Медицински университет – София

Медицински факултет

КАТЕДРА ПО ПАТОФИЗИОЛОГИЯ

Д-р Димитър Васков Бакалов

ПАТОФИЗИОЛОГИЧНИ ПОВЕДЕНЧЕСКИ ОТГОВОРИ КЪМ ХРОНИЧЕН И СОЦИАЛЕН СТРЕС ПРИ ПЛЪХОВЕ И ПОВЛИЯВАНЕТО ИМ С МЕЗЕМБРИНОВИ АЛКАЛОИДИ

Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Област на висше образование:

7. Здравеопазване и спорт, по професионално направление 7.1. Медицина
Научна специалност: Патофизиология

Научни ръководители:

Доц. д-р Радка Кирилова Тафраджийска, дм

Доц. Даниела Пехливанова, дм

София

2021

Съдържание

Използвани съкращения 4

I. Въведение 5

II. Литературен обзор 6

1. Стрес 6

2. Хроничен стрес 12

3. Клинична депресия 17

4. Фитотерапия на поведенческите нарушения 24

5. Изводи 28

III. Цел и задачи на изследването. 29

1. Цел 29

2. Задачи 29

IV. Материали и методи 30

1. Експериментални животни и схема на третиране 30

2. Метод за предизвикване на Т13Д при плъхове. 31

3. Метод за предизвикване на остър и хроничен имобилизационен стрес. 32

4. Метод за изследване на социално поведение - Тест „Resident-intruder“ 33

5. Метод за предизвикване на хроничен социален стрес (Social defeat stress) 33

6. Метод за проучване на изследователско поведение и хабитуация към непозната среда - Open-field тест. 34

7. Метод за изследване на работната памет – Novel object recognition test 35

8. Метод за изследване на поведението на безпокойство – Elevated plus maze test 36

9. Метод за изследване на болков праг – Paw Pressure Test 37

10. Подход за изолиране на мозъчни структури 37

11. Подход за взимане на кръвни проби и кръвна плазма 37

12. Метод за определяне нивата на хормоните кортикостерон и тестостерон в кръвна плазма и мозъчен хомогенат. 38

13. Метод за определяне нивата на карбонилирани протеини 38

14. Метод за статистически анализ на данните 38

V. РЕЗУЛТАТИ: 39

1. Ефекти на остър и хроничен имобилизационен стрес (RS) 39

2. Влияние на хроничния социален стрес (SS) при млади мъжки плъхове Wistar. . 47

3. Определяне на минимална ефективна доза на мезембриновата фракция 56

4. Данни от експериментален модел на Т13Д при плъхове. 60
VI. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ: 67
1. Промени в общата двигателна активност, изследователско поведение и тревожно поведение в непозната среда. 67
2. Промени в болковата чувствителност при тест “Paw pressure”..... 70
3. Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху работната памет, изследвана с тест Novel Object Recognition test (NORT). 71
4. Ефекти върху масата на слезката и надбъбречната жлеза, както и на нивото на глюкозата в кръвта..... 73
5. Влияние на хроничния социален стрес и третирането с MZM върху нивото на увредените, карбонилирани протеини в изолиран хипокампус и кръвна плазма. 75
6. Данни за минималната ефективна доза на мезембриновата фракция..... 76
7. Данни за влиянието на експериментален модел на Т13Д при плъхове и ефекти на хронично третиране с MZM. 76
8. Заключение 77
VII. Изводи 78
VIII. Приноси 80
X. Научна и публикационна активност във връзка с дисертационния труд 81
1. Публикации по дисертационния труд 81
2. Научни съобщения във връзка с дисертационния труд..... 82
XI. Библиография 83

Използвани съкращения

5-HT	Серотонин
ACC	Cortex Cingularis Anterior
ADT	Антидепресантна Терапия
АН	Артериално Налягане
AVP	Вазопресин
BDNF	Мозъчен Невротрофичен Фактор
BNST	Stria Terminalis
cAMP	Цикличен Аденозин Монофосфат
CIS	Хроничен Имобилизационен Стрес
CMS	Хроничен Умерен Стрес
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
DA	Допамин
fNMR	Функционален-ЯМР
GABA	Гама-Аминомаслена Киселина
HPA	Хипоталамо-Хипофизо-Адренална Ос
KOR	Каппа-Опиоиден Рецептор
LC	Locus Coeruleus
LPS	Липополизахарид
MAOI	Инхибитори На Моноаминооксидазата
MDD	Голямото Депресивно Разстройство/Major Depressive Disorder
mPFC	Cortex Praefrontalis Medialis
MZM	Мезембринови Алкалоиди
NE	Норадреналин
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NORT	Novel Object Recognition Test
OFC	Cortex Orbitofrontalis
OFT	Open-Field Test
PAG	Substantia Grisea Centralis
PBN	Nuclei Parabrachiales
PDE	Фосфодиестераза
POMC	Проопиомеланокортин
PTSD	Посттравматично Стресово Разстройство
PVN	Nucleus Paraventricularis Hypothalami
RS	Restrain Stress
SERT	Серотонинов Транспортер
SIH	Стрес Индуцирана Хипералгезия
SN	Substantia Nigra
SNRI	Серотонин-Норадреналин Реъптейк Инхибитори
SS	Хроничен Социален Стрес
SSRI	Селективни Серотонинови Реъптейк Инхибитори
STZ	Стрептозотоцин
TCA	Трициклични Антидепресанти
VP	Pallidum Ventrale
VS	Striatum Ventrale
VTA	Tegmentum Ventrale
α-MSH	А-Меланоцит-Стимулиращ Хормон
ДЧ	Дихателна Честота
ЕКТ	Електроконвулсивна Терапия
НЛР	Нежелани Лекарствени Реакции
НЦОЗА	Национален Център За Обществено Здраве И Анализи
ОКР	Обсесивно-Компулсивно Разстройство
СЗО	Световна Здравна Организация
СЧ	Сърдечна Честота
Т1ЗД	Тип 1 Захарен Диабет

I. Въведение

При хомеотермните видове организмът работи по строго определени правила, за да се запази предварително определено стабилно състояние, така наречената хомеостаза (еустаза), което е от съществено значение за живота и благополучието. Това квази-равновесно състояние бива подложено на постоянни въздействия, вътрешни или външни, реални или субективни, които се описват като стресори.

Настъпването на трайни увреждания в организма (функционални или органични) под действието на стресови фактори се определя като дистрес т.е. увреждащият стрес представлява дистрес. Дистресът причинява нарушения във функциите на организма и причинява болести като: трайно повишение на кръвното налягане, нарушен сърдечен ритъм, стомашна язва, поведенчески нарушения, тревожно-депресивни разстройства и други.

Целта на настоящия труд е изследване на ефектите на различни стресови модалности върху поведението и основни метаболитни характеристики при гризачи, като патофизиологичен модел на дистрес. Направи се и оценка на потенциалните протективни ефекти на мезембринова алкалоидна фракция, извлечена от *Narcissus cv. "Hawera"* при животните, подложени на остри и хронични стресови въздействия.

II. Литературен обзор

1. Стрес

1.1. Стрес и стрес-синдром

Ханс Селие е дефинирал стреса като „основен адаптационен синдром“, т.е., стереотипичен процес на организма в отговор към увреждащи нокси [Rosmond, 2005]. Все повече изследвания показват, че адаптационният отговор на стреса е различен в зависимост от вида, продължителността и интензитета на стресовия фактор [Jean Kant et al., 1985; Pitman et al., 1990; Ishikawa et al., 1992; Ricart-Jane et al., 2002; Rai et al., 2003].

Стресът се определя като неспецифична стереотипна реакция на тялото към всяко поставено пред него изискване за преустройство или приспособяване (адаптивен стрес отговор), която може да се осъществи от активиране на съществуваща биохимична каскада или от промяна на биохимично и физиологично ниво в резултат от контакта с нови фактори и процеси. Тази предопределена реакция има за цел да поддържа/възстанови заплашената хомеостаза. Реакцията на стрес се медиира от сложна и взаимосвързана невроендокринна, клетъчна и молекулярна инфраструктура, съставляваща стресовата система. Тя включва структури на централната и периферна нервна система, имунната и ендокринна системи [Chrousos & Gold, 1992; Chrousos, 1992]. Стресовата система приема и интегрира голямо разнообразие от сигнали - сензорни (т.е. зрителни, слухови, соматосензорни, обонятелни, вкусови, вестибуларни и висцерални), метаболитни, хематогенни и лимбични сигнали, които взаимодействат с регулаторните стрес-центрове и активират съответен отговор. Силата и адаптивната способност на този отговор зависи от множество генетични и епигенетични фактори, както и от фактори на околната среда. Комбинацията от тези фактори определя до голяма степен дали предизвиканият отговор ще повиши и подобри функционирането на организма (еустрес), или няма да се справи с предоляване на стресогените и ще доведе до заболяване (дистрес). При нормални условия тези промени са адаптивни и имат за цел оцеляването на организма. Първоначалната активация на стрес-системата обикновено отключва относително специфичен към стресора отговор, но с повишаване на силата на стресогенния фактор, специфичността на адаптивния отговор намалява, което обяснява относително неспецифичната картина на

синдрома на стреса, която се развива след среща с мощни стресори. Нещо повече, надпраговите и/или хроничните стресови въздействия могат да окажат пагубно влияние върху различни физиологични функции като растеж, възпроизводство, метаболизъм и имунна компетентност, което променя поведението и развитието на организма. Трябва да се отбележи, че пренаталният живот, детската възраст, детството и юношеството са критични периоди в процеса на формиране на стереотипа на адаптивния стрес отговор. Тези периоди се характеризират с висока пластичност и изменчивост на стресовата система и повишена уязвимост към стресогенните фактори.

Поведенческата адаптация се характеризира със засилени възбуда, бдителност, когниция и аналгезия, с успоредно инхибиране на вегетативните функции, като глад и стремеж за размножаване – т.нар. „Fight of flight" (виж Таблица 1). Паралелно на тези промени, физическата адаптация осигурява пренасочване на енергията и телесните ресурси към есенциалните за оцеляването системи - повишаване на сърдечно-съдовия тонус, дихателната честота и енергийния метаболизъм (глюконеогенеза и липолиза), докато системите с висока енергийна консумация (напр. храносмилане, размножаване, растеж и имунитет) са временно потиснати.

Таблица 1. Поведенческа и физическа адаптация по време на стрес.

Поведенческа адаптация	**Физическа адаптация**
Повишена възбудимост	Повишена СЧ, АН и ДЧ.
Повишена бдителност и когниция	O_2 и хранителни вещества се пренасочват към ЦНС
Потискане на глада	Повишена глюконеогенеза и липолиза
Потискане на сексуалните желания	Инхибиция на сексуалната функция
Инхибиция на стомашния мотилитет и засилване на чревния	Засилен чернодробен метаболизъм на ксенобиотици
Подържане на стресовия отговор	Подържане на стресовия отговор

**Адаптирана по Chrousos G.P. and Gold P.W., JAMA, 1992; 267, 1244.*

По този начин, кислородът и хранителните вещества се насочват главно към ЦНС и структурите на стресовата система, където те са най-необходими [Chrousos & Gold, 1992; Chrousos, 1992; Tsigos & Chrousos, 1994; Dorn & Chrousos, 1993].

Установено е, че мобилизацията на стресовата система често е с характер, който позволява на индивида известен контрол над случващото се. При такива условия стресът може да бъде полезен и приятен или дори вълнуващ, като предоставя положителни стимули на индивида за емоционален и интелектуален растеж и развитие [Cologero et al., 1988]. По този начин не е изненадващо, че активирането на стресовата система по време на хранене и сексуална активност, и двете задължителни функции за оцеляване, е свързано преди всичко с удоволствие.

1.2. Стресова система

Стресовата система не само задава нивото на възбуда и регулира жизнените показатели, но допълнително взаимодейства с други важни компоненти на ЦНС, включително мезокортиколимбичната допаминергична система (част от системата за възнаграждение в мозъка), комплекса амигдала/хипокампус и невроналната про-опиомеланокортинова (POMC) система на nucleus arcuatus [Roth et al., 1988; Gray et al., 1989; Chrousos, 1998]. От своя страна, след активиране под действието на стресогенния фактор, тези системи на ЦНС действат по специфични невронални пътища, за да променят дейността на стресовата система, като по този начин образуват сложен реципрочен механизъм, който фино настройва адаптивната реакция. Трябва да се отбележи, че съществуват добре установени взаимодействия между стресовата система и отделните центрове на ЦНС, които са от съществено значение за оцеляването, като центровете за терморегулация и засищане на апетита.

1.2.1. Мезокортиколимбична допаминергична система

Системата за възнаграждение в мозъка осъществява значителен контрол върху силата и вида на стресовия отговор. В „сърцето“ на тази система стои кръг от връзки между невроните на неокортекса и базалните ганглии. Striatum ventrale (VS) получава поток информация от Cortex orbitofrontalis (OFC) и cortex cingularis

anterior (ACC), както и мощен поток от допаминергичните неврони в средния мозък. VS от своя страна изпраща проекции до pallidum ventrale (VP), tegmentum ventrale (VTA) и substantia nigra (SN), които от своя страна имат реципрочни проекции до префронталната кора чрез медиалното дорзално ядро на таламуса [Haber & Knutson, 2010]. Функцията на тази система се допълва от модулиращо влияние от амигдалоидния комплекс, хипокампалната формация, латералната хабенула, педункулопонтинното ядро и червеното ядро на мозъчния ствол. Мезокортикалните и мезолимбичните компоненти на допаминергичната система са силно иннервирани от PVN/CRH невроните, LC/NE-норадренергичната система и по този начин се активират от CRH, катехоламини и глюкокортикоиди по време на стрес. Активирането на тези неврони изглежда централно потиска реакцията на стресовата система и взема участие в прогнозирането на събития и мисловната дейност [Gray et al., 1989]. Допаминергичните неврони на nucleus accumbens играят основна роля в мотивационните/стимулиращите/възнаграждаващите явления и при формирането на централната допаминергична система за възнаграждение [Grigoriadis et al., 1993]. Следователно еуфорията и дисфорията е вероятно да бъдат медиирани от мезокортиколимбичната система, която се счита за централен таргет на няколко пристрастяващи субстанции (например кокаин) [Robinson&Nestler, 2011; Blum et al., 2012; Olsen, 2011]. Най-често използваните наркотични вещества покачват нивата на екстрацелуларния допамин в nucleus accumbens и мезолимбичната система – направимер кокаина нарушава реъптейка на допамин от пресинаптичната мембрана. През 2017 година, Reiger et al. установяват, че стресови житейски събития са асоциирани с повишен лимбичен отговор към кокаин, т.е. индивиди подлежни на силен стрес са с по-висока склонност към наркотична зависимост [Reiger et al. 2017].

1.2.2. Амигдала и Хипокампус

Комплексът от амигдала/хипокампус се активира по време на стрес главно чрез възходящи катехоламинергични неврони, произхождащи от мозъчния ствол или от вътрешни емоционални стресори (напр. придобит страх), вероятно от асоциативни зони на неокортекса [Chrousos, 1998]. Ядрата на амигдалата представляват основния център на ЦНС за поведение, свързано със страха, и тяхното активиране е важно както за извличане, така и за емоционален анализ на

цялата съхранена информация за всеки даден стрес. В отговор на емоционалните стресори амигдалата може директно да стимулира компонентите на централната система за стрес и мезокортиколимбичната допаминергична система.

Що се отнася до глюкокортикоидите, те са изобилно представени в лимбичните области и ефектите им се медиират от минералокортикоидни и глюкокортикоидни рецептори [De Kloet et al., 1998]. В амигдалата има CRH пептидергични неврони, които реагират положително на глюкокортикоидите и чието активиране води до стимулиране на стрес и тревожност. CRH невроните в централното ядро на амигдалата изпращат проекции към PVN парвоцелуларните области и парабрахиалното ядро на мозъчния ствол, които се считат за решаващи за CRH-индуцираните невроендокринни, автономни и поведенчески ефекти. CRH влакната също свързват amygdala със stria terminalis (BNST) и хипоталамуса [Millan, 1981; McEwen, 2007]. Обратно на стимулиращия CRH и норадреналинови ефекти, хипокампусът упражнява тонично и инхибиращо действие върху активността на амигдала, PVN/CRH и LC/NE-симпатиковата системи. Основната роля на хипокампалната формация е при формирането на нови спомени и при извличането на вече съществуващи в дълготрайната памет. До сега са установени три главни характеристики на хипокампуса при обработката на информацията: 1/ тази структура упражнява инхибиращо действие върху спонтанни поведенчески реакции, свързани с изследователското поведение и поведението на безпокойство [Gray, 1982] 2/ отделни части на хипокампуса са есенциални за образуването на нови и отчасти за обработката на съществуващи епизодични спомени [Scoville and Milner, 1957] 3/ няколко вида клетки в хипокампуса формират система за пространствена ориентация и композиция на компоненти от семантичната памет [O'Keefe & Nadel, 1979].

Важна, но често забравяна функция на хипокампусът е ролята му за изключване на стресовата HPA реакция. Тази структура е ключова за диференциране на новата сетивна, пространствена и контекстуална информация от околната среда, като модулира HPA стресовата ос и по този начин регулира поведението на безпокойство и страх [Widman et al., 2019]. Атрофията или увреждането на хипокампа нарушава тази функция и може да доведе до продължителни HPA реакции под действието на психологически стресори [Lupien et al., 1998]. Тези открития доведоха до "хипотезата на

глюкокортикоидните каскади" за стреса и стареенето. Lupien et al. са показали, че прогресивно повишените нива на кортизол (за 5-годишен период) в слюнката по време на годишните изпити могат да предскажат намален обем на хипокампа и по-ниска ефективност при задачи за заучаване и памет, зависими от хипокампа [Refojo et al., 2011]. Нещо повече, Refojo et al. демонстрират, чрез специфични CRH-R1 делеции в глутаматергични, GABA-ергични, допаминергични и серотонергични клетки, че липсата на CRH-R1 в глутаматергичните вериги на предния мозък намалява тревожността и нарушава невротрансмисията в амигдалата и хипокампуса, докато елективната делеция на CRH-R1 в допаминергичните неврони на средния мозък води до засилване на тревожноти поведение, което предполага двупосочен модел за ролята на CRH-R1 при безпокойство [Lkhagvasuren et al., 2011]. Както ще бъде разгледано по-долу стимулацията на неврогенезата на хипокампа с инфузии на Brain derived neurotrophic factor (BDNF) протектира срещу стрес индуцирани изменения и увреждания на паметта (виж. II 3.3.).

1.2.3. Системата на Nucleus Arcuatus / Nucleus Tractus Solitarii - Proopiomelanocortin (POMC)

Съществува реципрочна инервация между опиоидните пептидни (POMC-продуциращи) неврони на хипоталамичното nucleus arcuatus и както CRH/AVP-продуциращите, така и LC/NE-норадренергичните неврони [Valentino et al., 1983; Roth et al., 1988]. Активирането на стресовата система стимулира освобождаването от nucleus arcuatus и nucleus tractus solitarii на пептиди, получени от POMC, включително α-меланоцит-стимулиращ хормон (α-MSH) и β-ендорфин, които посредством отрицателни обратни връзки инхибират активността на двата компонента на централната стресова система [Cerritelli et al., 2016]. Nucleus tractus solitarii има водеща роля в интеграцията на висцеросоматичните сигнали, като към него се проецират централни и периферни серотонинергични влакна. Това определя водещата роля на серотонина в регулацията на автономната нервна система. Това основно влияние върху вегитативните функции се медиира от активация на серотонин 3 (5-HT3) рецепторите в ядрото [Pratt et al. 1990]. 5-HT3 рецепторите играят ключова роля в инхибиторна модулация на парасимпатиковия компонент на вегитатвината нервна система [Sévoz-Couche & Brouillard, 2017].

Освен това, чрез проекции на тези неврони към substantia grisea centralis (PAG), nuclei parabrachiales (PBN) и ростралната вентролатерална медула, се контролира нивото на болкова чувствителност: „стрес-индуцирана аналгезия“ чрез инхибиране на възходящите болкови пътища, или „стрес-индуцирана хипералгезия“ чрез улесняване на болковата трансмисия след продължително или повтарящо се излагане на стресиращо въздействие [Ferdousi & Finn, 2018].

2. Хроничен стрес

2.1 Хроничен стрес и ендокринна система

Хроничният стрес е един от основните рискови фактори за афективни и поведенчески нарушения. Той може да индуцира дисфункция по оста на хипоталамо-хипофизата-надбъбречна (HPA), която често бива цитирана като водеща в патофизиологията на тези разстройства [Checkley, 1996; Parker et al., 2003], чрез повишаване на нивата на кортикостерон [De Kloet et al., 2005; McEwen et al., 2008; Chiba et al., 2012; Son et al., 2018]. Много животински модели се основават на продължително активиране на HPA ос, често наблюдавано при пациенти с клинична депресия (MDD) [Checkley, 1996]. Нещо повече, високите нива глюкокортикоиди, индуцирани от хроничен стрес и подкожно инжектирани глюкокортикоиди причиняват депресивно поведение, често съпроводено с невронална смърт, атрофия на дендритните израстъци и намалена неврогенеза в хипокампуса на зрели гризачи [Gregus et al., 2005; Wooley et al., 1990]. Както беше обсъдено, хроничното приложение на кортикостерон при плъхове засяга поведенчески и невробиологични промени, които отразяват няколко от основните симптоми и невробиологични промени, свързани с психични заболявания.

Тук трябва да се спомене и ролята на диабета като метаболитен стресор, директно свързан с дисрегулация по оста HPA. При пациенти с Т1ЗД много често се установява дисрегулация на HPA в отговор към различни стресори. В повечето случаи се касае за свръхактивация на HPA с увеличени плазмени кортизолови нива, при запазен ACTH отговор към CRH [Almqvist et al., 2001]. Тези изменения в регулацията са обект и на много проучвания със STZ-индуцирания модел на

Т13Д при гризачи, модел, който се използва и при разработването на тази дисертация. Класическата находка са повишени глюкокортикоиди, което поради контраинсуларния им ефект води до инсулинова резистентност [De Nicola et al., 1991; Watts et al., 2005]. При диабетни модели съдържанието на аргинин-Вазопресин (AVP) и окситоцин (OT) също е значително по-високо спрямо контролите поради повишената им mRNA експресия в nucleus paraventricularis (PVN), измерена чрез *in situ* хибридизация. Тези промени в експресията на неврохормони не са асоциирани нито с хипернатриемия, нито с дехидратация [Saravia et al., 2001]. Единствена друга причина за такава дисрегулация остава директното въздействие на стреса, като резултат от диабета.

2.2. Хроничен стрес и ЦНС

Друга важна област на мозъка, свързана с депресията, е Cortex praefrontalis medialis (mPFC). mPFC упражнява контрол върху хипоталамуса и амигдалата, които играят решаваща роля при определяне на емоционалното поведение и реакциите на стрес [Chiba et al., 2012; Son et al., 2018]. Например, лезии в дорзалната mPFC индуцират дисфункция на HPA ос и засилена секреция на кортикостерон [Dioro et al., 1993; Figueiredo et al., 2003]. Скорошно проучване също показа, че хроничният физически стрес повишава нивата на кортикостерон, което може да бъде намалено чрез добавяне на глутамин чрез глутамат-глутаминов цикъл между неврони и астроцити в mPFC [Son et al., 2018]. Именно при модел на хроничен метаболитен стрес при STZ-третирани плъхове многократно са описвани астроцитни аномалии в хипокампуса. При тези плъхове се наблюдава хипокампална увреда, включваща както астроцити, така и неврони, характерна за стреса [Magariños&McEwan, 2000]. При третирани със STZ мишки също е установено увеличение на броя на хипокампалните GFAP+ астроцити [Saravia et al., 2002]. Освен това, при тези животни астроцитите позитивират за наличие на аполипопротеин E, маркер за активна невронална увреда и дисрегулация [Rapp et al., 2003; Revsin et al., 2005]. Интересното е, че тези характеристики са общи както за реакцията към стрес, така и за стареенето.

От историческа гледна точка, първата парадигма на хроничен стрес, използвана за изследване на етиологията на MDD, е предложена от Katz [Katz,

1981]. Willner et al. след това предлагат модел на хроничен умерен стрес (CMS), основан на откритията на Katz. Те потвърждават, че моделът има предсказваща валидност като наблюдават, че антидепресантите редуцират индуцираното от CMS анхедонично поведение [Wilner et al., 1987; Slattery&Cryan, 2017]. Обикновено CMS моделът се състои от комбинация от различни умерени стресогени, като шум, накланяне на клетка, мокра постеля, променени в цикъла светло-тъмно, разклащане на клетката, принудително плуване и социално поражение и др., които се прилагат рандомизирано, с цел избягване на хабитуацията. Моделът CMS се използва широко от изследователите. В сравнение с CMS модела, моделът на хроничен имоблизационен стрес (CIS) е по-прост и по-ефективен, което го прави предпочитан при изследвания на хроничен стрес [Seo et al., 2012, 2016; Jung et al., 2012; Joo et al., 2009; Bowman et al., 2001; McLaughlin et al., 2005; Qin et al., 2011; Popoli et al., 2012].

2.3. Хроничен стрес и имунна система.

Имунитетът е естествената или придобита защита на организма срещу бактериални или вирусни инфекции, като същевременно има толерантност за избягване на алергии и автоимунни заболявания. Основен функционален елемент на имунната защита са белите кръвни клетки – левкоцити и лимфоцити. Те се намират в кръвта, лимфата и лимфоидните тъкани и органи. Имунната система на гръбначните съдържа много видове левкоцити, но само лимфоцитите имат рецепторно разнообразие, антигенна специфичност и способността за разпознаване на собствени/чужди антигени, които са отличителните белези на адаптивния имунитет. Т-клетките организират имунния отговор чрез производството на цитокини, стимулирайки В-клетките да произвеждат антитела и

с

и

г

н

а

л

и

з

и

р

а

Когато се говори за стрес, в литературата оста на хипоталамо-хипофизата-надбъбрек (HPA) и симпатико-адреналната ос се цитират заради тяхната

критична роля в психиатричната патофизиология, включително тревожно-депресивни разстройства и връзката им с повишаването на нивата на кортикостерон [Chiba, S. et al., 2012; de Kloet et al., 2005; McEwan, 2008]. Клиничните проучвания показват, че пациенти с клинична депресия имат характерен профил на секреция на анти-възпалителни цитокини, заедно с високи нива на кортизол [Pavon et al., 2006; Hernandez et al., 2008], което може да доведе до имуносупресия. Хроничният стрес нарушава регулацията на вродените и адаптивни имунни отговори, променяйки цитокиновия баланс на Th1/Th2. По този начин се индуцира хронично възпаление и се потиска функцията на имунните клетки [Dhabhar, 2014; Seiler, 2020]. Стрес-хормоните също така инхибират трафика и миграцията на неутрофили и макрофаги, функцията на антиген-представящите клетки и клетките - естествени убийци (NK) [Dowdell et al., 1999; McKabe et al., 2000; Padgett et al., 1998; Teunis et al., 2002]. През 1995, две публикации представят данни, че глюкокортикоидните (GC) хормони могат да повлияят на активността на NF-kB [Auphan et al., 1995; Scheinman et al., 1995]. По-конкретно, тези две проучвания показват, че GC хормоните могат да трансактивират инхибитор на NF-kB активността. Хипотезата е, че GC индуцира транскрипцията на IkBa, който след това секвестира NF-kB в цитоплазмата и му пречи да се транслоцира в ядрото и да предизвика генно активиране. Това е логично обяснение за широкия спектър на потискане на цитокините, медиирано от GC. Много от цитокините, произведени от макрофаги и от Th клетки, са под контрола на NF-kB [Li&Verma, 2002]. Следователно, ако GC хормоните могат да потиснат активирането, тогава отделните цитокини не би трябвало да притежават предполагаемите елементи на хормонален отговор за GC. Вместо това, чрез инхибиране на транскрипционната активност на NF-kB, множество цитокинови гени могат да бъдат изключени едновременно. В по-късни проучвания обаче е установено, че този ефект е главно върху лимфоцити и моноцити [Padgett&Glaser, 2003].

Лимфоидните органи рядко са във фокуса на изследване на стресовите ефекти. Те могат да бъдат класифицирани в две основни групи: (1) първични лимфоидни органи, в които лимфоцитите се генерират и претърпяват развитие и узряване; и (2) вторични лимфоидни органи и тъкани, където зрелите лимфоцити

взаимодействат с антигените. Съдовете на кръвната и лимфната система свързват лимфоидните органи и тъкани, като ги обединяват във функционално цяло.

Централните лимфоидни органи са необходими за развитието на лимфоидната и следователно имунната система. Те включват тимуса, костния мозък и бурсата на Фабриции. Централните лимфоидни органи също се наричат първични лимфоидни органи и тяхната функция е да се генерират лимфоцити. И Т-, и В-клетките произхождат от костния мозък, но там узряват само В клетки. Човешките Т-клетки узряват в тимуса.

Периферните лимфоидни органи не са необходими за онтогенезата на имунния отговор. Те са места, където се инициира адаптивният имунен отговор и където пролиферират лимфоцитните клонове. Периферните лимфоидни органи също се наричат вторични лимфоидни органи. Те включват лимфните възли, далака, сливиците и MALT (mucosa-associated lymphatic tissue; свързаните с лигавиците лимфоидни тъкани), в които се индуцират имунни отговори.

Далакът е най-големият вторичен имунен орган и се състои от две основни части: червена пулпа, която филтрира кръвта от чужд материал и увредени еритроцити, и бяла пулпа, която инициира имунни реакции към антигени, пренасяни в кръвта [Julius et al., 2004]. Това, с което най-често се асоциира връзката стрес – далак, е ролята му като кръвно депо. По време на остър физически стрес, свързан с усилена мускулна работа и повишени кислородни изисквания

Резултати от експерименти както с хора, така и с животински моделни системи потвърждават, че стресът подтиска имунния отговор към ваксини, усилва тежестта на вирусни и бактериални инфекции, забавя заздравяването на раните и може да има роля в автоимунни заболявания [Dowdell et al., 1999; Teunis

et al., 2002]. Често обаче се цитира, че стрес-индуцираното подтискане на функциите на имунната система е с приспособителна роля, тъй като нейното функциониране изисква много ресурс и регулация, и това би пречило на поддържането на други жизнено важни системи [Gustafsson et al., 1994; Moret&Schmid-Hempel, 2000; Sheldon&Verhulst, 1996; Svensson et al., 1998]. Тази супресия би позволила енергията и метаболитите да се насочат към процеси, свързани с оцеляването, част от системата „fight-or-flight“. Освен това, в напрегната стресова ситуация реакция на свръхчувствителност или автоимунен процес може да има много тежки последствия [Råberg et al., 1998]. Някои автори приемат, че това подтискане на имунната система при остър стрес може да бъде дори от полза. Не трябва да се забравя, че клетките на имунния отговор са и водещ производител на свободни радикали, съответно тяхното „заглушаване“ също би имало протективен ефект [Svensson et al., 1998; von Shantz et al., 1999], защото при стрес метаболизмът е усилен и това само по себе си е свързано с повишени нива на оксидативен стрес. Понастоящем е общоприето, че стресовите събития в живота могат да повлияят на здравето на индивида, включително на имунологичното му състояние. Въпреки че има все още много детайли, които предстои да бъдат изяснени, става все по-ясно, че продуктите на ендокринната система, като GC, и продуктите на нервната система, като катехоламини, могат да променят функцията на макрофагите и лимфоцитите, както и на други клетки на имунната система.

