

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ

Bulgarian Academy of Sciences



ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ



Д-р ЕЛЕОНОРА НИКОЛАЕВА ЕНЧЕВА

**Невропсихофармакологични проучвания
на новосинтезирани L-валинови пептидомиметици
върху гризачи със синдром на социална изолация**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователната и научна степен „Доктор”

Научен ръководител: Доц.д-р Любка Танчева

София, 2015



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
Институт по Невробиология



Д-р ЕЛЕОНОРА НИКОЛАЕВА ЕНЧЕВА

**Невропсихофармакологични проучвания
на новосинтезирани L-валинови пептидомиметици
върху гризачи със синдром на социална изолация**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”

Професионално направление: 7.1. Медицина

Научна специалност: “Фармакология”

Научен ръководител: Доц. д-р Любка Танчева

Официални рецензенти:

Проф. д-р Ирен Белчева, д.м., д.м.н., ИНБ-БАН

Проф. д-р Красимира Якимова, д.м., д.м.н., МУ-София

София, 2015

Дисертационният труд се състои от 159 стандартни страници, 31 фигури, 9 таблици и 9 схеми. Списъкът с цитирана литература включва 274 заглавия.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на разширено заседание на научния семинар в Института по невробиология – БАН, състоял се на 01 октомври, 2015 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 10.11.2015 г. от 13.30 часа в заседателната зала на Института по невробиология при БАН, ул. “Акад. Г. Бончев”, бл. 23, ет. 2, на открито заседание на Научното жури в състав:

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Ирен Белчева, дм, дмн (рецензия)
2. Доц. д-р Любка Танчева (становище)

Външни членове:

3. Проф. д-р Красимира Якимова, дм, дмн (рецензия)
4. Проф. д-р Христофор Дишовски, дм, дмн (становище)
5. Проф. д-р Любомир Везенков, дхн (становище)

Материалите по защитата са на разположение в канцеларията на Института по невробиология на БАН, ул. “Акад. Г. Бончев”, бл. 23, ет.2, стая № 213.

СЪДЪРЖАНИЕ

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ	4
ВЪВЕДЕНИЕ	5
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	6
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	7
IV. РЕЗУЛТАТИ	11
4.1. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ГРУПОВО ОТГЛЕЖДАНИ МИШКИ	11
4.2. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ГРУПОВО ОТГЛЕЖДАНИ WISTAR ПЛЪХОВЕ.....	15
4.3. ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА L-ВАЛИНОВИТЕ ПЕПТИДОМИМЕТИЦИ ВЪРХУ ПРОМЕНЕНИТЕ ПАМЕТОВИ ФУНКЦИИ НА ГРИЗАЧИ ВСЛЕДСТВИЕ НА ДЪЛГОСРОЧНА СОЦИАЛНА ИЗОЛАЦИЯ	18
A.1. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ МИШКИ.....	18
A.2. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ПЛЪХОВЕ	22
B. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ МЛАДИ МЪЖКИ И ЖЕНСКИ ПЛЪХОВЕ СЛЕД МАЙЧИНА ДЕПРИВАЦИЯ В КОМБИНАЦИЯ СЪС СОЦИАЛНА ИЗОЛАЦИЯ	24
4.4. БИОХИМИЧНИ КОРЕЛАТИ НА КОГНИТИВНИТЕ ПРОМЕНИ В МОЗЪЧНИ СТРУКТУРИ У ГРИЗАЧИ – ПРОМЕНИ ПОД ВЛИЯНИЕ НА М-6 И Р-6	28
V. ОБСЪЖДАНЕ	31
5.1. ЕФЕКТИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПЕПТИДОМИМЕТИЦИ ВЪРХУ ПОВЕДЕНИЕТО НА ГРУПОВО ОТГЛЕЖДАНИ МИШКИ	31
5.2. ПОВЕДЕНЧЕСКИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ГРУПОВО ОТГЛЕЖДАНИ WISTAR ПЛЪХОВЕ	33
5.3. ЕФЕКТИ НА L-ВАЛИНОВИТЕ ПЕПТИДОМИМЕТИЦИ ВЪРХУ ГРИЗАЧИ С ДЪЛГОСРОЧНА СОЦИАЛНА ИЗОЛАЦИЯ	35
5.3. A.1. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ МИШКИ.....	35
5.3. A.2. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ПЛЪХОВЕ	38
5.3. B. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ МЛАДИ МЪЖКИ И ЖЕНСКИ ПЛЪХОВЕ СЛЕД МАЙЧИНА ДЕПРИВАЦИЯ В КОМБИНАЦИЯ СЪС СОЦИАЛНА ИЗОЛАЦИЯ.....	40
5.4. БИОХИМИЧНИ КОРЕЛАТИ НА КОГНИТИВНИТЕ ПРОМЕНИ В МОЗЪЧНИ СТРУКТУРИ У ГРИЗАЧИ – ПРОМЕНИ ОТ М-6 И Р-6.	43
VI. ИЗВОДИ.....	48
VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	49
VIII. ПРИЛОЖЕНИЯ	50
IX. БЛАГОДАРНОСТИ	52

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

APB (BCAA)	-	Аминокиселина (-и) с разклонена верига /Branched-chain aminoacid(s)/
БА	-	Биологична активност
ЛМЕС	-	Лекарство-метаболизиращи ензимни системи
МАО	-	Моноамино оксидаза
ПИ	-	Протеазни инхибитори
ПМ	-	Пептидомиметик / пептидомиметици
СИ	-	Социална изолация
ХС	-	Химична структура
ЦНС	-	Централна нервна система
ACh	-	Ацетилхолин
ANOVA	-	Analysis of Variance, дисперсионен анализ
Df	-	Degrees of freedom, степени на свобода
F	-	Коефициент на Fisher
G-PCR	-	G-protein coupled receptors – метаботропни
i.p.	-	интраперитонеално въвеждане
IUPAC	-	Международен съюз за чиста и приложна химия
L-Trp	-	L-триптофан
L-Val	-	L- валин
Log P	-	коефициентът на разпределение на веществата в системата n-октанол/вода, представен чрез десетичен логаритъм
P	-	Значимост
QSAR	-	Анализ на количествените зависимости между ХС на веществата и тяхната БА
SD	-	стандартно отклонение
SEM	-	стандартна грешка на средната стойност
TCA	-	трициклични антидепресанти
5-HT	-	5- hydroxy-tryptamine (серотонин)

ВЪВЕДЕНИЕ

Създаването на нови високо ефективни и селективни медикаменти днес изисква съвместните усилия и партньорство между съвременната експериментална невропсихофармакология и модерната пептидомиметична химия. Подобен интердисциплинарен подход дава възможност за разкриването на детайли за връзката между невромедиаторните взаимоотношения и поведенческите характеристики, както и на потенциала за фармакологична модулация на нарушените паметови функции и техните биохимични корелати при разработването на потенциални лекарства.

Обект на нашите изследвания са два новосинтезирани пептидомиметика, представители на т. нар. гелообразуватели с ниска молекулна маса. Те са производни на аминокиселината L-валин и никотиновата, респ. изоникотиновата киселина. Синтезирани са от д-р Даниела Цекова от ХТМУ-София, катедра органична химия, съвместно с колектив от Университета в гр. Кастельон, Испания (проф. Хуан Миравет и Беатриу Ескудер) [Tsekova et al., 2009]. В първите години след синтезите им, този тип съединения бяха изучавани предимно и само като гелообразуватели, поради специфичната им способност да се самоорганизират в разтвори. Уникална е способността им, въпреки че са нискомолекулни съединения, да образуват надмолекулни комплекси на базата на водородни връзки, и дори в разтвори с много ниски концентрации да се самоорганизират в подредени структури, често формирайки гелове [Tsekova et al., 2008]. Интересът към подобни гелове напоследък е голям, тъй като те намират все по-широко приложение в бита, например в козметиката (кремове, шампоани, пасти за зъби), и е много важно да са безвредни и нетоксични. От медико-биологична гледна точка, любопитен факт е, че производните, с които ние работим, не са използвани до сега в лекарствения синтез. При синтезирането на веществата е използвана класическата стратегия за включване на ендегенни вещества в молекулата, която не е нова, и е била ползотворна при създаването на цели групи лекарствени средства (напр. антиметаболитите, хормонални средства, противотуморни и др.).

Валинът, като есенциална АРВ, е важна за нервната система, и е с доказани невропротективни свойства, което е едно от основанията за включването му в молекулата на новите съединения. Другото основание е, че присъствието на функционални групи на никотиновата и изоникотиновата киселина, също ще допринесе за по-изявени биологични активности, за което свидетелстват множество литературни данни за сходни вещества. Подкрепя в тази посока са и нашите собствени предварителни изследвания *ин витро* и *ин vivo* [Tantcheva L. et al., 2005; 2006; Tsekova et al., 2008].

Отдавна е известно влиянието на социалните фактори върху невроналната пластичност и върху познавателните функции на хора и на животни, което е установено с наблюдения върху деца аутисти, възрастни хора с деменции и др. Често бедната откъм комуникация и взаимопомощ социална среда е свързана с развитието на агресивните и депресивни състояния, както в ранна, така и в по-късна възраст.

Много от промените в мозъка на морфологично и неврохимично ниво са специфични и са описани в литературата като синдром на СИ. Все още обаче текат оживени дискусии относно недоизяснени механизми на нарушената невротрансмисия и промените в паметови функции при СИ. А сложното взаимодействие между социалния и фармакологичния фактор при хора и животни все още предстои да бъде изяснено. Именно в тази насока, ние задълбочихме изследванията си, използвайки комбинирани експериментални модели на социална изолация с майчина депривация. Известно е, че ранната и по-късна майчина депривация у гризачи, съчетана с последвала социална изолация, води до нарушения в поведението на животните и може да служи като аналог на разстроено нервнo-психическо развитие при човека (например при деца, изоставени в институции). С помощта на подобни модели могат да бъдат оценени прогностично възможностите за превенция и фармакологична модулация на нарушените паметови функции при животни и хора, под влияние на социални фактори.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия дисертационен труд беше да се проучат, чрез различни психофармакологични методи, ефектите на два нови L-валинови пептидомиметика върху обучителните и паметови процеси на гризачи със синдром на социална изолация, и върху промените в някои невромедиатори в мозък на агресивни плъхове и мишки.

За изпълнение на тази цел си поставихме следните **задачи**:

1. Да се изследват промените в двигателната координация, ориентировъчното поведение, обучението и паметта след еднократно и многократно третиране с М-6 и Р-6.
2. Да се проучат ефектите на М-6 и Р-6 върху процесите на обучение и запаметяване на половозрели мъжки мишки и плъхове със синдром на социална изолация.
3. Да се проучат ефектите на М-6 върху процесите на обучение и запаметяване при ранна социална изолация, съчетана с майчина депривация на млади мъжки и женски плъхове (на 21^{-ви} ден след раждането им).
4. Да се проучи дали има паралел между промените в паметта и някои техни биохимични корелати в мозъчни структури след третиране с М-6 и Р-6:
 - 4.1. Изследване на промените в нивата на серотонин (стимулирано освобождаване и обратно поемане) в цял мозък на агресивни мишки, и в хипокамп на агресивни плъхове под влияние на М-6 и Р-6.
 - 4.2. Проучване на ефектите на М-6 и Р-6 върху стимулираното освобождаване на белязан ацетилхолин в хипокамп на агресивни плъхове

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. *Експериментални животни*

Одобрението на комисията по етика към Института по Невробиология на БАН и на Комисията по етика на научните изследвания в Медицинския университет в София (КЕНИМУС протокол № 61/2011г), бяха получени преди началото на експериментите.

Опитите бяха проведени върху 120 бели половозрели ICR мъжки мишки с тегло 22-24 g, и върху 120 мъжки половозрели бели плъхове порода Wistar с тегло 180-200 g. Част от експериментите бяха проведени и върху 24 млади мъжки Wistar плъхове, 24 млади женски Wistar плъхове и 6 бременни Wistar плъхове. Животните бяха доставяни от експерименталната развъдна база за опитни животни на БАН (ЕРБОЖ Сливница).

Една част (30 броя) от плъховете бяха отглеждани групово по 8-10 броя в полипропиленови клетки, а друга част (90 броя) плъхове бяха отглеждани в социална изолация в индивидуални кафези, с оглед развитието на агресивно поведение. По същия начин бяха отглеждани групово и в условия на социална изолация, и половозрели мъжки мишки.

Животните бяха със свободен достъп на вода и храна (гранулирана, стандартна) при постоянна стайна температура $22 \pm 2^\circ\text{C}$, с регулиран цикъл на осветление: 12 часа светлина/12 часа тъмнина.

2. *Използвани фармакологични средства - непептидни L-Валинови пептидомиметици:*

М-6: [N,N'-Бис(N-никотиноил-L-валил)-диаминохексан]

Р-6: [N,N'-Бис(N-изоникотиноил-L-валил)-диаминохексан]

И двата непептидни L-Валинови пептидомиметика при всички експериментални постановки бяха прилагани интраперитонеално (i.p.), в обем 0.1 мл/10g т.м. за мишки и 1 мл/100g т.м. за плъхове. При еднократното въвеждане бяха прилагани в ефективни дози - 125 мг/кг; 250 мг/кг и 1000 мг/кг i.p., а при тридневното въвеждане бяха прилагани в дози 150 мг/кг, 125 мг/кг или 100 мг/кг i.p. (въз основа на изследванията на Г. Карамукова [2005] и Р. Гогова [2007]).

3. *Експериментални модели на социална изолация*

А.) Социална изолация (СИ) в половозряла възраст с последващо развитие на синдром на СИ, респ. на агресивно поведение у мишки и плъхове

Б.) Майчина депривация (на 21 ден от раждането), съчетана или не, със СИ на млади плъхове от двата пола.

3.1. *Експериментален модел на агресия при мишки чрез социална изолация – вътревидова агресия*

Половозрели мъжки мишки бяха отглеждани през зимно-пролетния сезон (януари, февруари, март, април), в индивидуални кафези с непрозрачни стени с размери 37x20x17 см. в продължение на 6 седмици по метода на Yen [Yen et al., 1959] отглеждани при 22-25 °C и редуващ се 12/12-часов цикъл "светло-тъмно", при свободен достъп до вода и храна.

След този период, мишките бяха тествани за вътревидова агресивност, като бяха поставяни по три в клетка и в продължение на 5 минути беше отчитано поведението им по скалата за агресивно поведение на Valzelli [1971].

3.2. *Експериментален модел на агресия при плъхове чрез социална изолация – междувидова агресия*

Мъжки плъхове порода Wistar, с тегло 180-200 гр. в началото на експеримента, бяха отглеждани в индивидуални кафези с непрозрачни стени с размери 37 x 20 x 17 см. в продължение на три месеца (Valzelli 1981) при стандартни лабораторни условия - 22-25 °C и редуващ се 12/12-часов цикъл “светло-тъмно”, храна и вода *ad libitum*. След три месеца изолирано отглежданите плъхове бяха тествани за междувидова агресивност - интактна бяла мишка ICR се поставя в клетката на всеки изолиран плъх и поведението на животните се наблюдава 15 минути. Може да се прояви два вида поведение - агресивно и неагресивно. При изолираните агресивни плъхове агресивната реакция е прегриване на гръбначния стълб на мишката - плъхове мишеубийци (mouse-killing, muricide). При изолираните неагресивни плъхове поведението към мишката е или индиферентно или «приятелско».

Други група плъхове бяха отглеждани групово по 8 бр. в клетка (50x36x17cm) при същите лабораторни условия. Всички плъхове предварително бяха тествани за агресивно поведение, с цел ако проявят спонтанна агресивност, тези животни да бъдат изключени от експериментите.

Полово зрелите мъжки Wistar-плъхове, развили агресивно поведение след социална изолация бяха третирани със съединенията в повтарящи се дози (100 мг/кг телесно тегло дневно, *i.p.*, в продължение на 3 дни) - едната група от шест животни получаваха вещество М-6, а другата група – неговия изомер – вещество Р-6. Контролните агресивни животни и контролните колективни животни се инжектираха с разтворител (1 мл /100g т.м., *i.p.*) в същия обем.

3.3. *Експериментален модел на ранна социална изолация с майчина депривация (лишаване от майката след отбиване на 21-ви ден от раждането).*

Млади мъжки и женски Wistar плъхове с майчина депривация, т.е. лишени от майката след отбиване на 21-ви ден от раждането, бяха отглеждани изолирани в клетки за 6 седмици (n=24) (Valzelli, 1978). Друга част от животните (n=24) бяха отглеждани групово, разделени в две групи по полов признак - женски и мъжки плъхове (2 x 6 женски и 2 x 6 мъжки плъха) при същите стандартни лабораторни условия и време. Групово отглежданите млади плъхчета от двата пола, отделени от майката на 21-вия ден след раждането, бяха разпределени в 4 групи, по 6 животни в група: група контролни мъжки, група контролни женски плъхчета, третирани с разтворител в същия обем, (1 мл/100 g т.м) *i.p.*, и две групи от двата пола третирани с М-6 плъхчета (150 мг/кг *i.p.*)

Проведените при разработването на дисертационния труд опити най-общо могат да бъдат разделени на две групи - поведенчески експерименти на интактни животни след третиране с разтворител/изследваните вещества, и **биохимични изследвания с белязани по третий невромедиатори** – върху отделени цял мозък на мишки и хипокамп на плъхове с агресия след дългосрочна социална изолация.

