 0.0182$) (Фиг. 38 А).



Фиг. 38. Ефекти върху общия брой профили (гъстота) (А) и върху броя профили (гъстота) с площ, по-голяма от 31 μm^2 (Б), в кората при плъхове със скополамин-индуцирана деменция, третирани с миртенал в доза 40 mg/kg (*P < 0.05, **P < 0.01, **P < 0.0001 спрямо контролите)**

И тук животните, получили комбинация от скополамин и миртенал, заемат междинна позиция с незначително понижение спрямо контролите, като липсва значимост в изменението спрямо скополаминовата група.

Изследването гъстотата на клетките в кората е разширено с определяне според размера (Фиг. 38 Б). Профили с по-голяма площ принадлежат основно на неврони. При тях се наблюдава съществен ефект върху средната гъстота на профилите на единица площ (1 mm^2) в резултат приложението на токсичния агент – достоверно понижение в сравнение с контролите ($p = 9.67 \times 10^{-6}$). Плъховете, третирани със скополамин и миртенал, заемат междинно положение – отново се наблюдава понижена гъстота на профилите, но се отчита повишение спрямо групата, третирана само със скополамин (статистически значима при ниво на доверителност $p = 0.05$, според тест на Dunnett-Tukey Kramer за небалансирани данни).

Резултатите позволяват да се направи извода, че макар и гъстотата на профилите при третираните със скополамин и миртенал животни да е понижена в сравнение със здравите контроли, налице е достоверно повишение спрямо скополаминовата група.

В хипокампа не се засичат съществени различия, подобни на тези, установени в кората.

Наред с установените невромодулаторни свойства и наблюдаваните позитивни ефекти на изследваното вещество върху паметта и обучението на опитните животни, хистопатологичните изследвания в мозъка на дементните гризачи показват, че миртеналът притежава способност, в някаква степен, да антагонизира увреждащото действие на скополамина. Холиноблокърът демонстрира токсичните си ефекти чрез значимо ($p = 0.018$) намаляване гъстотата на Cresyl-violet-позитивната фракция мозъчни клетки (брой на всички профили, поглъщащи над 20% от светлината). Миртеналът от своя страна предизвиква незначително понижение в показателя спрямо контролите, което демонстрира протективния му ефект срещу увреждащото действие на токсичния агент.

Скополаминът значително намалява средната гъстота на жизнените неврони в мозъчната кора ($p = 9.7 \times 10^{-6}$). При гризачите, третирани с миртенал едновременно със скополамин, увреждането е по-слабо проявено ($p = 0.007$), като броя на жизнените клетки в тази група е достоверно повишен спрямо този при групата плъхове, инжектирани само със скополамин ($p = 0.05$). Подобни ефекти спрямо невроглията не се наблюдават. Такива свойства на веществото не са проявени в хипокампа.

В заключение измененията в кората показват тенденция към намаляване на обема на Нисловата субстанция и/или броя на невроните на единица площ при животните със скополамин-индуцирана деменция. При плъховете, третирани едновременно със скополамин и миртенал, се наблюдава тенденция към намаляване на тези негативни

ефекти. Хистопатологичните изследвания насочват към локализация на невропротективния ефект на миртенал в кортекса.

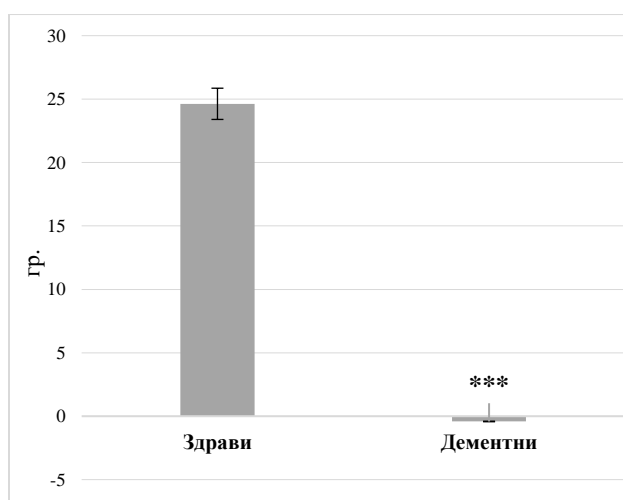
6. Сравняване ефектите на миртенала върху важни параметри при здрави и дементни експериментални гризачи

За изпълнение на поставената задача, са сравнени ефектите на миртенала върху основни поведенчески и биохимични показатели при здрави и при дементни експериментални гризачи. Направен е паралел между измененията при здравите животни, третирани с миртенал, спрямо контролните, както и при животните, третирани само със скополамин спрямо тези, третирани едновременно със скополамин и миртенал.

