

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ

Симона Александрова Александрова

**НЕВРОПРОТЕКТИВНИ МЕХАНИЗМИ В ЕФЕКТИТЕ НА
ЕЛАГОВАТА КИСЕЛИНА ВЪРХУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН
МОДЕЛ НА ПАРКИНСОНОВА БОЛЕСТ ПРИ ПЛЪХОВЕ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

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

по научната специалност:

„Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“

Научен ръководител:

Проф. д-р Любка Танчева, д. ф., ИНБ – БАН

София, 2022

Дисертационният труд е обсъден на разширен научен семинар на направление „Биологични ефекти на синтетични и природни вещества“ при Института по невробиология, БАН, състоял се на 22.11.2022 г. и е насочен за публична защита пред научно жури в състав:

- 1. Доц. д-р Димитринка Атанасова, ИНБ-БАН, вътрешен член (становище)*
- 2. Доц. д-р Мария Папазова, ИНБ-БАН, вътрешен член (рецензия)
Резервен вътрешен член:*
- 3. Проф. д-р Иванка Костадинова, Медицински университет – Пловдив, външен член (рецензия)*
- 4. Проф. д-р Петко Маринов, Медицински университет – Варна, външен член (становище)*
- 5. Проф. д-р Румен Николов, Медицински университет – София, външен член (становище)
Резервни членове:
проф. д-рн Атанас Кръстев, Тракийски университет – Стара Загора
проф. д-р Росица Замфирова, ИНБ-БАН*

Дисертационният труд съдържа общо 156 страници, онагледен е с 14 фигури и 5 таблици. Използваната литература включва 368 заглавия на латиница.

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в Института по невробиология, БАН, ул. Акад Г. Бончев, бл. 23, 1113 София, както и на интернет страницата на Института.

СЪДЪРЖАНИЕ

Списък на често използваните съкращения.....	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	8
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	9
IV. РЕЗУЛТАТИ.....	19
V. ОБСЪЖДАНЕ.....	29
VI. ИЗВОДИ.....	42
VII. ПРИНОСИ.....	43
VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА.....	44
IX. СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА.....	45
X. СПИСЪК НА ЦИТИРАНИЯТА НА СТАТИИТЕ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА...	46

Списък на често използваните съкращения

АХ	Ацетилхолин
АХЕ	Ацетилхолинестераза
БА	Болест на Алцхаймер
БП	Болест на Паркинсон
ЕК	Елагова киселина
ЕТВ	Електронно-транспортна верига
КМБ	Кръвно-мозъчна бариера
НДЗ	Невродегенеративни заболявания
ОС	Оксидативен стрес
ЦНС	Централна нервна система
6-OHDA	6-хидроксидопамин
CAT	Каталаза
DA	Допамин
GSH	Глутатион
GPx	Глутатион пероксидаза
i.p.	Интраперитонеално приложение
LPO	Липидно окисление
MPTP	1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрахидропиридин
NADPH	Никотинамид аденин динуклеотид фосфат
PCA	Principal component analysis/Анализ на главните компоненти
ROS	Реактивни кислородни видове
SNPC	Substantia nigra pars compacta
SOD	Супероксид дисмутаза
SO	Sham-operated/Фалшиво оперирани
TCDD	2,3,7,8-тетрахлородibenзо-p-диоксин

I. ВЪВЕДЕНИЕ

От незапомнени времена, в търсене на лечение на различни болести, хората са търсили и продължават да търсят лекарства от природата. Традиционната медицина предоставя вековен опит в използването на богати растителни екстракти за холистично лечение и превенция на различни хронични заболявания с минимални нежелани странични ефекти. Традиционната употреба на лечебни растения може да доведе до откриването на нови мощни ботанически агенти за лечението на редица заболявания. Съществуват около 7000 природни съединения, които в момента се използват в съвременната медицина и повечето от тях са били използвани от векове от традиционните лечители.

Редом с успехите, които жъне съвременната медицина, налице са и непосредствени медицински нужди в лицето на различни хронични заболявания, чието лечение с терапевтични агенти, насочени към единични патогенетични механизми, се оказва неефективно. Намалващата ефикасност на някои синтетични лекарства и увеличаващите се противопоказания за употребата им правят понастоящем актуално използването на биологично активни вещества от естествен произход. Поради тази причина, интересът към фитотерапевтичните продукти, известни със своята плурипотентност и отличен профил на безопасност, нарасна през последните години.

Едно от широкопопулярните растения в традиционната медицина на много култури по света е нарът – *Punica granatum L.* До ден днешен нарът и неговите екстракти (сок, екстракт от кората на плода, масло от семките на плода и др.) са силно застъпени в традиционната медицина и в кухнята на източните народи заедно с други суперхрани (като куркума, джинджифил, индийско орехче и др.), използвани от столетия заради техните благотворни ефекти върху организма. Нарът се използва от векове в традиционната китайска медицина, в Аюрведа, персийската традиционна медицина и други за лечението на атеросклероза, диабет, хипертония, хиперлипидемия, някои видове рак, язва и болести на храносмилателната система, а напоследък и на вирусни заболявания, включително и Ковид.

В последните две десетилетия, с помощта на науката, става ясно, че нарът може да предостави потенциално лечение на една група заболявания с огромна социална и медицинска значимост, чиято етиология и патогенеза остават ненапълно изяснени и до днес – невродегенеративните заболявания. Все повече изследвания показват, че екстракти от нар, богати на полифеноли, както и техните и метаболити оказват влияние върху различните видове мозъчни клетки и поддържат техния редокс баланс, оцеляване и пролиферация, както и повлияват клетъчното сигнализиране.

Невродегенерацията е многофакторен процес, който включва различни цитотоксични механизми, водещи до загуба на нервни клетки. Невровъзпаление, ексцитотоксичност, редокс-активни тежки метали, увеличени нива на свободни радикали, увреждане на ендогенните клетъчни защитни механизми, митохондриална дисфункция, понижена експресия на трофични фактори в нервната тъкан – всички тези процеси имат роля в патогенезата на НДЗ.

В резултат на неефективността на средствата, таргетиращи единични механизми, в последните години расте интересът към природните средства, които са известни със своята плурипотентност и отличен профил на безопасност.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ:

Изследване на невропротективните ефекти на елаговата киселина (ЕК) върху експериментален модел на болест на Паркинсон, предизвикан с унилатерално приложение на 6-хидроксидопамин (6-OHDA) на лабораторни плъхове.

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

1. Изследване влиянието на ЕК върху динамиката и развитието на невродегенеративния процес във времето, изследвайки:
 - нервномускулната координация като белег на болестта на Паркинсон (БП)
 - промени в паметта и обучението
2. Оценяване протективните ефекти на ЕК върху допаминергичните неврони при прилагане на невротоксина 6-OHDA- проследяване нивата на допамин в двете хемисфери
3. Изследване на антиоксидантното действие на ЕК върху параметрите на оксидативния стрес в двете мозъчни хемисфери – каталаза (CAT), супероксиддисмутаза (SOD), липидно окисление (LPO), глутатион (GSH), глутатион пероксидаза (GPx)
4. Сравнително проучване на протективното действие на ЕК върху двете хемисфери - хемисферна латерализация на ефектите на ЕК
5. Интегриране на поведенческите и биохимичните данни чрез клъстерен анализ

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Опитни животни

Опитите са провеждани върху полово зрели мъжки Wistar плъхове с тегло 250-300 г. (Експериментална развъдна база за опитни животни, ул. Драгоманско шосе 1, Сливница).

Опитните животни са отглеждани в пластмасови клетки при температура $20 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ относителна влажност на въздуха, 12-часов цикъл на светлина/тъмнина и при неограничен достъп до храна и вода. Всяка експериментална група се състои от 8-10 животни.

Всички процедури по третирането на животните както и експерименталните процедури са извършени в съответствие с правилата за работа с експериментални животни (Наредба № 20 от 01.11.2012 г. за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им, в сила от 01.01.2013 г., издадена от Министерство на Земеделието и храните, Обн. ДВ бр. 87 от 09.11.2012 г.), в съответствие с Европейската директива 86/609/ЕЕС и “Principles of laboratory animal care” (NIH publication No. 85-23), както и в съответствие с правилата на Комисията по етика на Института по невробиология към Българска академия на науките.

1.2. Експериментални вещества

6-хидроксидопамин (6-OHDA) - Sigma-Aldrich

6-OHDA е невротоксин, прилаган под формата на екстемпорално приготвян разтвор на 6-хидроксидопамин хидрохлорид в стерилен физиологичен разтвор. Приложението е интрастриатално в обем $2 \mu\text{L}/10 \mu\text{g}$ 6-OHDA с помощта на стереотаксична техника.

R(-)-апоморфин хидрохлорид хемихидрат – Sigma-Aldrich

Апоморфин е прилаган интраперитонеално под формата на екстемпорално приготвян разтвор с пречистена вода за инжекции-в доза 2 mg/kg .

Етилендиаминтетраоцетна киселина (ЕДТА) Sigma-Aldrich

ЕДТА е използвана за неврохимично определяне на допамин под формата на разтвор в дестилирана вода с рН 6–6.5.

Хлоралхидрат - Sigma-Aldrich

Хлоралхидрат е прилаган интраперитонеално под формата на екстемпорално приготвян разтвор с пречистена вода за инжекции в доза 400 mg/kg i. p за анестезия преди осъществяване на стереотаксичната техника на приложение на 6-OHDA.

Елагова киселина – Ellagic acid hydrate 97% Alpha Aesar

Поради слабата разтворимост на елаговата киселина във вода, веществото е включено в емулсия за парентерално (интраперитонеално) приложение, като използваният емулгатор е Tween 80. Емулсията е приготвяна при спазване на добрата лабораторна практика за приготвяне на лекарствени емулсии. Водната фаза на емулсията е пречистена вода за инжекции. За приготвяне на стабилна емулсия се използва хомогенизатор. Емулсията се приготвя ежедневно *ex tempore* и се прилага интраперитонеално в обем 1ml.

Физиологичен разтвор (0.9% NaCl) – банка 0.9 % NaCl, 500 ml, BRAUN

1.3. Избор на експериментален модел на БП

Познатите на този етап експериментални модели на БП са две основни групи: **генетични и токсин-предизвикани**, като всяка от тях има своите силни и слаби страни. Генетичните модели, създадени с помощта на генното инженерство притежават мутации, за които е известно, че водят до БП. Те се създават с цел да повторят някои причинно-следствените връзки, които предизвикват БП при хора, най-често с фамилна обремененост (Meredith et al., 2008; Bezard et Przedborski, 2011), но не успяват да възпроизведат в достатъчна степен невродегенеративните изменения и фенотипа на заболяването при спорадично възникващата БП (Dawson et al., 2010).

При токсин-предизвиканите модели се използва излагане на опитните животни на невротоксини, за които е известно, че предизвикват нигростриатална загуба на неврони. Токсин-предизвиканите модели на болестта възпроизвеждат повече от симптомите на болестта, и въпреки някои недостатъци са по-предпочитани от генетичните. Класически са моделите с 6-OHDA (6-хидроксидопамин) при плъхове и МРТР (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрахидропиридин) модел при мишки, които доминират вече десетилетия наред

(Ungerstedt, 1971). От двата модела 6-OHDA е предпочитан пред МРТР–предизвикания модел на БП, тъй като втория има по-слаб поведенчески фенотип и обикновено се използва като втори скрининг тест. Неговото предимство е в по-лесното осъществяване сравнение с 6-OHDA.

6-OHDA е катехоламинергичен невротоксин (Jonsson, 1983), използван интензивно в множество *in vitro* и *in vivo* проучвания. 6-OHDA има структурно сходство с допамин и норадреналин и показва висок афинитет към плазмено-мембранните транспортери за тях - DAT (за допамин) и NET (за норадреналин). В резултат на това, токсинът кумулира селективно в тези два типа неврони и ги уврежда. Високата селективност на 6-OHDA към катехоламинергичните неврони и по-специално към допаминергичните нигростриатални пътища, го прави много удобно средство за получаване на експериментални модели на БП. 6-OHDA не преминава кръвно-мозъчната бариера (КМБ), поради което за да достигне до централната допаминергична система се налага директното му инжектиране в мозъка на опитните животни чрез стереотаксична техника.

Предимства на модела:

1. Повтаря някои от основните характеристики на заболяването, а именно:

Оксидативен стрес. Въпреки, че точният механизъм на действие не е напълно изяснен се предполага, че токсинът предизвиква селективна невродегенерация на допаминергичните неврони чрез комбинацията от оксидативен стрес и митохондриална респираторна дисфункция (Luthman et al., 1989). По този начин токсинът повтаря много от процесите, които реално се случват в мозъка на пациенти с БП.

Невровъзпаление. 6-OHDA предизвиква микроглиална активация в стриатума и substantia nigra (Cicchetti et al., 2002).