3. Клинична депресия

Депресията е известна още от трудовете на Хипократ (460-379 г. пр.н.е.), който описва така наречената "меланхолия", произлизащо от древногръцките думи melas - "черен" и kholé - „жлъчка“ (Liddell et al., 1980).

3.1. Дефиниция

Клиничната депресия се характеризира със своя широк спектър от симптоми и променливо представяне. Има три основни синдрома на това заболяване: (1) тревожност – физическо раздразнение – соматизация; (2) потиснато настроение – двигателно забавяне; и (3) враждебност – междуличностна чувствителност (Katz et al, 1984; Katz and Maas, 1994). Диагностичната загадка при депресията се състои в това, че при всеки засегнат

индивид тези симптоми се съчетават по уникален начин. Най-често използваните диагностични критерии са събрани в Наръчника за диагностика и статистически данни за психични разстройства (DSM–5). DSM-5 очертава следните критерии, за да се постави диагноза на депресия: Депресивно настроение почти всеки ден; намаляващ интерес или удоволствие от почти всички дейности; значителна загуба на тегло без специфична диета; забавяне на мисловните процеси и намаляване на физическо активност; умора; чувство за безполезност или безпричинна вина; повтарящи се мисли за смъртта; повтарящи се самоубийствени идеации. За да получи диагностика „депресия“, пациентът трябва да изпитва пет или повече симптоми за период от 2 седмици, като най-малко един от симптомите трябва да бъде (1) потиснато настроение или (2) загуба на интерес или удоволствие. При пациенти с депресия е често срещана коморбидността на тревожно разстройство (паническо разстройство, генерализирано тревожно разстройство), посттравматично стресово разстройство (PTSD), ОКР или разстройство на личността (Mimura, 2001).

3.2. Епидемиология

Депресията засяга над 120 милиона души по света. Епидемиологичните данни показват, че в общата популация съществува риск за развитие на депресия в 10% до 15% от индивидите (Demyttenaere et al., 2004). Голямото депресивно разстройство (MDD) е водещата причина за психични заболявания в световен мащаб с честота, която нараства по-бързо от очакваното. През 2001 г. Световната здравна организация прогнозира, че MDD ще бъде второто най-често срещано заболяване в света до 2020 г. Това обаче се случва още през 2013 [Ferrari et al, 2013]. Депресията е вторият най-важен фактор, предизвикващ увреждания и проблемите със здравето в света. Тя е и основната причина за самоубийство, причинявайки над 128 000 самоубийства само в европейския регион. Според СЗО през 2015 г. в Европа 44,3 милиона души са страдали от депресия, с честота между 3,8% до 6,8% в различните страни (СЗО, 2019 г.). Според проучване, проведено от българския Национален Център за Обществено Здраве и Анализи (НЦОЗА), най-често срещаното психиатрично заболяване в България е тревожно разстройство (11.4%), а на второ място - афективни разстройства (6.2 %) (Hinkov et al., 2017).

3.3. Патофизиология на депресията

3.3.1. Връзка психично – соматично здраве

Соматичните заболявания често се съпровождат с повишен риск от депресия. Има два общи механизма, които могат да бъдат причина за това. Първият е психологически или когнитивен механизъм. Тежка или хронична болест, със заплахата, която представлява за нечий живот, може да бъде събитието, което да отключи депресивен епизод при предразположен човек. Има както генетични, така и не-генетичен фактори, които определят такава предразпооженост, което е демонстрирано от проучвания с близнаци (Kendler et al., 1993, 2001, 2002). Тъй като този механизъм е много неспецифичен, трябва също така да вземем предвид и втория механизъм, а именно, че зад депресията има значителна биологична основа и биологичните промени, причинени от физическо заболяване, могат да повлияят на депресивната реакция. В допълнение, лека депресия, промени в настроението и депресивни симптоми съществуват съвместно с други прояви на човешкия дистрес. Такива соматични презентации тестват конвенционалното разграничение между физическо и психическо разстройство и са непрестанен източник на противоречия (Goodwin, 2006).

3.3.2. Моноаминна хипотеза

Един от първите предложени механизми (от преди близо 50 години) за патогенезата на депресията е моноаминовата хипотеза (Schildkraut, 1965). Тази хипотеза гласи, че пациентите с депресия имат намалени нива на серотонин (5-HT), норадреналин (NA) и допамин (DA) в централната нервна система (ЦНС) (Bunney et al., 1965; Hirschfeld, 2000; Delgado, 2000; Muller et al., 1955). Първото емпирично доказателство за тази хипотеза е фактът, че някои пациенти, лекувани с резерпин, развиват клинична депресия. Тежестта на депресията намалявала след прекратяване на лечението или след електроконвулсивна терапия (ЕКТ) (Muller et al., 1955). Тези прояви се демонстрират и при лабораторни животни, лекувани с резерпин (Hirschfeld, 2000). При биохимичен анализ се установява, че резерпинът значително намалява концентрациите на моноамини - 5HT и катехоламини (Shore et al., 1955, 1957; Weiner et al., 1972). За съжаление много

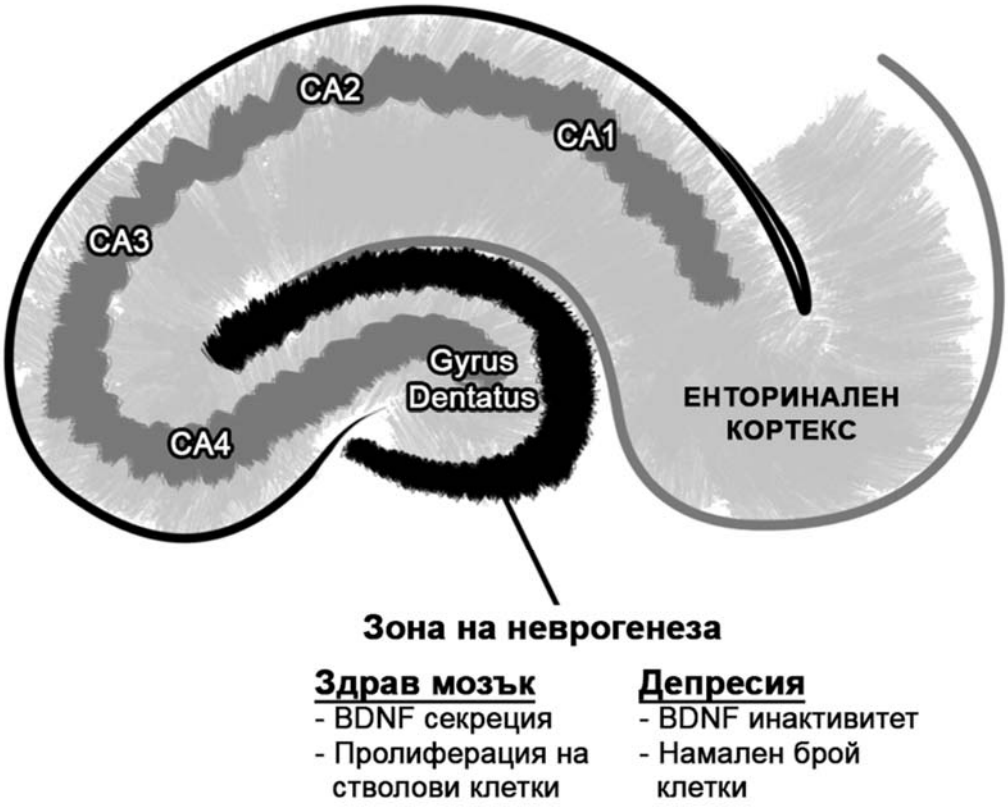
проучвания не успяват да потвърдят тази теория, и по-точно да определят коя конкретната медиаторна система е засегната. Основният проблем е невъзможността за директно измерване на мозъчните моноамини.

Въпреки че основните антидепресантни групи стават все по-ефективни, резултатите са обратими. Това е известно като тахифилаксия на антидепресантната терапия (ADT) и отначало е забелязано при пациенти, лекувани с инхибитори на моноаминооксидазата (MAOI). Тези пациенти реагират слабо на изменението на терапията и се влошават след рецидив в сравнение с периода преди лечението (Mann JJ, 1983). През 1995 г. Fava et al. установиха, че една трета от пациентите, които са достигнали до пълна ремисия със SSRI, получават рецидив (ADT тахифилаксията) между 3 месеца и 1 година по-късно, въпреки придържане към терапевтичния план. Някои проучвания дори показват, че пациентите с тежко депресивно разстройство (MDD), които са развили ADT тахифилаксия, често имат по-слаб отговор към терапията след това (Sharma, 2001). В същото време, изчерпването на моноамините не води до увеличаване на тежестта на симптомите на пациенти без лечение, нито води до значителна депресия при здрави доброволци без депресивно заболяване. Тези констатации поставят под въпрос самостоятелната роля на дефицита на моноамини в патогенезата на депресията (Delgado, 2000). Днес е известно, че патобиохимията на депресията е значително по- сложен проблем, който засяга както невромедиацията, така и морфологията на мозъка.

3.3.3. Морфологични изменения на ЦНС при депресия

През 1997 г. Drevets et al. доказват връзка между афективните разстройства и намаления кортикален обем. Това дава основание за изследване на връзката между патогенезата на депресията и морфологични промени в централната нервна система (Russo and Nestler, 2013). В много от изследваните субекти се установява едно и също – намалена дебелина на cortex prefrontalis (PFC) и намален общ брой на невроните (Rajkowska et al., 1999). Последващи проучвания разкриват още загуба на синапси и дендритна плътност в PFC (Kang et al., 2012) и hippocampus (Duric et al., 2013 г.) на пациенти с депресия. Патологични промени в хипокампуса (Фигура 1), част от лимбичната система, намираща се в медиалния темпорален лоб, често са свързани с различни симптоми на депресия, както и когнитивен спад и увреждане на паметта (Morales-Medina et al., 2013 г.).

Една от причините за морфологични промени в хипокампуса е продължителен стрес (Willner and Scheel-Krüger, 2013). При пациенти с PTSD обемът на хипокампа е значително по-малък, което корелира с дефицит в краткосрочната памет (Bremner et al. 1995). Скорошно образно изследване при плъхове показа, че хроничният стрес при имобилизация (CIS) наистина води до намаляване на обема на хипокампата в сравнение с контролните стойности (Lee et al. 2009). В модели на CIS, има значително намаляване на дендритни шипчета и микроструктурни измененията в региона на CA3 (Conrad et al., 1999), също и потискане неврогенезата в gyrus dentatus (Schoenfeld and Gould, 2012).



Фигура 1. Анатомия на хипокампуса и изменения при депресия - рисунка на д-р Бакалов. (BDNF – Brain-derived neurotrophic factor, Мозъчен невротрофен фактор; CA - cornu Ammonis региони)

Някои от тези ултраструктурни промени могат да бъдат обяснени с нарушаване на регулацията на невротрофичните фактори, напр. на мозъчния

невротрофичен фактор (BDNF). Проучванията показват, че хроничният умерен стрес причинява понижаване на производството на BDNF в gyrus dentatus (Grønli et al., 2007), което може да бъде свързано с невроналната атрофия и намаленото клетъчно деление. Антидепресантната терапия, с инхибитори на обратното захващане на серотонин и норадреналин (SSRI или SNRI), регулира нивата на BDNF в хипокампуса (Dumam, 1997; Dumam&Monteggia, 2006). Също така, BDNF демонстрира антидепресантни ефекти при поведенчески модели на гризачи с депресия. Това е показано след инфузия на BDNF в някои области на мозъка, като hippocampus и PFC (Björkholm&Monteggia, 2015). BDNF полиморфизми са предложени като основен фактор в патогенезата на семейната депресия, но резултатите не са достатъчно показателни до този момент (Levinson, 2006).

Друга важна група от молекули с възможна роля в патогенезата на депресията са фосфодиестеразите (PDE), по-специално PDE4, много широко разпространен в мозъка изотип, който е важен регулатор на cAMP (Moris et al., 2014). PDE4-насочената терапия е била първоначално използвана при лечението на ХОББ и респираторни заболявания, но *in vitro* изследвания са показали обещаващи резултати при нервновъзпалителни заболявания.

Първият PDE4 инхибитор, преминаващ през хемато-енцефалната бариера е Rolipram, създаден с цел третиране на невроинфламацията. Rolipram е показал обещаващи резултати при in vivo модели на депресия, болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон и невропатична болка (Rose et al., 2005; García-Osta et al., 2012; Pearse and Hughes, 2016). PDE4 инхибиторите потискат невровъзпалението чрез увеличаване на нивото на cAMP, стимулиране на CREB фосфорилирането, и инхибиране на NF-κB активацията в мозъчната кора и хипокампуса при мишки, подложени на LPS- индуцирано невровъзпаление (Zou et al., 2017). Освен това, изследване върху такива мишки е установило, че PDE4 инхибирането има ясно изразени антидепресантни ефекти, потвърдено от намаляването на депресивното поведение при forced swimming test и tail-suspension test (Yu et al., 2018).

3.4. Лечение на депресията - история и нови хоризонти

В болничните условия 50% от всички психиатрични консултации и 12% от всички хоспитализации са свързани с клинична депресия. (Kuo et al., 2015)

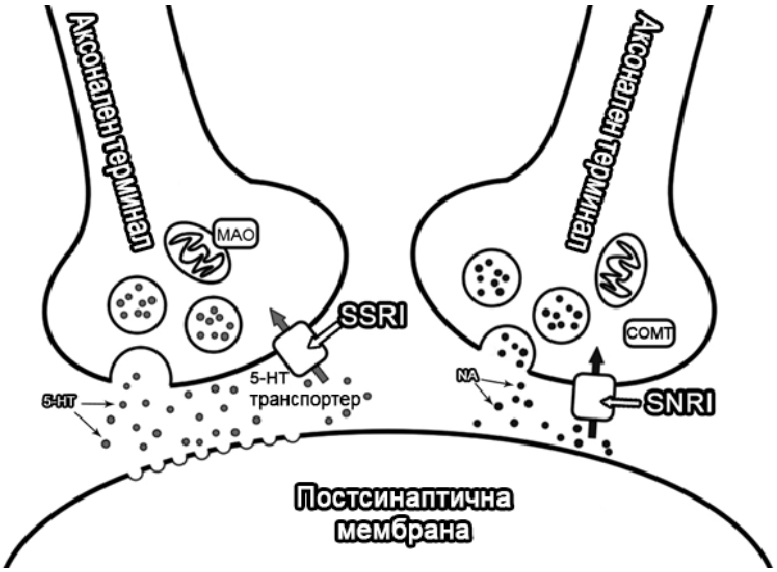
Това е една от причините да има все по-активни изследвания за нови и ефективни лечения. Съвременната фармакотерапия за лечение на афективни разстройства е фокусирана главно върху моноаминната невромедиация. Основните цели на тази терапия са свързани с възстановяване и поддържане на балансирани нива на ендогенните 5-HT, NA и DA.

Първото лекарство от семейството на антидепресантите е създадено случайно в лабораториите на Hoffmann-La Roche Ltd., САЩ. В тази лаборатория няколко години по-рано е бил патентован много ефективен противо-туберкулозен антибиотик - isonicotinylhydrazide (INH) (Riede, 2009). В един опит да се увеличи ефикасността на лекарството, Fox и Gibas (1953) създават нова моноалкилно производно - ипрониазид, което от своя страна е катализаторът за създаването на съвременните антидепресанти. По време на различни клинични изпитания на лекарството, лекарите наблюдават необичайни и неочаквани нежелани лекарствени реакции - еуфория, увеличен апетит, хипомания. През 1957 г. Loomer et al. провежда систематично клинично изпитване за тестване на ефектите на ипрониазид върху пациенти с депресия. В 70% от случаите има значително подобрение на симптомите (Loomer et al., 1957). Ипрониазидът е първият инхибитор на моноаминооксидазата в историята. Въз основа на тази моноаминна теория, през следващите години много повече лекарствени класове биват развивани и усъвършенствани. Друга група молекули с антидепресантно действие са трицикличните антидепресанти (TCA). TCA, подобно на MAOI, осъществяват своя антидепресантен ефект чрез повишаване на синаптичните концентрации на катехоламините, като инхибират тяхното обратно поемане в пресинаптичния неврон (Chockalingam et al., 2019).

Както споменахме, възпалителните процеси могат да имат съществена роля в етиологията на депресията, показано чрез животинските модели. Това беше подкрепено с нови литературни данни, демонстриращи, че SSRI притежават значителна противовъзпалителна активност, намалявайки провъзпалителните цитокини, а също така имат роля за стимулиране на неврогенезата (Walker, 2013). SSRIs остават основната фармакологична възможност за клиницистите при лечението на депресия.

В допълнение, настоящите антидепресанти имат много ограничения, включително забавена ефективност, резистентност към лекарства и рецидив [Trivedi et al., 2006; Gartlehner et al., 2007]. Следователно изследователите трябва

да разработят по-ефективни антидепресанти. Въпреки това, двусмислената патофизиология на MDD представлява пречка за разработването на нови антидепресанти. Не трябва да се пренебрегва и фактът, че конвенционалната психофармакотерапия все още е свързана с голям брой нежелани лекарствени реакции (НЛР), което е особено важно при пациенти с депресия, тъй като те често имат съпътстващи заболявания. Честотите на хроничните разстройства при депресия са както следва: астма - 27% (Lu et al., 2012), атопичен дерматит - 5% (Lim et al., 2016), ХОББ - 24,6% (Zhang et al., 2011), подагрозен артрит - 20% (Mak et al., 2011), ревматоиден артрит - 15% (Ho et al., 2011), системен лупус - 22% (Mak et al., 2011) и инсулт - 30% (Mak et al., 2013). Споменатият вече висок процент на ADT тахифилаксията (33%) е друг проблем, на който трябва да се обърне внимание в търсенето на нови, по-ефективни и комплексни възможности за лечение.



Фигура 2. Пресинаптична цепка. 5-HT - 5-хидрокситриптамин; COMT - Катехол-О-метилтрансфераза ; NA - норадреналин; MAO - моноаминооксидаза; SNRI - инхибитори на обратното захващане на серотонин-норепинефрин, напр. Duloxetine; SSRI - селективен инхибитор на обратното захващане на серотонин, напр. Paroxetine.

4. Фитотерапия на поведенческите нарушения

При лекарствата за депресивни и афективни разстройства не винаги е възможно да се намери балансът между положителния терапевтичен ефект и НЛР, което е причината много пациенти да посягат към средствата на

фитомедицината като допълнение към конвенционалнита терапия. Някои от тези "алтернативни" фитопрепарати са описани още по времето на Хипократ.

В последните десетилетия има значително увеличение на използването на растително-базирани препарати. В изследване, публикувано 2001 година (Kesler et al., 2001) се вижда, че 57% от пациентите с тревожност и 54% от хората с депресия са използвали фитопрепарати или алтернативна медицина през последните 12 месеца. Тези проценти в последните години стремглаво се увеличават.

Съвременната фитотерапия все още е много млад клон на фармакологията, но има експоненциално увеличение на броя на изследванията и пробивите през последните години. Освен класическите мощни алкалоиди, изолирани от растения като *Erythroxylon coca* - кокаин, *Papaver somniferum* - морфин, *Areca catechu* - arecoline, през последните десетилетия много повече растения проявяват потенциал да се превърнат в източник на терапевтични молекули, напр. Жълт кантарион (*Hypericum perforatum*), *Sceletium tortuosum* и някои видове от родът Нарцис (Harvey et al., 2011; Hanks, 2003).

Един важен аспект на фитотерапията е фактът, че често не е възможно да се изолира единична активна молекула, която да определя фармакодинамиката на екстракта. Действието често се дължи на синергестични ефекти на различни молекули, открити в растението (Heinrich, 2004).

Някои растения, като *H. perforatum, Rhodiola Rosea, Crocus sativus* (Kumar, 2006; Spinella, 2001). са известни с тяхната ефективност при промяна на хода на депресия, като действат на моноаминната невротрансмисия. Други действат на GABA, цитокините и дори – на опиоидната и канабиноидни системи (Spinella, 2001). Мета-анализ от 2009 показва, че *H. perforatum* е по-ефективен от плацебо, а също така показва по-добър профил на безопасност в сравнение с конвенционални SSRIs - значително по-малко хора преустановяват лечението поради нежелани лекарствени реакции (Rahimi et al, 2009).

4.1. Нарцисите в медицината

Нарцисът е член на семейство Amaryllidaceae, което се състои от 65 рода и повече от 860 вида. Тези видове са широко разпространени в тропически, субтропични и умерени райони на северното и южното полукълбо (Hanks, 2003;

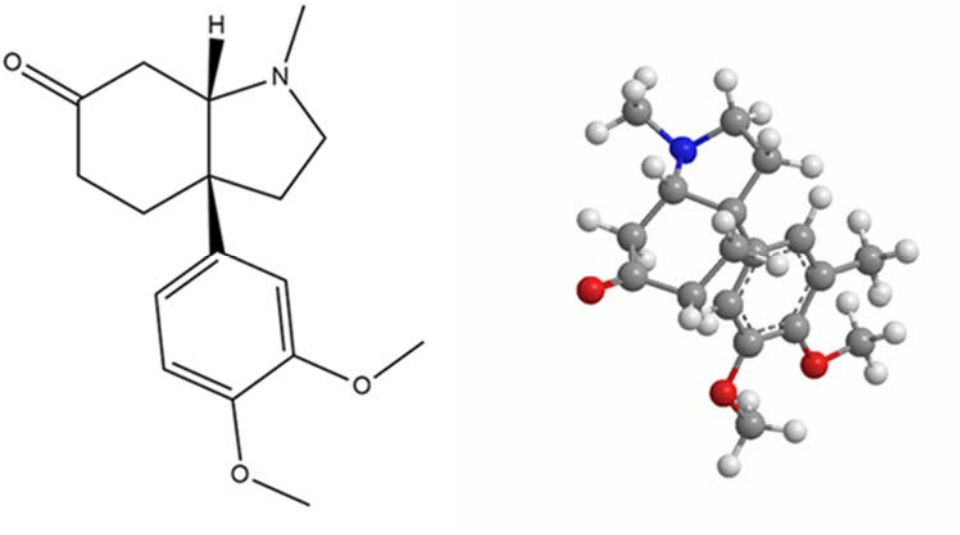
Buket et al., 2017; Berkov et al., 2020). Те са известни с декоративната си стойност и се използват в медицината от древни времена (Artyushenko, 1970; Khamidkhodzhaev, 1984). В последните години родът Нарцис е изследван от учените като нов източник на биомедицински активни алкалоиди - до момента са изолирани повече от 200 биоактивни алкалоиди (Hanks, 2003; Berkov et al., 2020). Не случайно родът Нарцис се е използвал в традиционната медицина за лечение на различни здравословни проблеми. Тези алкалоиди проявяват редица фармакологични ефекти, които включват антивирусна, противогъбична и антитуморна активност (Pigni et al., 2010; Berkov et al., 2020). Голям брой фитохимични изследвания на екстракти от Narcissus сочат тяхното възможно използване като източник на невроактивни вещества, например като източник на галантамин (Hanks, 2003), алкалоид с ацетилхолинестеразна инхибиторна активност, използван при терапията на леки когнитнивни нарушения в началните етапи на болестта на Алцхаймер. (Birks, 2006). В нашите изследвания, фокусът бе насочен към мезембриновите алкалоиди, изолирани от *Narcissus cv. Hawera* и техните потенциални ефекти върху различни аспекти на поведението.

4.2 Мезембринови алкалоиди

Тази интересна група от съединения е открита по същото време, когато е синтезиран ипрониазида (Bodendorf и Krieger, 1957). Растенията, съдържащи мезембринови алкалоиди, се използват от векове. Най-популярното растение от тази група е Sceletium tortuosum, което има дълга история на употреба в традиционната медицина на Южна Африка, главно заради своите добри ефекти върху повлияването на настроението (Harvey et al., 2011).

Това растение и неговите свойства са описани за първи път на хартия през 1662 г. от Ян ван Рибеек. *Sceletium tortuosum* се ползва като дъвка, отвари и тинктури, използвано е и като емфие и за пушене. (Smith et al., 1996). При *in vitro* изследвания алкалоидите, подобни на мезембрин, демонстрират SSRI активност, което предполага възможната им употреба при депресия, афективни разстройства и ОКР (Gericke & Van Wyk, 2001). Някои синтетични мезембринови алкалоиди показват силна инхибиторна активност на транспортера на серотонин, с възможни модулаторни ефекти върху обратното поемане на норадреналин и допамин (Harvey, 2008). Също така има данни, че тези алкалоиди инхибират

фосфодиестераза-4 (PDE4) (Napoletano et al., 2001). Както бе споменато по-рано, PDE4 инхибиторите са нова и обещаваща група фармакологични вещества, които предоставят нов терапевтичен подход за лечение на депресия. Чрез промяна на нивата на цикличния аденозинмонофосфат (cAMP), семейството на PDE4 ензимите има пряка роля в патогенезата на депресивните разстройства и е показано, че селективно инхибиране на тези ензими може да доведе до значителна антидепресивна активност (Houslay et al., 2005). Установено е, че PDE-4 инхбиторите стимулират транскрибцията на иРНК и синтеза на BDNF в хипокампус на плъх (Fujimaki et al., 2000), като по този начин, както бе обсъдено по-горе, този невротрофичен фактор може да окаже положителен антидепресивен ефект при засегнати индивиди.



Фиг. 3 Мезембрин

Досега няма съобщения за НЛР по отношение на препаратите, съдържащи мезембринови алкалоиди. В проучване, проведено за тестване на тяхната безопасност, екстракт от Sceletium се дава на седем здрави гончета и едно куче с деменция в доза 10 mg/kg два пъти на ден в продължение на шест дни. След широко клинично и параклинично изследване, включващо ПКК, биохимия и тестове за функциониране на бъбреците е установено, че няма значими промени в изследваните параметри, както и поведенчески отклонения (Hirabayashi et al., 2002).

Изследване, проведено за анализиране на ефектите на Zembrin, лекарство, което съдържа стандартизиран екстракт на Sceletium tortuosum, показва, че след третиране с еднократна доза от 25 мг, реакцията на амигдалата към плашещи лицеви изражения е подтисната. Това се визуализира с fNMR, който също показва затихване на активността по оста амигдала-хипоталамус. Всичко това доказва, че комбинацията от SSRI активност и PDE4-инхибиция на тези алкалоиди ги прави подходящи не само за лечение на депресия, но и при тревожност , която често придружава MDD (Terburg, 2013).

5. Изводи

Представените литературни данни по неопровержим начин представят значимостта на стреса и тревожно-депресивните разстройства като едни от водещите проблеми на съвременното общество. Видно е, че те повлияват организма на множество нива, водейки до нарушения не само в психическото благоденствие, но и на чисто биологичните му функции. Именно този биологичен субстрат и набелязаните обратни връзки между различни регулаторни системи стават все по-значим обект на изследвания. С особено значение е връзката между стресът (метаболитен, социален или физически), като отключващ фактор за тревожно-депресивни разстройства, и неговите директни ефекти върху организма на анатомично и функционално ниво.

Ето защо основен фокус на настоящия дисертационен труд е изследването на ефекта на различни стресови модалности върху поведението, когницията и физическите параметри при плъхове, както и изследването на ефекта на мезембриновите алкалоиди, които показваме като модулатори на редица ЦНС системи.

III. Цел и задачи на изследването.

1. Цел

Главна **цел** на настоящия труд беше да се характеризира влиянието на хроничния социален, физически и метаболитен стрес върху функциите, свързани с изследователското поведение и паметта у гризачи, както и потенциалното въздействие на мезембринови алкалоиди от *Narcissus cv. Hawera* върху тези параметри.

2. Задачи

За изпълнението на поставената цел бяха извършени следните основни **задачи**:

i. Изследване на ефектите на остър и хроничен имобилизационен стрес върху поведението у плъховете.
ii. Изследване на влиянието на хроничен социален стрес върху основни параметри на поведението у млади плъхове;
iii. Изследване на влиянието на опитен модел на захарен диабет тип I (Т1ЗД) върху поведението у плъхове.
iv. Установяване на ефективна еднократна доза на Мезембриновата фракция алкалоиди, извлечена от *Narcissus cv. "Hawera".*
v. Установяване на ефекта на мезембриновата фракция върху поведенческите промени, предизвикани от различни стресови модалности.

Последователното прилагане на различни методични подходи върху един и същ обект на изследване е предпоставка за по-пълното охарактеризиране на процесите и минимализиране на количеството отклонения и неточности.

IV. Материали и методи

При изпълнение на задачите бяха използвани следните методи и подходи:

1. Експериментални животни и схема на третиране

Таблица 2. Използвани експериментални животни

Група	Вид животни	Пол	Брой	Модел на	Използвани за
1	Мишки ICR	Мъжки и женски	40	-	Определяне на минимална ефективна доза
2	Плъхове Wistar	Женски	40	T1ЗД	Изследване на поведенчески ефекти на T1ЗД
3	Плъхове Wistar	Мъжки	80	Имобилизационен стрес	Изследване на поведенчески ефекти на имобилизационен стрес
4	Плъхове Wistar	Мъжки + женски	20 (10 двойки)	Социален стрес	Изследване на поведенчески ефекти на социален стрес върху ювенилни плъхове
		Мъжки ювенилни	60		

1.1. Определяне на минималната ефективна доза

Експериментите бяха проведени върху 40 мъжки и женски мишки ICR, получени от ЕРБОЖ към БАН. Животните бяха поставени в индивидуални кафези при стандартизирани условия (20±1 ◦C, влажност 50–60%), 24 часов цикъл светло/тъмно (08:00/20:00 ч.) и свободен достъп до вода и стандартна храна. След адаптация (10 дни) животните бяха третирани с изследваната фракция в дози от 12.5, 25 и 50 мг/кг.

