



Медицински университет – София
Медицински факултет
КАТЕДРА ПО ПАТОФИЗИОЛОГИЯ



Д-р Димитър Васков Бакалов

АВТОРЕФЕРАТ

На 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: Патопфизиология

На тема

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

Научни ръководители:

Доц. д-р Радка Кирилова Тафраджийска, дм

Доц. Даниела Пехливанова, дм

София

2021

Предложеният за обсъждане дисертационен труд е с общ обем от 105. За неговото онагледяване са използвани 2 таблици и 37 фигури. Библиографската справка обхваща 260, от които 259 на латиница и 1 на кирилица.

Дисертационния труд е обсъден и насочен за публична защита от Катедрения съвет на Катедра по Патифизиология при Медицински Университет – София, проведен на 25.05.2021 г.

Публичната защита на дисертационната работа ще се проведе на 12.10.2021 г. от 9:45 ч. в 104 семинарна зала на МБК на Медицински факултет, ул. Здраве 2, гр. София, при спазване на противоепидемичните мерки.

Публичната защитата ще бъде проведена дистанционно, в случай че епидемичната обстановка не позволява присъствено провеждане.

Научно жури в състав:

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Юлия Йорданова Петрова, дмн – ръководител на катедра по Неврология, МУ-София
/вътрешен член/
2. Проф. д-р Емил Влайков Воденичаров, дм – Катедра по епидемиология и хигиена
/вътрешен член/

Външни членове:

3. Проф. д-р Теодора Тодорова Димитрова, дм – МУ-Варна /външен член/
4. Доц. д-р Емилия Цветанова Цакова-Лакова, дм – МУ-Плевен, пенсионер /външен член/
5. Доц. д-р Камелия Жечкова Братоева, дм, МУ-Варна /външен член/

Резервни членове:

6. доц. д-р Жоржета Стоянова Бочева, дм – Катедра по фармакология и токсикология, МУ-София /вътрешен член/
7. доц. д-р Станислава Николаева Харизанова, дм – Ръководител катедра Хигиена, МУ-Пловдив /външен член/

Технически сътрудник: Иван Красимиров Филипов

Материалите по защитата са на разположение в отдел „Наука“ на Медицински факултет към Медицински Университет – София.

Забележка – фигурите и графиките в авторефера не съответства с номерацията в дисертационния труд.

Съдържание

Списък на фигурите:	5
Използвани съкращения	6
I. Въведение	8
II. Цел и задачи на изследването.	9
1. Цел.....	9
2. Задачи.....	9
III. Материали и методи	10
1. Експериментални животни и схема на третиране	10
2. Метод за предизвикване на Т13Д при плъхове.....	11
3. Метод за предизвикване на остър и хроничен имобилизационен стрес.	11
4. Метод за изследване на социално поведение - Тест „Resident-intruder“	12
5. Метод за предизвикване на хроничен социален стрес (Social defeat stress).....	13
6. Метод за проучване на изследователско поведение и хабитуация към непозната среда - Open-field тест.....	13
7. Метод за изследване на работната памет – Novel object recognition test.....	14
8. Метод за изследване на поведението на безпокойство – Elevated plus maze test.....	15
9. Метод за изследване на болков праг – Paw Pressure Test.....	16
10. Подход за изолиране на мозъчни структури.....	16
11. Подход за взимане на кръвни проби и кръвна плазма	16
12. Метод за определяне нивата на хормоните кортикостерон и тестостерон в кръвна плазма и мозъчен хомогенат.	17
13. Метод за определяне нивата на карбонилирани протеини	17
14. Метод за статистически анализ на данните.....	17
IV. РЕЗУЛТАТИ:	18
1. Ефекти на остър и хроничен имобилизационен стрес (RS)	18
2. Влияние на хроничния социален стрес (SS) при млади мъжки плъхове Wistar.	26
3. Определяне на минимална ефективна доза на мезембриновата фракция	35
4. Данни от експериментален модел на Т13Д при плъхове.	39
V. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ:.....	46
1. Промени в общата двигателна активност, изследователско поведение и тревожно поведение в непозната среда.	46
2. Промени в болковата чувствителност при тест “Paw pressure”.....	48
3. Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху работната памет, изследвана с тест Novel Object Recognition test (NORT).....	49

4. Ефекти върху масата на слезката и надбъбречната жлеза, както и на нивото на глюкозата в кръвта.	51
5. Влияние на хроничния социален стрес и третирането с MZM върху нивото на увредените, карбонилирани протеини в изолиран хипокампус и кръвна плазма.....	53
6. Данни за минималната ефективна доза на мезембриновата фракция.....	54
7. Данни за влиянието на експериментален модел на Т13Д при плъхове и ефекти на хронично третиране с MZM.....	54
8. Заключение	55
VI. Изводи.....	56
VII. Приноси	57
VIII. Научна и публикационна активност във връзка с дисертационния труд	58
1. Публикации по дисертационния труд.....	58
2. Научни съобщения във връзка с дисертационния труд	58

Списък на таблици и фигурите:

ТАБЛИЦА 1. ИЗПОЛЗВАНИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ЖИВОТНИ	10
ФИГ. 1. RESTRAIN STRESS	12
ФИГ. 2. OPEN FIELD TEST СЪС ЗАПИС НА ТРАЕКТОРИЯТА НА ОПИТНОТО ЖИВОТНО.	14
ФИГ. 3. МЕТОД ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НА РАБОТНАТА ПАМЕТ – NOVEL OBJECT RECOGNITION TEST.	15
ФИГ. 4. ELEVATED PLUS MAZE TEST.	15
ФИГ. 5. СТЕРЕОТАКСИЧНИТЕ КООРДИНАТИ НА ХИПОКАМПА (PAXINOS AND WATSON 1998).	16
ФИГ. 6 ЕФЕКТИ НА ЕДНОКРАТНО И ХРОНИЧНО ТРЕТИРАНЕ С MZM ВЪРХУ ПРЕДИЗВИКАНИТЕ ОТ ОСТЪР И ХРОНИЧЕН RS ПРОМЕНИ В ОБЩАТА ДВИГАТЕЛНА АКТИВНОСТ.	19
ФИГ. 7. ЕФЕКТИ НА ЕДНОКРАТНО И ХРОНИЧНО ТРЕТИРАНЕ С MZM ВЪРХУ ПРЕДИЗВИКАНИТЕ ОТ ОСТЪР И ХРОНИЧЕН RS ПРОМЕНИ В ПОВЕДЕНИЕТО НА БЕЗПОКОЙСТВО	20
ФИГ. 8 ЕФЕКТИ НА ЕДНОКРАТНО И ХРОНИЧНО ТРЕТИРАНЕ С MZM ВЪРХУ ПРЕДИЗВИКАНИТЕ ОТ ОСТЪР И ХРОНИЧЕН RS ПРОМЕНИ В ПОВЕДЕНИЕТО НА БЕЗПОКОЙСТВО.....	22
ФИГ.9 ЕФЕКТИ НА ЕДНОКРАТНО И ХРОНИЧНО ТРЕТИРАНЕ С MZM ВЪРХУ ПРЕДИЗВИКАНИТЕ ОТ ОСТЪР И ХРОНИЧЕН RS ПРОМЕНИ В БОЛКОВАТА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ	23
ФИГ. 10 ЕФЕКТИ ОТ ОСТЪР И ХРОНИЧЕН RS ВЪРХУ СВЕЖАТА МАСА НА СЛЕЗКАТА.	24
ФИГ. 11 ЕФЕКТИ ОТ ОСТЪР И ХРОНИЧЕН RS ПРОМЕНИ ВЪРХУ СВЕЖАТА МАСА НА НАДБЪБРЕЧНАТА ЖЛЕЗА.	25
ФИГ. 12 ЕФЕКТИ ОТ ОСТЪР И ХРОНИЧЕН RS ВЪРХУ НИВОТО НА ГЛЮКОЗА В КРЪВТА.	25
ФИГ. 13 Влияние на хроничния социален стрес (SS) в.	26
ФИГ. 14 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху относителната двигателна активност в централната аверсивна зона.....	27
ФИГ. 15 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху поведението на безпокойство в непозната среда.	27
ФИГ. 16 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху поведението на покой в защитените зони на непозната среда.....	28
ФИГ. 17 Влияние на хроничния социален стрес (SS) върху изследователското поведение в аверсивна среда	29
ФИГ. 18 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху поведението на безпокойство ..	30
ФИГ. 19 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху изследването на нови обекти....	31
ФИГ. 20 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху работната памет.....	32
ФИГ. 21 Влияние на хроничния социален стрес (SS) върху нивото на увредените, карбонилирани протеини.	33
ФИГ. 22 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху болковата чувствителност.....	34
ФИГ. 23 Влияние на еднократни дози мезембринова фракция алкалоиди върху депресивното поведение.	36
ФИГ. 24 Влияние на еднократни дози мезембринова фракция алкалоиди върху поведението на безпокойство ..	37
ФИГ. 25 Влияние на еднократни дози мезембринова фракция алкалоиди върху общата хоризонтална двигателна активност (.....	38
ФИГ. 26 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху телесната маса.	39
ФИГ. 27 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху денонощния прием на вода.....	40
ФИГ. 28 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху денонощния прием на храна	41
ФИГ. 29 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху денонощната екскреция на урина	41
ФИГ. 30 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху поведението на безпокойство.	42
ФИГ. 31 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху поведението на безпокойство	43
ФИГ. 32 Влияние на експериментален модел на захарен диабет и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху общата двигателна активност.....	43
ФИГ. 33 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху общата двигателна активност и хабиутация.	44

Използвани съкращения

5-HT	Серотонин	PAG	Substantia Grisea Centralis
ACC	Cortex Cingularis Anterior	PBN	Nuclei Parabrachiales
ADT	Антидепресантна Терапия	PDE	Фосфодиестераза
AH	Артериално Налягане	POM C	Проопиомеланокортин C
AVP	Вазопресин	PTS D	Посттравматично Стресово Разстройство
BDNF	Мозъчен Невротрофичен Фактор	PVN	Nucleus Paraventricularis Hypothalami
BST	Stria Terminalis	RS	Restrain Stress
cAMP	Цикличен Аденозин Монофосфат	SERT	Серотонинов Транспортер
CIS	Хроничен Имобилизационен Стрес	SIH	Стрес Индуцирана Хипералгезия
CMS	Хроничен Умерен Стрес	SN	Substantia Nigra
CRH	Corticotropin Releasing Hormone	SNRI	Серотонин-Норадреналин Рептейк Инхибитори
DA	Допамин	SS	Хроничен Социален Стрес
fNMR	Функционален-ЯМР	SSRI	Селективни Серотонинови Рептейк Инхибитори
GABA	Гама-Аминомаслена Киселина	STZ	Стрептозотозин
HPA	Хипоталамо-Хипофизо-Адренална Ос	TCA	Трициклични Антидепресанти
KOR	Карра-Опиоиден Рецептор	VP	Pallidum Ventrale
LC	Locus Coeruleus	VS	Striatum Ventrale
LPS	Липополизахарид	VTA	Tegmentum Ventrale

MAOI	Инхибитори На Моноаминооксидазата	α-MSH	А-Меланоцит-Стимулиращ Хормон
MDD	Голямото Депресивно Разстройство/Major Depressive Disorder	ДЧ	Дихателна Честота
mPFC	Cortex Praefrontalis Medialis	ЕКТ	Електроконвулсивна Терапия
MZM	Мезембринови Алкалоиди	НЛР	Нежелани Лекарствени Реакции
NE	Норадреналин	НЦО ЗА	Национален Център За Обществено Здраве И Анализи
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B	ОКР	Обсесивно-Компулсивно Разстройство
NORT	Novel Object Recognition Test	СЗО	Световна Здравна Организация
OFC	Cortex Orbitofrontalis	СЧ	Сърдечна Честота
OFT	Open-Field Test	Т13Д	Тип 1 Захарен Диабет

I. Въведение

При хомеотермните видове организъмът 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. 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 влиянието на опитен модел на Захарен диабет тип I (T13D) върху поведението у плъхове.
- ii. Изследване на влиянието на хроничен социален стрес върху основни параметри на поведението у млади плъхове;
- iii. Изследване на ефектите на остър и хроничен имобилизационен стрес върху поведението у плъховете.
- 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.

