

**Медицински университет „Проф. д-р П. Стоянов“ –
Варна
Факултет „Медицина“
Катедра по предклинична и клинична фармакология**

д-р Антоанета Борисова Георгиева

**ПСИХОФАРМАКОЛОГИЧНИ ЕФЕКТИ НА
ФЕНОЛНИ КИСЕЛИНИ В
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ФАРМАКОЛОГИЧНИ
ПРОУЧВАНИЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Варна, 2016 г.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедрен съвет на Катедрата по предклинична и клинична фармакология при Медицински университет – Варна, състояло се на 10.02.2016 г., и е насочен за публична защита пред научно жури в състав:

- 1. Проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н. – председател (становище)*
- 2. Проф. Рени Калфин, доктор (рецензия)*
- 3. Доц. д-р Мария Желязкова-Савова, д.м. (рецензия)*
- 4. Проф. д-р Стиляна Петкова Белчева, д.м. (становище)*
- 5. Проф. д-р Иванка Костадинова, д.м. (становище)*

Дисертационният труд съдържа общо 163 страници, онагледен е с 21 фигури и 19 таблици. Книгописът включва 308 заглавия на латиница.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 26.04.2016 г. от 11.00 ч. в Трета аудитория на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на често използваните съкращения.....	4
I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	8
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	9
1. Материали.....	9
1.1. Опитни животни.....	9
1.2. Експериментални вещества.....	9
2. Експериментални методи.....	9
2.1. Поведенчески методи.....	9
2.2. Статистически методи.....	12
IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	13
1. Ефекти на хлорогенова, ферулова, галова киселина и кверцетин върху изследователското поведение и двигателната активност в апарат Opto varimex.....	13
1.1. Ефекти на хлорогенова, ферулова, галова киселина и кверцетин върху изследователското поведение на животните.....	13
1.2. Ефекти на хлорогенова, ферулова, галова киселина и кверцетин върху двигателната активност на животните.....	29
1.3. Дискусия.....	37
2. Ефекти на хлорогенова, ферулова, галова киселина и кверцетин върху паметта и обучението.....	39
2.1. Метод за пасивно избягване - step through.....	39
2.2. Метод за активно двупосочно избягване - shuttle box.....	46
2.3. Дискусия.....	52
3. Ефекти на хлорогенова, ферулова, галова киселина и кверцетин върху тревожното поведение в повдигнат кръстосан лабиринт (elevated plus maze – тест).....	57
3.1. Резултати.....	58
3.2. Дискусия.....	71
4. Обобщена дискусия.....	73
V. ИЗВОДИ.....	75
VI. СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	77
VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	78
VIII. СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	79

Списък на често използваните съкращения

ХК – хлорогенова киселина

ФК – ферулова киселина

ГК – галова киселина

Кв – кверцетин

КК – кафеена киселина

Стах – максимална плазмена концентрация

Tмах – време за достигане на максимална плазмена концентрация

СЧТ – стомашно-чревен тракт

AUC – площ под кривата

P-gr – P-гликопротеин

LDL – low-density lipoproteins, нископлътностни липопротеини

SOD – супероксиддисмутаза

NO – азотен оксид

TNF- α – тумор-некротис фактор α

IкВ α – инхибиторен фактор капа-бета алфа

NF-кВ – нуклеарен фактор капа-бета

IL – интерлевкин

АТФ – аденозин трифосфат

БДЗ – бензодиазепини; бензодиазепинови

GABA, ГАМК – гама-аминомаслена киселина

PTZ – phenyltetrazole

eNOS - ендотелна NO-синтетаза

BDNF - brain-derived neurotrophic factor, мозъчен невротрофичен фактор

CREB - cAMP response element binding protein

5-НТ – 5-хидрокситриптамин, серотонин

NMDA – N-метил-D-аспарат

COX-2 – циклооксигеназа-2

MAO-A – моноаминооксидаза-A

iNOS – индуцируема NO-синтетаза

CYP - цитохром P450

IgE – имуноглобулин E

PPAR (α ; γ) – peroxisome-proliferator activated receptors (α ; γ)

ANP – атриален натриуретичен пептид

BNP – мозъчен натриуретичен пептид

HBV – хепатит В вирус

HBsAg – повърхностен антиген на хепатит В вируса

VEGF - васкуларен ендотелиален растежен фактор

PDGF – platelet-derived growth factor, извлечен от тромбоцити растежен фактор

HPLC – високоефективна течна хроматография

АСЕ - ангиотензин-конвертиращ ензим

НСПВЛ – нестероидно противовъзпалително лекарство

LDH – лактат-дехидрогеназа

АДФ – аденозин дифосфат

СХП – спонтанно хипертензивни плъхове

ХОББ – хронична обструктивна белодробна болест

АМРК - АМФ-активирана протеин-киназа

Pg (D2; E2) – простагландин (D2; E2)

GM-CSF – гранулоцито-макрофагеален колония-стимулиращ фактор

I. ВЪВЕДЕНИЕ

През цялата си история човечеството е търсило начини за борба със заболяванията. От древността до 19 век най-много жертви са взимали инфекциозните заболявания и травматизма. С развитието на съвременното общество и откриването на множество лекарства значението на тези фактори постепенно е намалявало и днес най-сериозен „принос“ за влошаване на човешкото здраве са социално значимите хронични заболявания, сред които и психичните такива като деменциите и тревожно-депресивните разстройства. Различните форми на деменция (напр. болест на Алцхаймер, съдова деменция) са често срещани в съвременното общество и са свързани със значително влошаване на качеството на живот най-вече на възрастното население и сериозни разходи за обществото. С увеличаване продължителността на живот голямо значение придобива и естественото влошаване на когнитивните функции с възрастта. Към 2020 г. се очаква заболелите от деменция да са 29 милиона, 2/3 от които да страдат от болестта на Алцхаймер (Dufouil et Alperovitch, 2005). Тревожните разстройства са едни от най-честите психични разстройства, при които пациентът изпитва продължително безпокойство. Тревожността често се съчетава с депресия, хранителни разстройства и др. (Kessler et Greenberg, 2002). Установено е, че през 2010 г. 273 милиона души (4.0% от световната популация) страдат от тревожни разстройства (Vos et al., 2012).

Приложението на класическите фармакологични средства за лечение често е съпроводено с разнообразни и неприятни странични ефекти. Осъзнаването на този факт кара учените все повече да се насочват към целенасочено търсене на фармакологично активни вещества от природни източници, които като цяло се свързват с минимални странични ефекти (Tapas, 2008). Все още малка част от растителните източници са характеризирани по отношение на техните активни компоненти и действие, но значителни усилия на обществото и учените в момента са насочени именно в тази посока.

Полифенолите са едни от най-широко разпространените растителни съединения. Четирите основни класа полифенолни съединения са флавоноидите, стилбените, лигнаните и фенолните киселини. Хлорогеновата, феруловата и галовата киселина са част от фенолните киселини, а кверцетинът е представител на флавоноидите. Тези вещества са изследвани по отношение на някои техни ефекти – антиоксидантен (Siquet et al., 2006; Trombino et al., 2004; Ferik et al., 2011; Hanasaki et al., 1994; Haenen et Bast, 1999), хепатопротективен (Ji et al., 2013; Kim H-Y et al., 2011; Rasool et al., 2010; Lee ES et al., 2003), противовъзпалителен (Domitrović et al., 2014; Kim H-Y et al., 2011; Yoon et al., 2013; Morikawa et al., 2003), антидиабетен (Ong et al., 2013; Balasubashini et al., 2003; Gandhi et al., 2014; Coskun et al., 2005) и др. Съществуват някои проучвания и на ефектите на тези вещества в нервната система (Kwon S-H et al., 2010; Yan et al., 2001; Mansouri et al., 2013b; Mohammadi et al., 2014). Повечето от тези изследвания обаче са провеждани в условията на модели на различни заболявания. Малко или никакви данни съществуват по отношение на ефектите на веществата у здрави индивиди. Затова настоящият труд е насочен към установяване на ефектите на хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) върху двигателната активност, паметовите и обучителни функции и тревожното поведение на

млади и здрави плъхове. Проучването на тези ефекти на фенолните киселини и кверцетин биха спомогнали за разширяване на познанията за техните фармакологични ефекти и евентуалното им последващо използване в профилактиката и лечението а социално значими психични заболявания като деменциите и тревожните разстройства.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

За да допълним вече известните данни за фармакологичните ефекти на фенолните киселини хлорогенова, ферулова и галова, си поставихме за **ЦЕЛ**

Да се изследват психофармакологичните ефекти при млади/здрави плъхове на фенолните киселини хлорогенова, ферулова и галова, приложени в еднаква ниска доза, и тези ефекти да се сравнят с ефектите на флавоноида кверцетин, приложен в същата доза.

За изпълнението на тази цел си поставихме следните **ЗАДАЧИ**

1. Да се изследват ефектите на фенолните киселини хлорогенова, ферулова и галова върху двигателната активност при млади/здрави плъхове и да се сравнят с ефектите на флавоноида кверцетин.
2. Да се изследват ефектите на фенолните киселини хлорогенова, ферулова и галова върху паметта и обучението при млади/здрави плъхове и да се сравнят с ефектите на флавоноида кверцетин.
3. Да се изследват ефектите на фенолните киселини хлорогенова, ферулова и галова върху тревожното поведение при млади/здрави плъхове и да се сравнят с ефектите на флавоноида кверцетин.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Експериментални животни

Опитите са провеждани върху мъжки Wistar плъхове (200 – 240 g), които са отглеждани в пластмасови клетки в добре вентилирана стая при температура 20-25 °С, 12-часов цикъл на светлина/тъмнина и при неограничен достъп до храна и вода.

Всички процедури по третирането на животните и експериментите са извършвани в съответствие с правилата на комисията по етика на Института по невробиология, Българска академия на науките (регистрация FWA 00003059 от американското министерство на здравеопазването и човешките ресурси), които са в съответствие с националните закони и правила, основаващи се на Европейската директива (ЕЕС Council Directive 86/609, 1987).

1.2. Експериментални вещества

Използвани са хлорогенова киселина, ферулова киселина, галова киселина и кверцетин на фирма Sigma-Aldrich (Germany).

2. Методи

2.1. Поведенчески методи

2.1.1. Метод за определяне на промените в двигателната активност и изследователското поведение чрез апарат Opto Varimex

Промените в изследователското поведение се проследяват съгласно метода на Kohler and Lorens (1978) чрез апарат Opto Varimex (Columbus Instruments, USA).

Експерименталната камера е с размери 50 x 50 x 21 cm. Апаратът е конструиран на принципа на фотоклетката – регистрира броя на пресичанията на инфрачервените светлинни лъчи при движението на животното в условни единици (УЕ), което позволява избирателно отчитане на броя на хоризонталните и вертикалните движения за определен период от време. Животното се поставя в центъра на експерименталната камера и всяко пресичане на лъч от движение на животното автоматично се регистрира като импулс и се записва от компютъра на всяка минута. Всички експерименти се провеждат по едно и също време (между 9.00 и 13.00 h). Преди всеки тест апаратът се почиства и подсушава.

Броят на хоризонталните и вертикалните движения за всяка минута до петата служи за мярка за изследователската активност и привикването към новата среда (хабитуация). Общият брой движения за първите 5 min, както и за целия 10-минутен период, е мярка за двигателната активност.

2.1.2. Методи за определяне на степента и динамиката на обучението и запаметяването при плъхове

2.1.2.1. Метод за обучение за активно двупосочно избягване – shuttle box

Обучението за активно двупосочно избягване чрез отрицателно подкрепление е проведено по метода на Bovet et al. (1969), модифициран от Petkov et al. (1993).

Обучението се осъществява в апарат shuttle box. Апаратът представлява камера (50 x 29 x 21 cm), разделена напречно на два еднакви сектора, свързани с централно разположен кръгъл отвор за преминаване на плъха от единия в другия сектор. Подът на камерата е люлееща се метална решетка, изработена от пръчки от неръждаема стомана с диаметър 3 mm, отстоящи една от друга на разстояние 11 mm. Краищата на пръчките са свързани с електрическата система на апарата, чрез която се подава токово дразнене – променлив ток от 20 до 30 V, чието напрежение може да се регулира чрез потенциометър.

Безусловният дразнител е променлив електрически ток (0,5 mA, 50 Hz), пропускан по металния решетъчен под на съответния отдел на камерата в продължение на 12 sec.

Като условен дразнител се използва изкуствена светлина (електрическа крушка от 21 W, монтирана на капака над всеки от двата сектора), която се включва алтернативно в двата сектора на апарата. Светлината посменно се включва в този сектор на камерата, в който не се намира плъхът в края на междусекторния период. Условният дразнител (светлина) предшества прилагането на безусловния дразнител (електрически ток) в течение на 9 sec, като продължава и във времето на действие на безусловния дразнител. Условнорефлекторно избягване – авойданс реакция (avoidance) се регистрира, когато плъхът избяга във времето на изолираното действие на светлината, т.е. през деветте секунди преди включване на електрическия ток.

Shuttle box апаратът е разположен в изолирано от шум помещение. Данните от апарата се подават в аналого-цифров преобразувател, свързан с компютър, управляван от подходяща on-line програма. Всеки авойданс, искейп и неадекватен отговор се записват автоматично.

Преди опита всяко животно се поставя в камерата на апарата за адаптация, като се прилагат 20 условнорефлекторни дразнителя за период от 6 min. По време на

адаптацията не се прилага безусловният дразнител – електрически ток. Обучителната сесия се провежда в два последователни дни, като всеки ден се провеждат 50 тренировки чрез комбинирано прилагане на условни и безусловни дразнители. Тестирането за памет се провежда на 24. час след обучителната тренировка, като се отчитат същите показатели, както при обучението. Светлинният стимул се прилага за 9 sec, последван от електрически ток за 2 sec и междусигнален интервал от 9 sec. Като показател за обученост и запаметяване се отчита броят на авойданс отговорите за всяка тренировъчна сесия (поотделно за всеки ден) и при теста за памет.

2.1.2.2. Метод за обучение за пасивно избягване – step through

Обучението за пасивно избягване с отрицателно подкрепление се провежда по метода на Buresova and Bures (1983) чрез апарат step through, конструиран в Института по физиология на БАН от Yonkov (1986). Апаратът се състои от две камери, като подът е метална решетка от пръчки от неръждаема стомана с диаметър 3 mm, отстоящи една от друга на разстояние 11 mm, по които се подава електрически ток. Вътрешната камера с размер 30 x 30 x 30 cm е черна с черен капак. Външната камера с размер 8 x 7 cm е от бял полистирол, съединена с вътрешната камера с врата тип „гилотина”. Върху пода на външната камера е поставена платформа от бял полистирол. Светлина от електрическа крушка от 100 W, поставена на 60 cm над външната камера, служи като безусловен дразнител. Обучението се състои от еднократна тренировка. Всяко животно се поставя на платформата в осветената камера при отворена врата. След влизане на животното в затъмненото помещение вратата се затваря и по подовата решетка се подава електрически ток със сила 0,5 mA и с продължителност 1 sec. Тестът за памет се провежда на 3^{ти} и 24^{ти} час след обучението, като всяко животно отново се поставя в осветената камера при отворена врата и престоят на плъха там се отчита в секунди (sec). При тестването за памет не се включва електрически ток. За критерий на обученост се приема престой на животните в осветената камера за период от поне 180 sec.

2.1.3. Метод за изследване на тревожността – повдигнат кръстосан лабиринт (elevated plus maze)

Тестът повдигнат кръстосан лабиринт е въведен от Pellow and File (1986). Изследванията се провеждат в апарат, който се състои от разположени едно срещу друго две отворени (50 x 10 cm) и две затворени (50 x 10 x 40 cm) рамена, поставени в

една равнина на височина 50 cm от пода. Над кръстосания лабиринт е монтиран източник на светлина, който осигурява равномерно осветяване (150 lux) на отворените и затворените рамена. Експерименталните животни се поставят в центъра на кръстосания лабиринт и се наблюдават в продължение на 5 min. Всички експерименти се провеждат по едно и също време (между 9.00 и 13.00 h). Отчитат се следните показатели: брой на влизания в отворените и затворените рамена и времето, прекарано в тях, отчетено в секунди, както и общият брой влизания в рамената и съотношението на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания. Повишеният брой влизанията в отворените рамена и увеличено време, прекарано в тях са показател за анксиолитичен ефект на изследваното вещество. Увеличено съотношение на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания също сочи наличие на анксиолитичен ефект на веществото. Общият брой на влизанията в рамената е показателен за двигателната активност на животното.

2.2. Статистически методи

Статистическата обработка на резултатите от изследванията е извършена с помощта на t-тест за сравняване на независими групи. Резултатите са представени като средна стойност \pm SEM. Статистическа достоверност се приема при $p < 0.05$.

Използван е статистически пакет GraphPad Prism (Version 5.00, GraphPad Software, Inc.

V. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Изследване ефектите на хлорогенова, ферулова, галова киселина и кверцетин върху изследователското поведение и двигателната активност в апарат Opto varimex

Изследването е проведено върху 200 мъжки плъха порода Wistar, разделени в 20 групи по 10 индивида. Плъховете са третирани чрез орогаstralна сонда в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни, като за всеки тестови период има по 5 групи – Контрола, ХК, ФК, ГК и Кв. Животните от контролната група са третирани с физиологичен разтвор в обем 10 ml/kg. Плъховете от групите ХК, ФК, ГК и Кв са третирани съответно с ХК, ФК, ГК и Кв в еднаква доза 20 mg/kg под формата на разтвор с обем 10 ml/kg. Тестът в апарат Opto varimex е проведен на 7^{ми}, 14^{ти}, 21^{ви} и 30^{ти} ден 60 min след последното приложение на експерименталните вещества. Регистриран е броят на хоризонталните и вертикалните движения за всяка минута от първата до петата. Той служи за мярка за изследователската активност и хабитуацията. Общият брой движения за първите 5 min, както и за целия 10-минутен период, е използван като мярка за двигателната активност на животните.

1.1. Изследване ефектите на хлорогенова, ферулова, галова киселина и кверцетин върху изследователското поведение на животните

Резултатите по отношение на хоризонталната и вертикалната изследователска активност на животните са представени:

- след 7-дневно третиране в Табл. 1 и 2 и на Фиг. 1
- след 14-дневно третиране в Табл. 3 и 4 и на Фиг. 2
- след 21-дневно третиране в Табл. 5 и 6 и на Фиг. 3
- след 30-дневно третиране в Табл. 7 и 8 и на Фиг. 4

След 7-дневно третиране

При животните от контролната група броят хоризонтални движения за 1^{ва} min е 201.1 ± 27.91 , постепенно намалява за всяка следваща минута и за 5^{та} min е 64.2 ± 7.19 . Броят вертикални движения за 1^{ва} min е 18.1 ± 2.44 , постепенно намалява за всяка следваща минута и за 5^{та} min е 2.7 ± 0.70 . Същата тенденция за намаляване на изследователската активност се наблюдава и в групите, третирани с ХК (брой хоризонтални движения за

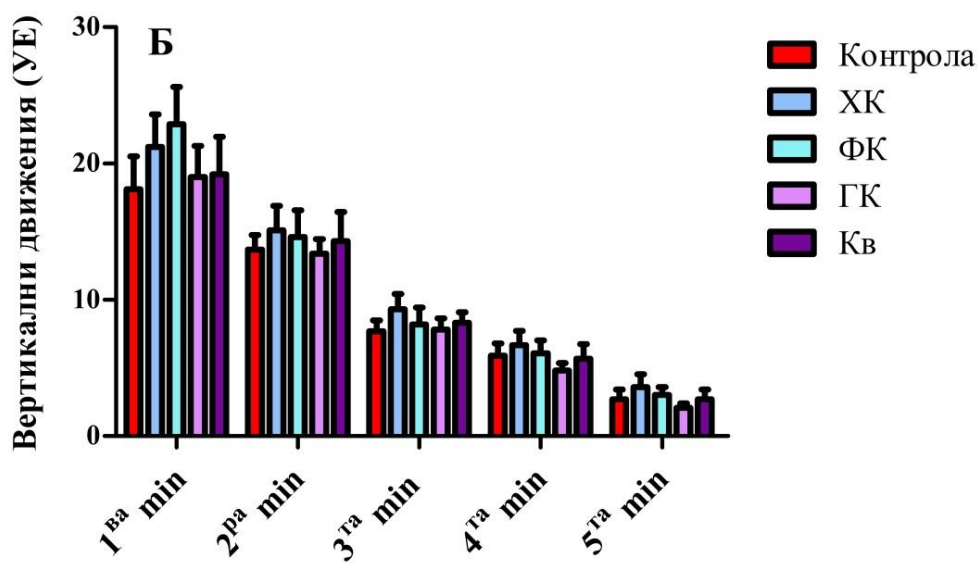
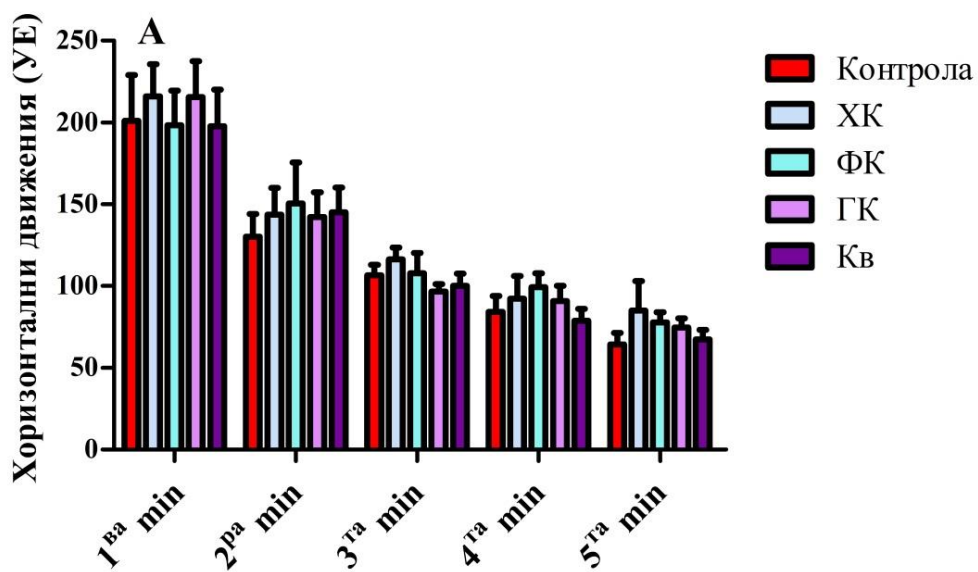
1^{ва} min 216.0 ± 19.71 , за 5^{та} min – 85.2 ± 17.77 ; брой вертикални движения за 1^{ва} min 22.9 ± 2.71 , за 5^{та} min – 3.6 ± 0.95), с ФК (хоризонтални движения съответно 198.5 ± 20.89 за 1^{ва} min и 77.8 ± 6.29 за 5^{та} min, вертикални съответно 21.2 ± 2.4 за 1^{ва} min и 3.0 ± 0.60 за 5^{та} min), с ГК (хоризонтални движения съответно 215.6 ± 21.97 за 1^{ва} min и 74.7 ± 5.66 за 5^{та} min, вертикални съответно 19.0 ± 2.28 за 1^{ва} min и 2.1 ± 0.31 за 5^{та} min) и с Кв (хоризонтални съответно 197.8 ± 22.36 за 1^{ва} min и 67.4 ± 5.82 за 5^{та} min, вертикални съответно 19.2 ± 2.75 за 1^{ва} min и 2.7 ± 0.70 за 5^{та} min) (Табл. 1, 2; Фиг. 1). Статистическият анализ чрез t-тест показва, че в групите, третирани с ХК, ФК, ГК и Кв броят хоризонтални и вертикални движения за всяка минута поотделно не се различава значимо от съответния брой при контролната група. В групите, третирани с ХК, ФК и ГК, броят хоризонтални и вертикални движения за всяка минута поотделно не се различава значимо от съответния брой при група Кв (Табл. 1, 2; Фиг. 1).