1.2. Изследване на поведенческите ефекти на захарен диабет тип I (T1ЗД) при плъхове и ефекта на Мезембриновата фракция

Експериментите бяха проведени върху 40 женски плъхове от порода Wistar (250–300 г), получени от ЕРБОЖ към БАН. Животните бяха поставени в индивидуални метаболитни клетки при стандартизирани условия (20±1 ◦C, влажност 50–60%), 24 часов цикъл светло/тъмно (08:00/20:00 ч.) и свободен достъп до вода и стандартна храна. След адаптация (10 дни) животните бяха третирани с изследваната фракция в дози от 20 мг/кг. [Shi et al., 1996]

1.3. Изследвания на имобилизационния стрес

Експериментите бяха проведени върху 80 мъжки плъхове от порода Wistar (250–300 г), получени от ЕРБОЖ към БАН. Животните се поставят групово по 5 животни в кафез при стандартизирани условия (20±1 ◦C, влажност 50–60%), 24 часов цикъл светло/тъмно (08:00/20:00 ч.) и свободен достъп до вода и стандартна храна. След адаптация и хендлиране (10 дни) започва процедурата по третиране. Животните бяха разделени на следните групи: 1/Контролни, третирани еднократно с MZM 20 мг/кг, и.п. или физиологичен разтвор; 2/ Контролни, третирани хронично с MZM 20 мг/кг, и.п. или физиологичен разтвор; 3/ Стресирани еднократно 6 часа, предварително третирани с MZM 20 мг/кг, и.п. или физиологичен разтвор; 4/ Стресирани хронично, предварително третирани с MZM 20 мг/кг, и.п. или физиологичен разтвор.

1.4. Изследвания на социалния стрес

За провеждането на социалния стрес бяха използвани 10 двойки: женски (с оперативна лигатура на маточните тръби) и мъжки плъхове от порода Wistar на възраст 12 седмици и 60 мъжки ювенилни плъхове от порода Wistar (възраст P21-P40), получени от ЕРБОЖ към БАН. Животните бяха отглеждани групово при стандартизирани условия (20±1 ◦C, влажност 50–60%), 24 часов цикъл светло/тъмно (08:00/20:00 ч.) и свободен достъп до вода и стандартна храна. Прилагането на социален стрес започва веднага след третирането с фракция мезембринови алкалоиди в доза 20 мг/кг, и.п. в продължение на 20 дни (група SS+MZM) или физиологичен разтвор (група SS). Плъхчетата от контролната група на същата възраст, както третираните, бяха поставяни индивидуално в чист кафез за период от 30 минути, каквато беше продължителността на стреса.

2. Метод за предизвикване на Т1ЗД при плъхове.

Методът за предизвикване на експериментален диабет тип 1 (diabetes mellitus - DM) се основава на интраперитонеално инжектиране на стрептозотоцин (STZ) в доза 65 мг/кг телесна маса, разтворен в цитратен буфер. Това води до разрушаване на бета-клетките на панкреаса, подобно на случващото се при Т1ЗД. Животните, третирани със STZ, бяха инфузирани с 10% разтвор на глюкоза в

първите 24ч, за да се избегне животозастрашаваща хипогликемия [Shi et al., 1996]**.** Концентрацията на глюкоза в кръвта беше проследявана чрез тест ленти Accu-Chek®.



Фиг. 4 Апарат и тест ленти Accu-Chek®.

3. Метод за предизвикване на остър и хроничен имобилизационен стрес.

Процедурата за предизвикване на остър (еднократно, 6 часа) и хроничен (2 седмици по 1 час на ден и 2 седмици по 6 часа на ден) имобилизационен стрес включва поставяне на експерименталните плъхове в индивидуални, прозрачни рестрейнери с размери 6 см вътрешен диаметър и дължина 20 см, които имат отвори за вентилация, стойка за фиксиране на позицията на тялото в пронация и ограничаващи дискове, които позволяват индивидуална регулация на дължината. През целия период на имобилизация, животните се наблюдават от опитен експериментатор за промени в първоначалната позиция, с цел избягване на нараняване на животното. Острият и хроничният стрес се прилагат в един и същи час от денонощието (от 09:00 до 11.0:00 и от 09:00 до 15:00 часа). Нестресираните контроли се отглеждат групово, като се хендлират ежедневно в същия часови интервал.



Фиг. 5. Restrain stress.

4. Метод за изследване на социално поведение - Тест „Resident-intruder“

Предварителната подготовка на теста включва оперативно поставяне на двустранни лигатури на маточните тръби на 10 женски плъха. Операцията беше извършена при антисептични условия под наркоза (Кетамин 80 mg/kg, i.m. + Ксилазин 4mg/kg, i.p.) и последвана от 7 дневен период на възстановяване. Операцията запазва функционалното състояние на яйчниците, без възможност на женските да забременеят. След възстановяването, всяка женска се поставя в кафез с по един мъжки, с телесна маса близка до нейната, за период от една седмица. Целта е мъжкият да развие защитно териториално поведение, което се проявява най-силно в присъствие на женска. Предотвратяването на бременността у женската елиминира възможността от развитие на защитно майчинско поведение по-нататък. Териториалното поведение на мъжкия индивид (резидента) се засилва от олфакторните следи на женската, което налага кафезът да не се чисти една седмица преди теста. В деня на теста, кафезите се преместват в звукоизолирана стая с камера за наблюдение и женските се изваждат един час преди поставянето на втори мъжки (интрудер), който не трябва да е имал предишен контакт с резидента и трябва да е с малко по-ниска телесна маса. Поведението на двата плъха се записва в продължение на 10 минути с дигитална камера. След края на експеримента, интрудерът се изважда и в кафеза се връща женската. Записите се преглеждат внимателно от двама независими наблюдатели, като се отчитат: общо време на активност по време на теста; продължителност на социален тип поведение (агресивна позиция на тялото, преследване, битка, ороназално изследване, аногенитално изследване и др.); продължителност на не-социален тип поведение (честота и латенция на хоризотналните и вертикални движения на резидента, почистване на козината, ненормална стереотипия, ровене); латенция до директно нападение (Clinch/attack bite) [Koolhaas et al., 2013].

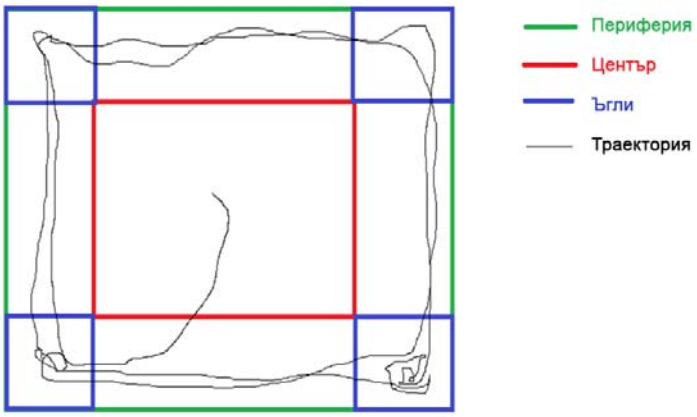
5. Метод за предизвикване на хроничен социален стрес (Social defeat stress)

Процедурата за предизвикване на хроничен социален стрес включва поставяне на младите плъхове (P35, телесна маса около 180 г) в кафез с по-възрастен мъжки плъх (резидент, телесна маса около 350 г), който е обитавал кафеза със стерилна женска в продължение на поне една седмица. Резидентът проявява агресивен тип социално поведение още през първите 5 минути спрямо

по-младия интрудер, който заема защитна позиция [Watt et al., 2009]. Младият плъх се приема за победен, когато е заел отбранителна позиция спрямо нападенията на резидента поне три последователни пъти, след което се разделя с мрежеста преграда, която го предпазва от физически контакт, но позволява звукови, олфакторни и зрителни въздействия за още 35 минути. След тази процедура младият плъх се връща в неговия кафез. Социалният стрес се повтаря в продължение на десет дни, като младите животни се поставят при различен резидент на рандомизиран принцип. Стресът се прилага в един и същи час от денонощието (от 10:00 до 11:00 часа).

6. Метод за проучване на изследователско поведение и хабитуация към непозната среда - Open-field тест.

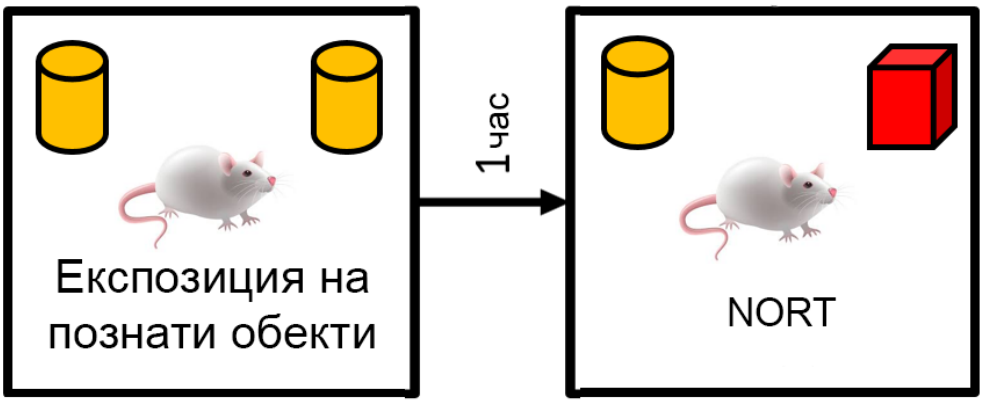
Апаратът се състои от кутия с размери 100 x 100 x 60 см, разделена на две зони - външен (100 x 100 см) и вътрешен (50 x 50 см) квадрати и видео камера, свързана с компютърна програма video tracking system (SMART Pan Lab software) на Harvard Apparatus, USA. Процедурата се състои в поставяне на изследваното животно в центъра на квадрата и проследяване на дължината на изминатата траектория и престоя на животното във вътрешния и външен квадрат за период от 5 минути. Вътрешната зона е възприета за аверсивна и престоят и дължината на изминатата в него траектория, изчислени като процент от общата стойност, изразяват нивото на безпокойство. Общият брой изправяния на задните лапи се приема за показател на изследователско поведение, заедно с изминатата хоризонтално траектория [Denenberg, 1969].



Фиг. 6. Open field test със запис на траекторията на опитното животно.

7. Метод за изследване на работната памет – Novel object recognition test

Апаратът е непрозрачна кутия (50 cm x 50 cm x 60cm), която е разположена в звукоизолирана, равномерно осветена стая. Процедурата се състои от 3 фази: 1-ви ден на привикване към новата среда за период от 15 минути; 2-ри ден – 5 минутно обучение, по време на което в кутията се поставят два идентични обекта и се отчита времето, през което животното ги изследва; 3та фаза – 5 минутен тест за оперативна памет 90 минути след обучителната сесия. През тази фаза, единият от вече проучените обекти се замества с нов, който има различна форма и цвят. Отчитат се отделно време за изследване на познатия и на новия обект. Обектите са подбрани с оглед да не наподобяват храна и вода и да нямат специфичен мирис. Изследователското поведение се дефинира като насочване на носа на животното към обекта на разстояние по-малко от 2 сантиметра, съпроводено с вибриране на мустачките. Способността за разграничаване на новия от вече познатия обект се представя като Recognition index (RI) = време на изследване на новия обект x 100% / (време на изследване на новия обект + време на изследване на познатия обект)[Pezze et al., 2015].

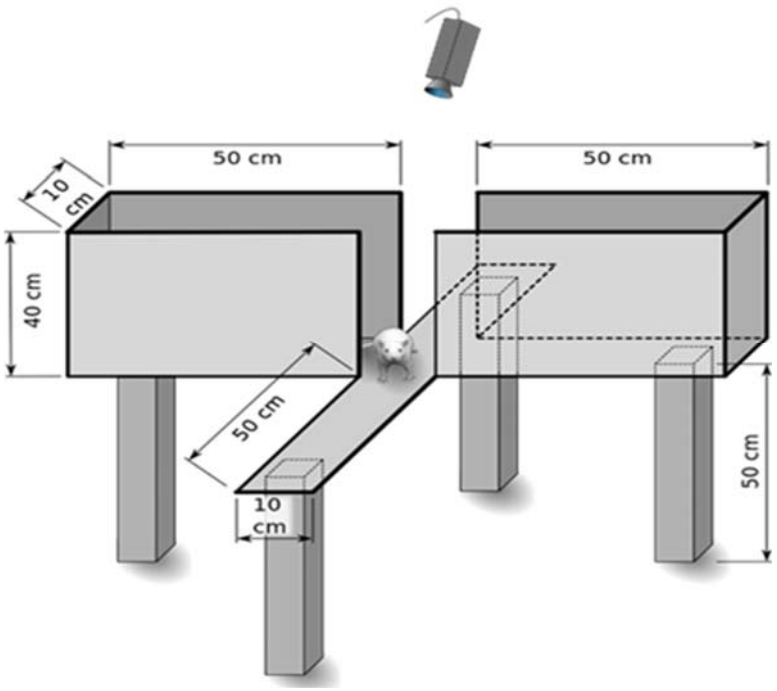


Фиг. 7. Метод за изследване на работната памет – Novel object recognition test. След всеки от поведенческите тестове, апаратурата се почиства старателно с 0.1 % разтвор на оцетна киселина, с цел премахване на олфакторни следи.

8. Метод за изследване на поведението на безпокойство – Elevated plus maze test

Лабиринтът се състои от две отворени рамене (50 x 10 cm), две затворени рамене (50 x 10 x 30 cm) и централна платформа (10 x 10 cm). Апаратът е повдигнат на 50 см от основата. Животните се поставят върху централната платформа с глава съм едното отворено рамо и поведението му се записва за период от 5 минути от видео камера, свързана с компютърна програма video tracking system (SMART Pan Lab software) на Harvard Apparatus, USA.

Състоянието на безпокойство беше оценено чрез съотношението на изминатата траектория и време на престой в аверсивните зони (отворени рамене) спрямо общата измината траектория и време на експеримента [Pellow et al., 1985].



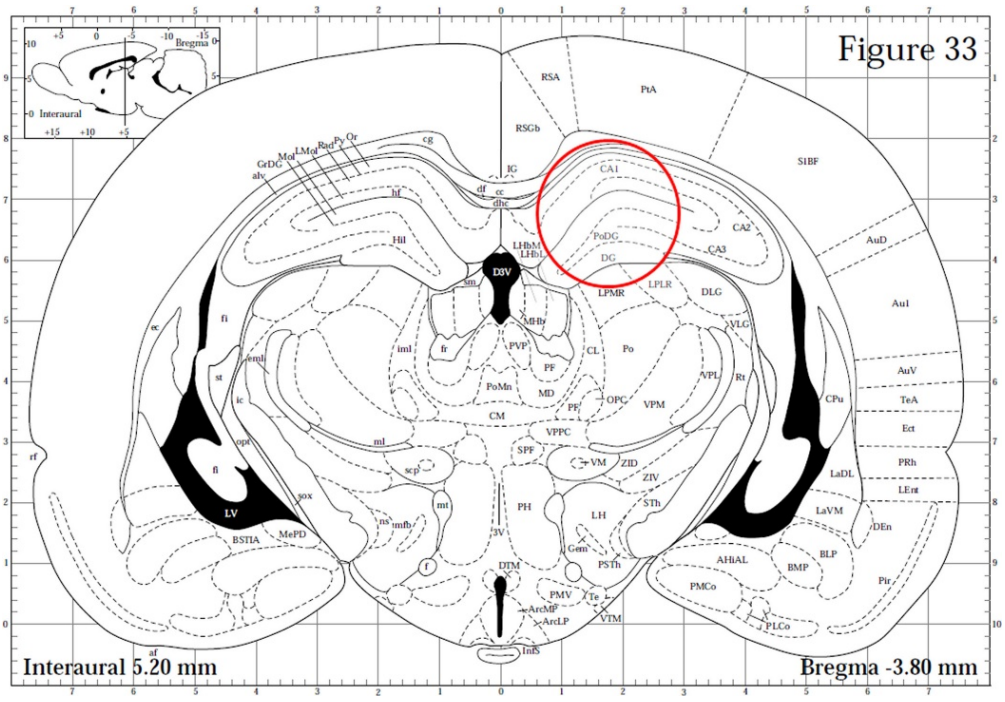
Фиг. 8. Elevated plus maze test.

9. Метод за изследване на болков праг – Paw Pressure Test

Болковата чувствителност беше изследвана чрез аналгезиметър Ugo Basile Italy след предварителна адаптация към експерименталните процедури и определяне на болковия праг като средна стойност от последователното прилагане на стимула върху двете задни лапи [Randall & Selitto, 1957] .

10. Подход за изолиране на мозъчни структури

Плъховете се декапитират посредством гилотина и мозъците се отпрепарират върху лед. Отделните структури (хипокамп) се изолират в съответствие със стереотаксичните им координати *(*Paxinos and Watson 1998).



Фиг. 9 Стереотаксичните координати на хипокампа (Paxinos and Watson 1998).

11. Подход за взимане на кръвни проби и кръвна плазма

Кръвните проби се вземат непосредствено след декапитация в стерилни вакуумтейнери с ЕДТА като антикоагулант. При животните, подложени на социален стрес, пробите се събират в края на сесията. Пробите се центрофугират

и получената кръвна плазма се използва за определяне нивата на кортикостерон и тестостерон.

12. Метод за определяне нивата на хормоните кортикостерон и тестостерон в кръвна плазма и мозъчен хомогенат.

Пробите се изследват чрез метода ELISA, съгласно протокола на производителя на селективния кит. Получените след измерването с ELISA четец (ELx800 Absorbance Reader, BioTek Instruments Co.) екстинции се преизчисляват на основа на стандартната крива за получаване на концентрациите на изследваните вещества във всяка проба.

13. Метод за определяне нивата на карбонилирани протеини

Образуването на карбонилни съединения е един неспецифичен, широко използван маркер за оксидативно модифицирани белтъчните молекули както in vitro, така и in vivo. В настоящото изследване сме използвали един от прилаганите методи за количествен анализ на протеинови карбонилни групи чрез взаимодействие на карбонилната група с 2,4-динитрофенилхидразин (DNPH), което води до образуване на стабилен хидразинов продукт от динитрофенил (DNP), който може да бъде количествено измерен спектрофотометрично при дължина 276 и 370 nm. Съдържанието на карбонилни групи се изчислява при пикова абсорбция около 360 nm м ммол/мг протеин [Dalle-Donne et al., 2006].

14. Метод за статистически анализ на данните

Всички данни от поведенческите експерименти са представени като средни стойности ± SEM. Статистическата обработка е извършена с two-way ANOVA с фактори Стрес (Социален, Имобилизационен, Метаболитен) (нива контроли и със стрес) и хронично третиране с MZM (нива физиологичен разтвор и MZM) с пост-тест Bonferroni. $P < 0.05$ се приема за статистически значимост. Използван софтуер – Sigma Plot 11.0 и GraphPad Prism 8.0

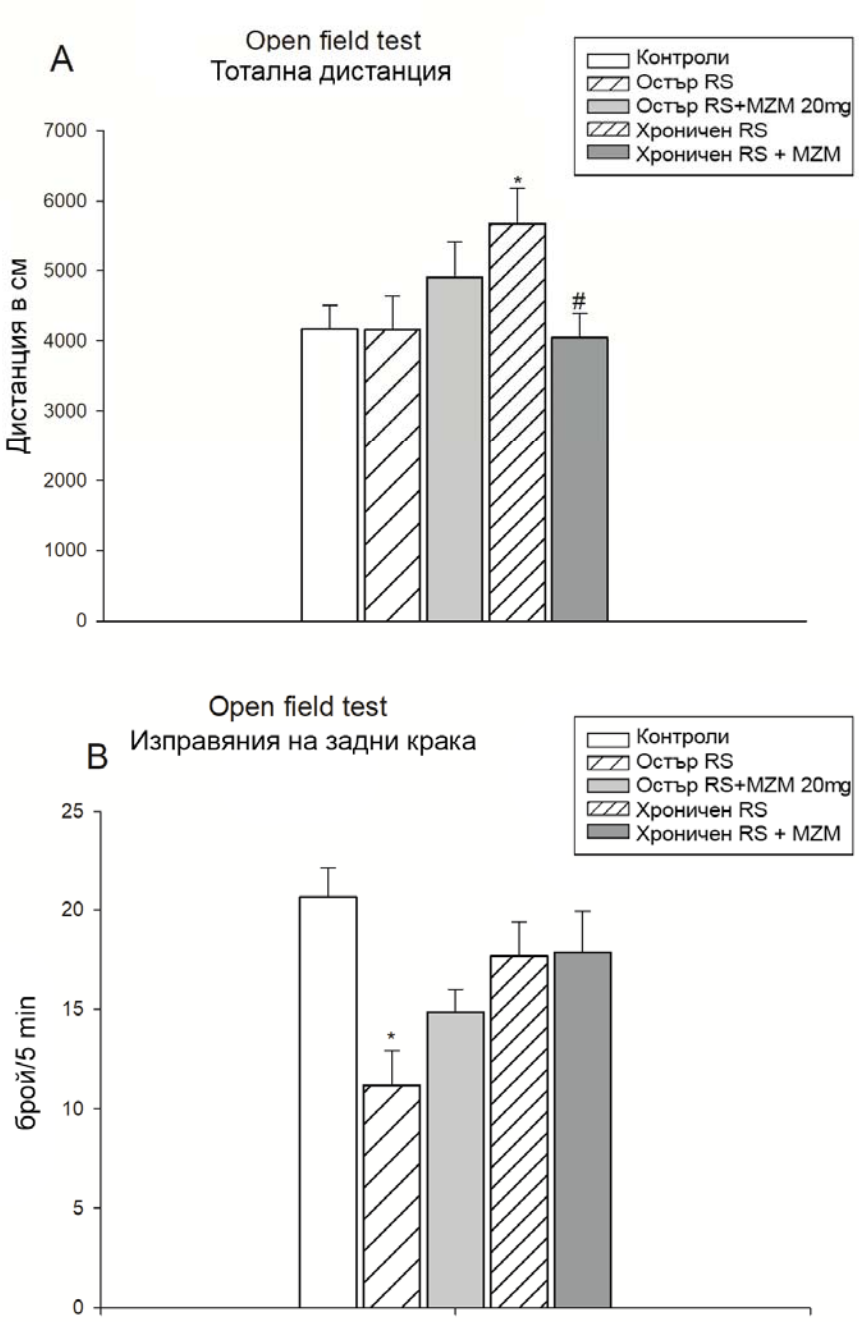
V. РЕЗУЛТАТИ:

1. Ефекти на остър и хроничен имобилизационен стрес (RS)

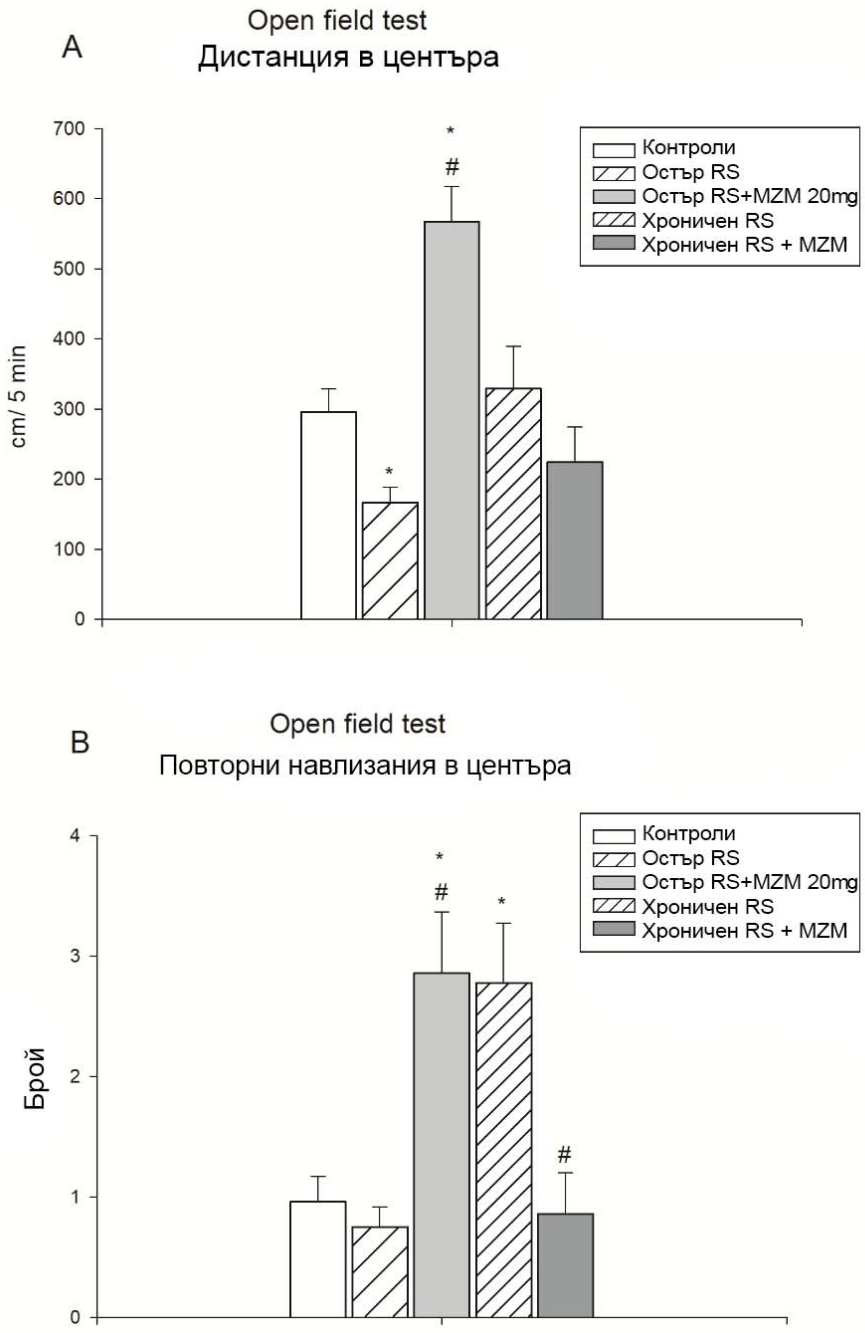
1.1. Ефекти на имобилизационен стрес върху изследователското поведение в непозната среда (Open Field Test).

Обработените експериментални данни показаха, че острият RS и еднократното третиране с MZM в доза 20мг/кг телесна маса не промени съществено общата локомоторна активност (фиг. 10A), но понижи изследователското поведение, като намали броя на вертикалните изправяния ($F_{1, 16} = 15.298$, * $p = 0.001$; фиг. 10B). Хроничният RS повишава значително общата хоризонтална двигателна активност ($F_{1, 19} = 6.430$, * $p = 0.021$). Еднократната доза 20мг/кг т.м. MZM нормализира вертикалното изследователско поведение, а хроничното претретиране с фракцията преди RS премахва напълно стрес-индуцираната хиперактивност ($F_{1,15} = 6.174$, # $p = 0.026$; фиг. 10A и B).

Острият стрес засили поведението на безпокойство, като намали значително дължината на изминатата траектория в централната аверсивна част на апарата ($H = 5.527$, $P = 0.019$). Еднократната доза от 20 мг/кг т.м. MZM, приложена непосредствено преди излагането на имобилизационния стрес, повиши значително изминатото в центъра разстояние ($F_{1,14} = 57.843$, * # $p<0.001$; (A)) и увеличи броя на повторните влизания в центъра на апарата ($H = 9.356$, * # $P= 0.002$;(B)), като предизвика изразен анксиолитичен ефект (Фиг. 11 A и B). Хроничният стрес увеличи броя на повторните влизания в централната зона на апарата ($H = 10.310$, *$P < 0.001$). Хроничното претретиране с MZM премахна напълно повишеното рисково поведение у стресираните животни ($H = 7.191$, # $P = 0.007$;Фиг. 11 B).