Медиаторен дисбаланс в базалните ганглии. 6-OHDA модела повтаря някои от биохимичните характеристики на заболяването като тежкия допаминов дефицит.

Селективна дегенерация на нигростриаталния тракт. 6-OHDA предизвиква токсин-индуцирана селективна дегенерация на нигростриатални допаминергични неврони (Ungerstedt, 1971).

2. Възможност за количествено измерване на увредената нигростриатална функция чрез различни поведенчески тестове.

В сравнение с другите модели, унилатералния 6-OHDA модел има уникално предимство - възможността за оценка на моторния дефицит, който е пряко свързан със степента на увреждане на нигростриаталния тракт чрез поведенчески тестове.

Един от най-разпространените методи за оценка на степента на унилатералните лезии при плъхове са кръговите моторни отговори предизвикани чрез системното приложение на D1/D2 агониста апоморфин. **Апоморфинът** (0,01-1 мг/кг) създава дисбаланс в допаминергичната система в стриатума чрез взаимодействие със свръхактивните допаминови рецептори в лизирания (ипсилатерален) стриатум, получени в резултат на нигростриаталната клетъчна загуба. Това предизвиква кръгово моторно поведение в посока обратна на лизираната страна. Контралатералните апоморфин–предизвикани ротации са единствено възможни при повече от 90% загуба на допаминергични неврони (Nefiti et al., 1980; Hudson et al., 1993).

Недостатъци на 6-OHDA модела - Не повтаря напълно всички характеристики на заболяването:

1. Бърза невронална загуба, която е в контраст с бавната прогресия на заболяването при човека.
2. Патологичните промени при БП при човека не са концентрирани само в базалните ганглии, а обхващат още и locus coeruleus и raphe nuclei, което при 6-OHDA модела не се репликира.
3. Клетъчната смърт при 6-OHDA модела се случва много по-бързо, в сравнение с бавния процес на невродегенерация при БП.
4. Въпреки че при моделите с нигростриатално 6-OHDA приложение има голямо съответствие между размера на лезиите и резултатите от поведенческите тестове, те са единствено възможни при унилатералния експериментален модел на заболяването.
5. При 6-OHDA модел на БП не се образуват телца на Леви (вътреклетъчни включения от променен алфа-синуклеин), както това се случва в реална ситуация (Spillantini et al., 1997; Baba et al., 1998).

6. Необходимостта на токсина да се вкарва стереотаксично в мозъка на опитните животни изисква персонал с определени технически умения и познания.

Въпреки ограниченията на 6-OHDA модела, той си остава ценен подход, при който чрез поведенчески тестове може да се направи оценка на фармакологичните ефекти на изследваните молекули върху допаминергичната система, количествена и качествена оценка на техните ефекти върху моторните симптоми. На практика, с изключение на антимукариновите, всички останали препарати, използвани днес в медицинската практика за лечение на БП са тествани посредством 6-OHDA модел при плъхове и са доказали своята ефикасност. Моделът дава добра възможност за изучаване и на клетъчните механизми, лежащи в основата на моторния дефицит, както и за изучаване на молекулните механизми на допаминовото изчерпване.

1.4. Описание на използвания модел на 6-OHDA-индуцирана БП при плъхове Стереотаксична техника

Опитните животни са анестезирани с хлоралхидрат (400 mg/kg i. p.) (Gheibi et al., 2014), след което главите им са обръснати и кожата е почистена с етилов алкохол 70%. Плъховете се позиционират върху стереотаксичен апарат за техните ушни канали. Осъществява се инцизия по срединната линия, отместват се подкожната и мускулната тъкан, почистват се зони bregma and lambda и в съответната локация на черепа се пробива дупка. Таргетните координати на стриатума са AP = 0; LR = 3.5; H = + 5 от bregma, в съответствие със стереотаксичния атлас (Paxinos et Watson, 1997). Инжектира се 2 μ L (общо 10 μ g) 6-OHDA унилатерално, в десния стриатум със скорост на инжектиране 1 μ L/мин. Иглата се оставя на място за 5 минути преди бавно да бъде изтеглена (García et al., 2000). След изтегляне на иглата, разрезът се затваря и животните се връщат в кафезите за възстановяване.

Контролната група оперирани животни (Sham operated-SHAM) преминава през същата процедура, с разликата, че в стриатума се инжектира физиологичен разтвор в същия обем и със същата скорост, вместо 6-OHDA.

1.5. Третиране на опитните животни и експериментален дизайн

Опитните животни са разделени на три групи:

- SO (sham operated) контрола оперирани, с въведен 2 μ l физиологичен разтвор в стриатума; претретиран с интраперитонеално приложен физиологичен разтвор 0,5 ml/100 g телесно тегло;
- 6-OHDA - с интрастриатално въведен 2 μ l/10 μ g 6-OHDA; претретиран с интраперитонеално приложен с 0.5 ml/100 g телесно тегло физиологичен разтвор.
- 6-OHDA + EA - с интрастриатално въведен 2 μ L/10 μ g 6-OHDA; претретиран с интраперитонеално приложен с разтвор на ЕК в доза 50 mg/kg в 0,5 ml/100 g телесно тегло.

Претретирането е осъществено в продължение на 5 дни преди операцията. Дозата на изследваното вещество – ЕК е избрана въз основа на наши предходни данни (Tancheva et al., 2018), както и въз основа на литературни източници (Seeram et al., 2004, Kabiraj et al., 2014, Nejad et al., 2015, Ho et al., 2014, Ding et al., 2014). Чрез използване на алометрично изчисление (Reagan-Shaw et al., 2008, Nair et Jacob, 2016) се установява дозата за плъх на ЕК - 50 mg/kg която отговаря на доза при човека (HED, human equivalent dose) от приблизително 9,8 mg/kg, приближаваща се до ефективната доза на ЕК при хора (при средно тегло 60 кг.)

Приготвянето на разтвора на ЕК е осъществено в съответствие с правилата за Добра лабораторна практика (GLP) за приготвяне на емулсии. След претегляне на необходимото количество ЕК е приготвена емулсия с емулгатор gumma Arabica, с помощта на хомогенизатор. Водната фаза на емулсията е физиологичен разтвор. Емулсията е приготвяна ежедневно ex tempore, с помощта на хомогенизатор и прилагана интраперитонеално в упоменатия по-горе обем.

На втората и третата седмица след въвеждането на 6-OHDA, опитните животни са подложени на поведенчески тестове. Непосредствено след приключване на поведенческото изследване, животните са евтаназирани за целите на биохимични изследвания. Телесното тегло на опитните животни е измерено преди началото на експерименталната работа (преди претретирането), след края на претретирането и преди операцията, както и на втората и третата седмица след операцията.

2. Методи

2.1. Поведенчески методи

2.1.1. Метод за определяне на степента на унилатералните лезии - апоморфин-предизвикани ротации

Тестът с апоморфин-предизвикани ротации е класически поведенчески тест за оценка на унилатералната нигростриатална загуба на допаминергични неврони.

Тестът е проведен на 14 ден след операцията, за да се позволи развитие на нигростриаталните лезии. След 10 минути хабиутация, всяко животно се инжектира с разтвор на апоморфин в доза 2 mg/kg, i.p. Животното се поставя в цилиндричен контейнер с диаметър 33 см и височина 35 см, разположен в стая с притъпено осветление. 1 минута след инжектирането с апоморфин започва отброяване на пълните контралатерални ротации – тези, които са в посока обратна на оперираната страна. Отброяването продължава 30 минути (Roghani et al., 2010).

2.1.2. Метод за определяне степента и динамиката на моторната координация – Rotarod

Rotarod тестът е класически метод за определяне на двигателната координация след приложение на фармакологични агенти, водещи до седация или мускулна релаксация, както и за изследване на хипокинезия при модели на БП (Rozas et al., 1997). Тестът е проведен при постоянна скорост на въртене 7 оборота/минута.

Тестът е проведен преди началото на експерименталната работа и повторен на 14-тия и 21-вия ден след операцията.

Провеждането на теста преди началото на работа има за цел да обучи животните, след което оценъчните тестове са проведени двукратно. При всички тестове и сесии животните са поставяни на апарата за 1 минута, като ако паднат са били поставяни отново. Отчетени са броят падания за една минута.

2.1.3. Метод за определяне на степента и динамиката на обучението и паметта – тест за пасивно избягване

Обучението и паметта на опитните животни са оценени с тест за пасивно избягване с отрицателно подкрепление. При този метод, животните се приучават да потискат вродения си инстинкт да предпочитат тъмни места пред осветени. Тестът се провежда с

апарат step-through по метода на Jarvik et Kopp (1967). Апаратът се състои от камера с две отделения, разделени с преграда, в която има вратичка за преминаване от едното отделение в другото. Едното отделение на камерата е добре осветено, а другото – тъмно. Подът на камерата е изграден от метални пръчки с дебелина 3мм и разстояние помежду си 11 мм, по които се провежда електрически ток.

Промяната в поведението на опитните животни се тригерира от електрическия шок, който те получават първоначално при обучението, когато следват естествения си инстинкт за да влизат в тъмното отделение.

Тестът е проведен преди началото на експерименталната работа, и е повторен на 14-тия и на 21-вия ден след въвеждане на 6-OHDA без прилагането на електрически ток.

Всички поведенчески тестове са извършени между 09:00 и 12:00 часа преди обяд. След приключване на тестовете, опитните плъхове са евтаназирани чрез CO₂, след което мозъците са отстранени бързо и обработени за биохимичен анализ.

2.2. Биохимични методи

2.2.1. Неврохимично определяне на допамин

За изследване на протективните ефекти на ЕК са проведени биохимични изследвания за определяне на нивата на допамин в отделните групи опитни животни.

След евтаназията на опитните животни, мозъците за отстранени и от всеки мозък са изолирани лявата и дясната хемисфера (ипсилатералната хемисфера е увредената и контралатералната е неувредената), които се замразяват веднага при -40°C за 24 часа.

За целите на настоящето определяне на нивата на допамина избрахме техниката за директно неврохимично определяне в мозъчната тъкан.

Замразените тъканни проби са претеглени и хомогенизирани в 5 ml бутанол и съответно количество 0,01 N HCl. Хомогенатите са центрофугирани за 10 минути при 1500 об/мин. 2 ml аликвотни части от бутаноловия супернатант са прехвърлени в епруветки с обем 1.5 ml съдържащи 0.1 M фосфатен буфер с рН 6,5. Сместа се разбърква с Vortex апарат за 20 секунди, като по този начин допаминът се екстрахира във фосфатния буфер. След това пробите се центрофугират 10 минути на 3000 rpm за разделяне на органичната от водната

фаза. Горният, органичен слой, съдържащ допамин се аспирира с вакуум. Допамин-съдържащият фосфатен екстракт се подготвя за измерва флуориметрично определяне по метода на Jacobowitz and Richardson (1978). По време на флуоресцентната реакция към 1 ml фосфатна фаза, на двуминутни интервали се добавя 0,25 ml разтвор на ЕДТА (4.0 g ЕДТА разредена в 100 ml dH₂O) с рН 6–6,5; 0,2 ml разтвор на калиев йодид (4,8 g калиев йодид + 0.25 g йодни кристали разредени в 100 ml dH₂O); 0.25 ml алкални сулфити (0.25 g Na₂SO₃ и 1 ml dH₂O + 9 ml 4N NaOH и 0,3 ml 5N CH₃COOH). Пробите са поставени последователно за 5 минути на вряща водна баня и след това за 1 минута на ледена баня. Флуоресценцията на допамин е определена на $\lambda = 320/385$ nm. Нивата на допамин са изчислени въз основа на флуоресценцията на стандартен допаминоз разтвор и са отразени в пикограми за грам свежа тъкан.

Увредата на периферните окончания на стриаталните неврони започва още в първия ден след въвеждането на 6-OHDA, докато загубата на неврони в SNPC се развива в продължение на поне една седмица, достигайки своя максимум около втора-трета седмица след въвеждането на токсина (Sauer et Oertel, 1994, Przedborski et al., 1995, Blandini et al., 2007).

2.2.2. Антиоксидантна активност

Следните биохимични параметри на антиоксидантната активност са определени в тъканния хомогенат:

- Липидна пероксидация - Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (MAK085, Sigma-Aldrich, USA);
- Нива на тотален редуциран глутатион - Glutathione Assay Kit (CS0260, Sigma-Aldrich, USA);
- Активност на супероксиддисмутаза - SOD determination kit (19160, Sigma-Aldrich, USA);
- Активност на глутатион пероксидаза - Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit (CGP1, Sigma-Aldrich, USA); and
- Активност на каталаза по метода на Aebi (1984)
- Протеинното съдържане е определено по метода на Lowry et al. (1951).

2.3. Статистически методи

Резултатите са показани чрез $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$. Статистическият анализ на данните е проведен с използване на Student's *t*-test, ANOVA последван от post-hoc test (Duncan, Dunnett, or Newman-Keuls). За сигнификантна разлика се приема $p < 0.05$.