6.1. Сравняване ефектите върху телесните маси

При здравите гризачи миртеналът не проявява общотоксично действие и не повлиява нормалното повишение на телесните маси. Изключение прави най-високата използвана доза, която при плъховете предизвиква понижение в телесните тегла. При животните с експериментална деменция изменението на показателя е по-слабо. Противодействие на токсичния ефект на скополамина по отношение на телесните маси при мишките осъществяват по-високите дози миртенал.

Обобщеното сравняване на ефектите на миртенала върху телесните маси при здрави и дементни гризачи е представено на фигура 39.

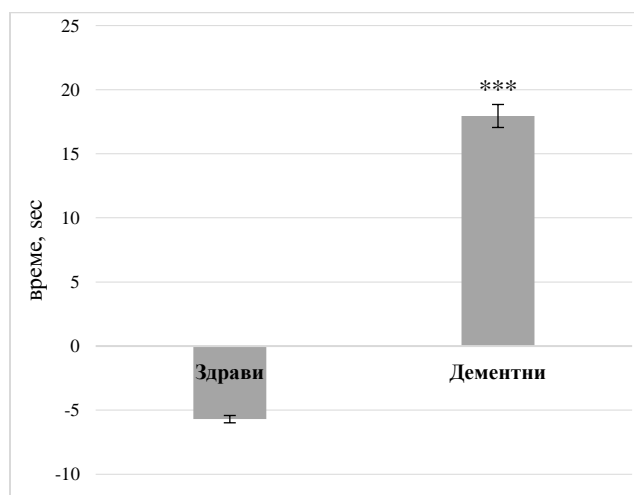


Фиг. 39. Ефекти върху телесните маси при здрави и дементни гризачи след приложение на миртенал (***P < 0.001 спрямо здравите) (*t*-Test)

От това следва, че приложението на миртенала е безопасно при здрави гризачи, а при дементни проявява анорексигенно действие. Подобни свойства са характерни и за антихолинестеразния лекарствен продукт галантамин, прилаган в терапията на невродегенеративните заболявания и използван като референт в настоящото проучване. Много вероятно е този ефект да се дължи на взаимодействие на фармакокинетично ниво между скополамина и миртенала, проявено в повлияване елиминирането на двете вещества. Друго възможно обяснение на резултатите е засилване по неясна причина на анорексигенните свойства на миртенала, характерни за много етерично-маслени компоненти, при комбинирането му с холиноблокера.

6.2. Сравняване на ефектите върху паметовите способности

Миртеналът подобрява паметовите способности на гризачите със скополамин-индуцирана деменция при *Step through test*, демонстрирано чрез увеличаване на латентното време, докато при здравите животни обратно – намалява латентното време, което е критерий за обучителните способности на животните при отчитане ефектите на приложените вещества (Фиг. 40).



Фиг. 40. Ефекти върху паметовите способности при здрави и дементни гризачи след приложение на миртенал (*) $P < 0.001$ спрямо здравите)**

Според нас възможно обяснение за наблюдаваните различия са проявените при здравите животни мембраностабилизиращи свойства на миртенала, изразяващи се в повлияване болковата чувствителност след продължително третиране при модел на индуцирана болка с централен механизъм.

Друга причина за намаляване на латентното време при здравите гризачи след приложението на миртенала, е проявения анксиолитичен потенциал. При *Step through test* животните инстинктивно се насочват към тъмната половина на постановката. След

проведеното обучение обаче, на база негативния опит от електрически ток в стъпалата, те избягват влизането в предпочитаното от тях тъмно отделение. Възможно е, съкратеното латентно време или по-краткия престой в осветеното отделение при здравите гризачи, да е свързано с понижена тревожност, наблюдавана при изследване на анксиолитичните свойства на монотерпеноида.

Установените ефекти на миртенала върху паметовите способности при здравите гризачи могат да бъдат обяснени и с разликата в резултатите при мишките и плъховете. В сравнение с контролните гризачи при мишките, третирани с изследваното вещество, се наблюдава намаляване на латентното време, докато при плъховете не се регистрира промяна в показателя. Междувидовите различия в метаболитните процеси, които предполагат по-бърза биотрансформация при мишките, в сравнение с тази при плъховете, може да са причина за по-краткия или липсващ ефект на миртенала върху способността за запаметяване при мишките.