Табл. 1. Брой хоризонтални движения за първата, втората, третата, четвъртата и петата минута при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 7 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

Група Време	Контрола (n = 10)	ХК (n = 10)	ФК (n = 10)	ГК (n = 10)	Кв (n = 10)
1^{ва} min	201.1 ± 27.91	216.0 ± 19.71	198.5 ± 20.89	215.6 ± 21.97	197.8 ± 22.36
2^{ра} min	130.4 ± 13.56	143.6 ± 16.49	150.5 ± 25.09	142.2 ± 15.26	145.1 ± 15.31
3^{та} min	106.5 ± 6.43	116.3 ± 7.37	107.9 ± 12.35	96.6 ± 4.46	100.1 ± 7.44
4^{та} min	84.2 ± 9.92	92.4 ± 13.81	99.3 ± 8.48	91.0 ± 9.00	78.9 ± 7.16
5^{та} min	64.2 ± 7.19	85.2 ± 17.77	77.8 ± 6.29	74.7 ± 5.66	67.4 ± 5.82

Табл. 2. Брой вертикални движения за първата, втората, третата, четвъртата и петата минута при плъхове, третиран с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 7 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

Група Време	Контрола (n = 10)	ХК (n = 10)	ФК (n = 10)	ГК (n = 10)	Кв
1^{ва} min	18.1 \pm 2.44	21.2 \pm 2.4	22.9 \pm 2.71	19.0 \pm 2.28	19.2 \pm 2.75
2^{ра} min	13.7 \pm 1.07	15.1 \pm 1.78	14.6 \pm 1.96	13.4 \pm 1.07	14.3 \pm 2.14
3^{та} min	7.7 \pm 0.78	9.3 \pm 1.13	8.2 \pm 1.25	7.8 \pm 0.84	8.3 \pm 0.79
4^{та} min	5.9 \pm 0.90	6.7 \pm 1.02	6.1 \pm 0.95	4.8 \pm 0.57	5.7 \pm 1.06
5^{та} min	2.7 \pm 0.70	3.6 \pm 0.95	3.0 \pm 0.60	2.1 \pm 0.31	2.7 \pm 0.70



Фиг. 1. Брой хоризонтални (панел А) и вертикални движения (панел Б) за първата, втората, третата, четвъртата и петата минута при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 7 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.; $n=10$.

След 14-дневно третиране

При животните от контролната група броят хоризонтални движения намалява постепенно от 222.7 ± 20.06 за 1^{ва} min до 54.9 ± 8.59 за 5^{та} min. Постепенно намаляват и вертикалните движения от 19.6 ± 1.83 за 1^{ва} min до 2.9 ± 0.60 за 5^{та} min. Същата тенденция се наблюдава и в групите, третирани с ХК (брой хоризонтални движения от 235.0 ± 31.42 за 1^{ва} min до 58.1 ± 8.74 за 5^{та} min; брой вертикални движения от 22.4 ± 1.83 за 1^{ва} min до 3.68 ± 0.79 за 5^{та} min), с ФК (хоризонтални движения от 184.2 ± 21.26 за 1^{ва} min до 43.6 ± 9.08 за 5^{та} min, вертикални движения съответно от 20.6 ± 2.86 за 1^{ва} min до 3.5 ± 0.54 за 5^{та} min), с ГК (хоризонтални движения от 219.6 ± 23.21 за 1^{ва} min до 60.3 ± 9.35 за 5^{та} min, вертикални движения съответно от 15.1 ± 1.64 за 1^{ва} min до 1.6 ± 0.34 за 5^{та} min) и с Кв (хоризонтални от 203.9 ± 11.47 за 1^{ва} min до 53.2 ± 7.80 за 5^{та} min, вертикални съответно от 18.4 ± 1.68 за 1^{ва} min до 2.9 ± 0.60 за значимо броя хоризонтални и вертикални движения за всяка минута поотделно в сравнение с контролната група) (Табл. 3, 4; Фиг. 2).

Статистическият анализ на резултатите чрез t-тест показва, че ХК, ФК и Кв не повлияват значимо изследователското поведение на животните в сравнение с контролната група. ГК не повлиява значимо хоризонталната изследователска активност на животните, но потиска вертикалната изследователска активност статистически значимо на 1^{ва}, 3^{та} и 5^{та} min ($p < 0.05$), както и на 2^{ра} и 4^{та} min с гранична значимост ($p = 0.05$). В сравнение с Кв ФК повлиява по-слабо ($p < 0.05$), а ГК – по силно ($p < 0.05$) вертикалната изследователската активност на животните за 4^{та} min. Между ХК и Кв групата не се наблюдава статистически значима разлика (Табл. 3, 4; Фиг. 2).

Табл. 3. Брой хоризонтални движения за първата, втората, третата, четвъртата и петата минута при плъхове, третиран с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 14 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

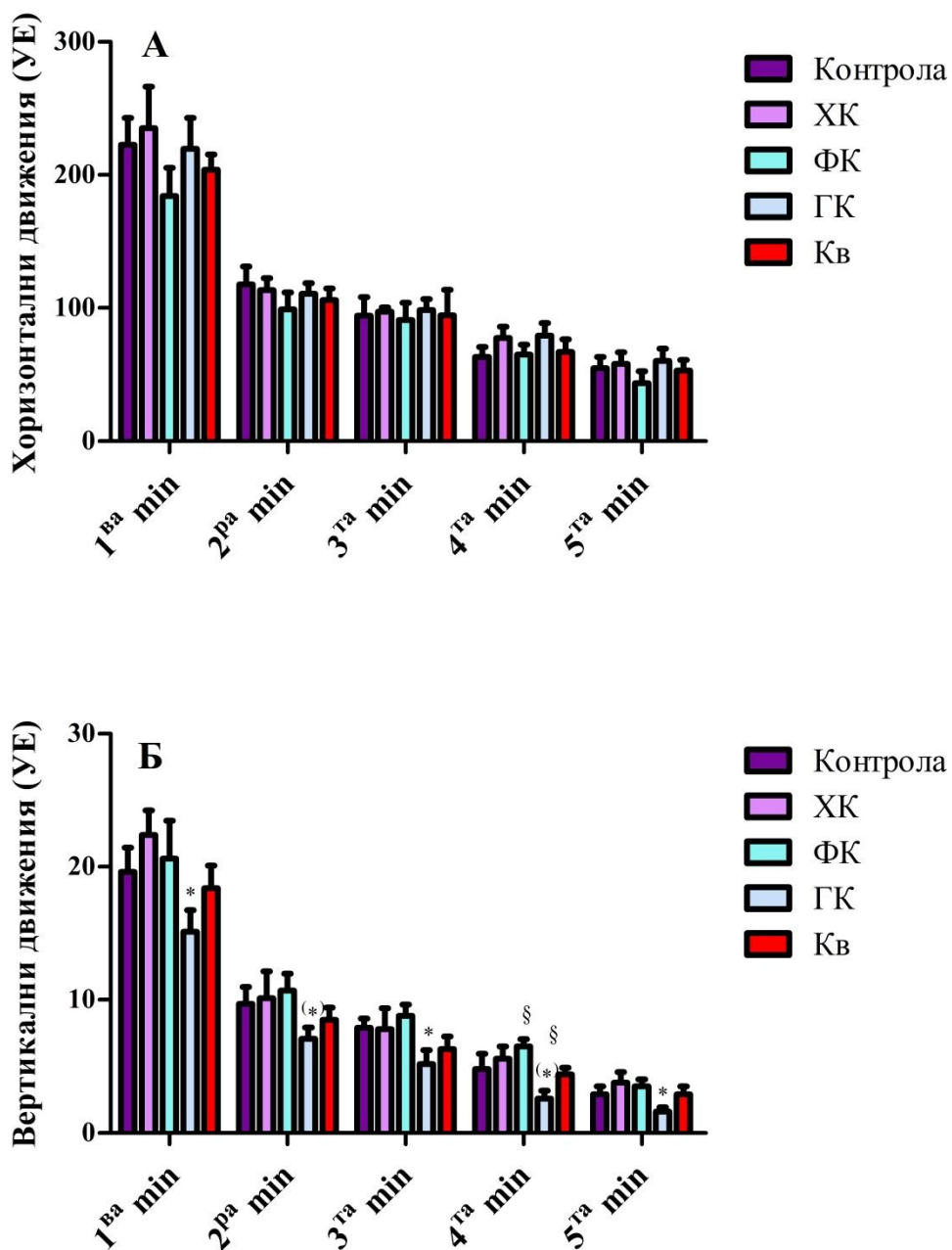
Група Време	Контрола (n = 10)	ХК (n = 10)	ФК (n = 10)	ГК (n = 10)	Кв (n = 10)
1^{ва} min	222.7 \pm 20.06	235.0 \pm 31.42	184.2 \pm 21.26	219.6 \pm 23.21	203.9 \pm 11.47
2^{ра} min	117.5 \pm 13.50	113.4 \pm 9.05	98.9 \pm 12.61	110.6 \pm 7.92	105.9 \pm 8.60
3^{та} min	94.3 \pm 13.73	97.1 \pm 3.32	91.0 \pm 12.95	98.3 \pm 8.37	94.7 \pm 18.94
4^{та} min	63.4 \pm 7.55	77.5 \pm 8.66	65.2 \pm 7.44	79.3 \pm 9.61	67.0 \pm 9.65
5^{та} min	54.9 \pm 8.59	58.1 \pm 8.74	43.6 \pm 9.08	60.3 \pm 9.35	53.2 \pm 7.80

Табл. 4. Брой вертикални движения за първата, втората, третата, четвъртата и петата минута при плъхове, третиран с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 14 дни.

Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

(*) $p=0.05$, * $p<0.05$ спрямо контролната група; & $p<0.05$ спрямо група Кв

Група Време	Контрола (n = 10)	ХК (n = 10)	ФК (n = 10)	ГК (n = 10)	Кв (n = 10)
1^{ва} min	19.6 \pm 1.83	22.4 \pm 1.83	20.6 \pm 2.86	15.1 \pm 1.64 *	18.4 \pm 1.68
2^{ра} min	9.7 \pm 1.27	10.1 \pm 2.02	10.7 \pm 1.27	7.1 \pm 0.84 (*)	8.5 \pm 0.93
3^{та} min	7.9 \pm 0.71	7.8 \pm 1.58	8.8 \pm 0.83	5.2 \pm 1.03 *	6.3 \pm 0.96
4^{та} min	4.8 \pm 1.16	5.6 \pm 0.91	6.5 \pm 0.56 &	2.6 \pm 0.58 (*)&	4.4 \pm 0.50
5^{та} min	2.9 \pm 0.60	3.68 \pm 0.79	3.5 \pm 0.54	1.6 \pm 0.34 *	2.9 \pm 0.60



Фиг. 2. Брой хоризонтални (панел А) и вертикални движения (панел Б) за първата, втората, третата, четвъртата и петата минута при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 14 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.; $n=10$.

^(*) $p<0.05$; ^{*} $p<0.05$ спрямо контролната група; [§] $p<0.05$ спрямо група Кв

След 21-дневно третиране

При животните от контролната група броят хоризонтални движения за 1^{ва} min е 216.4 ± 24.24 , постепенно намалява за всяка следваща минута и за 5^{та} min е 66.6 ± 9.48 . Броят вертикални движения за 1^{ва} min е 21.5 ± 1.09 , също постепенно намалява за всяка следваща минута и за 5^{та} min е 3.2 ± 0.51 . Същата тенденция се наблюдава и в групите, третирани с ХК (брой хоризонтални движения за 1^{ва} min 163.0 ± 18.22 , за 5^{та} min – 43.7 ± 7.64 ; брой вертикални движения за 1^{ва} min 14.0 ± 1.48 , за за 5^{та} min – 2.0 ± 0.39), с ФК (хоризонтални движения съответно 211.0 ± 25.63 за 1^{ва} min и 53.2 ± 6.38 за 5^{та} min, вертикални движения съответно 20.5 ± 2.34 за 1^{ва} min и 3.5 ± 0.50 за 5^{та} min), с ГК (хоризонтални движения съответно 163.8 ± 19.93 за 1^{ва} min и 35.3 ± 5.91 за 5^{та} min, вертикални движения съответно 15.8 ± 2.42 за 1^{ва} min и 1.8 ± 0.33 за 5^{та} min) и с Кв (хоризонтални движения съответно 155.4 ± 17.28 за 1^{ва} min и 38.6 ± 7.27 за 5^{та} min, вертикални движения съответно 11.0 ± 1.00 за 1^{ва} min и 1.3 ± 0.15 за 5^{та} min) (Табл. 5, 6; Фиг. 3).

Статистическата обработка на резултатите посредством t-тест показва, че ХК статистически значимо потиска хоризонталната изследователска активност на животните с изключение на втората min: за 1^{ва} и 5^{та} min със значимост $p < 0.05$, а за 3^{та} и 4^{та} min с гранична значимост $p = 0.05$. ХК потиска и вертикалната изследователска активност на животните с изключение на четвъртата min: за 1^{ва} min със значимост $p < 0.01$, за 2^{ра} min с гранична значимост $p = 0.05$, а за 3^{та} и 5^{та} min със значимост $p < 0.05$. ФК не повлиява значимо изследователското поведение на животните. ГК потиска хоризонталната изследователска активност на животните статистически значимо на 1^{ва} (гранична значимост, $p = 0.05$), 3^{та}, 4^{та} и 5^{та} min ($p < 0.01$). ГК потиска и вертикалната изследователска активност на животните статистически значимо на 1^{ва}, 4^{та} и 5^{та} min ($p < 0.05$), както и на 2^{ра} min с гранична значимост $p = 0.05$. Кв потиска хоризонталната изследователска активност на животните статистически значимо на 1^{ва}, 2^{ра}, 3^{та} и 5^{та} min ($p < 0.05$), както и вертикалната активност за всички минути до 5^{та} със значимост $p < 0.001$ за 1^{ва} и 3^{та} min, $p < 0.05$ за 2^{ра} и 4^{та} min и $p < 0.01$ за 5^{та} min (Табл. 5, 6; Фиг. 11). В сравнение с Кв, ГК потиска по-силно хоризонталната изследователска активност на животните за 4^{та} min ($p < 0.05$). ХК повлиява вертикалната изследователска активност за 3^{та} min по-слабо от Кв ($p < 0.05$). ФК повлиява вертикалната изследователска активност значително по-слабо от Кв ($p < 0.01$ за 2^{ра}, 3^{та} и 5^{та} min и $p < 0.05$ за 1^{ва} и 4^{та} min). ГК потиска по-силно хоризонталната изследователска активност на животните за 4^{та} min ($p < 0.05$) (Табл. 5, 6; Фиг. 3).

Табл. 5. Брой хоризонтални движения за първата, втората, третата, четвъртата и петата минута при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 21 дни.

Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

^(*) $p=0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$ спрямо контролната група; $\S p<0.05$ спрямо група Кв

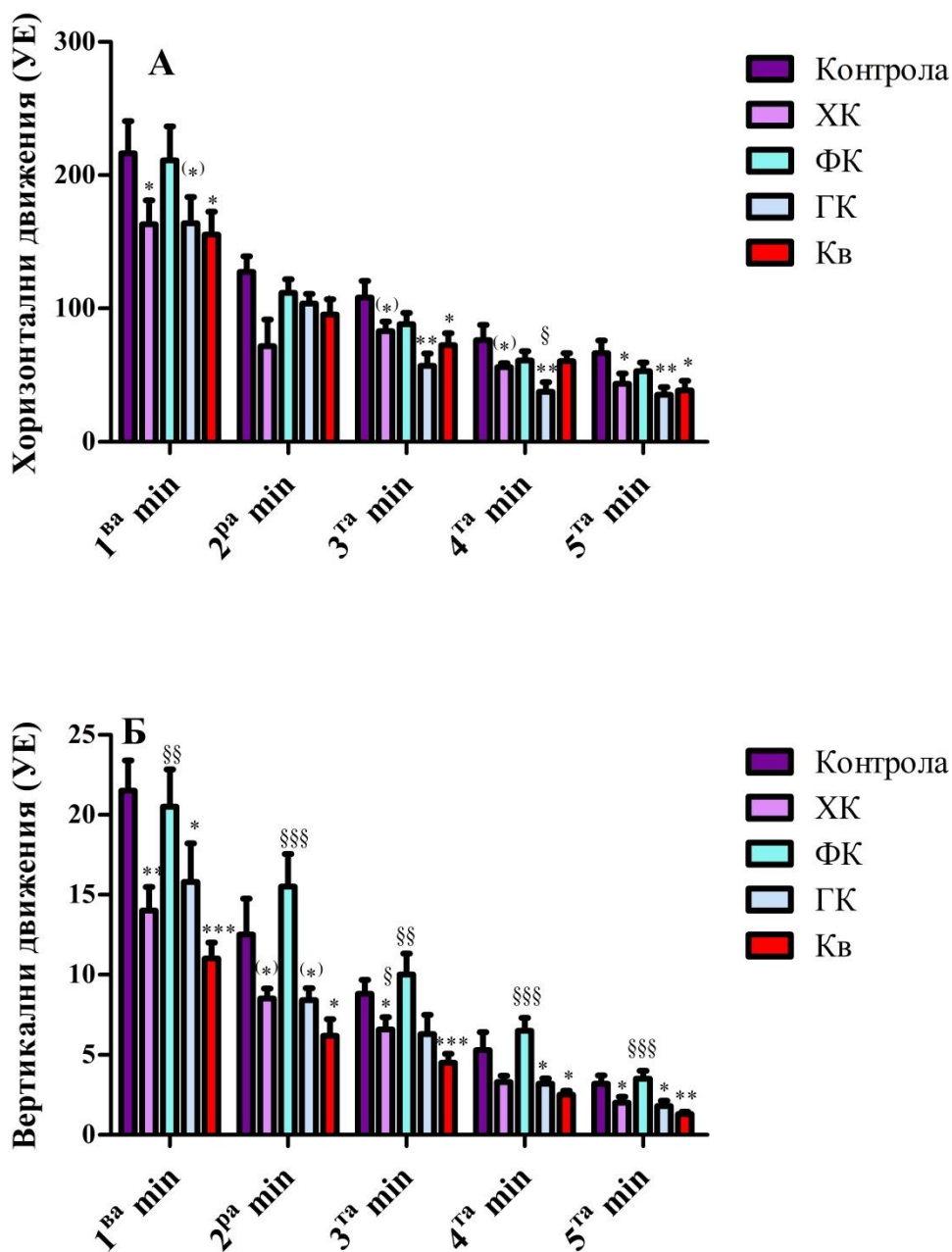
Група Време	Контрола (n = 10)	ХК (n = 10)	ФК (n = 10)	ГК (n = 10)	Кв (n = 10)
1^{ва} min	216.4 \pm 24.24	163.0 \pm 18.22 *	211.0 \pm 25.63	163.8 \pm 19.93 (*)	155.4 \pm 17.28 *
2^{ра} min	127.4 \pm 11.82	103.5 \pm 7.46	111.7 \pm 10.07	103.5 \pm 7.46	127.4 \pm 11.82
3^{та} min	108.1 \pm 12.44	83.2 \pm 7.21 (*)	88.3 \pm 8.59	57.2 \pm 9.15 **	72.7 \pm 8.94 *
4^{та} min	76.3 \pm 11.55	56.1 \pm 3.06 (*)	61.1 \pm 7.14	37.7 \pm 7.29 ** \S	60.7 \pm 5.91
5^{та} min	66.6 \pm 9.48	43.7 \pm 7.64 *	53.2 \pm 6.38	35.3 \pm 5.91 **	38.6 \pm 7.27 *

Табл. 6. Брой вертикални движения за първата, втората, третата, четвъртата и петата минута при плъхове, третиран с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 21 дни.

Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

(*) $p=0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ спрямо контролната група; § $p<0.05$, §§ $p<0.01$, §§§ $p<0.001$ спрямо група Кв

Група Време	Контрола (n = 10)	ХК (n = 10)	ФК (n = 10)	ГК (n = 10)	Кв (n = 10)
1^{ва} min	21.5 \pm 1.09	14.0 \pm 1.48 **	20.5 \pm 2.34 §§	15.8 \pm 2.42 *	11.0 \pm 1.00 ***
2^{ра} min	12.5 \pm 2.25	8.5 \pm 0.64 (*)	15.5 \pm 2.05 §§§	8.4 \pm 0.76 (*)	6.2 \pm 1.04 *
3^{та} min	8.8 \pm 0.88	6.6 \pm 0.76 *§	10.0 \pm 1.33 §§	6.3 \pm 1.21	4.5 \pm 0.58 ***
4^{та} min	5.3 \pm 1.13	3.3 \pm 0.40	6.5 \pm 0.83 §§§	3.2 \pm 0.33 *	2.5 \pm 0.27 *
5^{та} min	3.2 \pm 0.51	2.0 \pm 0.39 *	3.5 \pm 0.50 §§§	1.8 \pm 0.33 *	1.3 \pm 0.15 **



Фиг. 3. Брой хоризонтални (панел А) и вертикални движения (панел Б) за първата, втората, третата, четвъртата и петата минута при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 21 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.; $n=10$.