Анализ на главните компоненти

Преди анализ на връзката между изследваните променливи е направена стандартизация чрез изчисляване на *Z*-score за всяка променлива (изваждане на стандартното отклонение от медианата на променливата и след това разделяне на разликата на стандартното отклонение) (Gower, 1985). Проведен е корелационен тест на Spearman за оценка на корелацията между изследваните променливи. Изследователския анализ на главните компоненти е приложен за стандартизирани данни от 25 плъха с налични стойности за всички променливи, за установяване на прилики и разлики между отделните групи, както и за идентифициране на основните връзки между променливите, отговорни за вариабилността на анализирани данни.

Всички изчисления и графики създадени за Анализа на главните компоненти са създадени, използвайки софтуер IBM SPSS 19. Йерархичен клъстерен анализ (centroid clustering method, squared Euclidean distance) е проведен на отделни резултати от Анализа на главните компоненти за първите два компонента за потвърждаване на клъстерирането на отделните плъхове в зависимост от третирането им.

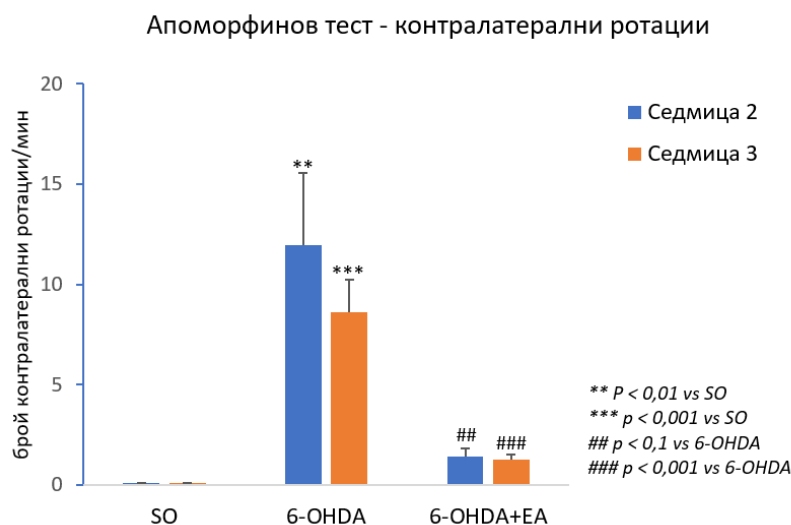
IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Поведенчески изследвания

1.1. Изследване протективните ефекти на ЕК върху степента на унилатерално увреждане на стриатума в резултат на приложението на 6-OHDA

В 6-OHDA контролната група на 2-ра седмица след прилагане на токсина се регистрират средно 11,95/мин контралатерални ротации. Същата група на седмица 3-та показва 8,6/мин. В sham-operated контролната група не се наблюдават ротации, което е потвърждение за липсата на стриатална лезия (фиг. 1).

Животните, третирани с ЕК показват съществено редуциране на броя на контралатералните ротации в минута, сравнено с 6-OHDA контролите. Най-добри показатели при третираните са отчетени на седмица 3-та след приложение на токсина (понижение с 85,35%, $p < 0.001$, $n = 8$) (фиг. 1).



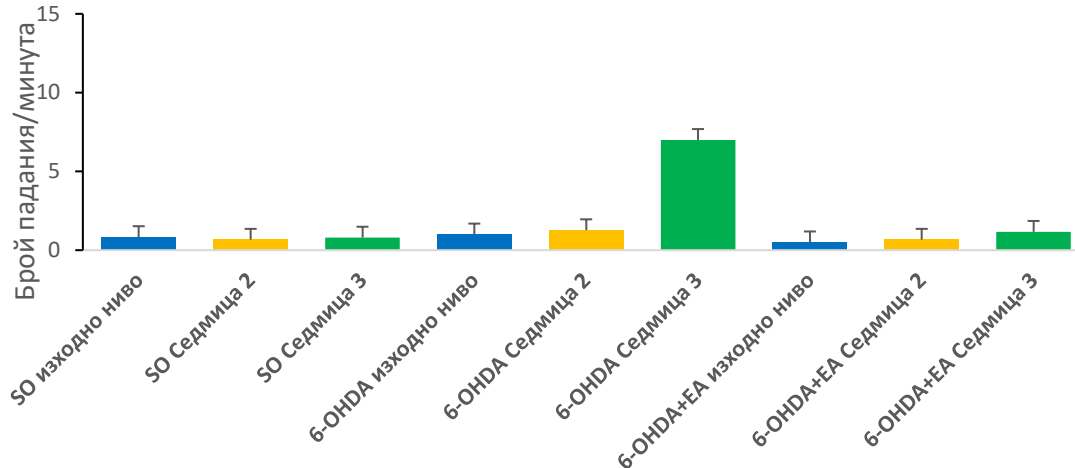
Фиг. 1. Ефект на ЕК върху апоморфин-индуцираните ротации в модел на БП при плъх. Опитните животни са наблюдавани в продължение на 30 минути, с начало 1 минута след инжектирането на апоморфин (2 mg/kg, i.p). Данните са показани в средни стойности \pm стандартната грешка (standard error of the mean - SEM) ($n = 6-8$ животни в група).

*сигнификантна разлика в броя на ротациите за минута при 6-OHDA група спрямо контролната група sham-operated (SO) ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

сигнификантна разлика в броя ротации в минута при експерименталната спрямо група 6-OHDA групата # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$. ANOVA и пост-тест на Dunnett.

1.2. Изследване на ефектите на елагова киселина върху нервномускулната координация

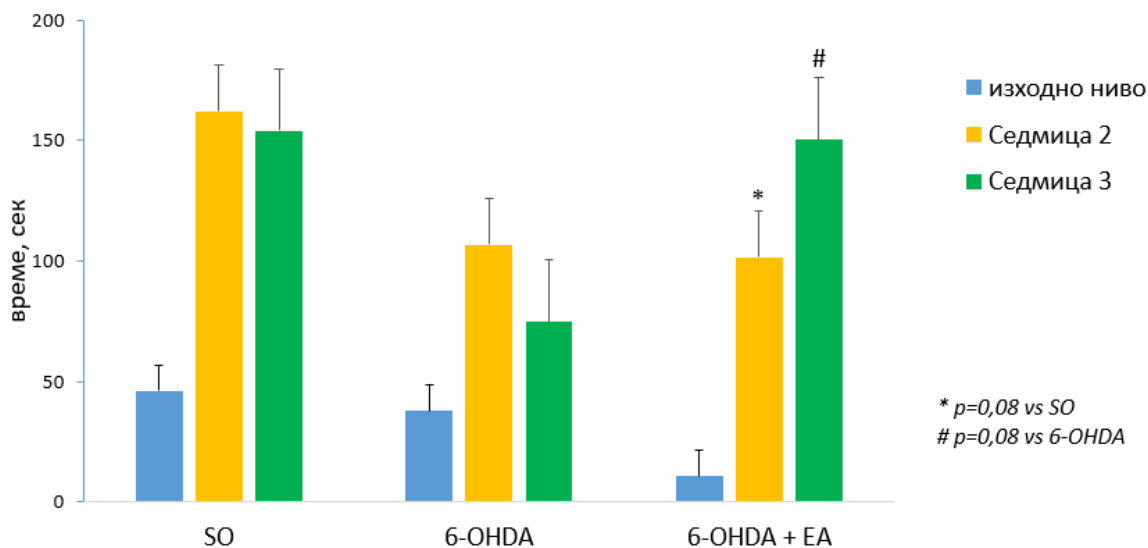
Регистрират се средно $0,61 \pm 0,14$ падания/минута на седмица 2-ра и $0,5 \pm 0,11$ падания/минута на седмица трета след въвеждане на токсина (фиг. 2). Животните, третирани с ЕК показват подобрене в нервномускулната координация, сравнено с контролната 6-OHDA група.



Фиг 2. Ефект на ЕК върху нервномускулната координация при модел на плъх с БП. ЕК е прилагана ежедневно за 5 дни преди стереотаксичното въвеждане на 6-OHDA. Изследването е проведено на седмица 2-ра и седмица 3-та след въвеждане на токсина. Животните са поставени на въртящ се прът (7 об/мин) и са преброени броя на паданията в продължение на 1 минута. Наблюдава се съществено различие между броя на паданията в експерименталната група и 6-OHDA групата $p < 0.05$. Статистическият анализ е проведен по Student *t*-test.

1.3. Изследване на ефектите на елагова киселина върху паметта и обучението

Латентното време през фазата на изследване (STL) на всички групи са показани на фиг. 8. Наблюдава се значително влошена памет в 6-OHDA контролната група е значително влошена. При сравнение със Sham-operated групата, в 6-OHDA контролната група STL са по-ниски с 34,57% ($p < 0,05$, $n=8$) и 51,42% ($p < 0,01$, $n=8$) на седмици 2-ра и 3-та, респективно (фиг. 8). От друга страна, обаче, претретрирането с ЕК показва значително запазена паметова функция. Латентното време в експерименталната група е значително по-дълго. ЕК подобрява паметовата функция със 100% ($p < 0,01$, $n = 8$) спрямо 6-OHDA контролата на седмица 3-та.



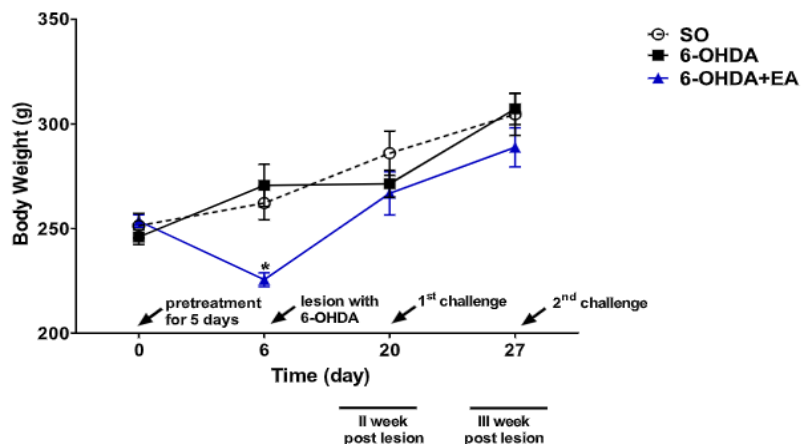
Фиг. 3. Ефект на ЕК върху латентното време (STL) в еднократен тест за пасивно избягване в модел на БП при плъхове. Изследването е проведено на седмица 2-ра и седмица 3-та. Данните са представени като средни стойности \pm стандартната грешка на средната стойност (SEM) ($n = 6-8$ животни в група). Наблюдава се сигнификантна разлика в латентното време (STL) между експерименталната група 6-OHDA + EA и 6-OHDA групата.

1.4. Ефект на елаговата киселина върху телесното тегло

В резултат на претретирането на опитните животни с ЕК, се отчита загуба на телесно тегло, което не се наблюдава в контролната група. В групата, третирана с ЕК се наблюдава редукция на теглото с 16% ($p < 0.05$), спрямо контролата. След прекратяване на приложението на ЕК се наблюдава възвръщане на телесното тегло в експерименталната група, като този тренд се запазва до края на експеримента. Наблюдава се повишена консумация на храна след прекратяване на третирането с ЕК, което е причината за възстановяване на изгубеното тегло. Обобщените резултати от измерванията на телесното тегло са показани на фиг. 4.

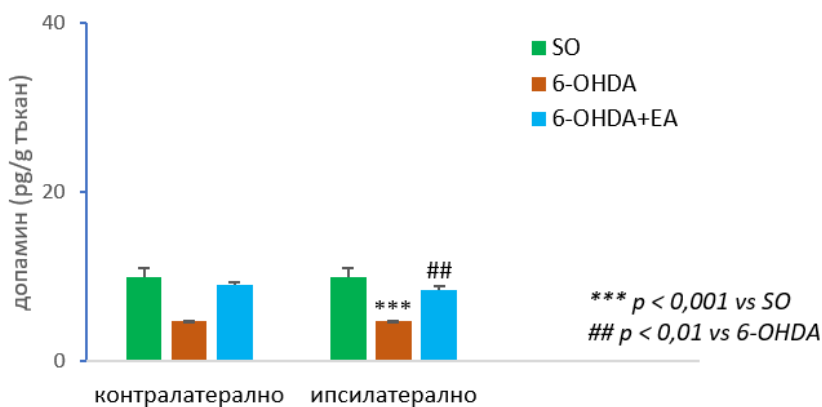
2. Биохимични изследвания

Допаминовите нива в мозъчни хомогенати са измерени на 21-я ден след приложението на невротоксина. В 6-OHDA контролната група допаминовите нива са значимо понижени в сравнение с sham-operated контролната група (фиг. 5). Ипсилатерално понижението е с 5.22% ($p < 0.01$, $n = 8$), а контралатералното понижение е с 52.18% ($p < 0.01$, $n = 8$).