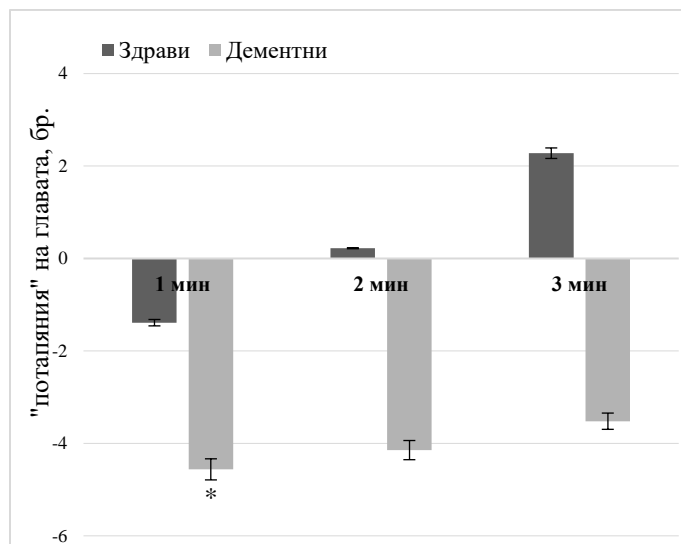
6.3. Сравняване на ефектите върху нервно-мускулната координация

При здравите мишки и плъхове миртеналът недостоверно увеличава времето на задържане върху въртящото се рамо на опитната постановка при *Rota rod test*. При мишките с индуцирано от скополамина увреждане, монотерпеноидът предизвиква несъществено подобрение в нервно-мускулното предаване, докато при плъховете не се наблюдават ефекти по отношение баланса и моториката на гризачите. Резултатите от експеримента показват, че миртеналът не проявява забележими ефекти върху нервно-мускулната координация при експерименталните животни.

Много етерични масла и техни компоненти притежават активираща и енергизираща организма активност. Терпените проявяват афинитет към различни рецептори и други структури на организма и притежават способността да влияят на жизнените процеси. Част от тях проявяват стимулиращо ЦНС действие, други имат успокояващи и релаксиращи свойства, а някои притежават способността да коригират нервно-мускулни проблеми и/или увреждания. Например тези извлечени от маслото на канабиса, повлияват ефективно изключително трудния за преодоляване тремор и подобряват състоянието на крайниците при Болестта на Паркинсон. За ралика от тях, миртеналът постига незначимо подобрение на координацията при здравите гризачи, а при използвания от нас модел на невродегенеративно увреждане е неефективен.

6.4. Сравняване на ефектите върху изследователското поведение

Сравнителното обобщение на ефектите на изследваното вещество върху проучвателната активност при здрави и при дементни гризачи е представено на фигура 41.



Фиг. 41. Ефекти върху изследователското поведение при здрави и дементни гризачи след приложение на миртенал (*P < 0.05 спрямо здравите)

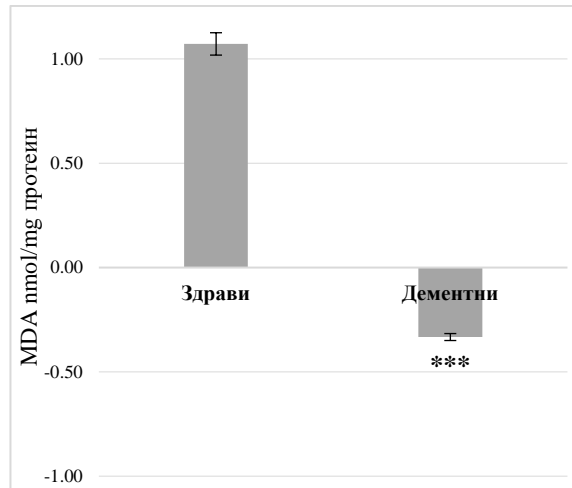
Миртеналът при здрави гризачи не повлиява проучвателната активност при *Hole board test*. Наблюдаваното известно повишение в броя „потапяния“ на главата, най-ясно проявено на 3-та минута, според някои автори, е показателно както за нивото на изследователската активност, така и за общата локомоция. Тези резултати корелират с проявеното при здравите гризачи слабо стимулиране на нервно-мускулната координация при *Rota rod test*.