III. Материали и методи

При изпълнение на задачите бяха използвани следните методи и подходи:

1. Експериментални животни и схема на третиране

Таблица 1. 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	T13Д	Изследване на поведенчески ефекти на T13Д
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 (T13Д) 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 Т13Д при плъхове.

Методът за предизвикване на експериментален диабет тип 1 (diabetes mellitus - DM) се основава на интраперитонеално инжектиране на стрептозотозин (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 Т13Д. 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®.

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 хендират ежедневно в същия часови интервал.



Фиг. 1. 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 (интродер), 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, интродерът 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

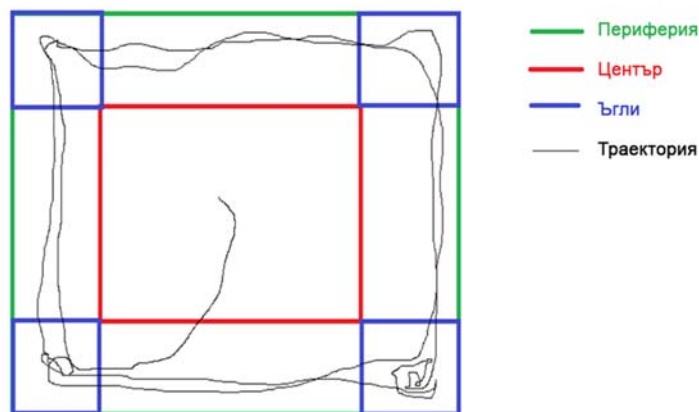
и др.); продължителност на не-социален тип поведение (честота и латенция на хоризонталните и вертикални движения на резидента, почистване на козината, ненормална стереотипия, ровене); латенция до директно нападение (Clinch/attack bite) [Koolhaas et al., 2013].

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 интродер, 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.

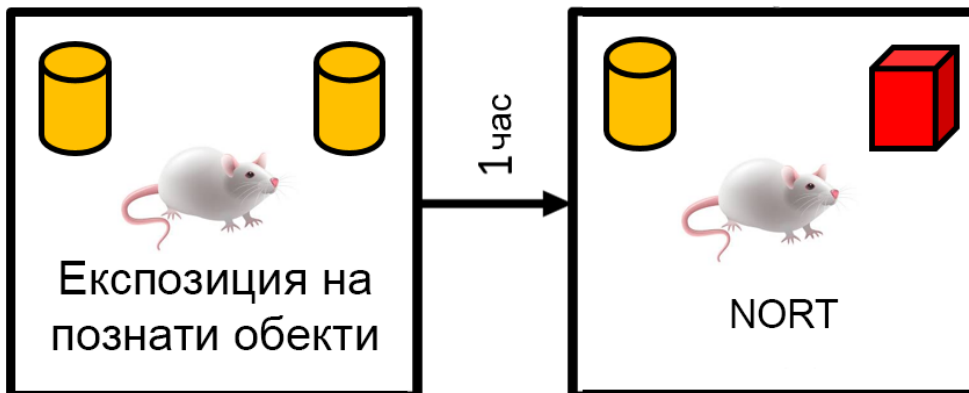
Апаратът се състои от кутия с размери 100 x 100 x 60 см, разделена на две зони - външен (100 x 100 см) и вътрешен (50 x 50 см) квадрати и видео камера, свързана с компютърна програма video tracking system (SMART Pan Lab software) на Harvard Apparatus, USA. Процедурата се състои в поставяне на изследваното 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. 2. Open field test със запис на траекторията на опитното животно.

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

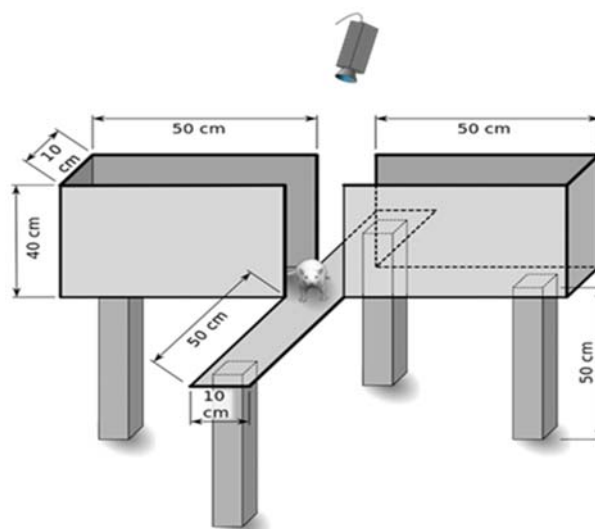
Апаратът е непрозрачна кутия (50 cm x 50 cm x 60cm), която е разположена в звукоизолирана, равномерно осветена стая. Процедурата се състои от 3 фази: 1-ви ден на привикване към новата среда за период от 15 минути; 2-ри ден – 5 минутно обучение, по време на което в кутията се поставят два идентични обекта 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. 3. 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 cm от основата. Животните се поставят върху централната платформа с глава към 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. 4. Elevated plus maze test.

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 \pm 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

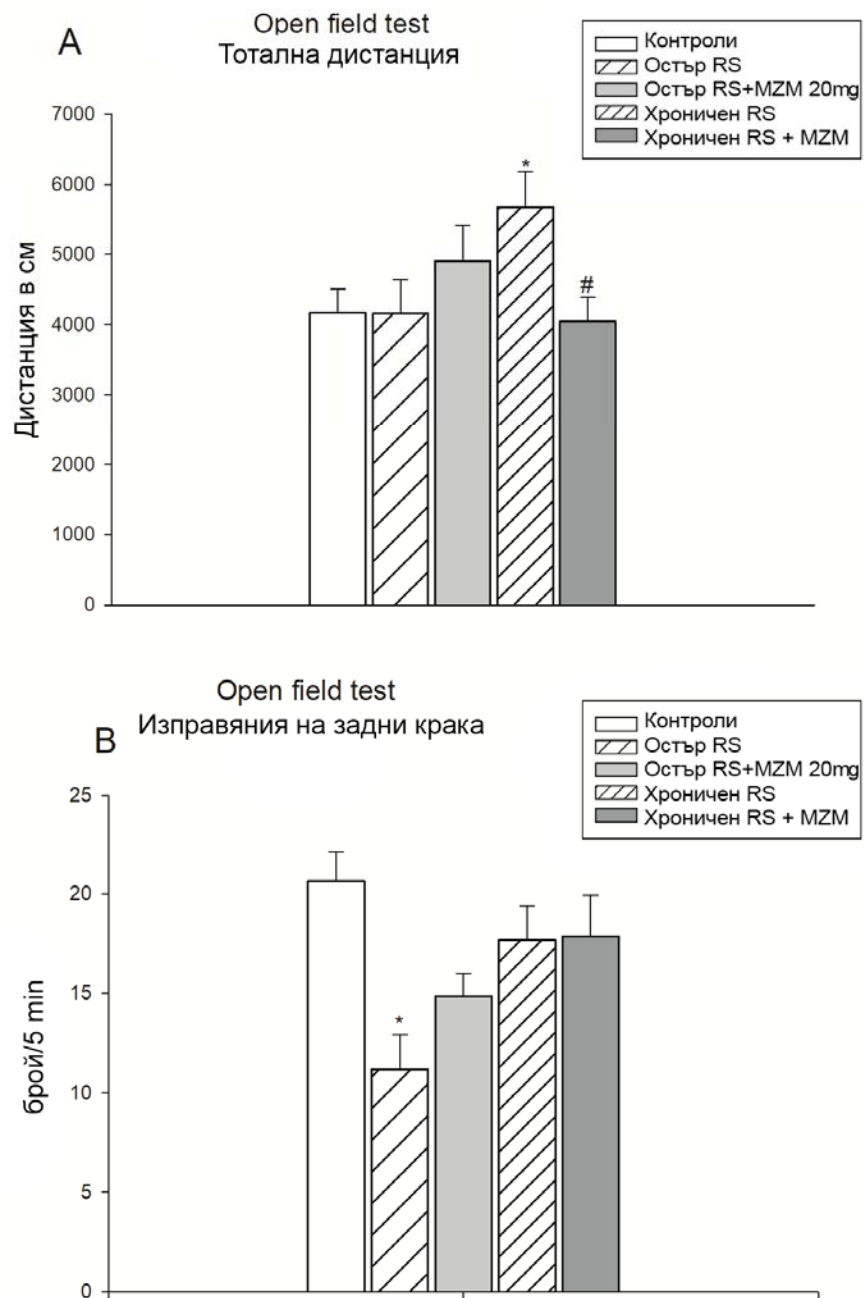
IV. РЕЗУЛТАТИ:

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

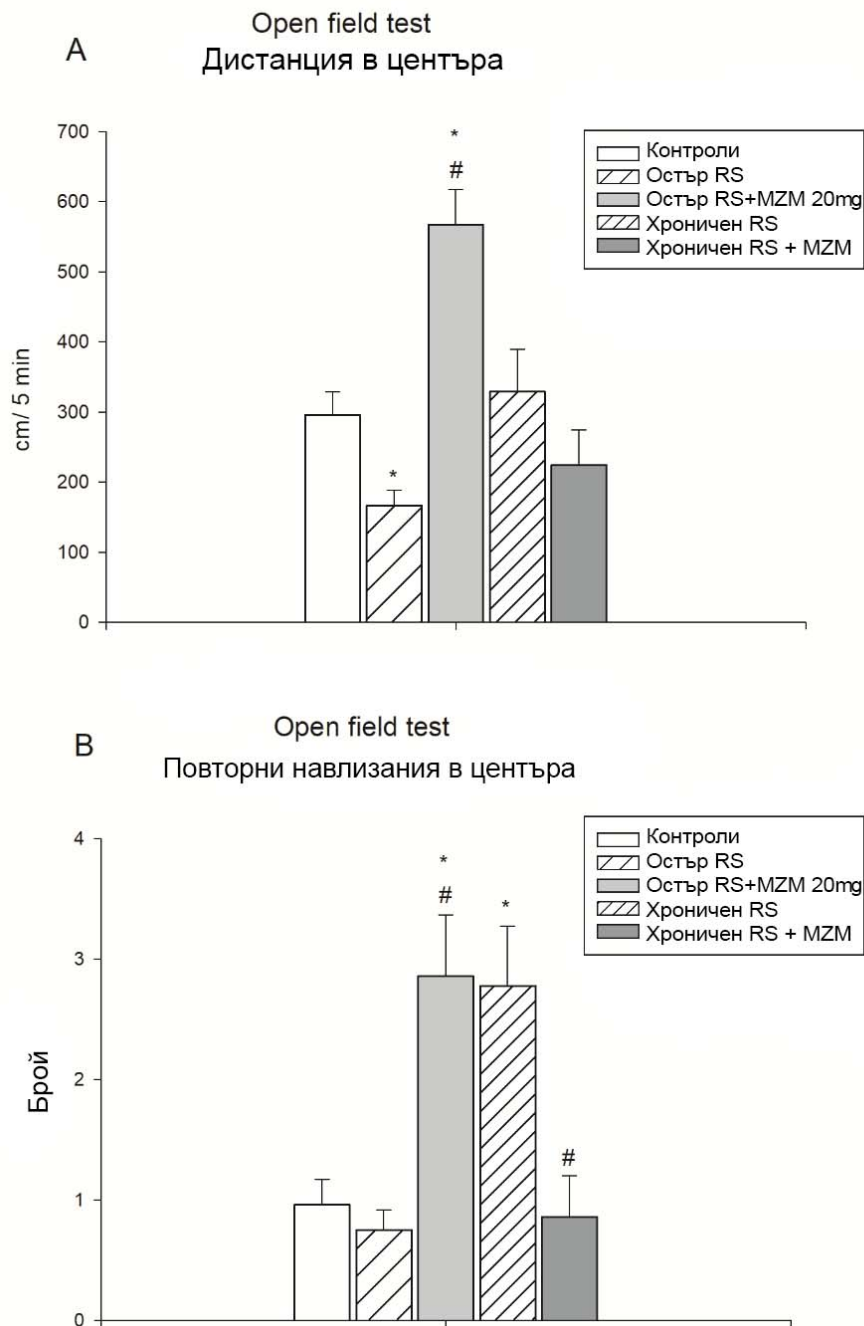
1.1. Ефекти на имобилизационен стрес върху изследователското поведение в непозната среда (Open Field Test).