Фиг. 4. Ефект на ЕК върху теглото на трите групи опитни животни. Отчетени са теглата на всяка група (mean \pm SEM), състояща се от 6-8 плъха. ЕК е прилагана перорално в рамките на 5 дни преди стереотаксичната интервенция и приложението на токсина 6-OHDA (унилатерална инжекция на 2 μ L/10 μ g 6-OHDA в десния стриатум. Символът * индикира сигнификантна разлика в телесното тегло между експерименталната и контролната група ($p < 0.01$). Използван е еднофакторен дисперсионен анализ (One-way ANOVA) с пост-тест на Dunnett.

Неврохимично определяне на допамин



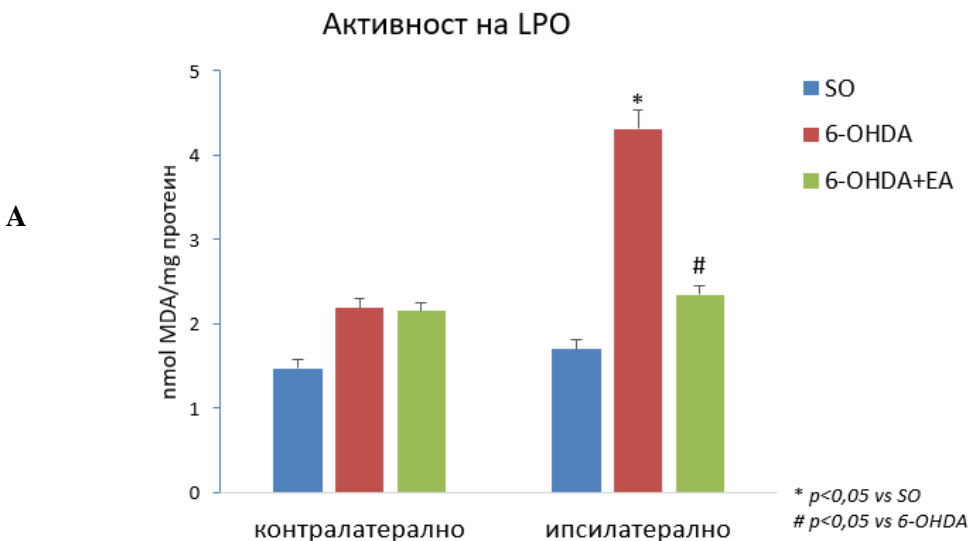
Фиг. 5. Ефект на ЕК на нивото на допамин в ипсилатералната хемисфера (увредена) и контралатералната мозъчна хемисфера (неувредена). ЕК е прилагана ежедневно в продължение на 5 дни преди стереотаксичната операция. Данните са представени като средна стойност \pm стандартната грешка на средната стойност (Standard error of the mean = SEM) ($n =$ four animals per group). С * е означена статистически значимата разлика в нивата на DA между 6-OHDA и SO групите при *** $p < 0.001$. С # е означена статистически значимата разлика в нивата на DA между експерименталната група с ЕК и 6-OHDA групата при ## $p < 0.01$. Използван е еднофакторен дисперсионен анализ (One-way ANOVA) с пост-тест на Dunnett.

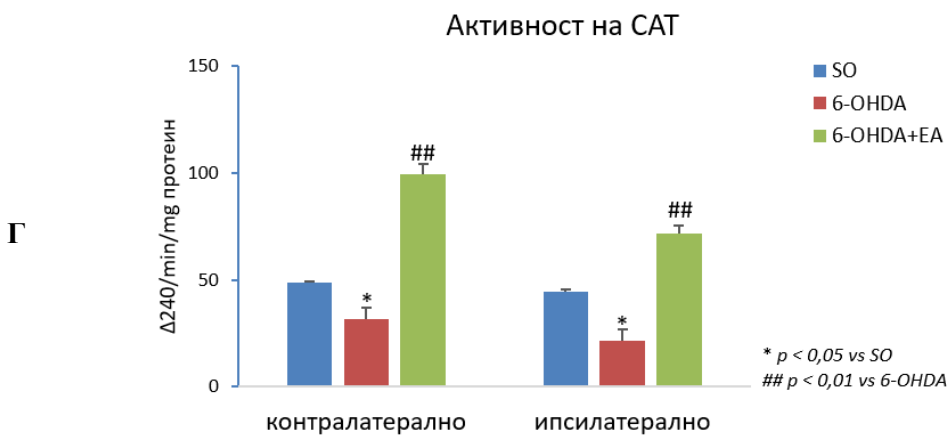
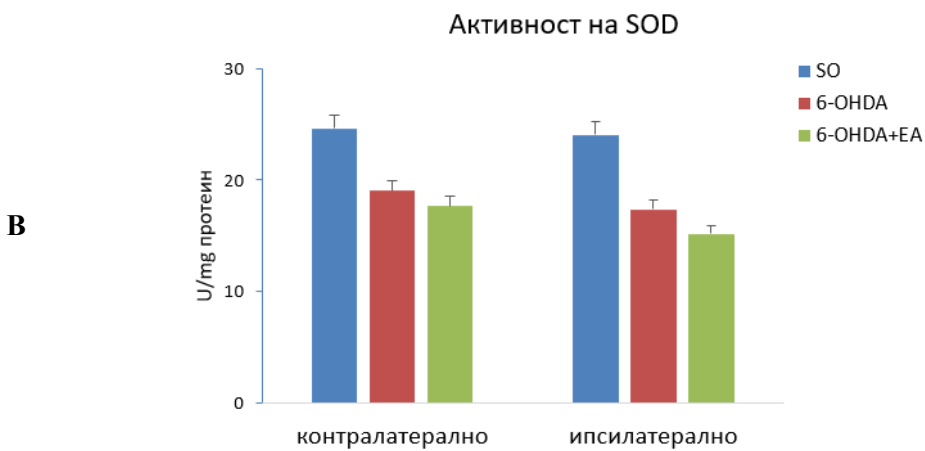
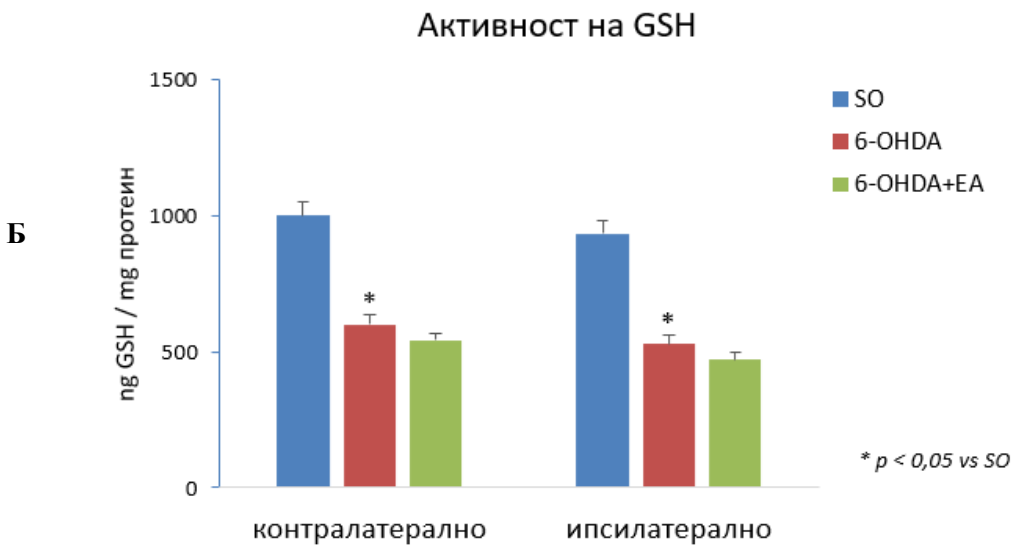
При плъховете претретиранни с ЕК се наблюдава статистически значимо увеличение на допаминовите нива в сравнение с 6-OHDA контролната група. ЕК води до повишаване на допаминовите нива със 108.9% ($p < 0.01$, $n = 4$) ипсилатерално и с 88.96% контралатерално.

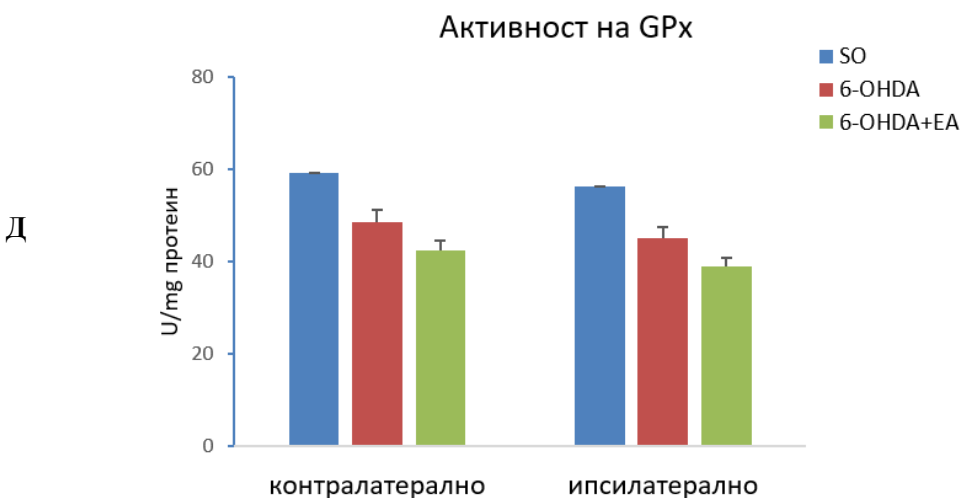
Възстановяващият ефект на ЕК върху допаминовите нива е по-силно изразен ипсилатерално.

2.1. Ефект на ЕК върху параметрите на оксидативен стрес в мозъка на плъхове с БП

Третирането на животните с невротоксина 6-OHDA води до значително увеличаване на нивата на липидна пероксидация и това е особено изразено в ипсилатералната хемисфера на мозъка (фиг. 6А). Също така се наблюдават понижени нива на GSH (фиг. 6Б) и понижена активност на каталазата (CAT) (фиг. 6Г), както ипсилатерално, така и контралатерално.







Фиг. 6. Ефект на ЕК върху параметрите на оксидативния стрес: (А) LPO; (Б) тотален GSH; (В) активност SOD; (Г) активност CAT и (Д) активност на GPx в мозъчни хомогенати на плъхове с 6-OHDA модел на БП. Данните са представени като средна стойност \pm стандартната грешка на средната стойност (Standard error of the mean - SEM) ($n = 4$ животни в група). С * са обозначени статистически значимите разлики в параметрите между 6-OHDA и SO групите при $* p < 0.05$. С # са обозначени статистически значимите разлики в параметрите между 6-OHDA и 6-OHDA + ЕК групите при $\# p < 0.05$; $\#\# p < 0.01$. Статистическият анализ е проведен по Student t-test.

Наблюдава се и понижение в активността на SOD (фиг. 6B) и GPx (фиг. 6Д), макар и несъществено.

Приложението на изследваното вещество ЕК частично възстановява измененията в оксидативния статус, индуцирани от 6-OHDA (фиг. 6) – наблюдава се понижение на липидното окисление при плъховете, третиран с 6-OHDA само ипсилатерално с 46% ($p < 0.05$). Върху нивата на GSH, ЕК не показва съществен ефект, но предизвиква съществено увеличение (с 236%) на активността на каталазата, отново предимно ипсилатерално.

2.2. Общ антиоксидантен ефект

Инструментите на биоинформатиката стават все по-застъпени в няколко области на биомедицинските изследвания. Те подпомагат изучаването на патогенетичните пътища чрез *in silico* предикционен анализ на тераностични молекули. Тераностиката е нов термин, една комбинация между термините терапия и диагностика. Тераностиката предлага

диагностика, прицелна терапия и проследяване на резултатите от терапията (Lombardo et al., 2019, Presti et al., 2018, Mammana et al., 2018, Fagone et al., 2019, Nicoletti et al., 2019)

Анализът на главните компоненти (PCA - principal component analysis) е класическо измерение на редуционисткия подход, който конструира линейни комбинации на набор от наблюдения, наречени главни компоненти. Главните компоненти са ортогонални един на друг и биха могли ефективно да обяснят вариации напр. в генната експресия (Ma et Dai, 2011).