Други терпени показват сходни с миртенала резултати при тестовете, изследващи състоянието на изследователското поведение и координацията. Например цинеолът, представител на растителните монотерпени, показва слабо повишение в активността при *Hole board test* и липса ефекти при *Rota rod test* при гризачи.

При дементни гризачи миртеналът проявява протективни ефекти. Намалената честота на активността при гризачите с експериментална деменция, показател за нормална хабитуация при животните в условията на позната обстановка, означава, че миртеналът противодейства на уврежданията в изследователското поведение, предизвикани от скополамина.

6.5. Сравняване на антиоксидантните ефекти (концентрация на продуктите на липидна пероксидация в мозък)

Миртеналът проявява антиоксидантни свойства само при животните с предизвикано от скополамина увреждане, докато при здравите гризачи липсват ефекти (Фиг. 42).



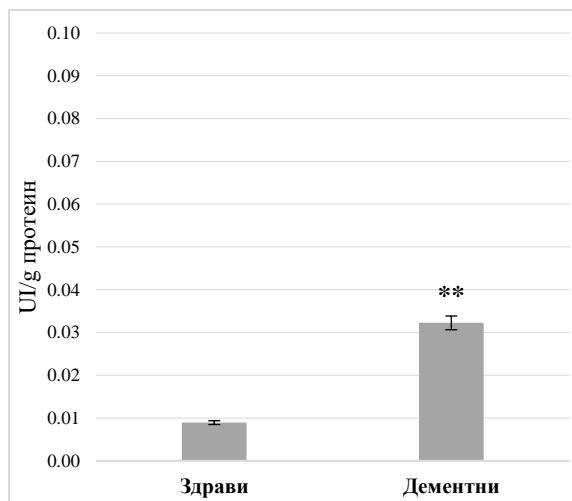
Фиг. 42. Ефекти върху нивата на продуктите на липидната пероксидация в мозъка при здрави и дементни гризачи след приложение на миртенал (*) $P < 0.001$ спрямо здравите)**

При дементните мишки и плъхове миртеналът понижава съдържанието на продуктите на ЛПО в мозъка, с ниво на достоверност $p < 0.001$.

Известни са антиоксидантните свойства на редица вещества от растителен произход с разнообразна структура. Терпените се характеризират с протективен ефект срещу оксидативния стрес, обикновено комбиниран с други ефекти с установена терапевтична полза при множество заболявания. Различните механизми на действие ги прави подходящи за проучване на възможностите им в посока мултицелестната терапия, като иновативна стратегия спрямо невродегенеративните заболявания. Подобно на многото други съединения от този клас, миртеналът проявява антиоксидантни свойства, които са водещия механизъм за неговите невропротективни ефекти.

6.6. Сравняване на ефектите върху активността на мозъчната ацетилхолинестераза

При здрави животни миртеналът повишава активността на мозъчната AChE, докато при дементните не е установен ефект върху стимулирания от скополамина ензим. Сравняването на ефектите на монотерпеноида върху активността на мозъчната AChE при здравите и дементните гризачи е представено на фигура 43.



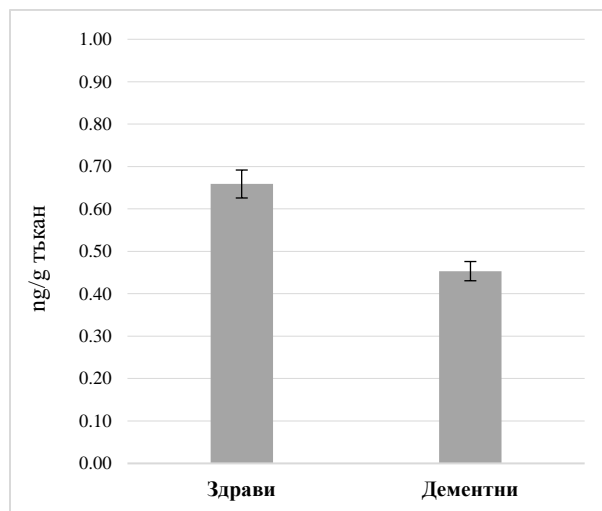
Фиг. 43. Ефекти върху активността на АСhЕ в мозъка при здрави и дементни гризачи след приложение на миртенал (P < 0.01 спрямо здравите)**

Според проведените докинг-изследвания монотерпеноидът притежава афинитет за свързване с активния център на ензима, но не потиска неговата активност. Миртеналът не проявява анти-холинестеразни свойства при експерименталните животни, въпреки данните от *in vitro* изследвания за такива свойства на молекулата.