4. *Поведенчески методи*

След първоначално обучение на първия час след последно третиране, както и на 24-тия час, бяха изследвани във всички групи промените в двигателна координация, изследователско поведение (Hole board тест), както и в процеси на обучението и паметта (Step-through тест), като така отчитахме ефектите върху краткосрочната памет (24^{ти} час) и дългосрочната памет (седмица след проведеното обучение).

4.1. *Тестове за нервно-мускулна координация:*

Метод за определяне на двигателната координация у мишки

* **String тест**, или “Traction reflex test” представлява модификация на horizontal bar теста [Deacon, 2013] където гредата може да стигне 1 см в диаметър, докато тук е заместена с опъната жица, за която мишката се захваща и балансира с помощта и на опашката си.

Метод за определяне на двигателна координация у мишки и плъхове

* **Rota-rod тест** – въртяща се ос – [Dunham, Miya, 1957] При тестовите за нервно-мускулна координация, животните бяха тествани за двигателна координация на Rota rod 1 час след третирането, а при тридневното прилагане на веществата, на 24^{-ти} час и на 7^{-ми} ден след последното третиране. Мускулният тонус се изследваше на 7^{-мия} ден след тридневно третиране.

4.2. Метод за определяне на ориентировъчно поведение

Хол-борд тест, от англ.: **”Hole-board”** - дъска с дупки. (Boissier и Simon, [1962])

4.3. Методи за определяне степента и динамиката на обучението и запаметяването

Метод за обучение за пасивно избягване при мишки - Step-down

Изследванията бяха проведени по метода на Stein и съавт.[1975]. Степента на запаметяване се определяше според престоя в секунди върху платформата.

Метод за обучение за пасивно избягване при плъхове -”Step-through” - тест за еднопосочно пасивно избягване, (Bures и Bureshova [1991]).

Веществата (разтворител +/- пептидомиметик) бяха въвеждани 1 час преди обучението. Използваният метод при мишки е както при плъхове. При еднократното третиране тестът за памет се провеждаше на 1 час и 24^{-ти} час след обучението. Степента на запаметяване се отчиташе като засичахме латентното време (секунди на престой) в светлия сектор на апарата.

5. Сепарационни методи и методи за изследване невромедиатори

Изследването в мозъчни структури на някои биохимични корелати на паметовите функции след третиране с пептидомиметиците М-6 и Р-6, се извърши с белязани по тритий невромедиатори, за установяване промени в невротрансмисията на 5-НТ и АCh.

Отделяне цял мозък на мишка и на плъх и дисекция с отделяне на хипокамп на плъх - **Метод за изолиране на отделни мозъчни структури на плъх [Valzelli & Garrattini, 1969].**

МЕТОДИ ЗА ИЗСЛЕДВАНЕ НЕВРОМЕДИАТОРИ:

Метод за освобождаването на белязани по тритий невромедиатори от срезове на хипокамп

Животните (мъжки плъхове, порода Wistar) с тегло около 180 г, бяха декапитирани на 24^{-ия} час след последното третиране със съединенията. Мозъкът се отстраняваше върху лед и хипокампът се сепарираше. Нарязваше се на срезове с дебелина 0.33 мм с помощта на специален автоматичен нож McIlwain™ Chopper. Срезове бяха инкубирани в 2 мл среда (разтвор на Кребс), съдържаща съответния белязан с тритий невромедиатор с определена концентрация. Инкубирането продължаваше определено време за всеки изотоп.

◇ **Освобождаване на [³H]-5-НТ от цял мозък на мишка и от срезове на хипокамп на плъх (Stancheva et al., 2008)**

◇ **Освобождаване на [³H]-ACh от срезове на хипокамп на плъх (Milusheva et al., 1994)**

Обработка на резултатите от измерванията.

Абсолютната величина на отделената радиоактивност се измерваше в брой разпади в секунда за 1 грам тъкан (Bq/g). Изчисляваше се *Fractional release*, който представлява радиоактивността на определена фракция, изразена като процент от общото радиоактивно съдържание на препарата в началото на съответната колекция. Изчисленията се извършваха с помощта на Microsoft Excel.

Ефектите на веществата върху базалното ниво на освобождаване на невромедиатора се изразяваха чрез отношението R_2/R_1 , а върху евокираното (стимулирано) освобождаване - като S . С R_2 и R_1 се обозначават средните стойности на спонтанното освобождаване, измерено в две фракции: следваща (R_2) и предхождаща (R_1) стимулацията; S - стойностите на фракционното освобождаване на невромедиатора, получено в резултат на химическата (за освобождаване на [^3H]-5-НТ) или електрическа ([^3H]-АCh) стимулация.

Метод за оценка на обратно поемане на [^3H]-5-НТ в хипокампадни синаптозони.

Експерименталните животни се декапитираха също на 24-ия час след последното третиране със съединенията, а след това мозъкът се отстраняваше на студено върху лед и хипокампа отляво и отдясно бе отделен. Целият мозък на мишки, или съотв. сепарирани хипокампи на плъховете се хомогенизираха, центрофугираха и инкубираха с белязан по тритий серотонин. Синаптозомалният [^3H]-5-НТ се измерва в pmol/min/mg протеин $\pm$ SEM, съгласно метода на Lai [Lai et al., 1980]. Съдържанието на протеин в утайката се измерваше по метода на Lowry с говежди серумен албумин като стандарт [Lowry et al., 1951].

6. *Статистически методи*

Получените данни за изследваните показатели на социално изолирани животни бяха сравнени с референтните стойности на контролните животни, които са били отглеждани в група и инжектирани само с разтворител. Данните са изразени като средна стойност и стандартна грешка (**MEAN $\pm$ SEM**); за достоверни се считаха разликите при ниво на значимост $p < 0.05$.

Експерименталните резултати бяха анализирани със статистически софтуер SPSS 11.0 за Windows, с който бе проведена one-way ANOVA и многофакторна ANOVA от смесен тип, както и Student-Fisher T – тест. При наличие на повече на брой сравнения е приложена корекция за множествени сравнения по Bonferroni (Field, 2009), а когато допускането за сферичност на данните е нарушено, е използвана корекция на Greenhouse-Geisser (Field, 2009).

При еднофакторните ANOVA анализи, когато е спазено допускането за хомогенност на дисперсията (сходно по големина разсейване на данните), за post hoc test е използван метода на Tuckey (Field, 2009). Когато това условие е нарушено, е използван теста на Games Howell (Field, 2009).

IV. РЕЗУЛТАТИ

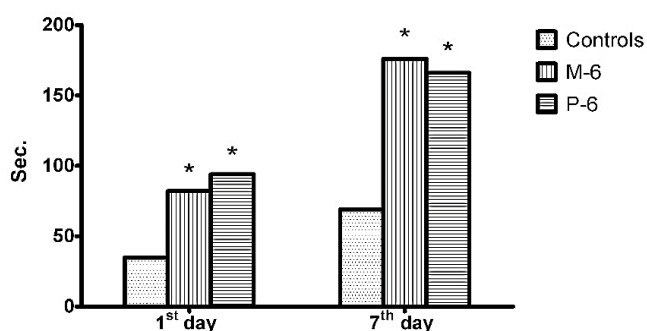
4.1. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ГРУПОВО ОТГЛЕЖДАНИ МИШКИ

1. Ефекти на М-6 и Р-6 върху двигателната координация и мускулния тонус на мишки (*Rota-rod* и *String mecme*)

Ефектите на М-6 и на Р-6 върху моторната координация бяха проследени 60 минути след еднократно i.p. въвеждане в доза 250 мг/кг. Ефектите на М-6 и на Р-6 върху двигателната координация бяха проследени и след тридневно i.p. инжектиране на веществата (в ежедневни дози от 125 мг/кг, сутрин, по едно и също време) на първия и на седмия ден след последното инжектиране.

На първия час след еднократно третиране на мишките с веществата М-6 и Р-6 липсваха промени в нервно-мускулната координация на животните (Вещество $F_{(1,25)} = 1.2$, $p > 0.1$).

На 24^{-тия} час след тридневно третиране обаче, третираните с М-6 и Р-6 животни показват статистически значимо удължаване на времето, изразено в секунди, за което мишките се задържат върху въртящата се ос (*Rota-rod*) без да падат, спрямо контролните животни (Вещество, $F_{(1,25)} = 5.29$, $p < 0.05$). ANOVA показва още, че този модел на въздействие на М-6 и Р-6 се затвърждава, и дори засилва на 7^{-мия} ден (Вещество, $F_{(1,25)} = 5.29$, $p < 0.05$).

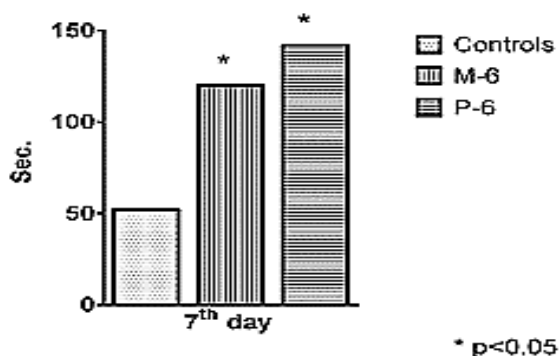


Фиг. 1. Ефекти на М-6 (125 мг/кг т.м., i.p., 3 дни) и Р-6 (125мг/кг т.м., i.p., 3 дни), на 1^{-ви} и 7^{-ми} ден върху времето (секунди) за задържане на мишките върху въртящия се лост (*Rota-rod* тест)

* $p < 0.05$

Допълнителната еднофакторна ANOVA оценява ефекта на веществата върху мускулния

тонус на животните след тридневното инжектиране, изследван на седмия ден след последното третиране (*String mecme*). ANOVA показва значим ефект на фактора Вещество ($F_{(1,25)} = 8.3$; $p \leq 0.01$), като Post-hoc тестът показва, че М-6 и Р-6 достоверно удължават времето на задържане върху жицата на 7^{-мия} ден ($p \leq 0.05$), в сравнение с контролите, третирани с *Ol. Helianthi*.

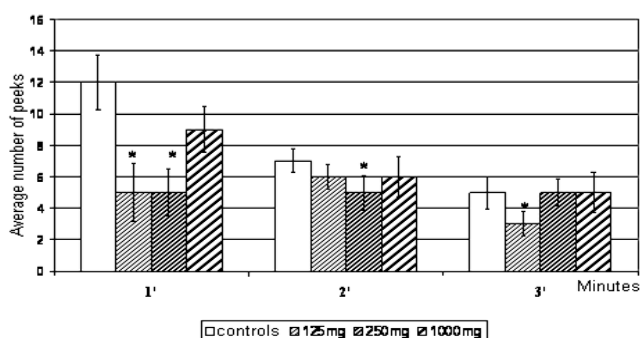


Фиг. 2. Ефекти на М-6 (125 мг/кг) и Р-6 (125мг/кг), въведени i.p. три поредни дни, и тествани за мускулен тонус на 7^{-ми} ден след последното третиране. Ордината: секунди, за които мишките се задържат върху жицата

* $p < 0.05$

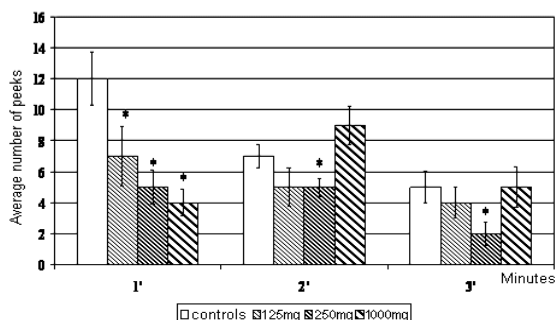
2. Ефекти на М-6 и Р-6 върху ориентировъчното поведение на мишки (Hole-board тест)

Ефектите на М-6 и на Р-6 (еднократно прилагане в дози 125, 250 и 1000 мг/кг т.м.) върху изследователската активност са изследвани в два паралелни ANOVA анализа (Виж раздел Методи, т. 7.2). Данните са получени на следващия ден (ретенционен тест) 24 часа след първоначалното обучение на животните (поставянето им в хол-борда с цел запознаването им с Hole-board теста). Анализът на данните с ANOVA показва, че на първа минута животните, третирани с М-6 в дози 125 и 250мг/кг т.м. показват значимо понижаване на изследователската активност спрямо контролите и инжектираните животни с доза 1000мг /кг т.м. ($F_{(2,26)} = 4.53$, $p < 0.05$). Това наблюдение се подкрепя от значимата интеракция Доза X Време ($F_{(4,52)} = 3.37$, $p < 0.05$). За 2' това понижение се запазва значимо само за групата мишки, инжектирани с доза 250 мг/кг т.м. ($F_{(2,26)} = 5.56$, $p < 0.05$), а на третата минута животните, инжектирани със 125 мг/кг т.м., показват най-ниска изследователска активност. С времето като цяло изследователската активност спада (Фиг. 3, Време, $F_{(2,26)} = 14.34$, $p < 0.001$).



Фиг. 3. Ефекти на М-6 (в дози 125мг/250 мг/1000мг/kg) на 1^{-ви} ден върху броя на надничанията в дупките на hole-board за всяка минута поотделно в продължение на 3-минутно наблюдение.

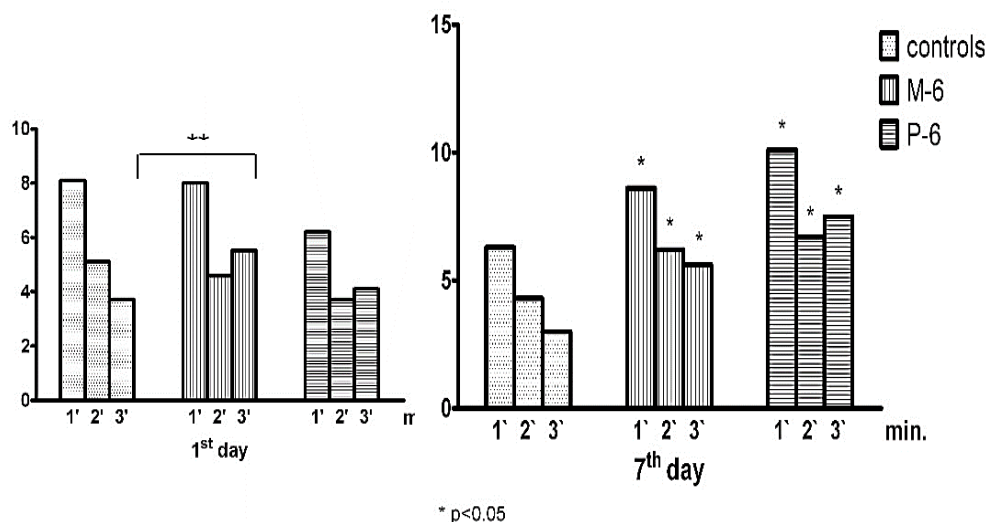
ANOVA показва, че на първа минута животните, третирани с дози 125 и 250 и 1000мг/кг т.м. от изомера Р-6, показват значимо понижаване на изследователската активност спрямо контролите ($F_{(2,26)} = 8.19$, $p < 0.05$). Това наблюдение се подкрепя от значимата интеракция Доза X Време ($F_{(4,52)} = 3.4$, $p < 0.05$). За 2' и 3' това понижение се запазва значимо само за групата мишки, инжектирани с доза 250 мг /кг т.м. ($F_{(2, 26)} = 6.97$, $p < 0.05$). С времето като цяло изследователската активност бележи спад, с изключение на групата мишки, третирани с 1000 мг/кг, където на втора минута има повишен брой надничания в дупките на дъската, докато на първа - значително понижен спрямо контролите (Фиг. 4, Време, $F_{(2,26)} = 19.23$, $p < 0.001$).



Фиг. 4. Ефекти на Р-6 (в дози 125мг/250 мг/1000мг/kg) на 1^{-ви} ден след третирането върху броя на надничанията в дупките на hole-board за всяка минута поотделно в продължение на 3-минутно наблюдение.

Ефекти на М-6 и Р-6 при многократно прилагане (125 мг i.p., 3 дни) върху ориентировъчното поведение на мишки

Ефектите на М-6 и на Р-6 върху ориентировъчното поведение са отчетени на първия и седмия ден като ретенционни тестове след първоначалното обучение на животните.



Фиг. 5. Ефекти на М-6 (125 мг i.p., 3 дни) и Р-6 (125 мг i.p., 3 дни) върху броя на надничанията в дупките на hole-board за всяка минута поотделно в продължение на 3-минутно наблюдение, на 1^{-ви} и 7^{-ми} ден след последно третиране.

Анализът на данните с ANOVA показва, че на първия ретенционен тест за памет третираните с М-6 мишки не се отличават значимо по изследователска активност, в сравнение с контролните животни в първите две от изследваните три минути от теста (Вещество, $F_{(2,18)} = 0.89$, $p > 0.1$). На третата минута обаче, се наблюдава значимо повишение на изследователската активност на М-6 животните спрямо контролите (Фигура 5; $F_{(2,18)} = 7.12$, $p < 0.01$). На седмия ден се наблюдава значимо повишение на изследователското поведение на животните, третирани с М-6 спрямо контролите (Вещество X Ден на теста ($F_{(4,26)} = 3.67$, $p < 0.05$, Вещество, $F_{(2,18)} = 4.98-7.13$, $p < 0.05$). При анализ на данните за животните, третирани с Р-6, се установи, че на първия ден на теста значимо се понижава изследователската активност спрямо контролите - в първата и втората минута (Вещество, $F_{(2,18)} = 5.12-8.32$, $p < 0.05$). На третата минута липсва значим ефект на веществото (Вещество, $F_{(2,18)} = 1.18$, $p > 0.05$). На седмия ден изследователското поведение на третираните с Р-6 животни значимо нараства спрямо контролите (Вещество X Ден на теста ($F_{(4,36)} = 7.23$, $p < 0.05$, Вещество, $F_{(1,18)} = 6.73-16.34$, $p < 0.01-0.05$).