(*) $p=0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ спрямо контролната група;

§ $p<0.05$, §§ $p<0.01$, §§§ $p<0.001$ спрямо група Кв

След 30-дневно третиране

При животните от контролната група броят хоризонтални движения намалява постепенно от 1^{ва} min (222.0 ± 16.07) към 5^{та} min (71.5 ± 8.73). Броят вертикални движения постепенно намалява от 19.2 ± 1.84 за 1^{ва} min до 2.7 ± 0.37 за 5^{та} min. Същата тенденция на потискане на изследователската активност се наблюдава и в групите, третирани с ХК (брой хоризонтални движения от 180.3 ± 18.10 за 1^{ва} min до 51.3 ± 7.05 за 5^{та} min; брой вертикални движения от 14.6 ± 1.56 за 1^{ва} min до 1.9 ± 0.28 за 5^{та} min), с ФК (хоризонтални движения съответно от 201.9 ± 23.59 за 1^{ва} min до 73.0 ± 7.60 за 5^{та} min, вертикални движения съответно от 20.8 ± 1.85 за 1^{ва} min до 2.9 ± 0.38 за 5^{та} min), с ГК (хоризонтални движения съответно от 161.5 ± 17.92 за 1^{ва} min до 52.5 ± 7.48 за 5^{та} min, вертикални движения съответно от 14.7 ± 1.67 за 1^{ва} min до 1.7 ± 0.26 за 5^{та} min) и с Кв (хоризонтални движения съответно от 145.7 ± 10.68 за 1^{ва} min до 29.4 ± 6.31 за 5^{та} min, вертикални движения съответно от 10.3 ± 0.99 за 1^{ва} min до 1.1 ± 0.10 за 5^{та} min) (Табл. 7, 8; Фиг. 4).

Статистическата обработка на резултатите чрез t-тест показва, че ХК потиска хоризонталната изследователска активност на животните за 2^{ра}, 3^{та}, 4^{та} и 5^{та} min със статистическа значимост от $p < 0.05$, както и за 1^{ва} min с гранична значимост $p = 0.05$. ХК потиска и вертикалната изследователска активност за всички минути до петата включително със статистическа значимост от $p < 0.05$. ФК не повлиява значимо изследователското поведение. ГК потиска хоризонталната изследователска активност на животните за 1^{ва}, 2^{ра} и 3^{та} min със статистическа значимост от $p < 0.05$, както и за 4^{та} min с гранична значимост $p = 0.05$. ГК потиска и вертикалната изследователска активност за всички минути до петата включително със статистическа значимост от $p < 0.05$. Кв потиска хоризонталната изследователска активност на животните за всички минути до петата включително със статистическа значимост от $p < 0.001$ за 1^{ва}, 3^{та}, 4^{та} и 5^{та} min и $p < 0.01$ за 2^{ра} min, както и вертикалната изследователска активност за всички минути до петата включително със статистическа значимост от $p < 0.001$ за 1^{ва}, 2^{ра}, 4^{та} и 5^{та} min и $p < 0.01$ за 3^{та} min (Табл. 7, 8; Фиг. 12).

В сравнение с Кв ХК повлиява по-слабо хоризонталната изследователска активност за 5^{та} min и вертикалната изследователска активност за 1^{ва} и 5^{та} min ($p < 0.05$ спрямо Кв). ФК повлиява по-слабо хоризонталната двигателна активност ($p < 0.05$ за 1^{ва} min и $p < 0.001$ за останалите минути), както и вертикалната двигателна активност ($p < 0.01$ за 4^{та} min и $p < 0.001$ за останалите минути) в сравнение с Кв. ГК повлиява по-слабо

хоризонталната двигателна активност за 5^{та} min ($p < 0.05$), както и вертикалната двигателна активност ($p < 0.05$ за всички min) в сравнение с Кв (Табл. 7, 8; Фиг. 4).

Табл. 7. Брой хоризонтални движения за първата, втората, третата, четвъртата и петата минута при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 30 дни.

Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

(*) $p < 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група; § $p < 0.05$, §§§ $p < 0.001$ спрямо група Кв

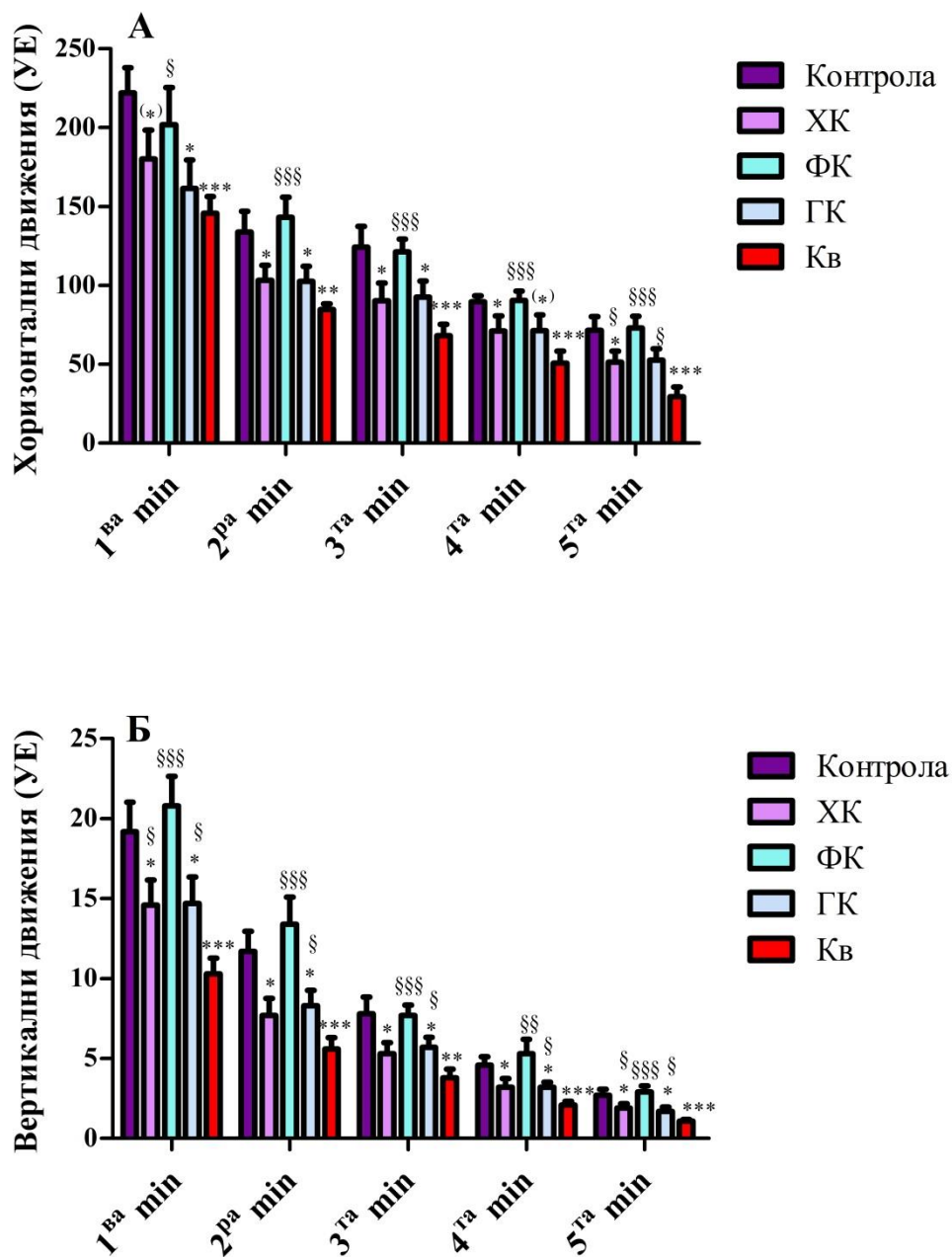
Група Време	Контрола (n = 10)	ХК (n = 10)	ФК (n = 10)	ГК (n = 10)	Кв (n = 10)
1 ^{ва} min	222.0 \pm 16.07	180.3 \pm 18.10 (*)	201.9 \pm 23.59 §	161.5 \pm 17.92 *	145.7 \pm 10.68 ***
2 ^{ва} min	133.8 \pm 13.27	103.3 \pm 9.57 *	143.3 \pm 12.61 §§§	102.7 \pm 9.42 *	84.7 \pm 3.74 **
3 ^{та} min	124.2 \pm 13.16	90.3 \pm 11.21 *	121.3 \pm 8.09 §§§	92.5 \pm 10.27 *	68.2 \pm 7.42 ***
4 ^{та} min	89.6 \pm 3.89	71.1 \pm 9.62 *	90.6 \pm 6.01 §§§	71.3 \pm 10.13 (*)	50.7 \pm 7.66 ***
5 ^{та} min	71.5 \pm 8.73	51.3 \pm 7.05 *§	73.0 \pm 7.60 §§§	52.5 \pm 7.48 §	29.4 \pm 6.31 ***

Табл. 8. Брой вертикални движения за първата, втората, третата, четвъртата и петата минута при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 30 дни.

Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$ спрямо група Кв

Група Време	Контрола (n = 10)	ХК (n = 10)	ФК (n = 10)	ГК (n = 10)	Кв (n = 10)
1^{ва} min	19.2 \pm 1.84	14.6 \pm 1.56 *§	20.8 \pm 1.85 §§§	14.7 \pm 1.67 *§	10.3 \pm 0.99 ***
2ра min	11.7 \pm 1.26	7.7 \pm 1.05 *	13.4 \pm 1.69 §§§	8.3 \pm 0.97 *§	5.6 \pm 0.70 ***
3^{та} min	7.8 \pm 1.04	5.3 \pm 0.68 *	7.7 \pm 0.65 §§§	5.7 \pm 0.62 *§	3.8 \pm 0.55 **
4^{та} min	4.6 \pm 0.52	3.2 \pm 0.55 *	5.3 \pm 0.90 §§	3.2 \pm 0.33 *§	2.1 \pm 0.23 ***
5^{та} min	2.7 \pm 0.37	1.9 \pm 0.28 *§	2.9 \pm 0.38 §§§	1.7 \pm 0.26 *§	1.1 \pm 0.10 ***



Фиг. 4. Брой хоризонтални (панел А) и вертикални движения (панел Б) за първата, втората, третата, четвъртата и петата минута при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 30 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.; $n=10$.

(*) $p < 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$ спрямо група Кв

Обобщение на резултатите за изследователската активност на животните

ХК, приложена в продължение на 7 и на 14 дни, не променя значимо изследователската активност на опитните животни. Приложена за 21 и 30 дни, ХК значимо потиска изследователската активност. За всички периоди на третиране ХК не нарушава хабитуацията на животните.

ФК, независимо от продължителността на третиране, не променя значимо изследователската активност и не нарушава хабитуацията на опитните животни.

След 7-дневно приложение ГК не променя значимо изследователската активност на опитните животни. Приложена за 14 дни, ГК не променя хоризонталната, но потиска вертикалната двигателна активност на животните. След приложение в продължение на 21 и 30 дни ГК потиска значимо изследователската активност. За всички периоди на третиране ГК не нарушава хабитуацията на животните.

Приложен за 7 и 14 дни, Кв не променя значимо изследователската активност на опитните животни. След 21- и 30-дневно приложение Кв потиска значимо изследователската активност. Независимо от продължителността на третирането Кв не нарушава хабитуацията на животните.

Наблюдава се по-силно понижаване на изследователската активност от Кв в сравнение с фенолните киселини ХК, ФК и ГК, което е най-изразено след 30-дневно третиране.

1.2. Изследване ефектите на хлорогенова, ферулова, галова киселина и кверцетин върху двигателната активност на животните

Резултатите по отношение на двигателната активност на животните са представени:

- ***след 7-дневно третиране*** в Табл. 9 и на Фиг. 5 и 6
- ***след 14-дневно третиране*** в Табл. 10 и на Фиг. 5 и 6
- ***след 21-дневно третиране*** в Табл. 11 и на Фиг. 5 и 6
- ***след 30-дневно третиране*** в Табл. 12 и на Фиг. 5 и 6

След 7-дневно третиране броят на хоризонталните движения за първите 5 min при животните от контролната група е 586.4 ± 30.48 , а броят на вертикалните движения за същия период е 48.1 ± 2.99 . Броят на хоризонталните движения за целия 10-минутен период на наблюдение е 764.5 ± 25.59 , а броят на вертикалните движения за същия период е 64.8 ± 3.84 . В групите, третирани с ХК, ФК, ГК и Кв, не се променя статистически значимо броят хоризонтални и вертикални движения за първите 5 min и

за целия 10-минутен период в сравнение с контролната група. При сравнение на групите, третирани с ХК, ФК и ГК с група Кв не се откриват значими разлики по отношение на двигателната активност на животните (Табл. 9; Фиг. 5, 6).

Табл. 9. Брой хоризонтални и вертикални движения за първите 5 min и за целия 10-минутен период на изследване при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 7 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

Период Група	Хоризонтални движения		Вертикални движения	
	1.-5. min	1.-10. min	1.-5. min	1.-10. min
Контрола (n=10)	586.4 \pm 30.48	764.5 \pm 25.59	48.1 \pm 2.99	64.8 \pm 3.84
ХК (n=10)	653.5 \pm 54.69	872.6 \pm 68.53	55.9 \pm 4.64	73.9 \pm 4.75
ФК (n=10)	634.0 \pm 33.09	828.4 \pm 41.96	54.8 \pm 4.36	74.0 \pm 5.34
ГК (n=10)	620.1 \pm 25.02	830.1 \pm 37.77	47.1 \pm 2.96	63.1 \pm 2.08
Кв (n=10)	589.3 \pm 28.82	795.1 \pm 39.55	50.2 \pm 5.20	66.0 \pm 5.37

След 14-дневно третиране броят на хоризонталните движения за първите 5 min при животните от контролната група е 552.8 ± 39.39 , а броят на вертикалните движения за същия период е 44.9 ± 2.68 . Броят на хоризонталните движения за целия 10-минутен период на наблюдение е 745.2 ± 66.92 , а броят на вертикалните движения за същия период е 61.6 ± 3.68 . В групите, третирани с ХК и ФК, броят хоризонтални и вертикални движения за първите 5 min и за целия 10-минутен период не се променя статистически значимо в сравнение с контролната група. В групата, третирана с ГК, броят хоризонтални движения за първите 5 min и за целия 10-минутен период не се променя значимо, но намалява значимо броят вертикални движения за тези два периода ($p < 0.001$) в сравнение с контролната група. В групата, третирана с Кв, не се наблюдава

значима промяна на броя хоризонтални движения за първите 5 min и за целия 10-минутен период, както и на броя вертикални движения за първите 5 min, но намалява статистически значимо броят вертикални движения за целия 10-минутен период ($p < 0.05$) в сравнение с контролната група (Табл. 10; Фиг. 5, 6).

В сравнение с Кв ХК потиска по-слабо вертикалната двигателна активност на животните както за първите 5 min ($p < 0.05$), така и за целия 10-минутен период ($p < 0.01$). ФК потиска по-слабо вертикалната двигателна активност на животните както за първите 5 min ($p < 0.05$ спрямо Кв), така и за целия 10-минутен период ($p < 0.01$ спрямо Кв). ГК потиска по-слабо вертикалната двигателна активност на животните за целия 10-минутен период ($p < 0.05$ спрямо Кв) (Табл. 10; Фиг. 5, 6).

Табл. 10. Брой хоризонтални и вертикални движения за първите 5 min и за целия 10-минутен период на изследване при плъхове, третиран с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 14 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ спрямо група Кв

Период Група	Хоризонтални движения		Вертикални движения	
	1.-5. min	1.-10. min	1.-5. min	1.-10. min
Контрола (n=10)	552.8 \pm 39.39	745.2 \pm 66.92	44.9 \pm 2.68	61.6 \pm 3.68
ХК (n=10)	581.1 \pm 30.15	767.7 \pm 37.52	49.7 \pm 3.06 §	65.1 \pm 3.30 §§
ФК (n=10)	482.9 \pm 28.44	661.1 \pm 27.08	50.1 \pm 2.88 §	68.9 \pm 4.53 §§
ГК (n=10)	568.1 \pm 34.14	765.9 \pm 33.93	31.6 \pm 1.92 ***	41.6 \pm 3.41 ***§
Кв (n=10)	524.7 \pm 22.68	696.7 \pm 27.27	40.5 \pm 2.34	52.8 \pm 2.48 *

След 21-дневно третиране броят на хоризонталните движения за първите 5 min при животните от контролната група е 594.8 \pm 35.67, а броят на вертикалните движения за същия период на наблюдение е 51.3 \pm 3.44. Броят на хоризонталните движения за целия

10-минутен период на наблюдение е 763.6 ± 45.76 , а броят на вертикалните движения за същия период е 67.1 ± 3.79 . При групата, третирана с ХК, броят хоризонтални движения за първите 5 min ($p < 0.01$) и за целия 10-минутен период ($p < 0.05$), както и броят вертикални движения и за двата периода на изследване намаляват статистически значимо със значимост от $p < 0.001$. Животните от групата, третирана с ФК, не показват статистически значима промяна на броя хоризонтални и вертикални движения за първите 5 min, както и за целия 10-минутен период. При групата, третирана с ГК броят хоризонтални движения за първите 5 min ($p < 0.001$) и за целия 10-минутен период ($p < 0.01$), както и броя вертикални движения и за двата периода на изследване намаляват статистически значимо със значимост от $p < 0.001$. Животните от групата, третирана с Кв, показват статистически значимо понижаване на броя хоризонтални движения на животните със значимост от $p < 0.01$ и за двата периода на изследване, както и понижаване на броя вертикални движения със значимост от $p < 0.001$ и за двата периода на изследване (Табл. 11; Фиг. 5, 6).

В сравнение с Кв ХК потиска по-слабо вертикалната двигателна активност на животните както за първите 5 min, така и за целия 10-минутен период ($p < 0.01$). ФК потиска по-слабо вертикалната двигателна активност на животните както за първите 5 min, така и за целия 10-минутен период ($p < 0.001$ спрямо Кв). ГК потиска по-слабо вертикалната двигателна активност на животните както за първите 5 min, така и за целия 10-минутен период ($p < 0.01$ спрямо Кв) (Табл. 11; Фиг. 5, 6).

Табл. 11. Брой хоризонтални и вертикални движения за първите 5 min и за целия 10-минутен период на изследване при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 21 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група; §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$ спрямо група Кв

Група \ Период	Хоризонтални движения		Вертикални движения	
	1.-5. min	1.-10. min	1.-5. min	1.-10. min
Контрола (n=10)	594.8 \pm 35.67	763.6 \pm 45.76	51.3 \pm 3.44	67.1 \pm 3.79
ХК (n=10)	449.5 \pm 25.58 **	613.0 \pm 42.44	34.4 \pm 2.03 **§§	45.8 \pm 2.15 ***§§
ФК (n=10)	525.3 \pm 38.34	703.1 \pm 48.13	56.0 \pm 4.88 §§§	72.7 \pm 5.78 §§§
ГК (n=10)	365.8 \pm 44.50 ***	543.6 \pm 54.82 **	35.5 \pm 2.35 ***§§	46.6 \pm 2.61 ***§§
Кв (n=10)	422.9 \pm 44.15 **	575.2 \pm 53.89 **	25.5 \pm 1.71 ***	33.8 \pm 2.54 ***

След 30-дневно третиране броят на хоризонталните движения за първите 5 min при животните от контролната група е 641.1 ± 32.83 , а броят на вертикалните движения за същия период на наблюдение е 46.0 ± 2.69 . Броят на хоризонталните движения за целия 10-минутен период на наблюдение е 812.7 ± 34.23 , а броят на вертикалните движения за същия период е 61.1 ± 3.48 .

При животните, третирани с ХК се наблюдава статистически значимо понижаване на броя хоризонтални и вертикални движения за първите 5 min и за целия 10-минутен период със значимост от $p < 0.01$. В групата, третирана с ФК броят хоризонтални и вертикални движения на животните за първите 5 min, както и за целия 10-минутен период не се променя статистически значимо. Броят хоризонтални движения за първите 5 min и за целия 10-минутен период ($p < 0.01$) както и броят вертикални движения за първите 5 min ($p < 0.01$) и за целия 10-минутен период ($p < 0.001$) в групата, третирана с ГК, намалява статистически значимо. При животните, третирани с Кв, броят

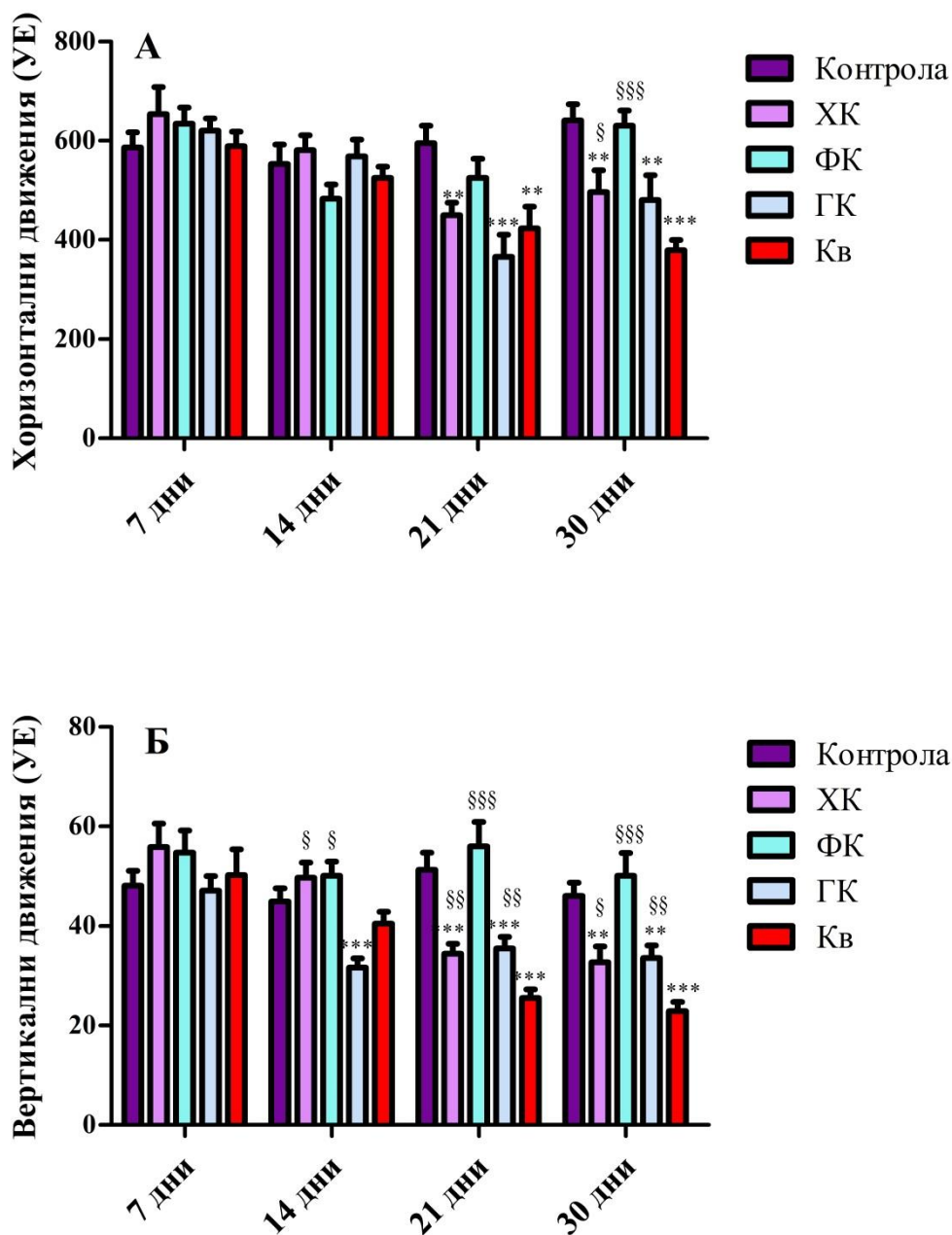
горизонтални и вертикални движения и за двата периода на изследване намалява със значимост от $p < 0.001$ (Табл. 12; Фиг. 5, 6).