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. 6А), но понижи изследователското поведение, като намали броя на вертикалните изправяния ($F_{1, 16} = 15.298$, * $p = 0.001$; фиг. 6В). 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. 10А и В).

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 ($F_{1, 14} = 57.843$, * # $p < 0.001$; (А)) и увеличи броя на повторните влизания в центъра на апарата ($H = 9.356$, * # $P = 0.002$; (В)), като предизвика изразен анксиолитичен ефект (Фиг. 7 А и В). Хроничният стрес увеличи броя на повторните влизания в централната зона на апарата ($H = 10.310$, * $P < 0.001$). Хроничното претретиране с MZM премагна напълно повишеното рисково поведение у стресираните животни ($H = 7.191$, # $P = 0.007$; Фиг. 7 В).



Фиг.6 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 (А) и вертикалното проучвателно поведение (В; брой на вертикалните изправяния за 5 минути) при тест „Отворено поле“. Данните са представени като средни \pm SEM, $n = 8$; * $p < 0.05$ vs Controls; # $p < 0.05$ vs Chronic RS.

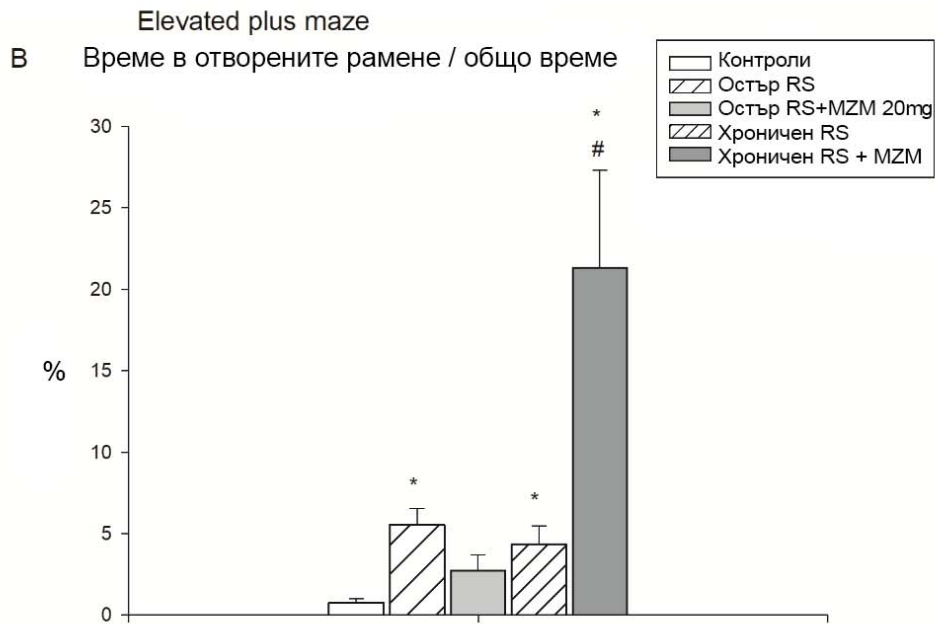
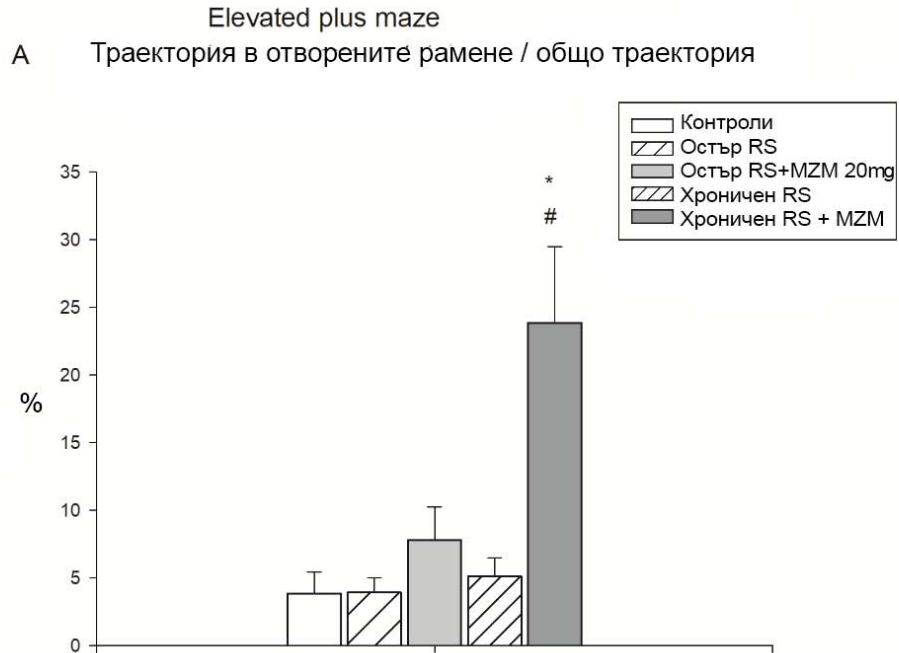


Фиг. 7. Ефекти на еднократно и хронично третиране с MZM върху предизвиканите от остър и хроничен RS промени в поведението на безпокойство (дължина на траекторията (A) и брой повторни влизания в центъра(B)) при тест „Отворено поле“. Данните са представени като средни \pm SEM, $n = 8$; * $p < 0.05$ vs Controls; # $p < 0.05$ vs Chronic RS

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

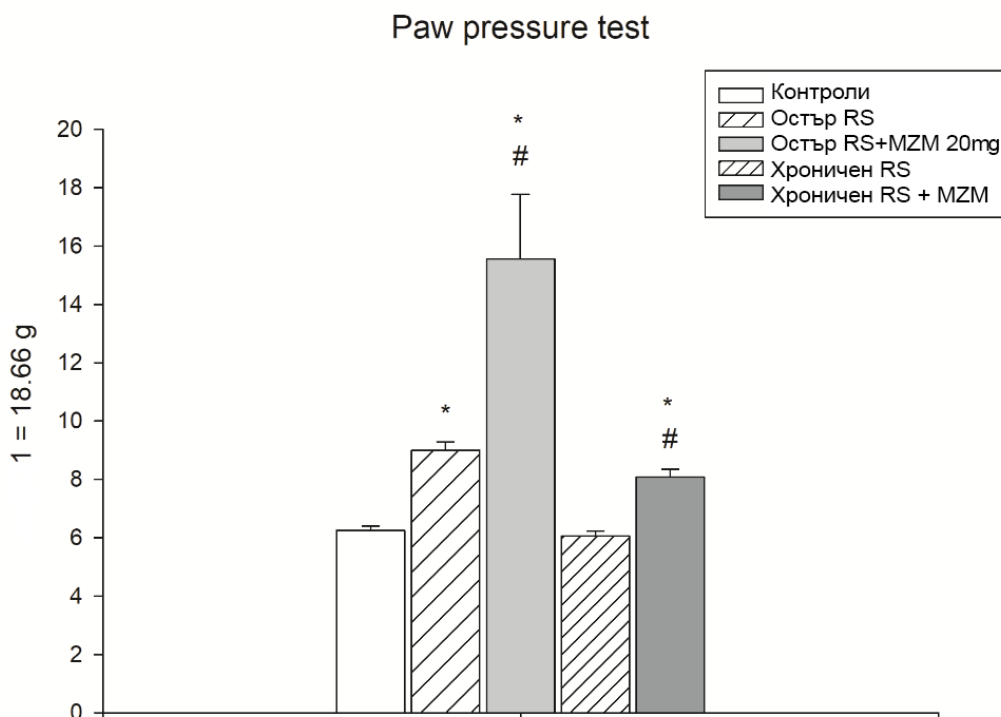
При теста за изследване на поведението на безпокойство (Elevated plus maze) не беше отчетено съществено влияние на острия и хроничен стрес, нито на еднократната доза преди острия стрес върху съотношението на изминатата в аверсивните отворени рамене траектория спрямо общата измината траектория. Хроничното третиране преди прилагане на хроничен стрес обаче повиши значително процента на изминатото разстояние в отворените рамене ($H = 7.503$, * $P = 0.006$; Фиг. 8А).

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. 8В). Еднократна доза МЗМ 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. 8В).



Фиг. 8 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 рамене) при тест „Повдигнат кръстосан лабиринт“. Данните са представени като средни \pm SEM, $n = 8$; * $p < 0.05$ vs Controls; # $p < 0.05$ vs Chronic RS

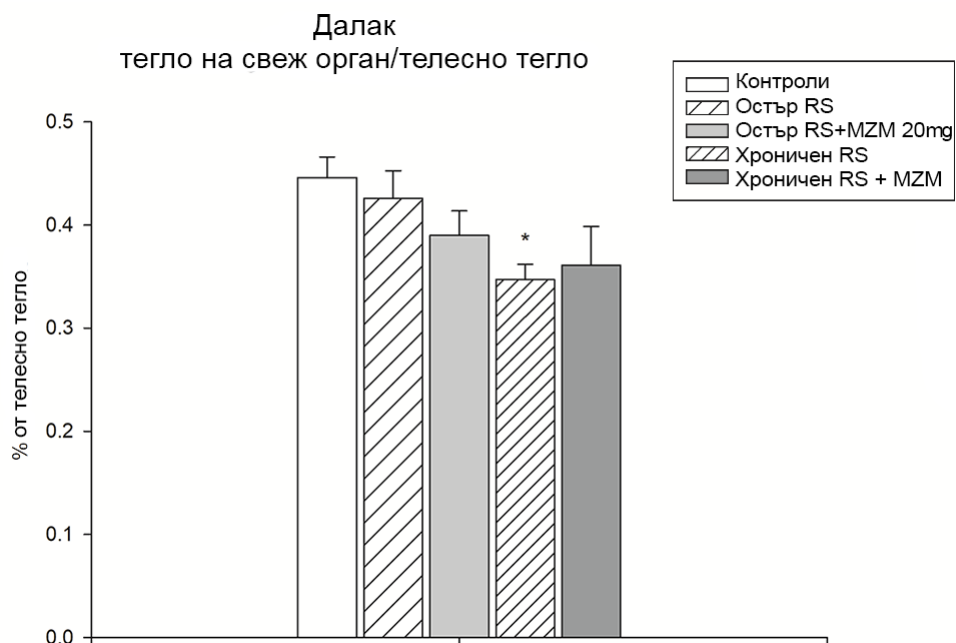
1.3 Промени в болковата чувствителност при тест “Paw pressure”.



Фиг.9 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 \pm SEM, $n = 8$; * $p < 0.05$ vs Controls; # $p < 0.05$ vs Chronic RS

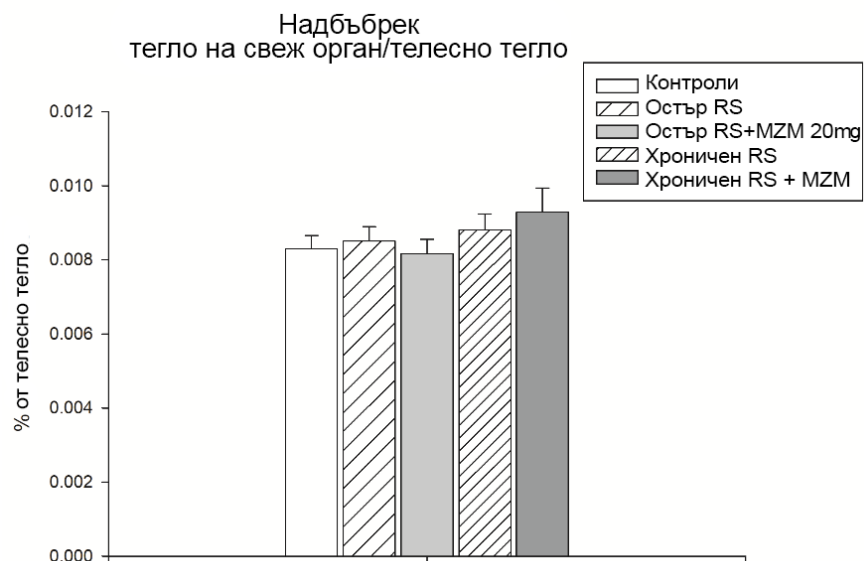
Острият RS индуцира антиноцицепция ($H = 13.877$, * $P < 0.001$), а еднократното инжектиране на MZM преди стреса засилва достоверно стрес-индуцираната аналгезия ($H = 4.575$, # $P = 0.032$; Фиг. 9). За разлика от острия, хроничният стрес не предизвика съществени промени в болковия праг, но хроничното третиране с MZM преди ежедневното прилагане на RS намали достоверно болковата чувствителност ($H = 12.066$, * # $P = < 0.001$; Фиг. 9).