3. Ефекти на М-6 и Р-6 върху обучителните и паметовите процеси

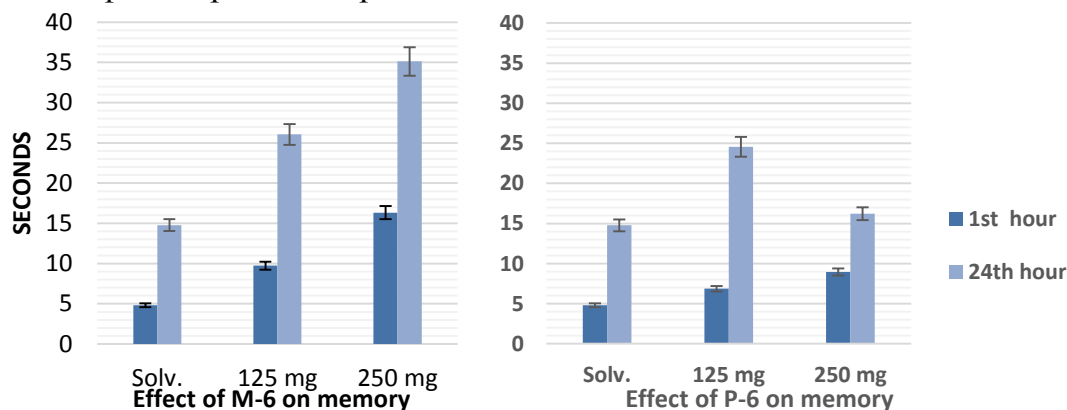
3.1. Ефекти при еднократно прилагане на веществата на мъжки бели мишки (Step down тест)

Фигура 6 са представени ефектите на М-6 (а), и на Р-6 (б) върху паметта (1 и 24 часа след обучението), след еднократно приложение на веществата в различни дози (125 мг/кг т.м. и 250 мг/кг т.м.).

При животните, третирани с М-6 се прояви по-силен ефект в сравнение с тези, третирани с Р-6, който е значим при по-ниската доза на М-6 (125 мг/кг т.м.). Същото се наблюдава и на втория ретенционен тест за памет (24^{-ти} час).

Пуснати бяха паралелни анализи с еднофакторна ANOVA, която изследва ефекта на веществата в две различни дози върху паметта на животните след еднократно инжектиране, спрямо контроли, на първи час след третирането (отделно); както и 24 часа след третирането с цел изследване запамятаването. Анализът на данните с ANOVA показва значим ефект на фактора вещество ($F_{(1,25)} = 8.3$; $p \leq 0.01$), както на първия, така и на 24-тия час за вещество М-6. Post-hoc тестът показва, че М-6 и Р-6

достоверно удължават времето на престой върху платформата на Step-down апарата, като ефектът е по-силен при М-6, и е пропорционален на дозата. Изомерът Р-6 също има значим ефект на 24-тия час в доза от 125 мг/кг. По-високата доза (250 мг/кг т.м) няма значим ефект спрямо контролите.



Фиг.6. Ефекти на М-6 (а) и Р-6(б), в дози 125 мг/кг и 250 мг/кг (еднократно i.p.) върху времето (sec) на престой върху платформата 1 час и 24 часа след обучение (Step-down тест)

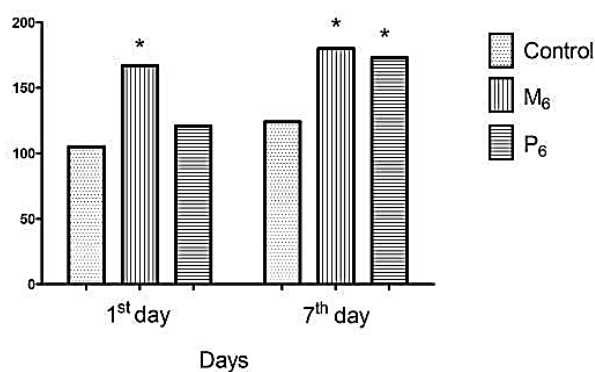
Налице е по-изразен подобряващ ефект на вещество М-6 върху паметта, който е дозозависим ($p < 0,05$). Вещество Р-6 е по-ефективно в по-ниската изследвана доза (125 мг/кг т. т).

3.2. Ефекти на М-6 и Р-6 върху паметовите функции на мъжки бели мишки след тридневното им прилагане

Обучението се провеждаше на третия ден, 60 минути след последното въвеждане на веществото, а ретенционните тестове за памет – на 24^{-тия} час и на 7^{-мия} ден след обучението. Съединението М-6 показва подобряващ ефект върху паметта на мишки, след тридневно прилагане в ефективни дози всяка сутрин по едно и също време.

На 24^{-тия} час след последно инжектиране третираните с М-6 и Р-6 животни показват удължаване на времето, изразено в секунди, за което мишките се задържат в светлата част на апарата Step-through спрямо контролните животни, което е статистически значимо само за третираните с М-6 животни (Вещество $F_{(1,25)} = 5.29$, $p < 0.05$). ANOVA показва още, че този модел на въздействие на М-6 и Р-6 се затвърждава и подчертава на 7^{-мия} ден, включвайки значимост на фактор Вещество и за Р-6, освен за М-6 (Вещество, $F_{(1,25)} = 4.32$, $p < 0.05$).

За разлика от М-6, изомер Р-6 показва статистически значим ефект само на 7^{-мия} ден от обучението (Фиг. 7).



Фиг. 7. Ефекти на М-6 (125 мг/т.т) и Р-6 (125 мг/т.т), инжектирани i.p., 3 дни, на мъжки мишки върху латентното време при тестовите за памет на 1^{-ви} и 7^{-ми} ден (Step-through). По ординатата – Step through латенция в секунди; $n = 10$; * $p < 0.05$ – достоверност спрямо контролната група.

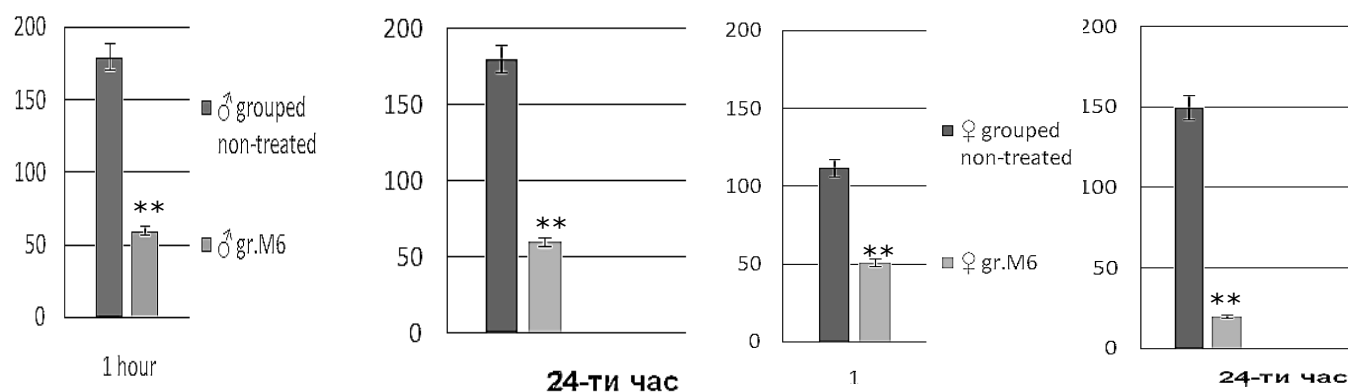
* $p < 0.05$

4.2. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ГРУПОВО ОТГЛЕЖДАНИ WISTAR ПЛЪХОВЕ

4.2.1. Ефект на М-6 върху нервно-мускулната координация (Rota-rod тест) на групово отглеждани плъхове от двата пола

Тестът за нервно-мускулна координация показва недвусмислено потискащия ефект на веществото върху моториката и баланса, при двата пола групови животни (Фиг.8а и 8б). Съгласно проведения статистически анализ – ANOVA със смесен дизайн и фактори: Вещество (М-6 /Разтворител) x Пол(Мъжки/Женски) x Време на тестиране(1-ви /24-ти час), е налице двукратно понижаване на двигателната координация на третираните спрямо контролните животни - както при мъжки (Третиране, $F_{(1,16)} = 8.93$, $p < 0.01$), така и при женски плъхове (Третиране, $F_{(1,18)} = 14.91$, $p < 0.001$) – Фигура 8.

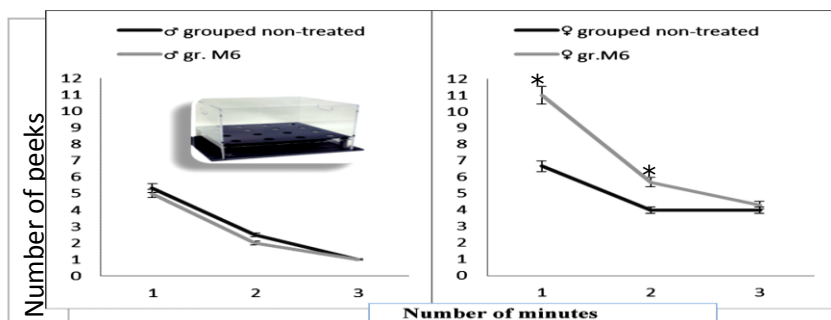
Ефектът на М-6 върху двигателната координация показва зависимост от пола (Вещес//тво x Пол, $F_{(2, 26)} = 7.3$, $p < 0.05$; Вещество x Пол x Време $F_{(4, 52)} = 5.23$, $p < 0.05$). Налице е специфично само при женските плъхове по-силно изразено понижение на времето за задържане върху въртящата се ос на 24^{-ия} час след третирането (понижение със 75 %), в сравнение с 1^{-ия} час (понижение с 50%).



Фиг. 8а) Ефекти на М-6 върху времето на задържане върху въртящ се лост в секунди при мъжки групово отглеждани Wistar-плъхове на 1^{-ви} и 24^{-ти} час след тридневно третиране с М-6/разтворител (Rota-rod тест) и 8б) у женски Wistar-плъхове на 1^{-ви} и 24^{-ти} час след тридневно третиране с М-6 или само с разтворител

4.2.2. Ефекти на М-6 върху ориентировъчното поведение на мъжки и женски Wistar-плъхове (Hole-board)

На Фигура 9 е представена разликата в ефектите на М-6 при мъжки и женски животни. При провеждане на Hole-board тест се наблюдава повишена изследователска активност само при женските плъхове. Ефектът е изразен на първата минута, по-слабо на втората, а на третата минута той вече е незначим (Табл.3). Според направената статистическа обработка на данните с многофакторна ANOVA (смесен дизайн, Табл.4), и тук имаме ясно изразен ефект на третирането с веществото, който е зависим от пола на животните ($F = 10.65$, $p < 0.05$).



Фиг. 9. Брой на надничанията в дупките на hole-board за всяка минута поотделно в продължение на 3-минутно наблюдение) у групово отглеждани мъжки и женски плъхове, на 24^{-ти} час след последното третиране с пептидомиметик М-6 (125 мг/т.т., i.p.) / разтворител

Значимото взаимодействие между факторите време, пол и третиране с веществото (Табл.3) показва, че ефектът на пептидомиметик М-6 е силно зависим от пола на животните, и е дори още по-силно изявен в зависимост от изследваните минути, (фактор време) от Hole-board теста.

Таблица 3. Резултати от ANOVA (смесен дизайн) за данните от Hole-board теста. Значимост на Факторите Време (1' спрямо 2' спрямо 3' минута) X Пол X Третиране.

Фактори и Взаимодействия	Df	F	Значимост
Време от теста (1', 2', 3)	2,80	1731.00	p<0.001
Пол	1,40	808.91	p<0.001
Третиране с М-6	1,40	135.87	p<0.001
Време X Пол	2,80	4.000	p<0.05
Време X Третиране с М-6	2,80	19.75	p<0.001
Пол X Третиране с М-6	1,40	10.65	p<0.01
Време X Пол X Третиране с М-6	2,80	19.75	p<0.001

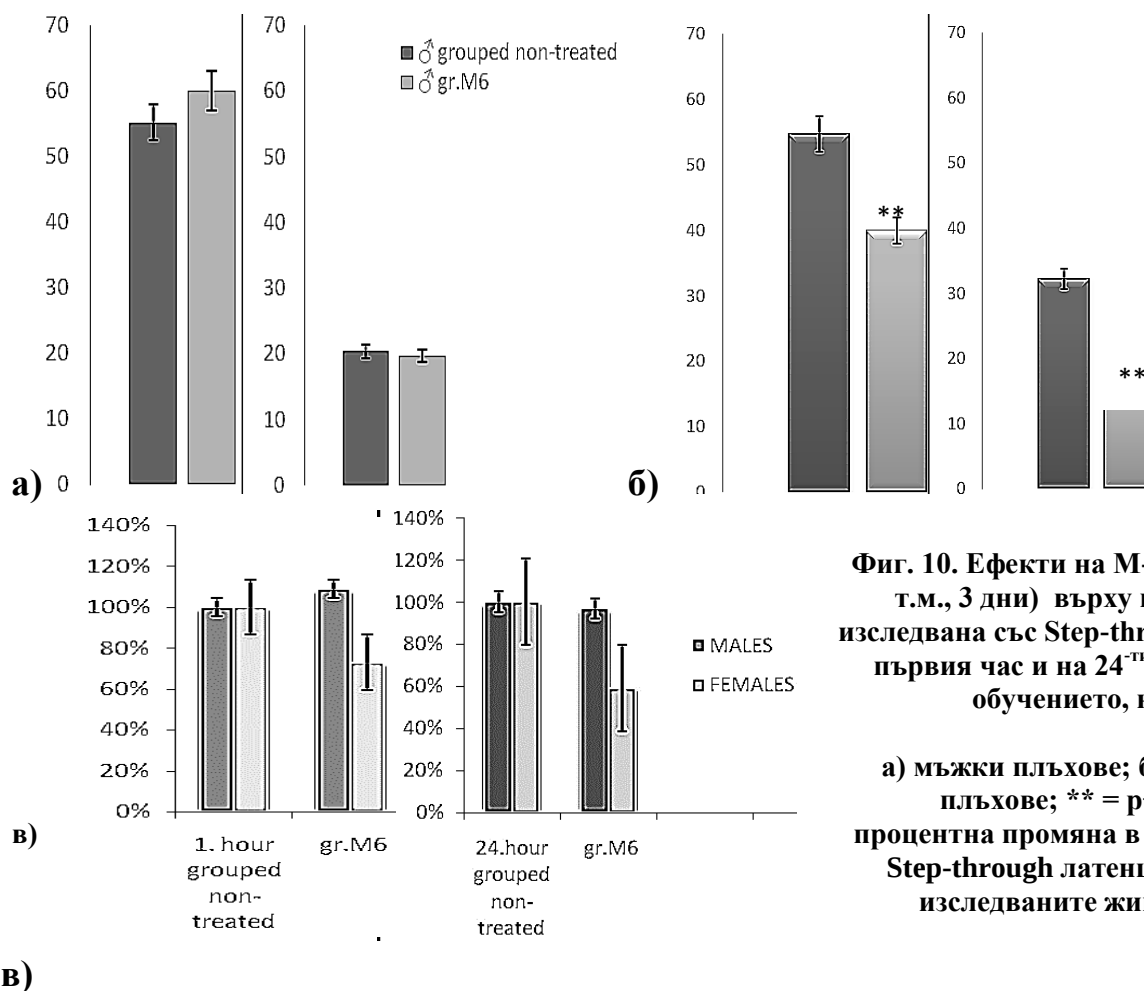
4.2.3. Ефекти на вещество М-6 върху паметовите функции на млади половоз-зрели плъхове Wistar от двата пола спрямо контроли

Резултатите от Step-through теста са представени за мъжките (фиг.10а) и за женските (фиг. 10б) плъхове. На първия час след обучението имаме по-добро представяне спрямо 24^{-ия} час, както е видно на фигурата. Мъжките помнят по-добре от женските животни.

Третирането с М-6 намалява времето на престой на светло на женските животни (Фиг. 10б). При женските плъхове се наблюдава и най-силен ефект на 24^{-ти} час, в сравнение с мъжките плъхове.

От направената статистическа обработка на данните с ANOVA, (mixed design) - Табл.4, е видно, че факторът пол влияе значимо върху ефекта от третирането на животните ($F=9.64$; $p<0,05$). Анализът с ANOVA демонстрира, че за третираните с пептидомиметика женски плъхове имаме понижаване на паметовите показатели, в сравнение с мъжките (на 1^{-ви} и на 24^{-ти} час). Не се отчита статистически значим ефект на М-6 върху паметта на мъжките животни, нито на първия, нито на 24^{-тия} час (Фиг. 10а, Третиране, $F_{(1,40)} < 1$; $p > 0.05$).

Значимото взаимодействие между факторите време, пол и третиране с веществото (Таблица 4) показва, че ефектът на пептидомиметик М-6 е силно зависим от пола на животните, и е по-силно изявен на 24^{-тия} час след обучение.