Анализът на главните компоненти се използва основно за придобиване на по-дълбоко разбиране на ролята на индукцията в антиоксидантните ефекти на ЕК, както и да идентифицира кои параметри на оксидативния стрес повлияват допаминовите нива и поведението на изследваните опитни животни. В настоящото изследване са анализирани трите групи опитни групи – третирани с ЕК, 6-OHDA контрола и sham-operated контрола. Главните компоненти са изчислени при използване на всички налични променливи: (i) допамин (DA), GSH, и LPO ниво; (ii) CAT, SOD, и GPx активност контралатерални и ипсилатерално, (iii) относително тегло на мозъка, както и резултати от тестовете за пасивно избягване, Rotarod и апоморфиновия тест за втората и третата седмица. Данните са стандартизирани за да се елиминира ефекта на мащаба. Първите пет компонента са екстрахирани в опит да се идентифицира потенциалния компонент, идентифициращ всяка от експерименталните групи

Таблица 1 показва, че първите три главни компонента (PC1, PC2 и PC3) обясняват над половината от наблюдаваната дисперсия на данните (63%). Това предполага съществуването на силни взаимовръзки, които се групират в рамките на три компонента. По-нататъшно изследване само на PC1 (обяснява 29% от дисперсията) показва силна положителна връзка между концентрацията на DA и по-голямата част от параметрите на оксидативния стрес както в контра-, така в на ипсилатералните локации (Таблица 3). Единственото изключение прави липидната пероксидация, която корелира отрицателно с концентрацията на DA конкретно в увредените места (Таблица 1). От друга страна, PC2, който обяснява 23% от дисперсията, корелира положително с нивата на липидна пероксидация в засегнатата половина на мозъка, с останалите показатели на оксидативния стрес (GSH, CAT, SOD и GPx) както и с поведенческите параметри (RR-Week 3, Apo-Week

2, Apo-Week 3). PC3, отговорен за 11% от дисперсията, демонстрира връзка на нивата на DA с паметовите и двигателни процеси (RR и Apo). Взети заедно, PC4 и PC5 обясняват малка част от вариацията на параметрите (едва около 15%), поради което не бяха подложени на по-нататъшна интерпретация. От горното можем да предположим наличието на три основни механизма, свързани с антиоксидантното възстановяване при плъхове с БП: (1) АО повишават нивата на допамин в мозъка и намаляват липидната пероксидация в увредените области (PC1), (2) независимо промените на оксидативния стрес са свързани с поведенческите параметри (PC2) и (3) нивата на допамин показват пряка връзка с поведенческото представяне (PC3). Това предполага, че общата антиоксидантна защита при плъхове с БП задейства най-малко три отделни, паралелно протичащи взаимодопълващи се механизма на възстановяване на ЦНС.

Таблица 1. ¹ Представени са тегловните коефициентите, получени за всеки главен компонент и за всеки параметър и количеството на дисперсия, която обяснява всеки от главните компоненти. Вляво е списъкът с параметри, където L означава контралатералната страна и D за ипсилатералната страна на лезията; резултатите от поведенческите тестове (RR и АРО) се показват съответно за втората (Week 2) и третата (Week 3) седмица. Коефициентите, над 0,3, са представени с удебелен шрифт.

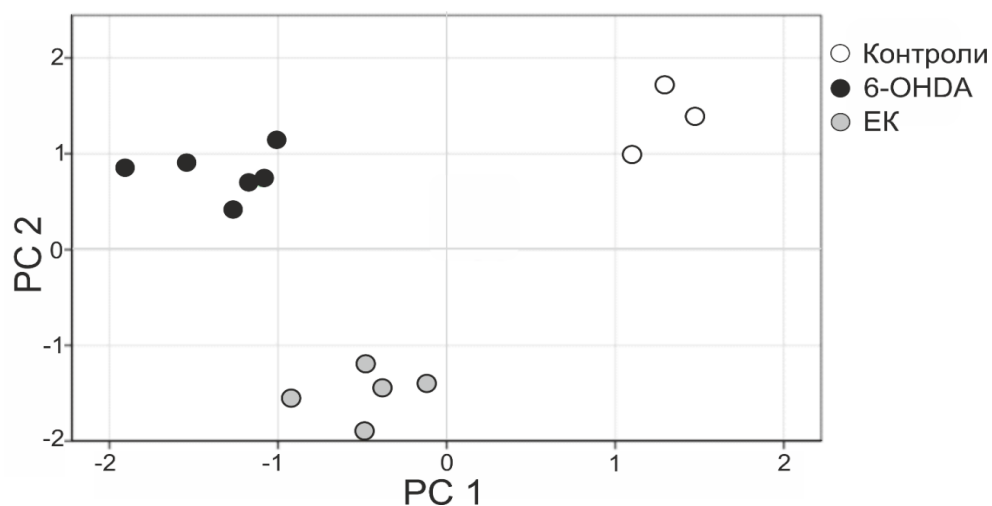
Parameters ¹	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
DA-L	0.60	-0.34	0.64	-0.01	-0.18
DA-D	0.69	-0.37	0.49	0.06	-0.11
LPO-L	-0.29	-0.18	0.04	0.76	0.21
LPO-D	-0.72	0.46	0.27	0.40	0.02
GSH-L	0.72	0.54	-0.14	0.32	0.01
GSH-D	0.74	0.48	-0.07	-0.03	0.14
CAT-L	0.31	-0.86	-0.29	0.11	-0.11
CAT-D	0.57	-0.79	0.02	-0.09	-0.08
SOD-D	0.54	0.45	-0.23	0.49	-0.26

Parameters ¹	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
SOD-L	0.56	0.58	-0.05	0.24	-0.34
GPx-L	0.61	0.58	0.16	-0.26	0.19
GPx-D	0.29	0.76	-0.18	-0.36	-0.10
Brain Weight	-0.35	-0.32	-0.67	0.15	0.11
RR-Week 2	0.12	-0.11	0.74	0.31	0.23
RR-Week 3	-0.52	0.31	0.18	-0.36	-0.07
Apo-Week 2	-0.58	0.38	0.18	0.15	0.19
Apo-Week 3	-0.68	0.40	0.32	-0.01	-0.32
Component coefficients	5.51	4.39	2.15	1.71	1.15
Variance explained	29.01	23.09	11.31	8.98	6.04

2.3. Специфични антиоксидантни ефекти

С цел допълнително изследване на механизмите, отговорни за фармакологичния ефект на ЕК, беше проведен, надграждащ анализ на основните компоненти (Principal Component Analysis, PCA) на набор променливи, включително нива на допамин, липидна пероксидация, редуциран глутатион, каталаза, супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза, както ипсилатерално, така и контралатерално. Допълнително бяха включени резултатите от измерването на теглото на мозъка, Rotarod теста и апоморфиновия тест на седмица 2-ра и седмица 3-та след въвеждането на невротоксина и инициране на БП. Бяха идентифицирани 5 главни компонента (PC1–PC5). След това на база от резултатите от клъстерния анализ и количеството дисперсия, обяснено от всеки фактор, беше проведен втори PCA с фиксиран брой фактори - 2. Оказа се, че тези два фактора PC1 и PC2 - обясняват 54 процента от общата дисперсия и критерият на Кайзер-Майер-Олкин е висок от 0,6, което потвърждава, адекватността на извадката.

Основните компоненти на PC1 (Таблица 1) показват силна връзка между нивата на DA и оксидативния стрес, отразени от GSH, CAT, SOD и GPx, но не и нивата на LPO ипси- и контралатерално. PC2 демонстрира връзка между когнитивното представяне на плъх (апоморфинов тест на втора и трета седмица и Rota-rod на трета седмица) и оксидативен стрес (LPO в ипсилатералните локации и GSH, SOD и GPx билатерално).



Фиг. 7. Представяне на индивидуалните променливи, чрез използване на първите два главни компонента (PC1 и PC2) в двуизмерна скала – показва клъстериране на плъховете в контролните групи SO— бели кръгове; 6-OHDA— черни кръгове, 6-OHDA + EA—сиви кръгове.

Фиг. 7 представя диаграма на разсейването, получена чрез съпоставяне по абсциса и ордината на тегловните коефициенти на PC1 и PC2, изчислени за всяко от 14-те изследвани животни. Съществува силна тенденция за групиране на плъховете в зависимост от тяхното третиране. Данните от фиг. 7 са допълнително потвърдени от йерархичен клъстерен анализ на тегловните коефициенти на PC1 и PC2. Така демонстрираме формирането на добре обособени групи животни според вида на третирането, основано на промените на допаминава концентрация, параметрите на оксидативния стрес в ипси- и контралатералните локации на кората, и тяхното поведенческо представяне. Нелекуваните паркинсонови плъхове и контролните sham operated животни обособяват двата полюса на спектъра на възстановяване, докато третираните с ЕК животни заемат междинно положение. Това наблюдение, свидетелства за общо подобряване на състоянието на животните, лекувани с ЕК.

V. ОБСЪЖДАНЕ

До момента етиологията на БП остава неясна, но са налице многобройни съобщения предполагащи връзка между ОС и патогенезата на заболяването (Loeffler et al., 2017, Toulorge et al., 2016). Една от основните концепции за патогенезата на БП се фокусира върху образуването на ROS и ролята на ОС, водещ до увреждане на нигростриаталните неврони. Тази патогенетична хипотеза се подкрепя както от предклинични проучвания върху животински модели на БП (Cebrián et al., 2014) така и от обширни *post mortem* проучвания при пациенти с БП, при които се установява нарушение в митохондриална функция, промени в антиоксидантните защитни системи (най-вече супероксид дисмутаза и редуциран глутатион), както и обширно окислително увреждане на липидите, протеините и ДНК (Jenner, 1993). В резултат на различните окислителни реакции при БП и други НДЗ настъпва смърт на невроните (Fortalezas et al., 2010). Много неврохимичните реакции продуцират повишени нива на ROS в мозъка поради високото съдържание на окисляеми

субстрати, изобилие от редокс-активни метали, голяма зависимост от окислителното фосфорилиране в нервните клетки и в същото време оскъдни нива на ендogenous антиоксиданти. Неустойчивите нива на ROS в ЦНС са замесени в патогенезата или прогресията на различни НДЗ (Liu et al., 2017).

Известно е, че мозъкът консумира около 20% от кислорода в целия организъм и голяма част от този кислород бива превърнат в ROS. Тази засилена продукция на ROS в мозъка обяснява съществената роля, която ROS имат в патогенезата на БП. Мозъкът е силно уязвим на оксидативно увреждане орган свързано и с високата му метаболитна активност, изискваща високи концентрации на кислород. Антиоксидантният му капацитет е чувствително по-нисък от този на други органи – едва 10-20% от антиоксидантния капацитет на черния дроб и сърцето (Floyd, 1999). Установено е, че в ЦНС ROS се генерират както в невроните, така и в глията, като основен принос имат митохондриалните ЕТВ. Други източници на ROS включват моноаминоксидаза, NADPH оксидаза и др. Мозъкът съдържа висока концентрация на полиненаситени мастни киселини, които в условия на ОС подхранват процеса на липидно окисление и продукцията на токсични крайни продукти (Pothos et al., 1998). А митохондриите също произвеждат полуредуцирани свободни радикали, супероксид и водороден пероксид, които са причинителите на оксидативен стрес в процеса на дишане (Kirkinetzos et Moraes, 2001).

Голям брой изследвания показват, че най-съществен източник на ROS е самият допаминово метаболитизъм, „подпомогнат“ от ниските нива на GSH и високите нива на желязо и калций в SNPC (de Miranda et Greenamyre, 2017). Допаминовият метаболитизъм води до продукция на реактивни метаболити, които предизвикват последващо окислително увреждане в клетката (Stokes et al., 1999). Клетъчната токсичност в резултат на метаболитизма на допамина се проявява по два начина – 1) производството на реактивни метаболити от ензимния метаболитизъм и 2) автоокисление на молекулата до силно електрофилния допаминхинон (Hastings, 2009). В потвърждение на тази хипотеза са данните от изследване, при което е инжектиран допамин в стриатума на плъхове, което води до значително и дозозависимо увеличение на лезиите (Hastings et al., 1996). Тези лезии са смекчени от едновременното прилагане на GSH, който неутрализира реактивните метаболити. Следователно, приложението на подходящи антиоксиданти е ключов компонент за

забавяне на прогресията на болестта (Hastings et al., 1996; Royt et al., 1997). Окислението на допамин се свързва с митохондриална увреда, олигомеризация на α -синуклеин, активация на NMDA-рецептора и редуцирана протеозомна функция (Pothos et al., 1998).

Използваният в настоящото изследване експериментален модел на БП, предизвикан с невротоксина 6-OHDA при плъхове е добре познат, класически *in vivo* метод, който позволява да се изследват механизмите и потенциалните терапевтични стратегии за лечение на БП. 6-OHDA е високоефективен допаминергичен невротоксин, структурен аналог на допамин и норадреналин. Притежава висок афинитет към няколко катехоламинергични плазмени мембранни транспортери (DAT и NAT, съответно), които го разпознават и поглъщат. В резултат на това се нарушава транспортната система на катехоламините и селективно се генерира ОС и невровъзпаление в базалните ганглии (Cohen et Heikkila, 1974). В допълнение, 6-OHDA е токсичен както на периферно, така и на централно ниво. Въпреки това, тъй като невротоксинът не е в състояние да премине кръвно-мозъчната бариера, неговата токсичност в ЦНС се постига само когато се инжектира директно в мозъка чрез стереотаксична хирургична техника. Невротоксинът причинява селективна и масивна загуба на допаминергични неврони чрез генериране на оксидативен стрес (Blum et al., 2001, Cadet et Brannock, 1998, Glinka et al., 1997, 2004), митохондриална дисфункция (Glinka et Youdim 1995) и невровъзпаление с микроглиално активиране (Fricke et al., 2016). Така индуцираният модел относително надеждно демонстрира също и паркинсоноподобен двигателен дефицит (Bove et Perier, 2012).