В сравнение с Кв ХК потиска по-слабо хоризонталната и вертикалната двигателна активност на животните както за първите 5 min, така и за целия 10-минутен период ($p < 0.05$). ФК потиска по-слабо хоризонталната и вертикалната двигателна активност на животните както за първите 5 min, така и за целия 10-минутен период ($p < 0.001$ спрямо Кв). ГК потиска по-слабо хоризонталната двигателна активност за целия 10-минутен период ($p < 0.05$ спрямо Кв), както и вертикалната двигателна активност на животните за първите 5 min и за целия 10-минутен период ($p < 0.01$ спрямо Кв) (Табл. 12; Фиг. 5, 6).

Табл. 12. Брой хоризонтални и вертикални движения за първите 5 min и за целия 10-минутен период на изследване при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 30 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

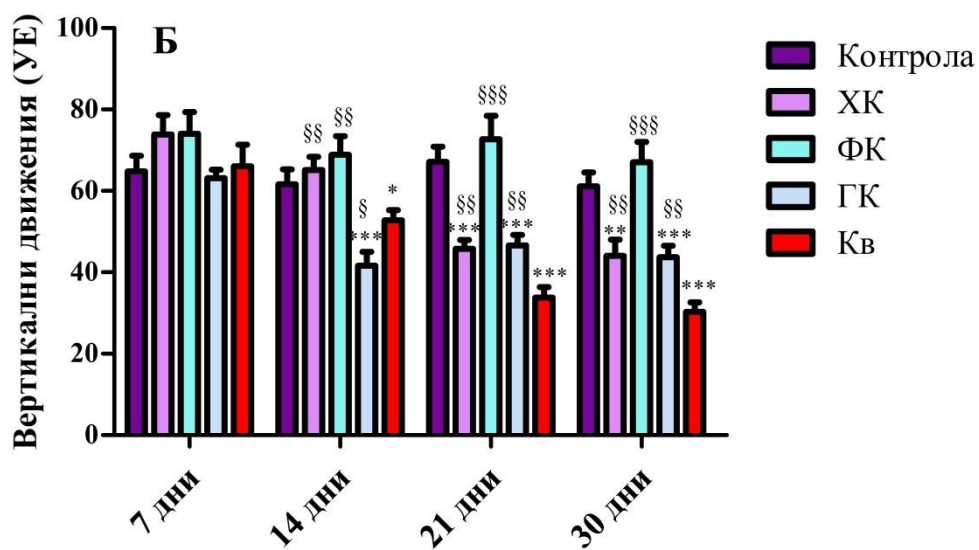
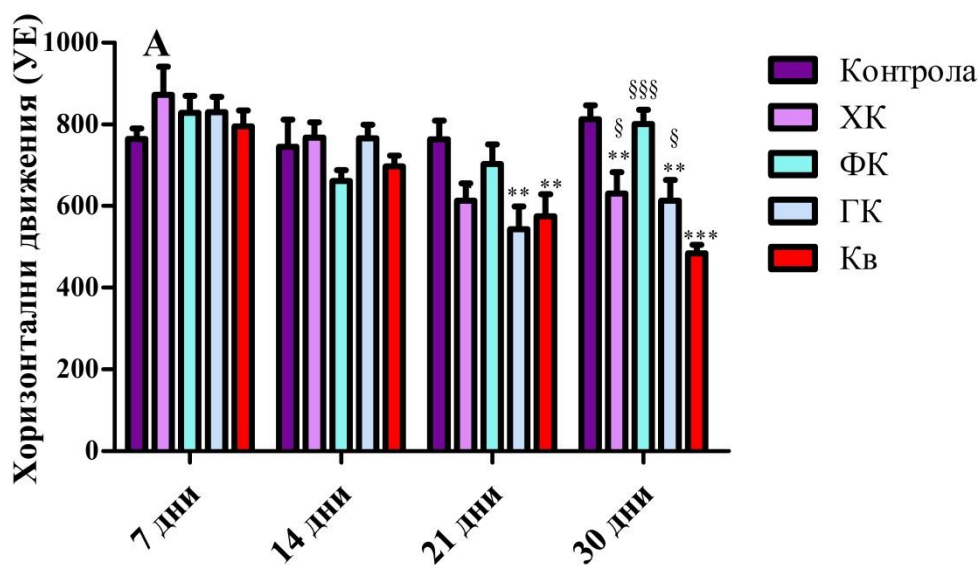
*** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група; $^{\$}p < 0.05$, $^{\$\$}p < 0.01$, $^{\$ \$ \$}p < 0.001$ спрямо група Кв*

Период Група	Хоризонтални движения		Вертикални движения	
	1.-5. min	1.-10. min	1.-5. min	1.-10. min
Контрола (n=10)	641.1 \pm 32.83	812.7 \pm 34.23	46.0 \pm 2.69	61.1 \pm 3.48
ХК (n=10)	496.3 \pm 43.99 ** $\$$	630.3 \pm 52.38 ** $\$$	32.7 \pm 3.20 ** $\$$	44.0 \pm 4.01 ** $\$$
ФК (n=10)	630.1 \pm 30.94 $\$ \$ \$$	801.5 \pm 34.85 $\$ \$ \$$	50.1 \pm 4.62 $\$ \$ \$$	67.0 \pm 5.01 $\$ \$ \$$
ГК (n=10)	480.5 \pm 49.80 **	612.7 \pm 51.17 ** $\$$	33.6 \pm 2.51 ** $\$ \$$	43.7 \pm 2.81 *** $\$ \$$
Кв (n=10)	378.7 \pm 20.66 ***	484.6 \pm 20.95 ***	22.9 \pm 1.87 ***	30.3 \pm 2.36 ***



Фиг. 5. Брой хоризонтални и вертикални движения за първите 5 min (панел А - хоризонтални движения; панел Б - вертикални движения) при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.; $n=10$.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$, §§§ $p < 0.001$ спрямо група Кв



Фиг. 6. Брой хоризонтални и вертикални движения за целия 10-минутен период (панел А – хоризонтални движения; панел Б – вертикални движения) при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.; $n=10$.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ спрямо контролната група; § $p<0.05$, §§ $p<0.01$, §§§ $p<0.001$ спрямо група Кв

Обобщение на резултатите за двигателната активност на животните

ХК, приложена за 7 и 14 дни, не повлиява значимо двигателната активност на опитните животни. При 21- и 30 днешно приложение ХК потиска двигателната активност.

ФК, независимо от периода на приложение, не оказва влияние върху двигателната активност на животните.

Приложена за 7 дни, ГК не променя значимо двигателната активност на опитните животни. След 14-днешно третиране ГК не повлиява хоризонталната, но потиска вертикалната двигателна активност. Приложена за 21 и 30 дни, ГК потиска двигателната активност на животните.

Кв не променя двигателната активност на опитните животни, третирани с него в продължение на 7 дни. Приложен за 14 дни, Кв не повлиява хоризонталната двигателна активност, както и вертикалната активност за първите 5 min, но потиска вертикалната двигателна активност за целия 10-минутен период. След 21- и 30-днешно приложение Кв потиска значимо двигателната активност на животните.

Наблюдава се по-силно потискане на двигателната активност от Кв в сравнение с фенолните киселини. При сравнение на изследваните вещества помежду им се наблюдава най-силно потискане на двигателната активност от Кв, следван от ГК и ХК, и липса на този ефект при ФК. Потискането е най-силно изразено след 30-днешно приложение на веществата.

1.3. Дискусия

В настоящия експеримент опитните животни са изследвани в апарат Opto Varimex, който представлява базисен тест за проследяване на изследователското поведение и двигателната активност на гризачите (Gould et al., 2009). Концепцията на теста е базирана на естествения стремеж на гризачите да изследват нова за тях среда, в случая камерата на апарата, като впоследствие привикват към нея (хабитуация) (Bolivar et al., 2000; Daenen et al., 2001). Изследователското поведение се определя като активно проучване, което води до натрупване на информация от животното за неговата среда (Lynn et al., 2009). Кратката продължителност на изследването насърчава изследователското поведение (Gould et al., 2009).

Привикването към новата среда (хабитуация) се счита за елементарна форма на обучение и намаляването на изследователската активност се явява показател за експлицитната (декларативна) неасоциативна памет (Thiel et al., 1998; Thiel et al., 1999; Barrett et al., 2016). Според настоящото изследване третирането с всички изследвани

вещества (ХК, ФК, ГК, Кв) в използваната доза от 20 mg/kg за всички тестови периоди (7, 14, 21 и 30 дни) не нарушава хабитуацията на опитните животни, което предполага, че те нямат негативен ефект върху паметта. Тези изводи съвпадат с други наши изследвания (Valcheva-Kuzmanova et al., 2014; Georgieva et al., 2015). Множество изследвания върху полифенолите потвърждават тяхното положително влияние върху паметта (Spencer 2010; Rendeiro et al., 2012a, b). Редица автори установяват положителни ефекти на полифенолите, и по-специално на ХК, ФК, ГК и Кв, в модели на болест на Алцхаймер при плъхове и мишки (Cheng D et al., 2014, Han et al., 2015; Yan et al., 2001, Cho J-Y et al., 2005; Mansouri et al., 2013a, Van et al., 2008; Wang D-M et al., 2014, Sabogal-Guaqueta et al., 2015, Patil et al., 2003). Други автори изследват ефекта на тези вещества в модели на болест на Паркинсон при плъхове, риби-зебра, както и в клетъчна култура (Shen et al., 2012; Mansouri et al., 2013b; Bureau et al., 2008; Zhang et al., 2011). Фенолните киселини и Кв се прилагат и в други модели на увреждане на паметта, където отново демонстрират протективни ефекти. ХК подобрява показателите за памет при scopolamine-индуцирани паметови нарушения при мишки (Kwon S-H et al., 2010). В клинично проучване ФК подобрява паметовите функции при фронтотемпорална лобарна дегенерация или деменция с телца на Lewy (Kimura and Takamatsu, 2015) и при предизвикани от триметилкалай когнитивни увреждания при мишки (Kim MJ et al., 2007). ГК намалява уврежданията в модел на васкуларна деменция, предизвикана чрез перманентна билатерална оклузия на a. carotis communis при плъхове (Korani et al., 2014). Кв подобрява паметта в модел на паметови увреждания, предизвикани от повтаряща се церебрална исхемия при плъхове (Pu et al., 2007), както и при dexamethasone-индуциран паметов дефицит (Tongjaroenbuangam et al., 2011) и предизвикани от етанол когнитивни увреждания при мишки (Singh et al., 2003). Влиянието на Кв върху паметта при интактни плъхове и мишки е изследвано, но с противоречиви резултати (Jung et al., 2010; Priprem et al., 2008; Patil et al., 2003). При хора флавоноидите (вкл. Кв) се асоциират със забавяне на упадъка на когнитивните функции с възрастта (Letenneur et al., 2007). Данните за влиянието на фенолните киселини у индивиди без паметови нарушения са изключително оскъдни.

Резултатите от настоящото изследване показват, че ХК, приложена за 21 и 30 дни, както и ГК и Кв, приложени за 14, 21 и 30 дни, потискат двигателната активност на плъховете в сравнение с контролните групи, вероятно вследствие на седативен ефект. ФК не повлиява двигателната активност на опитните животни, независимо от периода на приложение. Предполагаме механизъм на седативния ефект на ХК е активация или

модуляция на рецепторите за ГАМК. Данните от експеримент в модел на невропатична болка показват, че ефектът на ХК е намален при приложение на ГАМК_A-рецепторния антагонист bicuculline (Nara et al., 2014). Bouayed et al. (2007) посочват като вероятен механизъм активация на БДЗ-рецептори. Според нашия експеримент ФК не потиска двигателната активност и не причинява седация, което е в противоречие с данните на Tu et al. (2012). Според тези автори ФК доза-зависимо (при доза ≥ 15 mg/kg) потиска двигателната активност на интактни мишки. Тази разлика би могла да се дължи на по-високата чувствителност на мишките към евентуалното седативно действие на ФК, в сравнение с плъховете. Липсата на седативен ефект при ФК би могла да се обясни с нейната невъзможност за свързване или свързване в по-слаба степен от другите фенолни киселини към ГАМК и БДЗ рецептори поради различия в химичната ѝ структура. Седативният ефект на ГК и Кв вероятно се дължи на активация на БДЗ-рецептори (Mansouri et al., 2014; Bhutada et al., 2010). При Кв може да се предположи и активация на опиоидните рецептори (Anjaneyulu and Chopra, 2003). По-късната изява на седативния ефект на ХК (след 21-дневно третиране), както и на ГК и Кв (след 14-дневно третиране) и липсата му при по-кратките периоди на приложение на веществата могат да бъдат обяснени с натрупването на полифенолите в мозъка след дълготрайно приложение (Willis et al., 2009).

2.Изследване ефектите на хлорогенова, ферулова, галова киселина и кверцетин върху паметта и обучението

2.1.Метод за пасивно избягване – step through

Чрез метода за пасивно избягване са тествани 240 плъха. Животните са разделени в 20 групи по 12 индивида и са третирани чрез орогастрална сонда в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни. За всеки период на третиране има по пет групи животни - Контролна, ХК, ФК, ГК и Кв. Животните от контролната група са третирани с физиологичен разтвор 10 ml/kg. Плъховете от групите, третирани с ХК, ФК, ГК и Кв, са получавали съответно 20 mg/kg ХК, ФК, ГК и Кв под формата на разтвор 10 ml/kg. Всички експерименти са проведени по едно и също време (между 9.00 и 13.00 h). Веществата са приложени 60 min преди началото на обучението и не са прилагани преди тестовете за памет на 3^{ти} и 24^{ти} час след обучението. Отчитан е престоят на опитното животно в осветената камера на апарата (латентно време) в sec като показател за паметта и обучението на опитните животни.

Резултатите по отношение на латентното време при тестовете за ретенция на 3^{ти} и 24^{ти} час са представени:

-след 7-дневно третиране в Табл. 13 и на Фиг. 7

- след 14-дневно третиране в Табл. 13 и на Фиг. 7

- след 21-дневно третиране в Табл. 14 и на Фиг. 8

- след 30-дневно третиране в Табл. 14 и на Фиг. 8

Резултатите по отношение на латентното време са обработени чрез t-тест.

След третиране в продължение на 7 дни, латентното време при животните от контролната група е съответно 126.5 ± 16.34 sec на 3^{ти} час и 136.3 ± 13.35 sec на 24^{ти} час след тренировъчната сесия. При групите, третирани с ХК, ФК, ГК и Кв се наблюдава тенденция за повишаване на латентното време, което обаче не се различава статистически значимо от латентното време на контролната група животни (Табл. 13; Фиг. 7).

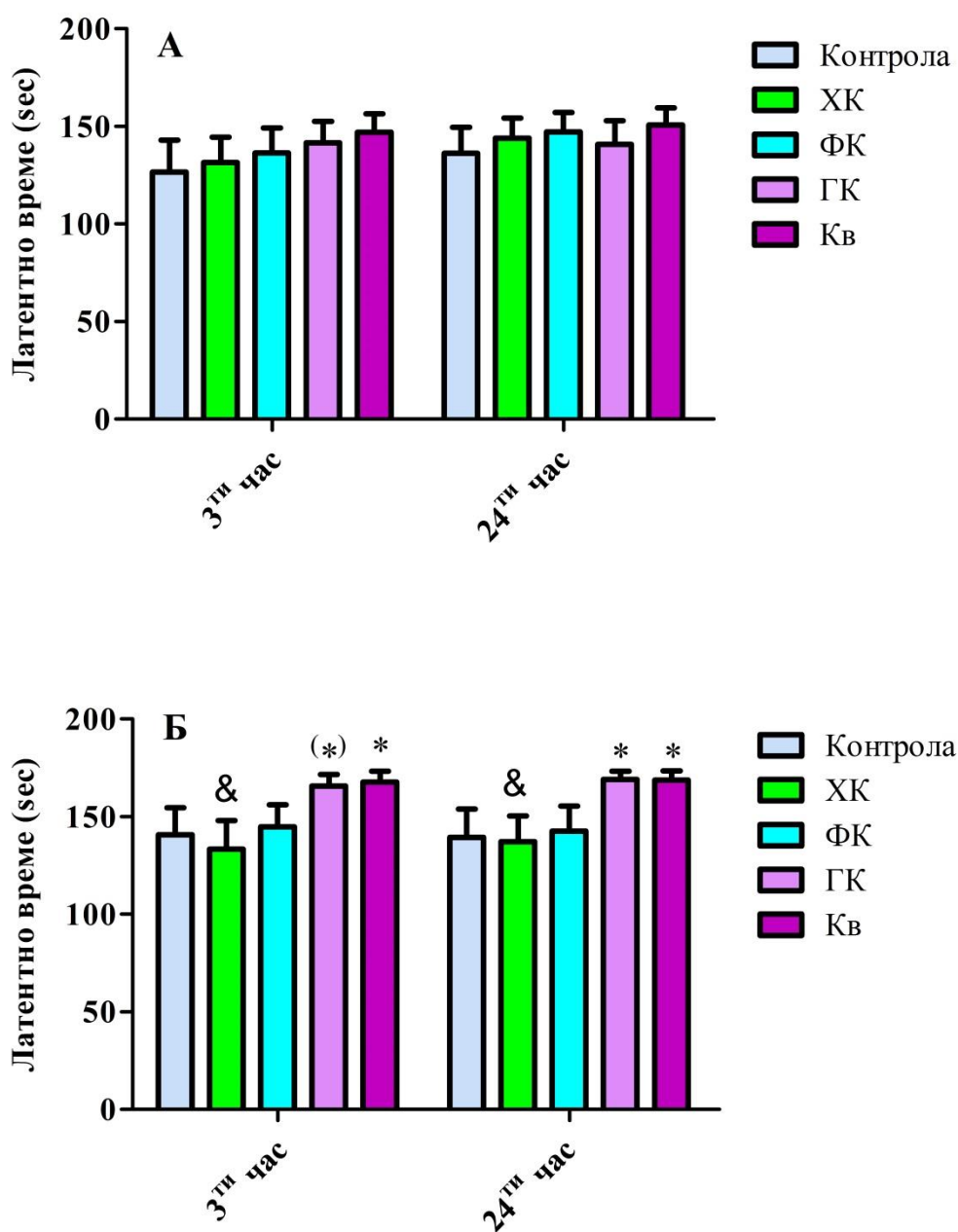
След третиране в продължение на 14 дни, латентното време при животните от контролната група е съответно 140.8 ± 13.81 sec на 3^{ти} час и 139.4 ± 14.46 sec на 24^{ти} час след тренировъчната сесия. При групата, третирана с ХК, се наблюдава статистически незначимо скъсяване на латентното време при тестовете за ретенция на 3^{ти} и 24^{ти} час в сравнение с контролната група. При групата, третирана с ФК, се наблюдава тенденция за повишаване на латентното време, но разликата не е статистически значима. При животните от група ГК латентното време при теста за памет на 3^{ти} час се удължава с гранична значимост ($p=0.05$), а при теста на 24^{ти} час – със значимост $p<0.05$. При плъховете от група Кв латентното време и при двата теста за ретенция се удължава със значимост $p<0.05$ спрямо контролната група.

В група ХК латентното време е значимо по-ниско от това на група Кв ($p<0.05$ за 3^{ти} и 24^{ти} час), докато при групи ФК и ГК не се наблюдава статистически значима разлика спрямо група Кв (Табл. 13; Фиг. 7).