Фиг. 10. Ефекти на М-6 (150мг/кг т.м., 3 дни) върху паметта, изследвана със Step-through тест на първия час и на 24-тия час след обучението, на:

а) мъжки плъхове; б) женски плъхове; ** = $p < 0,01$ процентна промяна в паметта (в Step-through латенцията) на изследваните животни;

Таблица 4. Резултати от ANOVA (смесен дизайн) за данните от Step-through теста
Значимост на Факторите Време (час на ретенционния тест за памет) X Пол X Третиране.

Взаимодействия	Df	F	Значимост
Време (час)	1,40	1421.31	$p < 0.001$
Пол	1,40	362.17	$p < 0.001$
Третиране с М-6	1,40	13.53	$p < 0,01$
Време X Пол	1,40	48.28	$p < 0.001$
Време X Третиране с М-6	1,40	28.33	$p < 0.001$
Пол X Третиране с М-6	1,40	3.095	$p = 0.086$
Време X Пол X Третиране с М-6	1,40	9.640	$p < 0.01$

4.3. ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА L-ВАЛИНОВИТЕ ПЕПТИДОМИМЕТИЦИ ВЪРХУ ПРОМЕНЕНИТЕ ПАМЕТОВИ ФУНКЦИИ НА ГРИЗАЧИ ВСЛЕДСТВИЕ НА ДЪЛГОСРОЧНА СОЦИАЛНА ИЗОЛАЦИЯ

А.1. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ МИШКИ

4.3.1.1. Влияние на социалната изолация и ефекти на М-6 и Р-6 върху нервно-мускулната координация и мускулния тонус на мишки (Rota-rod и String тестове)

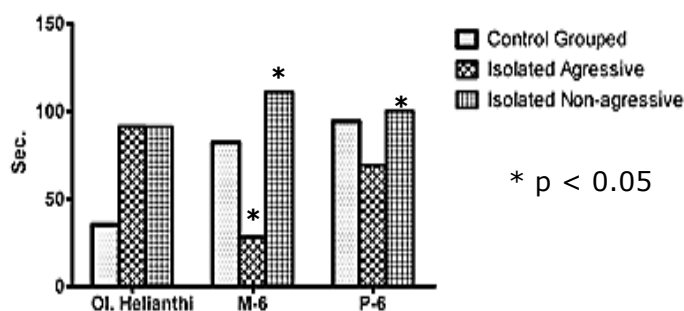
Контролните животни, третирани само с разтворител за 3 дни (Фиг. 11) и тествани за двигателна координация (Rota-rod) на 24-тия час след последното третиране, показват статистически значимо удължаване на времето, изразено в секунди, за което мишките се задържат върху въртящата се ос без да падат (Изоляция, $F_{(2,27)} = 4.87$, $p < 0.05$). Това важи в еднаква степен за изолираните мишки проявили агресия и тези без агресивно поведение. Данните са обработени статистически с двуфакторна ANOVA: Вещество (М-6/Р-6/Разтворител) x Агресивно поведение (+/-).

ANOVA анализът показва достоверен ефект за М-6, въвеждан в доза 125 мг/т.м., в продължение на 3 дни върху нервно-мускулната координация (Rota-rod) на агресивните мишки (Вещество X Агресивно поведение (+) $F_{(2,27)} = 3.97$; $p < 0.05$). Сравненията с Post-hoc теста показаха, че М-6 значително понижава времето на задържане върху въртящия се лост, спрямо контролните агресивни мишки ($p < 0.05$).

ANOVA за ефекта на М-6 при неагресивните мишки, показва също значим ефект на веществото (Вещество X Агресивно поведение (-), $F_{(4, 54)} = 3.26$; $p < 0.05$). Сравнявайки ефекта на М-6 върху неагресивните мишки с този на контролните неагресивни, се установи, че М-6 удължава времето за задържане на мишката върху въртящия се лост ($p < 0.05$), т.е. ефект, противоположен на този при агресивните (Фиг.11).

ANOVA анализът показва достоверен ефект също за Р-6, въвеждан в доза 125 мг/т.м., в продължение на 3 дни върху нервно-мускулната координация (Rota-rod) на агресивните мишки (Вещество X Агресивно поведение (+) $F_{(2,27)} = 4.97$; $p < 0.05$). Сравненията с Post-hoc теста показаха, че Р-6 понижава времето на задържане върху въртящия се лост, спрямо контролните агресивни мишки (Вещество X Агресивно поведение (-), $F_{(4, 54)} = 3.26$; $p < 0.05$).

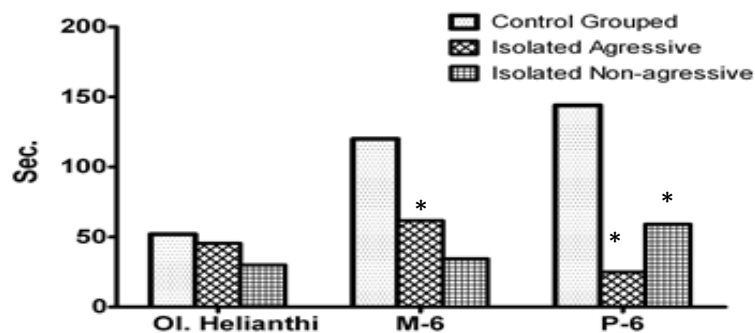
Сравнявайки ефекта на Р-6 върху неагресивните мишки с този на контролните неагресивни, се установи, че Р-6 няма значим ефект върху времето за задържане на мишката върху въртящия се лост ($p > 0.1$)(Фиг.11).



Фиг.11. Ефекти на М-6 и Р-6 (3 дни, i.p., 125 мг/кг т.м.) върху времето на задържане в секунди върху въртящ се лост на социално изолирани и групово отглеждани мишки

На Фигура 12 са представени промените в мускулния тонус (на 7-мия ден след третото от тридневните третираня) изследван със String тест,

показателите на който у социално изолираните контроли по данни от ANOVA бе значимо понижен спрямо груповите контроли (Изоляция, $F_{(2,27)} = 7.15$, $p < 0.01$; Post hoc тест < 0.01)



Фиг. 12. Ефекти на М-6 и Р-6(125 мг/кг за 3 дни, i.p.), върху времето на задържане (секунди) по жицата на изолирани агресивни, изолирани неагресивни и групово отглеждани мишки String тест); * $p < 0.05$ - достоверност спрямо съответната контролна група

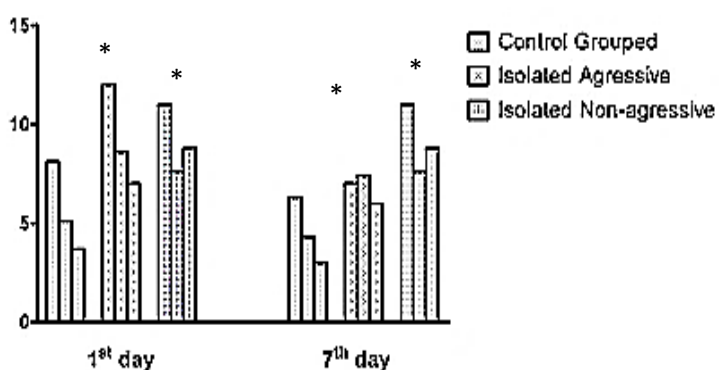
Значима промяна във времето на задържане по данни от ANOVA има при агресивните мишки, третирани с М-6, спрямо агресивните контроли - то нараства, както демонстрира post hoc тестът (Вещество X Агресивно поведение (+), $F_{(2,27)} = 5.34$, $p < 0.05$).

ANOVA анализът за ефект на М-6 върху времето на задържане на жицата (в сек.) показва липса на значимост при неагресивните мишки (Вещество, $F_{(2,27)} = 3.78$, $p > 0.05$). Резултатите у агресивните мишки, третирани с Р-6, анализирани с ANOVA и post hoc тест, показват статистически значимо намаляване на времето за задържане на String теста, в сравнение със съответните контроли (Вещество X Агресивно поведение (+) $F_{(2,27)} = 5.11$, $p < 0.05$).

Времето на задържане на изолираните неагресивни животни, третирани с Вещество Р-6 върху жицата се увеличава в сравнение с неагресивните контроли (Вещество X Агресивно поведение (-), $F_{(2,28)} = 9.89$ $p < 0.05$).

4.3.1.2. Ефекти на М-6 и Р-6 върху ориентировъчното поведение на социално изолирани мишки (Hole-board тест)

Влиянието на социалната изолация върху ориентировъчното поведение на изолирани контролни мишки, проучено с Hole-board теста, е представено на Фигура 13. Изолираните агресивни, изолираните неагресивни и групово отглежданите животни бяха третирани с разтворителя на веществата Ol.Helianthi в продължение на 3 дни.



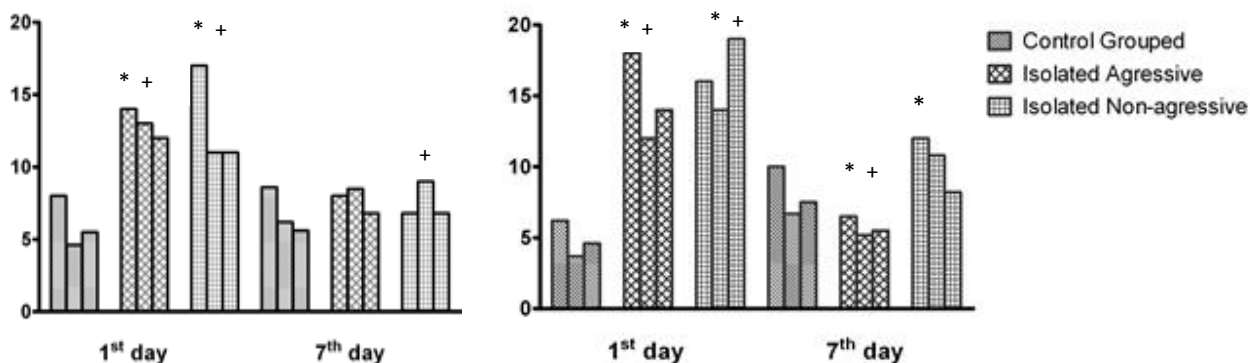
Фиг. 13. Ефекти на социалната изолация върху броя на надничанията в дупките на Hole-board за всяка минута поотделно в продължение на 3-мин. наблюдение, на 1^{-ви} и 7^{-ми} ден след последно третиране с Ol.Helianthi; * $p < 0.05$ спрямо контролните групово отглеждани мишки

На първия ден контролните изолирани мишки (агресивни и неагресивни), след тридневно

инжектиране с разтворител показаха увеличен брой надничания на теста, в сравнение с групово отглежданите контроли ($p < 0.05$).

На 7^{-ми} ден ANOVA за броя на надничанията в дупките показва достоверност за фактора „Агресивно поведение“. При post-hoc сравненията се установи, че агресивните мишки имат като цяло намален брой надничания на теста спрямо изолираните неагресивни (Агресивно поведение (+) X ден на изследване, $F_{(4,82)} = 3.6$, $p < 0.05$). По-голям брой надничания на седмия ден демонстрират неагресивните мишки – в сравнение с другите

две групи контроли (Изоляция X Агресивно поведение (-) X Ден на изследване $F = 3.76$; $p < 0.05$ - Фиг. 13).



а) б)
Фиг. 14. Ефекти на социалната изолация върху броя на надничанията в дупките на hole-board за всяка минута поотделно от 3-минутно наблюдение, на 1^{-ви} и 7^{-ми} ден след 3 дни i.p. прилагане на М-6 (а) и на Р-6 (б); * $p < 0.05$ спрямо контроли изолирани животни от Фиг.13; * $p < 0.05$ спрямо групови контроли, третираните със съответното вещество

В първата минута от първия ретенционен тест, третираните с М-6 (125 мг/кг т.м., i.p., 3 дни) изолирани неагресивни мишки се отличават със значимо повишение броя на надничанията, както спрямо груповите контроли, така и спрямо третираните с разтворител изолирани агресивни мишки /Агресивно поведение (-) X Вещество X Време от теста (1', 2', 3'); $F_{(3,86)} = 3.82$; $p < 0.05$ /. Анализът на сумарния брой надничания в рамките на трите минути на теста с ANOVA, показва значимост за фактора вещество, както спрямо груповите контроли ($p < 0.05$), така и спрямо съответните изолирани контроли (Фиг.13 и 14).

На 7^{-мия} ден липсва статистически значима разлика в броя надничания на теста между групите изследвани животни /Изоляция (+/-) X Агресивно поведение (+/-) $F_{(3,86)} = 0.51$; $p > 0.1$). Третираните с М-6 неагресивни мишки се отличават с намален брой надничания на 7^{-мия} ден, в сравнение с техните неагресивни контроли (третираните само с разтворител, фиг.13).

При изследване ефекта на Р-6 върху изследователското поведение на мишките се установи, че на първия ден има статистически значимо увеличение на броя надничания в дупките на Hole-board, както спрямо контролите групови животни, третираните с Р-6, така и спрямо контролите агресивни и неагресивни изолирани мишки (Фиг. 14 и 13).

На седми ден третираните с Р-6 агресивни животни, имат статистически значимо понижен брой надничания, както спрямо контроли групово-отглеждани мишки, така и спрямо агресивните контроли (Ден от изследване X Вещество X Агресивно поведение (+) $F_{(2,86)} = 3.90$; $p < 0.01$).

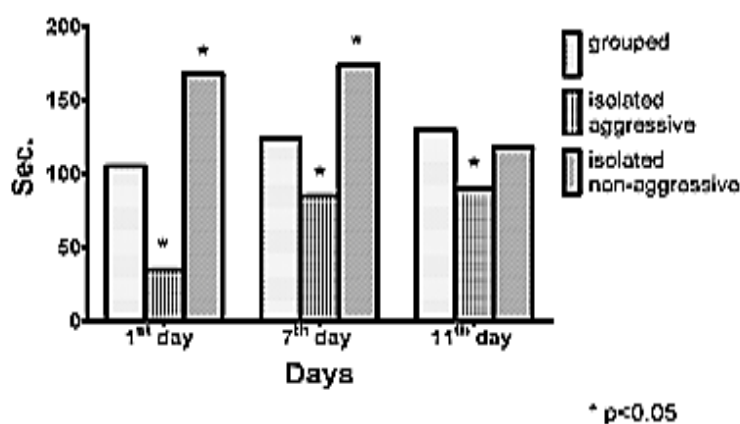
Третираните с Р-6 неагресивни мишки нямат значима промяна в броя надничания спрямо техните контроли (Агресивно поведение (-) X Вещество, $F_{(2,86)} = 4.11$, $p > 0.05$). За разлика обаче от групово-отглежданите контроли, третираните с Р-6 неагресивни мишки се отличават със значимо по-засилена изследователска активност (Изоляция X Агресивно поведение (-), $F_{(2,86)} = 4.76$, $p < 0.05$).

4.3.1.3. Ефекти на изомерите М-6 и Р-6 върху памет на социално изолирани мишки (Step-through test)

На Фигура 15 е показано влиянието на социалната изолация върху паметовите функции на контролните групови и социално изолирани мишки (агресивни и неагресивни), след тридневна третиране с разтворителя на веществата. Тестът беше

проведен в деня, следващ последното инжектиране с разтворител, 24 часа след обучение, проведено час след третирането. Съпоставени са данните за памет и обучение на 1^{-ви} и 7^{-ми} ден след обучението на агресивните мишки, както и на изолираните без развитие на агресивно поведение, Време (1^{-ви} спрямо 7^{-ми} ден) X Изолация X Агресия (+). Факторът „Изолация“ значимо влияе върху времето на задържане в осветеното помещение на апарата у изследваните животни (Изолация, $F_{(2,24)} = 4.17$, $p < 0.05$).

В зависимост от това, дали изолираните животни проявяват агресивно поведение или не, времето на задържане в осветеното помещение на Step-through е променено в различна посока. От направената статистическа обработка е видно, че факторът „Агресия“ влияе значимо върху латентното време ($F_{(2,24)} = 5.63$, $p < 0.05$). За изолираните неагресивни мишки ANOVA анализът показва достоверност за броя на секундите престой в светлото помещение на 1^{-вия} ден ($F_{(1,12)} = 7.12$, $p < 0.05$ и на 7^{-мия} ден ($F_{(1,12)} = 5.67$, $p < 0.05$) и недостоверно на 11^{-тия} ден. За разлика от тях, агресивните изолянти имат понижено време на задържане на светло спрямо контролните групово отглеждани мишки, като ефектът на интеракцията Изолация X Агресия продължава и на 11^{-тия} ден на теста ($F_{(2,24)} = 4.45$, $p < 0.05$).



Фиг. 15. Памет на 24^{-ти} час, 7-ми ден и 11^{-ти} ден памет при групови и социално-изолирани контролни мишки – Step-through тест.

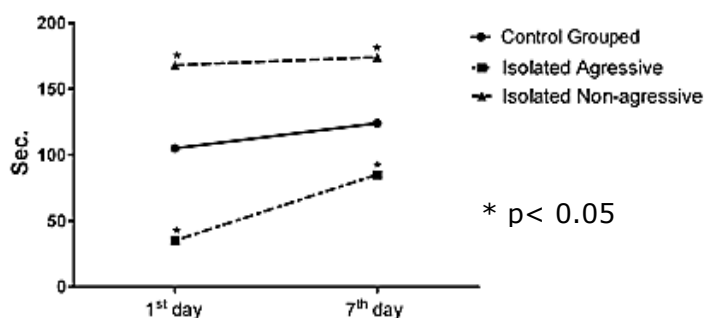
По ординатата - Step-through латенция в секунди

Ефектите на пептидомиметиците бяха изследвани с тест Step-through 24 часа след първоначално обучение, проведено 60 минути след третото инжектиране със съответния

пептидомиметик в доза 125 мг/кг, i.p.