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

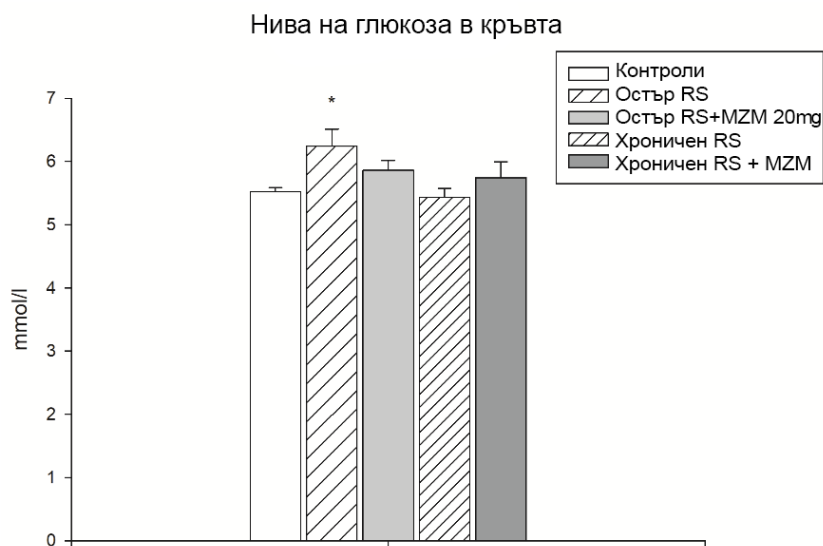


Фиг. 10 Ефекти от остър и хроничен RS върху свежата маса на слезката. Данните са представени като средни \pm SEM проценти от телесната маса, $n = 8$; * $p < 0.05$ vs Controls.

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. 10). Острият стрес и третирането с MZM не оказва влияние върху масата на този орган. Нито едно от въздействията (стрес или алкалоидна фракция) не оказва съществено влияние върху процентното съотношение на свежата маса на изолираните надбъбречни жлези спрямо телесната маса на изследваните плъхове (Фиг. 11).



Фиг. 11 Ефекти от остър и хроничен RS промени върху свежата маса на надбъбречната жлеза (усреднена стойност от двете жлези). Данните са представени като средни \pm SEM проценти от телесната маса.



Фиг. 12 Ефекти от остър и хроничен RS върху нивото на глюкоза в кръвта. Данните са представени като средни \pm SEM проценти от телесната маса.

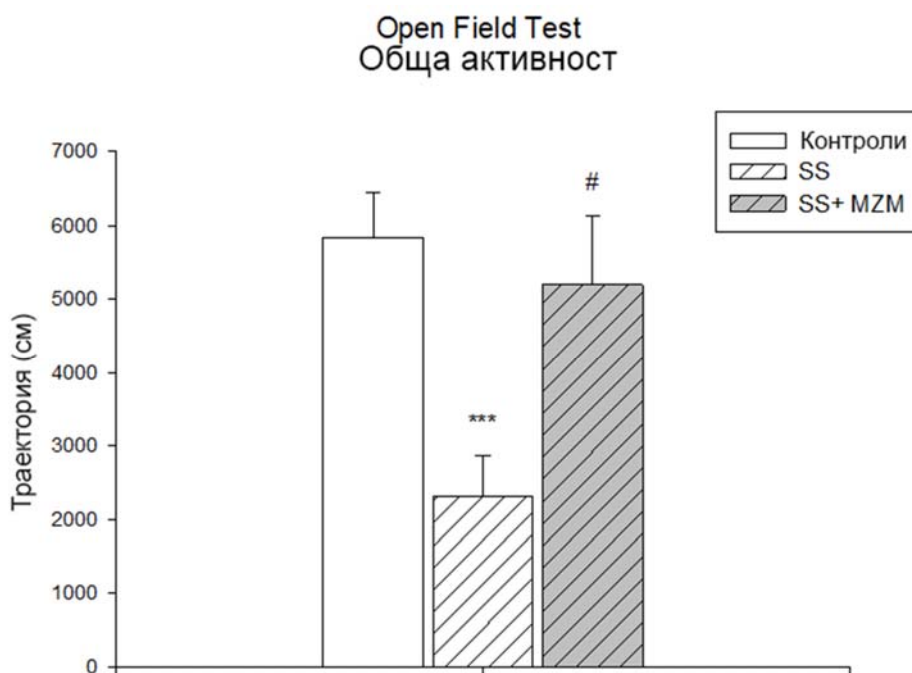
Острият RS предизвиква покачване на нивото на глюкоза в кръвните проби ($N = 5.334$, $* P = 0.021$), а претретирането с MZM премахва стрес-индуцирания ефект (Фиг. 12).

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

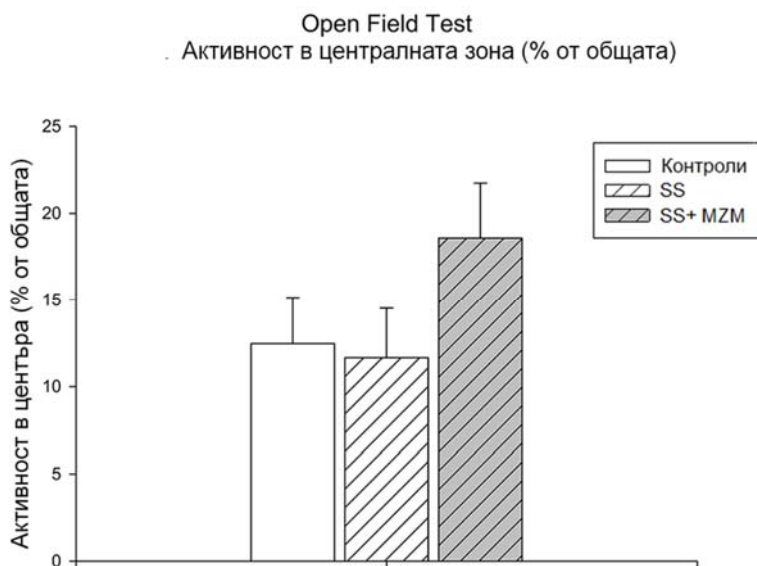
2.1. Ефекти върху изследователското поведение в непозната среда (Open Field Test).

Анализът на данните за общата хоризонтална активност (дължина на изминатата траектория във всички зони на апарата) показва драстичен спад на двигателната активност при животните, подложени на SS ($F_{1,15} = 18.190$, $***p < 0.001$). Третирането с МЗМ премахва напълно стрес-индуцираната хиполокомоция ($F_{1,15} = 7.026$, $\#p = 0.019$; фиг.13).

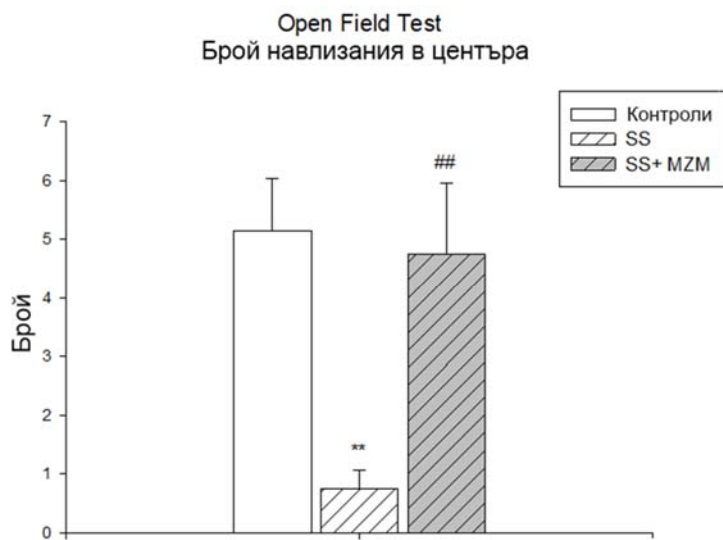
Данните на фиг. 14 показват, че хиполокомоцията не е свързана с промяна в изминатата траектория в централната аверсивна зона на апарата. Тези данни обаче не отчитат първоначалната траектория, която животното изминава от момента на поставянето му в центъра на апарата до достигане на периферната или ъглова зони.



Фиг. 13 Влияние на хроничния социален стрес (SS) върху изследователското поведение (обща двигателна активност) в непозната среда (Open Field Test). Данните са представени като средни стойности \pm SEM, $***p < 0,001$ спрямо нетретираните контроли, $\#p < 0.05$ спрямо подложените на социален стрес, третираните с физиологичен разтвор.



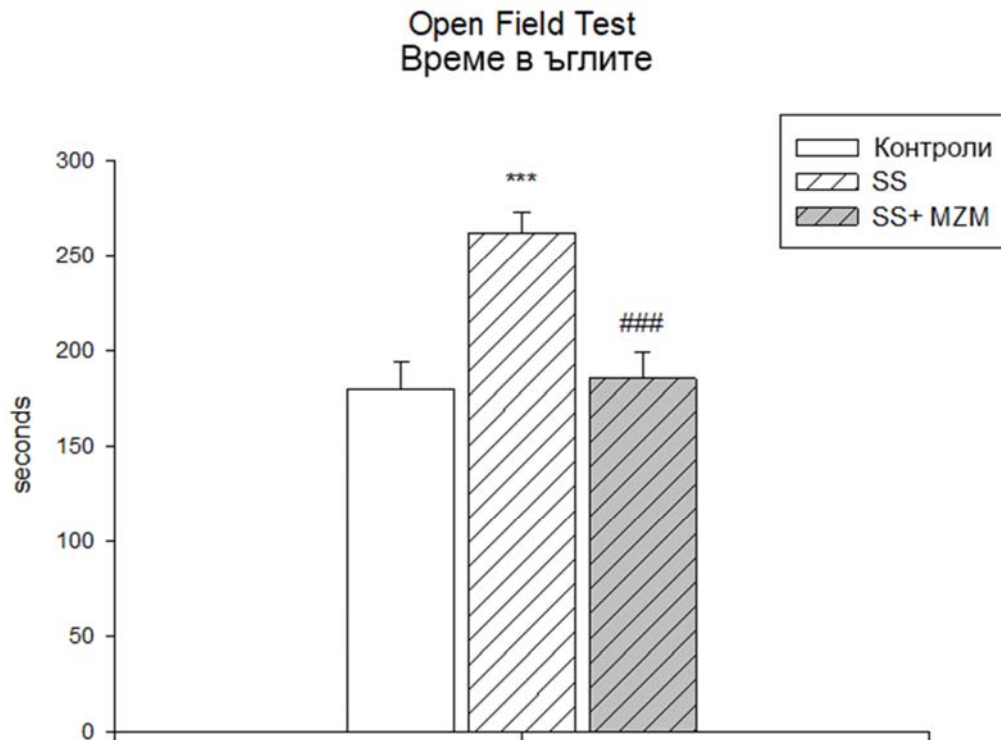
Фиг. 14 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху относителната двигателна активност в централната аверсивна зона (Open Field Test) при млади мъжки плъхове Wistar. Данните са представени като средни стойности \pm SEM.



Фиг. 15 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 \pm SEM, *** $p < 0,001$ спрямо нетретираните контроли, # $p < 0.05$ спрямо подложените на социален стрес, третирани с физиологичен разтвор.