Невротоксинът 6-OHDA лесно може да претърпи автоокисление до водороден пероксид и супероксидни радикали, което в крайна сметка води до производството на хидроксилни свободни радикали. В настоящото изследване, инжектирането на 6-OHDA в стриатума води до значително увеличаване на нивата на липидна пероксидация и това е особено изразено в ипсилатералната хемисфера на мозъка. Също така се наблюдават понижени нива на GSH и понижена активност на CAT, както ипсилатерално, така и контралатерално. Наблюдава се и понижение в активността на SOD и GPx, макар и несъществено. Наблюдават се и типичните двигателни смущения в резултат на нигростриаталната увреда.

Третирането на животните с невротоксина 6-OHDA води до едностранното увреждане на нигростриаталната допаминергична система, понижаване в нивата на допамин в стриатума и повишава допаминовите постсинаптични рецептори от същата страна. Тези промени предизвикват функционална и двигателна асиметрия, която може да бъде оценена с помощта на допаминов агонист, какъвто е като апоморфин. Апоморфинът е допаминов агонист, който стимулира и двата типа допаминови рецептори (D1, D2) и следователно може директно да повлияе пресинаптичните и постсинаптичните рецептори. Апоморфинът индуцира въртене, контралатерално на страната на лезията поради стимулирането на D2 рецепторите в денервирания стриатум.

Контралатералните ротации, предизвикани от апоморфин при плъхове с 6-OHDA индуцирана БП са надежден маркер за нигростриатално изчерпване на допамин. В настоящото проучване инжектирането на апоморфин на плъхове в контролната 6-OHDA група причинява значителни контралатерални ротации, което е показател за увреждане на поне 75% от нигростриаталните допаминергични неврони (Ungerstedt, 1971). На 2-ра седмица след прилагане на токсина се регистрират средно 11,95/мин контралатерални ротации. Същата група на седмица 3-та показва 8,6/мин.

Опитните животни претретиран с ЕК показват 85, 35% по-малко ротации към седмица 3-та, което е свидетелство за протективната функция на ЕК, осъществена в условия на 6-OHDA токсичност.

Третирането с невротоксина води също и до увеличаване на броя на паданията от въртящия се лост в минута, регистрирано чрез Rotarod теста. Налице е също и намаляване на латентното време (STL) при теста за пасивно избягване, което говори за налични паметови нарушения, установени в групата, третирана с невротоксина в сравнение с фалшиво оперираните контролни животни.

В sham-operated контролната група не се наблюдават ротации, което е потвърждение на липсата на стриатална лезия. Установените нарушения в поведението на БП плъховете в сравнение с фалшиво оперираните (sham-operated) контролни плъхове верифицира валидността на модела.

Rotarod тест е утвърден поведенчески методи за оценка на уменията за баланс и двигателната координация при плъхове с БП

ЕК предизвиква също и значимо намаляване на броя на паданията в минута при Rotarod теста. Този резултат потвърждава отчетеното подобрене в моторната координация предизвикано от прилагането на ЕК.

При изследване на допаминовите нива в двете хемисфери виждаме, че нивата в контролната и експерименталната група са в корелация с резултатите поведенческите изследвания. Изчерпването на допамин в 6-OHDA групата при плъхове паркинсонизи е добре изразено в сравнение с фалшиво оперираните (sham-operated) контролни плъхове.

При плъховете претретирани с ЕК се наблюдава статистически значимо съхранение на допаминовите нива в сравнение с 6-OHDA контролната група.

В групата, третирана с ЕК се наблюдава 108.9% по-високи нива на допамин ($p < 0.01$, $n = 4$) ипсилатерално и 88.96% контралатерално, спрямо 6-OHDA групата. Ефектът на съхраняване на допаминовите нива е по-изразен ипсилатерално.

В нашето проучване с помощта на този модел бяха оценени няколко параметъра на поведението, както и промени, които са маркери на БП, а именно:

- индуцираното от апоморфин ротационно поведение, което е свързано със степента на загуба на нигростриатен допамин и се счита за „златен стандарт“ за верифициране на 6-OHDA модела на БП (Bove et Perier, 2012);
- Rotarod тест е утвърден поведенчески методи за оценка на уменията за баланс и двигателната координация при плъхове с БП (Monville et al., 2005)
- Тест за пасивно избягване, е използван за оценка на ефективността на обучението и паметта при БП животни.

Ключовата роля на ОС в патогенезата на БП провокират по-нататъшните изследвания в търсене на подходящи антиоксиданти за неутрализиране на окислителните процеси. Обаче, не всички антиоксиданти притежават потенциала да повлияят ОС при БП. Ключов е мултитаргетния механизъм на действие на потенциалния терапевтик, който да съвместява пряко антиоксидантно с други невропротективни механизми. В процеса на търсене, някои антиоксиданти са показали дори обратен ефект. Витамин С, витамин Е и

коензим Q10 не показват добри ефекти за забавяне прогресията на заболяването. Поради тази причина продължава търсенето на синтетични или други природни вещества с широкоспектърна биологична активност и комплексни мултитаргетни механизми за ефективна терапия и/или профилактика на БП (Chandrasekhar et al., 2018, Doaee et al., 2019).

Антиоксидантът ЕК е изследван като нова терапевтична алтернатива за невродегенеративни заболявания като болестта на Алцхаймер (БА) и БП, като е показал ефективност и при депресия, тревожност, исхемия и други неврологични нарушения (Connell et al., 2012, Fujita et al., 2008, Sarkaki et al., 2016). ЕК показва мощен антиоксидантен и протективен ефект при *in vitro* модели на оксидативен стрес (Sarabhai et al., 2013; Gaire et al., 2013; Landette, 2011). Нейната антиоксидантна активност е както с неензимен характер (напр. улавяне на свободни радикали), така и с ензимен характер, изразяващ се в повишаване на експресията на антиоксидантните ензими супероксид дисмутаза, каталаза, глутатион и глутатион пероксидаза (Chao et al., 2009). Неензимният характер на биологичното действие на ЕК е пряко свързано с нейния директен антиоксидантен ефект, който неутрализира вредните ефекти на свободните радикали (ROS), продуцирани в резултат на клетъчния метаболизъм и клетъчния отговор към стресогенни фактори на околната среда.

Установено е, че ЕК притежава мощен антиоксидантен ефект по отношение на токсичността на желязния (II) сулфат върху PC12 клетки - един полезен модел за изучаване на невроналното клетъчно увреждане, причиняващ освен директния, така и индиректен оксидативен стрес и увреда, чрез редуциране на нивата на ендогенния антиоксидант GSH (Palomba et al., 2001). ЕК успява да повлияе експресията и да повиши нивата на GSH и по този начин да осъществи също и индиректно своята антиоксидантна активност. Благодарение на хелиращите си свойства ЕК противодейства и на желязо- и мед-индуцираното образуване на ROS (Muthaiyah et al., 2011; Pavlica et al., 2005).

Приложена като превантивен агент, ЕК оказва протективни ефекти върху кората и хипокампа на плъхове, третирани с TCDD, посредством съществено редуциране на продукцията на супероксидни аниони в тези мозъчни региони, както и чрез индуциране на GSH синтез и стимулиране на активността на GPx (Unkila et al., 1995).

На базата на споменатите комплексни механизми, осъществявани от ЕК, ние допускаме, че наблюдаваните в нашите изследвания изразени протективни свойства на ЕК върху прогресията на БП се дължат на нейния потенциал да противодейства на невроналната смърт, основната патогенетична характеристика на отмирането на нервни клетки при НДЗ.

Известно е, че ОС съчетан с митохондриални дисфункции в мозъка на пациенти с БП, намалява съотношението GSH/GSSG, което се счита за маркер на невровъзпалителните и невродегенеративните явления, възникващи при това заболяване (Bjørklund et al., 2021).

В нашите изследвания потвърдихме, че ЕК повишава глутатионовите нива и вероятно това е свързано с подобряване защитните механизми на клетките, наблюдавано при други модели на заболявания (Barch et Rundhaugen, 1994, Barch et al., 1995, Khanduja et al., 1999, Vattem et Shetty, 2004).

Глутатионовият дефицит е ключов фактор в оксидативния стрес в организма, което от своя страна, играе съществена роля в процесите на стареене, както и в патогенезата на редица заболявания (включително БА, БП, както и други заболявания - чернодробни заболявания, СПИН, рак, инфаркт на миокарда, инсулт диабет и др.) (Wu et al., 2004). Антиоксидантният капацитет на ЕК да увеличава активността на глутатион-S-трансферазата (GST), нивата на изоензимите на GST, както и нивото на GSH е докладван и от други автори (Teel, 1986). В настоящото изследване, оценихме ефекта на ЕК като превантивен агент срещу нигростриатална увреда, предизвикана от невротоксина 6-OHDA. Ефектът на ЕК върху ОС беше оценен чрез неврохимични изследвания на нивата на липидно окисление като маркер за нивото на ОС, както и на нивата на основните маркери на ендогенната антиоксидантна защита – GSH, GPx, SOD и CAT.

В нашите изследвания, подобно на данни от литературата върху други модели на БП, установихме някои общи антиоксидантни механизми във възстановяващия ефект на ЕК върху плъхове с БП (Adams et al., 2001). Според резултатите от настоящето изследване, превантивното третиране с ЕК води до значително намаляване броя на контралатералните ротации съгласно апоморфиновия тест, като най-добър ефект се наблюдава на 3-та седмица след третиране с токсина 6-OHDA.

ЕК предизвиква също и значимо намаляване на броя на паданията в минута при Rotarod теста. Този резултат потвърждава отчетеното подобрене в моторната координация предизвикано от прилагането на ЕК. Животните, третирани с ЕК показват съществено по-нисък брой на контралатералните ротации в минута, сравнено с 6-OHDA контролите. Най-добри показатели при третираните с ЕК са отчетени на седмица 3-та след приложение на токсина - понижение с 85.35%, което свидетелства за убедителния превантивен ефект на ЕК и способността му да предотвратява нигростриатална невронална загуба.

Предишни наши изследвания показаха, че прилагането на ЕК предизвиква понижение с около 17% на допаминовия респейк, което може също да способства за превенция на наблюдаваната двигателна увреда на животните в настоящите изследвания (Tancheva et al., 2018, Aleksandrova et al., 2015).

Наблюдаваната в настоящия опит слаба редуция в телесното тегло на третираните с ЕК плъхове с 16% ($p < 0.05$), докладвана и от други автори (Farbood et al., 2015), може да има връзка с подобрена нервно-мускулна координация на животните установена в тази група.

Особено интересни резултати се получиха при изследване промените в паметта и обучението чрез теста за пасивно избягване (passive avoidance test), където промяната в обучението и паметта се оценява чрез параметъра STL. В нашия експеримент установихме, че ЕК показва подобряващ паметта ефект, който е добре изразен. Известно е, че процесите на обучение и памет зависят предимно от холинергичните неврони в хипокампа, в мозъчната кора и в някои части на неостриатума (Braak et Braak, 1996). Способността на ЕК да регулира когнитивната функция може да се осъществи чрез инхибиране на активността на мозъчната ацетилхолинестераза (AChE) ($IC_{50}=13,79 \mu\text{g/ml}$) и чрез регулиране нивата на ацетилхолина (Pinho et al., 2013), което установихме и в наши предишни опити върху гризачи с експериментална деменция (Aleksandrova et al., 2015).

Предполагаме, че подобрените когнитивни функции на гризачите, третирани с ЕК до голяма степен се дължат на нейния директен антиоксидантен ефект, служещ като щит за биологичните мембрани и предпазвайки ги от оксидативна увреда.

Но освен общите й антиоксидантни механизми на подобрените когнитивни функции на гризачите с експериментална БП, допускаме и някои специфични ефекти на ЕК върху паметта. В предишни наши изследвания установихме подобряващи паметта ефекти на ЕК върху когнитивни нарушения, свързани с други невродегенеративни модели – скополамин-индуцирана деменция и аутизъм, предизвикан с интоксикация с пропионова киселина. Прилагането на ЕК предизвика значително подобрение на паметта, моторната координация и социалното поведение със значително понижение в агресивните прояви, характерни за тази група заболявания (Popatanasov et al., 2016, Aleksandrova et al., 2015).