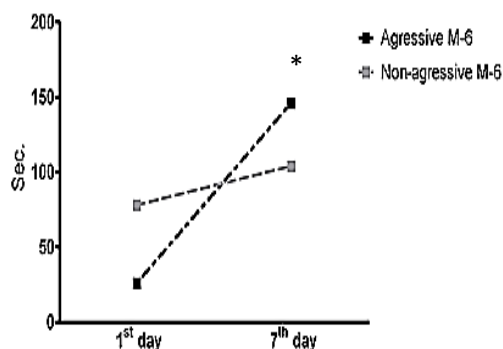
На Фигура 16 са съпоставени латенциите на третираните с веществата М-6 (Фигура 16 б) и Р-6 (Фигура 16 в) агресивни и неагресивни изолирани мишки с техните не третирани контроли, както и групово отглежданите контролни животни (Фиг. 16 а).

Фиг.16.а)

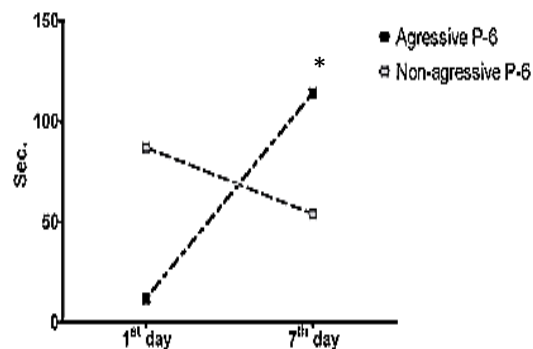


Фиг. 16. Ефекти на М-6 и Р-6, въвеждани i.p. в дневна доза 125мг/кг за три дни върху латентното време в секунди (Step through), отчитано на 1^{-вия} и 7^{-мия} ден след последно третиране: а)контроли; б) изолирани агресивни и изолирани неагресивни мишки третирани с М-6; в) агресивни и неагресивни мишки изолянти, третирани с Р-6

Фиг. 16. б)



Фиг. 16в)



Анализът на данните с ANOVA показва достоверен ефект на фактора вещество ($F_{(2,24)} = 4.98$; $P \leq 0.05$) както на първия, така и на седмия ден и за двете вещества М-6 и Р-6 у агресивните мишки. Значим е и факторът Вещество при неагресивните изолирани мишки, третирани с веществата ($F_{(2,24)} = 6.54$; $p < 0.05$) спрямо контролните животни.

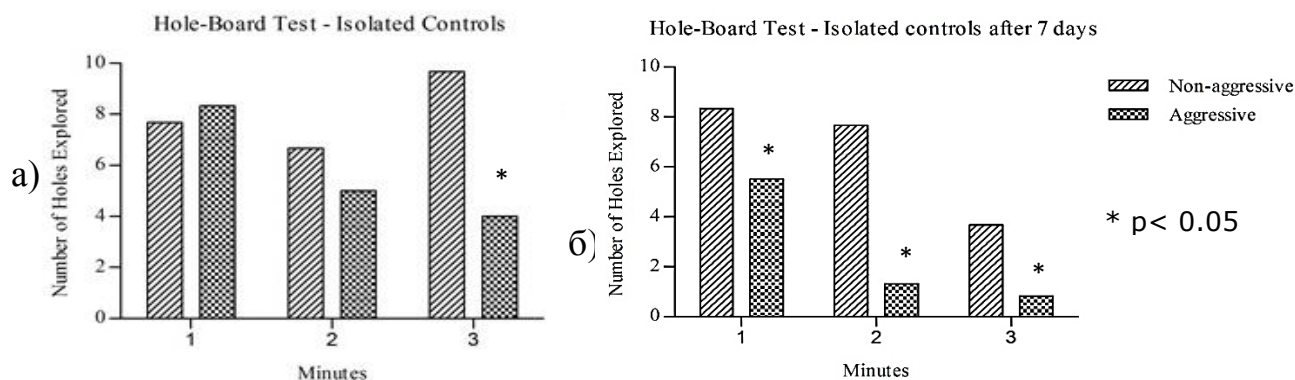
При неагресивните третирани с двата ПМ мишки се наблюдава значимо понижение на времето на престой в светлия сектор на апарата както на първия, така и на седмия ден, ($F_{(2,24)} = 4.32$; $p < 0.05$) спрямо контролните неагресивни животни, третирани тридневно само с разтворител, и характеризиращи се с най-дълъг престой на светло (Фиг.15).

А.2. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ПЛЪХОВЕ

1. *Влияние на социалната изолация върху изследователското поведение на Wistar-плъхове – разлики между плъхове с изявено агресивно поведение и плъхове без доказана агресия*

Тестът за ориентировъчно поведение беше направен на 24 час, както и 7 дена след тридневно интраперитонеално инжектиране с разтворител.

Проведената ANOVA от смесен тип [Агресия (+/-) X Време на тестиране ($1^{\text{ви}}/7^{\text{ми}}$ ден) X Време от теста ($1', 2', 3'$)] показва значима промяна в средния брой надничания (на $7^{\text{мия}}$ ден) у агресивните плъхове (Фиг. 17б) и за трите изследвани минути от теста. Изследваният параметър според post hoc анализа е доста понижен спрямо този на неагресивните животни (Агресия $F_{(1,11)} = 5.23$; $p < 0.05$).



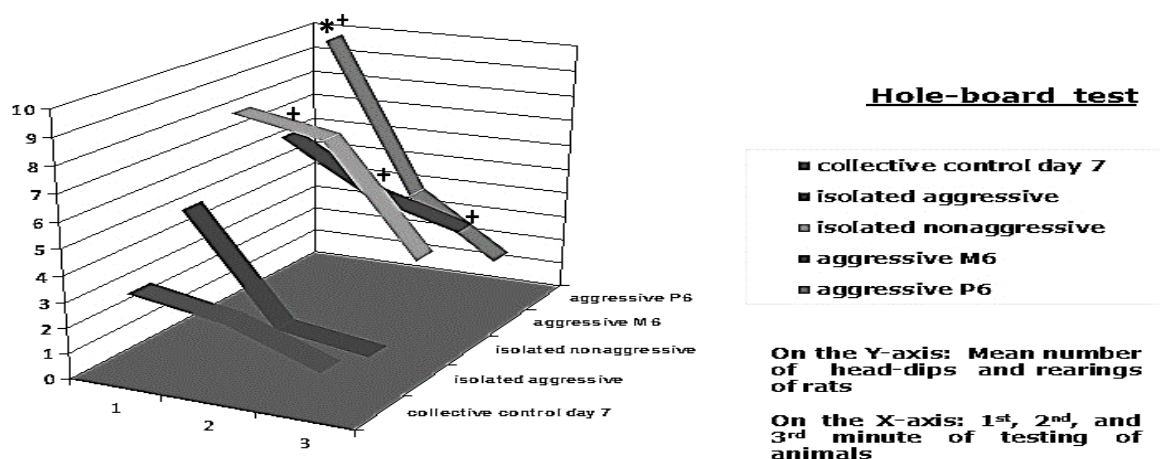
Фиг. 17 а) Ориентировъчно поведение на Hole-board на Wistar плъхове-изоланти сравнение между агресивни и неагресивни контроли - $1^{\text{ви}}$ ден, и 17 б) - след 7 дена; взети са средни стойности за брой надничания в дупките на дъската за минута в групите изследвани плъхове (на ординатата)

2. *Ефекти на М-6 и Р-6 върху изследователското поведение на агресивни плъхове (Hole-board тест)*

Веществата бяха въвеждани интраперитонеално, в дози 100 мг/кг тегло, за три дни. Обучението се провеждаше 1 час след третото третиране, т.е. на третия ден. На седмия ден след последно третиране – се провеждаше и самият тест за ориентировъчното поведение у третираните животни.

Резултатите от смесената ANOVA [Вещество (М-6/Р-6/Разтворител) X Агресия (+/-) X Време на теста ($1', 2', 3'$)] показват значимост за фактор агресия (Агресия $F_{(1,11)} = 8.76$; $p < 0.01$). Според post hoc анализа агресивните животни имат повишен брой надничания на в първата минута на Hole-board теста, сравнено с групово отглежданите контроли. И двете съединения оказват значимо влияние върху ориентировъчното поведение – увеличават броя надничания в дупките на дъската в сравнение с агресивните контроли (Вещество X Агресия $F_{(2,22)} = 4.13$; $p < 0.01$).

Наблюдаваните промени в ориентировъчното поведение бяха по-големи в групата третиран с Р-6 в сравнение с М-6 изомера за първата минута от теста (Вещество X Време на теста, $F_{(3,34)} = 3.21; p < 0.05$) (фиг.18).

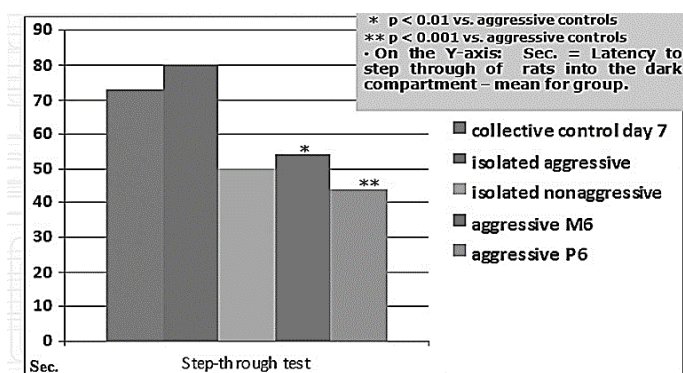


Фиг. 18. Ефекти на М-6 и Р-6 в дози 100 мг/кг т.м., инжектирани i.p., за 3 дни, на изолирани агресивни мъжки плъхове, върху броя на надничанията за 3 мин. на 7^{ми} ден след третирането. + $p < 0.01$ достоверност спрямо съответната контролна група; * $p < 0.05$ достоверност на разликите между групата инжектирани с М-6 vs тази с Р-6.

3. Влияние на социалната изолация и ефекти на веществата М-6 и Р-6 върху паметта на изолирани агресивни Wistar –плъхове (Step-through)

Веществата бяха въвеждани интраперитонеално, в дози 100 мг/кг тегло, за три дни. Обучителната тренировка се провеждаше 1 час след третото третиране, т.е. на третия ден. На седмия ден след последно третиране се проведе и самият тест за памет у третираните животни. Използвана е трифакторна ANOVA (Вещество x Изолация x Агресия).

Анализът на данните за 7^{ми} ден след обучение за пасивно избягване показаха, че с високи показатели за изследвания параметър, се отличават агресивните животни, за разлика от неагресивните изоланти (Агресия $\pm F_{(1,11)} = 6.59; p < 0.05$). Сравняването с post hoc теста демонстрира, че и двете вещества статистически значимо намалиха латентното време на прехода на агресивните животни в тъмното помещение (време в секунди, средно за група изследвани плъхове, на ординатата, Фиг. 19), в сравнение с контролните агресивни плъхове (Вещество $F_{(3,34)} = 7.54; p < 0.05$), като така го приближават до средните стойности за изолираните неагресивни контроли.



Фиг. 19. Ефекти на М-6 и Р-6, въвеждани i.p. в дневна доза 100мг/кг за три дни върху латентното време в секунди (Step-through), отчетено 7 дена след последното третиране – средни стойности в изследваните групи животни (контроли групови, изолирани агресивни и неагресивни, и третиран с ПМ агресивни плъхове Wistar, по ред на представяне във фигурата)

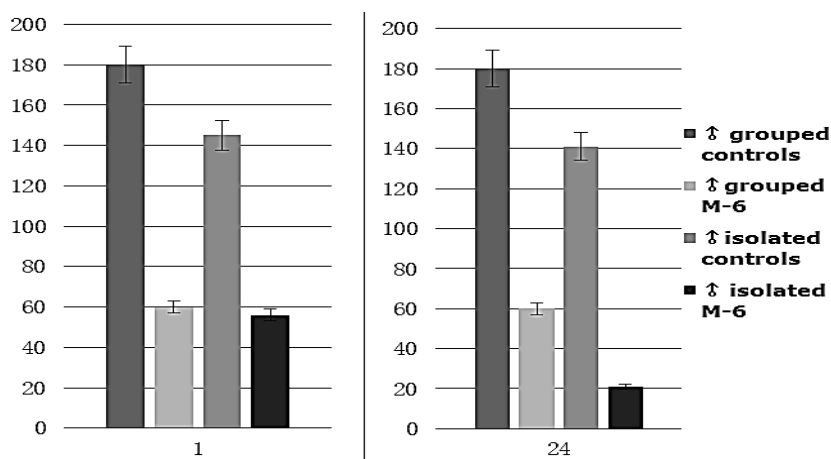
В. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ МЛАДИ МЪЖКИ И ЖЕНСКИ ПЛЪХОВЕ СЛЕД МАЙЧИНА ДЕПРИВАЦИЯ В КОМБИНАЦИЯ СЪС СОЦИАЛНА ИЗОЛАЦИЯ

1. Ефекти на веществото М-6 върху двигателната координация (Rota-rod тест) на мъжки и женски социално изолирани Wistar плъхове

Веществото беше въвеждано интраперитонеално в дози 150 мг/кг т.м. за три дни. Поставянето на Rota rod теста се осъществяваше за първи път 60 минути след последното третиране, след което за втори път на 24^{-тия} час.

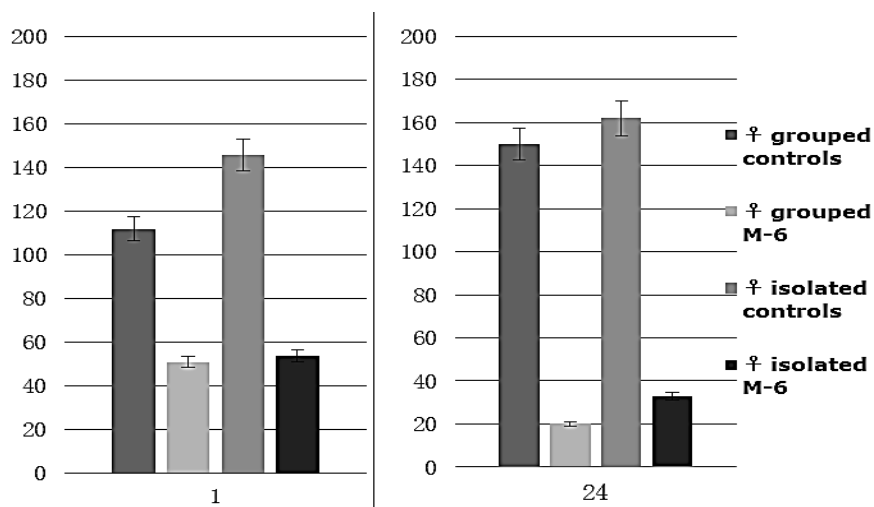
Тестът за нервно-мускулна координация показва, че ефектът на вещество М-6 върху моториката и баланса, и при двата пола изолирани животни, е потискащ (Фиг. 20 и 21). Наблюдава се значимо понижаване на двигателната координация, което на 24^{-ти} час при мъжките изолирани животни е още по-силно изразено, в сравнение с първия час ($p < 0,01$) (Фиг. 20 а).

Липсва значима разлика в потискащия ефект на М-6 за първия час у мъжките животни в зависимост от начина на отглеждането им - групово или в СИ (фактор изолация) съгласно статистическата обработка на данните ($p > 0,05$) (Фиг. 20 ляво).



Фиг. 20. Секунди на задържане върху въртящ се лост на първи и на 24-ти час при мъжки Wistar плъхове след тридневно третиране с М-6 (150мг/кг i.p.) – Rota-rod тест

При мъжките животни наблюдавахме по-силно потискане двигателната активност от М-6 на третираните мъжки изолати, в сравнение с третираните групово-отглеждани мъжки плъхчета на 24^{-тия} час (Фиг.20 дясно, групови третирани – потискане с 65 % спрямо изолираните третирани – потискане с ~ 90 %)



Фиг.21. Секунди на задържане на първи и на 24-ти час у женски Wistar плъхове след тридневно третиране с М-6 (150мг/кг i.p.) – Rota-rod тест.

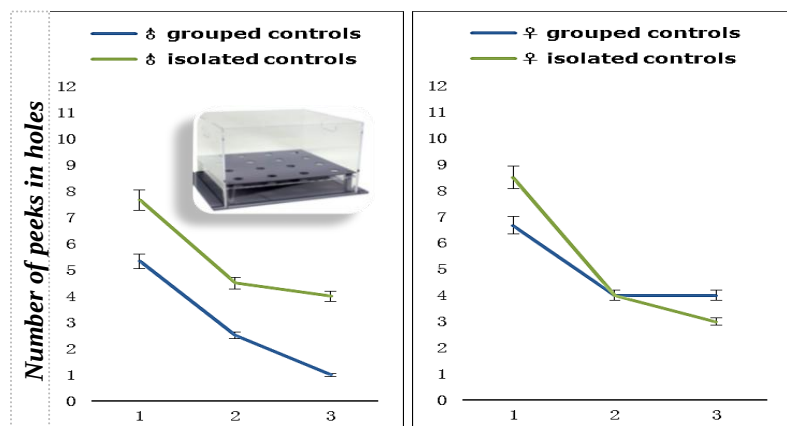
При женските изолирани животни ефектът на М-6 е сходен с този у мъжките на първия час. Наблюдаваният потискащ ефект на М-6 на

24-ти час е по- силно изразен при колективно отглежданите женски животни, в сравнение с изолираните женски ($p < 0.05$) (Фиг. 21 дясно).