На фиг. 15 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. 16 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 ($H = 9.763$, $***P(\text{exact}) = <0.001$), а съвместното прилагане на стрес и MZM напълно елиминира ефекта на стреса ($F_{1,15} = 19.291$, $### p < 0.001$).

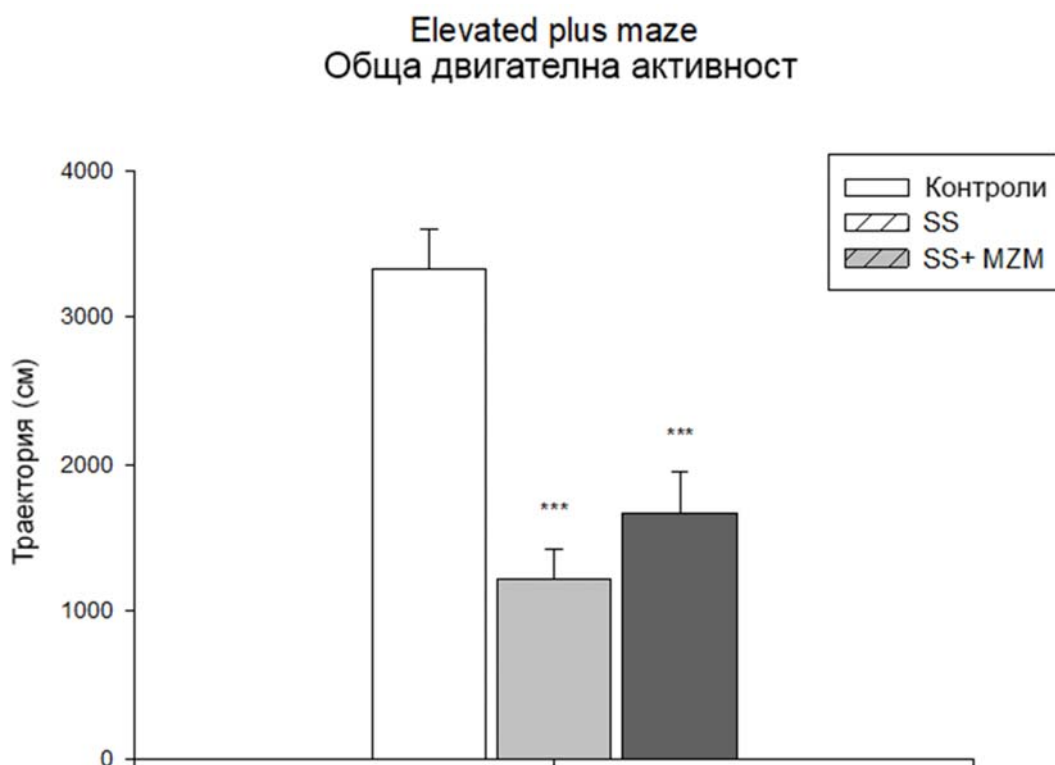


Фиг. 16 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху поведението на покой в защитените зони на непозната среда (Open Field Test) при млади мъжки плъхове Wistar. Данните са представени като средни стойности \pm SEM, $***p < 0,001$ спрямо нетретираните контроли, $### p < 0,001$ спрямо подложените на социален стрес, третиран с физиологичен разтвор.

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

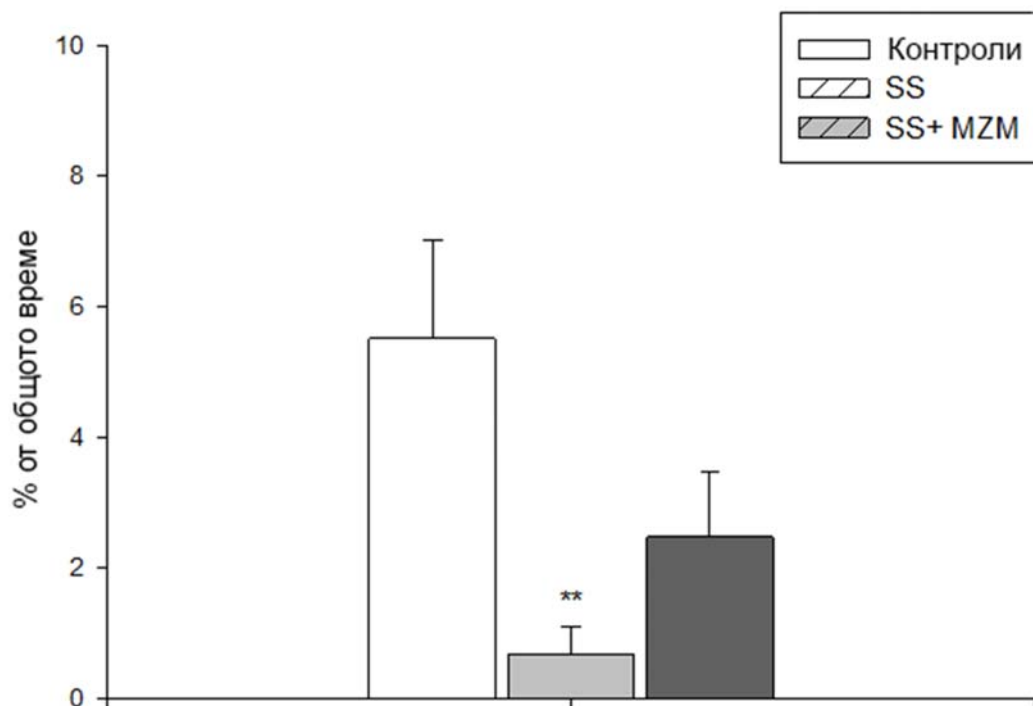
Данните от теста за изследване на поведение на безпокойство показаха достоверно понижаване на общата двигателна активност при стресираните групи животни, третирани с MZM или с физиологичен разтвор ($F_{1, 16} = 33.080$, $***p < 0.001$; $F_{1, 18} = 17.909$, $***p < 0.001$, фиг. 17).

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. 18). Третирането с алкалоидната фракция понижи анксиогенния ефект на стреса ($F_{1, 16} = 2.334$, $p = 0.147$).



Фиг. 17 Влияние на хроничния социален стрес (SS) върху изследователското поведение в аверсивна среда (Elevated Plus Maze Test). Данните са представени като средни стойности \pm SEM, $***p < 0,001$ спрямо нетретираните контроли.

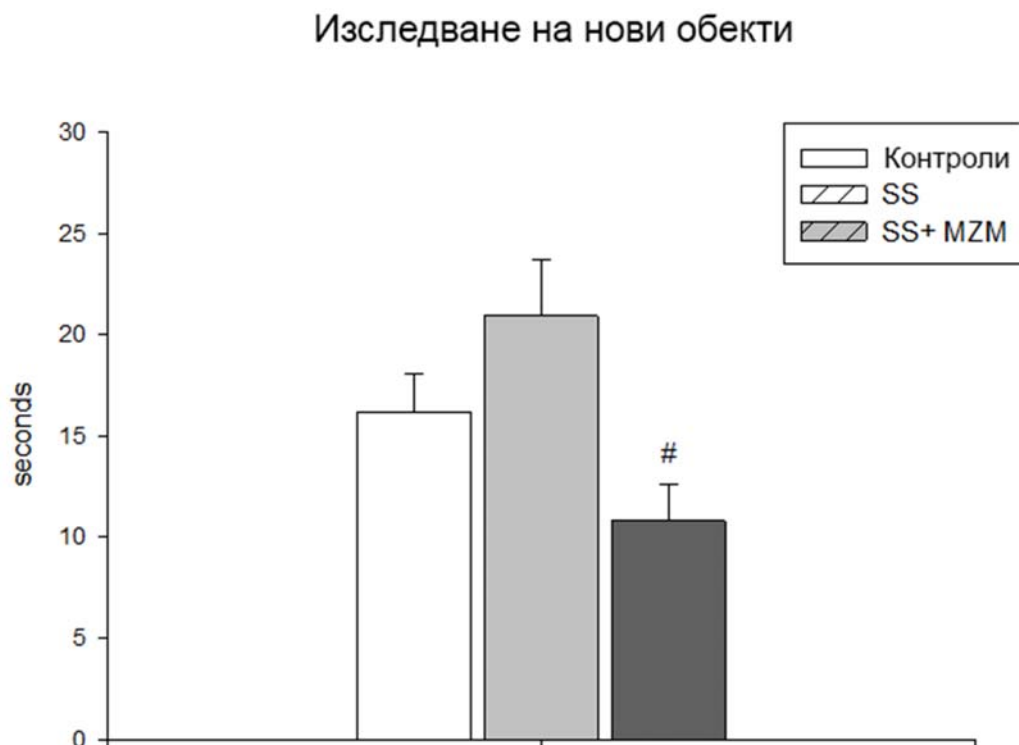
Elevated plus maze Време в отворените рамене / общо време



Фиг. 18 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 \pm SEM, $**p < 0,01$ спрямо нетретираните контроли.

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

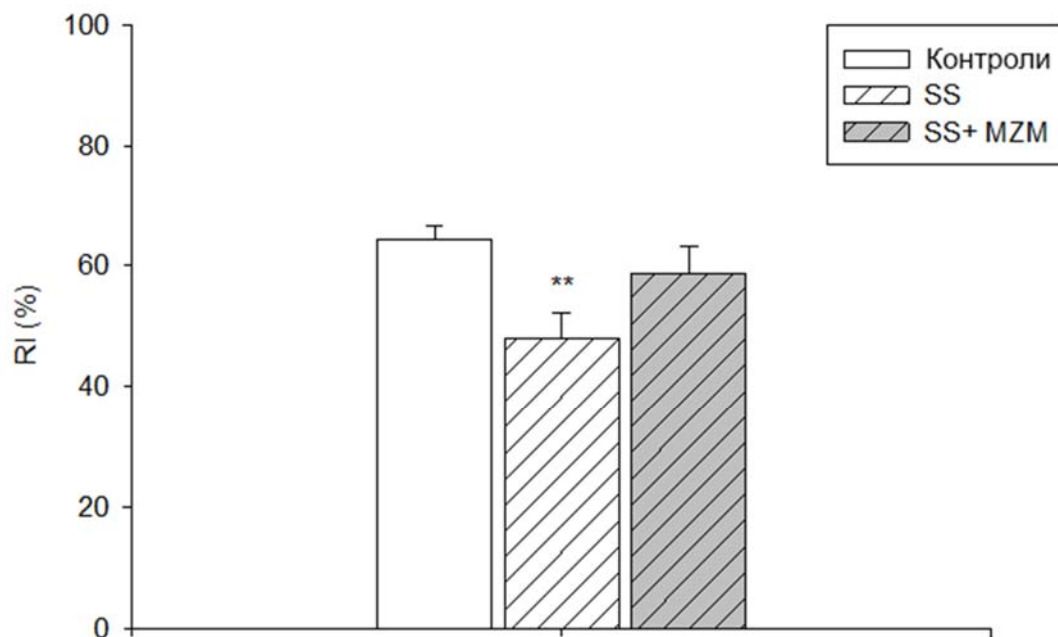
Хроничният социален стрес не промени съществено мотивацията за проучване на нови обекти, което се вижда от времето за изследване на обекти по време на обучителната фаза на теста (фиг. 19). Комбинираното прилагане на социален стрес с MZM съкрати времето на проучване ($F_{1, 16} = 9.300$, $\# p = 0.008$; фиг. 23), което е характерно за импулсивния тип поведение.



Фиг. 19 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 \pm 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 ($H = 6.699$, $**P(\text{exact}) = 0.007$) и че третирането с MZM облекчава стрес-индуцираната амнезия до нива, близки до контролите (фиг. 20).