Известно е, че увреждането и загубата на допаминергични неврони в SNPC водят до понижаване на нивата на допамин в неостриатума, което е в основата на симптомите на БП (Hald et Lotharius, 2005). Нашите резултати показваха, че промените в поведението и моторната координация на плъховете с БП модел корелира с намалени допаминови нива в мозъците на плъховете. Това изчерпване на допамин в стриатума при плъхове паркинсонизи е добре изразено в сравнение с фалшиво оперираните (sham-operated) контролни плъхове.

ЕК възстановява мозъчните допаминови нива в ипсилатералната и контралатералната страна, но очаквано показва латерализация на полукълбото – възстановяващият ефект на ЕК е по-силно изразен в ипсилатералната (увредена) страна на мозъка. Способността на ЕК да превентира нивата на допамин в мозъка към увреждащото въздействие на невротоксина (6-OHDA) дава допълнително силно доказателство относно нейните невропротективни свойства *in vivo*. В предишни наши изследвания върху други невродегенеративни модели наблюдавахме понижение на допаминовия рептейк от ЕК, което може да обясни наблюдаваната превенция на двигателната увреда на животните (Tancheva et al., 2018, Aleksandrova et al., 2015). Нашите данни доказват, че невропротективните, невромодулиращите и подобряващите паметта и обучението ефекти на ЕК са придружени от мощна антиоксидантна активност, което позволява мултитаргетно повлияване на невродегенеративния процес (Tancheva et al. 2018, Aleksandrova et al. 2015).

В настоящия труд ние потвърдихме връзката между невроналната дегенерация в 6-OHDA модел на БП и ОС като основен патогенен фактор в прогресията на това невродегенеративно заболяване (Adams et al., 2001. Sayre et al., 2001). В основата на

неговата невротоксичност лежи окисляването на 6-OHDA чрез молекулен кислород или моноаминоксидаза. Този процес на окисление води до производството на вътреклетъчен H_2O_2 , който се трансформира в силно реактивни хидроксилни радикали. В същото време се понижават нивата на редуцирания GSH, както и активността на супероксид дисмутаза, увеличава се липидната пероксидация и производството на цитотоксични супероксидни свободни радикали (Hritcu et al., 2008). Понижаването на нивата на GSH в SNPC е най-ранният известен индикатор за оксидативен стрес при предсимптомна БП, който предхожда спадането на нивата на допамина (Jenner, 1993).

Нашите резултати установиха повишена липидна пероксидация и намалени нива на редуцирания глутатион в мозъка на плъховете с БП. Тази промяна е налична, както в ипсилатералната, така и в контралатералната хемисфера. В синхрон с резултатите от този *post mortem* анализ, както и допълнително потвърждавайки предклиничната значимост на използвания 6-OHDA модел, ние също наблюдавахме значително понижаване на активността на основните антиоксидантни ензими (SOD, CAT и GPx) при плъховете с БП в сравнение с фалшиво оперираната контролна група.

От настоящите изследвания можем да заключим, че до голяма степен антипаркинсоновият ефект на ЕК се дължи на изразеното ѝ антиоксидантно действие. Тя повишава активността на CAT, като този ефект е по-силно изразен ипсилатерално. Повишената активност на CAT може да се дължи на два механизма:

1) увеличаването на концентрацията на водородния пероксид от SOD задейства ензима CAT

2) ЕК причинява директно активиране на ензима CAT, който катализира токсичния водороден пероксид до вода и кислород (Alfei et al., 2020).

В същото време обаче в нашите експериментални условия не установихме повишаване активността на SOD от ЕК, както се съобщава от Sarkaki et al. (2016) Тази разлика вероятно е свързана с различните условия на проведените експерименти. В нашето изследване ЕК е прилагана превантивно преди лезията, докато в опитите на Sarkaki et al. – ЕК е прилагана след лезията (Sarkaki et al., 2016).

Въз основа на настоящите изследвания, може да твърдим, че ЕК подобрява с висока степен на достоверност мозъчната антиоксидантна защита, което води до намаляване на ОС. Ефектът ѝ е по-силно изразен ипсилатерално, както е наблюдавано и от други автори, но при различни опитни постановки (Sarkaki et al., 2016).

Въз основа на нашите експериментални данни може убедително да предположим, че използването на ЕК, може да допринесе за облекчаване симптомите и за забавяне на прогресията на БП в експериментални условия.

При животински модели на БП е наблюдавана пряка връзка между нивата на оксидативен стрес и функцията на допаминовите неврони. В нашите изследвания използвайки клъстерен анализ за обработка на експерименталните данни установихме пряка зависимост между възстановяването на допаминергичната система и подобряването на нервномускулната координация при плъхове, в следствие на прилагането на ЕК. Намаляването на оксидативния стрес и по-специално липидната пероксидация, пряко корелира с подобрените поведенчески показатели на плъховете, третирани с ЕК, в сравнение с фалшиво оперираните контроли.

За да се разграничат общите от специфичните механизми на неврозащитното действие на ЕК, приложихме възможностите на клъстерния анализ, при който използвахме основните резултати на компонентите, получени от биохимичните данни (допаминовите нива са обобщени заедно с параметрите на ОС в мозъка) както и от наличните поведенчески параметри (двигателна координация и памет и обучение). Клъстерният анализ показва ясно групиране на данните от различните експериментални групи – контролни и експериментални, третирани с ЕК. Анализът позволи да се отличи ясно групата на плъховете с БП чрез 6-OHDA приложение (черни кръгове). Отделен клъстер представляват фалшиво оперираните плъхове, което отчита влиянието на унилатералното приложение на физиологичен разтвор и влиянието на хирургичната интервенция. Ясно различима от предишните две групи е експерименталната група на плъхове с невротоксин, претретирани с ЕК.

Клъстерният анализ ни дава основание убедително да предположим наличието на три основни механизма, свързани с антиоксидантното възстановяване при плъхове с БП:

1) ЕК повишава нивата на допамин в мозъка и намалява липидната пероксидация в увредените области;

2) промените на оксидативния стрес са свързани с поведенческите параметри на гризачите

3) нивата на допамин показват пряка връзка с поведенческото представяне на животните.

Всичко това дава основание да се предполага, че общата антиоксидантна защита при плъхове с БП задейства най-малко три отделни, паралелно протичащи и взаимно допълващи се механизма на възстановяване на ЦНС.

Нелекуваните паркинсонови плъхове и контролните фалшиво оперирани животни обособяват двата полюса на спектъра на възстановяване, докато третираните с ЕК животни заемат междинно положение. Това наблюдение, свидетелства за категорично подобряване на общото състояние на животните, лекувани с ЕК.

Въз основа на използвания клъстерен анализ можем да направим следния основен извод:

ЕК има значим невропротективен ефект при плъхове, третирани с невротоксина 6-OHDA. Налице са ясни доказателства за невропротективните ефекти на ЕК, които ясно се отличават от ефектите при нетретираните животни с БП.

Наблюдаваният антипаркинсоновият ефект на ЕК е свързан с нейната разнообразна и богата биологична активност. Благоприятният ефект на ЕК върху паметта на третираните плъхове, вероятно има и специфичен механизъм. Предполагаме, че той е свързан със специфичните подобряващи паметта ефекти на нейните активни метаболити - уролитини, които лесно проникват през КМБ, наблюдавани при други изследвания (Tomás-Barberán et al., 2016, Cerdá et al., 2003, 2004).

ЕК предизвиква увеличаване на нивата на ацетилхолин (АХ) в холинергичните синапси посредством инхибиране на ацетилхолинестеразата (АХЕ), което допринася за наблюдавания подобряващ паметта ефект. Съгласно наши предишни данни ЕК увеличава нивата на АХ в холинергичните синапси посредством инхибиране на АХЕ, върху друг

невродегенеративен модел /скополаминова деменция при мишки и плъхове (Tancheva et al., 2018, Aleksandrova et al., 2015).

Освен този основен механизъм на антиоксидантно превантивно действие на ЕК при БП за запазване на нигростриаталните неврони от смърт, настоящите данни предполагат и друг вероятен механизъм - невромодулиращо действие на ЕК.

Данните от настоящото изследване демонстрират комплексността на невродегенеративния процес, както и възможността той да бъде повлиян ефективно чрез мулти-таргетен подход на превенция с природни полифеноли с богата биологична активност, каквато е ЕК.

VI. ИЗВОДИ

1. Настоящото изследване показва, че ЕК притежава изразени невропротективни ефекти върху плъхове с модел на унилатерална 6-OHDA индуцирана Болест на Паркинсон.
2. Механизмите на установените защитни ефекти на ЕК върху плъхове с експериментална БП се дължат на многофакторни комплексни механизми, а именно:

- Мощно антиоксидантно действие, което води до стимулиране на естествената антиоксидантната защита и до понижаване на оксидативния стрес в мозъка.
 - Способност на ЕК да увеличава допаминовите нива в мозъка, което води до забавяне прогресията на БП.
3. Установи се селективна способност на ЕК да повлиява предимно увредената хемисфера, където нивата на оксидативния стрес са чувствително по-високи от тези на интактната хемисфера
 4. Значителна промяна в допаминовите нива също е установена ипсилатерално при животните претретиран с ЕК.
 5. Проведеният клъстерен анализ позволи да се интегрират поведенческите и биохимичните данни, което ни дава основание да направим извода, че ЕК съществено забавя прогресията на БП посредством своите комплексни механизми.

VII. ПРИНОСИ

1. За първи път е установено невропротективното действие на ЕК върху унилатерален 6-ОНДА модел на БП при нейното превантивно приложение.
2. Демонстрирахме оригинална пряка корелация между възстановяването на допаминергичната система, антиоксидантния ефект и подобряването на нервномускулната координация при плъхове, вследствие превантивното прилагане на ЕК.

3. За първи път беше установена изразена селективна способност на ЕК да повлиява селективно увредената хемисфера, в сравнение с интактната, което е видно от разликите в променените показатели на ОС и на допаминовите нива в двете хемисфери.
4. Представят се за първи път интегрирани поведенчески и биохимични данни, в подкрепа на заключението, че ЕК проявява едновременно комплексни невропротективни свойства и чрез различни биохимични механизми може да забави прогресията на БП в експериментални условия при плъхове.

VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Публикации в български научни списания или в тематични сборници

1. LP Tancheva, AB Popatanasov, ST Dragomanova, ER Tzvetanova, **SM Aleksandrova**, LG Alova, SM Stefanova, RE Kalfin, 2018, New mechanisms in preventive effect of ellagic acid on cognition in mice with Alzheimer's disease type dementia, Bulg. Chem. Commun 50, 20-24

IF: 0,398 Quartile: Q4

2. **Aleksandrova S**, Alexova R, Tancheva L , Kalfin R, The Anti-COVID19 Potential of Ellagic Acid and The Pomegranate Polyphenols, 2021, Trakia Journal of Sciences,19, 2, 38-44

Публикации в чуждестранни научни списания, в чуждестранни тематични сборници или в наше научно списание с международен статут

1. LP Tancheva, MI Lazarova, AV Alexandrova, ST Dragomanova, F Nicoletti, ER Tzvetanova, YK Hodzhev, RE Kalfin, **SA Miteva**, E Mazzon, NT Tzvetkov, AG Atanasov, Neuroprotective Mechanisms of Three Natural Antioxidants on a Rat Model of Parkinson’s Disease: A Comparative Study, 2020, Antioxidants 9 (1), 49

IF: 7,675 Quartile: Q1

2. **Aleksandrova S**, Alexova R, Dragomanova S, Kalfin R, Nicoletti F, Fagone P, Petralia MC, Mangano K, Tancheva L, Preventive and Therapeutic Effects of Punica granatum L. Polyphenols in Neurological Conditions, Int. J. Mol. Sci. 2023, 24(3), 1856

IF: 6,208 Quartile: Q1

Публикации на доклад в пълен текст в материали от чуждестранно научно мероприятие или в материалите на международно научно мероприятие у нас

1. **S Aleksandrova**, L Tancheva, S Dragomanova, L Alova, M Stefanova, A Georgieva, L Simeonova, E Pavlova, R Kalfin, Preventive effect of ellagic acid on cognitive disorders in two mouse models of oxidative stress (influenza infection and scopolamine-induced dementia), 2015, Amino Acids, (8), 1651-1651

IX. СПИСЪК НА УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **S. A. Aleksandrova**, L. P. Tancheva, Review of pharmacological activities of ellagic acid with focus on central nervous system and antiviral effects, Пета Работна среща на тема: “Експериментални модели и методи в биомедицинските изследвания”, Института по експериментална морфология, патология и антропология с музей, БАН, 7 – 9 април 2014, София, България, участие с доклад