Табл. 13. Латентно време (sec) при тестовете за ретенция на 3^{ми} и 24^{ми} час при плъхове, третиран с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) за 7 и 14 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

(*) $p=0.05$, * $p<0.05$ спрямо контролната група; § $p<0.05$ спрямо група Кв

Период Група	7 дни		14 дни	
	3 ^{ти} час	24 ^{ти} час	3 ^{ти} час	24 ^{ти} час
Контрола (n=12)	126.5 \pm 16.34	136.3 \pm 13.35	140.8 \pm 13.81	139.4 \pm 14.46
ХК (n=12)	131.5 \pm 12.90	143.9 \pm 10.28	133.4 \pm 14.67 §	137.3 \pm 13.10 §
ФК (n=12)	136.4 \pm 12.87	147.3 \pm 9.78	144.8 \pm 11.36	142.5 \pm 12.95
ГК (n=12)	141.6 \pm 10.98	140.8 \pm 12.19	165.8 \pm 5.82 (*)	169.0 \pm 4.41 *
Кв (n=12)	147.1 \pm 9.36	150.8 \pm 8.81	167.7 \pm 5.64 *	168.8 \pm 4.83 *



Фиг. 7. Латентно време (sec) при тестовете за ретенция на 3^{ти} и 24^{ти} час при плъхове, третиран с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) за 7 дни (панел А) и 14 дни (панел Б) при метода за пасивно избягване (step through). Резултатите са представени като средна стойност ± S.E.M.; n=12.
 (*) p=0.05, * p<0.05 спрямо контролната група; § p<0.05 спрямо група Кв

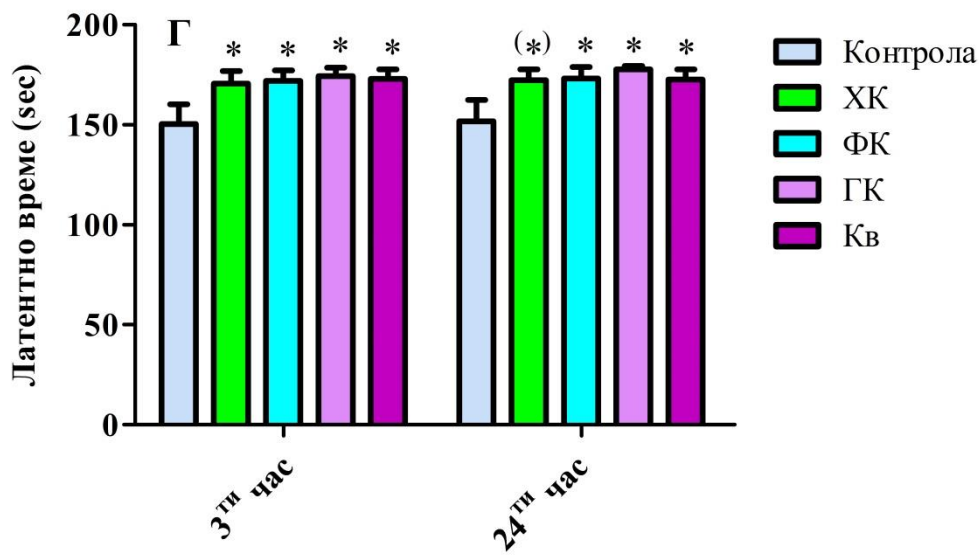
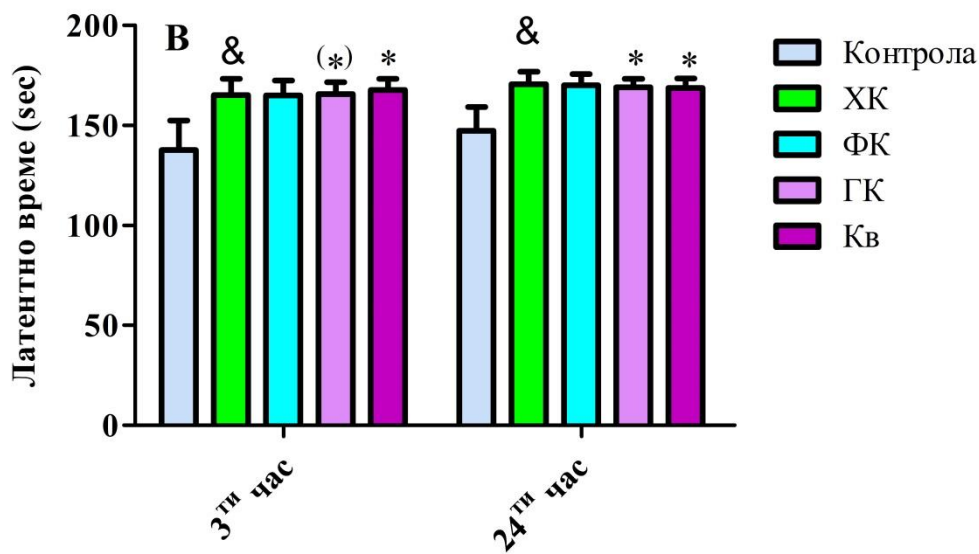
След 21-дневно третиране латентното време на контролната група е съответно 137.7 ± 14.67 sec на 3^{ти} час и 147.4 ± 11.87 sec на 24^{ти} час след тренировъчната сесия. При групата, третирана с ХК, се наблюдава статистически незначимо скъсяване на латентното време при тестовете за ретенция на 3^{ти} и 24^{ти} час. При групата, третирана с ФК, се наблюдава тенденция за удължаване на латентното време при двата теста за памет, но разликата не е статистически значима. При група ГК латентното време при теста за памет на 3^{ти} час се удължава с гранична значимост ($p=0.05$), а при теста на 24^{ти} час – със значимост $p<0.05$. При групата, третирана с Кв, латентното време и при двата теста за ретенция се удължава със значимост $p<0.05$. В група ХК латентното време е значимо по-ниско от това на група Кв ($p<0.05$ за 3^{ти} и 24^{ти} час), докато при групи ФК и ГК не се наблюдава статистически значима разлика спрямо група Кв (Табл. 14; Фиг. 8).

След 30-дневно третиране латентното време на контролната група е съответно 150.4 ± 9.77 sec на 3^{ти} час и 151.7 ± 10.76 sec на 24^{ти} час след тренировъчната сесия. При групата, третирана с ХК, латентното време при теста за ретенция на 3^{ти} час се удължава със значимост $p<0.05$, а на 24^{ти} час – с гранична значимост ($p=0.05$). В група ФК латентното време и при двата теста за ретенция се удължава значимо ($p<0.05$). Животните от група ГК също показват значимо удължаване на латентното време при тестовете за памет на 3^{ти} и 24^{ти} час ($p<0.05$). При Кв групата латентното време и при двата теста за ретенция се удължава със значимост $p<0.05$ спрямо контролната група. След 30-дневно третиране ХК, ФК, ГК и Кв имат сравними ефекти по отношение на удължаването на латентното време (Табл. 14; Фиг. 8).

Табл. 14. Латентно време (sec) при тестовете за ретенция на 3^{ми} и 24^{ми} час при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) за 21 и 30 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

(*) $p=0.05$, * $p<0.05$ спрямо контролната група; § $p<0.05$ спрямо група Кв

Период Група	21 дни		30 дни	
	3 ^{ти} час	24 ^{ти} час	3 ^{ти} час	24 ^{ти} час
Контрола (n=12)	137.7 \pm 14.67	147.4 \pm 11.87	150.4 \pm 9.77	151.7 \pm 10.76
ХК (n=12)	165.3 \pm 7.95 §	170.5 \pm 6.43 §	170.5 \pm 6.41 *	172.2 \pm 5.60 (*)
ФК (n=12)	165.1 \pm 7.25	170.0 \pm 5.67	171.9 \pm 5.29 *	173.0 \pm 5.99 *
ГК (n=12)	165.8 \pm 5.82 (*)	169.0 \pm 4.41 *	174.4 \pm 4.22 *	177.7 \pm 1.74 *
Кв (n=12)	167.7 \pm 5.64 *	168.8 \pm 4.83 *	172.9 \pm 4.79 *	172.5 \pm 5.18 *



Фиг. 8. Латентно време (sec) при тестовете за ретенция на 3^{ти} и 24^{ти} час при плъхове, третиран с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) за 21 дни (панел В) и 30 дни (панел Г) при метода за пасивно избягване (step through). Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.; n=12.

(*) $p < 0.05$, * $p < 0.05$ спрямо контролната група; § $p < 0.05$ спрямо група Кв

Обобщение на експерименталните данни от теста step-through

След 7-, 14- и 21-дневно третиране ХК не повлиява значимо паметовите и обучителни процеси при опитните животни. След 30-дневно третиране ХК подобрява процесите на памет и обучение, измерени чрез латентното време.

ФК, приложена за 7, 14 и 21 дни, не повлиява значимо процесите на памет и обучение при опитните животни. След 30-дневно третиране ФК подобрява паметта и обучението, измерени чрез латентното време.

Приложена за 7 дни, ГК не повлиява значимо процесите на памет и обучение при опитните животни. ГК, приложена за 14, 21 и 30 дни, подобрява паметовите и обучителни процеси.

Кв, приложен за 7 дни, не повлиява значимо паметта и обучението при опитните животни. След 14-, 21- и 30 дневно приложение Кв подобрява паметта и обучението.

От тези данни става ясно, че най-рано се проявяват ефектите на ГК и Кв (след 14-дневно третиране) и те са съпоставими по сила. Ефектите на ХК и ФК се проявяват след 30-дневно приложение на веществата, когато фенолните киселини (ХК, ФК и ГК) имат ефект, подобен на Кв.

2.2.Метод за активно двупосочно избягване – shuttle box

Чрез метода за активно двупосочно избягване са тествани 200 плъха. Животните са разделени в 20 групи по 10 индивида. За всеки период на третиране (7,14, 21, 30 дни) са обособени по 5 групи – Контрола, ХК, ФК, ГК и Кв. Животните от контролната група са третирани с физиологичен разтвор 10 ml/kg. Плъховете от останалите групи са получавали съответно ХК, ФК, ГК и Кв в доза 20 mg/kg под формата на разтвор 10 ml/kg. Всички експерименти са провеждани по едно и също време (между 9.00 и 13.00 h). Тренировъчните сесии са извършвани 60 min след последното приложение на веществата. Групите не са третирани преди теста за памет на 24^{ти} час след втората тренировъчна сесия. Отчитан е броят избягвания (авойданс-отговори) на 1^{ви} и 2^{ри} тренировъчен ден, както и в теста за ретенция. Данните са обработени статистически чрез t-тест.

Резултатите по отношение на авойданс-отговорите на първия и втория тренировъчен ден, както и в теста за ретенция са представени:

- след 7-дневно третиране в Табл. 15 и на Фиг. 9

- след 14-дневно третиране в Табл. 15 и на Фиг. 9

- след 21-дневно третиране в Табл. 15 и на Фиг. 10

- след 30-дневно третиране в Табл. 15 и на Фиг. 10

След 7-дневно третиране броят избягвания в контролната група е съответно 4.4 ± 0.34 на 1^{ви} тренировъчен ден, 6.2 ± 0.44 на 2^{ри} тренировъчен ден и 8.5 ± 0.27 при теста за ретенция 24 h след 2^{ри} тренировъчен ден. При групите, третирани с ХК, ФК, Гк и Кв не се наблюдава значима промяна на броя на авойданс-отговорите през първия и втория тренировъчен тест и при теста за ретенция в сравнение с контролната група (Табл. 15; Фиг. 9).

След 14-дневно третиране броят на авойданс-отговорите при животните от контролната група е съответно 4.2 ± 0.47 на 1^{ви} тренировъчен ден, 6.6 ± 0.40 на 2^{ри} тренировъчен ден и 8.6 ± 0.40 при теста за ретенция, т.е наблюдава се тенденция за неговото повишаване. При групата, третирана с ХК, не се повлиява значимо броят на авойданс-отговорите през първия и втория тренировъчен тест и при теста за ретенция спрямо контролната група, като през двата тренировъчни дни се наблюдава тенденция за повишаване на броя избягвания. В група ФК група също също се наблюдава тенденция за повишаване на броя избягвания на 1^{ви} и 2^{ри} тренировъчен ден и в теста за ретенция, като разликата не е статистически значима спрямо контролната група. В групата, третирана с ГК, броят на авойданс-реакциите се повишава със значимост от $p < 0.001$ на първия тренировъчен тест, както и със значимост от $p < 0.01$ на втория тренировъчен тест и при теста за ретенция. При група Кв броят на авойданс-отговорите също се повишава както на двата тренировъчни теста, така и при теста за ретенция със статистическа значимост $p < 0.01$ спрямо контролната група (Табл. 16; Фиг. 9). В сравнение с Кв ХК повлиява по-слабо паметовите и обучителни функции ($p < 0.05$ за 1^{ви} и 2^{ри} тренировъчен ден и $p < 0.01$ в теста за ретенция). ФК също повлиява по-слабо паметовите и обучителни функции в теста за ретенция ($p < 0.05$ спрямо Кв). ГК повлиява паметта и обучението при опитните животни сравнено с Кв (Табл. 15; Фиг. 9).

След 21-дневно третиране броят на авойданс-отговорите при животните от контролната група е съответно 4.6 ± 0.45 на 1^{ви} тренировъчен ден, 6.1 ± 0.38 на 2^{ри} тренировъчен ден и 8.2 ± 0.44 при теста за ретенция. При група ХК се наблюдава значимо повишаване на броя на авойданс-отговорите на първия тренировъчен ден ($p < 0.05$), на втория тренировъчен ден ($p < 0.01$) и при теста за ретенция ($p < 0.05$) в

сравнение с контролната група. При животните, третирани с ФК, броят на авойданс-отговорите на първия тренировъчен ден не се променя значимо, но се повишава на втория тренировъчен ден със значимост $p < 0.05$ и при теста за ретенция със значимост $p < 0.01$ спрямо контролната група. При група ГК значимо се повишава броят на авойданс-реакциите на първия тренировъчен тест ($p < 0.05$ спрямо контролната група), както и на втория тренировъчен тест и при теста за ретенция ($p < 0.01$ спрямо контролната група). При групата, третирана с Кв броят на авойданс-реакциите също се повишава значимо при двата тренировъчни теста и при теста за ретенция (статистическа значимост $p < 0.01$ спрямо контролната група) (Табл. 16; Фиг. 10). При сравнение на фенолните киселини с Кв се установява, че след 21-дневно приложение ХК, ФК и ГК увеличават броя на авойданс-отговорите в тренировъчните сесии и в теста за ретенция сравнено с Кв (Табл. 15; Фиг. 10).

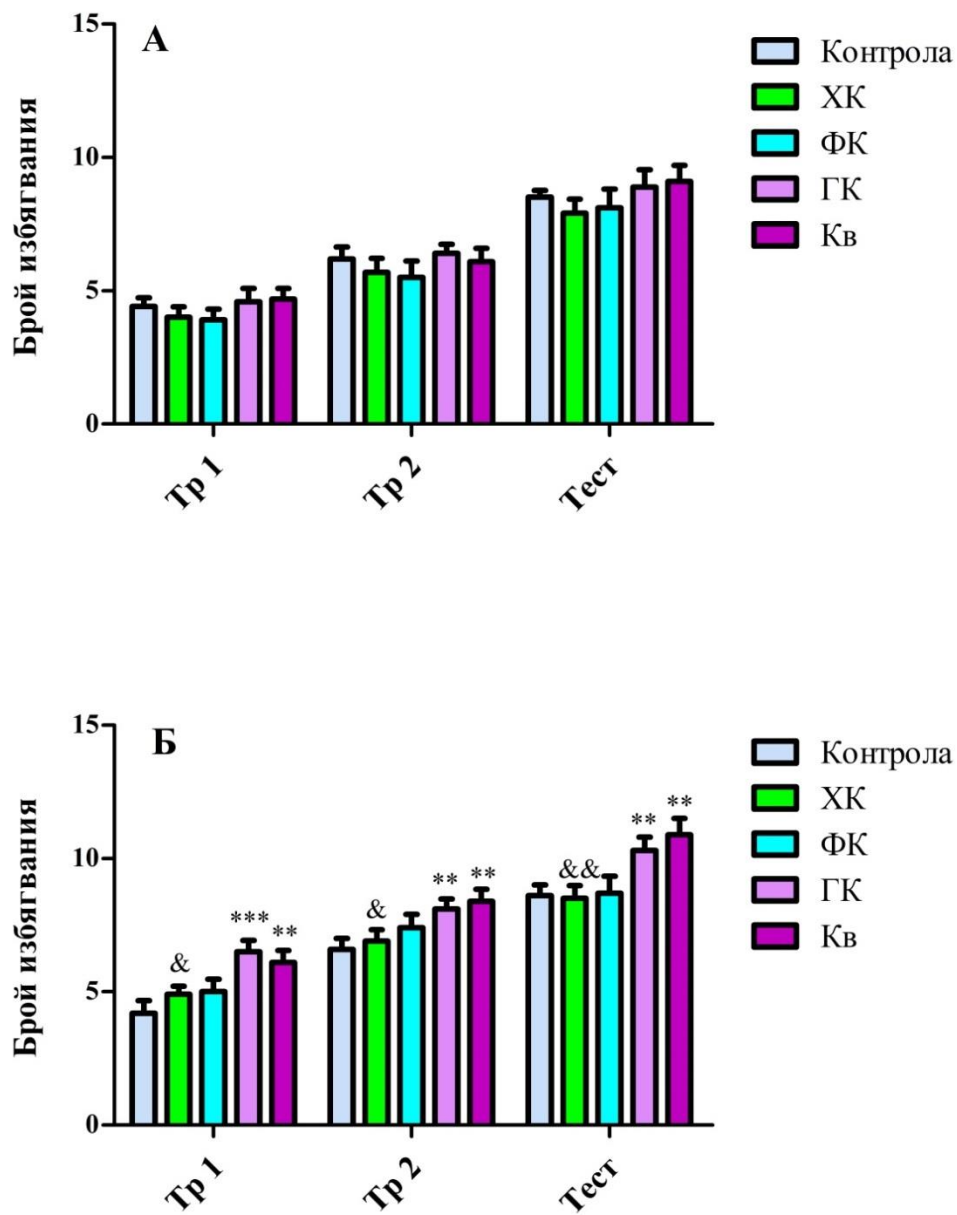
След 30-дневно третиране броят на авойданс-отговорите при животните от контролната група е съответно 4.4 ± 0.40 на 1^{ви} тренировъчен ден, 5.8 ± 0.33 на 2^{ри} тренировъчен ден и 7.9 ± 0.41 при теста за ретенция. В групата, третирана с ХК, броят на авойданс-отговорите значимо се повишава на първия и на втория тренировъчен ден, както и при теста за ретенция (значимост $p < 0.05$) в сравнение с контролната група. При ФК групата също се наблюдава значимо повишение на броя на авойданс-реакциите на първия тренировъчен тест (значимост $p < 0.05$), както и на втория тренировъчен тест и при теста за ретенция със значимост $p < 0.01$. При животните от ГК групата се наблюдава значимо повишение на броя на авойданс-отговорите на първия тренировъчен ден ($p < 0.001$), както и на втория тренировъчен ден и при теста за ретенция ($p < 0.01$). В Кв групата също значимо се повишава броят на авойданс-отговорите на първия тренировъчен ден ($p < 0.01$), както и на втория тренировъчен ден ($p < 0.001$) и при теста за ретенция ($p < 0.01$) (Табл. 16; Фиг. 10).

При сравнение на фенолните киселини с Кв се установява, че след 30-дневно приложение ХК, ФК и ГК увеличават броя на авойданс-отговорите в тренировъчните сесии и в теста за ретенция сравнено с Кв (Табл. 15; Фиг. 10).

Табл. 15. Брой на избягванията по време на първата (1^{ва} гр.) и втората (2^{ра} гр.) обучителна сесия и в теста за ретенция (ТР) при теста за активно двупосочно избягване (shuttle box) при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни. Резултатите са представени като средна стойност ± S.E.M.

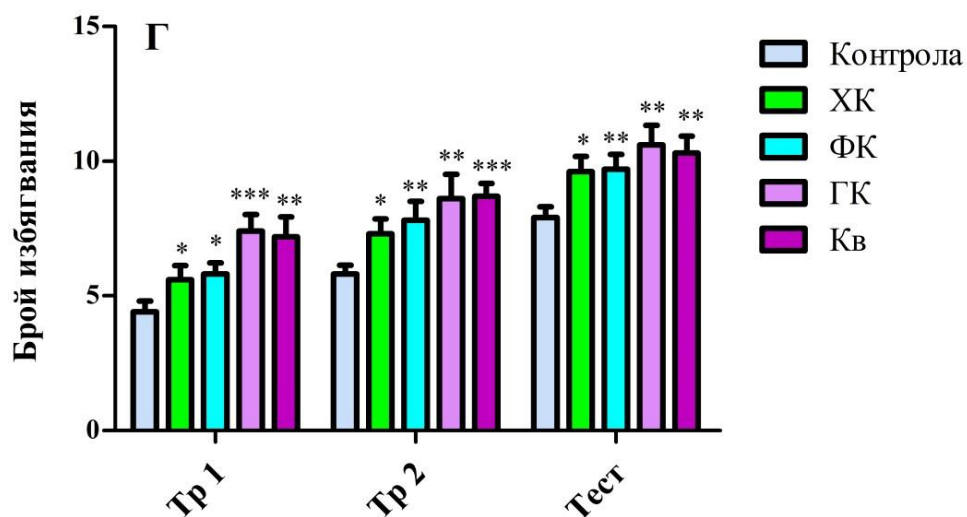
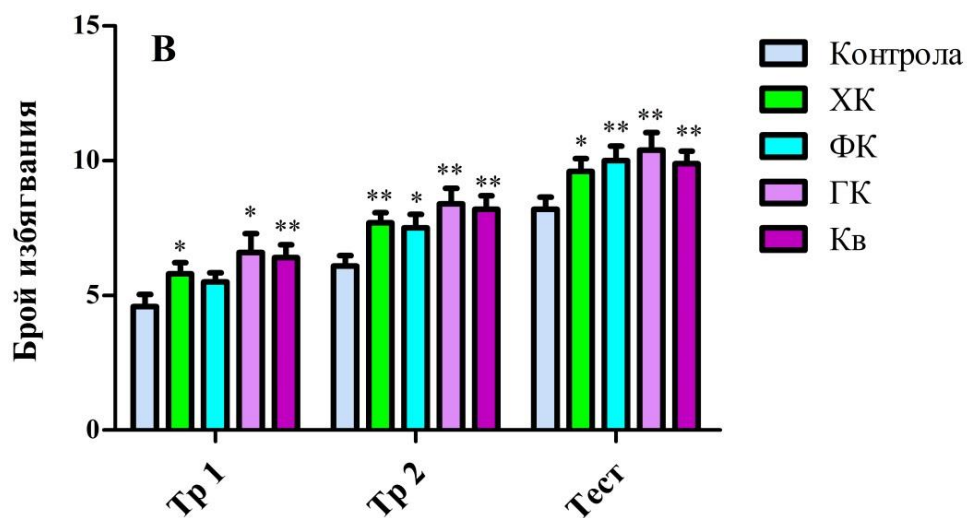
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ спрямо група Кв

Третиране	Група		Контрола (n=10)	ХК (n=10)	ФК (n=10)	ГК (n=10)	Кв (n=10)
	Тест						
7 дни	1 ^{ва} гр.		4.4 ± 0.34	4.0 ± 0.39	3.9 ± 0.41	4.6 ± 0.50	4.7 ± 0.40
	2 ^{ра} гр.		6.2 ± 0.44	5.7 ± 0.52	5.5 ± 0.62	6.4 ± 0.34	6.1 ± 0.50
	ТР		8.5 ± 0.27	7.9 ± 0.53	8.1 ± 0.72	8.9 ± 0.64	9.1 ± 0.6
14 дни	1 ^{ва} гр.		4.2 ± 0.47	4.9 ± 0.31 §	5.0 ± 0.47	6.5 ± 0.43 ***	6.1 ± 0.46 **
	2 ^{ра} гр.		6.6 ± 0.40	6.9 ± 0.43 §	7.4 ± 0.50	8.1 ± 0.38 **	8.4 ± 0.45 **
	ТР		8.6 ± 0.40	8.5 ± 0.48 §§	8.7 ± 0.63 §	10.3 ± 0.50 **	10.9 ± 0.60 **
21 дни	1 ^{ва} гр.		4.6 ± 0.45	5.8 ± 0.42 *	5.5 ± 0.34	6.6 ± 0.69 *	6.4 ± 0.48 **
	2 ^{ра} гр.		6.1 ± 0.38	7.7 ± 0.37 **	7.5 ± 0.50 *	8.4 ± 0.58 **	8.2 ± 0.49 **
	ТР		8.2 ± 0.44	9.6 ± 0.48 *	10.0 ± 0.54 **	10.4 ± 0.65 **	9.9 ± 0.46 **
30 дни	1 ^{ва} гр.		4.4 ± 0.40	5.6 ± 0.52 *	5.8 ± 0.42 *	7.4 ± 0.62 ***	7.2 ± 0.73 **
	2 ^{ра} гр.		5.8 ± 0.33	7.3 ± 0.56 *	7.8 ± 0.70 **	8.6 ± 0.90 **	8.7 ± 0.47 ***
	ТР		7.9 ± 0.41	9.6 ± 0.58 *	9.7 ± 0.56 **	10.6 ± 0.73 **	10.3 ± 0.63 **



Фиг. 9. Брой на избягванията по време на първата и втората обучителна сесия и в теста за ретенция при теста за активно дупосочно избягване при плъхове, третиран с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 7 дни (панел А) и 14 дни (панел Б). Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.; $n = 10$.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ спрямо група Кв



Фиг. 10. Брой на избягванията по време на първата и втората обучителна сесия и на теста за ретенция при теста за активно двупосочно избягване (shuttle box) при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 21 дни (панел В) и 30 дни (панел Г). Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.; $n = 10$.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ спрямо контролната група

Обобщение на експерименталните данни от теста shuttle box

ХК, приложена за 7 и 14 дни, не повлиява значимо паметовите и обучителни процеси при опитните животни. След 21- и 30-дневно приложение ХК подобрява процесите на памет и обучение.