2. Влияние на социалната изолация върху изследователското поведение на Wistar-плъхове – разлики между мъжки и женски плъхове

Разтворителят (Ol.Helianthi) беше въвеждан интраперитонеално за три дни. Поставянето на Hole-board дъската се осъществяваше за първи път 60 минути след последното третиране, след което самият тест се проведе на 24 час.

Ориентировъчното поведение бе по-силно изразено при женските, отколкото при мъжките групово отглеждани животни, докато при социално изолираните плъхчета, разликата между двата пола е незначима (фиг. 22). Според направената статистическа обработка на данните с многофакторна ANOVA, и тук имаме ясен ефект на изолацията, в зависимост от пола ($F = 587.83$; $p < 0.001$)



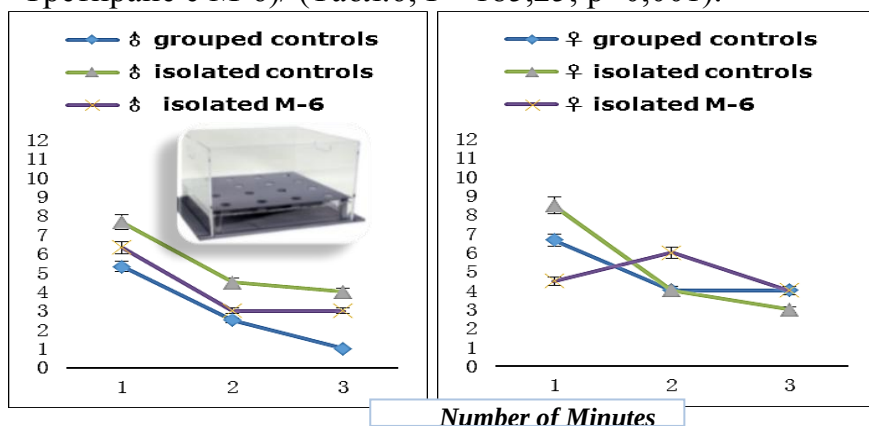
Фиг. 22. Ориентировъчно поведение (Hole-board тест) на неагресивни изолирани и групово отглеждани контроли Wistar плъхчета с майчина депривация на 24^{-ти} час след последна апликация на разтворител: сравнение по пол и изолация. По ордината – брой надничания в дупките на дъската за минута

3. Ефекти на М-6 върху изследователското поведение на социално изолирани мъжки и женски плъхове

Веществото беше въвеждано интраперитонеално в дози 150 мг/кг т.м. за три дни. Поставянето на Hole-board с цел запознаване с обстановката се осъществяваше за първи път 60 минути след последното третиране, след което за самият тест - на 24^{-тия} час.

Ориентировъчното поведение у третираните с М-6 социално изолирани мъжки плъхчета показва ясна тенденция към приближаване по стойности на измерваните показатели у групово-отглежданите контроли. За сравнение – контролите мъжки изолирани плъхчета, които са третирани само с разтворител, проявяват доста засилена ориентировъчна активност и в трите минути от теста (Фиг. 23 ляво).

В първата минута третираните животни са със силно потиснато ориентировъчно поведение, в сравнение с изолираните нетретираните женски плъхове, докато през втора минута има засилена изследователска активност в сравнение с останалите групи (Фиг.23 дясно). Това е зависимост с голяма статистическа значимост, както е видно на многофакторната ANOVA /Време (1' спрямо 2' спрямо 3' минута) X Пол X Изолация X Третиране с М-6/ (Табл.6; $F = 185.25$; $p < 0.001$).



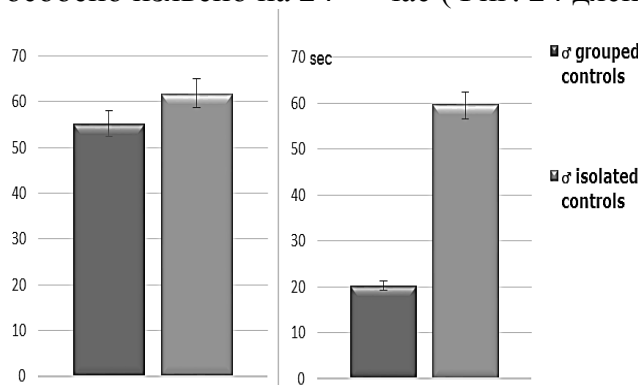
Фиг. 23. Изследователско поведение (Hole-board тест) според пол и третиране на изолираните плъхчета с М-6 По ордината – брой надничания средно в група/мин.

Таблица 6. Резултати от ANOVA за данните от Hole-board теста при изследване ефекта на третирането и междуфакторните взаимодействия

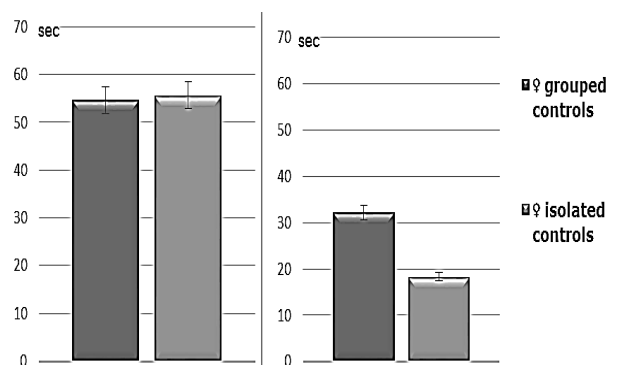
Фактори и Взаимодействия	Df	F	Значимост
Време от теста (1', 2', 3)	2,80	1731.00	p<0.001
Пол	1,40	808.91	p<0.001
Изоляция	1,40	70.43	p<0.001
Третиране с М-6	1,40	135.87	p<0.001
Време X Пол	2,80	4.000	p<0.05
Време X Изоляция	2,80	45.75	p<0.001
Време X Третиране с М-6	2,80	19.75	p<0.001
Пол X Изоляция	1,40	587.83	p<0.001
Пол X Третиране с М-6	1,40	10.65	p<0.01
Време X ПолX Изоляция	2,80	55.75	p<0.001
Време X ИзоляцияX Третиране с М-6	2,80	169.75	p<0.001
ВремеX ПолX Третиране с М-6	2,80	19.750	p<0.001
Пол X ИзоляцияX Третиране с М-6	1,40	281.74	p<0.001
Време X Пол X Изоляция X Третиране с М-6	2,80	185.25	p<0.001

4. Влияние на социалната изолация върху паметта на Wistar-плъхове – разлики между мъжки и женски плъхове

Както при социално изолираните плъхове, при младите мъжки изолирани животни изследваните параметри на обучението и паметта (Step-through тест) бяха по-добри в сравнение с групово отглежданите животни. Това се наблюдаваше както на 1^{-вия}, така и особено изявено на 24^{-тия} час (Фиг. 24 дясно).



Фиг. 24. Тест пасивно избягване на 1^{-ви} (вляво) и 24^{-ти} час (дясно) след тренировка у мъжки контроли Wistar плъхчета. По ординатата -Step-through латенция в секунди



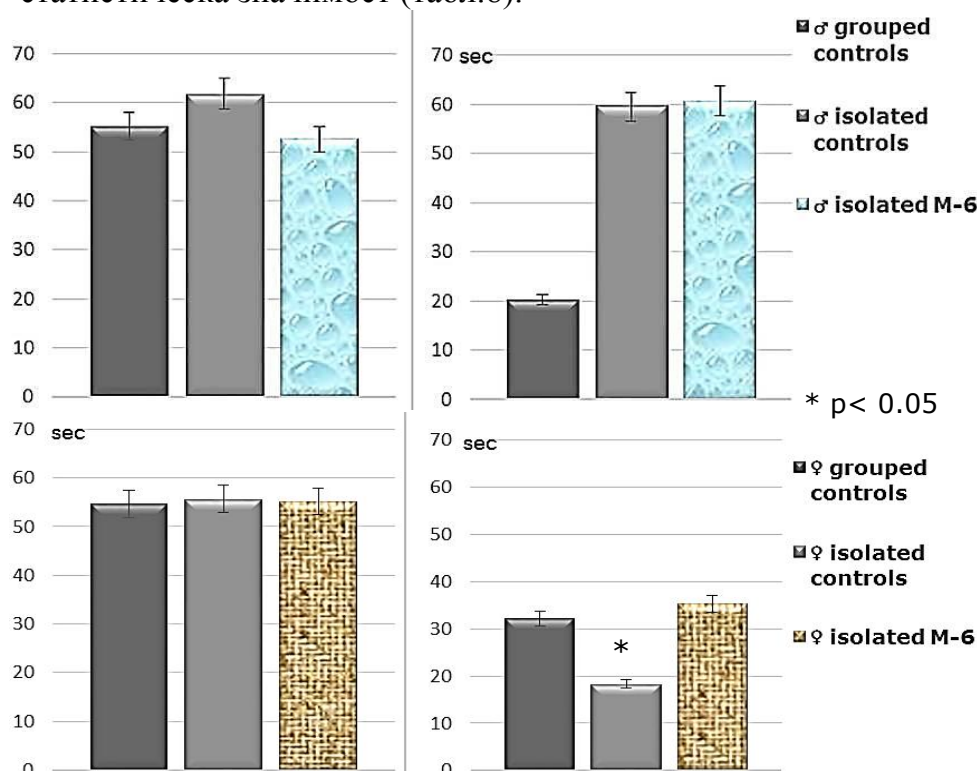
Фиг. 25. Тест пасивно избягване на 1^{-ви} (вляво) и 24^{-ти} час (дясно) след тренировка у контроли женски плъхчета Wistar. По ординатата: Step-through латенция в секунди.

От статистическата обработка на данните с ANOVA, (mixed design), е видно, че факторът изолация силно влияе върху когнитивните способности на животните, (Табл.8) като мъжките изоланти се представят далеч по-добре от женските изоланти, и то особено на 24^{-тия} час. Това влияние е зависимо от пола, както на първия час, така и дори още по-явно, на 24^{-тия} час ($F=440,74$; $p<0,001$). Изолираните женски животни се представят с далеч по-ниски паметови показатели, в сравнение с груповите женски животни (намаление с близо 50%, Фиг.25 дясно), докато мъжките изоланти са с трикратно повишени стойности на измерваната латентност на Step-through теста, в сравнение с групово отглежданите мъжки плъхове на 24^{-тия} час от обучението (Фиг. 24 дясно).

5. Ефекти на М-6 върху паметта и обучението след тридневно третиране на мъжки и женски плъхове Wistar с майчина депривация

Съединение М-6 показва по-добър превантивен ефект върху паметта при изолирани женски плъхове, отколкото при групово отглежданите животни от същия пол /Фиг. 11 б) и Фиг.26 б)/. Това се демонстрира от Step-through теста, с който животните се обучават в пасивно избягване след аверзивен стимул. Изолираните женски плъхове, третирани с М-6 показват по-добра памет в сравнение с изолираните и групови женски контроли на 24^{-тия} час. При мъжките изолирани животни М-6 (Фиг.26а) няма значим ефект спрямо контролите изоланти ($p > 0.05$).

От статистическите анализи най-съществен интерес представляват именно данните за значението на факторите пол и третиране. Статистически значимо подобряване на паметта има при изолираните женски животни, докато при мъжките животни ефектът е неутрален (Фиг. 26б). При групово отглежданите женски плъхчета, ефектът на М6 е в посока намаляване латентното време на престой на светло средно в група, в сравнение с контролните групово отглеждани плъхчета от женски пол (Фиг. 11 б и в). Зависимостта между факторите пол – изолация – третиране е с голяма статистическа значимост (табл.8).



Фиг. 26. Ефекти на М-6 (150 мг/кг т.м.) инжектирани i.p., 3 дни на мъжки (а) и женски (б) плъхове с майчина депривация върху латентното време при тестовите за памет на 1^{-ви} и 24^{-ти} час (Step-through) спрямо груповоотглеждани и изолирани контроли. По ординатата - Step-through латенция в секунди. n= 6 бр. животни в група

Таблица 8. Резултати от ANOVA за данните от Step-through теста при изследване ефекта на третирането и междуфакторните взаимодействия

Фактори и взаимодействия	Df	F	Sig.
Час	1,40	1421.31	p<0.001
Пол	1,40	362.17	p<0.001
Изолация	1,40	552.66	p<0.001
Третиране	1,40	13.53	p<0.01
Час X Пол	1,40	48.28	p<0.001
Час X Изолация	1,40	222.97	p<0.001
Час X Третиране	1,40	28.33	p<0.001
Пол X Изолация	1,40	211.79	p<0.001
Пол X Третиране с М-6	1,40	3.095	p=0.086
Час X Пол X Изолация	1,40	440.74	p<0.001
Час X Пол X Третиране	1,40	9.64	p<0.01
Час X Изолация X Третиране	1,40	50.36	p<0.001
Пол X Изолация X Третиране	1,40	184.78	p<0.001
Час X Пол X Изолация X Третиране	1,40	.000	1.000

4.4. БИОХИМИЧНИ КОРЕЛАТИ НА КОГНИТИВНИТЕ ПРОМЕНИ В МОЗЪЧНИ СТРУКТУРИ У ГРИЗАЧИ – ПРОМЕНИ ПОД ВЛИЯНИЕ НА М-6 И Р-6

За да направим съпоставка на когнитивните промени с някои техни биохимични корелати в мозъчни структури след третиране с двата пептидомиметика, изследвахме:

Промени в нивата на белязан по тритий 5-НТ (стимулирано освобождаване и обратно поемане) при групово-отглеждани и социално изолирани животни:

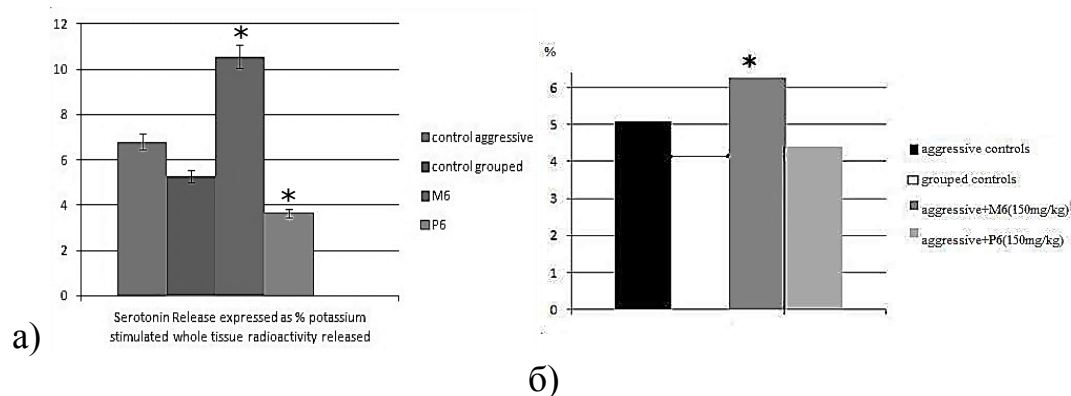
- ✓ в цял мозък на мишки, и
- ✓ в хипокамп на плъхове;

Стимулирано освобождаване на белязан по тритий ACh в хипокамп на третирани плъхове (колективни и социално изолирани).

1. Промени в нивата на 5-НТ след третиране с М-6 и Р-6

1.1. Стимулирано освобождаване на [³H]5-НТ в мозъчни структури на гризачи в цял мозък на мишки и хипокамп на плъх

Двата ПМ: М-6 и Р-6 имат разнопосочни ефекти върху стимулираното освобождаване на [³H]5-НТ в цял мозък на мишки (Фиг. 27 а), което се потвърждава и в срезове от хипокамп на плъх (Фиг. 27 б). Изомерът М-6 засилва статистически значимо освобождаването на 5-НТ, докато Р-6 го понижава спрямо агресивните контроли.

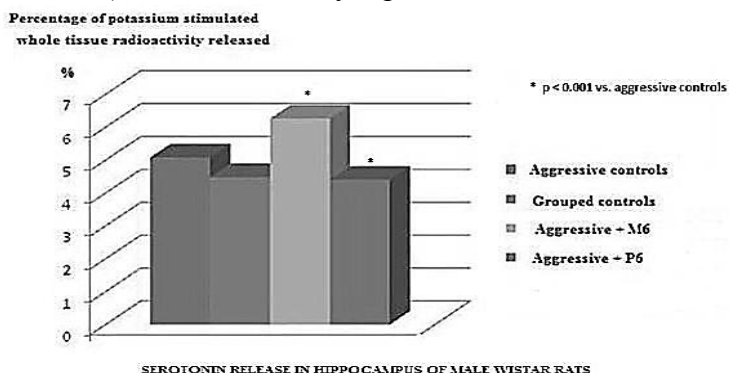


Фиг. 27. Стимулирано освобождаване на $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ от мозъчна тъкан (%)
а) – в цял мозък на мишки; б) в срезове от хипокамп на плъх

1.2. Освобождаване на белязан 5-НТ в хипокамп на плъхове

Серотониновото освобождаване в хипокамп на агресивни плъхове, третиран с М-6 е значително повишено спрямо агресивните контроли. Противоположен е ефектът на съединението Р-6: значително намалява КСI-стимулираното освобождаване на белязан с тритий серотонин в хипокамп на плъх, в сравнение с данните у агресивните контролни плъхове (Табл. 9, Фиг. 28). Установените нива на серотониново освобождаване след третиране с Р-6 на агресивни животни са близки до нивата в хипокамп на групово-отглежданите контролни плъхове (фиг. 28 - Влияние на М-6 и Р-6 на $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ освобождаване в хипокампа на агресивни мъжки плъхове).