2. **С. Александрова**, Р. Клисуров, Л. Танчева, А. Георгиева, С. Драгоманова, Ефекти на сок от нар (*Punica granatum*, L.), респективно елагова киселина, върху когнитивните функции, VII Национална конференция по хранене, 16-18 май 2014, к.к. Св. Св Константин и Елена, България, участие с доклад
3. Lyubka P. Tancheva, **Simona Aleksandrova**, Almira P. Georgieva, Radoslav Ts. Clisurov, Svetlana M. Stoeva, Lora Simeonova, Elitsa Pavlova, Effects of Ellagic acid on the cognitive functions of mice, VII Национален конгрес по фармакология, 17 – 19 Октомври 2014 Медицински Университет – Плевен, България, участие с доклад
4. Lyubka Tancheva, **Simona Aleksandrova**, Almira Georgieva, Liana Alova, Miroslava Stefanova, Lora Simeonova, Elitsa Pavlova, Reni Kalfin, Preventive effect of ellagic acid on cognitive disorders in two mouse Models of oxidative stress (influenza infection and scopolamine induced dementia)“, 14th International Congress On Amino acids, Peptides and Proteins, проведен на 5-7 август 2015, Виена, Австрия, участие с постер
5. **S. A. Miteva**, L. P. Tancheva, „Pharmacological effects of ellagic acid on central nervous system a review“, 9th Conference on medicinal and aromatic plants of southeast European countries, 26-29 май 2016, Пловдив, България, участие с постер
6. **S. Aleksandrova**, L. Tancheva, S. Dragomanova, L. Alova, M. Stefanova, S. Abarova, B. Tenchov, R. Kalfin, Antioxidant mechanisms in preventive effect of Ellagic Acid on cognitive disorders on experimental model of Alzheimer’s disease, First International Conference on Bio-antioxidants - "Natural bio-antioxidants – as a base for new synthetic drugs and food additives/supplements”, 25-29 юни 2017, участие с постер
7. L. Tancheva, **S. Aleksandrova**, S. Dragomanova, L. Alova, M. Stefanova, S. Abarova, B. Tenchov, R. Kalfin, Preventive effect of Ellagic Acid on cognitive disorders in mouse model of dementia, "Of mice and mental health: facilitating dialogue between basic and clinical neuroscientists", 24-25 Април 2017, Лондон, Великобритания, участие с постер
8. **Simona Miteva**, Elina Tzvetanova, Albena Alexandrova, Lyubka Tancheva, Maria Lazarova, Reni Kalfin, Deepak Singh, Ellagic acid delays progression of neurodegeneration in experimental rodent models, XVIII International Congress of Medical Sciences for Students and Young Doctors, 09-12 May 2019, Sofia, Bulgaria, участие с постер
9. Lyubka Tancheva, Maria Lazarova, **Simona Miteva**, Diamara Uzunova, Albena Alexandrova, Elina Tzvetanova, Almira Georgieva, Reni Kalfin, Ellagic acid alleviates progression of parkinson’s disease in rats with 6-hydroxydopamine model, 4th International Conference on Natural Products Utilization: from Plants to Pharmacy Shelf (ICNPU-2019), 29 May – 01 Jun 2019, Albena, Bulgaria, участие с постер
10. L. Tancheva, R. Kalfin, M. Lazarova, S. Dragomanova, A. Alexandrova, **S. Alexandrova**, E. Tzvetanova, D. Uzunova, H. Staykov, Y. Hodzev, Neuroprotective mechanisms of three bio

antioxidants on experimental neurodegenerative models, Symposium “Bulgarian experience in neurodegenerative diseases”, Ionnio University, Malatia, Turkey, November 2021, участие с доклад

11. **Simona Aleksandrova**, Ralitza Alexova, Lyubka Tancheva, Reni Kalfin, ANTI-COVID19 POTENTIAL OF ELLAGIC ACID AND POMEGRANATE POLYPHENOLS, НАУЧЕН СИМПОЗИУМ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ Събитието е под патронажа на доц. Добри Ярков Ректор на Тракийски университет "COVID 19 – МУЛТИДИСЦИПЛИНАРЕН НАУЧЕН ОБЗОР" 1-2 октомври 2021 г. STARA ZAGORA, участие с доклад
12. Lyubka Tancheva, Stela Dragomanova, **Simona Aleksandrova**, Maria Lazarova, Diamara Uzunova, Elina Tsvetanova, Almira Georgieva, Albena Alexandrova, Simona Alexandrova, Miroslava Stefanova, Hristian Staykov, Yordan Hodzhev, Reni Kalfin, Multi-target strategy using natural compounds for experimental treatment of Alzheimer’s type dementia” INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE BULGARIAN SOCIETY OF PHYSIOLOGICAL SCIENCES, Stara Zagora Mineral Springs, 30 October-1 November 2022, участие с доклад

X. СПИСЪК НА ЦИТИРАНИЯТА НА СТАТИИТЕ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА

Tancheva LP, Popatanasov AB, Dragomanova ST, Tzvetanova ER, **Aleksandrova SM**, Alova LG, Stefanova SM, Kalfin RE, 2018, New mechanisms in preventive effect of ellagic acid on cognition in mice with Alzheimer's disease type dementia, Bulg. Chem. Commun 50, 20-24

- Tancheva LP, Lazarova MI, Alexandrova AV, Dragomanova ST, Nicoletti F, Tzvetanova ER, Hodzhev YK, Kalfin RE, Miteva SA, Mazzon E, Tzvetkov NT. Neuroprotective mechanisms of three natural antioxidants on a rat model of parkinson's disease: A comparative study. *Antioxidants*. 2020 Jan 6;9(1):49.
- Abd El-Aziz NM, Awad OM, Shehata MG, El-Sohaimy SA. Antioxidant and anti-acetylcholinesterase potential of artichoke phenolic compounds. *Food Bioscience*. 2021 Jun 1;41:101006.
- El-Aziz A, Mohammad N, Shehata MG, Alsulami T, Badr AN, Elbakatoshy MR, Ali HS, El-Sohaimy SA. Characterization of Orange Peel Extract and Its Potential Protective Effect against Aluminum Chloride-Induced Alzheimer's Disease. *Pharmaceuticals*. 2023 Jan;16(1):12.
- Dragomanova S, Pavlov S, Marinova D, Hodzev Y, Petralia MC, Fagone P, Nicoletti F, Lazarova M, Tzvetanova E, Alexandrova A, Kalfin R. Neuroprotective Effects of Myrtenal in an Experimental Model of Dementia Induced in Rats. *Antioxidants*. 2022 Feb 12;11(2):374.
- Tancheva L, Lazarova M, Velkova L, Dolashki A, Uzunova D, Minchev B, Petkova-Kirova P, Hassanova Y, Gavrilova P, Tasheva K, Taseva T. Beneficial Effects of Snail Helix aspersa Extract in an Experimental Model of Alzheimer's Type Dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*.(Preprint):1-21.
- Aleksandrova S, Alexova R, Tancheva L, Kalfin R. THE ANTI-COVID19 POTENTIAL OF THE ELLAGIC ACID AND THE POMEGRANATE POLYPHENOLS. *Trakia Journal of Sciences*. 2021;19(2):38-44.

Tancheva LP, Lazarova MI, Alexandrova AV, Dragomanova ST, Nicoletti F, Tzvetanova ER, Hodzhev YK, Kalfin RE, **Miteva SA**, Mazzon E, Tzvetkov NT, Atanasov AG, Neuroprotective Mechanisms of Three Natural Antioxidants on a Rat Model of Parkinson's Disease: A Comparative Study, 2020, *Antioxidants* 9 (1), 49

- Bjørklund G, Peana M, Maes M, Dadar M, Severin B. The glutathione system in Parkinson's disease and its progression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2021 Jan 1;120:470-8.
- Dragomanova S, Miteva S, Nicoletti F, Mangano K, Fagone P, Pricoco S, Staykov H, Tancheva L. Therapeutic potential of alpha-lipoic acid in viral infections, including COVID-19. *Antioxidants*. 2021 Aug 16;10(8):1294.

- Kurakula M, Naveen N R, Patel B, Manne R, Patel DB. Preparation, optimization and evaluation of chitosan-based avanafil nanocomplex utilizing antioxidants for enhanced neuroprotective effect on PC12 cells. *Gels*. 2021 Jul 16;7(3):96.
- Tóth F, Cseh EK, Vécsei L. Natural molecules and neuroprotection: Kynurenic acid, pantethine and α -lipoic acid. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Jan 2;22(1):403.
- Balakrishnan R, Azam S, Cho DY, Su-Kim I, Choi DK. Natural phytochemicals as novel therapeutic strategies to prevent and treat Parkinson's disease: current knowledge and future perspectives. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021 May 25;2021.
- Singla RK, De R, Efferth T, Mezzetti B, Uddin MS, Ntie-Kang F, Wang D, Schultz F, Kharat KR, Devkota HP, Battino M. The International Natural Product Sciences Taskforce (INPST) and the power of Twitter networking exemplified through# INPST hashtag analysis. *Phytomedicine*. 2023 Jan 1;108:154520.
- Ardah MT, Bharathan G, Kitada T, Haque ME. Ellagic acid prevents dopamine neuron degeneration from oxidative stress and neuroinflammation in MPTP model of Parkinson's disease. *Biomolecules*. 2020 Nov 6;10(11):1519.
- Kujawska M, Jourdes M, Witucki Ł, Karaźniewicz-Łada M, Szulc M, Górka A, Mikołajczak PL, Teissedre PL, Jodynis-Liebert J. Pomegranate juice ameliorates dopamine release and behavioral deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Sciences*. 2021 Aug 25;11(9):1127.
- Panda SP, Prasanth DS, Gorla US, Dewanjee S. Interlinked role of ASN, TDP-43 and Miro1 with parkinopathy: Focus on targeted approach against neuropathy in parkinsonism. *Ageing Research Reviews*. 2022 Nov 9:101783.
- Zhu H, Yan Y, Jiang Y, Meng X. Ellagic Acid and Its Anti-Aging Effects on Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Sep 19;23(18):10937.
- Wu X, Ren Y, Wen Y, Lu S, Li H, Yu H, Li W, Zou F. Deacetylation of ZKSCAN3 by SIRT1 induces autophagy and protects SN4741 cells against MPP⁺-induced oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2022 Mar 1;181:82-97.
- Banc R, Rusu ME, Filip L, Popa DS. The Impact of Ellagitannins and Their Metabolites through Gut Microbiome on the Gut Health and Brain Wellness within the Gut–Brain Axis. *Foods*. 2023 Jan 6;12(2):270.
- Dragomanova S, Lazarova M, Munkuev A, Suslov E, Volcho K, Salakhutdinov N, Bibi A, Reynisson J, Tzvetanova E, Alexandrova A, Georgieva A. New Myrtenal–Adamantane Conjugates Alleviate Alzheimer's-Type Dementia in Rat Model. *Molecules*. 2022 Aug 25;27(17):5456.
- Wei W, Cheng B, He D, Zhao Y, Qin X, Cai Q, Zhang N, Chu X, Shi S, Zhang F. Identification of Human Brain Proteins for Bitter-Sweet Taste Perception: A Joint Proteome-Wide and Transcriptome-Wide Association Study. *Nutrients*. 2022 May 23;14(10):2177.
- Xu K, Zhang C, Li M, Gong S, Zhang Y, Wang X, Wang Z, Wang S. A myrtenal-based colorimetric and fluorescent probe for reversibly monitoring alkaline pH and bioimaging in living

cells and zebrafish. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2022 Sep 1;430:113962.

- Elmazoglu Z, Galván-Arzate S, Aschner M, Rangel-López E, Bayraktar O, Santamaría A, Karasu Ç. Redox-active phytoconstituents ameliorate cell damage and inflammation in rat hippocampal neurons exposed to hyperglycemia+ A β 1-42 peptide. *Neurochemistry International*. 2021 May 1;145:104993.
- Akefe IO, Adegoke VA, Lamidi IY, Ameh MP, Idoga ES, Ubah SA, Ajayi IE. Myrtenal mitigates streptozotocin-induced spatial memory deficit via improving oxido inflammatory, cholinergic and neurotransmitter functions in mice. *Current Research in Pharmacology and Drug Discovery*. 2022 Jan 1;3:100106.
- Dragomanova S, Pavlov S, Marinova D, Hodzev Y, Petralia MC, Fagone P, Nicoletti F, Lazarova M, Tzvetanova E, Alexandrova A, Kalfin R. Neuroprotective Effects of Myrtenal in an Experimental Model of Dementia Induced in Rats. *Antioxidants*. 2022 Feb 12;11(2):374.
- Tancheva L, Lazarova M, Velkova L, Dolashki A, Uzunova D, Minchev B, Petkova-Kirova P, Hassanova Y, Gavrilova P, Tasheva K, Taseva T. Beneficial Effects of Snail *Helix aspersa* Extract in an Experimental Model of Alzheimer's Type Dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*.(Preprint):1-21.
- Manne R, Patel DB. Preparation, Optimization and Evaluation of Chitosan-Based Avanafil Nanocomplex Utilizing Antioxidants for Enhanced Neuroprotective Effect on PC12 Cells. *Gels* 2021, 7, 96.