*Фиг.10 Ефекти на еднократно и хронично третиране с MZM върху предизвиканите от остър и хроничен RS промени в общата двигателна активност (сантиметри измината траектория за 5 минути) в непозната среда (A) и вертикалното проучвателно поведение (B; брой на вертикалните изправяния за 5 минути) при тест „Отворено поле“. Данните са представени като средни ± SEM, n = 8; * p<0.05 vs Controls; # p<0.05 vs Chronic RS.*

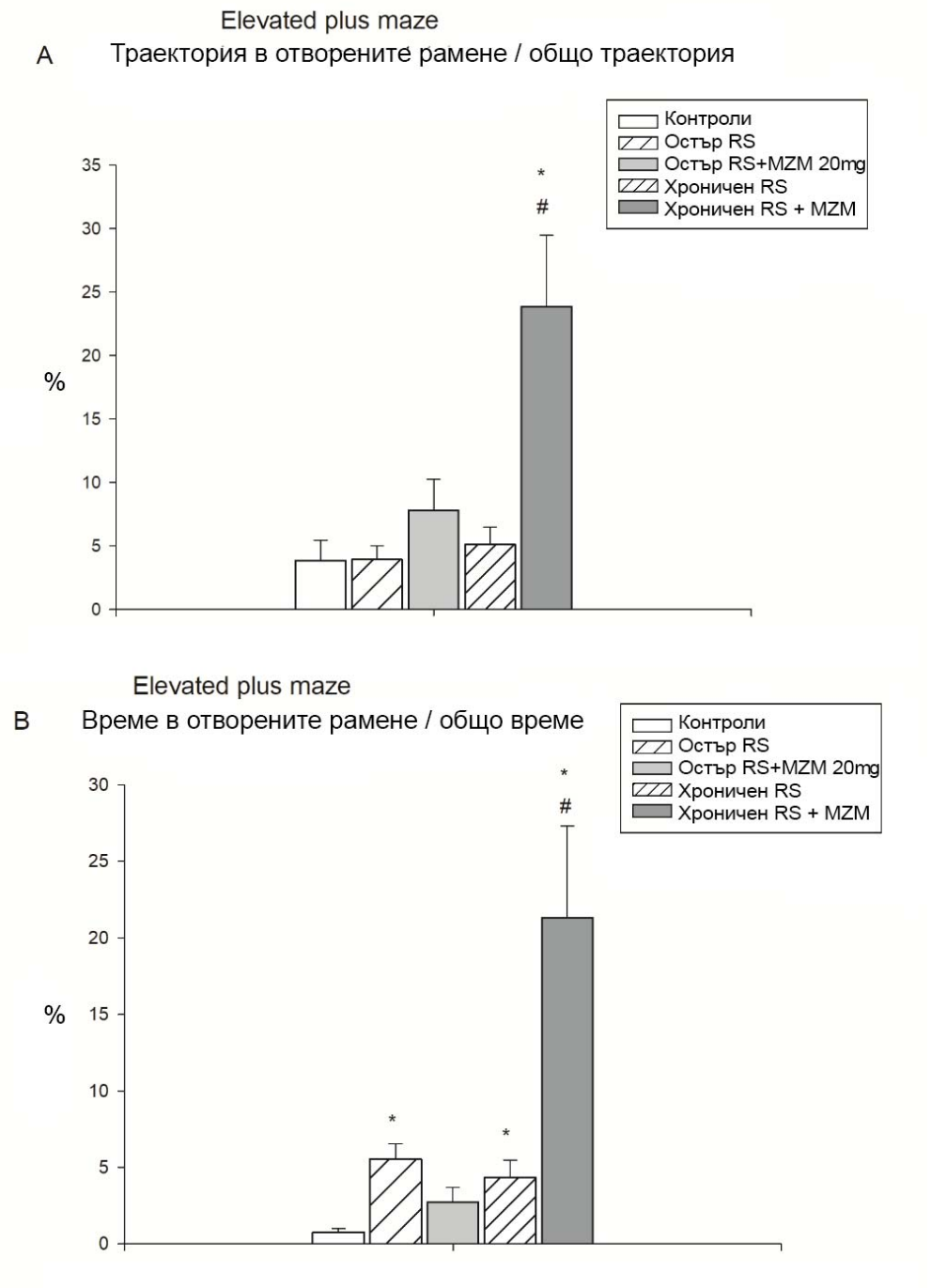


*Фиг. 11 Ефекти на еднократно и хронично третиране с MZM върху предизвиканите от остър и хроничен RS промени в поведението на безпокойство (дължина на траекторията (A) и брой повторни влизания в центъра(B)) при тест „Отворено поле“. Данните са представени като средни ± SEM, n = 8; * p<0.05 vs Controls; # p<0.05 vs Chronic RS*

1.2 Влияние на физическия стрес (RS) върху поведението на безпокойство (Elevated Plus Maze Test)

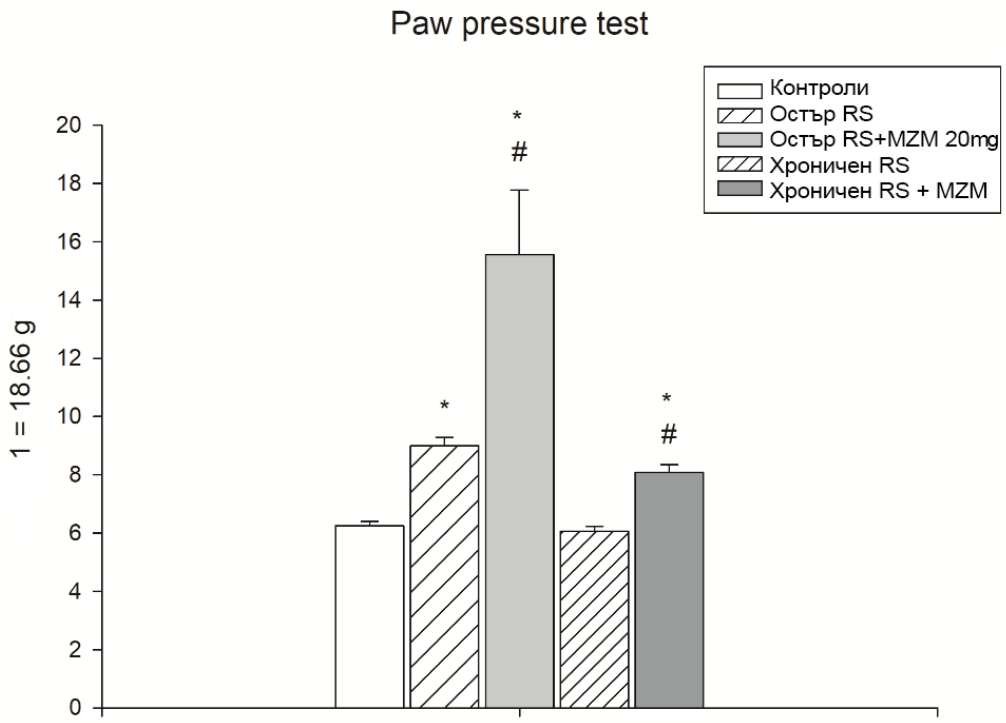
При теста за изследване на поведението на безпокойство (Elevated plus maze) не беше отчетено съществено влияние на острия и хроничен стрес, нито на еднократната доза преди острия стрес върху съотношението на изминатата в аверсивните отворени рамене траектория спрямо общата измината траектория. Хроничното третиране преди прилагане на хроничен стрес обаче повиши значително процента на изминатото разстояние в отворените рамене (H = 7.503, * P = 0.006; Фиг. 12A).

Друг параметър, който отразява поведението на безпокойство е съотношението на времето, прекарано в отворените рамене, спрямо общото време на теста. Този показател беше достоверно повишен и при двете схеми на стресиране: остър (H = 11.827, * P <0.001) и хроничен (H = 4.571, * P = 0.033) стрес (Фиг. 12 B). Еднократна доза MZM премахна анксиолитичния ефект на стреса, докато хроничното претретиране с фракцията доведе до достоверно повишаване на времето в отворените рамене (H = 5.728, P = 0.017 ; Фиг. 12 B).



*Фиг. 12 Ефекти на еднократно и хронично третиране с MZM върху предизвиканите от остър и хроничен RS промени в поведението на безпокойство (дължина на траекторията (A) и време на престой (B) в отворените ръмене) при тест „Повдигнат кръстосан лабиринт“. Данните са представени като средни ± SEM, n = 8; * p<0.05 vs Controls; # p<0.05 vs Chronic RS*

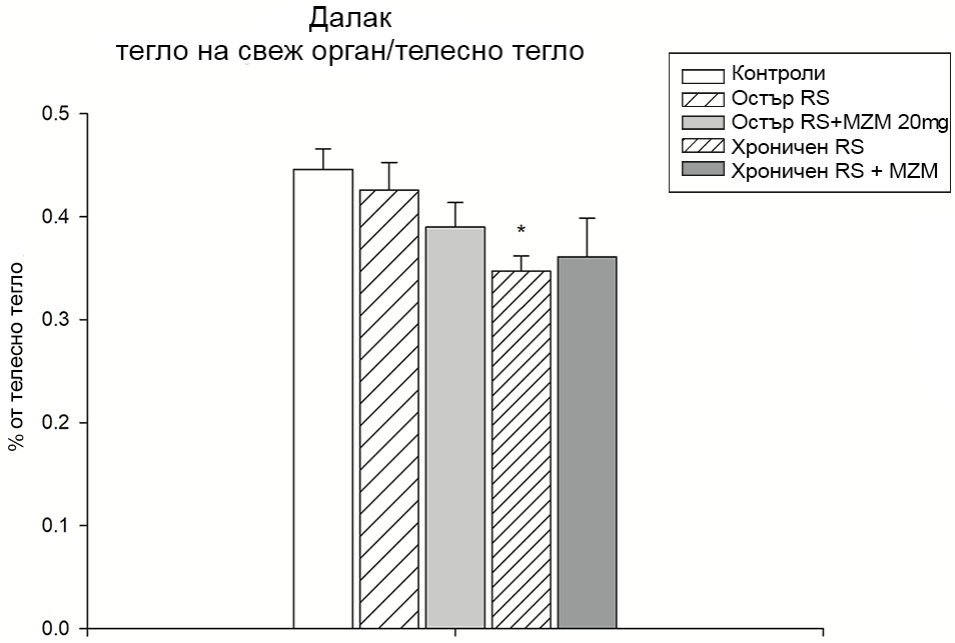
1.3 Промени в болковата чувствителност при тест “Paw pressure”.



*Фиг.13 Ефекти на еднократно и хронично третиране с MZM върху предизвиканите от остър и хроничен RS промени в болковата чувствителност (болков праг при механичен натиск на задна лапа) при тест „Paw pressure “. Данните са представени като средни ± SEM, n = 8; * p<0.05 vs Controls; # p<0.05 vs Chronic RS*

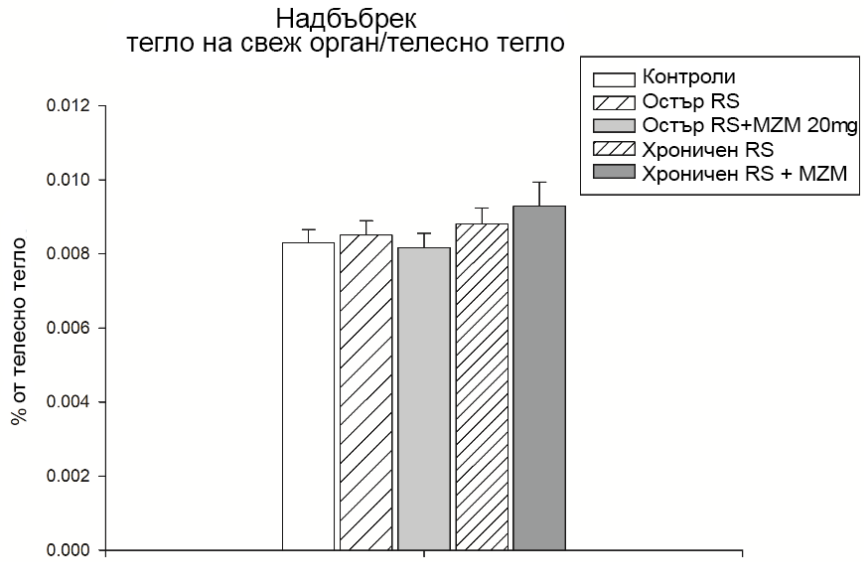
Острият RS индуцира антиноцицепция (H = 13.877, * P <0.001), а еднократното инжектиране на MZM преди стреса засилва достоверно стрес-индуцираната аналгезия (H = 4.575, # P = 0.032; Фиг. 13). За разлика от острия, хроничният стрес не предизвика съществени промени в болковия праг, но хроничното третиране с MZM преди ежедневното прилагане на RS намали достоверно болковата чувствителност (H = 12.066, * # P = <0.001; Фиг. 13).

1.4 Ефекти на остър и хроничен имобилизационен стрес върху масата на слезката и надбъбречната жлеза, както и на нивото на глюкозата в кръвта.

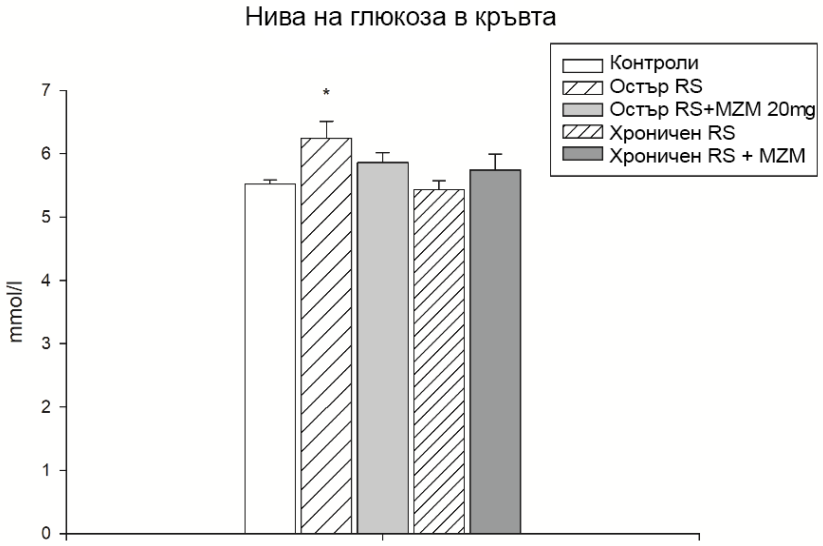


*Фиг. 14 Ефекти от остър и хроничен RS върху свежата маса на слезката. Данните са представени като средни ± SEM проценти от телесната маса, n = 8; * p<0.05 vs Controls.*

Хроничният имобилизационен стрес води до намаляване на процентното съотношение на свежата маса на изолираната слезка спрямо общата телесна маса (F 1, 31 = 12.218, * p = 0.001; Фиг. 14). Острият стрес и третирането с MZM не оказа влияние върху масата на този орган. Нито едно от въздействията (стрес или алкалоидна фракция) не оказа съществено влияние върху процентното съотношение на свежата маса на изолираните надбъбречни жлези спрямо телесната маса на изследваните плъхове (Фиг. 15).



Фиг. 15 Ефекти от остър и хроничен RS промени върху свежата маса на надбъбречната жлеза (усреднена стойност от двете жлези). Данните са представени като средни ± SEM проценти от телесната маса.



Фиг. 16 Ефекти от остър и хроничен RS върху нивото на глюкоза в кръвта. Данните са представени като средни ± SEM проценти от телесната маса.

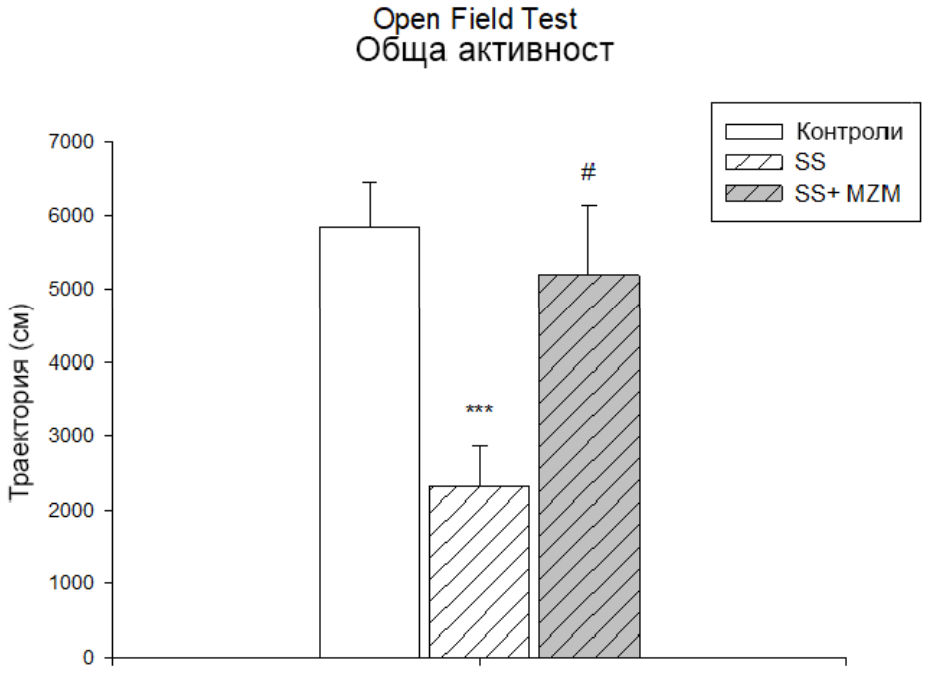
Острият RS предизвиква покачване на нивото на глюкоза в кръвните проби (H = 5.334, * P = 0.021), а претретирането с MZM премахва стрес-индуцирания ефект (Фиг. 16).

2. Влияние на хроничния социален стрес (SS) при млади мъжки плъхове Wistar.

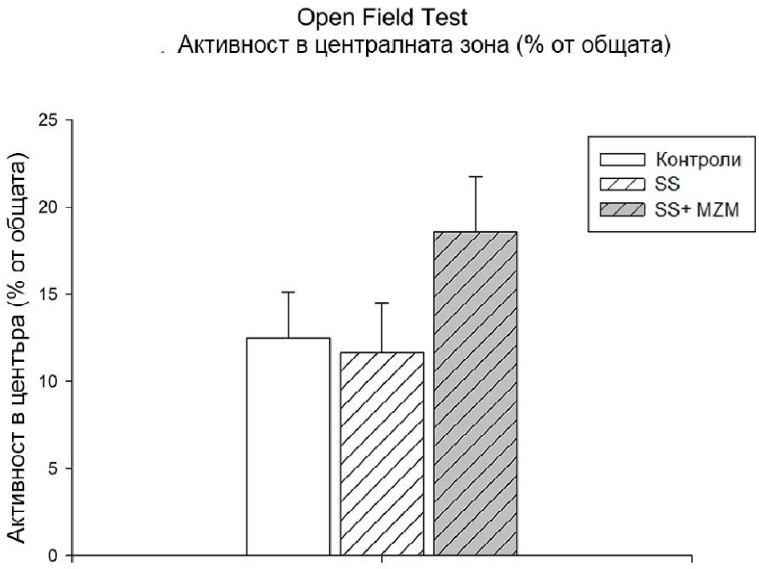
2.1. Ефекти върху изследователското поведение в непозната среда (Open Field Test).

Анализът на данните за общата хоризонтална активност (дължина на изминатата траектория във всички зони на апарата) показа драстичен спад на двигателната активност при животните, подложени на SS (F 1,15 = 18.190, ***p<0.001). Третирането с MZM премахна напълно стрес-индуцираната хиполокомоция (F 1,15 = 7.026, #p = 0.019; фиг.17).

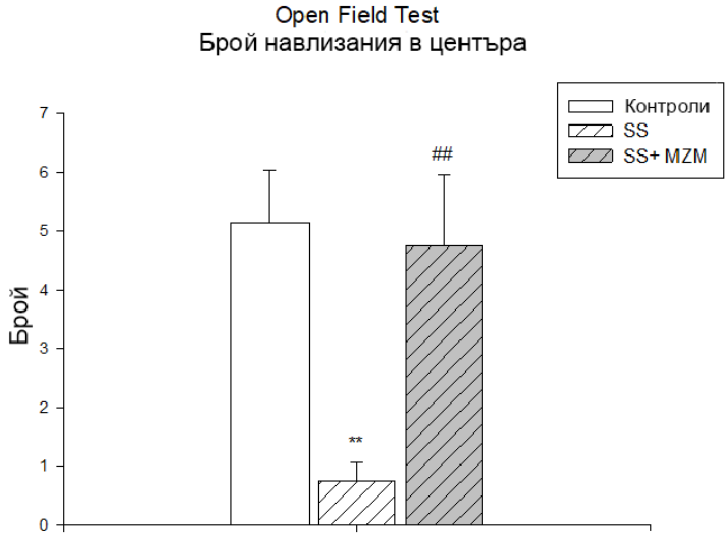
Данните на фиг. 18 показват, че хиполокомоцията не е свързана с промяна в изминатата траектория в централната аверсивна зона на апарата. Тези данни обаче не отчитат първоначалната траектория, която животното изминава от момента на поставянето му в центъра на апарата до достигане на периферната или ъглова зони.



*Фиг. 17 Влияние на хроничния социален стрес (SS) върху изследователското поведение (обща двигателна активност) в непозната среда (Open Field Test). Данните са представени като средни стойности ± SEM, ***p<0,001 спрямо нетретираните контроли, #p< 0.05 спрямо подложените на социален стрес, третирани с физиологичен разтвор.*

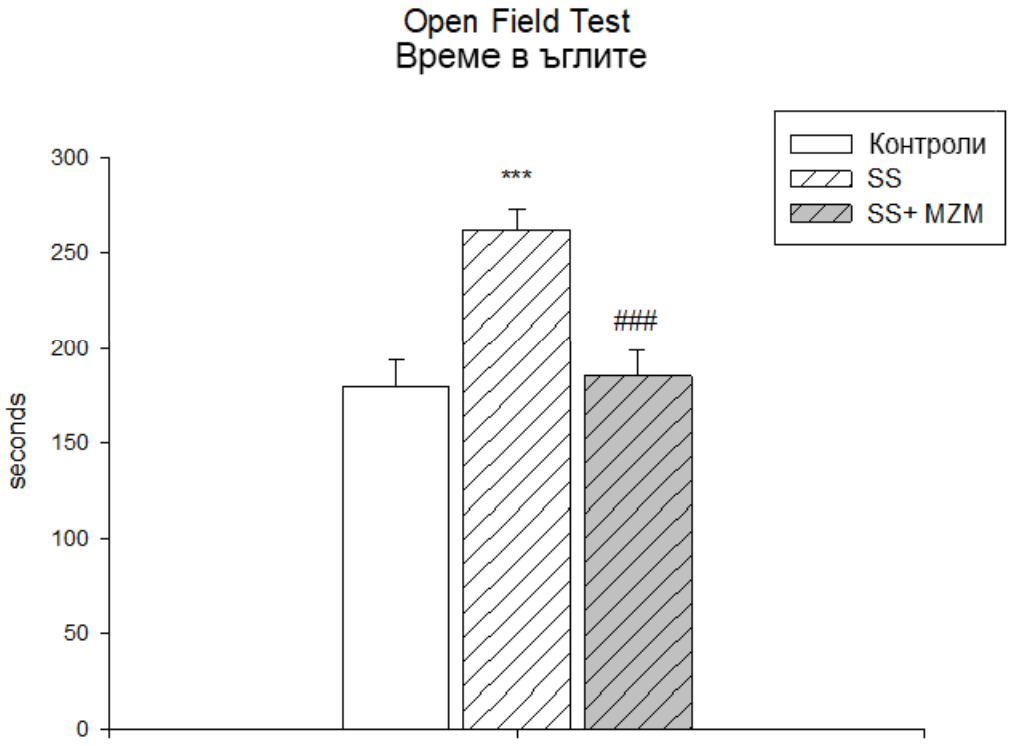


Фиг. 18 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху относителната двигателна активност в централната аверсивна зона (Open Field Test) при млади мъжки плъхове Wistar. Данните са представени като средни стойности ± SEM.



*Фиг. 19 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху поведението на безпокойство в непозната среда (Open Field Test) при млади мъжки плъхове Wistar. Данните са представени като средни стойности ± SEM, ***p<0,001 спрямо нетретираните контроли, # p< 0.05 спрямо подложените на социален стрес, третирани с физиологичен разтвор.*

На фиг. 19 са представени броят на повторните влизания в централната зона, който параметър показва наличието на страх от откритата централна зона на апарата у плъхчетата, подложени на хроничен SS (H = 6.875, **P (exact)= 0.009) и възстановяването на нормалното за тази възрастова група изследователско поведение при третираните с MZM + SS (H = 7.189, ## P(exact)= 0.007). Тези данни се допълват от представения на фиг. 20 анализ за времето на престой в ъгловите зони (защитена зона тип убежище). Животните, подложени на стрес, прекарват значително по-дълго време в тези 4 зони в сравнение с контролите (H = 9.763, ***P(exact)= <0.001), а съвместното прилагане на стрес и MZM напълно елиминира ефекта на стреса (F 1,15 = 19.291, ### p<0.001).

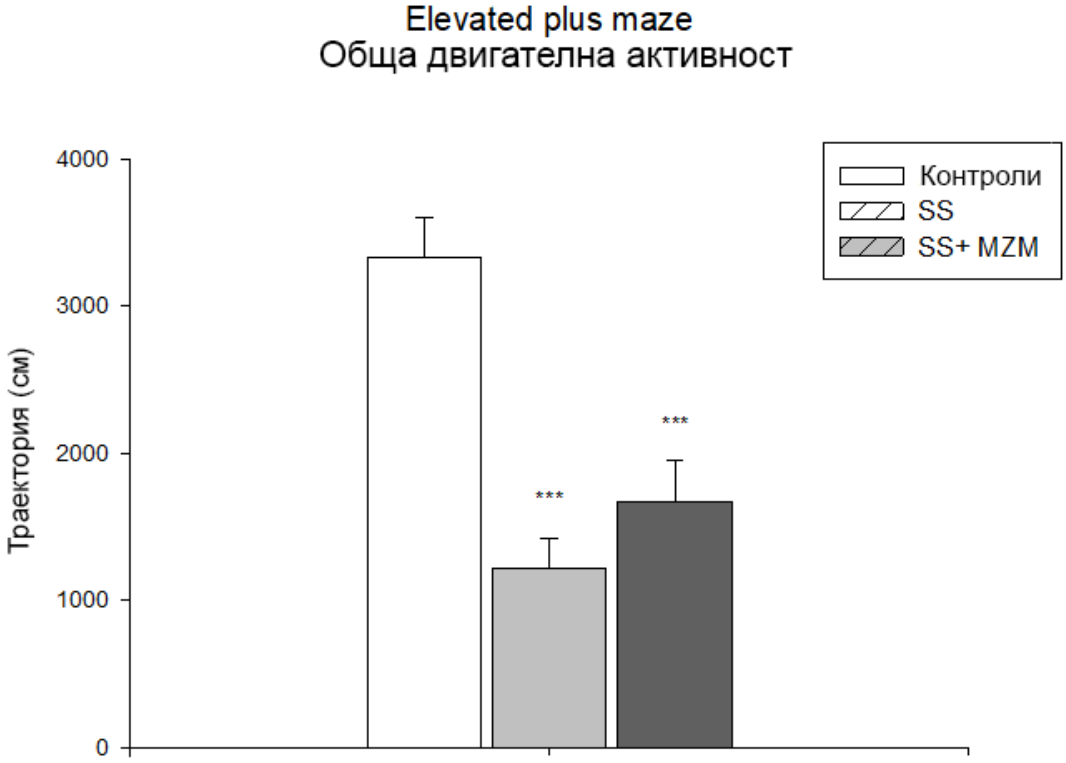


*Фиг. 20 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху поведението на покой в защитените зони на непозната среда (Open Field Test) при млади мъжки плъхове Wistar. Данните са представени като средни стойности ± SEM, ***p<0,001 спрямо нетретираните контроли, ### p< 0,001 спрямо подложените на социален стрес, третирани с физиологичен разтвор.*

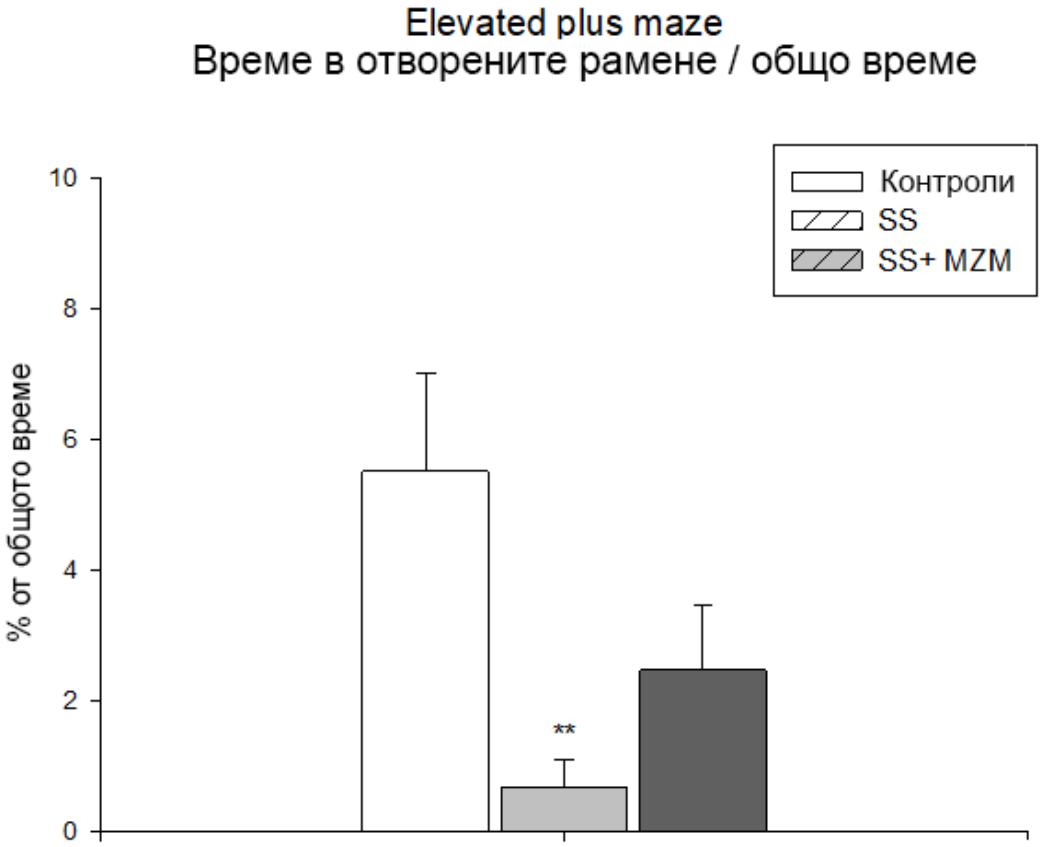
2.2. Влияние на хроничния социален стрес (SS) върху поведението на безпокойство (Elevated Plus Maze Test)

Данните от теста за изследване на поведение на безпокойство показаха достоверно понижаване на общата двигателна активност при стресираните групи животни, третирани с MZM или с физиологичен разтвор (F 1, 16 = 33.080, ***p<0.001; F 1, 18 =17.909, ***p<0.001, фиг. 21).

Социалният стрес понижи значително времето на престой в отворените рамене на лабиринта, което е показател за повишено поведение на безпокойство (H = 5.843, **P = 0.016, фиг. 22). Третирането с алкалоидната фракция понижи анксиогенния ефект на стреса (F 1, 16 = 2.334, p= 0.147).