На ординатата на фигури 27 и 28 е представено освобождаването на серотонин в проценти от първоначалната тъканна радиоактивност, след 3-минутна стимулация на тъканта с 25 mM KCl (химически стимулирано освобождаване на белязан с тритий невромедиатор).



Фиг. 28. Освобождаване на белязан 5-НТ в срезове от хипокамп на плъх. Прилаганите вещества бяха в ежедневни дози 150 mg/kg т.м., i.p., 3 дни.

Таблица 9. Стимулирано освобождаване на белязан 5-НТ в срезове от хипокамп на плъх: S - % освобождаване на $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ след стимулация. R₁ - % спонтанно освободен медиатор за 9 мин. преди стимулацията S, а R₂ - % спонтанно освободен медиатор след S; Средни стойности $\pm$ S.D.

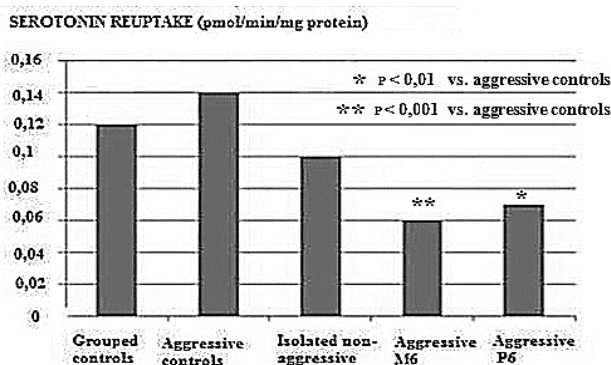
Третиране	S $\pm$ S.D.	R ₂ /R ₁ $\pm$ S.D.
Контроли неагресивни	5.09 $\pm$ 1.72	1.39 $\pm$ 0.28
Контроли агресивни	4.49 $\pm$ 2.11	1.18 $\pm$ 0.08
М-6	6.27 $\pm$ 4.13	1.48 $\pm$ 0.51
Р-6	3.66 $\pm$ 1.31	1.31 $\pm$ 0.16

1.3. Ефект на М-6 и Р-6 върху обратното поемане на $[^3\text{H}]5\text{-HT}$ в хипокампа на агресивни мъжки плъхове.

Незначителни колебания в обратното поемане на белязан серотонин бяха намерени в контролните групи. Контролните плъхове с агресивно поведение показаха тенденция за по-високо обратно поемане на 5-НТ в хипокампа на агресивни мъжки плъхове.

изолираните неагресивни плъхове, така и спрямо груповите контроли (Фиг. 29 - обратно поемане на серотонина в хипокамп на агресивни плъхове). Противоположна е тенденцията у неагресивните изолирани контроли. Обратното поемане на 5-НТ у неагресивните контролни изоланти показва тенденция към намаляване в сравнение с колективните и агресивни контроли.

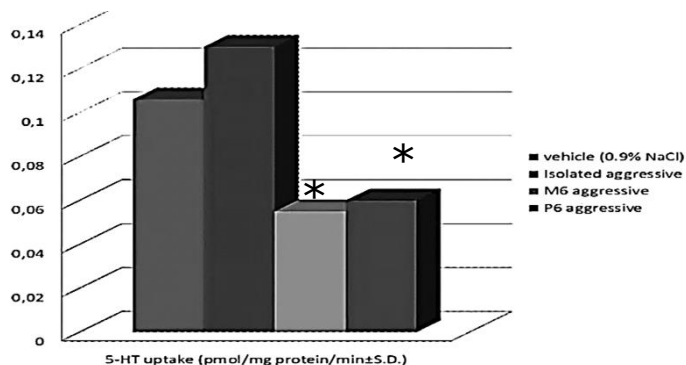
М-6 значително намалява обратното поемане на 5-НТ (с 57%) в синаптозомите на агресивни животни. Подобен е модулиращият ефект на съединението Р-6: намаляване на общото количество на обратно поеман серотонин в синаптозоми на агресивни животни (с 50%), в сравнение с агресивните контроли, третирани само с разтворител.



Фиг. 29. Обратно поемане на 5-НТ синаптозоми от хипокамп на плъх. Прилаганите вещества бяха в ежедневни дози 150 mg/kg т.м., i.p., 3 дни.

1.4. Ефекти на М-6 и Р-6 върху обратното поемане на [³H]-5-НТ в синаптозоми от цял мозък на агресивни мъжки мишки

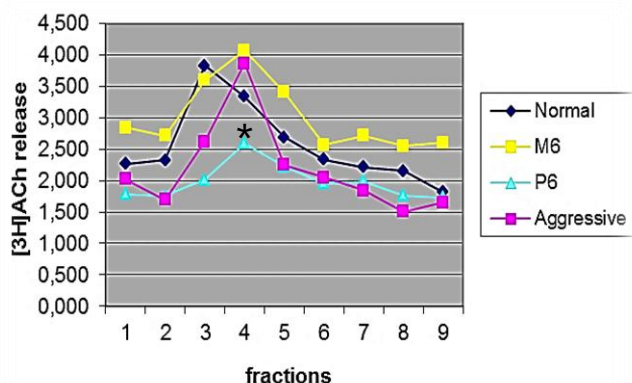
Аналогично на резултатите от хипокамп у плъхове (фиг.29), веществата М-6 и Р-6 намаляват значимо обратното поемане на серотонин в цял мозък на мишки, (фиг.30), както спрямо колективните контроли, така и спрямо агресивните контроли (в още по-голяма степен).



Фиг. 30. Обратно поемане на серотонин от синаптозоми на цял миши мозък след тридневно третиране само с разтворител или с М-6, или с Р-6 в дози 150 мг/кг тегло

2. Освобождаване на белязан ацетилхолин в хипокамп на плъх

Двете изследвани вещества повлияха разнопосочно ацетилхолиновото освобождаване. Изомерът М-6 слабо повишава освобождаването на невромедиатор от хипокампалните срезове, като ефектът е статистически незначителен, докато Р-6 значимо намалява стимулираното освобождаване на [³H]ACh, сходно с наблюдаваното намаляване на серотониновото освобождаване (фигури 28 и 31).



Фиг. 31. Ацетилхолиново отделяне от срезове на хипокамп от плъх (% радиоактивност за фракциите спрямо начално ниво).

По-изразено е значителното понижаване в групата, третирана с Р-6.

V. ОБСЪЖДАНЕ

5.1. ЕФЕКТИ НА ИЗСЛЕДВАНИТЕ ПЕПТИДОМИМЕТИЦИ ВЪРХУ ПОВЕДЕНИЕТО НА ГРУПОВО ОТГЛЕЖДАНИ МИШКИ

Мускулният тонус и нервно-мускулната координация на животните могат да бъдат променени от потенциални невротропни медикаменти. В тази връзка е важно да се установи дали изследваното вещество повлиява реакционното време, дали затруднява двигателната координация като оказва седативен ефект или миорелаксиращ ефект.

На първи час след еднократното въвеждане на пептидомиметиците в доза 250 мг/кг, не бяха установени значими промени в нервно-мускулната координация на животните спрямо контролите, т.е. не можем да очакваме бърз миорелаксиращ, или седращ ефект на изследваните съединения.

На 1^{-ви} ден след деня на последното третиране с веществата М-6 и Р-6, нервно-мускулната координация се подобри значимо в сравнение с контролите (третирана с *Ol. Helianthi*). Същият ефект, още повече засилен, беше наблюдаван и на 7^{-мия} ден, което ни дава основание да допуснем, че веществата влияят позитивно върху обучението в двигателни умения на мишките.

Горепосочените ефекти на веществата се потвърждават и от подобрения мускулен тонус на мишки, изследван чрез наблюдение върху захвата на животните, отчитайки времето на задържане върху телена жица със String тест. Ефектът на Р-6 се оказа по-силно изразен.

2. Тестът за изследване на ориентировъчното поведение на гризачи, дава ценни данни за установяване способността на животните да запомнят средата, в която са поставени. С развитието на хабитуация (привикване), ориентировъчната активност обичайно намалява, както в рамките на самия тест – 1', спрямо 2', спрямо 3' минута, така и при повторно поставяне на животното върху същата дъска с дупки, която те обследват. По този начин Hole board тестът позволява да се прави оценка за пространствената памет, а също може да ни даде информация за наличието на тревожност [van der Staay et al., 2012; Casarrubea et al., 2010; Lin et al., 2010; Karl et al., 2006].

При еднократно третиране с двете вещества ориентировъчното поведение на групово отглежданите мишки е потиснато, като ефектите им са дозо-зависими.

- При контролите е налице обичайно и постепенно понижаване на интензивността на ориентировъчното поведение, изразено като намаляване броя на „надничанията”, което показва, че процесите на хабитуация не са нарушени. На 3^{-та} минута стойностите при Hole-board теста са с около 50 % по-ниски от тези на 1^{-та} минута.

- За разлика от контролите, в групата животни, третирани еднократно с вещество М-6 бе установена потисната изследователска активност от всички изследвани дози - 125, 250 и 1000 мг/кг i.p..

Данните от трите изследвани минути на Hole-board теста показват, че М-6 във всички изследвани дози влияе положително върху обичайното привикване на мишките към обстановката. Вещество Р-6, дори в по-ниски дози, също води до засилване хабитуацията на 3^{-та} минута от теста, докато доза от 1000 мг/кг практически анулира ефекта на хабитуация при проследяване ориентировъчната активност на животните.

След тридневното третиране с М-6 в ефективни дози, не се наблюдаваха промени в ориентировъчната активност на мишките. Третираните с Р-6 мишки обаче бяха с потисната изследователска активност още на първия ден. На 7^{-мия} ден след последното третиране ориентировъчната активност се засили значително и в двете групи животни третирани с М-6 и Р-6, в сравнение с контролната група животни. По-изразени бяха ефектите на Р-6. Особено интересно е, че на 1^{-ви} ден този изомер потиска любопитството, а на 7^{-мия} ден го стимулира. В условията на нашия опит е явна способността на веществата Р-6 и М-6 да засилват любопитството и изследователската активност на животните в дългосрочен план, като Р-6 проявява по-изразен ефект от М-6 на 7^{-ми} ден.

Твърде интересен резултат при съпоставка на данните е, че еднократното прилагане на веществата в ефективни дози води до понижаване на ориентировъчната активност, докато след тридневно третиране се наблюдава обратния ефект – засилване ориентировъчната активност. Дали веществата имат анксиогенен ефект след натрупване (при многократното прилагане), (проявяват страничен ефект двигателно безпокойство) или ефектът им е амнестичен по отношение пространствената памет, засега не е ясно, като се има предвид, че промените в ориентировъчното поведение и в двете посоки (както увеличаването на броя надничания, така и намаляването им), могат да означават и засилена тревожност.

Съществуват данни в литературата, подкрепящи тезата за повишена тревожност при засилената изследователска активност. Така например Kliethermes и Crabbe съобщават, че флуоксетинът, който е антидепресант, но и анксиолитик, намалява дозо-зависимо броя на надничанията в дупките на хол-борда у генетично хетерогенни мишки [Kliethermes and Crabbe, 2006], като това авторите обясняват с потискането на двигателната активност от този медикамент.

Други автори твърдят обратното, че всъщност нарушената хабитуация, както и общо понижената изследователска активност, са показателни за наличието на тревожност [Takeda et al., 1998]. Така например, Kamei и съавтори съобщават, че ноцицептинът, приложен интрацеребровентрикуларно в ниска доза на мишки, проявява анксиолитичен ефект, демонстриран чрез засилване изследователската им активност, като възможно обяснение за това се посочва активация на серотонинергичната невротрансмисия в хипокамп [Kamei et al., 2004]. В по-високи дози ноцицептин обаче, (прилаган по същия начин) има обратен, анксиогенен ефект, изразяващ се в намаляване броя надничания в дупките на хол борда от третираните мишки. Авторите предполагат, че причина за това е инхибиране серотонинергичната невротрансмисия в амигдалата [Chiou et al., 2007].

Може би когнитивен хол-борд [van der Staay et al., 2012], с хранителна примамка в определени дупки на хол-борда, би установил с по-голяма прецизност, дали животните с намалена изследователска активност помнят по-добре или демонстрират тревожност.

Като цяло, ефектът и на двата ПМ върху изследователската активност на мишките след еднократно прилагане в различни дози е потискащ, а в някои дози, както при М-6, така и при Р-6, се наблюдават нарушения в естествената хабитуация в продължение на трите минути върху Хол-борд. Именно нарушаването в естествената хабитуация и понижаването на броя надничания в дупките е признак за тревожност според някои автори [Kamei et al., 2004; Karl et al., 2006; do-Rego et al., 2006].

След многократно прилагане обаче, ефектите на веществата върху ориентировъчната активност на първи ден са почти минимални, с изключение на Р-6, който я потиска (особено в първата минута от теста). На седмия ден ефектът и на двете вещества е по-изявен в посока засилване на изследователската активност (особено в първата и в третата минута за Р-6), което би могло да говори в полза на възможен анксиолитичен ефект, и/или амнестичен ефект на веществата, по-силно изразен при вещество Р-6.

3. Резултатите от нашите поведенчески изследвания на групово отглеждани мишки ни дадоха основание да предположим, че работим с потенциални подобряващи паметта средства, предвид ефекта им върху памет на гризачите, изследвана с тест за пасивно избягване.

Известно е, че ефектът на фармакологичните агенти, подобряващи паметта, обичайно се извява не по-рано от 16^{-ти} до 24^{-тия} час след обучението [Mondadori et al 1994]. Нашите изследвания потвърдиха този факт, като значително подобрене се наблюдаваше на ретенционния тест, проведен 24 часа след обучението. По-силен подобряващ ефект върху

паметта, на Step-down тест, бе демонстриран от М-6, на 24^{та} час след обучението в доза 250 мг/кг т.м.

След трикратно третиране на животните с пептидомиметиците отново установихме подобър ефект на М-6 отколкото на Р-6. Статистически значима разлика имаше в представянето на животните, третирани с М-6 на 24^{та} час след обучението им, спрямо контролите. За сравнение, третираните с Р-6 мишки не показаха толкова значимо подобрене на ретенционния тест спрямо контролните. Но на седмия ден все пак, беше отчетено значимо подобрене на паметта и в двете групи животни третирани с ПМ, в сравнение с контролите. Това, че на първия ден няма особено големи отклонения говори за един вероятно по-бавно настъпващ ефект на веществото.

Различията в силата на ефектите от двата позиционни изомера могат да бъдат обяснени с различната степен на достигане до прицелните мозъчни структури. Възможно е също като позиционни изомери те да имат и различен метаболизъм, тъй като липсва съществена разлика във физикохимичните им свойства по предварителни данни. Твърде възможно е, никотинамидният (М-6) изомер да има по-голям афинитет към никотинови/серотонинови рецептори, в сравнение с изоникотинамидния (Р-6) изомер.

В обобщение за мъжки бели ICR групово-отглеждани мишки получихме, че:

1. И двата пептидомиметика подобряват паметта при еднократно прилагане, като М-6 се очертава с по-силно действие, и с по-изявен дозо-зависим ефект.
2. След тридневно приложение на веществата в доза 125 мг/кг, значим ефект от изомер М-6 върху паметта има както на първия, така и на седмия ден, докато при Р-6 е наблюдавано значимо подобрене единствено на 7^{мия} ден в тази доза. Поради това можем да заключим, че М-6 има по-бързо влияние върху емоционалната памет, и е по-ефективен.

5.2. ПОВЕДЕНЧЕСКИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ГРУПОВО ОТГЛЕЖДАНИ WISTAR ПЛЪХОВЕ

1. За разлика от горепосочените ефекти на веществата върху мишки, където невро-мускулната координация се подобряваше, при плъхове двигателната координация както при мъжките, така и при женските животни бе значително влошена. Това е значимо междувидово различие в ефектите на изследвания пептидомиметик. Изследването с Rota rod тест е изключително чувствително към церебеларните функции на животните. Така например, дефицити в клетките на Пуркиние на малкия мозък довеждат до влошаване представянето на Rota rod. Други причини за влошено представяне на теста Rota-rod могат да бъдат и периферни – на ниво мускули [Hinkle et al, 2012].

Съвсем на място възниква въпроса, дали е възможно веществата да оказват миорелаксиращ / седиращ ефект у плъхове (но не и при мишки). В такъв случай, съществуват междувидови различия между мишки и плъхове или в метаболизма на веществата, или в таргетните им мозъчни структури. Друга вероятна причина е, че в малкия мозък у младите плъхове от двата пола могат да настъпват промени в невротрансмисията под действие на съединението М-6.