При третиране с ФК в продължение на 7 и 14 дни паметта и обучението не се повлияват статистически значимо. Приложена за 21 и 30 дни, ФК подобрява паметовите и обучителни процеси при опитните животни.

ГК не повлиява значимо процесите на памет и обучение след 7-дневно приложение.

Приложена за 14, 21 и 30 дни, ГК подобрява паметта и обучението.

Кв, приложен за 7 дни, не повлиява значимо процесите на памет и обучение. След 14-, 21- и 30 дневно третиране Кв подобрява паметовите и обучителни процеси при опитните животни.

Тези данни показват, че ефектите на ГК и Кв върху паметта и обучението настъпват най-рано (след 14-дневно третиране). По-късно настъпват ефектите на ХК и ФК – след 21-дневно третиране. Ефектите на фенолните киселини и Кв са сравними помежду си.

2.3. Дискусия

Невродегенеративните заболявания (напр. болест на Алцхаймер и на Паркинсон) са често срещани в съвременното и са свързани със значително влошаване на качеството на живот най-вече на възрастното население и със сериозни разходи за обществото.

Болестта на Алцхаймер е водещата причина за деменция (Reitz et al., 2011). С увеличаване продължителността на живота голямо значение придобива и естественото влошаване на когнитивните функции с възрастта. Засегнатите от деменция в световен мащаб се оценяват на около 24 милиона и се предвижда да се увеличават двойно на всеки 20 години. Към 2020 г. се очаква заболелите от деменция да са 29 милиона, 2/3 от които да страдат от болестта на Алцхаймер (Dufouil and Alperovitch, 2005). Честотата на болестта на Паркинсон се оценява от порядъка на 102-190 случаи на 100 000 в Западните страни, като поява на симптомите обичайно настъпва след 60-годишна възраст и нараства с увеличаване на възрастта (van den Eeden et al., 2003).

Настоящото изследване е проведено чрез използване на два метода – пасивно (инхибиторно) избягване (shuttle box) и активно избягване (step-through). Те представляват класически методи за изследване на паметта при животни. При метода за пасивно избягване се извършва тестване на имплицитния асоциативен тип памет. От резултатите при теста за ретенция на 3^{ти} час съдим за краткотрочната памет на

животните, а при теста на 24^{ти} час – за дългосрочната памет (Bovet et al., 1969; Petkov et al., 1993; Barrett et al., 2016). При теста за активно избягване се следи отново имплицитната асоциативна памет, като се съди основно за дългосрочната ретенция на паметовите следи (Buresova and Bures, 1983; Barrett et al., 2016).

Резултатите от нашето изследване показват, че ХК и ФК подобряват запаметяването и усилват обучителните процеси при опитните животни след 21- и 30-дневно приложение. ГК и Кв показват същите ефекти още след 14 дни. Множество изследвания върху полифенолите потвърждават тяхното положително влияние върху паметта (Spencer, 2010; Rendeiro et al., 2012a; Rendeiro et al., 2012b; Willis et al., 2009; Shukitt-Hale et al., 2015).

Редица автори установяват положителен ефекти на полифенолите, и по-специално на ХК, ФК, ГК и Кв, в модели на болест на Алцхаймер при плъхове и мишки (Cheng D et al., 2014, Han et al. 2015; Yan et al., 2001, Cho J-Y et al., 2005; Mansouri et al., 2013a, Ban et al., 2008; Wang D-M et al., 2014, Sabogal-Guaqueta et al., 2015, Patil et al., 2003). Други автори изследват ефекта на тези вещества в модели на болест на Паркинсон при плъхове, риби-зебра, както и в клетъчна култура (Shen et al., 2012; Mansouri et al., 2013b; Bureau et al., 2008, Zhang et al., 2011). Фенолните киселини и Кв се прилагат и в други модели на увреждане на паметта, където отново демонстрират протективни ефекти. ХК подобрява показателите за памет при scopolamine-индуцирани паметови нарушения при мишки (Kwon S-H et al., 2010). В клинично проучване ФК подобрява паметовите функции при фронтотемпорална лобарна дегенерация или деменция с телца на Lewy (Kimura and Takamatsu, 2015) и при предизвикани от триметилкалай когнитивни увреждания при мишки (Kim MJ et al., 2007). ГК намалява уврежданията в модел на васкуларна деменция, предизвикана чрез перманентна билатерална оклузия на a. carotis communis при плъхове (Korani et al., 2014). Кв подобрява паметта в модел на паметови увреждания, предизвикани от повтаряща се церебрална исхемия при плъхове (Pu et al., 2007), както и при dexamethasone-индуциран паметов дефицит (Tongjaroenbuangam et al., 2011) и предизвикани от етанол когнитивни увреждания при мишки (Singh et al., 2003). Влиянието на Кв върху паметта при интактни животни е изследвано, но с противоречиви резултати (Jung et al., 2010; Priprem et al., 2008; Patil et al., 2003). При хора флавоноидите (вкл. Кв) се асоциират със забавяне на упадъка на когнитивните функции с възрастта (Letenneur et al., 2007). Данните за влиянието на фенолните киселини при индивиди без паметови нарушения са изключително оскъдни.

Положителното влияние на фенолните киселини и кверцетин върху паметовите и обучителни процеси до известна степен се дължи на антиоксидантното действие на тези вещества. ХК е определена от Siquet et al. (2006) като „chain-breaking“ антиоксидант, т.е. такъв, който спира вече започнала свободнорадикална увреда. Тя осъществява този ефект вероятно чрез изчистване на кислородните радикали („scavenging“), свързано с нейния капацитет за отдаване на водород и способността ѝ да стабилизира образуващия се впоследствие феноксилен радикал. В модел на оксидативна невронална смърт в клетъчна култура ХК потиска индуцираните от H_2O_2 апоптотична кондензация на клетъчното ядро на невроните и down-регулация на антиапоптотичните протеини Bcl-2 и Bcl-XL. В същото време се блокират проапоптотичните фактори каспаза-3 и про-поли (АДФ-рибоза) полимераза (Kim J et al., 2012). ХК потиска увеличението на MDA и на маркерите за оксидативен стрес SOD, каталаза (CAT) и глутатионовото съдържание в модел на methotrexate-индуцирано увреждане на церебелума при плъхове (Vardi et al., 2012). ФК също демонстрира антиоксидантен ефект в клетъчна култура, който е по-силен от този на други класически антиоксиданти като α -токоферол, β -каротен и аскорбинова киселина самостоятелно или в комбинация (Trombino et al., 2004). Антиоксидантните свойства на ГК също са демонстрирани в култура от плъши и човешки клетки (Dwibedy et al., 1999; Lu Z et al., 2006). Поради наличието на интрацелуларни ефекти, но липса на промяна в антиоксидантния капацитет на човешката плазма се предполага, че ГК не изчиства директно кислородните радикали, а ефектът ѝ *in vivo* се дължи на индиректна протекция срещу радикалите, например чрез активация на транскрипционни фактори (Ferk et al., 2011). Някои от съединенията на ГК дори се използват в хранителната индустрия като антиоксидантни добавки: Е-310 (пропилгалат), Е-311 (октилгалат), Е-312 (лаурилгалат) (Serrano et al., 1998). Кв ефективно изчиства различни кислородни радикали (Nanasaki et al., 1994) и реактивни азотни радикали (Haenen et al., 1997) в клетъчни култури. Кв също така усилва ендогенния антиоксидантен капацитет на плазмата в значителна степен (Arts et al., 2004). Кв потиска свободнорадикалните реакции на 3 нива: формирането на супероксиден йон, генериране на хидроксилни радикали и формирането на липидни пероксидни радикали (Afanas'ev et al., 1989). Друг възможен механизъм при подобреното на паметта от страна на ХК е инхибиция на ацетилхолинестеразната активност в хипокампуса и фронталния кортекс. Такъв ефект е установен от Kwon S-H et al. (2010) при мишки. Ацетилхолинът играе важна роля в паметовите процеси, по-специално в енто- и перириналния кортекс и

хипокампуса, важни за запазването на нови спомени (Hasselmo, 2006). При Кв също е установено взаимодействие с ацетилхолинови рецептори, и по специално активиране на $\alpha 7$ субтипа на никотиновия рецептор, разположен главно в кортикалната и лимбична зона, включително в хипокампуса (Lee B-H et al., 2010).

Паметовите и обучителни процеси се медиират до известна степен и от т. нар. brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Той е важен за преживяването на септални холонергични неврони *in vitro* (участващи в пространствената памет), на допаминергични неврони в substantia nigra (Human et al., 1991), както и на кортикалните неврони (Ghosh et al., 1994). Има данни, че BDNF предпазва плъши хипокампусни, септални и кортикални неврони от метаболитно и ексцитотоксично увреждане (Cheng B and Mattson, 1994), както и че усилва глутаматергичната синаптична пластичност в хипокампусни неврони от плъхове (Lemann et al., 1994).

Установено е също, че експресията на BDNF се увеличава при контекстуално обучение (Hall et al., 2000). Ниски нива на BDNF се свързват с влошена пространствената памет при мишки (Linnarsson et al., 1997). Понижени нива на този невротрофичен фактор са наблюдавани при хора с болест на Алцхаймер (Phillips et al., 1991), болест на Паркинсон (Howells et al., 2000) и при пациенти депресия, където е отчетено и тяхното възстановяване при третиране с антидепресанти (Shimizu et al., 2003). ХК и Кв повишават нивата на BDNF и на неговия регулиращ фактор cAMP response element binding protein (CREB) в хипокампуса на мишки (Yabe et al., 2010; Tchanchou et al., 2009).

Един от механизмите, предпазващи мозъчните клетки от увреждане, е потискане на отделянето на проинфламаторни фактори. Повишени нива на IL-6 и TNF- α са докладвани при болестта на Алцхаймер при хора (Hyun and Kang, 2015). ХК потиска продукцията на NO и TNF- α в липополизахарид-стимулирана микроглия и намалява LPS-индуцираното освобождаване на IL-1 β и TNF- α в substantia nigra (Shen et al., 2012). В други модели ХК потиска експресията на IL-8 и на колонен макрофагеален инфламаторен протеин-2 (Shin et al., 2015), на COX-2 (Domitrović et al., 2014) и на IL-4 и IL-5 (Kim H-R et al., 2010) при мишки. При интрацеребровентрикуларно приложение на амилоид β ФК намалява експресията на IL-1 β (Yan et al., 2001) и на IL-1 α (Cho J-Y et al., 2005) при мишки. При мишки ФК потиска и освобождаването на IL-6 и TNF- α (Kesh et al., 2013), на iNOS и COX-2 (Kim H-Y et al., 2011). ГК също потиска освобождаването на IL-6 и TNF- α (Kim S-H et al., 2006), както и експресията на гени за цитокините IL-1 β и IL-6, за хемокини, COX-2 и матриксна металопротеиназа-9 (Yoon et al., 2013) в

клетъчни култури. Bureau et al. (2008) установяват намаляване на невроналното възпаление от Кв чрез потискане на гените за IL-1 и TNF- α в липополизахарид-стимулирана микроглия. Кв потиска свръхпродукцията на NO и свръхекспресията на iNOS и намалява експресията на проинфламаторни гени за IL-1 β , TNF- α и COX-2 (Zhang et al., 2011) в клетъчна култура и при риби зебра, както и за С-реактивен протеин в клетъчна култура (García-Mediavilla et al., 2007). Кв намалява и отделянето на хистамин, левкотриени, P gD_2 и GM-CSF в култура от човешки мастоцити (Kimata et al., 2000).

Друг възможен протективен механизъм на фенолните киселини и Кв е потискане на апоптозата и дори увеличена пролиферация на нервни клетки. ХК инхибира апоптозата (Ji et al., 2013; Domitrović et al., 2014) и автофагията при мишки чрез потискане на p53, Вах активна каспаза-3, циклин D $_1$ (Domitrović et al., 2014). ФК също намалява експресията на проапоптотични гени при мишките (Yu et al., 2006). ГК противодейства на индуцираната от амилоид апоптотична невронална смърт при плъхове, вероятно чрез намалено отделяне на глутамат и реактивни кислородни видове (Van et al., 2008). Кв влияе негативно върху признаците на апоптоза, а именно повишава Bcl-2, каспаза-3 и фрагментация на ДНК (Giacoppo et al., 2015) при мишки. Кв също така увеличава експресията на X-свързания протеин-инхибитор на апоптозата в мозъка на плъхове (Hu et al., 2011). Yabe et al. (2010) демонстрират сигнификантно усилване на пролиферацията в неврална култура от стволови/прогениторни клетки от теленцефалон на 14-дневни ембриони на плъхове от ФК, а така също и на стволовите клетки при възрастни плъхове *in vivo*.

Фенолните киселини и Кв вероятно допринасят за подобрието на паметовите и обучителните процеси и чрез своите съдови ефекти. ХК и ФК подобряват ендотелната функция чрез увеличаване биодостъпността на азотния оксид (NO) в артериалната гладка мускулатура на плъхове, чрез което водят до вазодилатация (Zhao Y et al., 2012; Choi et al., 2012). ГК също може да доведе до съдоразширяващ ефект, тъй като увеличава отделянето на NO и инхибира ангиотензин-конвертиращия ензим (ACE) в човешки ендотелни клетки от умбиликална вена (Kang et al., 2015). При Кв също се наблюдава директен и индиректен (медиран от NO) вазодилатиращ ефект в изолирана аорта от плъх (Chen SK and Pace-Asciak, 1996). Кв поне отчасти премахва и калций-индуцираната контракция в гладка мускулатура, включително в съдовете (Morales et al., 1994). ГК също така предпазва човешка ендотелна клетъчна култура от увреждане (Kam et al., 2014), а Кв инхибира тромбин- и АДФ-индуцираната агрегация на

изолирани човешки тромбоцити (Pace-Asciak et al., 1995). Bucki et al. (2003) също установяват антитромбозен ефект на Кв, чрез намаляване формирането на тромбин и нивата на фосфатидилинозитол дифосфат в изолирани човешки тромбоцити. Друг важен съдов ефект на фенолните киселини и Кв е предотвратяването на атеросклеротичните изменения. ХК и ФК показват антиатерогенен ефект като сигнификантно потискат ензими, участващи в продукцията на холестерол при мишки (Cho A-S et al., 2010; Kwon EY et al., 2010). ХК увеличава оксидацията на мастни киселини и експресията на рецепторите PPAR α в черния дроб на мишки (Cho A-S et al., 2010). ФК значимо намалява нивата на общия холестерол и аполипопротеин В (apo В) в плазмата на мишки, както и съотношението apo В/apo А-I. Впечатляващо, аортни плаки са експресирали 80% от мишките в контролната група и нито едно животно от групата, третирана с ФК (Kwon EY et al., 2010). Кв също показва антиатерогенен ефект чрез потискане на оксидативната модификация на нископлътностните липопротеини LDL от макрофагите (de Whalley et al., 1990) и потискане на пролиферацията на интимални гладкомускулни клетки (Perez-Vizcaino et al., 2006) в клетъчни култури. При срезово проучване сред японски жени Arai et al. (2000) установяват статистически значима негативна корелация на приема на кверцетин с нивата на общия и LDL-холестерол.

Изява на ефекта на ХК и ФК след 21-дневно третиране, както и на ГК и Кв след 14-дневно третиране и липсата му при по-кратките периоди на приложение на веществата могат да бъдат обяснени с натрупването на полифенолите в мозъка след дълготрайно приложение (Willis et al., 2009; Spencer, 2008).

3. Изследване ефектите на хлорогенова, ферулова, галова киселина и кверцетин върху тревожното поведение в повдигнат кръстосан лабиринт (elevated plus maze)

Изследването е проведено върху 200 плъха, разделени в 20 групи по 10 животни. Животните са третирани в продължение на 7, 14, 21 и 30 дни, като за всеки период има по 5 групи – Контрола, ХК, ФК, ГК и Кв. Животните от контролните групи са третирани с физиологичен разтвор в обем 10 ml/kg, а тези от останалите групи – съответно с ХК, ФК, ГК и Кв под формата на разтвор с концентрация 20 mg/kg в обем 10 ml/kg. Отчитат се следните показатели: брой на влизания в отворените и затворените рамена и времето, прекарано в тях, отчетено в секунди, както и общият брой влизания в

рамената и съотношението на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания. Резултатите са обработени статистически чрез t-тест.

3.1. Резултати

Резултатите по отношение на броя влизания в отворените рамена на лабиринта и времето, прекарано там, са представени:

- *след 7-дневно третиране* в Табл. 16 и на Фиг. 11
- *след 14-дневно третиране* в Табл. 17 и на Фиг. 11
- *след 21-дневно третиране* в Табл. 18 и на Фиг. 11
- *след 30-дневно третиране* в Табл. 19 и на Фиг. 11

Резултатите по отношение на броя влизания в затворените рамена на лабиринта и времето, прекарано там, са представени:

- *след 7-дневно третиране* в Табл. 16 и на Фиг. 12
- *след 14-дневно третиране* в Табл. 17 и на Фиг. 12
- *след 21-дневно третиране* в Табл. 18 и на Фиг. 12
- *след 30-дневно третиране* в Табл. 19 и на Фиг. 12

Резултатите по отношение на общия брой влизания в отворените и затворените рамена на лабиринта и индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания са представени:

- *след 7-дневно третиране* в Табл. 16 и на Фиг. 13
- *след 14-дневно третиране* в Табл. 17 и на Фиг. 13
- *след 21-дневно третиране* в Табл. 18 и на Фиг. 13
- *след 30-дневно третиране* в Табл. 19 и на Фиг. 13

След 7-дневно третиране броят влизания в отворените рамена на лабиринта, времето, прекарано в тях, броят влизания в затворените рамена на лабиринта и времето, прекарано там, както и общият брой навлизания в рамената на лабиринта и индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания са представени в Табл. 16 и на Фиг. 19, 20, 21. При групата, третирана с ХК, се наблюдава увеличен брой влизания в отворените рамена на лабиринта (статистическа значимост $p < 0.05$) и удължаване на времето, прекарано в тях ($p < 0.05$) (Табл. 16; Фиг. 11). Броят влизания в затворените

рамена при тази група не се променя значимо, но се скъсява времето, прекарано в тях ($p < 0.01$) (Табл. 17; Фиг. 12). При същата група не се променят значимо общият брой навлизания в рамената на лабиринта, както и индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания (Табл. 16; Фиг. 13). При животните, третирани с ФК, не се наблюдава значима промяна в изследваните показатели за тревожност (брой на влизания в отворените и затворените рамена и времето, прекарано в тях, отчетено в секунди, както и общият брой влизания в рамената и съотношението на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания) (Табл. 16; Фиг. 11, 12, 13). При група ГК не се наблюдава значима промяна на броя влизания в отворените рамена на лабиринта, но времето, прекарано в тях се удължава с гранична значимост ($p = 0.05$) (Табл. 16; Фиг. 11). Броят влизания в затворените рамена при тази група не се променя значимо, но се скъсява времето, прекарано в тях (гранична значимост $p = 0.05$) (Табл. 16; Фиг. 12). При същата група не се променят значимо общият брой навлизания в рамената на лабиринта, както и индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания (Табл. 16; Фиг. 13). При групата, третирана с Кв, се наблюдава увеличен брой влизания в отворените рамена на лабиринта (статистическа значимост $p < 0.05$) и удължаване на времето, прекарано в тях ($p < 0.05$) (Табл. 16; Фиг. 11). Броят влизания в затворените рамена при Кв групата не се променя значимо, но се скъсява времето, прекарано в тях ($p < 0.05$) (Табл. 16; Фиг. 12). При същата група не се променят значимо общият брой навлизания в рамената на лабиринта, както и индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания (Табл. 16; Фиг. 13).

В сравнение с Кв, в група ФК се наблюдава по-кратко време, прекарано в отворените рамена на лабиринта, съответно по-дълго време, прекарано в затворените рамена ($p < 0.05$). Индексът влизания в отворените рамена/общ брой навлизания в рамената е понижен във ФК групата в сравнение с Кв ($p < 0.05$). При животните, третирани с ХК и ГК, проследяваните показатели не се различават значимо от тези на третираните с Кв животни (Табл. 16; Фиг. 11, 12, 13).