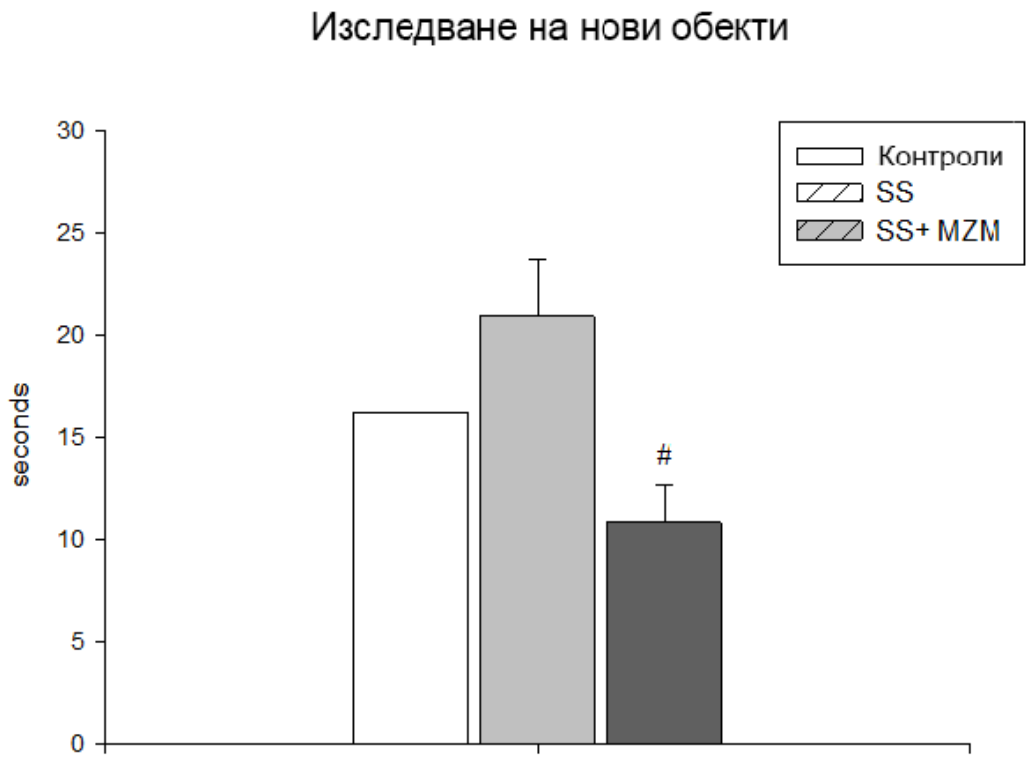
*Фиг. 21 Влияние на хроничния социален стрес (SS) върху изследователското поведение в аверсивна среда (Elevated Plus Maze Test) . Данните са представени като средни стойности ± SEM, ***p<0,001 спрямо нетретираните контроли.*



*Фиг. 22 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху поведението на безпокойство (Elevated Plus Maze Test) при млади мъжки плъхове Wistar. Данните са представени като средни стойности ± SEM, **p<0,01 спрямо нетретираните контроли.*

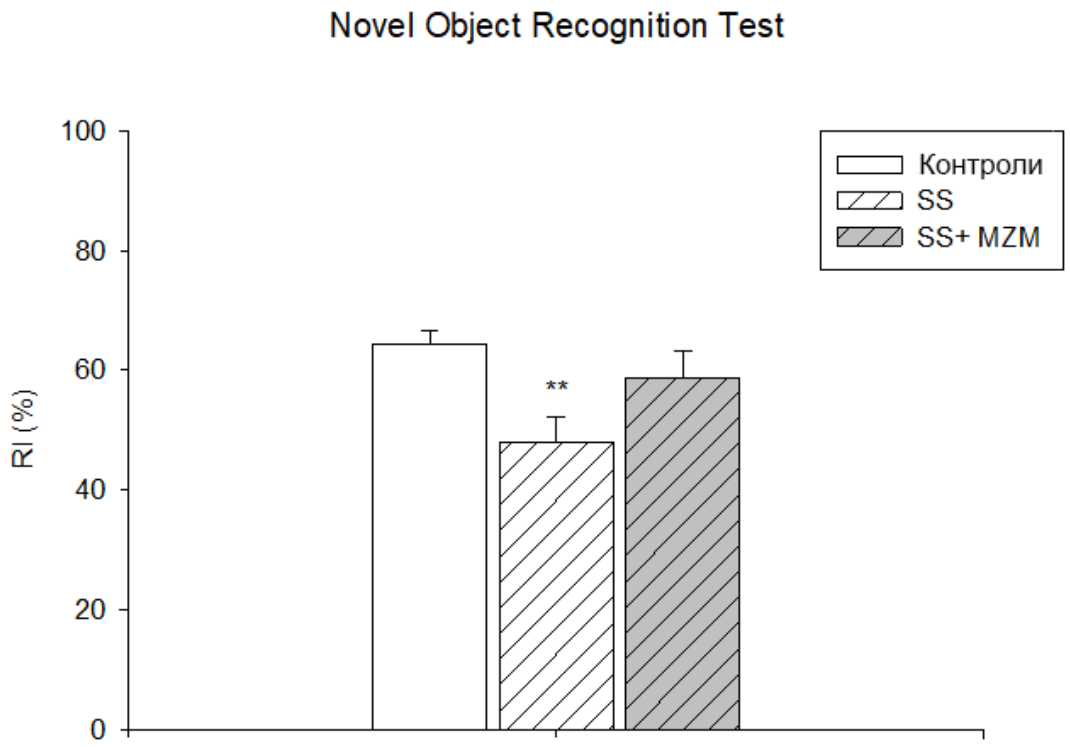
2.3. Влияние на хроничния социален стрес (SS) върху работната памет, изследвана с тест Novel Object Recognition

Хроничният социален стрес не промени съществено мотивацията за проучване на нови обекти, което се вижда от времето за изследване на обекти по време на обучителната фаза на теста (фиг. 23). Комбинираното прилагане на социален стрес с MZM съкрати времето на проучване (F 1, 16 = 9.300, # p = 0.008; фиг. 23), което е характерно за импулсивния тип поведение.



Фиг. 23 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху изследването на нови обекти (Novel Object Recognition Test) при млади мъжки плъхове Wistar. Данните са представени като средни стойности ± SEM, # p< 0,05 спрямо подложените на социален стрес, третирани с физиологичен разтвор.

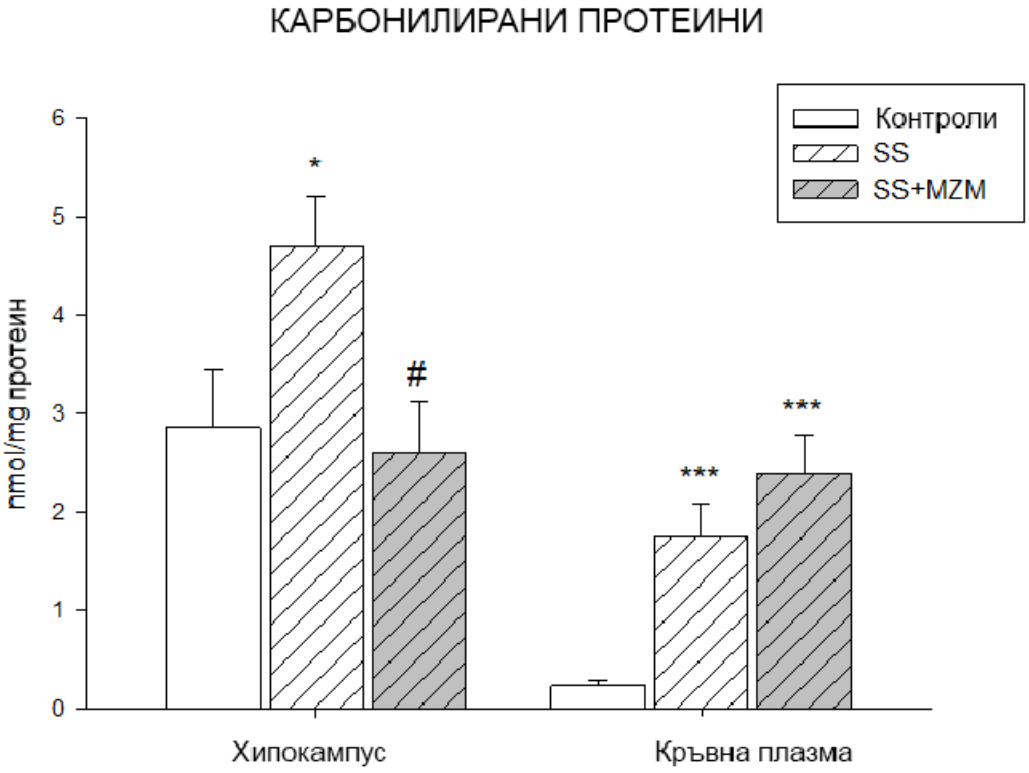
Индексът на разпознаване на новия обект от вече познатия показва, че хроничният социален стрес уврежда работната памет (H = 6.699, **P(exact)= 0.007) и че третирането с MZM облекчава стрес-индуцираната амнезия до нива, близки до контролите (фиг. 24).



*Фиг. 24 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху работната памет (Novel Object Recognition Test) при млади мъжки плъхове Wistar. **p<0,01 спрямо нетретираните контроли.*

2.4. Влияние на хроничния социален стрес върху нивото на увредените, карбонилирани протеини в изолиран хипокампус и кръвна плазма.

След края на поведенческите експерименти бяха взети кръвни проби и отпрепарирани двата хипокампуса, с цел изследване на нивото на карбонилираните протеини, като показател за увреждането им в резултат от повишено ниво на оксидативния стрес.

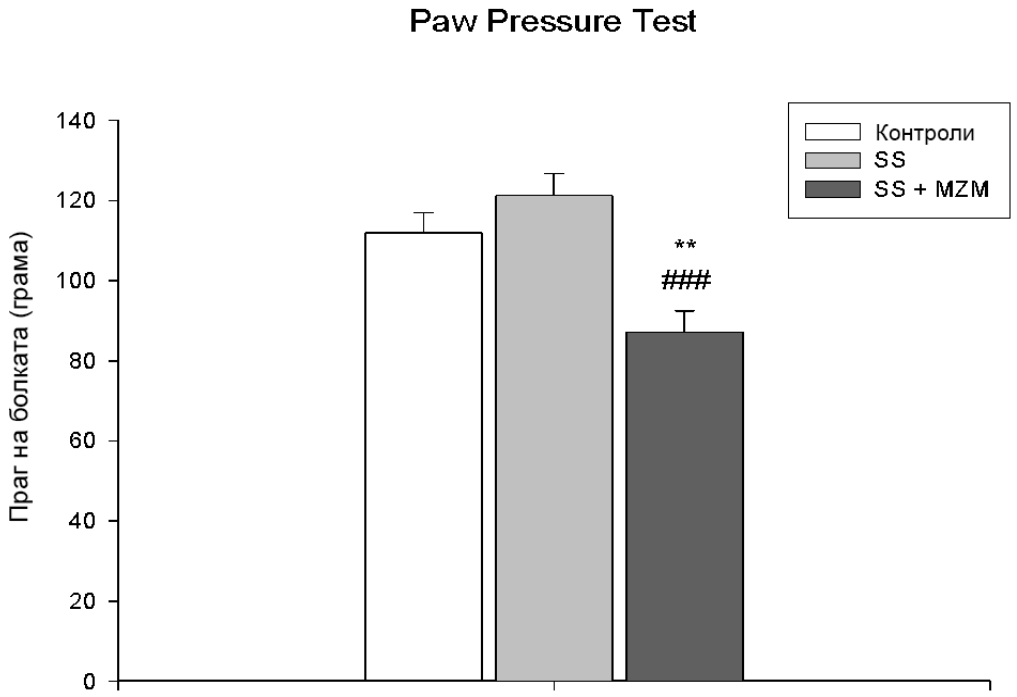


*Фиг. 25 Влияние на хроничния социален стрес (SS) върху нивото на увредените, карбонилирани протеини в изолиран хипокампус и кръвна плазма. Данните са представени като средни стойности ± SEM, *p<0,05 и ***p<0,001 спрямо нетретираните контроли # p< 0,05 спрямо подложените на социален стрес, третирани с физиологичен разтвор.*

Данните на фиг. 25 сочат, че хроничният социален стрес повишава значително нивата на увредените протеини в хипокампуса (F 1, 14 = 5.747, *p = 0.032) и в кръвна плазма (H = 9.054, *P(exact)= 0.001). Третирането с MZM понижава нивото на увредения протеин в мозъка (F 1, 14 = 8.345, # p = 0.013), но не оказва влияние върху плазмените му нива.

2.5 Влияние на хроничния социален стрес върху болковия праг, тестван чрез Paw pressure test.

На фиг. 26 са представени данните от изследването на механичния болков праг при еднократно прилагане на натиск върху задните лапи на плъхчета. SS не оказва значително влияние върху прага на фазовата болка, но третирането с MZM понижава достоверно болковия праг под нивото на контролните и на стресираните групи (F (1, 15) = 10.889, **p = 0.005; F (1, 14) = 18.506, ###p <0.001).



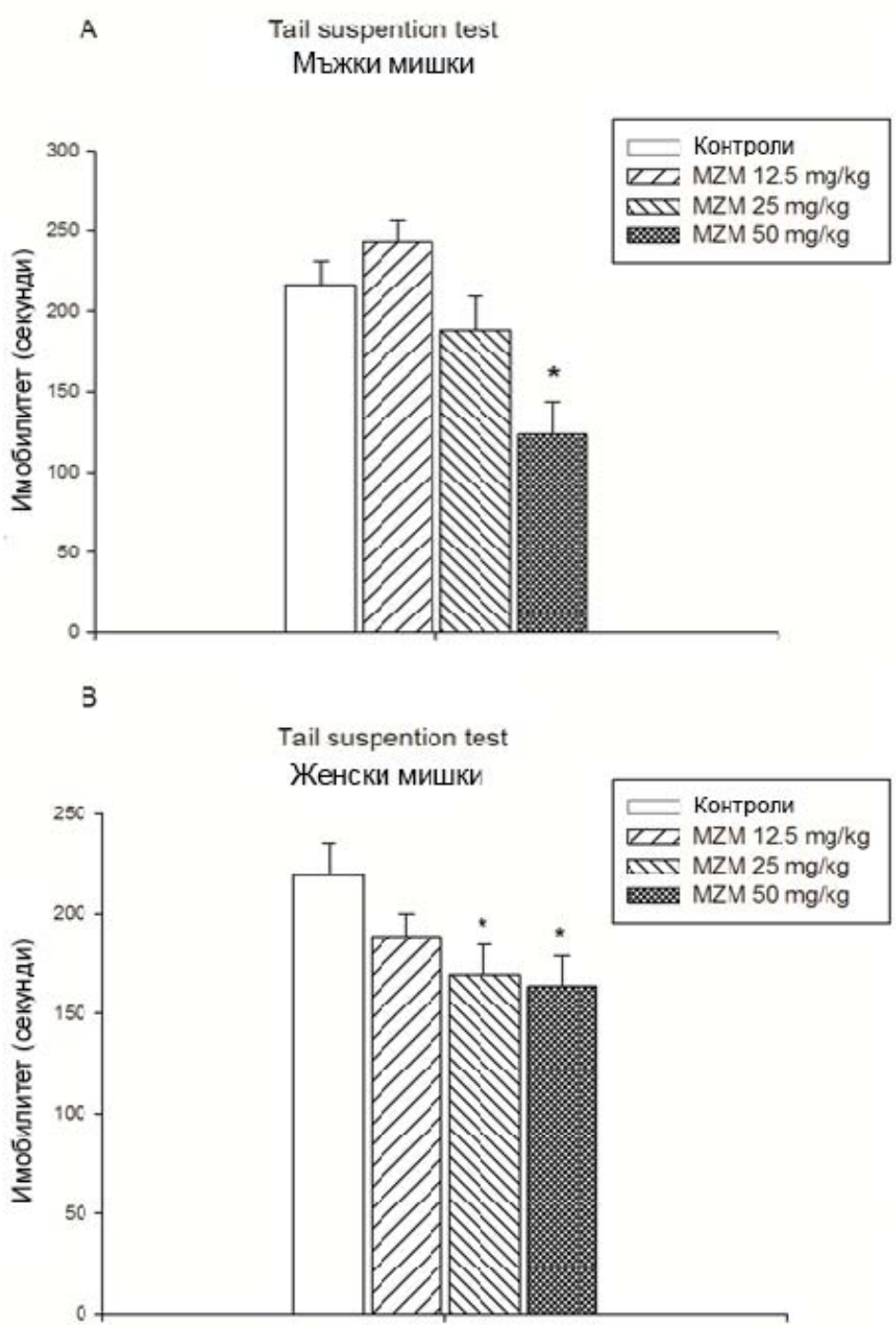
*Фиг. 26 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху болковата чувствителност (Paw Pressure Test) при млади мъжки плъхове Wistar. *p<0,05 спрямо нетретираните контроли, # p< 0,05 спрямо подложените на социален стрес, третирани с физиологичен разтвор.*

3. Определяне на минимална ефективна доза на мезембриновата фракция

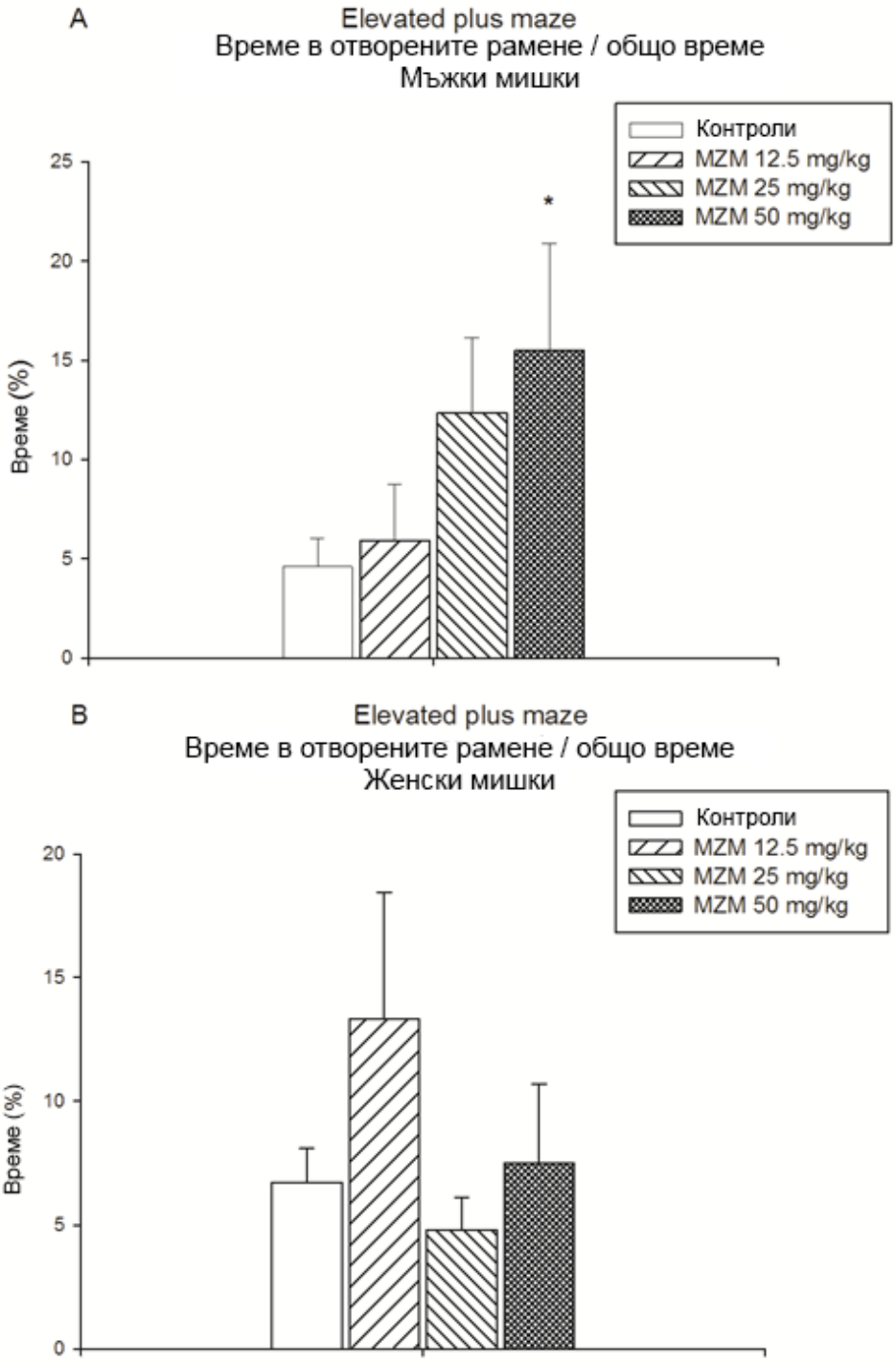
3.1. Данни за анксиолитичния и антидепресантен ефект на еднократни дози мезембринова фракция алкалоиди у мишки.

Мезембриновата фракция от алкалоиди, изолирани от *Narcissus cv. Hawera* упражнява доза-зависим и полово-зависим стимулиращ, анксиолитичен и антидепресивен ефект. Антидепресивно-подобното поведение беше изразено при по-ниска доза (25 мг/кг, F 1, 14 = 5.053, p = 0.043; 50 мг/кг, F 1, 14 = 6.233, p = 0.027) у женските мишки, докато при мъжките ефективната доза беше 50 мг/кг (F 1, 12 = 14.257, p =0.003) (Фиг.27 А и В).

При изследване на поведението на безпокойство в непозната и аверсивна среда установихме, че само най-високата използвана доза MZM оказва анксиолитичен ефект у мъжки здрави контролни животни (H = 5.513,P = 0.019) (Фиг. 28А и В).

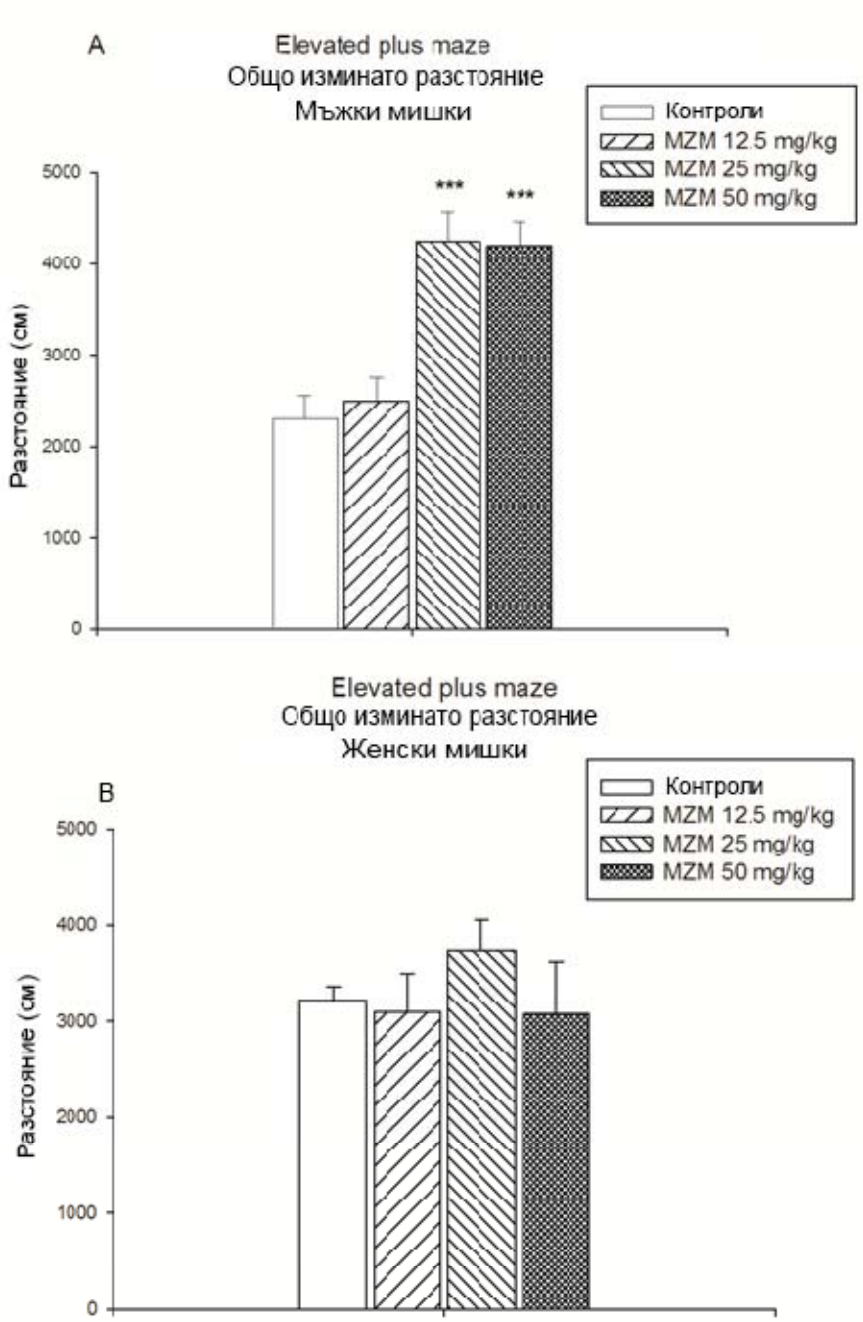


*Фиг. 27 Влияние на еднократни дози мезембринова фракция алкалоиди върху депресивно-подобното поведение (immobility time), изследвано с "Tail suspention test" у мъжки (A) и женски (B) мишки. N=8, * p<0.05 спрямо контролите.*



*Фиг. 28 Влияние на еднократни дози мезембринова фракция алкалоиди върху поведението на безпокойство (процент на времето прекарано в аверсивните отворени рамене), изследвано с "Elevated plus maze test" у мъжки (A) и женски (B) мишки. N=8, * $p<0.05$ спрямо контролите.*

3.2. Данни за влияние на еднократни дози мезембринова фракция алкалоиди върху общата хоризонтална двигателна активност у мишки.



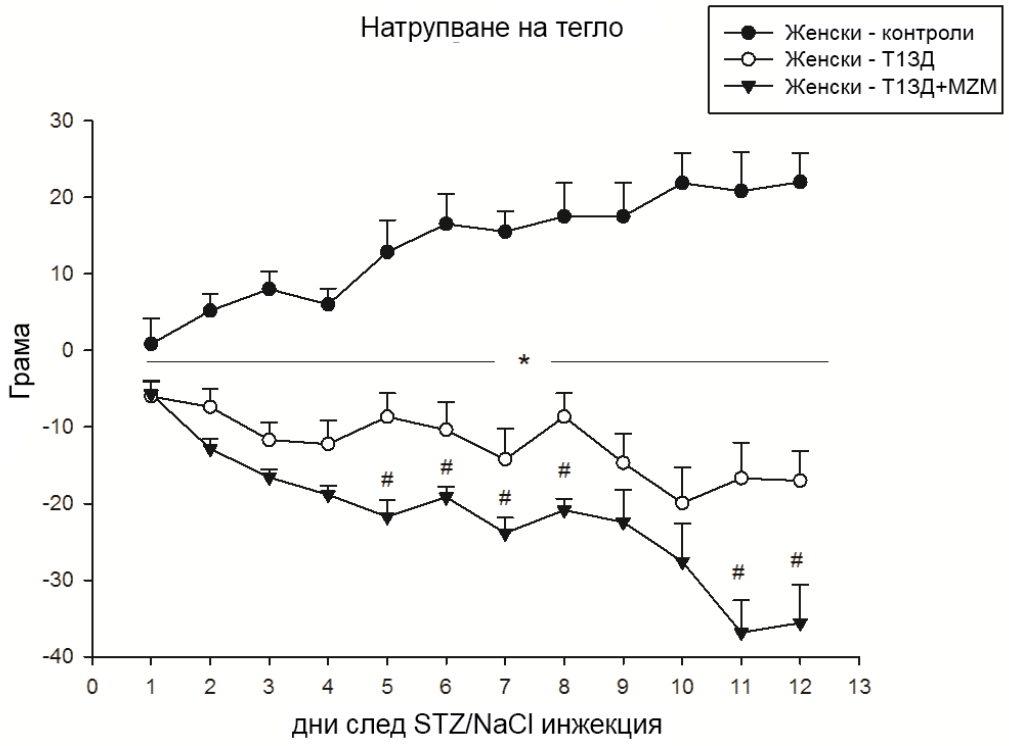
*Фиг. 29 Влияние на еднократни дози мезембринова фракция алкалоиди върху общата хоризонтална двигателна активност (дължина на изминатата траектория), изследвана с "Elevated plus maze test" у мъжки (А) и женски (В) мишки. N=8, * $p<0.05$ спрямо контролите.*

Еднократно инжектираните дози 25 и 50 мг/кг телесна маса MZM предизвика значително повишаване на общата двигателна активност у мъжки мишки (F 1, 17 = 22.781, p<0.001; F 1, 1 = 27.032, p<0.001), но не оказа значим ефект у женските животни (Фиг. 29 А и В)

4. Данни от експериментален модел на Т1ЗД при плъхове.

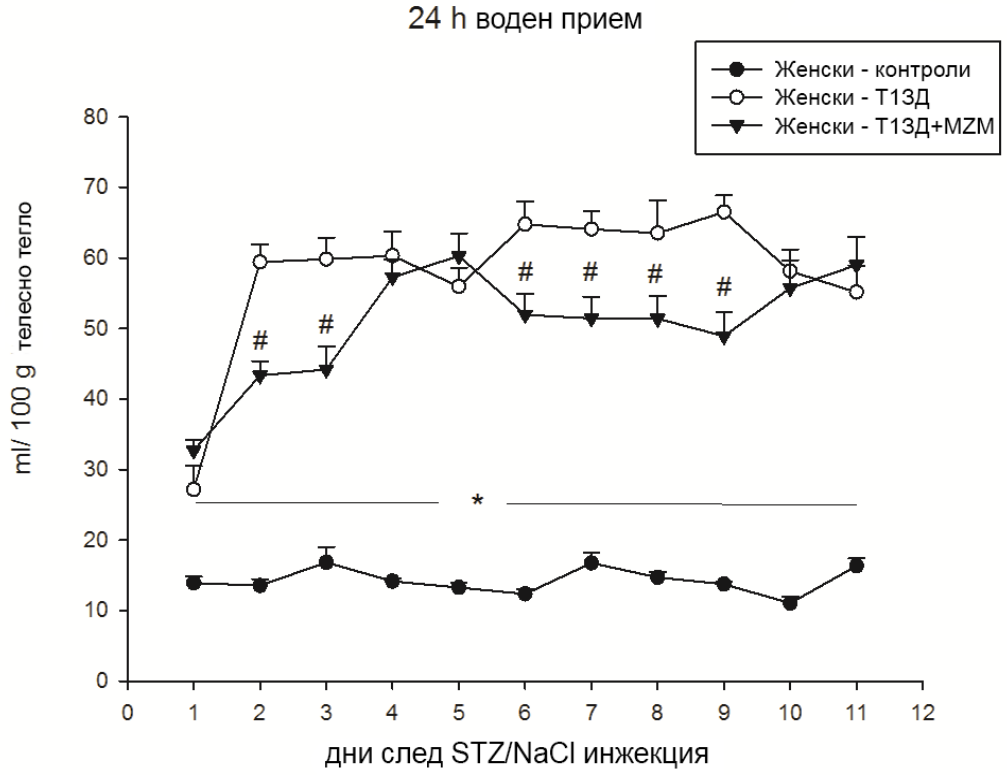
4.1. Телесната маса, денонощния прием на храна и вода и екскрецията на урина.

Експерименталният модел на захарен диабет предизвика драстично понижаване в наддаването на телесна маса през целия период на наблюдение (F 1, 167 = 166.199,* p<0.001, Фиг. 30). Третирането с MZM достоверно засили диабет-индуцираното намаляване на телесната маса след пети ден от прилагането на стрептозотоцина (F 1, 200 = 38.564, # p<0.001).



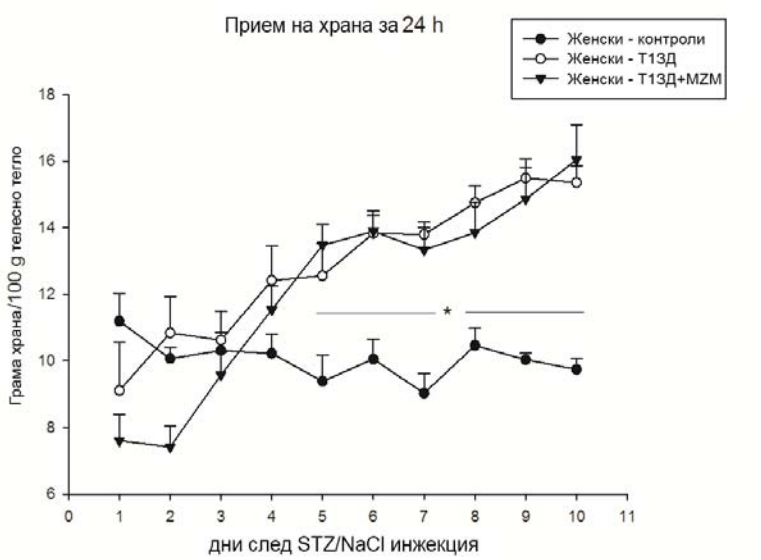
*Фиг. 30 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху телесната маса на женски плъхове. N=8, * p<0.05 спрямо здравите контроли, # p<0.05 спрямо диабетните плъхове, инжектирани с физиологичен разтвор.*

Експерименталният модел на захарен диабет тип 1 предизвика значителна полидипсия, която се проявява още на втория ден след инжектиране на STZ (F 1, 212 = 1226.467, p<0.001). Хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди доведе до значително намаляване на денонощния прием на вода (F 1,215 = 41.535, p<0.001) (фиг. 31).