Много активни компоненти с растителен произход, в т. ч. терпените, притежават антихолинестеразни свойства, проявени в различна степен. Проучването за наличие на антихолинестеразни ефекти на миртенала при животни (здрави и с индуцирана деменция) е проведено за първи път. Потвърден е афинитета на монотерпеноида към АСhЕ, но не и способността му да потиска ензимната активност.

6.7. Сравняване на ефектите върху нивата на медиатора ацетилхолин в мозъка

Миртеналът повишава концентрацията на мозъчния невротрансмитер АСh при здрави и при дементни животни. Изследваното вещество проявява по-силно невромодулаторните си ефекти спрямо нивата на мозъчния ацетилхолин при здравите животни (Фиг. 44).



Фиг. 44. Ефекти върху съдържанието на ACh в мозъка при здрави и дементни гризачи след приложение на миртена

Повишените концентрации на ACh в мозъка, както при здравите, така и при дементните животните, са съпроводени с повишена активност на ензима, отговорен за неговото разграждане в синапса. Резултатите насочват към наличие на невромодулаторна активност, която не се дължи на антихолинестеразни свойства. Възможен механизъм е стимулиране синтезата на медиатора чрез активиране на ензима ChAT, което е характерно за други терпени от групата на изследваното вещество. По-слабо проявените невромодулаторни свойства на миртенала при дементните плъхове вероятно се дължат и на антагонизиране ефектите на скополамина, чийто увреждащ механизъм включва също така инхибиране активността на ChAT, което допринася за по-силното потискане на холинергичната невротрансмисия.

Невродегенеративните увреждания се характеризират с комплексен патогенетичен механизъм, включващ митохондриална дисфункция, невроинфламация и оксидативен стрес. Многоцелеви стратегии, насочени към повлияване на митохондриална дисфункция посредством вещества, които повишават митохондриалната биоенергетика и потискат оксидативния стрес, са с потенциални терапевтични ползи при невродегенеративни заболявания.

С настоящия дисертационен труд за първи път се изследва потенциала на миртенала да повлиява измененията при моделна невродегенерация. Вероятният механизъм на невропротективното действие на монотерпеноида при дементни гризачи е свързан с неговите антиоксидантни и невромодулиращи свойства, проявени в по-голяма степен при дементни в сравнение със здрави опитни гризачи и локализиращи в мозъчната кора.

VII. ИЗВОДИ

A. Фармакологични и токсикологични ефекти на миртенал при здрави гризачи

1. Определена е средната летална доза на миртенал за мишки при интраперитонеално приложение (LD_{50} i.p. = 191.5 mg/kg).
2. Миртеналът не предизвиква общ токсичен ефект по отношение на телесните маси след многократно приложение при мишки и плъхове. По-продължителното третиране при плъховете води до анорексигенен ефект, съпроводен с положителни промени в липидния профил.
3. Наблюдаваните от нас централни ефекти на миртенала – потенциране действието на потискащи ЦНС медикаменти с различни механизми на действие и наличието на анксиолитични свойства, потвърждават резултатите от докинг-изследванията, показващи афинитета му към GABA_A-рецептора.
4. Миртеналът, приложен с различна продължителност, проявява обезболяваща активност, вероятно свързана с установените от нас ЦНС потискащи ефекти и мембраностабилизиращите му свойства.

B. Протективни ефекти на миртенал при дементни гризачи с модел на невродегенерация

1. След многократно приложение миртеналът не проявява общ токсичен ефект по отношение на телесните маси при дементните мишки, докато при плъховете дозата 40 mg/kg предизвиква достоверно понижение на теглата.
2. Миртеналът значимо подобрява паметовите и обучителните способности при дементните гризачи, по-силно изразено при плъховете, но без съществено повлияване на разпознавателната им памет.
3. Миртеналът възстановява увредената от скополамина проучвателна активност на гризачите при два поведенчески теста. Липсват положителни ефекти върху нервно-мускулната координация.
4. Миртеналът демонстрира антиоксидантни свойства, проявени с коригиране на предизвикания от скополамина оксидативен стрес в мозъка. При дементните мишки

понижава нивата на продуктите на ЛПО, дозо-зависимо повишава съдържанието на tGSH и значимо намалява увеличената от скополамина активност на SOD до нива, близки до тези на референта ЛК. Сходни са ефектите му в мозъка на дементните плъхове.