Табл. 16. Брой влизания в отворените рамена (ОР) и затворените рамена (ЗР) на повдигнатия кръстосан лабиринт и време, прекарано в тях; общ брой навлизания в рамената и индекс на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания в рамената при плъхове, третиран с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 7 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

(*) $p=0.05$; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ спрямо контролната група; § $p<0.05$ спрямо група Кв

Група Показател	Контрола (n=10)	ХК (n=10)	ФК (n=10)	ГК (n=10)	Кв (n=10)
Влизания в ОР (брой)	1 \pm 0.15	1.6 \pm 0.22 *	1.1 \pm 0.18	1.3 \pm 0.15	1.4 \pm 0.16 *
Време в ОР (sec)	5 \pm 0.99	8.1 \pm 0.57 **	5.7 \pm 0.87 §	8.8 \pm 1.98 (*)	9.4 \pm 1.45 *
Влизания в ЗР (брой)	2.4 \pm 0.43	3.0 \pm 0.54	3.1 \pm 0.46	2.5 \pm 0.22	2.4 \pm 0.31
Време в ЗР (sec)	295 \pm 0.99	291.9 \pm 0.57 **	294.3 \pm 0.87 §	291.2 \pm 1.98 (*)	290.6 \pm 1.45 *
Общ брой влизания	3.4 \pm 0.45	4.6 \pm 0.58	4.2 \pm 0.59	3.8 \pm 0.25	3.8 \pm 0.42
Влизания в ОР/Общ брой влизания	0.33 \pm 0.05	0.37 \pm 0.05	0.26 \pm 0.04 §	0.34 \pm 0.03	0.38 \pm 0.03

След 14-дневно третиране броят влизания в отворените рамена на лабиринта, времето, прекарано в тях, броят влизания в затворените рамена на лабиринта и времето, прекарано там, както и общият брой навлизания в рамената на лабиринта и индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания са представени в Табл. 17 и на Фиг. 19, 20, 21. При групата, третирана с ХК, се наблюдава увеличен брой влизания в отворените рамена на лабиринта (статистическа значимост $p<0.01$) и удължаване на времето, прекарано в тях ($p<0.01$) (Табл. 17; Фиг. 19). Броят влизания в затворените

рамена при тази група не се променя значимо, но се скъсява времето, прекарано в тях ($p < 0.05$) (Табл. 17; Фиг. 20). При същата група не се променя значимо общият брой навлизания в рамената на лабиринта, а индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания се повишава със значимост $p < 0.05$ (Табл. 17; Фиг. 21). При животните, третирани с ФК, не се наблюдава значима промяна в изследваните показатели за тревожност (брой на влизания в отворените и затворените рамена и времето, прекарано в тях, отчетено в секунди, както и общият брой влизания в рамената и съотношението на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания) (Табл. 17; Фиг. 19-21). При група ГК се наблюдава значимо повишаване на броя влизания в отворените рамена на лабиринта ($p < 0.001$) и удължаване на времето, прекарано в тях ($p < 0.05$) (Табл. 17; Фиг. 19). Броят влизания в затворените рамена при тази група не се променя значимо, но се скъсява времето, прекарано в тях (значимост $p < 0.05$) (Табл. 17; Фиг. 20). При същата група не се променят значимо общият брой навлизания в рамената на лабиринта, а индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания се повишава със значимост $p < 0.05$ (Табл. 17; Фиг. 21). При групата, третирана с Кв, се наблюдава увеличен брой влизания в отворените рамена на лабиринта (статистическа значимост $p < 0.01$) и удължаване на времето, прекарано в тях ($p < 0.05$) (Табл. 17; Фиг. 19). Броят влизания в затворените рамена при група Кв не се променя значимо, но се скъсява времето, прекарано в тях ($p < 0.05$) (Табл. 17; Фиг. 20). При същата група не се променят значимо общият брой навлизания в рамената на лабиринта, а индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания се повишава със значимост $p < 0.01$ (Табл. 17; Фиг. 21).

В сравнение с Кв, в група ФК се наблюдават по-малък брой влизания в отворените рамена на лабиринта и по-кратко време, прекарано в тях, както и по-дълго време, прекарано в затворените рамена ($p < 0.05$). Индексът влизания в отворените рамена/общ брой навлизания в рамената е понижен във ФК групата в сравнение с Кв ($p < 0.01$). При животните, третирани с ХК и ГК, проследяваните показатели не се различават значимо от тези на третираните с Кв животни (Табл. 17; Фиг. 19, 20, 21).

Табл. 17. Брой влизания в отворените рамена (ОР) и затворените рамена (ЗР) на повдигнатия кръстосан лабиринт и време, прекарано в тях; общ брой навлизания в рамената и индекс на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания в рамената при плъхове, третиран с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 14 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ спрямо група Кв

Група \ Показател	Контрола (n=10)	ХК (n=10)	ФК (n=10)	ГК (n=10)	Кв (n=10)
Влизания в ОР (брой)	1 \pm 0.15	1.7 \pm 0.21 **	1.1 \pm 0.18 §	1.9 \pm 0.18 ***	2.2 \pm 0.39 **
Време в ОР (sec)	5 \pm 0.99	8.6 \pm 0.92 **	4.7 \pm 0.90 §	9.4 \pm 1.46 *	9.8 \pm 1.63 *
Влизания в ЗР (брой)	2.4 \pm 0.43	2.0 \pm 0.21	2.7 \pm 0.47	2.1 \pm 0.31	2.1 \pm 0.23
Време в ЗР (sec)	295 \pm 0.99	291.4 \pm 0.92 **	295.3 \pm 0.90 §	290.6 \pm 1.46 *	290.2 \pm 1.63 *
Общ брой влизания	3.4 \pm 0.45	3.7 \pm 0.37	3.8 \pm 0.53	4.0 \pm 0.37	4.3 \pm 0.56
Влизания в ОР/Общ брой влизания	0.33 \pm 0.05	0.46 \pm 0.03 *	0.30 \pm 0.05 §§	0.49 \pm 0.04 *	0.49 \pm 0.04 **

След 21-дневно третиране броят влизания в отворените рамена на лабиринта, времето, прекарано в тях, броят влизания в затворените рамена на лабиринта и времето, прекарано там, както и общият брой навлизания в рамената на лабиринта и индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания са представени в Табл. 18 и на Фиг. 19, 20, 21. При група ХК се наблюдава увеличен брой влизания в отворените рамена на лабиринта (статистическа значимост $p < 0.01$ спрямо контролната група) и

удължаване на времето, прекарано в тях ($p < 0.05$) (Табл. 18; Фиг. 19). Броят влизания в затворените рамена при тази група не се променя значимо, но се скъсява времето, прекарано в тях ($p < 0.05$) (Табл. 18; Фиг. 20). При същата група не се променя значимо общият брой навлизания в рамената на лабиринта, а индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания се повишава със значимост $p < 0.05$ (Табл. 18; Фиг. 21). При животните, третирани с ФК, не се наблюдава значима промяна в изследваните показатели за тревожност (брой на влизания в отворените и затворените рамена и времето, прекарано в тях, отчетено в секунди, както и общият брой влизания в рамената и съотношението на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания) (Табл. 18; Фиг. 19-21). При групата, третирана с ГК, се наблюдава значимо повишаване на броя влизания в отворените рамена на лабиринта ($p < 0.01$) и удължаване на времето, прекарано в тях ($p < 0.01$) (Табл. 18; Фиг. 19). Броят влизания в затворените рамена при тази група не се променя значимо, но се скъсява времето, прекарано в тях (значимост $p < 0.01$) (Табл. 18; Фиг. 20). При същата група не се променят значимо общият брой влизания в рамената на лабиринта, а индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания се повишава със значимост $p < 0.05$ (Табл. 18; Фиг. 21). При животните, третирани с Кв, се наблюдава увеличен брой влизания в отворените рамена на лабиринта (статистическа значимост $p < 0.001$) и удължаване на времето, прекарано в тях ($p < 0.01$) (Табл. 18; Фиг. 19). Броят влизания в затворените рамена при Кв групата не се променя значимо, но се скъсява времето, прекарано в тях ($p < 0.01$) (Табл. 18; Фиг. 20). При същата група се повишават значимо общият брой влизания в рамената на лабиринта ($p < 0.05$) и индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания ($p < 0.05$) (Табл. 18; Фиг. 21).

В сравнение с Кв, в група ФК се наблюдават по-малък брой влизания в отворените рамена на лабиринта ($p < 0.001$). Общият брой влизания в рамената на лабиринта, както и индексът влизания в отворените рамена/общ брой влизания в рамената са понижени в група ФК в сравнение с група Кв ($p < 0.05$). В група ХК се наблюдава намален общ брой влизания в рамената на лабиринта в сравнение с група Кв. При животните, третирани с ГК, проследяваните показатели не се различават значимо от тези на третираните с Кв животни (Табл. 18; Фиг. 19, 20, 21).

Табл. 18. Брой влизания в отворените рамена (ОР) и затворените рамена (ЗР) на повдигнатия кръстосан лабиринт и време, прекарано в тях; общ брой навлизания в рамената и индекс на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания в рамената при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 21 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група; § $p < 0.05$, §§§ $p < 0.001$ спрямо група Кв

Група Показател	Контрола (n=10)	ХК (n=10)	ФК (n=10)	ГК (n=10)	Кв (n=10)
Влизания в ОР (брой)	1 \pm 0.15	1.7 \pm 0.21 **	1.0 \pm 0.15 §§§	1.9 \pm 0.28 **	2.5 \pm 0.34 ***
Време в ОР (sec)	5 \pm 0.99	8.4 \pm 0.91 *	5.6 \pm 1.42	9.9 \pm 1.28 **	9.2 \pm 1.05 **
Влизания в ЗР (брой)	2.4 \pm 0.43	1.9 \pm 0.23	2.5 \pm 0.37	1.9 \pm 0.23	2.5 \pm 0.31
Време в ЗР (sec)	295 \pm 0.99	291.6 \pm 0.91 *	294.4 \pm 1.42	290.1 \pm 1.28 **	290.8 \pm 1.05 **
Общ брой влизания	3.4 \pm 0.45	3.6 \pm 0.27 §	3.5 \pm 0.37 §	3.8 \pm 0.39	5.0 \pm 0.49 *
Влизания в ОР/Общ брой влизания	0.33 \pm 0.05	0.47 \pm 0.05 *	0.31 \pm 0.05 §	0.50 \pm 0.05 *	0.50 \pm 0.04 *

След 30-дневно третиране броят влизания в отворените рамена на лабиринта, времето, прекарано в тях, броят влизания в затворените рамена на лабиринта и времето, прекарано там, както и общият брой навлизания в рамената на лабиринта и индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания са представени в Табл. 19 и на Фиг. 19, 20, 21. При група ХК се наблюдава увеличен брой влизания в отворените рамена на лабиринта (статистическа значимост $p < 0.01$) и удължаване на времето,

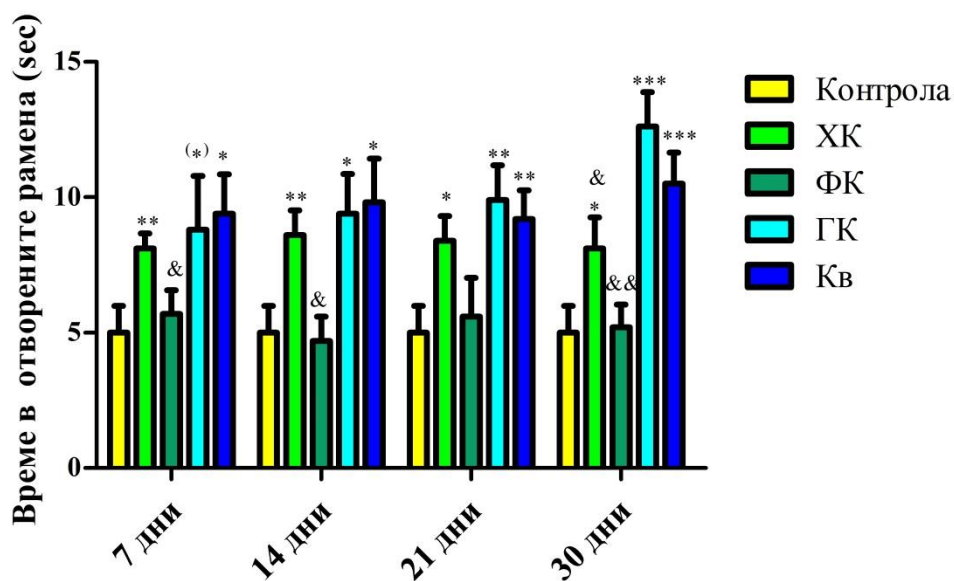
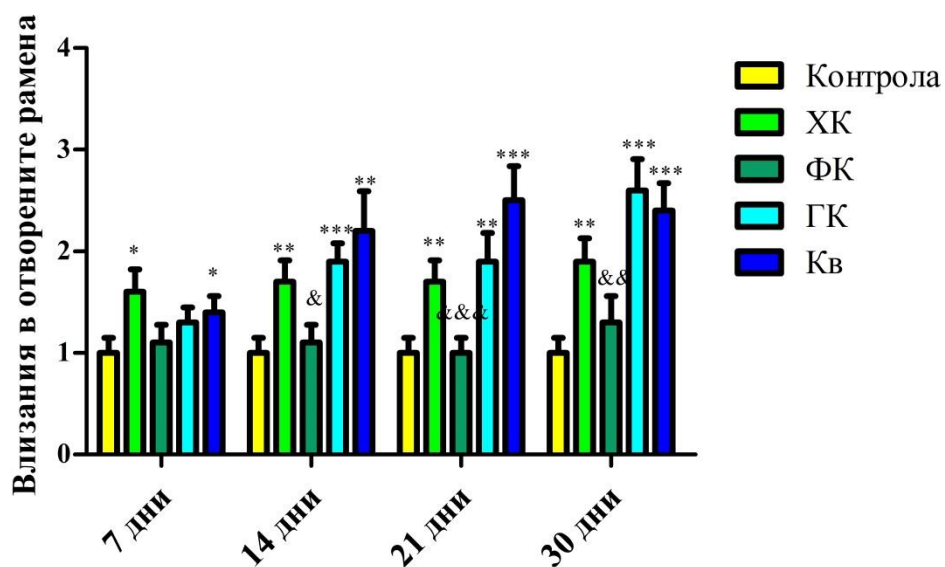
прекарано в тях ($p < 0.05$) (Табл. 19; Фиг. 19). Броят влизания в затворените рамена при тази група не се променя значимо, но се скъсява времето, прекарано в тях ($p < 0.05$) (Табл. 19; Фиг. 20). При същата група не се променя значимо общият брой навлизания в рамената на лабиринта, а индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания се повишава със значимост $p < 0.01$ в сравнение с контролната група (Табл. 19; Фиг. 21). При животните, третирани с ФК, не се наблюдава значима промяна в изследваните показатели за тревожност (брой на влизания в отворените и затворените рамена и времето, прекарано в тях, отчетено в секунди, както и общият брой влизания в рамената и съотношението на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания) (Табл. 19; Фиг. 19, 20, 21). При групата, третирана с ГК, се наблюдава значимо повишаване на броя влизания в отворените рамена на лабиринта ($p < 0.001$) и удължаване на времето, прекарано в тях ($p < 0.001$) (Табл. 19; Фиг. 19). Броят влизания в затворените рамена при тази група не се променя значимо, но се скъсява времето, прекарано в тях (значимост $p < 0.001$) (Табл. 19; Фиг. 20). При същата група се повишават значимо и общият брой навлизания в рамената на лабиринта ($p < 0.05$), както и индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания ($p < 0.001$) в сравнение с контролната група (Табл. 19; Фиг. 21). При животните, третирани с Кв, се наблюдава увеличен брой влизания в отворените рамена на лабиринта (статистическа значимост $p < 0.001$) и удължаване на времето, прекарано в тях ($p < 0.001$) в сравнение с контролната група (Табл. 19; Фиг. 19). Броят влизания в затворените рамена при група Кв не се променя значимо, но се скъсява времето, прекарано в тях ($p < 0.001$) (Табл. 19; Фиг. 20). При същата група се повишават значимо общият брой навлизания в рамената на лабиринта ($p < 0.05$) и индексът брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания ($p < 0.01$) спрямо контролната група (Табл. 19; Фиг. 21).

В сравнение с Кв, във ФК групата се наблюдават по-малък брой влизания в отворените рамена на лабиринта и по-кратко време, прекарано в тях ($p < 0.01$). Времето, прекарано в затворените рамена на лабиринта, е удължено в група ФК в сравнение с Кв, а индексът влизания в отворените рамена/общ брой влизания в рамената е понижен ($p < 0.05$). В група ХК се наблюдава по-кратко време, прекарано в отворените рамена на лабиринта, в сравнение с Кв групата. При животните, третирани с ГК, проследяваните показатели не се различават значимо от тези на третираните с Кв животни (Табл. 19; Фиг. 19, 20, 21).

Табл. 19. Брой влизания в отворените рамена (ОР) и затворените рамена (ЗР) на повдигнатия кръстосан лабиринт и време, прекарано в тях; общ брой навлизания в рамената и индекс на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания в рамената при плъхове, третиран с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) в продължение на 30 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ спрямо група Кв

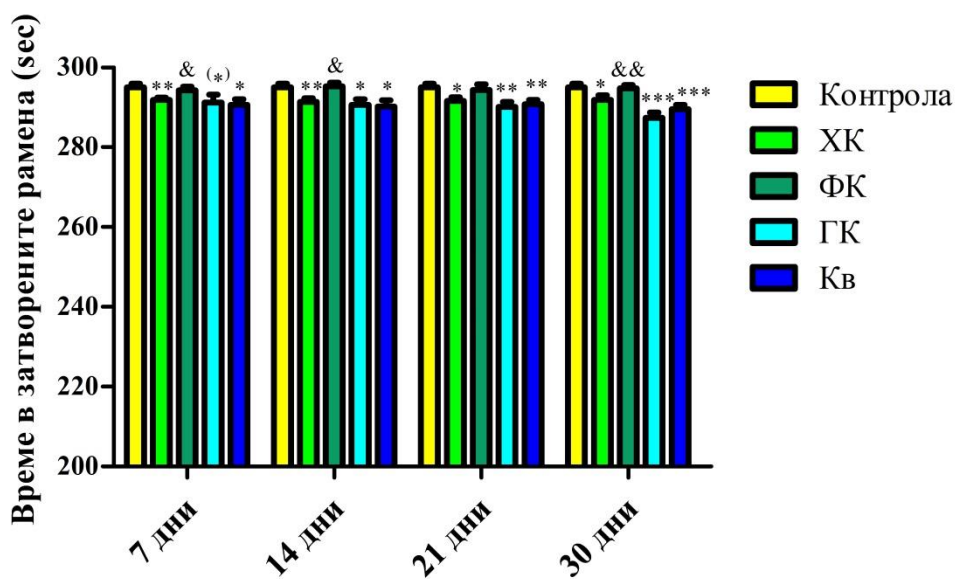
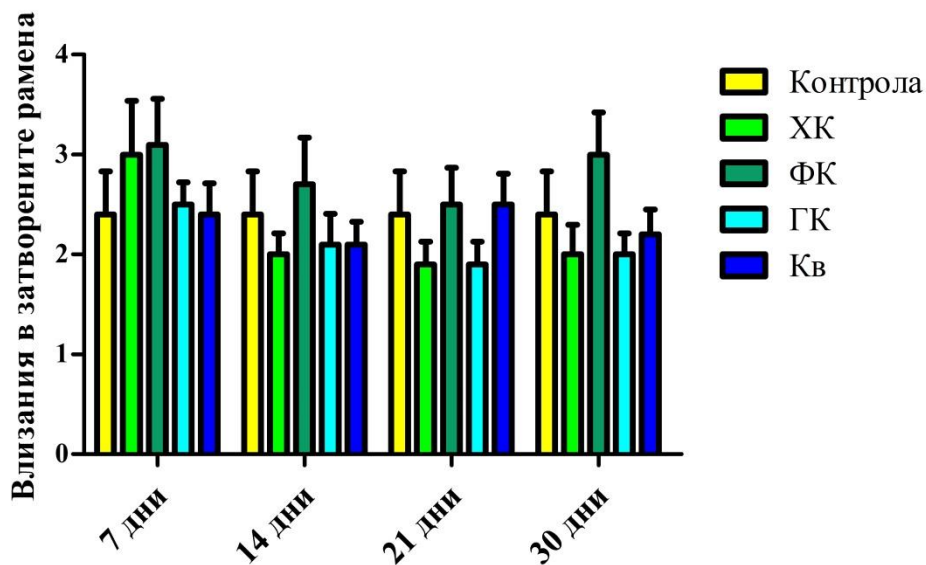
Група \ Показател	Контрола (n=10)	ХК (n=10)	ФК (n=10)	ГК (n=10)	Кв (n=10)
Влизания в ОР(брой)	1 \pm 0.15	1.9 \pm 0.23 **	1.3 \pm 0.26 §§	2.6 \pm 0.31 ***	2.4 \pm 0.27 ***
Време в ОР (sec)	5 \pm 0.99	8.1 \pm 1.16 *§	5.2 \pm 0.83 §§	12.6 \pm 1.28 ***	10.5 \pm 1.15 ***
Влизания в ЗР (брой)	2.4 \pm 0.43	2.0 \pm 0.30	3.0 \pm 0.42	2.0 \pm 0.21	2.2 \pm 0.25
Време в ЗР (sec)	295 \pm 0.99	291.9 \pm 1.16 *	294.8 \pm 0.83 §§	287.4 \pm 1.28 ***	289.5 \pm 1.15 ***
Общ брой влизания	3.4 \pm 0.45	3.9 \pm 0.43	4.3 \pm 0.60	4.6 \pm 0.34 *	4.6 \pm 0.27 *
Влизания в ОР/Общ брой влизания	0.33 \pm 0.05	0.50 \pm 0.04 **	0.31 \pm 0.05 §§	0.56 \pm 0.04 ***	0.52 \pm 0.05 **



Фиг. 11. Брой влизания в отворените рамена на повдигнатия кръстосан лабиринт и време, прекарано в тях при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) за 7, 14, 21 и 30 дни.

Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.; $n=10$.

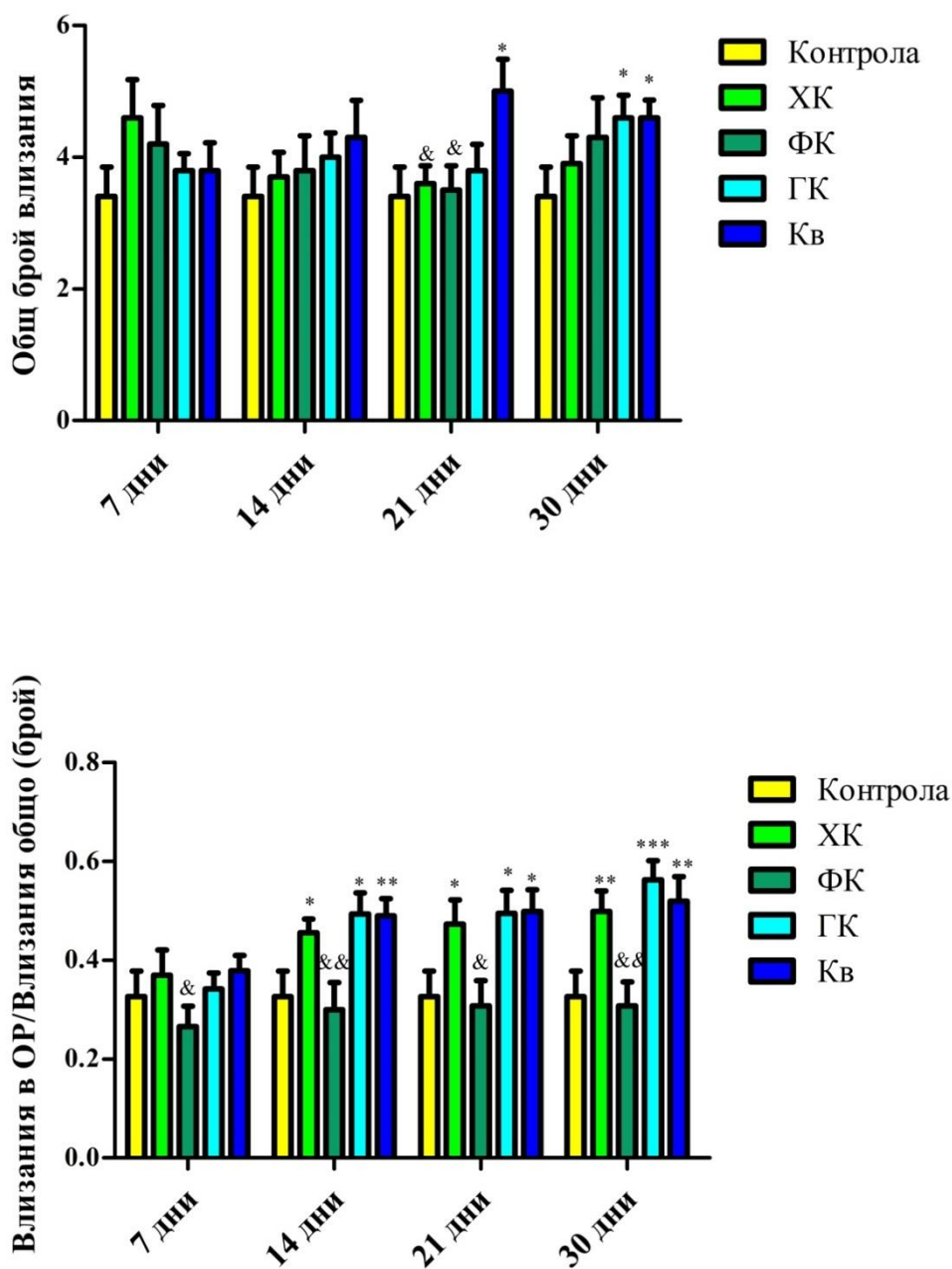
(*) $p=0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ спрямо контролната група; & $p<0.05$, && $p<0.01$ спрямо група Кв



Фиг. 12. Брой влизания в затворените рамена на повдигнатия кръстосан лабиринт и време, прекарано в тях при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) за 7, 14, 21 и 30 дни.

Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.; $n=10$.

(*) $p=0.05$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ спрямо контролната група; & $p<0.05$, && $p<0.01$ спрямо група Кв



Фиг. 13. *Общ брой влизания в рамената на повдигнатия кръстосан лабиринт и отношение на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания тях при плъхове, третирани с хлорогенова киселина (ХК), ферулова киселина (ФК), галова киселина (ГК) и кверцетин (Кв) за 7, 14, 21 и 30 дни. Резултатите са представени като средна стойност \pm S.E.M.; $n=10$.*

** $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група; & $p < 0.05$; && $p < 0.01$ спрямо група Кв*

Обобщение на експерименталните данни от теста в повдигнат кръстосан лабиринт

За четирите периода на приложение (7, 14, 21 и 30 дни) ХК показва анксиолитично-подобен ефект, тъй като увеличава броя влизания в отворените рамена на лабиринта, удължава времето, прекарано в тях и скъсява времето, прекарано в затворените рамена на лабиринта. За 14-, 21- и 30-дневните периоди на приложение се увеличава и индекса брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания.

ФК, независимо от периода на приложение, не променя значимо показателите за тревожност (брой влизания в отворените рамена и затворените рамена на повдигнатия кръстосан лабиринт и време, прекарано в тях; общ брой навлизания в рамената и индекс на влизанията в отворените рамена към общия брой влизания в рамената) при опитните животни.

Приложена за 7 дни, ГК показва слаб анксиолитично-подобен ефект, като удължава времето, прекарано в отворените рамена на лабиринта и скъсява времето, прекарано в затворените рамена с гранична значимост. След 14-, 21- и 30-дневно приложение ГК показва анксиолитично-подобен ефект, като увеличава броя влизания в отворените рамена на лабиринта, удължава времето, прекарано в тях и скъсява времето, прекарано в затворените рамена на лабиринта. За тези периоди на приложение ГК увеличава и индекса брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания. За 21-дневния период на приложение се увеличава и общият брой влизания в рамената на лабиринта, вероятно за сметка на силно увеличения брой влизания в отворените рамена.

Кв в четирите периода на приложение (7, 14, 21 и 30 дни), показва анксиолитично-подобен ефект при опитните животни, като увеличава броя влизания в отворените рамена на лабиринта, удължава времето, прекарано в тях и скъсява времето, прекарано в затворените рамена на лабиринта. За 14-, 21- и 30-дневния период на приложение Кв увеличава и индекса брой влизания в отворените рамена/общ брой влизания. След 21- и 30-дневно приложение в Кв групите се увеличава и общият брой влизания в рамената на лабиринта, вероятно за сметка на силно увеличения брой влизания в отворените рамена.

Ефектите на ХК и ГК върху индексите на тревожност са сравними с тези на Кв след 7-, 14- и 21-дневно приложение. След 30-дневно приложение се наблюдава сравним ефект на ГК с Кв, който е по-голям от ефекта на ХК. За всички периоди на приложение ФК не повлиява индексите на тревожност.

3.2. Дискусия

Тревожните разстройства са едни от най-честите психични нарушения. При тях пациентът изпитва продължително безпокойство. Тревожността често се съчетава с депресия, хранителни разстройства и др. (Kessler and Greenberg, 2002). Спектърът на тревожните разстройства включва различни фобии (специфични фобии, социална фобия, агорафобия), паническо разстройство, обсесивно-компулсивно разстройство, генерализирана тревожност и др. (American Psychiatric Association, 2013). Установено е, че през 2010 г. 273 милиона души (4.0% от световната популация) страдат от тревожни разстройства (Vos et al., 2012). Патологичната тревожност се свързва с намаление в мозъчните нива на инхибиторния невротрансмитер гама-аминомаслена киселина (GABA) (Lydiard, 2003). Едни от най-използваните лекарства за тревожни разстройства, бензодиазепините, постигат анксиолитичен ефект чрез потенциране на GABA-ергичната невротрансмисия, свързвайки се с GABA_A рецепторите. Те обаче имат множество нежелани ефекти като седация, миорелаксация, атаксия, амнезия и не на последно място водят до развитие на зависимост. Съвременните проучвания са насочени към изследване на природни анксиолитици с много по-малко странични ефекти (Carlini, 2003).

Повдигнатият кръстосан лабиринт е най-често използваният експериментален тест за изследване на тревожността при гризачи. В основата на теста стои конфликтът между вродения страх на животните от открити пространства и тяхното любопитство към непознатата среда. Чрез този тест се оценява анксиолитично-подобният ефект на кандидати за лекарства при предклинични изпитвания. Повечето анксиолитици стимулират изследването на отворените рамена от животните, което се отчита с увеличение на броя на влизанията в тях и удължаване на времето, прекарано там, като същевременно не засилват двигателната активност на животните, изразена чрез общия брой влизания в отворените и затворените рамена. Важен показател за анксиолитичното действие е и увеличението на съотношението между броя влизания в отворените рамена и общия брой влизания (Pellow and File, 1986; Lister, 1987).

Резултатите от настоящия експеримент показват, че ХК, ГК и Кв проявяват анксиолитично-подобна активност след 14, 21- и 30-дневно приложение (изразена чрез увеличен брой влизания в отворените рамена, удължено време на престой в тях и повишен индекс брой влизания в отворените рамена към общ брой влизания). При ХК и Кв тази тенденция се проявява след 7-дневно третиране чрез увеличен брой влизания в отворените рамена и удължено време на престой в тях.

Анксиолитично-подобният ефект на ХК, ГК и Кв вероятно се дължи на улесняване на GABA-ергичната невротрансмисия. GABA рецепторите са пре- и постсинаптични. Те се подразделят на два големи типа – йонотропни (GABA_A) и метаботропни (GABA_B). Йонотропните действат чрез модулация на хлорния инфлукс, а метаботропните са G-протеин-свързани. Селективен антагонист на GABA_A рецепторите е алкалоидът bicuculline (Johnston, 2013), а на GABA_B – baclofen (Bowery, 2006). Действието на GABA_A рецепторите може да бъде модулирано от множество лекарства, напр. барбитурати, бензодиазепини и техни антагонисти, общи анестетици, етанол и др. При експериментите на Bouayed et al. (2007) с мишки ХК показва ефект, подобен на БДЗ-агониста diazepam, като в същото време този ефект се блокира от БДЗ-антагониста flumazenil. Това предположение се подкрепя и от данни при плъхове. Nara et al. (2014) наблюдават антагонизиране на ефекта на ХК от GABA_A-рецепторния антагонист bicuculline, а Mansouri et al. (2014) установяват частично премахване на ефекта ГК от flumazenil. При мишки Bhutada et al. (2010) наблюдават анксиолитичен ефект на Кв, сравним с diazepam, а Filho et al. (2008) – блокиране на ефекта на Кв от антагонисти на GABA_A рецепторите.

Друг вероятен механизъм на анксиолитично-подобното действие на ХК, ГК и Кв е активация на 5-HT_{1A} рецепторите. Има няколко типа рецептори за серотонин (5-хидрокситриптамин, 5-НТ). 5-HT_{1A} рецепторите участват в модулацията на изследователското и свързаното със страх поведение и тяхното потискане се асоциира с увеличена тревожност (Ramboz et al., 1998). Mansouri et al. (2014) наблюдават при плъхове анксиолитично-подобен ефект на ГК, сходен с този на 5-HT_{1A} рецепторния агонист buspirone, който се блокира при използване на 5-HT_{1A} рецепторен антагонист. Активиране на 5-HT_{1A} рецепторите наблюдават и Filho et al. (2008) при изследване на анксиолитичния ефект на Кв при мишки.

Опиоидните рецептори също играят роля в модулацията на тревожно-депресивното поведение. Filliol et al. (2000) установяват, че активацията на μ -рецепторите предизвиква тревожност, а на δ - анксиолиза. Anjaneyulu and Chopra (2003) предполагат активация на опиоидни рецептори от Кв, на което може да се дължи и неговият анксиолитичен ефект.

Антагонистите на NMDA рецепторите за глутамат също упражняват анксиолитично действие (Dunn et al., 1989). Такова рецепторно взаимодействие при мишки наблюдават някои автори за ФК (Yu et al., 2006).

ХК и Кв вероятно осъществяват своето анксиолитично-подобно действие и чрез повишаване нивата на BDNF (Yabe et al., 2010; Tchantchou et al., 2009), тъй като ниски нива на този невротрофичен фактор вероятно са ангажирани в развитието на тревожността (Porcher et al., 2011; Suliman et al., 2013).

Антиоксидантната активност на полифенолите също допринася за техния анксиолитичен ефект (Bouayed et al., 2007; de Almeida et al., 2014). Редица автори доказват антиоксидантния капацитет на ХК, ГК и Кв (Siquet et al., 2006; Ferik et al., 2011; Hanasaki et al., 1994; Haenen and Bast, 1999).

Липсата на анксиолитично-подобен ефект при ФК би могла да се обясни с нейната невъзможност за свързване или свързване в по-слаба степен от другите фенолни киселини към рецептори за различни медиатори в ЦНС поради различия в химичната ѝ структура.

4. Обобщена дискусия

В последните години се наблюдава повишен интерес към веществата от природен произход и към полифенолните съединения в частност. Първоначално е демонстрирана антиоксидантната активност на полифенолите. Впоследствие те са изследвани в разнообразни модели на заболявания на различни органи и системи, където демонстрират протективни ефекти. Първоначалното становище е, че полифенолите не преминават през хемато-енцефалната бариера. След 2006 година, когато се установява тяхното навлизане в ЦНС, започват проучванията на централните им ефекти.

Фенолните киселини са един от класовете полифеноли. Поради голямото социално значение на дегенеративните заболявания на нервната система и тяхната висока цена за обществото, както и поради ограничените възможности за лечение на тези състояния, съпроводено с много нежелани реакции, са проучвани ефектите на фенолните киселини в модели на болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон, невропатична болка, невротоксичност и др. Липсват изследвания върху ефектите на фенолните киселини в нервната система при млади/здрави плъхове.

Кв е представител на клас флавоноиди и е един от най-широко изследваните полифеноли. Поради тази причина той е използван в настоящите проучвания като стандарт, с който са сравнявани ефектите на фенолните киселини хлорогенова, ферулова и галова върху изследователското поведение и двигателната активност, върху паметта и обучението, и върху тревожността при млади/здрави плъхове.

При настоящото изследване се установява, че хлорогенова и галова киселина потискат изследователското поведение и двигателната активност при животните, вероятно поради седативно действие на веществата. Тези ефекти са сравними с ефектите на кверцетин. Седацията на опитните животни вероятно настъпва чрез активация на рецептори за ГАМК или чрез тяхната модулация посредством свързване с БДЗ-рецептори. За двете фенолни киселини (хлорогенова и галова) е установен и анксиолитично-подобен ефект. Това действие на веществата вероятно е свързано също с активация на рецепторите за ГАМК и тяхната модулация чрез БДЗ-рецепторите, но може би участват и други механизми като активация на 5-HT_{1A} рецепторите, модулация на опиоидни рецептори, повишени нива на невротрофичния фактор BDNF и на неговия регулатор CREB и антиоксидантно действие. Феруловата киселина не променя изследователското поведение и двигателната активност и не повлиява тревожното поведение при млади/здрави плъхове. Различията в ефектите вероятно се дължат на разлики в химичната структура на феруловата киселина, обуславящи липса на активация и модулация на рецепторите за ГАМК, серотонин, опиоиди и други медиатори, участващи в регулацията на тревожното поведение.

Фенолните киселини хлорогенова, ферулова и галова сравнено с кверцетин подобряват паметовите и обучителни процеси при млади/здрави плъхове. Вероятни механизми на този положителен ефект са антиоксидантно действие, инхибиция на ацетилхолинестеразната активност в мозъчни зони, важни за паметта и обучението, увеличени нива на невротрофичния фактор BDNF и на неговия регулатор CREB, потискане на апоптозата и стимулиране на пролиферацията на нервни клетки, потискане отделянето на проинфламаторни фактори и благоприятни съдови ефекти.

VI. ИЗВОДИ

1. При субхронично приложение ефекти върху изследователското поведение и общата двигателна активност на млади/здрави плъхове показват фенолните киселини хлорогенова и галова, както и флавоноидът кверцетин. Феруловата киселина не променя изследователското поведение и общата двигателна активност при млади/здрави плъхове.
 - Кверцетинът потиска изследователското поведение и общата двигателна активност при млади/здрави плъхове при 21- и 30-дневно приложение.
 - Хлорогеновата киселина потиска изследователското поведение и общата двигателна активност при животните, като този ефект настъпва при 21- и 30-дневно приложение и е по-слаб в сравнение с ефекта на Кв.
 - Галовата киселина потиска изследователското поведение и общата двигателна активност при плъховете, като ефектът настъпва при 14-, 21- и 30-дневно приложение и е по-слаб от този на Кв.

2. Ефектите на фенолните киселини хлорогенова, ферулова и галова и на флавоноида кверцетин върху изследователското поведение и общата двигателна активност при млади/здрави плъхове не са съпроводени с нарушаване на хабитуацията на опитните животни към средата, която е показател за запаметяване.

3. Фенолните киселини хлорогенова, ферулова и галова, както и флавоноидът кверцетин при субхронично приложение подобряват паметовите и обучителни процеси при млади/здрави плъхове.
 - Ефектът на кверцетин върху паметта и обучението се проявява при 14-, 21- и 30-дневно приложение.
 - Ефектите на хлорогеновата и феруловата киселини се проявяват при 21- и 30-дневно приложение в теста shuttle box и при 30-дневно приложение в теста step through, като са сравними с ефектите на Кв за същите периоди.
 - Ефектът на галова киселина се проявява при 14-, 21- и 30-дневно приложение и е сравним с този на Кв за същите периоди.

4. При субхронично приложение при млади/здрави плъхове фенолните киселини хлорогенова и галова, както и флавоноидът кверцетин проявяват анксиолитично-подобни ефекти, докато феруловата киселина няма ефект върху тревожността.
- Кверцетинът при субхронично приложение проявява анксиолитично-подобен ефект при млади/здрави плъхове, изявен още при 7-дневно приложение и наличен за всички периоди на третиране.
 - Анксиолитично-подобните ефекти на хлорогеновата и галовата киселина са изявени още при 7-дневно приложение, налични са за всички периоди на третиране и са сравними с тези на кверцетин.

VII. ПРИНОСИ

1. За пръв път в сравнителен аспект са изследвани ефектите на фенолните киселини хлорогенова, ферулова и галова и на флавоноида кверцетин върху изследователското поведение и двигателната активност на млади/здрави плъхове, като е установено, че хлорогеновата и галовата киселина потискат тези показатели сравнимо с кверцетин, а феруловата киселина няма ефект върху тях.
2. За пръв път са получени данни за потискащите ефекти на хлорогенова киселина и кверцетин върху двигателната активност при плъхове. Потвърдени са данните за потискащия ефект на галова киселина и липсващия ефект на ферулова киселина върху тези показатели.
3. За пръв път са изследвани в сравнителен аспект ефектите на фенолните киселини хлорогенова, ферулова и галова и на кверцетин върху паметта и обучението, като е установено, че трите фенолни киселини и кверцетинът в еднаква степен подобряват паметта и обучението при млади/здрави плъхове.
4. За пръв път са изследвани в сравнителен аспект ефектите на фенолните киселини хлорогенова, ферулова и галова и на флавоноида кверцетин върху тревожното поведение на млади/здрави плъхове, като е установено, че хлорогенова и галова киселина показват анксиолитично-подобен ефект, сравним с този на кверцетин, а при феруловата киселина такъв ефект не се наблюдава.
5. За пръв път са установени анксиолитично-подобни ефекти на хлорогенова и галова киселина при субхронично приложение в относително ниска доза и за пръв път са получени данни за липса на анксиолитично-подобен ефект на ферулова киселина върху тревожното поведение при млади/здрави плъхове. Потвърдени са данните за анксиолитично-подобния ефект на кверцетин.

VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Valcheva-Kuzmanova S, Georgieva A, Belcheva S, Tashev R. Effects of chlorogenic acid on learning and memory in rats. *Trakia Journal of Sciences*, 2014; 12 (1):132-136.
2. Valcheva-Kuzmanova S, Georgieva A, Belcheva S, Tashev R. Effects of ferulic acid on exploratory behavior and locomotor activity in rats. *Journal of Biomedical and Clinical Research*, 2014; 7 (2):81-87.
3. Georgieva A, Belcheva S, Tashev R, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of ferulic acid on learning and memory in rats. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 2015; 68(3):401-408 (**IF 0.284**).
4. Valcheva-Kuzmanova S, Georgieva A, Belcheva S, Tashev R. Anxiolytic-like effect of chlorogenic acid administered subchronically to rats. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 2015; 68(11):1463-1470 (**IF 0.284**).
5. Georgieva A, Belcheva S, Tashev R, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of gallic acid on exploratory behavior and locomotor activity in rats. *Trakia Journal of Sciences* 2015; 13(S2):29-33.

VIII. СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Valcheva-Kuzmanova S, Georgieva A, Belcheva S, Tashev R. Anxiolytic-like effect of chlorogenic acid administered subchronically to rats. Пета работна среща „Експериментални модели и методи в биомедицинските изследвания” (София, 7-9.04.2014).
2. Valcheva-Kuzmanova S, Georgieva A, Belcheva S, Tashev R. Effects of chlorogenic acid on exploratory behavior and locomotor activity in rats. Пета работна среща „Експериментални модели и методи в биомедицинските изследвания” (София, 7-9.04.2014).
3. Valcheva-Kuzmanova S, Georgieva A, Belcheva S, Tashev R. Effects of chlorogenic acid on learning and memory in rats. “Ist Trakia Medical Days” International Scientific Conference (Stara Zagora, 22-23.05.2014).
4. Georgieva A, Belcheva S, Tashev R, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of ferulic acid on learning and memory in rats. Seventh National Congress of Pharmacology / VII Национален конгрес по фармакология – От експеримента към клиниката (Плевен, 17-19.10.2014).
Abstract: *Journal of Biomedical and Clinical Research (JBCR)* 7(1):S59.
5. Valcheva-Kuzmanova S, Georgieva A, Belcheva S, Tashev R. Effects of ferulic acid on exploratory behavior and locomotor activity in rats. Seventh National Congress of Pharmacology / VII Национален конгрес по фармакология – От експеримента към клиниката (Плевен, 17-19.10.2014).
Abstract: *Journal of Biomedical and Clinical Research (JBCR)* 7(1):S60.
6. Georgieva A, Belcheva S, Tashev R, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of gallic acid on exploratory behavior and locomotor activity in rats. Юбилейна научна конференция „20 години Тракийски университет“ (Стара Загора, 19-20.05.2015).
7. Георгиева А, Белчева С, Ташев Р, Вълчева-Кузманова С. Ефект на феруловата киселина, приложена субхронично, върху тревожността при плъхове. Юбилейна научна конференция „Наука за здраве“, посветена на 70 години от основаването на Медицински университет – Пловдив (Пловдив, 20-22.05.2015).
Abstract: *Folia medica* 57 (1):161.
8. Георгиева А, Белчева С, Ташев Р, Вълчева-Кузманова С. Ефекти на хлорогеновата киселина върху изследователското поведение и двигателната

- активност при плъхове. Юбилейна научна конференция по фармакология и клинична фармакология за млади учени (Цигов Чарк, 5-7.06.2015).
9. Valcheva-Kuzmanova S, Georgieva A, Todorova K, Belcheva S, Tashev R. Effects of gallic acid and quercetin on learning and memory processes in young/healthy rats. 28th ECNP Congress (Amsterdam, The Netherlands, 29.08.-01.09.2015).
Abstract: *European Neuropsychopharmacology* 25:S340-S341 (IF 4.369).
 10. Георгиева А, Белчева С, Белчева И, Ташев Р, Вълчева-Кузманова С. Ефекти на хлорогенова и ферулова киселина върху изследователското поведение и двигателната активност при плъхове. XI Национален конгрес по физиологични науки (София, 9-11.10.2015)
 11. Georgieva A, Belcheva I, Tashev R, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of chlorogenic acid and ferulic acid on learning and memory in rats. 2nd International Conference on Natural Products Utilization: From Plants to Pharmacy Shelf - ICNPU 2015 (Plovdiv, 14-17.10.2015).
 12. Georgieva A, Belcheva I, Belcheva S, Tashev R, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of chlorogenic acid, ferulic acid, gallic acid and quercetin on learning and memory in the two-way active avoidance task in young/healthy rats. Second Pharmaceutical Business Forum with Scientific and Practical Conference (Varna, 30-31.10.2015).
Abstract: *Scripta Scientifica Pharmaceutica* 2(S1):18.
 13. Valcheva-Kuzmanova S, Georgieva A, Belcheva I, Belcheva S, Tashev R. Effects of chlorogenic acid, ferulic acid, gallic acid and quercetin on learning and memory in the one-way passive avoidance task in young/healthy rats. Десета работна среща „Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти“ (София, 17-19.11.2015).