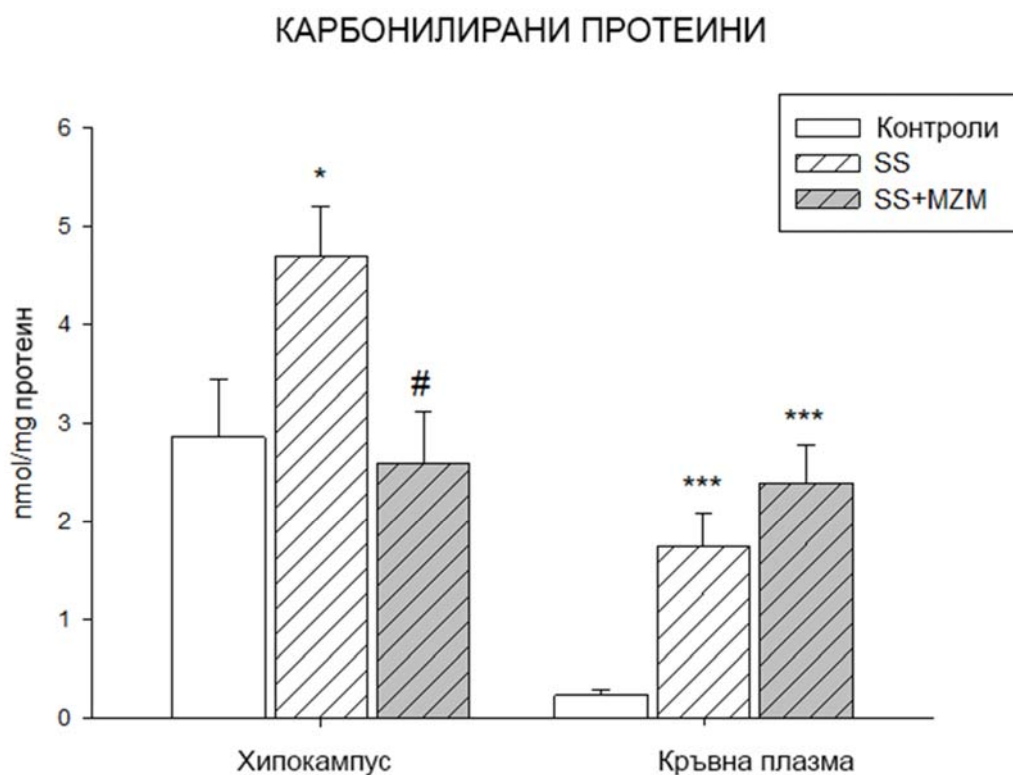
Novel Object Recognition Test



Фиг. 20 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.

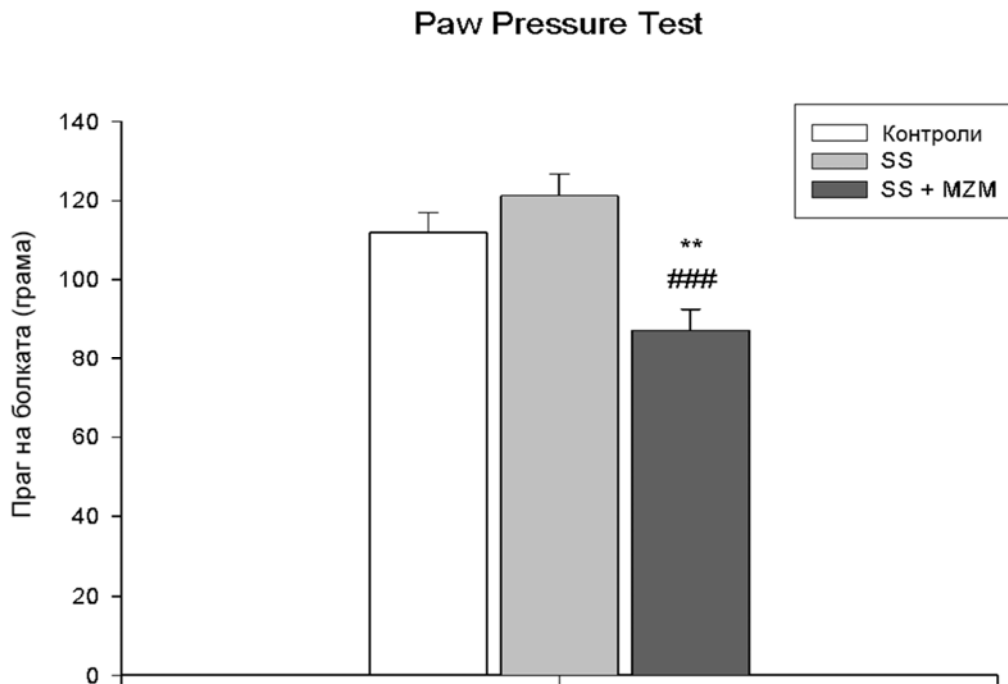


Фиг. 21 Влияние на хроничния социален стрес (SS) върху нивото на увредените, карбонилирани протеини в изолиран хипокампус и кръвна плазма. Данните са представени като средни стойности \pm SEM, * $p < 0,05$ и *** $p < 0,001$ спрямо нетретираните контроли # $p < 0,05$ спрямо подложените на социален стрес, третиран с физиологичен разтвор.

Данните на фиг. 21 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 ($H = 9.054$, * $P(\text{exact}) = 0.001$). 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. 22 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 ($F(1, 15) = 10.889$, $**p = 0.005$; $F(1, 14) = 18.506$, $###p < 0.001$).



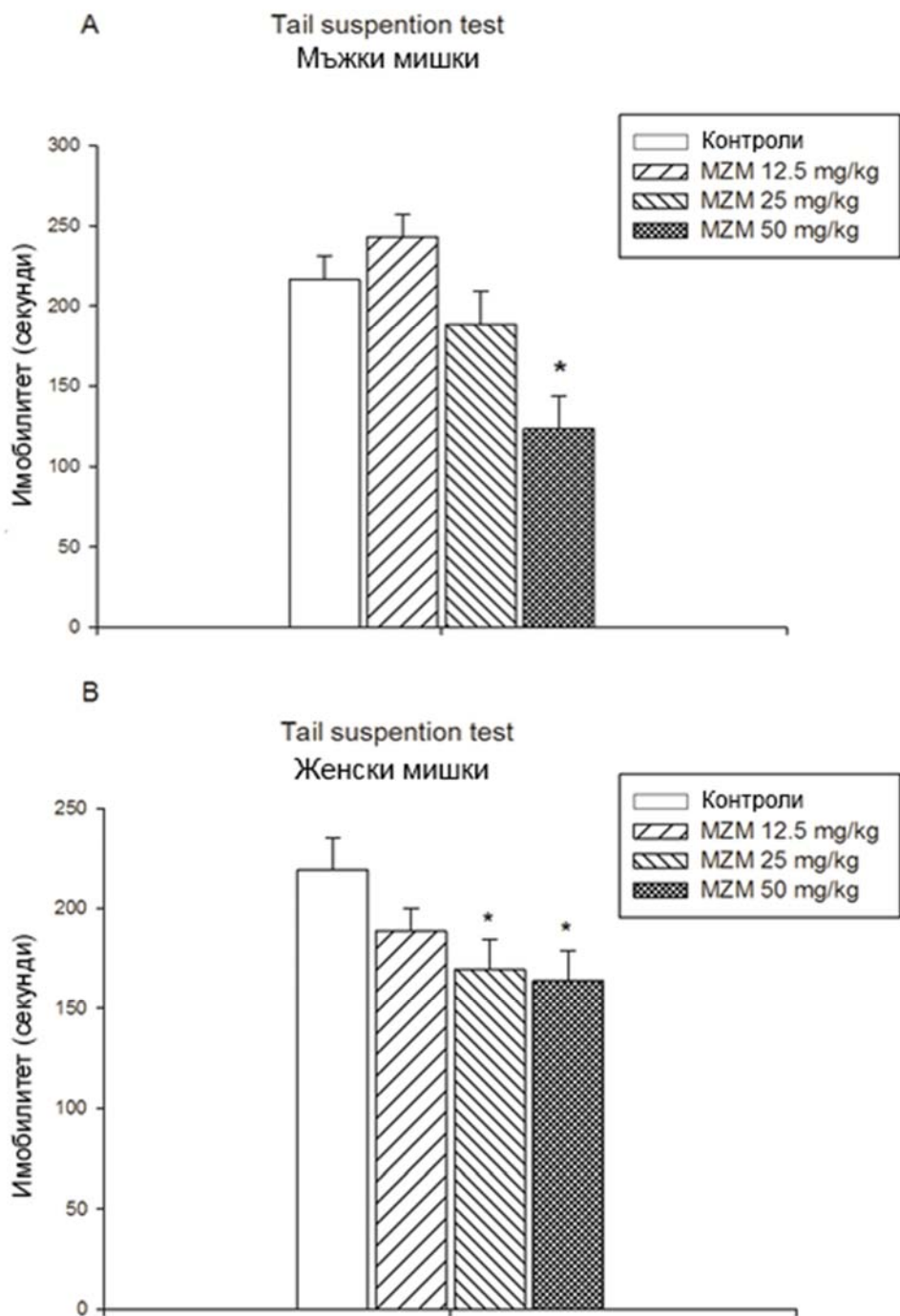
Фиг. 22 Влияние на хроничния социален стрес (SS) и третирането с MZM върху болковата чувствителност (Paw Pressure Test) при млади мъжки плъхове Wistar. $*p < 0,05$ спрямо нетретираните контроли, $\#p < 0,05$ спрямо подложените на социален стрес, третирани с физиологичен разтвор.

3. Определяне на минимална ефективна доза на мезембриновата фракция

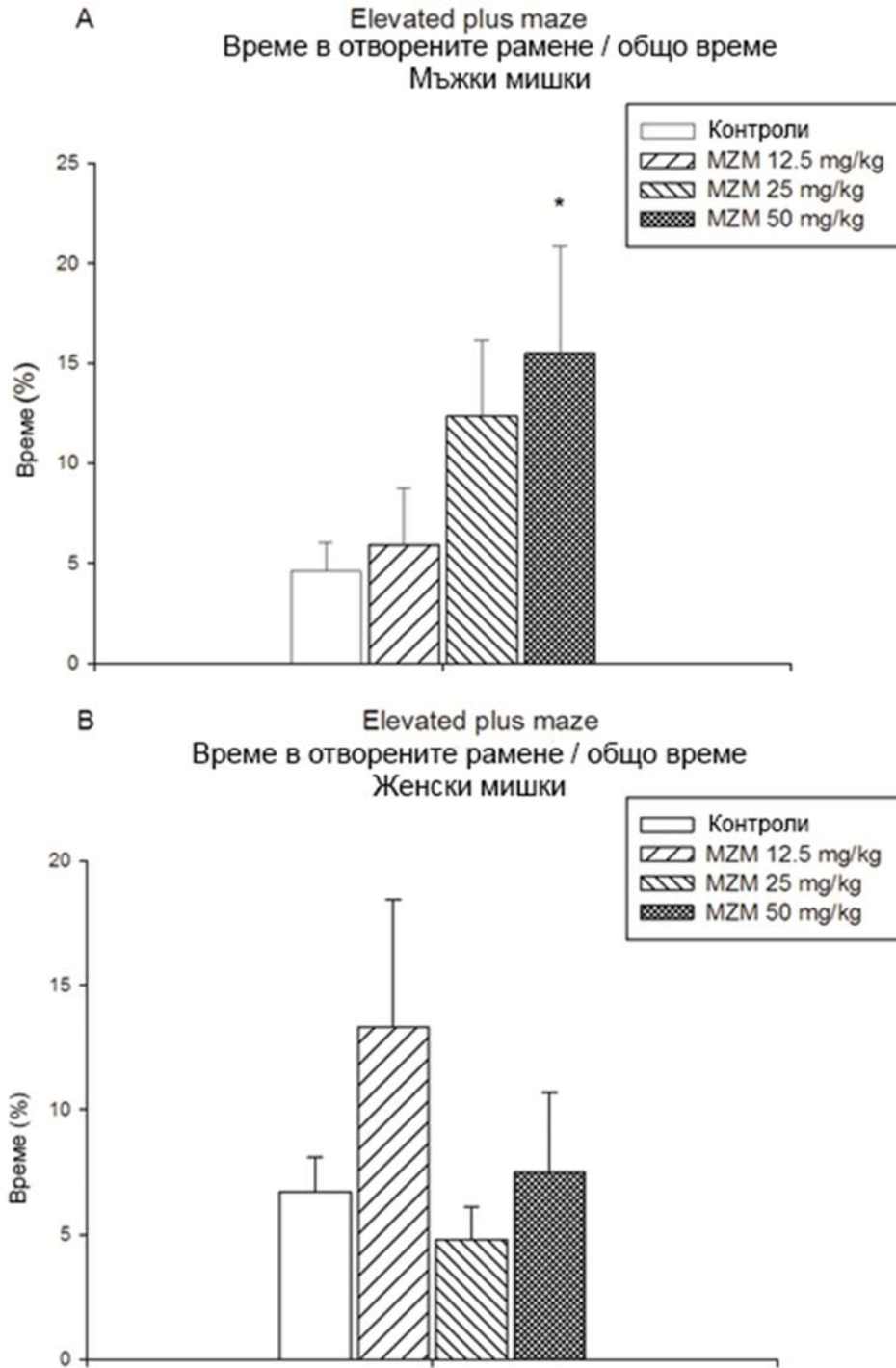
3.1. Данни за анксиолитичния и антидепресантен ефект на еднократни дози мезембринова фракция алкалоиди у мишки.