5. Миртеналът не проявява анти-холинестеразни свойства *in vivo*, но повишава съдържанието на ACh в мозъка на дементните плъхове, вероятно чрез стимулиране активността на ензима ChAT.

6. Хистопатологичните изследвания локализируют протективните ефекти на миртенала върху невродегенеративния процес в мозъчния кортекс.

VIII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път са проучени ефектите на миртенала върху здрави гризачи (мишки и плъхове). Към този момент изследванията за изясняване механизмите на действие на монотерпеноида в световен мащаб са предимно върху експериментални модели на различни заболявания.
2. Получени са нови данни, допълващи токсикологичната характеристика на миртенала при експериментални гризачи. За първи път е определена средната летална доза (LD₅₀) за мишки при интраперитонеално приложение.
3. Установени са ЦНС ефекти, изразени в потенциране действието на барбитурати и бензодиазепини, както и анксиолитичен потенциал при самостоятелно приложение, вероятно свързани с повлияване на GABA-ергичната невротрансмисия, които кореспондират с докинг-изследванията, посочващи по-големия афинитет на миртенала към GABA_A-рецептора, в сравнение с Diazepam.
4. Получени са нови данни за фармакологичните ефекти на миртенала при интактни гризачи. Установено е наличие на обезболяващи свойства при различна продължителност на въздействие. Извършените за първи път проучвания върху неврофармакологичната активност на миртенала не установяват увреждащи ефекти върху паметта, координацията и изследователското поведение на животните.
5. Проведените за първи път изследвания върху антихолинестеразните свойства на миртенала при *in vivo* модел отхвърлят възможността за блокиране на ензимната активност, в противовес на наличните *in vitro* данни.
6. За първи път е установен протективния потенциал на монотерпеноида при гризачи с експериментален модел на деменция, свързан с неговите антиоксидантни и невромодулиращи свойства. Оригиналните хистопатологични данни, насочват към локализация на невропротективния ефект на миртенала в кортекса.
7. Предложена е нова дозова модификация на скополамин-индуцирана деменция с цел пресъздаване на не-линейната прогресия на увреждането, която е верифицирана поведенчески, биохимично и хистопатологично.
8. За първи път е извършен сравнителен анализ на ефектите на миртенала при здрави и при дементни гризачи, който показва по-силно изразен ефект при животните с предизвикано увреждане.

IX. ПРИЛОЖЕНИЯ

1. Публикации във връзка с дисертационния труд

1. **Dragomanova S.**, Tancheva L., Georgieva M. A review: Biological activity of myrtenal and some myrtenal-containing medicinal plant essential oils. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, [S.l.], 5(2): 22 - 33, Dec. **2018**, ISSN 2367-5500. doi: <http://dx.doi.org/10.14748/ssp.v5i2.5614>.
2. Tzvetanova E., Georgieva A., Alexandrova A., Tancheva L., Lazarova M., **Dragomanova S.**, Alova L., Stefanova M., Kalfin R. Antioxidant mechanisms in neuroprotective action of lipoic acid on learning and memory of rats with experimental dementia. *Bulgarian Chemical Communications*, 50, Special Issue C: 52 – 57, **2018**.
3. **Dragomanova S.**, Tancheva L., Georgieva M., Klisurov R. Analgesic and anti-inflammatory activity of monoterpenoid myrtenal in rodents. *J of IMAB*, 25(1):2406 - 2413, Jan-Mar **2019**, SJIF (Scientific Journal Impact Factor): 2018 – 7.774; Scopus Journal Metrics: CiteScore 2017 – 0.07, SJR 2017 – 0.103, SNIP 2017 – 0.025.