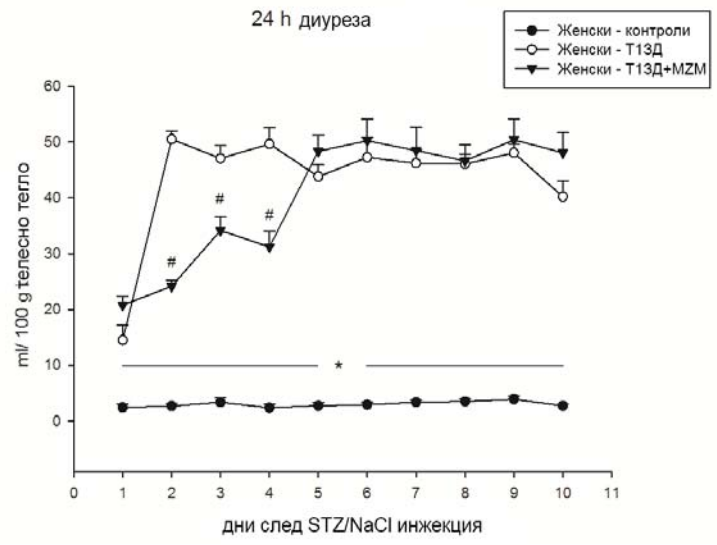
*Фиг. 31 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху денонощния прием на вода на женски плъхове. N=8, * p<0.05 спрямо здравите контроли, # p<0.05 спрямо диабетните плъхове, инжектирани с физиологичен разтвор.*

След четвъртия ден от прилагането на STZ беше отчетено значително нарастване в приема на храна у диабетните плъхове (F 1, 109 = 63.223, p<0.001), но третирането с MZM не промени съществено диабет-индуцираната хиперфагия (F 1, 119 = 3.736, p = 0.056) (фиг. 32).



*Фиг. 32 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху денонощния прием на храна у женски плъхове. N=8, * p<0.05 спрямо здравите контроли.*

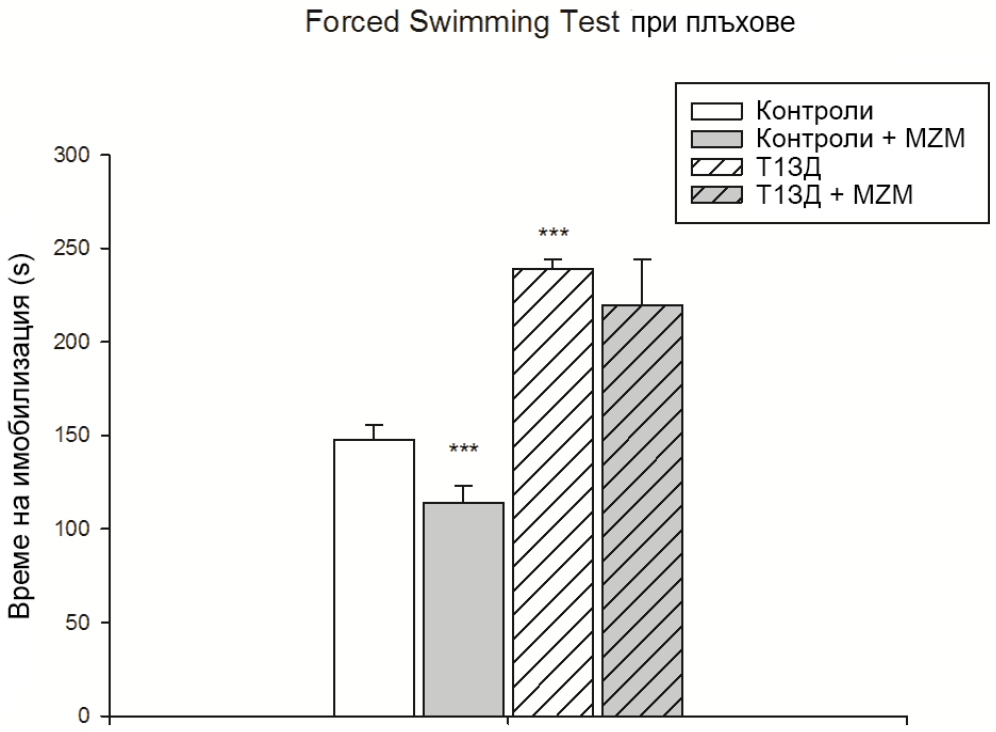
Експерименталният модел на диабет се характеризира със значителна полиурия 24 часа след инжектиране на токсина (F 1, 188 = 1577.343, p<0.001). Третирането с мезембринова фракция алкалоиди понижава диурезата от втория до четвъртия ден след прилагане на токсина (F 1, 174 = 7.661, p = 0.006) (фиг. 33).



*Фиг. 33 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху денонощната екскреция на урина у женски плъхове. N=8, * p<0.05 спрямо здравите контроли; # p<0.05 спрямо диабетните плъхове, инжектирани с физиологичен разтвор.*

4.2. Данни за депресивното поведение у диабетни женски плъхове от порода Wistar.

Хроничното третиране на здравите контроли с алкалоидната фракция достоверно понижи депресивно-подобното поведение (F 1, 15 = 7.291,p =0.017). Експерименталният захарен диабет предизвика депресивно поведение (F 1,18 = 95.357, p <0.001), което не беше повлияно от третирането с алкалоидната фракция (Фиг.34).

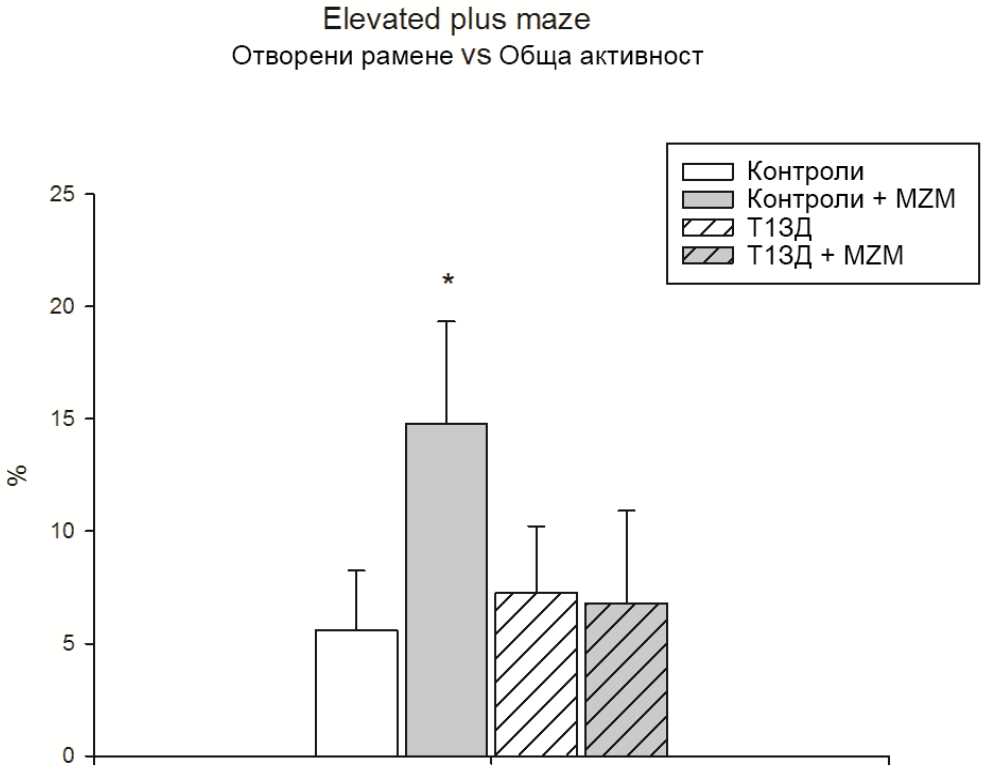


*Фиг. 34 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху поведението на безпокойство (immobility time) у женски плъхове. N=8, * p<0.05 спрямо здравите контроли.*

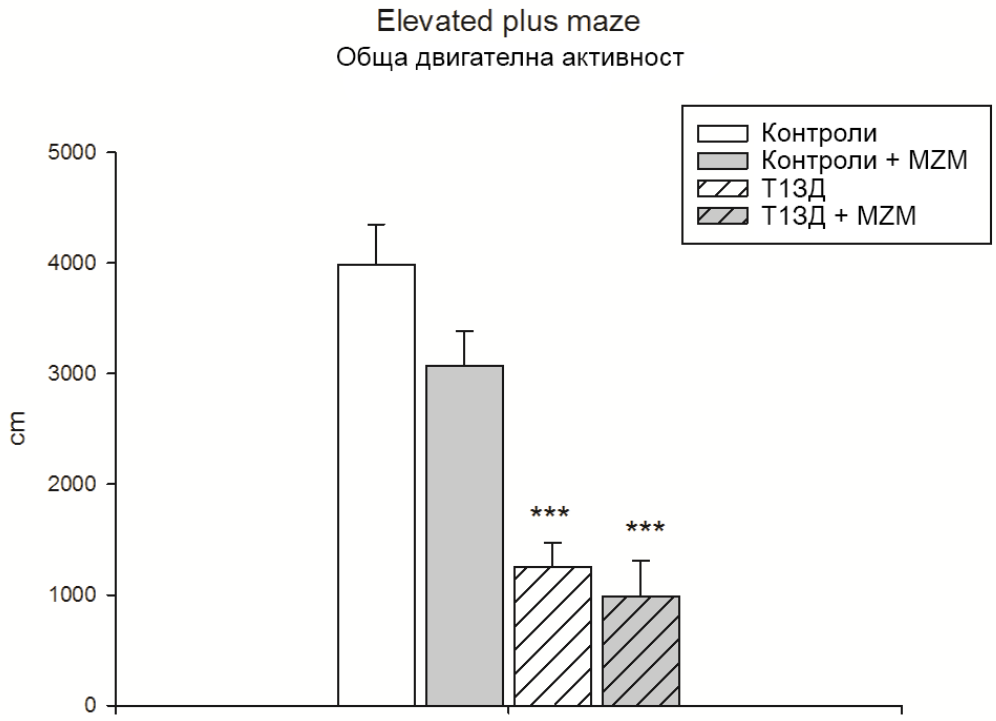
4.3. Данни за поведението на безпокойство у диабетни женски плъхове от порода Wistar.

Хроничното третиране с фракция мезембринови алкалоиди повиши достоверно траекторията, измината в аверсивните отворени рамене на лабиринта, в

сравнение със затворените (H = 4.725, P = 0.030) само у здравите животни, но не показа ефект върху плъховете с Т1ЗД (фиг.35). Анксиолитичният ефект на фракцията у здравите животни не е свързано с повишена обща двигателна активност, но Т1ЗД понижава значително двигателната активност (F 1, 19 = 41.385, p<0.001) и третирането с MZM не повлиява диабет-индуцираната хипоактивност (фиг. 36).



*Фиг. 35 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху поведението на безпокойство (процентно съотношение на траекторията, измината в отворените рамене, спрямо общата измината траектория) при тест „повдигнат кръстосан лабиринт“ у женски плъхове. N=8, * p<0.05 спрямо здравите контроли.*

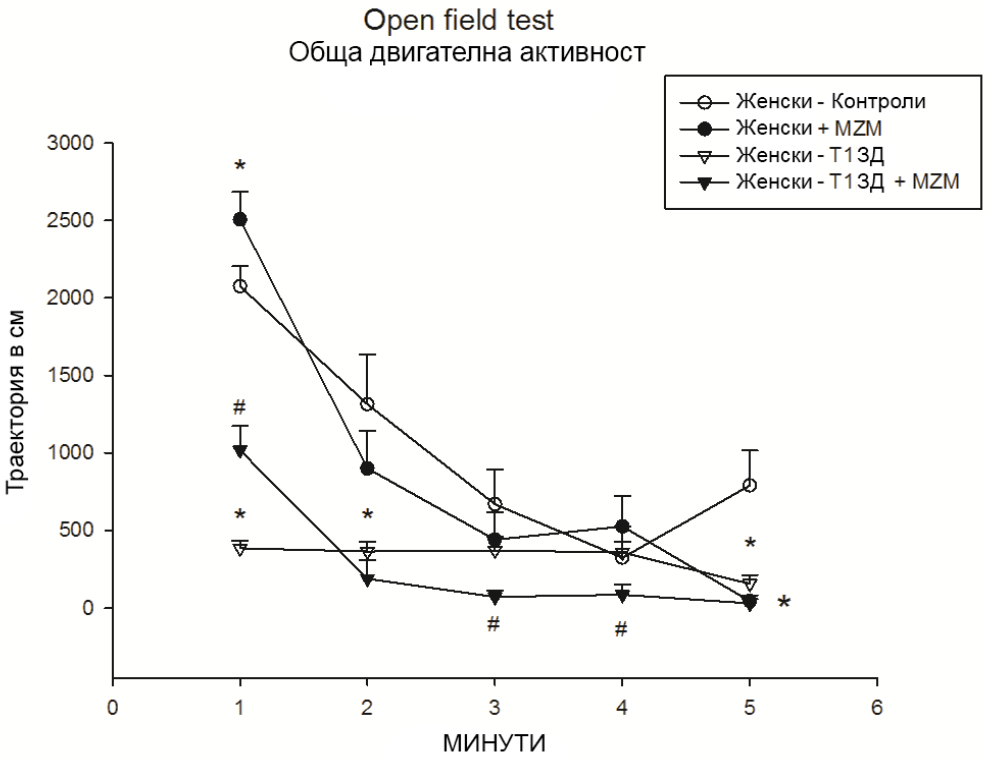


*Фиг. 36 Влияние на експериментален модел на захарен диабет и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху общата двигателна активност (дължина на изминатата траектория в лабиринта) при тест „повдигнат кръстосан лабиринт“ у женски плъхове. N=8, *** p<0.001 спрямо здравите контроли.*

4.4. Данни за общата двигателна активност и хабитуация към непозната околна среда у контролни и диабетни женски плъхове от порода Wistar.

Хабитуацията към непозната среда се приема за най-проста форма на обучение, която включва намаляване на отговора към стимул, който няма биологично значение за субекта. Развитието на експериментален захарен диабет беше съпроводено със значително намаляване на общата двигателна активност (фактор Т1ЗД, F 1, 75 = 31.859, p<0.001) и хабитуация към непозната (отворено поле) среда. Характерната хабитуация у здравите контроли се изразява с повишено изследователско поведение в началото на теста и постепенно намаляване на двигателната активност към четвъртата минута (фактор време, F1, 36 = 14.419, p<0.001). При плъховете с Т1ЗД отчетохме нарушена хабитуация през първите четири минути и затихване само в пета минута след началото на теста (фактор време, F1, 24 = 6.866, p<0.001). Хроничното третиране с фракция мезембринови алкалоиди не промени значително двигателната активност на

здравите плъхове, но подобри тяхната хабитуация в непозната среда (F1, 80 = 27.908, p<0.001) (Фиг.37).



*Фиг. 37 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху общата двигателна активност и хабитуация (дължина на изминатата траектория за всяка минута) при тест „отворено поле“ у женски плъхове. N=8, * p<0.001 спрямо здравите контроли; # p<0.05 спрямо диабетните плъхове, инжектирани с физиологичен разтвор.*

Резултатите от проведените изследвания за установяване на анхедония чрез „с тест за предпочитание към сладки разтвори“ показаха, че този тест не е подходящ за животни с развит захарен диабет. Количеството на приетия захарен разтвор значително надхвърли контролните стойности (данните не са показани), което може да се дължи на активираните от тъканния глюкозен дефицит хомеостатични механизми, а не на хедоничен ефект на модела.

VI. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ:

1. Промени в общата двигателна активност, изследователско поведение и тревожно поведение в непозната среда.

1.1 Влияние на острия и хроничен имобилизационен стрес (RS) и третирането с MZM при млади мъжки плъхове Wistar.

От проведените експерименти се установи, че при OFT, острият RS не води до промени на общата локомоторна активност, но понижава изследователското поведение, т.е. острият стрес засилва поведението на безпокойство, което е в съответствие с предишни доклади (Sulakhiya et al., 2016; Budni et al., 2013). Еднократната доза 20мг/кг т.м. MZM нормализира вертикалното изследователско поведение и предизвика изразен анксиолитичен ефект.

Хроничният RS повишава значително общата хоризонтална двигателна активност. Също така се наблюдава повишено рисково поведение, демонстрирано от увеличен брой на повторните влизания в централната зона на апарата. Това потвърждава предишни доклади, че хроничният умерен стрес води до намален брой на пресичанията на мрежата, както и удължава времето, прекарано в централната зона (Fan et al., 2011). Masood et al. (2003) са показали, че RS намалява амбулацията и изправянето на задни лапи при плъхове в OFT. Авторите предполагат, че наблюдаваните промени са свързани с микроструктурни промени, дължащи се на повишаване на експресията на индуцируем азотен оксид (NO) синтаза в мозъка, които, както е съобщено, играят роля в процеса на стрес-индуцирана невродегенерация (Fan et al., 2011). Хроничното претретиране с фракцията преди RS премахва напълно стрес-индуцираната хиперактивност и повишеното рисково поведение у стресираните животни.

При теста за изследване на поведението на безпокойство (Elevated plus maze) не беше отчетено съществено влияние както на острия и хроничен стрес, така и на еднократната доза преди острия стрес, върху съотношението на изминатата в аверсивните отворени рамене траектория спрямо общата измината траектория. Хроничното третиране преди прилагане на хроничен стрес обаче повиши значително процента на изминатото разстояние в отворените рамене.

Друг параметър, който отразява поведението на безпокойство, е съотношението на времето, прекарано в отворените рамене спрямо общото време на теста. Този показател беше достоверно повишен и при двете схеми на стресиране: остър и стрес. Еднократна доза MZM премахна анксиолитичния ефект на стреса, докато хроничното претретиране с фракцията доведе до достоверно повишаване на времето в отворените рамене.

Получените оригинални данни от проведеното изследване показват, че MZM демонстрира стабилно повлияване на предизвиканата от имобилизационния стрес промяна в двигателната и изследователска активност - ефект, с резултати, много близки до тези, които се докладват при приложение на диазепам, и съответно силно подсказващи анти-стресовия/адаптогенен профил на MZM.

1.2 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху изследователското поведение в непозната среда (Open Field Test).

При животните подложени на социален стрес се наблюдава достоверно понижаване на общата двигателна активност и времето на престой в отворените рамене на лабиринта, което е показател за повишено поведение на безпокойство сравнено с контролите. Това говори за липсата на привикване към този тип реакции на стрес, което може да се дължи на специфичните характеристики на социалния стрес. По-специално, този стресор има две свойства, които могат да обяснят липсата на привикване: стабилността на индуцираната физиологична реакция на стрес и лошото ниво на контрол, което животното може да упражнява върху него. Както бе споменато по-горе, такива силни стресови събития предизвикват силни автономни/невроендокринни реакции. Както посочват някои автори, скоростта на адаптация на физиологичната стресова система към определен стресор е обратно пропорционална на интензивността на стимула [Pitman et al., 1990]. Има данни, че интензитетът на стресовия отговор е обратно пропорционален на степента на контрол и адаптация, с която организма може да противодейства на стресора. [Weiss, 1972; Vogel & Jensh 1985]. В конкретния случай, епизодът на периодично подчинение, възникващ всеки път на непозната територия на агресивния противник, не позволява на експерименталното животно да прогнозира и контролира резултата от агонистичното взаимодействие

и това води до развитието на неблагоприятни поведенчески нарушения. Третирането с алкалоидната фракция понижи анксиогенния ефект на стреса, което потвърждава предполагаемите фармакологични свойства на MZM.

1.3 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху поведението на безпокойство (Elevated Plus Maze Test).

При изследването на ефектите на хроничният социален стрес върху ювенилни плъхове беше направена оценка на техните реакциите към анксиогенната среда при Elevated-plus maze test. Установи се, че стресираните животни прекарват значително по-малко време в отворените рамена и прекарват повече време в затворени рамена на лабиринта, в сравнение с контролите - класически анксиогенно-подобен отговор. Едновременното възникване на психиатрични заболявания като тежка депресия и генерализирано тревожно разстройство е много често при деца и юноши (Axelson & Birmaher, 2001). Следователно, в новото пето издание на диагностично-статистическия наръчник на психичните разстройства е включена класификация „тревожна депресия“ (DSM-5; Das-Munshi et al., 2008). Поради тази причина, когато се оценяват предизвиканите от стреса промени на настроението на предклинично ниво, обикновено се прилагат и тестовете за оценка на тревожността, в допълнение към тези за депресивно поведение (Beuke et al., 2003). Това тревожно поведение при подрастващи плъхове имитира това на възрастни гризачи, подложени на социално поражение (Berton et al., 2006) - подчертавайки, че стресът от социално поражение повлиява чувствителността към непозната, анксиогенна среда при подрастващи плъхове по начин, подобен на този при възрастните (Warren et al.,2013). Третирането с алкалоидната фракция понижи анксиогенния ефект на стреса, което потвърждава описаните по-горе доклади за анксиолитичното действие на мезембриновите алкалоиди.

2. Промени в болковата чувствителност при тест “Paw pressure”.

2.1 Влияние на имобилизационен стрес и третирането с MZM върху болковия праг.

В това изследване се установи, че при животни, подложени на остър имобилизационен стрес, се наблюдава повишен болков праг в сравнение с контролите и тези, подложени на хроничен стрес, което в съответствие с предишни литературни данни [Calcagnetti & Holtzmann, 1990; Gamaro et al., 1998; Lewis et al., 1980, 1981], До определена степен това се дължи на факта, че индуцираните от острия стрес промени губят своя ефект при животните, подложени на хроничен, заради адаптацията им към дразнещия фактор. Интересно наблюдение беше, че тази аналгезия се потенцира при едновременно приложение на MZM. Това предполага стимулиращо действие на MZM върху системата Nucleus arcuatus – Proopiomelanocortin (POMC) и вече докладваните им ефекти върху опиоидните рецептори. Точните механизми на ефекта са все още недоизяснени. Както опиоидни, така и неопиоидни медиирани механизми са били описани да стоят в основата на SIA [Calcagnetti&Holtzmann, 1990; Lewis et al., 1981]. Като резултат от проведените експерименти се установи, че богатата на мезембрин фракция показа трайно анксиолитично и антиноцицептивно действие върху плъховете, подложени на хроничен физически стрес.

2.2 Влияние на хроничния социален стрес и третирането с MZM върху болковия праг.

При животните, подложени на хроничен социален стрес (SS) и третирани с физиологичен разтвор, не се наблюдаваха значими отклонения на болковия праг от нормата. Важно е обаче да се отбележи, че при третираните с фракция на MZM плъхове се демонстрира понижен праг на фазовата болка. Това се наблюдава както при контролни животни, така и при тези, подложени на SS. Този резултат насочва нашето внимание към промените в ендогенните антиноцицептивни механизми, особено към опиоидергичната система, поради докладвано инхибиращо действие на мезембриновите алкалоиди върху опиоидните рецептори [Harvey et al., 2011]. Това, което вече е ясно, е че както при NE и 5-HT медиация, така и при опиоидергичните неврони е прекалено опростено да се мисли, че тяхната модулация води само до еднопосочни отговори [Millan, 2002].

Вероятно се касае за форма на „стрес-индуцирана хипералгезия“ (SIH) чрез улесняване на болковата трансмисия, каквато често се наблюдава след продължително или повтарящо се излагане на стресиращо въздействие [Ferdousi & Finn, 2018]. В литературата има данни, че при инхибиция на опиоидните рецептори се забелязва потенциация на SIH при paw-pressure test [Pilcher & Browne, 1983].

Поразителната разлика между ефектите на различните стресови модалности върху болковата перцепция предполага, че има все още недоизяснени механизми, които я регулират под действието на различни стимули. Това предположение се подкрепя от установените разнопосочни ефекти на MZM върху болковия праг при restrain stress и социален стрес, но все още предстои да се установи каква е ролята на опиодната и серотонинергичната системи в тези механизми.

3. Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху работната памет, изследвана с тест Novel Object Recognition test (NORT).

Настоящото проучване показва, че при хроничния социален стрес животинските модели на депресия могат да демонстрират когнитивни дефицити, които са независими от нарушенията на хипокампалната функция, в частност – пространствената памет. Доколкото ни е известно, много малко изследвания на когнитивни дефицити, свързани с депресия, са използвали NORT парадигма за оценка [Li et al., 2008; Orsetti et al., 2007; Wu et al., 2016; Femenia et al., 2015]. Почти всички от тези проучвания включват хроничен умерен стрес, който може да доведе до тревожност, предизвикана от новости [Dulawa & Hen, 2005; Zhu et al., 2014]. При по-голямата част от изследванията на когницията с модели на депресията се използват тестове за пространствена памет, като водния лабиринт на Морис и Y-maze [Henningsen et al., 2009; Bessa et al., 2009; Goeldner et al., 2013]. Както вече беше споменато, част от когнитивните дефицити при депресията се асоциират с намалена хипокампална неврогенеза и намалена активност на BDNF. Следователно много от изследванията, свързани с депресията, се фокусират върху пространствената памет, доколкото тя зависи от хипокампуса [Tronel et al., 2015; Moodley et al., 2015; Kaidah et al., 2016; Lee et al., 2016; Rossato et al., 2015]. Тези дефицити обаче обхващат само частично спектъра на когнитивните нарушения, наблюдавани при пациенти с депресия [Hammar & Ardal, 2009; Marazziti et al., 2010; Gonda et al., 2015; Goeldner et al., 2013]. Това навежда на

мисълта да се използва разпознаването на нови обекти (NORT) като тест, защото този процес не разчита изцяло на хипокампуса [Oliveira et al., 2010; Cohen & Stackman, 2015; Dere et al., 2007; Barker et al., 2007]. Все пак има и данни, че хипокампусът играе роля при припомнянето на предмети чрез асоциирането им с тяхното обкръжение [Aggleton&Brown, 1999; Eichenbaum et al., 2007; Montaldi&Mayes, 2010; Rugg&Yonelinas, 2003].

В същото време чрез NORT се прави оценка на изследването на нови, непознати обекти, което е част от придобиването на нови спомени посредством имплицитната памет. Наличните в дълготрайната памет спомени за свойствата на обектите може да се активират отново в буфера на работната памет и да се сравнят със свойствата на нови, непознати обекти, за да се формират нови спомени за два различни обекта. Работната памет използва основни мозъчни структури, разположени главно в префронталната кора и хипокампуса, което прави изследването на този вид памет ключово за установяване на увреждания, свързани с придобиването, обработката и съхраняването на информация.

Нарушенията в NORT могат да произтичат от два когнитивни процеса, които не се разграничават лесно. Първо, споменът за познатия обект трябва да остане стабилен и достъпен [Cohen & Stackman, 2015; Dere et al., 2007; Morici et al., 2015]. Второ, новият обектен стимул трябва да бъде успешно дискриминиран от познатия обектен стимул [Antunes & Biala, 2012; Dere et al., 2007;]. Има данни, че новостите носят определена стойност на награда за гризачите [Antunes & Biala, 2012; Dere et al., 2007; Ennaucer et al., 2009]. Поради тази причина подозирахме, че плъховете, които показват депресивно поведение, могат да проявят намален интерес към нови обекти, което би довело до по-малко изследване на обекти, както се вижда в друго проучване [Femenia et al., 2015]. Това намаляване на изследването на обекти би създало по-слабо придобиване на обектни спомени, като по този начин ще доведе до нарушения при NORT. Това намаляване на изследването на обекти обаче не се наблюдава. Вместо това животните, които проявяват депресивни характеристики, изследват както познатите, така и новите обекти в размер, равен на нивото на изследване на нови обекти на контролните животни. Това предполага, че животните, които са показали депресивно поведение, не са намерили новостите по-малко привлекателни от контролните животни и не са имали дефицити в общото изследване на обекти, което би

нарушило паметта на обекта. След като се изключат тези две възможности, останалите обяснения за нарушеното разпознаване са, че животните, които са проявявали депресивни характеристики, са имали проблеми с консолидирането на спомени или дискриминиращите стимули. При третираните с мезембрин животни се наблюдава значително подобрение на работната памет, която достигна до нива, съпоставими с тези на контролите. Изследването на неврофизиологичната основа на тези нарушения може да се окаже полезно при търсене на нови подходи за лечението на депресия.

4. Ефекти върху масата на слезката и надбъбречната жлеза, както и на нивото на глюкозата в кръвта.

При наблюдаваните опитни животни се установи, че острият стрес доведе до покачване на глюкозните нива, а хроничният не доведе до значима разлика. Това потвърждава литературните данни, че острият имобилизационен стрес води до повишени нива на глюкоза в плазмата и кортикостерон по време на интервенцията (van de Kar & Blair, 1999), докато концентрацията на плазмен инсулин се увеличава в началото на интервенцията и се връща към нормалната си стойност в нейния край (Yamada et al., 1993). От друга страна, отговорът към хроничния стрес е напълно различен от този на остър краткосрочен стрес, както беше споменато по-горе. В това отношение, хроничното излагане на имобилизация, разклащане и имобилизация плюс разклащане в продължение на 6 часа води до значително намаляване на предизвиканото от стреса повишаване на нивото на кортикостерон в плазмата (Dhabhar & McEwen, 1997). Нещо повече, хроничното потапяне във вода причинява по-малко повишаване на плазмените нива на норадреналин, адреналин, кортикостерон и глюкоза при плъховете, в сравнение с излагането на остър стрес (de Boer et al., 1990). Хроничното излагане на шум не причинява промени в серумните нива на инсулин, глюкоза (Armario et al., 1985), а също и на базално ниво на кортикостерон в плазмата (Armario et al., 1984). В допълнение, многократното обездвижване повишава плазмения кортикостерон, намалява плазмения инсулин и няма ефект върху плазмените концентрации на глюкоза (Makino et al., 1999). В някои други проучвания, острото излагане на обездвижване (Ricart-Jane et al., 2002; Rai et al., 2003) повишава плазмените концентрации на глюкоза и инсулин. Тъй като стресът

може да увеличи плазмените нива на катехоламини, (освен нивата на кортикостерон), и секрецията на катехоламините е част от реакцията „борба или бягство“, която стимулира гликогенолизата и увеличава базалния метаболизъм и производството на глюкоза и инсулин (Teague et al., 2007), различните наблюдавани резултати могат да отразяват различни отговори на прага на нивото на стрес, диференцирани нива на производство на глюкоза и инсулин или други вътрешни метаболитни разлики между животните, използвани в различните проучвания. Чрез увеличаване на дните на излагане на стрес, реакцията на катехоламини може да бъде адаптирана и следователно може да доведе до значително намаляване на нивото на глюкозата в плазмата, както е показано от de Boer et al.(1990).