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.23 А и В).

При изследване на поведението на безпокойство в непозната и аверсивна среда установихме, че само най-високата използвана доза МЗМ оказва анксиолитичен ефект у мъжки здрави контролни животни (H = 5.513, P = 0.019) (Фиг. 24А и В).

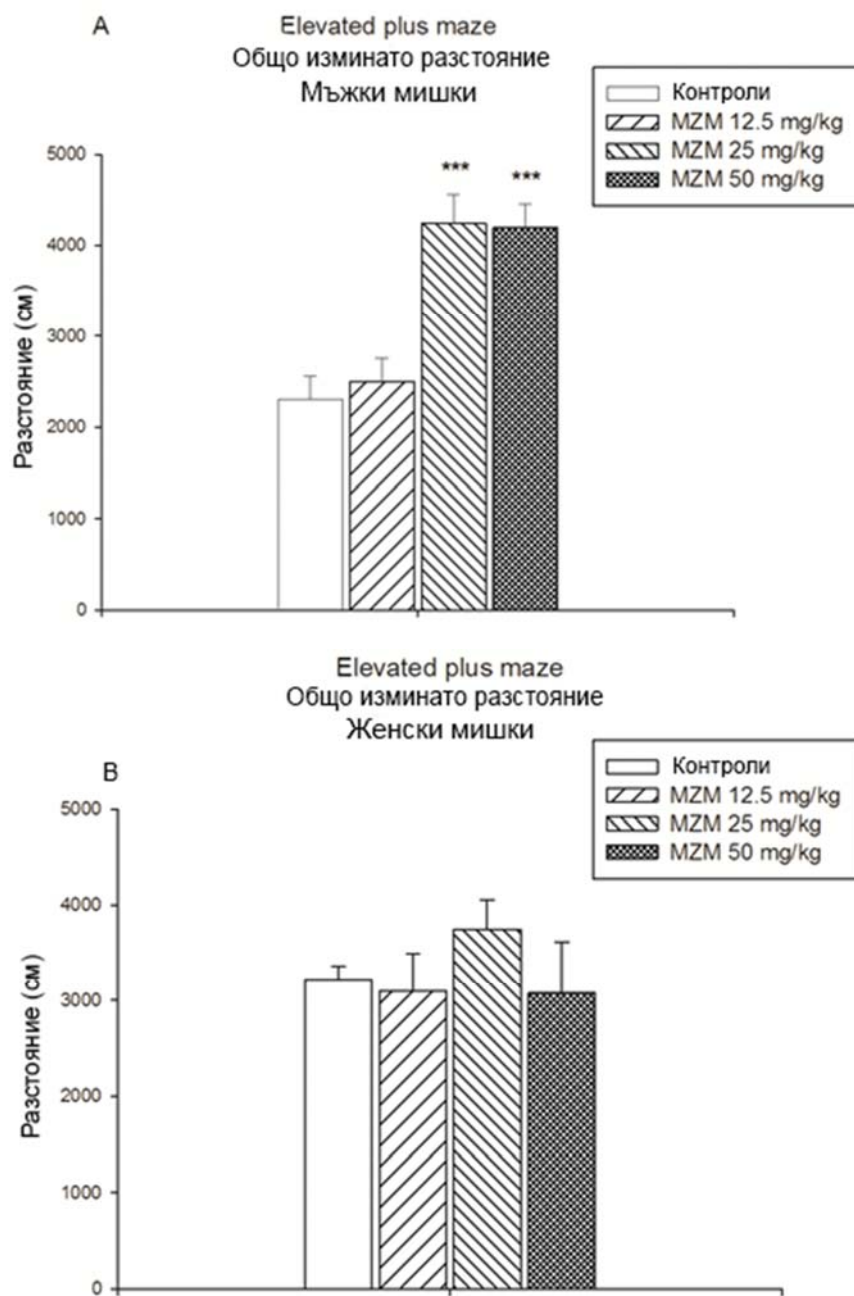


Фиг. 23 Влияние на еднократни дози мезембринова фракция алкалоиди върху депресивно-подобното поведение (*immobility time*), изследвано с “Tail suspension test” у мъжки (A) и женски (B) мишки. $N=8$, * $p<0.05$ спрямо контролите.



Фиг. 24 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. 25 Влияние на еднократни дози мезембринова фракция алкалоиди върху общата хоризонтална двигателна активност (дължина на изминатата траектория), изследвана с "Elevated plus maze test" у мъжки (A) и женски (B) мишки. N=8, * p<0.05 спрямо контролите.

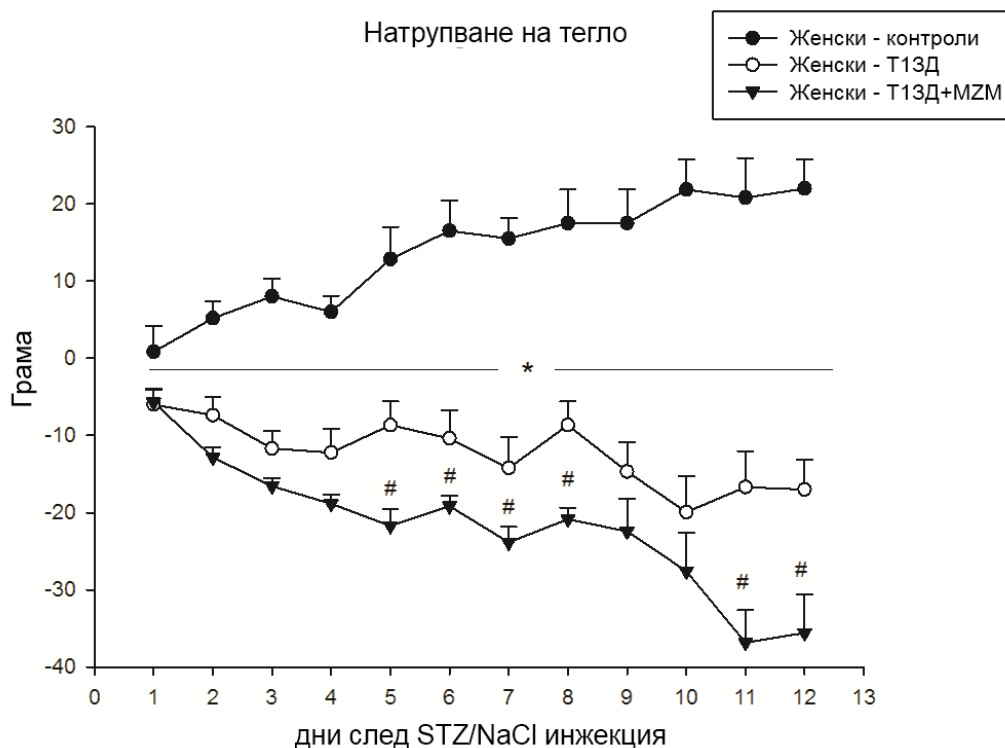
Еднократно инжектираните дози 25 и 50 мг/кг телесна маса MZM предизвика значително повишаване на общата двигателна активност у мъжки мишки (F 1, 17 =

22.781, $p < 0.001$; $F_{1, 1} = 27.032$, $p < 0.001$), но не оказва значим ефект у женските животни (Фиг. 25 А и В)

4. Данни от експериментален модел на Т1ЗД при плъхове.

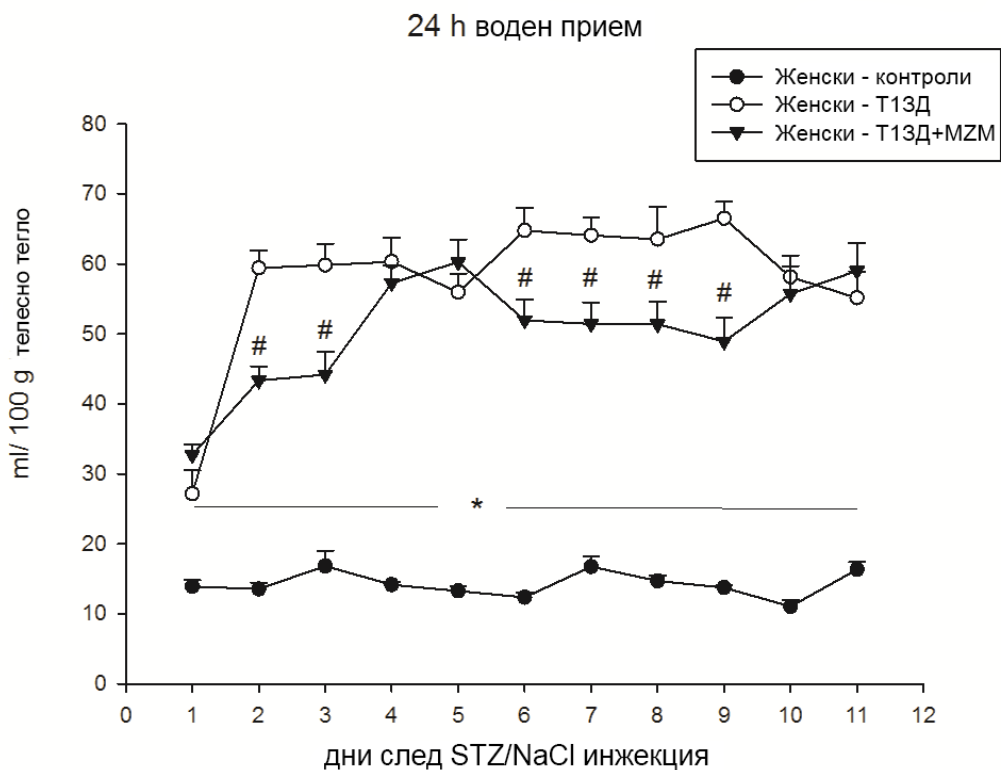
4.1. Телесната маса, денонощния прием на храна и вода и екскрецията на урина.

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. 26). Третирането с МЗМ достоверно засили диабет-индуцираното намаляване на телесната маса след пети ден от прилагането на стрептозотоцина ($F_{1, 200} = 38.564$, $\# p < 0.001$).



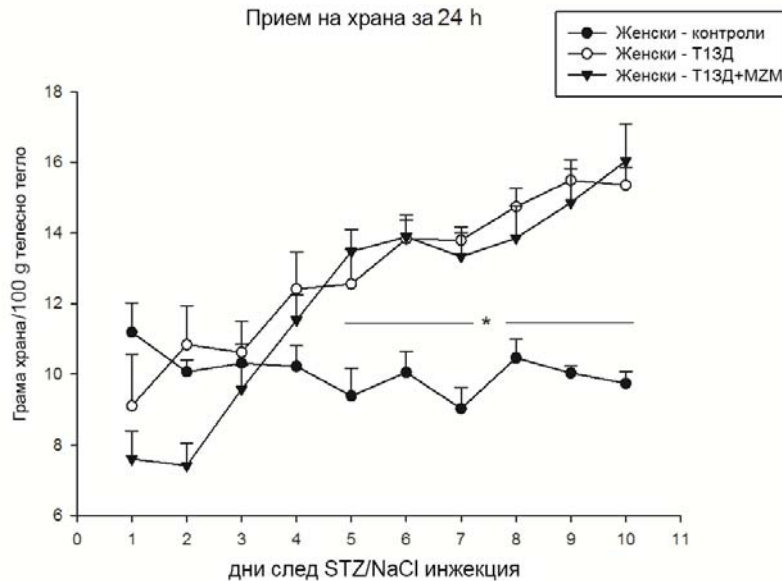
Фиг. 26 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху телесната маса на женски плъхове. $N=8$, $* p < 0.05$ спрямо здравите контроли, $\# p < 0.05$ спрямо диабетните плъхове, инжектирани с физиологичен разтвор.