2. Научни съобщения по темата на дисертационния труд

1. **Dragomanova S.**, Tancheva L., Dishovsky C., Georgieva A., Kalfin R., Georgieva M., Stoeva S. Pilot study of preventive effect of myrtenal on memory and ache activity in ad experimental mice. *Научна конференция “Невронауки – от теорията до експеримента“*, ИНБ – БАН, София, 4 декември **2014**.
2. **Dragomanova S.**, Tancheva L., Georgieva M., Georgieva A., Dishovsky C., Kalfin R., Atanasova D., Lazarov N. Preventive effect of the natural monoterpene myrtenal on cognitive disorders in dement mice. *Abstract Book 28th ECNP Congress*, Amsterdam, 29 August - 1 September **2015**, *The Netherlands, European Neuropsychopharmacology*, 25 (2): S578 - S579, September (2015), doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-977X\(15\)30812-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-977X(15)30812-9) (спечелен грант)
3. **Dragomanova S.**, Tancheva L., Georgieva M., Dishovsky C., Georgieva A., Kalfin R., Hodzhev Y., Atanassova D., Lazarov N. Preventive effects of the monoterpene Myrtenal on Alzheimer’s disease progression on experimental mouse model. *Abstract Book, 14th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vienna, Austria, August 3 - 7, **2015**, *Amino Acids* (2015), 47: 1652, doi: [10.1007/s00726-015-2016-z](http://dx.doi.org/10.1007/s00726-015-2016-z).
4. **Dragomanova S.**, Tancheva L., Georgieva M., Georgieva A., Dishovsky C., Stoeva S., Pavlov S., Kalfin R. Preventive effect of myrtenal and lipoic acid in combination on progression of Alzheimer’s disease. *Abstracts of the 29th ECNP Congress*, Vienna, Austria, 17 - 20 Sept **2016**, *European Neuropsychopharmacology*, 26(2):636, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-977X\(16\)31732-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-977X(16)31732-1).

5. **Dragomanova S.**, Tancheva L., Georgieva M., Georgieva A., Dishovsky C., Stoeva S., Kalfin R. Effect of monoterpene Myrtenal on experimental dementia in mice. *Abstract Book of 31st International Conference of Alzheimer's Disease International*, Budapest, Hungary, 21 - 24 April, p 210, **2016**.
6. **Dragomanova S.**, Tancheva L., Georgieva M., Klisurov R., Eftimov M., Kalfin R. Study on the mechanism of neuroprotective effect of Myrtenal on rats with experimental dementia. *Abstract Book AAIC (Alzheimer's Association) Satellite Symposia*, Varna, Bulgaria, 19 - 20 Oct., p. 3, **2017**.
7. Klisurov R., **Dragomanova S.**, Tancheva L., Kalfin R. Study on the neuroprotective activity of Myrtenal on rats. *Abstract Book of 2nd International Biomedical Congress*, Sofia, Bulgaria, 17 - 19 Nov, p. 40, **2017**.
8. Tzvetanova E., Alexandrova A., Tancheva L., Lazarova M., **Dragomanova S.**, Alova L., Stefanova M., Kalfin R. Antioxidant mechanisms in neuroprotective action of Lipoic acid on learning and memory of rats with experimental dementia. *Abstract Book ICBA 2017, 1st International Congress of Bio-Antioxidants*, Sofia, Bulgaria; 25 - 27 June, p. 54, **2017**, <http://icba2017.orgchm.bas.bg>.
9. **Dragomanova S.**, Tancheva L., Georgieva M., Georgieva A., Kalfin R. Neuroprotective mechanisms of combination Myrtenal and Lipoic Acid on experimental Alzheimer's disease model. *Abstract Book ICBA 2017, 1st International Congress of Bio-Antioxidants*, Sofia, Bulgaria, 25 - 27 June, p. 84, **2017**, <http://icba2017.orgchm.bas.bg>.
10. **Dragomanova S.**, Tancheva L., Georgieva M., Kalfin R. Myrtenal effects in pain experimental mice models. *IV Фармацевтичен Бизнес-форум с Научно-Практическа Конференция*, Варна, България, 27 - 29 октомври, **2017**.
11. Stoeva S., Georgieva M., **Dragomanova S.**, Tancheva L. Anxiolytic and sedative properties of Myrtenal in experimental rodents. *IV Фармацевтичен Бизнес-форум с Научно-Практическа Конференция*, Варна, България, 27 - 29 октомври, **2017**.
12. Tancheva L., Lazarova M., Alexandrova A., Tzvetanova E., **Dragomanova S.**, Alova L., Stefanova M., Kalfin R. Reversibility of the oxidative brain damages and cognitive deficit after scopolamine treatment of rats. *2nd International Conference on Bio-antioxidants (BIO-ANTIOXIDANTS 2018)*, Varna, Bulgaria, 07 - 10 September **2018**.
13. Klisurov R., **Dragomanova S.**, Tancheva L., Kalfin R. Myrtenal changes the oxidative status and the lipid profile in experimental rats. *2nd International Conference on Bio-antioxidants (BIO-ANTIOXIDANTS 2018)*, Varna, Bulgaria, 07 - 10 September **2018**.
14. **Dragomanova S.**, Tancheva L., Alexandrova A., Tzvetanova E., Lazarova M., Pavlova A., Alova L., Stefanova M., Georgieva M., Kalfin R. Effects of Myrtenal on brain oxidative status in rats with experimental dementia. *2nd International Conference on Bio-antioxidants (BIO-ANTIOXIDANTS 2018)*, Varna, Bulgaria, 07 - 10 September **2018**.
15. **Dragomanova S.**, Klisurov R., Georgieva M., Lazarova M., Dishovsky C., Kalfin R., Tancheva L. Effect of Myrtenal on social behavior and memory of rats. *Abstract Book of 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC10) and 12th Congress of the Serbian Society of Toxicology (12th SCT)*, Belgrade, Serbia, April 18 - 21, p. 116, **2018**.