Хроничното подлагане на физически стрес в продължение на 28 дни не оказа съществено въздействие върху общото състояние и телесната маса, но доведе до намаляване на масата на слезката, свързано с повишена активност по време на физически стрес. Както беше споменато, малко проучвания са изследвали ефектите на хроничните стресови фактори върху лимфоидните органи и имунния отговор [Domínguez-Gerpe & Rey-Méndez, 2001; Bobyntsev et al., 2007; Bobyntsev et al., 2005]. Например, свръхекспресиращата CRH трансгенна мишка има високи нива на кортикостерон, което води до значителни промени в популациите на левкоцити и нарушено образуване на герминативни центрове в бялата пулпа на далака [Dirks et al., 2002]. Хроничното и екзогенно лечение с глюкокортикоиди има същия ефект върху имунния отговор при плъхове [Pruett et al., 2007]. По подобен начин, продължителното приложение на синтетични глюкокортикоиди причинява имуносупресия, увеличавайки риска от инфекция [Aucott, 1994].

При модел на имобилизационен стрес при мишки е установено, че съотношението CD4/CD8 намалява и се повишава процентът на естествените клетки-убийци, моноцитите и полиморфонуклеарните супресорни клетки. Демонстрирано е, че именно активирането на оста на хипоталамус-хипофиза-надбъбречна жлеза (HPA) и симпатиковата нервна система (SNS) допринася за промяната в разпределението на левкоцитите в кръвта. Спленектомията обаче обръща промяната на съотношението CD4/CD8, предизвикано от стрес [Jiang et al., 2017]. В литературата също така има публикувани данни, че

имобилизационният стрес може да доведе до инволюция на далака [Qiu et al., 1999], като точният механизъм не е изяснен, но вероятно се касае за ефект, осъществяван отново с участието на кортикостероновите рецептори на лимфоцитните прекурсори. При експериментални модели in vitro и in vivo е демонстрирано, че високите нива на кортикостерон, асоциирани със стресови състояния, водят до подтискане на пролиферацията на Т-клетките на далака [Sterzer et al., 2004]. При WKY плъховете, третирани с хидрокортизон или подложение на имобилизационен стрес+хидрокортизон, се наблюдават значителни промени във функционалната анатомия на далака, проявяващи се с хиперплазия на червена пулпа и атрофия на бялата пулпа. Авторите спекулират, че така наблюдаваното явление може да се отдаде на хипосенсибилизация на глюкокортикоидните рецептори в Т и В клетките, поради продължителното им надправого излагане на повишени нива на кортикостерон in vivo, а това може да доведе до нарушена клетъчна пролиферация [Sterzer et al., 2004].

5. Влияние на хроничния социален стрес и третирането с MZM върху нивото на увредените, карбонилирани протеини в изолиран хипокампус и кръвна плазма.

При изследване нивата на карбонилирани протеини при плъхове, подложени на хроничен социален стрес, се установи значителното им повишване в хипокампуса и плазмата. Атенуиращият ефект на MZM върху нивата в хипокампуса вероятно се дължат на антиоксидантните и противовъзпалителни свойства на екстракта (Bennett et al., 2018). Няколко проучвания, проведени през последните години, показват намаляване невронната клетъчна смърт, предизвикана от оксидативен стрес, от добавки на фенолни антиоксиданти (Youdim&Joseph, 2001; Ishige et al., 2001). Докато директен защитен ефект не може да се отхвърли, ефектът на MZM също може да бъде приписан на намаляването на свободните радикали и подобряване на антиоксидантна активност в хипокампа, което потенциално може да доведе до намаляване на липидната пероксидация и образуването на карбонилни протеин в хипокампуса и мозъчната кора. Тази антиоксидантна защита на хипокампа и кората би довела и до подобряване на представянето в моторните и паметови задачи.

Карбонилирането на протеините представлява оксидативна модификация, която за разлика от формирането на цистеинови дисулфидни мостове е

необратима и трудна за индуциране (Dalle-Donne et al., 2003). Съществуват хипотези, че то може да играе и роля при междуклетъчна сигнализация поради потенциална, но все още недоказана обратимост в определени тъкани (Wong et al., 2012). Много изследвания асоциират карбонилирането на протеините с напредването на възрастта и с нарушенията във функциите на множество органни системи (Wu et al., 2016; Feng et al., 2008; Jha&Rizvi, 2011; Rabek&Boylston, 2003). Особен интерес представляват данните, че при остаряващи плъхове хипокампалните нива на тези модифицирани протеини са значимо по-високи от тези в мозъчния кортекс (Anand et al., 2015) и тяхното ниво е по-малко при животните, извършващи физически упражнения. Това се дължи на факта, че хипокампалните неврони са силно уязвими към окислително увреждане по време на стареенето, поради намаляване на капацитета им да поддържат своята редокс хомеостаза (Marosi et al., 2012).

6. Данни за минималната ефективна доза на мезембриновата фракция

6.1. Данни за анксиолитичния и антидепресантен ефект на еднократни дози мезембринова фракция алкалоиди у мишки.

При експериментите, проведени върху женски плъхове от порода Wistar и мишки ICR от двата пола се установи, че алкалоидната фракция, екстрахирана от Narcissus cv. “Hawera” има уникално съотношение на мезембринови алкалоиди, които приложени еднократно в дози 25 и 50 мг/кг имат стимулиращ двигателната активност и инхибиращ депресивно-подобното поведение у контроли от двата пола.

6.2. Данни за влиянието на еднократни дози мезембринова фракция алкалоиди върху общата хоризонтална двигателна активност у мишки.

Хроничното третиране с мезембриновата фракция на женски контроли предизвика подобрена хабитуация към непозната среда, без да промени съществено общата двигателна активност.

7. Данни за влиянието на експериментален модел на Т1ЗД при плъхове и ефекти на хронично третиране с MZM.

При експерименталния модел на Т1ЗД се установи, че хроничното третиране с MZM понижи диабет-индуцираната полидипсия и полиурия. Тези резултати предполагат влияние на MZM фракция върху регулирането на водния

баланс. Непроменените нива на кръвна глюкоза подсказват, че лечението с MZM няма защитен ефект при развитието на експерименталния модел на Т1ЗД. Намаленото телесно тегло при Т1ЗД плъховете, третирани с MZM, може да е резултат от намаления прием на вода, тъй като алкалоидите не влияят на приема на храна при диабетни плъхове. Също така се установи известно подобрение върху хабитуацията към непозната околна среда, без съществен ефект върху диабет-индуцираната депресия и понижаването на двигателната активност.

Тези резултати ни дават основание да считаме, че мезембриновата фракция алкалоиди има благоприятен ефект върху емоционално обусловените форми на поведение при здрави индивиди, но вероятно има механизъм на действие различен от този на диабет-индуцираните усложнения, свързани с хипоактивност и депресивно-подобно поведение.

Експерименталните ни данни показват, че тестът за избор на разтвор на захароза като модел за изследване на депресивно поведение и анхедония не е подходящ за използване в модела на захарен диабет. Предполага се, че метаболитният стимул (нужда от увеличен прием на въглехидрати) има по-голямо физиологично значение, отколкото загубата на интерес към стимулите, които доставят удоволствие.

8. Заключение

Настоящото изследване разширява знанията за влиянието на хроничния социален и физически стрес върху развитието на тревожно-депресивни разстройства и ефектите върху общуването, познавателното поведение и паметта.

Получените данни показват значителни благоприятни ефекти на хроничното третиране с алкалоидна фракция, извлечена от листата на Narcissus cv Hawera, върху неблагоприятните последствия от прилагането на хроничен социален стрес у ювенилни плъхове. Резултатите са важни за характеризиране на фармакологичния профил на получената алкалоидна фракция и потенциалното въвеждане на пречистени компоненти от нея при терапията на разстройства в поведението, предизвикани от социалния стрес.

VII. Изводи

Съпоставката на получените резултати в настоящия труд с данните от детайлно направената литературна справка позволява да се направят следните изводи:

1. Острият имобилизационен стрес понижава изследователското поведение, засилва поведението на безпокойство, повишава болковия праг и покачва нивото на глюкоза в кръвта. Хроничното излагане на имобилизационен стрес предизвиква хиперактивност и анксиолиза.

2. Хроничният социален стрес предизвиква понижаване на двигателната активност, повишено ниво на безпокойство и увреждане на работната памет. Повишава нивата на карбонилираните протеини в хипокампуса и кръвната плазма у млади, незрели експериментални плъхове, без да предизвиква съществени промени в нивата на кортикостерон и тестостерон.

3. Изолираната от листната маса на *Narcissus cv. Hawera* и пречистена фракция представлява уникална композиция от алкалоиди, която има общ стимулиращ, анксиолитичен и антидепресивно- подобен ефект у здрави експериментални животни.

4. Системното третиране с MZM премахва неблагоприятните ефекти както на острия, така и на хроничния имобилизационен стрес върху поведението на безпокойство, изследователското поведение и нивата на кръвната глюкоза. MZM засилва стрес-индуцираната антиноцицепция при еднократно прилагане, но повишава болковата чувствителност след хронично третиране преди стресогена.

5. Системното третиране с MZM предизвика краткотрайно потискане на полиурията и полидипсията, ускоряване на загубата на тегло и подобряване на хабитуацията към непозната среда у плъхове с експериментален ЗД тип 1. Третирането не оказа ефект върху диабет-индуцираните промени в изследователското и депресивното поведение.

6. При младите плъхове, подложени на хроничен социален стрес и третирани с MZM, се наблюдава понижен болков праг и премахване на хиполокомоцията и безпокойството. Третирането с MZM също така понижава значимо нивото на увредения протеин в мозъка, но не оказва влияние върху плазмените му нива.
7. Индуцираният от STZ експериментален модел на ЗД тип1 се характеризира с драстично повишаване на кръвната глюкоза, полиурия, полидипсия, полифагия, загуба на тегло, понижена двигателна активност и хабитуация към непозната среда, депресивно поведение.

VIII. Приноси

1. Анализът на данните от различни експериментални методи и подходи потвърждава увреждащите ефекти на имобилизационен, социален и метаболитен стрес (неконтролиран захарен диабет) върху основни компоненти на когнитивното поведение и паметта.
2. Потвърждава се наблюдението, че модалността и продължителността на действие на стресовите фактори води до различни ефекти върху стрес-индуцираната регулация на болковата перцепция.
3. Проведените експерименти за пръв път представят данни за анксиолитичното и общо стимулиращо действие на системно приложената алкалоидна фракция, извлечена от растението *Narcissus cv. Hawera.*
4. Установена е ролята на богатия на мезембринови алкалоиди извлек от *Narcissus cv. Hawera* като адаптоген, който успешно премахва някои неблагоприятни ефекти на физическия, психическия и метаболитен стрес при подрастващи и зрели експериментални животни.

X. Научна и публикационна активност във връзка с дисертационния труд

1. Публикации по дисертационния труд

1. **D. Bakalov**, R. Tafradjiiska-Hadjiolova, D. Pechlivanova; Pathophysiology of depression and novel sources of phytochemicals for its treatment – a systematic review. Acta Medica Bulgarica 2020; XLVII (4): 69-74. Online ISSN: 0324-1750

SCOPUS

2. S. Berkov, D. Pechlivanova, R. Denev, M. Nikolova, L. Georgieva, B. Sidjimova, **D. Bakalov,** R. Tafradjiiska, A. Stoynev, G. Momekov, J. Bastida. GC-MS analysis of Amaryllidaceae and Scletium-type alkaloids in bioactive fractions from Narcissus cv. Hawera; Rapid Communications in Mass Spectrometry 2021, e9116, Online ISSN: 1097-0231;

(IF=2.200)

3. **Димитър В. Бакалов**, Даниела М. Пехливанова, Зафер А. Сабит, Радка К. Тафраджийска, Милена Т. Николова, Александър Г. Стойнев, Страхил Х. Берков; Ефекти на стреса върху имунната система. Списание „Съвременна медицина“, 2021;

Приета за публикация.

2. Научни съобщения във връзка с дисертационния труд

1. International Congress of Medical Sciences for students and young doctors, 9-12 May 2019, Sofia, Bulgaria. **Anxiolytic Effect Of The Mesembrenone Rich Alkaloid Fraction From Narcissus Cv. "HAWERA" In Rats.** Dimitar Bakalov, Daniela Pechlivanova, Zafer Sabit, Radka Tafradjiiska, Milena Nikolova, Alexander Stoynev, Strahil Berkov.

2. 32nd ECNP Congress, 7-10 September 2019, Copenhagen, Denmark. **Effects of mesembrenone rich alkaloid fraction from narcissus cv. hawera on the anxiety and depression-like behaviour in stressed rats.** Dimitar Bakalov, Daniela Pechlivanova, Zafer Sabit, Radka Tafradjiiska, Milena Nikolova, Alexander Stoynev, Strahil Berkov.

3. FENS 2020 Virtual Forum, 11-15 July 2020. **Ameliorative effects of alkaloid fraction from Narcissus cv. Hawera on the deleterious impact of chronic social defeat stress in adolescent rats.** Dimitar Bakalov, Daniela Pechlivanova, Zafer Sabit, Radka Tafradjiiska, Milena Nikolova, Alexander Stoynev, Strahil Berkov.

XI. Библиография

1. Aggleton JP, Brown MW (1999) Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. Behav Brain Sci 22:425-444; discussion 444-489.
2. Almqvist EG, Groop LC, Manhem PJ: Hypothalamic-pituitary-adrenal response to different tests in type 1 diabetes mellitus. Scand J Clin Lab Invest 2001;61:557–565.
3. Anand S, Rajashekharaiah V, Tekupalli R. Effect of age and physical activity on oxidative stress parameters in experimental rat model. Int J Clin Exp Physiol. 2015; 2:185–90.
4. Antunes M, Biala G (2012) The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. Cogn Process 13: 93–110. 10.1007/s10339-011-0430-z
5. Armario A, Castellanos JM, Balasch J. Chronic noise stress and insulin secretion in male rat. Physiol Behav. 1985;34(3):359–361.
6. Armario A, Lopez-Calderon A, Jolin T, Balasch J. Response of anterior pituitary hormones to chronic stress. The specificity of adaptation. Neurosci Biobehav Rev. 1986;10(3):245–250.
7. Artyushenko, Z.T. 1970. Amaryllidaceae of USSR, morphology, taxonomy and use. Nauka, Leningrad, Russia.
8. Aucott J., “Glucocorticoids and infection,” Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 23, 3, 655–670, 1994.
9. Auphan, N. et al. (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of NF-kB activity through induction of IkB synthesis. Science 270, 286–289
10. Axelson DA, Birmaher B. Relation between anxiety and depressive disorders in childhood and adolescence. Depress Anxiety. 2001;14:67–78.
11. Barker GR, Bird F, Alexander V, Warburton EC (2007) Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. J Neurosci 27: 2948–2957. 10.1523/JNEUROSCI.5289-06.2007
12. Berkov S., Osorio E., Viladomat F., Bastida J. Chapter Two – Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids. The Alkaloids: Chemistry and Biology. 2020; 83: 113-185.

13. Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, et al. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. Science. 2006;311:864–8.

14. Bessa JM, Mesquita AR, Oliveira M, Pego JM, Cerqueira JJ, et al. (2009) A trans-dimensional approach to the behavioral aspects of depression. Front Behav Neurosci 3: 1 10.3389/neuro.08.001.2009

15. Beuke CJ, Fischer R, McDowall J. Anxiety and depression: why and how to measure their separate effects. Clin Psychol Rev. 2003;23:831–48.

16. Birks, J Birks, Jacqueline S. "Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease". The Cochrane Database of Systematic Reviews. 2006; 1: CD005593.

17. Björkholm C, Monteggia LM. BDNF - a key transducer of antidepressant effects. Neuropharmacology. 2016; 102:72–79. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.10.034

18. Blum K, Werner T, Carnes S, Carnes P, Bowirrat A, Giordano J, Oscar-Berman M, Gold M . Sex, drugs, and rock 'n' roll: hypothesizing common mesolimbic activation as a function of reward gene polymorphisms. Journal of Psychoactive Drugs 2012. 44 (1): 38–55. doi:10.1080/02791072.2012.662112.

19. Bobyntsev I., A. A. Dolzhikov, and L. A. Sever'yanova, “Morphological changes in immune and endocrine organs of mice injected with a gonadotropin-releasing hormone analog,” Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 139, 1, 101–104, 2005.

20. Bobyntsev I., A. A. Dolzhikov, and L. A. Sever'yanova, “Morphological changes in immune and endocrine organs of stressed mice after administration of a gonadotropin-releasing hormone analogue,” Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 144, 5, 744–747, 2007.

21. Bodendorf, K., Krieger, W.; Alkaloids of Mesembryanthemum tortuosum. Arch. Pharm. 1957; 290:441.

22. Bowman, R.E., Zrull, M.C., Luine, V.N. Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats. Brain Research. 904 (2), 279-289 (2001).

23. Bremner JD, Randall P, Scott TM, Bronen RA, Seibyl JP, Southwick SM, Delaney RC, McCarthy G, Charney DS, Innis RB. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. Am J Psychiatry. 1995; 152: 973–981.

24. Budni J, Zomkowski AD, Engel D, Santos DB, dos Santos AA, Moretti M, et al. Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. Exp Neurol 2013;240:112-21.

25. Buket Bozkurt, Ahmet Emir, Gulen Irem Kaya, Mustafa Ali Önür, Strahil Berkov, Jaume Bastida, N.U. Somer. Alkaloid Profiling of Galanthus woronowii Losinsk. by GC-MS and evaluation of its biological activity. Marmara Pharmaceutical Journal. 2017; 21 (4):915-920.

26. Bunney WE Jr, Davis JM. Norepinephrine in depressive reactions. A review. Arch Gen Psychiatry. 1965; 13(6):483-94.

27. Calcagnetti D.J., Holtzman S.G., Factors affecting restraint stressinduced potentiation of morphine analgesia, Brain Res. 537 (1990) 157-162

28. Calogero AE, Gallucci WT, Gold PW, Chrousos GP. Multiple feedback regulatory loops upon rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion. Potential clinical implications. J Clin Invest 1988;82:767-774.

29. Cerritelli S, Hirschberg S, Hill R, Balthasar N, Pickering AE (2016) Activation of Brainstem Pro-opiomelanocortin Neurons Produces Opioidergic Analgesia, Bradycardia and Bradypnoea. PLOS ONE 11(4): e0153187

30. Checkley, S. The neuroendocrinology of depression and chronic stress. British Medical Bulletin. 52 (3), 597-617, (1996).

31. Chiba, S. et al. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry. 39 (1), 112-119 (2012).

32. Chockalingam R, Gott BM, Conway CR. Tricyclic Antidepressants and Monoamine Oxidase Inhibitors: Are They Too Old for a New Look? Handbook of Experimental Pharmacology. 2019 ;250:37-48.

33. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. JAMA 1992;267:1244-1252.

34. Chrousos GP. Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The corticotropin-releasing hormone perspective. Endocrinol Metab Clin North Am 1992;21:833-858.

35. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. Nat Rev Endocrinol 2009, 5(7):374-81.

36. Chrousos GP. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. Ann N Y Acad Sci 1998;851:311-335.

37. Cohen SJ, Stackman RW Jr. (2015) Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. Behav Brain Res 285: 105–117. 10.1016/j.bbr.2014.08.002

38. Conrad CD, LeDoux JE, Magarinos AM, McEwen BS. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. Behav Neurosci. 1999; 113: 902–913

39. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A (2006) Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. J Cell Mol Med 10:389–406

40. Das-Munshi J, Goldberg D, Bebbington PE, Bhugra DK, Brugha TS, Dewey ME, Jenkins R, et al. Public health significance of mixed anxiety and depression: beyond current classification. Br J Psychiatry. 2008;192:171–7.

41. de Boer SF, van der Gugten J, Slangen JL. Plasma catecholamine and corticosterone responses to predictable and unpredictable noise stress in rats. Physiol Behav. 1989;45(4):789–795.

42. de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M: Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. Endocr Rev 1998;19:269– 301.

43. de Kloet, E.R., Joels, M., Holsboer, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. Nature Reviews Neuroscience. 6 (6), 463-475 (2005).

44. De Nicola AF, Magariños A, Foglia VG: Bernardo Houssay Lecture: neuroendocrine regulation in experimental diabetes; in Rifkin H, Colwell JA, Taylor SI (eds): Diabetes 1991. Amsterdam, Elsevier, 1991, pp 3–8.

45. Delgado PL. Depression: the case for a monoamine deficiency. J Clin Psychiatry. 2000; 61 S6:7-11.

46. Demyttenaere K, Bruffaerts R, Posada-Villa J, et al. Prevalence, severity, and unmet need for treatment of mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys. JAMA. 2004; 291:2581–2590

47. Denenberg VH. Open-field behavior in the rat: what does it mean. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1969;159:852–859.

48. Dere E, Huston JP, De Souza Silva MA (2007) The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. Neurosci Biobehav Rev 31: 673–704. 10.1016/j.neubiorev.2007.01.005

49. Dhabhar FS (2014) Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. Immunol Res 58:193–210

50. Dhabhar FS, McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. Brain Behav Immun. 1997;11(4):286–306.

51. Diorio, D., Viau, V., Meaney, M.J. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. The Journal of Neuroscience. 13 (9), 3839-3847 (1993).

52. Dirks, L. Groenink, J. A. Bouwknecht et al., "Overexpression of corticotropin-releasing hormone in transgenic mice and chronic stress-like autonomic and physiological alterations," European Journal of Neuroscience, 16, 9, 1751–1760, 2002.

53. Domínguez-Gerpe L. and M. Rey-Méndez, "Alterations induced by chronic stress in lymphocytes subsets of blood and primary and secondary immune organs of mice," BMC Immunology, 2, article 7, 2001.

54. Dorn LD, Chrousos GP. The endocrinology of stress and stress system disorders in adolescence. Endocrinol Metab Clin North Am 1993;22:685-700.

55. Dowdell, K.C. et al. (1999) Neuroendocrine modulation of chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis: a critical role for the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. J. Neuroimmunol. 100, 243–251

56. Drevets WC, Price JL, Simpson JR Jr, Todd RD, Reich T, Vannier M, Raichle ME. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. Nature. 1997; 386:824–827.

57. Dulawa SC, Hen R (2005) Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: the novelty-induced hypophagia test. Neurosci Biobehav Rev 29: 771–783. 10.1016/j.neubiorev.2005.03.017

58. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ. A molecular and cellular theory of depression. Arch. Gen. Psychiatry. 1997; 54(7):597–606.

59. Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. Biol. Psychiatry. 2006; 59(12):1116–1127.

60. Duric V, Banasr M, Stockmeier CA, Simen AA, Newton SS, Overholser JC, Jurjus GJ, Dieter L, Duman RS. Altered expression of synapse and glutamate related genes in postmortem hippocampus of depressed subjects. Int J Neuropsychopharmacol. 2013; 16:69–82.

61. Eichenbaum H, Yonelinas AP, Ranganath C (2007) The medial temporal lobe and recognition memory. Annu Rev Neurosci 30:123-152.

62. Ennaceur A, Michalikova S, Chazot PL (2009) Do rats really express neophobia towards novel objects? Experimental evidence from exposure to novelty and to an object recognition task in an open space and an enclosed space. Behav Brain Res 197: 417–434. 10.1016/j.bbr.2008.10.007

63. Fan SJ, Jiang H, Yang LJ, Liu X, Song J, Pan F. Effects of adrenergic agents on stress-induced brain microstructural and immunochemical changes in adult male Wistar rats. Ann Anat. 2011;193:418–424.

64. Fava M, Rappe SM, Pava JA, et al. Relapse in patients on long-term fluoxetine treatment respond to increased fluoxetine dose. J. Clin Psychiatry. 1995; 56:52–55.

65. Femenia T, Magara S, DuPont CM, Lindskog M (2015) Hippocampal-Dependent Antidepressant Action of the H3 Receptor Antagonist Clobenpropit in a Rat Model of Depression. Int J Neuropsychopharmacol 18.

66. Feng J, Xie H, Meany DL, Thompson LV, Arriaga EA, Griffin TJ. Quantitative proteomic profiling of muscle type-dependent and age-dependent protein carbonylation in rat skeletal muscle mitochondria. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2008; 63:1137–52.

67. Ferdousi M, Finn DP. Stress-induced modulation of pain: Role of the endogenous opioid system. Prog Brain Res. 2018;239:121-177.

68. Ferrari, A.J. et al. Burden of Depressive Disorders by Country, Sex, Age, and Year: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. PLoS Medicine. 10 (11) (2013).

69. Figueiredo, H.F., Bruestle, A., Bodie, B., Dolgas, C.M., Herman, J.P. The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. European Journal of Neuroscience. 18 (8), 2357-2364 (2003).

70. Fox H., Gibas T. Synthetic tuberculostats. V. Alkylidene derivatives of isonicotinyhydrazineJ. Org. Chem. 1953; 18(8): 983-989

71. Frederick Rohan Walker A critical review of the mechanism of action for the selective serotonin reuptake inhibitors: Do these drugs possess anti-inflammatory properties and how relevant is this in the treatment of depression? Neuropharmacology, 2013; 67: 304-317

72. Fujimaki, K., Morinobu, S. & Duman, R. Administration of a cAMP Phosphodiesterase 4 Inhibitor Enhances Antidepressant-Induction of BDNF mRNA in Rat Hippocampus. Neuropsychopharmacol, 2000; 22: 42–51

73. Gamaro G.D., Xavier M.H., Denardin J.D., Pilger J.A., Ely D.R., Ferreira M.B., Dalmaz C., The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats, Physiol. Behav. 63 (1998) 693–697.

74. García-Osta, A., Cuadrado-Tejedor, M., Garcia-Barroso, C., Oyarzabal, J., and Franco, R. Phosphodiesterases as therapeutic targets for Alzheimer's disease. ACS Chem. Neurosci. 2012; 3:832–844.

75. Gartlehner, G. et al. Second-Generation Antidepressants in the Pharmacologic Treatment of Adult Depression: An Update of the 2007 Comparative Effectiveness Review. Second-Generation Antidepressants in the Pharmacologic Treatment of Adult Depression: An Update of the 2007 Comparative Effectiveness Review. [Internet]. http://www. Diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A810275&dswid=-7243 (2011).

76. Gericke, N. and Van Wyk, B. 2001. In African Natural Health CC(Ed.), Pharmaceutical compositions containing mesembrine

77. Goeldner C, Ballard TM, Knoflach F, Wichmann J, Gatti S, et al. (2013) Cognitive impairment in major depression and the mGlu2 receptor as a therapeutic target. Neuropharmacology 64: 337–346. 10.1016/j.neuropharm.2012.08.001

78. Gonda X, Pompili M, Serafini G, Carvalho AF, Rihmer Z, et al. (2015) The role of cognitive dysfunction in the symptoms and remission from depression. Annals of General Psychiatry 14: 1–7.

79. Goodwin GM. Depression and associated physical diseases and symptoms. Dialogues Clin Neurosci. 2006; 8(2):259–265.

80. Gray TS, Carney ME, Magnuson DJ. Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in stress-induced adrenocorticotropin release. Neuroendocrinology 1989;50:433-446.

81. Gregus, A., Wintink, A.J., Davis, A.C., Kalynchuk, L.E. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. Behavioural Brain Research. 156 (1), 105-114 (2005).

82. Grigoriadis DE, Heroux JA, De Souza EB. Characterization and regulation of corticotropin-releasing factor receptors in the central nervous, endocrine and immune systems. Ciba Found Symp 1993;172:85-101.

83. Grønli J, Bramham C, Murison R, Kanhema T, Fiske E, Bjorvatn B, Ursin R, Portas CM. Chronic mild stress inhibits BDNF protein expression and CREB activation in thedentate gyrus but not in the hippocampus proper. Pharmacol Biochem Behav. 2006; 85(4):842-9.

84. Gustafsson, L., Nordling, D., Andersson, M. S., Sheldon, B. C. and Qvarnström, A. (1994). Infectious diseases, reproductive effort and the cost of reproduction in birds. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B 346,323 -331.

85. Haber SN, Knutson B. The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. Neuropsychopharmacology. 2010;35(1):4-26. doi:10.1038/npp.2009.129

86. Hammar A, Ardal G (2009) Cognitive functioning in major depression—a summary. Front Hum Neurosci 3.

87. Hanks, G.R. (ed.). 2003. Narcissus and daffodil: The genus Narcissus. CRC Press, Boca Raton, FL.

88. Harvey, A. (2008). In Gericke N. (Ed.), Personal communication to Nigel Gericke.

89. Harvey, A. L.; Young, L. C.; Viljoen, A. M.; Gericke, N. P. "Pharmacological actions of the South African medicinal and functional food plant Sceletium tortuosum and its principal alkaloids". Journal of Ethnopharmacology. 2011; 137(3):1124–1129.

90. Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E., 2004. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. Churchill Livingstone, London.

91. Henningsen K, Andreasen JT, Bouzinova EV, Jayatissa MN, Jensen MS, et al. (2009) Cognitive deficits in the rat chronic mild stress model for depression: relation to anhedonic-like responses. Behav Brain Res 198: 136–141. 10.1016/j.bbr.2008.10.039

92. Hernández M, D. Mendieta, D. Martínez-Fong et al., "Variations in circulating cytokine levels during 52 week course of treatment with SSRI for major depressive disorder," European Neuropsychopharmacology, 18, 12, 917–924, 2008.

93. Hinkov H., P. Dimitrov, Z. Zarkov, V. Nakov, R. Dinolova, N. Shumkov, S. Chipova. National Representative Epidemiological Study Of Common Mental Disorders In Bulgaria Epibul 2, 2016-2017: Tool, Methodology, Process Evaluation. Social Medicine. 2017; 1: 21-23.

94. Hirabayashi, M. & Ichikawa, K. & Fukushima, Ryuji & Uchino, T. & Shimada, H. Clinical application of South African tea on dementia dog. JSAP. 2002; 21:109-113.

95. Hirschfeld RM. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. J Clin Psychiatry. 2000; 61 S6:4-6.

96. Ho RC, Fu EH, Chua AN, et al. Clinical and psychosocial factors associated with depression and anxiety in Singaporean patients with rheumatoid arthritis. Int J Rheum Dis 2011; 14:37–47.

97. Houslay, M., Schafer, P., & Zhang, K. Keynote review: Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. Drug Discovery Today. 2005; 15:11503.

98. Ishige, K., Schubert, D. and Sagara, Y. (2001), "Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms", Free Radical Biology and Medicine, Vol. 30, pp. 433-46.

99. Ishikawa M, Hara C, Ohdo S, Ogawa N. Plasma corticosterone response of rats with sociopsychological stress in the communication box. Physiol Behav. 1992;52(3):475–480.

100. Jean Kant G, Eggleston T, Landman-Roberts L, Kenion CC, Driver GC, Meyerhoff JL. Habituation to repeated stress is stressor specific. Pharmacol Biochem Behav. 1985;22(4):631–634.