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. 27).



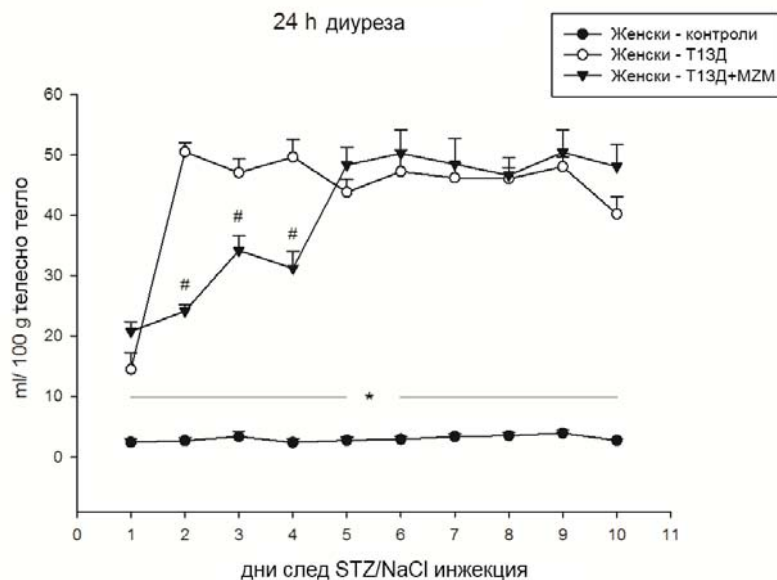
Фиг. 27 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху денонощния прием на вода на женски плъхове. $N=8$, * $p<0.05$ спрямо здравите контроли, # $p<0.05$ спрямо диабетните плъхове, инжектирани с физиологичен разтвор.

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. 28).



Фиг. 28 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. 29).

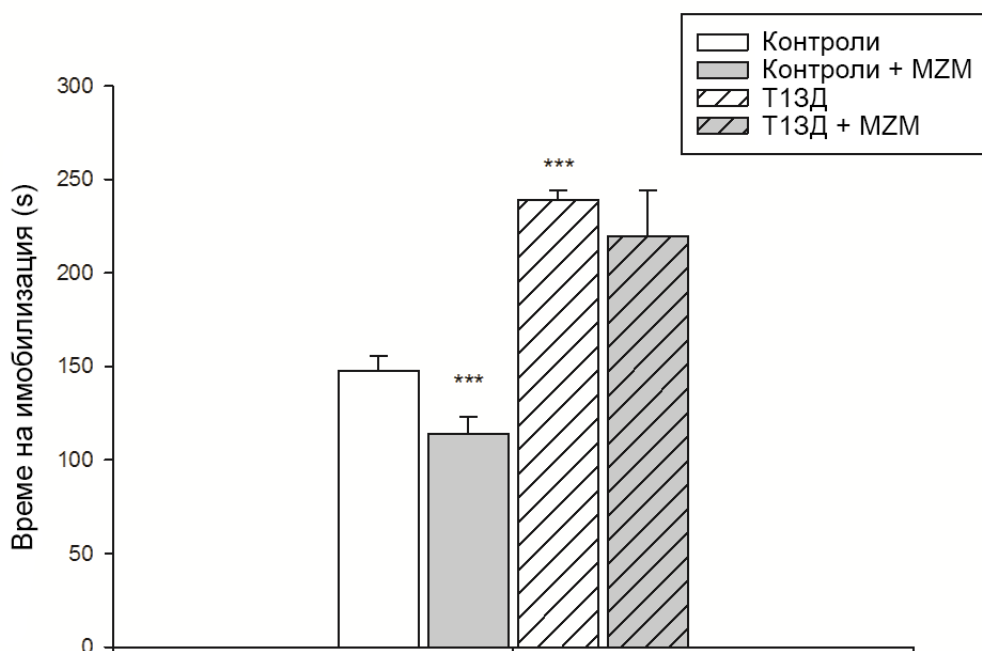


Фиг. 29 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху денонощната екскреция на урина у женски плъхове. $N=8$, $*p<0.05$ спрямо здравите контроли; $\#p<0.05$ спрямо диабетните плъхове, инжектирани с физиологичен разтвор.

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.30).

Forced Swimming Test при плъхове

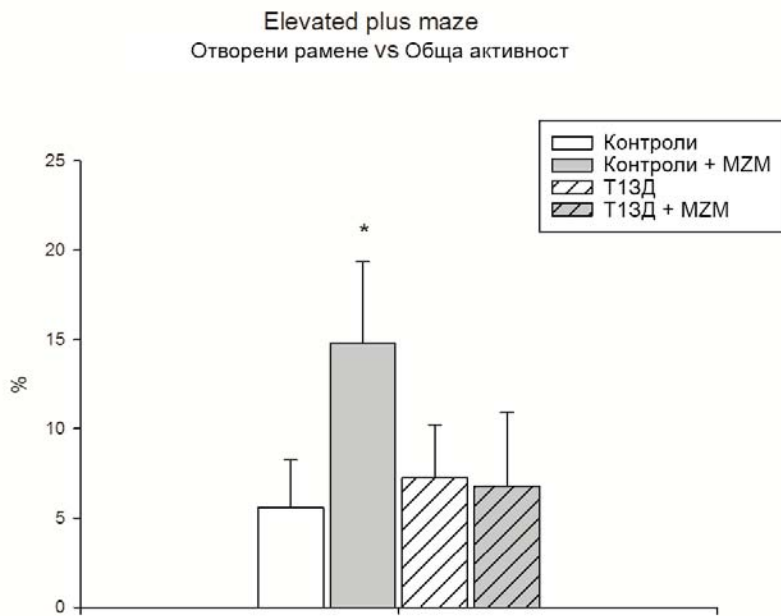


Фиг. 30 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху поведението на безпокойство (immobility time) у женски плъхове. $N=8$, * $p < 0.05$ спрямо здравите контроли.

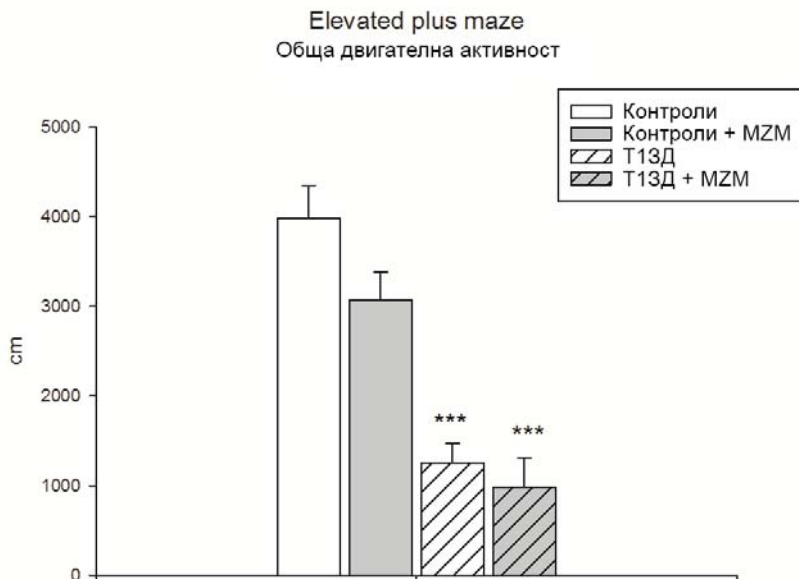
4.3. Данни за поведението на безпокойство у диабетни женски плъхове от порода Wistar.

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 показва ефект върху плъховете с T13Д (фиг.31). Анксиолитичният ефект на фракцията у здравите животни не е свързано с повишена обща двигателна активност, но T13Д понижава значително

двигателната активност ($F_{1, 19} = 41.385, p < 0.001$) и третирането с MZM не повлиява диабет-индуцираната хипоактивност (фиг. 32).



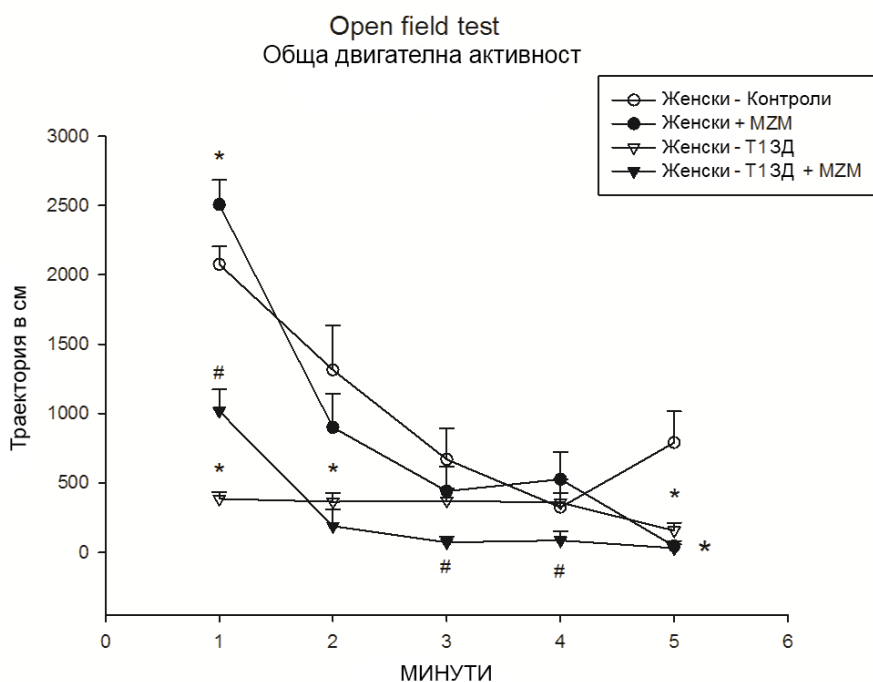
Фиг. 31 Влияние на експериментален модел на захарен диабет тип 1 и хроничното третиране с мезембринова фракция алкалоиди върху поведението на безпокойство (процентно съотношение на траекторията, измината в отворените рамене, спрямо общата измината траектория) при тест „повдигнат кръстосан лабиринт“ у женски плъхове. $N=8, * p < 0.05$ спрямо здравите контроли.



Фиг. 32 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 T13Д, $F_{1, 75} = 31.859$, $p < 0.001$) 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, $F_{1, 36} = 14.419$, $p < 0.001$). При плъховете с T13Д отчетохме нарушена хабитуация през първите четири минути и затихване само в пета минута след началото на теста (фактор време, $F_{1, 24} = 6.866$, $p < 0.001$). Хроничното третиране с фракция мезембринови алкалоиди не промени значително двигателната активност на здравите плъхове, но подобри тяхната хабитуация в непозната среда ($F_{1, 80} = 27.908$, $p < 0.001$) (Фиг.33).



Фиг. 33 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.

V. 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 & Jensch 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 реакции 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 & Birnhaer, 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 медиранни 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 показва 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 raw-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 когнитивната 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 хипокампадна 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; Ennauer 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 създавало 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 подобрене 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, остро 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 оказва 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 подложени 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 надправено 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. Атенуираният 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 протеини 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 органични системи (Wu et al., 2016; Feng et al., 2008; Jha&Rizvi, 2011; Rabek&Boylston, 2003). Особен интерес представляват данните, че при остаряващи плъхове хипокампа 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 хипокампа нива

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 Т13Д при плъхове и ефекти на хронично третиране с MZM.

При експерименталния модел на Т13Д 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 Т13Д. Намаленото телесно тегло при Т13Д 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 подобрене 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 (неужда 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 характеризирание 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.

VI. 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, 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 предизвиква 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 оказва 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.

VII. Приноси

1. Анализът на данните от различни експериментални методи и подходи потвърждава увреждащите въздействия от неконтролирания захарен диабет, от прилагането на имобилизационен и социален стрес 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.

VIII. 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, 35(14), 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.