16. Dragomanova S., Tancheva L., Lazarova M., Alexandrova A., Tzvetanova E., Klisurov R., Kalfin R. Complex mechanisms of neuroprotective action of myrtenal in an experimental model of dementia. *Scientific Conference with International Participation “Neuroscience, Bioinformatics, Microbiome and Beyond”*, Dedicated to the 150th Anniversary of the Bulgarian Academy of Sciences, Bachinovo, Bulgaria, 17 - 19 September **2019**.

17. Dragomanova S., Tancheva L., Alexandrova A., Lazarova M., Tzvetanova E., Kalfin R. Antioxidant effect of Myrtenal in rodents with experimental dementia. *3rd International Conference on Bio-antioxidants (BIO-ANTIOXIDANTS 2019)*, Nessebar, Bulgaria, 17 - 21 September **2019**, <https://www.bio-antioxidants2019.com>.

3. Участия в научни проекти по темата на дисертационния труд

Координатор на проект по Фонд „Наука“ при Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ – Варна, № 14014, на тема „Превантивни ефекти на природни монотерпени върху паметови нарушения на експериментални гризачи“, 2014 - 2018 г.

4. Цитирания на статии от дисертационния труд

A. Tzvetanova E., Georgieva A., Alexandrova A., Tancheva L., Lazarova M., **Dragomanova S.**, Alova L., Stefanova M., Kalfin R. Antioxidant mechanisms in neuroprotective action of lipoic acid on learning and memory of rats with experimental dementia. *Bulgarian Chemical Communications*, 50, Special Issue C: 52 – 57, **2018**.

1. Lazarova M., Popatanasov A., Klissurov R., Stoeva S., Pajpanova T., Kalfin., Tancheva L. Preventive Effect of Two New Neurotensin Analogues on Parkinson’s Disease Rat Model. *Journal of Molecular Neuroscience*. **2018**, 66. 10.1007/s12031-018-1171-6.
2. Monteiro S., Santos, Fernanda C., Romeiro R., Azulay C., Cerqueira G., Monteiro M., Barreira J. Review Article Mitochondrial Dysfunction and Alpha-Lipoic Acid: Beneficial or Harmful in Alzheimer's Disease?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2019**, Article ID 8409329, 14 pages, <https://doi.org/10.1155/2019/8409329>.

B. **Dragomanova S.**, Tancheva L., Georgieva M. A review: Biological activity of myrtenal and some myrtenal-containing medicinal plant essential oils. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, [S.l.], 5(2): 22 - 33, Dec. **2018**, ISSN 2367-5500. doi: <http://dx.doi.org/10.14748/ssp.v5i2.5614>.

3. Lazarova M., Popatanasov A., Klissurov R., Stoeva S., Pajpanova T., Kalfin R., Tancheva L. Preventive Effect of Two New Neurotensin Analogues on Parkinson’s Disease Rat Model. *Journal of Molecular Neuroscience*, **2018**, 66. 10.1007/s12031-018-1171-6.
4. Il’ina I., Morozova E., Pavlova A., Korchagina D., Tolstikova T., Volcho K., Salakhutdinov N. Synthesis and analgesic activity of aliphatic ketones-derived chiral hexahydro-2H-chromenes. *Med Chem Res*. **2020**, <https://doi.org/10.1007/s00044-020-02518-3>.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам благодарности на ръководството на Института по невробиология при БАН в лицето на проф. д-р Рени Калфин за съдействието, за предоставените ми условия и материална база за работа. Благодаря на научния ми ръководител проф. д-р Любка Танчева за нейната всеотдайност, за всестранната помощ и подкрепа, както и на всички колеги, които допринесоха по различен начин за осъществяването на този труд.