101. Jha R, Rizvi SI. Carbonyl formation in erythrocyte membrane proteins during aging in humans. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011; 155:39–42.

102. Jiang, W., Li, Y., Sun, J. et al. Spleen contributes to restraint stress induced changes in blood leukocytes distribution. Sci Rep 7, 6501 (2017). https://doi.org/10.1038/s41598-017-06956-9

103. Joo, Y. et al. Chronic immobilization stress induces anxiety- and depression-like behaviors and decreases transthyretin in the mouse cortex. Neuroscience Letters. 461 (2), 121-125 (2009).

104. Julius M. Cruse, Robert E. Lewis, Huan Wang, MOLECULES, CELLS, AND TISSUES OF IMMUNITY, Immunology Guidebook, Academic Press, 2004, Pages 1-15, ISBN 9780121983826, https://doi.orr/10.1016/B978-012198382-6/50025-X.

105. Jung, S. et al. Decreased expression of extracellular matrix proteins and trophic factors in the amygdala complex of depressed mice after chronic immobilization stress. BMC Neuroscience. 13 (1) (2012).

106. Kaidah S, Soejono SK, Partadiredja G (2016) Exercise improves hippocampal estrogen and spatial memory of ovariectomized rats. Bratisl Lek Listy 117: 94–99.

107. Kang HJ, Kim JM, Lee JY, Kim SY, Bae KY, Kim SW, Shin IS, Kim HR, Shin MG, Yoon JS. BDNF promoter methylation and suicidal behavior in depressive patients. J Affect Disord. 2013; 151:679–685.

108. Katz MM, Koslow SH, Berman N, Secunda S, Maas JW, Casper R et al. A multi-vantaged approach to measurement of behavioral and affect states for clinical and psychobiological research. Psychol Rep. 1984; 55:619–671.

109. Katz MM, Maas JW. Psychopharmacology and the etiology of psychopathological states: are we looking in the right way? Neuropsychopharmacology. 1994; 10:139–144.

110. Katz, R.J. Animal model of depression: Effects of electroconvulsive shock therapy. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 5 (2), 273-277 (1981).

111. Kendler K S., Neale M., Kessler R., Heath A., Eaves L. A twin study of recent life events and difficulties. Arch Gen Psychiatry. 1993; 50:789–796.

112. Kendler KS., Gardner CO., Prescott CA. Toward a comprehensive developmental model for major depression in women. Am J Psychiatry. 2002; 159:1133–1145.

113. Kendler KS., Thornton LM., Gardner CO. Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression. Am J Psychiatry. 2001; 158:582–156.

114. Kessler, R.C., Soukup, J., Davis, R.B., Foster, D.F., Wilkey, S.A., Van Rompay, M.M., Eisenberg, D.M. The use of complementary and alternative therapies to treat anxiety and depression in the United States. Am. J. Psychiatry. 2001; 158:289–294.

115. Khamidkhodzhaev, S.A. 1984. Biology, resources and introduction of medicinal plants of Ungernia Bunge and Ficus L. in Middle Asia. Main Botanical Garden, Moscow, Russia, Dr. Sci. Diss. Abstr

116. Koolhaas JM, Coppens CM, de Boer SF, Buwalda B, Meerlo P, Timmermans PJ. The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. J Vis Exp. 2013 Jul 4;(77):e4367. doi: 10.3791/4367. PMID: 23852258; PMCID: PMC3731199.

117. Kumar, V. Potential medicinal plants for CNS disorders: an overview. Phytother. Res. 2006; 20(12):1023–1035.

118. Kuo DC, Tran M, Shah AA, et al. Depression and the suicidal patient. Emerg Med Clin North Am 2015; 33:765–78.

119. Larsen PJ, Jessop D, Patel H, Lightman SL, Chowdrey HS. Substance P inhibits the release of anterior pituitary adrenocorticotrophin via a central mechanism involving corticotrophin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. J Neuroendocrinol 1993;5:99-105.

120. Lee CH, Ryu J, Lee SH, Kim H, Lee I (2016) Functional cross-hemispheric shift between object-place paired associate memory and spatial memory in the human hippocampus. Hippocampus 26: 1061–1077.

121. Lee T, Jarome T, Li SJ, Kim JJ, Helmstetter FJ. Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal magnetic resonance imaging study. Neuroreport. 2009; 20: 1554–1558.

122. Levinson, D. "The genetics of depression: a review". Biological Psychiatry. 2006; 60 (2): 84–92.

123. Lewis J.W., Cannon J.T., Liebeskind J.C., Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia, Science 208 (1980) 623–625.

124. Lewis J.W., Sherman J.E., Liebeskind J.C., Opioid and non-opioid stress analgesia: assessment of tolerance and cross-tolerance with morphine, J. Neurosci. 1 (1981) 358–363

125. Li S, Wang C, Wang W, Dong H, Hou P, et al. (2008) Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior. Life Sci 82: 934–942. 10.1016/j.lfs.2008.02.010

126. Li, Q. and Verma, I.M. (2002) NF-kB regulation in the immune system. Nat. Rev. Immunol. 2, 725–734

127. Liddell, Henry and Robert Scott (1980). A Greek-English Lexicon (Abridged Edition). United Kingdom: Oxford University Press. ISBN 0-19-910207-4.

128. Lim VZ, Ho RC, Tee SI, et al. Anxiety and depression in patients with atopic dermatitis in a Southeast Asian tertiary dermatological center. Ann Acad Med Singapore 2016

129. Lkhagvasuren B, Nakamura Y, Oka T, Sudo N, Nakamura K. Social defeat stress induces hyperthermia through activation of thermoregulatory sympathetic premotor neurons in the medullary raphe region. Eur J Neurosci 2011;34:1442-1452.

130. Loomer, H. P., Saunders, J. C., & Kline, N. S. A clinical and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer. Psychiatric Research Reports. 1957; 8:129-141.

131. Lu Y, Mak KK, van Bever HP, et al Prevalence of anxiety and depressive symptoms in adolescents with asthma: a meta-analysis and meta-regression. Pediatr Allergy Immunol. 2012; 23:707–715

132. Lupien SJ, de LM, de SS, Convit A, Tarshish C, Nair NP, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ. Cortisol levels during human aging

predict hippocampal atrophy and memory deficits. Nat Neurosci 1998;1:69-73.

133. Magariños A, McEwen B: Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:11056–11061.

134. Mak A, Tang CS, Chan MF, et al. Damage accrual, cumulative glucocorticoid dose and depression predict anxiety in patients with systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol 2011;

135. Mak KK, Kong WY, Mak A, et al. Polymorphisms of the serotonin transporter gene and post-stroke depression: a meta-analysis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2013

136. Makino S, Asaba K, Nishiyama M, Hashimoto K. Decreased type 2 corticotropin-releasing receptor mRNA expression in the ventromedial hypothalamus during repeated immobilization stress. Neuroendocrinology. 1999;70(3):160–167.

137. Mann JJ. Loss of antidepressant effect with long-term monoamine oxidase inhibitor treatment without loss of monoamine oxidase inhibition. J Clin Psychopharmacol. 1983; 3:363–366.

138. Marazziti D, Consoli G, Picchetti M, Carlini M, Faravelli L (2010) Cognitive impairment in major depression. Eur J Pharmacol 626.

139. Masood A, Banerjee B, Vijayan VK, Ray A. Modulation of stress-induced neurobehavioral changes by nitric oxide in rats. Eur J Pharmacol. 2003;458:135–139.

140. Maurice, D. H., Ke, H., Ahmad, F., Wang, Y., Chung, J., and Manganiello, V. C. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. Nat. Rev. Drug Discov. 2014; 13, 290–314.

141. McCabe, P.M. et al. (2000) Animal models of disease. Physiol. Behav. 68, 501–507

142. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. Physiol Rev 2007;87:873-904.

143. McEwen, B.S. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. European Journal of Pharmacology. 583 (2-3), 174-185 (2008).

144. McLaughlin, K.J., Baran, S.E., Wright, R.L., Conrad, C.D. Chronic stress enhances spatial memory in ovariectomized female rats despite CA3 dendritic

retraction: Possible involvement of CA1 neurons. Neuroscience. 135 (4), 1045-1054 (2005).

145. Millan MJ. Descending control of pain. Prog Neurobiol. 2002 Apr;66(6):355-474. doi: 10.1016/s0301-0082(02)00009-6. PMID: 12034378.

146. Millan MJ. Stress and endogenous opioid peptides: a review. Mod Probl Pharmacopsychiatry 1981;17:49-67.

147. Mimura M. Comorbidity of Depression and Other Diseases. JMAJ 2001; 44(5): 225–229

148. Montaldi D, Mayes AR (2010) The role of recollection and familiarity in the functional differentiation of the medial temporal lobes. Hippocampus 20:1291-1314.

149. Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. J Comp Physiol Psychol. 1955;48:254–60.

150. Moodley K, Minati L, Contarino V, Prioni S, Wood R, et al. (2015) Diagnostic differentiation of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease using a hippocampus-dependent test of spatial memory. Hippocampus 25: 939–951.

151. Morales-Medina JC, Juarez I, Venancio-Garcia E, Cabrera SN, Menard C, Yu W, Flores G, Mechawar N, Quirion R. Impaired structural hippocampal plasticity is associated with emotional and memory deficits in the olfactory bulbectomized rat. Neuroscience. 2013; 236:233–243.

152. Moret, Y. and Schmid-Hempel, P. (2000). Survival for immunity: the price of immune system activation for bumblebee workers. Science 290,1166 - 1168.

153. Morey, J. N., Boggero, I. A., Scott, A. B., & Segerstrom, S. C. (2015). Current directions in stress and human immune function. Current Opinion in Psychology, 5, 13–17. doi:10.1016/j.copsyc.2015.03.007

154. Morici JF, Bekinschtein P, Weisstaub NV (2015) Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. Behav Brain Res 292: 241–251. 10.1016/j.bbr.2015.06.030

155. Muller JC, Pryor WW, Gibbons JE, Orgain ES. Depression and anxiety occurring during Rauwolfia therapy. J Am Med Assoc. 1955; 29; 159(9):836-9.

156. Nakamura K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2011;301:R1207-R1228

157. Nikolarakis KE, Almeida OF, Herz A. Stimulation of hypothalamic beta-endorphin and dynorphin release by corticotropin-releasing factor (in vitro). Brain Res 1986;399:152-155.

158. Oellerich WF, Schwartz DD, Malik KU. Neuropeptide Y inhibits adrenergic transmitter release in cultured rat superior cervical ganglion cells by restricting the availability of calcium through a pertussis toxin-sensitive mechanism. Neuroscience 1994;60:495-502.

159. Oka T, Oka K. Age and gender differences of psychogenic fever: a review of the Japanese literature. Biopsychosoc Med 2007;1:11.

160. O'Keefe, J., & Nadel, L. (1979). Précis of O'Keefe & Nadel's The hippocampus as a cognitive map. Behavioral and Brain Sciences, 2(4), 487-494.

161. Oliveira AM, Hawk JD, Abel T, Havekes R (2010) Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. Learn Mem 17: 155–160. 10.1101/lm.1625310

162. Olsen CM. Natural rewards, neuroplasticity, and non-drug addictions. Neuropharmacology 2011. 61 (7): 1109–22. doi:10.1016/j.neuropharm.2011.03.010

163. Orsetti M, Colella L, Dellarole A, Canonico PL, Ghi P (2007) Modification of spatial recognition memory and object discrimination after chronic administration of haloperidol, amitriptyline, sodium valproate or olanzapine in normal and anhedonic rats. Int J Neuropsychopharmacol 10: 345–357. 10.1017/S1461145706006705

164. Padgett, D. A., & Glaser, R. (2003). How stress influences the immune response. Trends in Immunology, 24(8), 444–448. doi:10.1016/s1471-4906(03)00173-x

165. Padgett, D.A. et al. (1998) Restraint stress slows cutaneous wound healing in mice. Brain Behav. Immun. 12, 64–73

166. Parker, K.J., Schatzberg, A.F., Lyons, D.M. Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. Hormones and Behavior. 43 (1), 60-66 (2003).

167. Patterson, S. M., Matthews, K. A., Allen, M. T., & Owens, J. F. (1995). Stress-induced hemoconcentration of blood cells and lipids in healthy women during acute psychological stress. Health Psychology, 14(4), 319–324. doi:10.1037/0278-6133.14.4.319

168. Pavon L, G. Sandoval-Lopez, M. Eugenia Hernandez et al., “Th2 cytokine response in major depressive disorder patients before treatment,” Journal of Neuroimmunology, 172, 1-2, 156–165, 2006.

169. Paxinos, G. and Watson, C. (1998) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, San Diego

170. Pearse, D. D., and Hughes, Z. A. PDE4B as a microglia target to reduce neuroinflammation. Glia. 2016; 64:1698–1709.

171. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods. 1985 Aug;14(3):149-67. doi: 10.1016/0165-0270(85)90031-7. PMID: 2864480.

172. Pezze MA, Marshall HJ, Fone KC, Cassaday HJ (2015) Dopamine D1 receptor stimulation modulates the formation and retrieval of novel object recognition memory: role of the prelimbic cortex. Eur Neuropsychopharmacol 25(11):2145–2156

173. Pigni, N.B.; Berkov, S.; Elamrani, A.; Benaissa, M.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J. Two New Alkaloids from Narcissus serotinus L.. Molecules, 2010; 15: 7083-7089

174. Pilcher CW, Browne JL. Effects of naloxone and Mr 1452 on stress-induced changes in nociception of different stimuli in rats. Life Sci. 1983;33 Suppl 1:697-700.

175. Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH. Effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats. Behav Neurosci. 1990;104(1):28–36.

176. Pitman, D.L., Ottenweller, J.E. and Natelson, B.H., Effect of stressor intensity on habituation and sensitization of glucocorticoid responses in rats”, Behav. Neurosci. 1990, 104, 28–36.

177. Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S., Sanacora, G. The stressed synapse: The impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. Nature Reviews Neuroscience. 13 (1), 22-37 (2012).

178. Pratt, Bowery, Kilpatrick, Leslie, Barnes, Naylor, Jones, Nelson, Palacids, Slater, Consensus meeting agrees distribution of 5-HT3 receptors in mammalian hindbrain, Trends Pharmacol. Sci. 1990, 11 , 135-137

179. Pruett S., P. Hébert, J. M. Lapointe, W. Reagan, M. Lawton, and T. T. Kawabata, “Characterization of the action of drug-induced stress responses on the immune system: evaluation of biomarkers for drug-induced stress in rats,” Journal of Immunotoxicology, 4, 1, 25–38, 2007.View at:

180. Qin, M., Xia, Z., Huang, T., Smith, C.B. Effects of chronic immobilization stress on anxiety-like behavior and basolateral amygdala morphology in Fmr1 knockout mice. Neuroscience. 194, 282-290 (2011).

181. Qiu Y, Y. P. Peng, C. Cheng, and L. Dai, "Time effect of restraint stress-induced suppression of lymphocyte transformation," Acta Physiologica Sinica, 51, 4, 477–480, 1999.

182. Rabek JP, Boylston WH 3rd, Papaconstantinou J. Carbonylation of ER chaperone proteins in aged mouse liver. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 305:566–72.

183. Råberg, L., Grahn, M., Hasselquist, D. and Svensson, E. (1998). On the adaptive significance of stress-induced immunosuppression. Proc. Biol. Sci. 265,1637 -1641.

184. Rahimi, R., Nikfar, S., Abdollahi, M., Efficacy and tolerability of Hypericum perforatumin major depressive disorder in comparison with selective serotonin reuptake inhibitors: a meta-analysis. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2009; 33:118–127.

185. Rai D, Bhatia G, Sen T, Palit G. Comparative study of perturbations of peripheral markers in different stressors in rats. Can J Physiol Pharmacol. 2003;81(12):1139–1146.

186. Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, Meltzer HY, Overholser JC, Roth BL, Stockmeier CA. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. Biol Psychiatry. 1999; 45:1085-1098.

187. Randall, L. O., & Selitto, J. J. (1957). A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. Archives Internationales de Pharmacodynamie et de thérapie, CXI, 409–419.

188. Rapp SR, Espeland MA, Shumaker SA, Henderson VW, Brunner RL, Manson JE, et al: Effect of estrogen plus progestin on global cognitive function in postmenopausal women: the Women's Health Initiative Memory Study: a randomized controlled trial. JAMA 2003;289:2663–2672.

189. Refojo D, Schweizer M, Kuehne C, Ehrenberg S, Thoeringer C, Vogl AM, Dedic N, Schumacher M, von WG, Avrabos C, Touma C, Engblom D, Schutz G, Nave KA, Eder M, Wotjak CT, Sillaber I, Holsboer F, Wurst W, Deussing JM. Glutamatergic and dopaminergic neurons mediate anxiogenic and anxiolytic effects of CRHR1. Science 2011;333:1903-1907.

190. Regier PS, Monge ZA, Franklin TR, Wetherill RR, Teitelman AM, Jagannathan K, et al. Emotional, physical and sexual abuse are associated with

a heightened limbic response to cocaine cues. Addiction Biology. 2017 Nov;22(6):1768-177. doi: 10.1111/adb.12445

191. Revsin Y, Saravia F, Roig P, Lima A, de Kloet ER, Homo-Delarche F, et al: Neuronal and astroglial alterations in the hippocampus of a mouse model for type 1 diabetes. Brain Res 2005;1038:22–31.

192. Ricart-Jane D, Rodriguez-Sureda V, Benavides A, Peinado-Onsurbe J, Lopez-Tejero MD, Liobera M. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. Metabolism. 2002;51(7):925–931.

193. Riede, Hans L. "Fourth-generation fluoroquinolones in tuberculosis". Lancet. 2009; 373(9670): 1148–1149.

194. Robison AJ, Nestler EJ, Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. Nat. Rev. Neurosci 2011. 12 (11): 623–637. doi:10.1038/nrn3111.

195. Rose, G. M., Hopper, A., De Vivo, M., and Tehim, A. Phosphodiesterase inhibitors for cognitive enhancement. Curr. Pharm. Des. 2005; 11:3329–3334.

196. Rosmond R. Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome. Psychoneuroendocrinology. 2005;30(1):1–10.

197. Rossato JI, Kohler CA, Radiske A, Bevilaqua LR, Cammarota M (2015) Inactivation of the dorsal hippocampus or the medial prefrontal cortex impairs retrieval but has differential effect on spatial memory reconsolidation. Neurobiol Learn Mem 125: 146–151. 10.1016/j.nlm.2015.09.001

198. Roth RH, Tam SY, Ida Y, Yang JX, Deutch AY. Stress and the mesocorticolimbic dopamine systems. Ann N Y Acad Sci 1988;537:138-147.

199. Rugg MD, Yonelinas AP (2003) Human recognition memory: a cognitive neuroscience perspective. Trends Cogn Sci 7:313-319

200. Russo SJ, Nestler EJ. The brain reward circuitry in mood disorders. Nat Rev Neurosci. 2013; 14:609–625.

201. Saravia F, Gonzalez S, Roig P, Alves V, HomoDelarche F, De Nicola AF: Diabetes increases the expression of hypothalamic neuropeptides in the spontaneous model of type 1 diabetes, the nonobese diabetic (NOD) mouse. Cell Mol Neurobiol 2001;21:15–27

202. Saravia F, Revsin Y, Gonzalez-Deniselle MS, Roig P, Lima A, Homo-Delarche F, et al: Increased astrocyte reactivity in the hippocampus of murine models of type 1 diabetes: the nonobese diabetic (NOD) and streptozotocin-treated mice. Brain Res 2002;957: 345–353.

203. Scheinman, R.I. et al. (1995) Role of transcriptional activation of IkBa in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. Science 270, 283–286

204. Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. Am J Psychiatry. 1965; 122(5):509-22.

205. Schindler A. Mechanisms Underlying the Adverse Consequences of Stress: A Role for the Dynorphin/Kappa Opioid Receptor System, p38α MAPK, and the Serotonin TransporterThesis (Ph.D.); University of Washington, 2012

206. Schoenfeld TJ, Gould E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. Exp Neurol. 2012; 233:12–21

207. Schulz S, Laessle RG. Stress-induced laboratory eating behavior in obese women with binge eating disorder. Appetite 2012;58:457-461.

208. Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 2000 Winter;12(1):103-13. doi: 10.1176/jnp.12.1.103. PMID: 10678523.

209. Seiler A., Fagundes C.P., Christian L.M. (2020) The Impact of Everyday Stressors on the Immune System and Health. In: Choukèr A. (eds) Stress Challenges and Immunity in Space. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16996-1_6

210. Seo, J.S. et al. Cellular and molecular basis for stress-induced depression. Molecular Psychiatry. 22 (10), 1440-1447 (2016).

211. Seo, J.-S. et al. NADPH Oxidase Mediates Depressive Behavior Induced by Chronic Stress in Mice. Journal of Neuroscience. 32 (28), 9690-9699 (2012).

212. Sévoz-Couche Caroline, Brouillard Charly, Key role of 5-HT3 receptors in the nucleus tractus solitarii in cardiovagal stress reactivity, Neuroscience & Biobehavioral Reviews 2017, 74(B),423-432 https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.04.014.

213. Sharma V. Loss of response to antidepressants and subsequent refractoriness: diagnostic issues in a retrospective case series. J Affect Disord. 2001; 64:99–106.

214. Sheldon, B. C. and Verhulst, S. (1996). Ecological immunity: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. Trends Ecol. Evol. 11,317 -321

215. Shi ZQ, Rastogi KS, Lekas M, Efendic S, Drucker DJ, Vranic M 1996 Glucagon response to hypoglycemia is improved by insulin-independent restoration of normoglycemia in diabetic rats. Endocrinology 137:3193–3199

216. Shore PA, Silver SL, Brodie BB.Interaction of reserpine, serotonin, and lysergic acid diethylamide in brain. Science. 1955; 122(3163):284-5.

217. Shore PA, Pletscher A, Tomich EG, Carlsson A, Kuntzman R, Brodie BB. Role of brain serotonin in reserpine action. Ann N Y Acad Sci. 1957; 66(3):609-15; discussion, 615-7.

218. Slattery, D.A., Cryan, J.F. Modelling depression in animals: at the interface of reward and stress pathways. Psychopharmacology. 234 (9-10), 1451-1465 (2017).

219. Smith, M. T.; Crouch, N. R.; Gericke, N.; Hirst, M. "Psychoactive Constituents of the Genus Sceletium N.E.Br. and other Mesembryanthemaceae: A Review". Journal of Ethnopharmacology. 1996; 50(3):119–130.

220. Sompayrac L (2016) How the immune system works, 5th edn. Singapore, Wiley Blackwell

221. Son, H. et al. Glutamine has antidepressive effects through increments of glutamate and glutamine levels and glutamatergic activity in the medial prefrontal cortex. Neuropharmacology. 143, 143-152. (2018).

222. Spellberg B, Edwards JE Jr (2001) Type 1/type 2 immunity in infectious diseases. Clin Infect Dis 32:76–102

223. Spencer SJ, Tilbrook A. The glucocorticoid contribution to obesity. Stress 2011;14:233-246.

224. Spinella, M., 2001. The Psychopharmacology of Herbal Medicine: Plant Drugs That Alter Mind, Brain and Behavior (Paperback). MIT Press, Cambridge.

225. Stafford, G. I.; Pedersen, M. E.; van Staden, J.; Jäger, A. K.;Review on plants with CNS-effects used in traditional South African medicine against mental diseases". Journal of Ethnopharmacology. 2008; 119(3):513–537

226. Sterzer P., G. J. Wiegers, and J. M. H. M. Reul, “Long-term in vivo administration of glucocorticoid hormones attenuates their capacity to accelerate in vitro proliferation of rat splenic T cells,” Endocrinology, 145, 8, 3630–3638, 2004.

227. Stewart, I.B., McKenzie, D.C. The Human Spleen During Physiological Stress. Sports Med 32, 361–369 (2002). https://doi.org/10.2165/00007256-200232060-00002

228. Sulakhiya K, Patel Ж, Saxena Rahul, Dashore Jagrati, Srivastava Amit Kumar, Rathore Manoj, Effect of Beta vulgaris Linn. leaves extract on anxiety- and depressive-like behavior and oxidative stress in mice after acute restraint stress, Pharmacognosy research 2016, 8(1), 1-7.

229. Svensson, E., Råberg, L., Koch, C. and Hasselquist, D. (1998). Energetic stress, immunosuppression and the costs of an antibody response. Funct. Ecol. 12,912 -919.

230. Teague CR, Dhabhar FS, Barton RH, Beckwith-Hall B, Powell J, Cobain M, Singer B, McEwen BS, Lindon JC, Nicholson JK, et al. Metabonomic studies on the physiological effects of acute and chronic psychological stress in Sprague-Dawley rats. J Proteome Res. 2007;6(6):2080–2093.

231. Terburg D, Syal S, Rosenberger LA, et al. Acute effects of Sceletium tortuosum (Zembrin), a dual 5-HT reuptake and PDE4 inhibitor, in the human amygdala and its connection to the hypothalamus. Neuropsychopharmacology. 2013; 38(13):2708–2716.

232. Teunis, M.A. et al. (2002) Maternal deprivation of rat pups increases clinical symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis at adult age. J. Neuroimmunol. 133, 30–38

233. Trivedi, M.H. et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. The American Journal of Psychiatry. 163 (1), 28-40 (2006).

234. Tronel S, Charrier V, Sage C, Maitre M, Leste-Lasserre T, et al. (2015) Adult-born dentate neurons are recruited in both spatial memory encoding and retrieval. Hippocampus 25: 1472–1479.

235. Tsigos C, Chrousos GP. Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. Endocrinol Metab Clin North Am 1994;23:451-466.

236. Valentino RJ, Foote SL, Aston-Jones G. Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. Brain Res 1983;270:363-367.

237. van de Kar LD, Blair ML. Forebrain pathways mediating stress induced hormone secretion. Front Neuroendocrinol. 1999;20(1):1–48.

238. Vidal R, Pilar-Cuellar F, dos Anjos S, Linge R, Treceno B, Vargas VI, Rodriguez-Gaztelumendi A, Mostany R, Castro E, Diaz A, Valdizan EM,

Pazos A. New strategies in the development of antidepressants: towards the modulation of neuroplasticity pathways. Curr Pharm Des. 2011; 17:521–533.

239. Vogel, W.H. and Jensh, R. Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone level in male rats, Neurosci. Lett. 1988, 87, 183–188

240. von Schantz, T., Bensch, S., Grahn, M., Hasselquist, D. and Wittzell, H. (1999). Good genes, oxidative stress and condition-dependent sexual signals. Proc. Biol. Sci. 266, 1-12.

241. Warren BL, Vialou VF, Iñiguez SD, Alcantara LF, Wright KN, Feng J, Kennedy PJ, et al. Neurobiological sequelae of witnessing stressful events in adult mice. Biol Psychiatry. 2013;73:7–14.

242. Watt MJ, Burke AR, Renner KJ, Forster GL. Adolescent male rats exposed to social defeat exhibit altered anxiety behavior and limbic monoamines as adults. Behav Neurosci. 2009;123(3):564-576

243. Watts LM, Manchem VP, Leedom TA, Rivard AL, McKay RA, Bao D, et al: Reduction of hepatic and adipose tissue glucocorticoid receptor expression with antisense oligonucleotides improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic rodents without causing systemic glucocorticoid antagonism. Diabetes 2005;54:1846–1853.

244. Weiner N, Cloutier G, Bjur R, Pfeffer RI. Modification of norepinephrine synthesis in intact tissue by drugs and during short-term adrenergic nerve stimulation. Pharmacol Rev. 1972; 24(2): 203-221.

245. Weiss, J.M. Psychological factors in stress and disease, Sci. Am. 1972, 226, 104–113.

246. White BD, Dean RG, Edwards GL, Martin RJ. Type II corticosteroid receptor stimulation increases NPY gene expression in basomedial hypothalamus of rats. Am J Physiol 1994;266:R1523-R1529.

247. WHO, Fact Sheet - Mental Health 2019, Accessed 04.03.2019 at: http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/mental-health/data-and-resources/fact-sheet-mental-health-2019

248. Widman AJ, Cohen JL, McCoy CR, Unroe KA, Glover ME, Khan AU, Bredemann T, McMahon LL, Clinton SM. Rats bred for high anxiety exhibit distinct fear-related coping behavior, hippocampal physiology, and synaptic plasticity-related gene expression. Hippocampus. 2019 Oct;29(10):939-956. doi: 10.1002/hipo.23092. Epub 2019 Apr 17. PMID: 30994250; PMCID: PMC7377203.

249. Willner P, Scheel‐Krüger J. The neurobiology of depression and antidepressant action. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 2013; 37: 2331–2371

250. Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., Muscat, R. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. Psychopharmacology. 93 (3), 358-364 (1987).

251. Woolley, C.S., Gould, E., McEwen, B.S. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. Brain Research. 531 (1-2), 225-231 (1990).

252. Wu J, Luo X, Jing S, Yan LJ. Two-dimensional gel electrophoretic detection of protein carbonyls derivatized with biotin-hydrazide. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2016;

253. Wu R, Shui L, Wang S, Song Z, Tai F (2016) Bilobalide alleviates depression-like behavior and cognitive deficit induced by chronic unpredictable mild stress in mice. Behav Pharmacol 27: 596–605. 10.1097/FBP.0000000000000252

254. Yamada F, Inoue S, Saitoh T, Tanaka K, Satoh S, Takamura Y. Glucoregulatory hormones in the immobilization stress induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. Endocrinology. 1993;132(5):2199–2205.

255. Youdim KA, Joseph JA. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: A multiplicity of effects. Free Radical Biology and Medicine. 2001;30(6):583–594.

256. Yu, H., Zou, Z., Zhang, X., Peng, W., Chen, C., Ye, Y., et al. Inhibition of phosphodiesterase 4 by FCPR03 alleviates lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviors in mice: involvement of p38 and JNK signaling pathways. Int. J. Mol. Sci. 2018; 19: E513.

257. Zhang MW, Ho RC, Cheung MW, et al. Prevalence of depressive symptoms in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review, meta-analysis and meta-regression. Gen Hosp Psychiatry 2011; 33:217–23.

258. Zhao J, Unelius L, Bengtsson T, Cannon B, Nedergaard J. Coexisting beta-adrenoceptor subtypes: significance for thermogenic process in brown fat cells. Am J Physiol. 1994 Oct;267(4 Pt 1):C969-79.

259. Zhu S, Shi R, Wang J, Wang JF, Li XM (2014) Unpredictable chronic mild stress not chronic restraint stress induces depressive behaviours in mice. Neuroreport 25: 1151–1155. 10.1097/WNR.0000000000000243

260. Zou, Z. Q., Chen, J. J., Feng, H. F., Cheng, Y. F., Wang, H. T., Zhou, Z. Z., et al. Novel phosphodiesterase 4 inhibitor FCPR03 alleviates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation by regulation of the cAMP/PKA/CREB signaling pathway and NF- kappaB Inhibition. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2017; 362, 67–77.