Майчината депривация във възрастта на подрастването – веднага след отбиване, представлява, макар и в лека степен хроничен стрес. Подобен стрес може би е компрометирал съзряването и стабилността на невроналните мрежи в ЦНС, отговорни за двигателната координация и баланс на плъхчетата, като е възможно да ги е направил уязвими на манипулиране с неврофармакологични агенти. Намираме подкрепа в тази насока в обзор на Brandao и Mayer за поведението у гризачи с акцент върху обогатяването на средата им [Brandao and Mayer, 2011], където изрично се подчертава, че групи по шест животни, е абсолютният минимум на социална група, и пак трябва да се предприемат мерки за социално обогатяване, срещу неудачите, които поставя животът в по-малобройна социална група. При това, авторите на ценния обобщителен обзор с препоръки по тематиката изрично подчертават, че наличието на дълготрайна майчина грижа, както и отглеждането на животните в по-големи социални групи, позволява на потомството да имат по-стабилно невропсихично развитие.

2. Ориентировъчното поведение на първия ден след тридневното третиране на мъжките плъхчета с ефективна доза не е променено спрямо контролите, но при женските то е засилено в значима степен, особено в първите две минути от Hole-board теста. Нашите проучвания върху мъжки и женски плъхчета в късния период на подрастването от живота им потвърждават вече установени междуполови различия в изследователската активност на животните, а именно това, че женските са далеч по-активни от мъжките [Lynn et al., 2009].

Интересното е, че никотинамидният изомер (М-6) дори засилва тези различия, като повлиява единствено типичното за женските подрастващи плъхчета ориентировъчно поведение, което става по-активно при третираните женски. Интерес представлява и причината за подобни различия – дали женските плъхчета са просто по-любопитни, по-слабо тревожни, или запомнят по-слабо средата, и заради това по-активно изследват дупките на хол-борда. В препоръките си за среда на отглеждане на гризачи, Brandao и Mayer изтъкват това, че в периода на подрастването (веднага след отбиване и преди зрялата възраст, т.е. между 21^{-ви} ден от раждането до 60 ден), женските плъхове се отличават с засилващо се любопитство към околната среда и увеличена двигателна активност, и вероятно по-голямото жизнено пространство би се оказало ползотворно за развитието им [Brandao and Mayer, 2011]. Следователно това е типична за женския пол отличителна характеристика на животните, и не е необходимо непременно да упоменаваме конкретна причина за това тяхно засилено изследователско поведение. Предполагаме, че тази поведенческа характеристика на животните най-вероятно е свързана с междуполови различия в серотонинергичната невротрансмисия в мозъка на животните. Така например, Фишет и сътр. откриват, че между мъжките и женските плъхове съществуват различия в свързването на серотонина от 5-HT₁ рецепторите в дискретни участъци на мозъка [Fischette et al., 1983]. Също така, в по-скорошно изследване Гоел и Бейл установяват че у женски мишки има повече на брой рецептори за серотонин в хипофизата, по-едри надбъбречни жлези, в сравнение с мъжките, както и различия в хипоталамус-хипофиза-надбъбречната ос [Goel and Bale, 2010]. Възможно е, щом изследваното съединение допълнително засилва двигателната активност и любопитството на женските плъхчета, ефектите му да са свързани с пространствената памет само на женските животни, или също да увеличават допълнително потребността на женските плъхчета от жизнена площ за изучаване и свободни движения.

Ако сравним ефектите на М-6 върху мишки и върху плъхове, се оказва, че изследваният пептидомиметик не проявява ефект върху ориентировъчното поведение на мъжките групово отглеждани плъхчета, докато при мъжки мишки – има увеличаване на броя надничания, особено в третата минута от теста. При женските плъхчета наблюдаваният ефект на 24^{-тия} час след последния ден на третиране и първо поставяне на плъховете върху хол-борда, е подобен на този при мъжките групово отглеждани мишки на 7^{-мия} ден. Наличието на междувидови различия в ефектите на фармакологично активни вещества е установено отдавна и при изследване ефектите на бензодиазепини върху двигателната активност на гризачи. Така например, ниските дози бензодиазепини приложени на мишки водят до умерена до силно изразена двигателна активност [Crabbe et al., 1998], докато при плъхове каквито и дози бензодиазепини да се приложат – водят до обратния ефект - потискане двигателната им активност (локомоторна депресия) [Lister et al., 1990, Kliethermes and Crabbe, 2006].

В обобщение вещество М-6 има или амнестичен ефект по отношение пространствената памет на женските плъхчета, или анксиолитичен ефект, изразяващ се в увеличаване броя надничания в дупките на Hole-board'a. Във втория случай е уместно да си зададем въпроса, защо анксиолитичен ефект се наблюдава само върху женски животни. Не е изключено двата ефекта да съществуват паралелно, и да са обусловени от хормоналните нива във вече зрелите женски плъхчета.

3. Резултатите за влиянието на никотинамидния изомер М-6 показват недвусмислено липса на промени в паметта, изследвана с тест за пасивно избягване в мъжки плъхове. При женските животни се наблюдаваше понижаване на изследвания показател за памет както на 1^{-вия}, така и на 24^{-тия} час, което корелира със засилена ориентировъчна активност (вероятно понижена пространствена памет, или анксиолитичен ефект) на 24^{-тия} час.

Резултатите за пространствената памет у женски животни (засилено надничане по дупките на дъската, макар да попадат за пореден път върху същата среда) корелират с намаляването на паметовите им показатели, изследвани при теста Step-through (тест за пасивно избягване). Възможна причина за тези резултати би могла да бъде наличие на амнестичен ефект на М-6 у женските животни, който е не само върху пространствената памет, но и върху емоционалната памет на плъхчетата.

Интересно е, че изомерът не нарушава паметта у мъжките плъхчета. Следователно твърде вероятно е, женските полови хормони по за сега механизъм, да взаимодействат и да повлияват ефектите на въвеждания фармакологичен агент М-6. Възможна причина за междуполови различия в ефектите на веществата би могла да се крие в докладваните от Goel и Bale различия

в серотонинергичното модулиране на стресовата ос хипоталамус – хипофиза – надбъбрек [Goel and Bale, 2010]. В мозъка на плъх са открити междуполови различия в серотонинергичната невротрансмисия [Carlsson et al., 1985]. В подкрепа на това говорят и по-подробни изследвания на Bethea и съавтори за съществена роля, която имат овариалните стероиди по отношение серотонинергичната нервна комуникация в ЦНС [Bethea et al., 2002]. Както при плъхове, така и при хора са установени междуполови различия в серотониновите синапси (по-конкретно в броя на постсинаптичните 5-HT_{1A} –рецептори), които у жените са повече, отколкото у мъжете [Cosgrove et al., 2007].

Нашите данни за химически стимулираното серотониново освобождаване и обратно поемане на този невромедиатор от синаптозоми в хипокамп са изключително и само от мозъчни тъкани на мъжки гризачи. Ние бихме могли само да предполагаме различия в ефектите на пептидомиметика върху серотонина в мозъка на женски плъхове, предвид липсата на данни за това.

Установените междуполови различия в ефекта на М-6 върху поведението на млади плъхове могат да се разглеждат като косвено доказателство за повлияване на серотонинергичната нервна система в мозъка на третираните животни от фармакологичния агент М-6.

5.3. ЕФЕКТИ НА L-ВАЛИНОВИТЕ ПЕПТИДОМИМЕТИЦИ ВЪРХУ ГРИЗАЧИ С ДЪЛГОСРОЧНА СОЦИАЛНА ИЗОЛАЦИЯ

5.3. А.1. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ МИШКИ

1. В литературата са описани няколко експериментални модела за предизвикване на агресивно поведение - чрез болково дразнене, чрез мозъчни лезии, електро-стимулация на мозъчни структури, химично стимулиране на мозъчни структури, фармакологично третиране и др. Ние избрахме продължителната изолация на опитни животни, която е един неинвазивен и сравнително адекватен модел на социална изолация при човека, свързан с чувството на тревожност, страх, гняв, и с последици - насилствено поведение и агресия [Ramirez, 2000; Marsden et al., 2011; Fone, 2008].

Преди да се насочим към ефектите на изследваните от нас пептидомиметици е добре да обсъдим значението на социалната изолация при експерименталните гризачи. В литературата има не малко данни за социалната изолация като стресов фактор при животните, който както всеки хроничен стрес, се отразява неблагоприятно върху организма им. В нашите изследвания върху двигателната координация на социално изолирани мишки, се натъкнахме на интересен феномен - значимо по-дългото време на задържане върху лоста на контролите мишки - изоланти спрямо контролите групово-отглеждани. Подобни данни са докладвани и от други автори, които също не установяват по-добра двигателна координация у групово отглежданите мишки. Те намират, че когато мишките могат да бъдат физически активни в клетката си (обогатена физическа среда, с колела за бягане), това е свързано с по-добро представяне на рота род (по-дълъг престой на въртящия се лост). Това се наблюдава както при социално изолираните мишки, така и при групово отглежданите [Madronal et al., 2010]. Все пак, отглежданите за 1 месец в СИ мишки имат по-дълъг престой върху лоста в сравнение с групово-отглежданите мишки, когато и двете групи са отглеждани в условия на необогатена физическа среда, но авторите не се опитват да обяснят причината за този феномен. Мадронал и съавтори намират, че социалните взаимодействия повлияват хипокампалната неврогенеза, като увеличават клетъчната пролиферация в мишия хипокамп, но сам по себе си, този фактор не повлиява способността за заучаване у животните. Заключение на авторите е, че неврогенезата не е пътя по който обогатената жизнена среда променя хипокамп-обусловеното поведение у животните. В предвид, че нашите социално изолирани животни не са отглеждани в условия на физически обогатена среда, нашите данни намират подкрепа в изследванията на гореспоменатите автори. За социално изолираните мишки, които изследвахме, по-дългият престой върху въртящия се лост спрямо групово отглежданите контроли може да бъде проява на склонност към стереотипно поведение, неспособност животните да спрат продължаващите си движения [Hinkle et al., 2012]. Така например авторите в цитираното съвременно оригинално изследване, установяват подобро представяне на Rota rod у мутантни мишки с делеция на ген, който е с много висока експресия в малкия мозък, както и упоменават конкретни животински (миши) модели на дегенеративни заболявания, които се характеризират с подобрени показатели на Rota-rod спрямо здрави

контроли – например мишият модел за синдром на Даун, (Ts65DN), heregulin- (лиганд за тирозин-рецепторна киназа) мутантни мишки, модел на епилепсия с дефицит в един репариращ белтък L-isoaspartate [d-aspartate]-O-methyltransferase [Pcmt1-/-] и Huntington мишки с тройна делеция Hdh [$\Delta Q/\Delta Q$] mice. Гореизложеното неминуемо повдига въпроса, дали подобрените показатели на рота род непременно означават по-добра двигателна координация. Hinkle и съавтори установяват, че въпреки наличието на нарушена походка у изследваните от тях мишки-мутанти, те все пак имат значимо подобрени показатели на тестовете за моторна координация. Резултатите на рота род у мутантните мишки си остават по-добри с 25 % в сравнение с контролите, независимо от наличието или не на патологични структурни промени в малкия мозък на животните.

От друга страна, тридневното третиране с изследваните пептидомиметици, доведе до понижаване времето на задържане върху лоста у мишките развили агресия след социална изолация. Ефектът на никотинамидният изомер М-6 е по-силно изявен, в сравнение с ефекта на Р-6.

Така нервно-мускулната координация, се намали значимо у изолираните агресивни мишки след третирането им с М-6, а в по-малка степен, но също видимо – от Р-6, докато у изолирани неагресивни мишки това не се наблюдаваше. Подобно, мускулният тонус, изследван със String тест, също показва интересни различия: изолираните агресивни мишки показаха намален мускулен тонус под влияние на Р-6- третирането, докато под влияние на М-6 мускулният тонус бе слабо повишен спрямо контролните агресивни животни.

Съществен положителен ефект от двата ПМ беше наблюдаван върху двигателната координация у социално изолирани мишки, (rota rod тест) след тридневно третиране на изолирани животни, неразвили агресия, от което можем да заключим, че агресивното поведение може да е свързано с променена реактивност към пептидомиметиците. Фактът, че ефектите на изследваните вещества при агресивни животни са в посока значимо намаляване двигателната координация, докато ефектите при неагресивните са противоположни, може да означава, че изследваните ПМ повлияват невромедиатори с директно отношение към моториката.

Мускулният тонус, изследван доста по-късно във времето, на 7^{ми} ден след последното третиране със веществата, дава още по-интересни различия, този път и в зависимост от това кое съединение е приложено. Различията в ефектите на двата изомера са налице при изследване влиянието им върху мускулния тонус на социално изолираните животни което, ни насочва към извода, че е възможно съществуването на различни прицелни рецептори, за двата позиционни изомери. Прави впечатление още, че резултатите от изследването на мускулния тонус показват силно намалена способност на социално изолираните животни, (развили или не агресия), да се задържат с предните си лапи за опънатата тел, което говори за намален захват, или намален мускулен тонус, в сравнение с групово отглежданите животни.

Вероятно, с течение на времето, повлияването на моториката от веществата се осъществява от различни таргетни за М-6 и за Р-6 невронални рецепторни структури. В нашите изследвания открихме, че двата изомера имат модулиращо действие върху мускулния тонус на животните в зависимост от това дали са групово-отглеждани, или социално изолирани, също в зависимост от това дали социално изолираните са развили или не агресивно поведение. При агресивните животни ефектите на двата изомера са противоположни един на друг, както по отношение на мускулния тонус, и по отношение двигателна координация (време на задържане на въртящия се лост) – като М-6 намалява престоя на животните върху въртящия се лост, а удължава времето на захващане за телта. Обратното се наблюдава под действие на Р-6 – изоникотинамидният изомер удължава времето на престой на агресивните мишки върху Rota rod, а намалява мускулния им тонус, както е видно от String – теста. В този ред на мисли, удачно би било да сметнем, че двигателната координация и балансирането на животните върху въртящия се лост са в обратна зависимост с мускулния тонус на животните, след като балансирането намалява с увеличаването на мускулния тонус.

1. Относно ефекта на социалната изолация върху ориентировъчното поведение, нашите резултати потвърждават вече описани характерни особености на социално изолираните гризачи, а именно засилена изследователска активност на Hole-board. Прави впечатление, че на първия ден след първоначалното поставяне на животните върху хол-борда,

мишките – изолати се отличават със запазена хабитуация в рамките на трите изследвани минути, макар да е увеличена изследователската активност като цяло и за трите минути от теста. На седмия ден, тестът, проведен с цел да се види дали животните помнят средата, и вече са загубили интерес към дупките на хол-борда, показва, че изолираните агресивни мишки помнят повече. Тяхната изследователска активност в рамките на трите минути е по-близка до тази на контролните групово отглеждани животни (снижаване броя надничания в дупките на хол-борда, в сравнение с първия ден на тестиране). За разлика от тях неагресивните мишки изолати се отличават със също толкова активно надничане по дупките на хол-борда, както е било на първия ден след запознаването им със средата. Тези изключително интересни различия ни дават основание да спекулираме относно значението на тази хиперактивност върху хол-борда у изолирани неагресивни мишки. Дали това означава, че те помнят по-зле в сравнение с агресивните мишки, или дали всъщност агресивните не губят по-бързо интерес към средата, на която попадат, в сравнение с изолираните неагресивни – това са въпроси заслужаващи нашето внимание при тълкуване на резултатите. След като съпоставим резултатите на изолираните животни с тези на групово-отглежданите, се оказва, че типични промени в посока активация има в ориентировъчното поведение върху хол-борда на изолираните мишки особено на първия ден. Наличието на спад в активността върху хол-борда у агресивните мишки на седмия ден, говори според нас по-скоро за по-добра памет в сравнение с неагресивните мишки относно средата, където попадат животните вече трети път.

Ефектите на двата ПМ върху ориентировъчното поведение би трябвало да бъдат оценявани в светлината на получените данни за ефектите от социалната изолация върху изследваните от нас групи животни.

Ако приемем, че изследването с хол-борд е тест за груба преценка на пространствената памет, на първия ден ефектът на М-6 върху изолираните агресивни и неагресивни мишки, е в посока влошаване пространствената памет, за което съдим по увеличени брой надничания в дупките на хол-борда. И двата изомера оказват потискащ ефект върху ориентировъчното поведение на седмия ден, който е по-добре изразен у агресивни гризачи, отколкото при социално изолираните неагресивни. Този факт навежда на мисълта, че социално изолираните агресивни животни се повлияват по-добре от изследваните ПМ в сравнение с неагресивните.

Не можем да изключим и значението на този тест като оценка на тревожността на животните. Възможно обяснение за наблюдаваните от нас резултати би могло да бъде потенциалното анксиолитично действие на първия ден, и потенциално ноотропно действие на изследваните вещества, проявяващо се към 7^{-мия} ден, което се изяснява в различна степен в зависимост от развитието или не на агресивно поведение след социалната си изолация.

2. Според последни съобщения в научната литература, емоционалната памет е влошена у социално изолирани мишки, но авторите не уточняват дали животните са развили или не, агресия [Okada et al. 2014]. Други автори посочват противоположни резултати. Liu и колектив наблюдават подобрена памет при социално изолираните мишки, като обясняват противоречието с Okada и колектив, с ранния период на изолация на своите опитните мишки – в периода на подрастването – веднага след отбиване [Liu et al. 2014]. В нашите опити периодът на изолация започва в полова зрялост – у мишки, завършили периода на подрастването, което може да бъде в подкрепа и на двете противоречиви мнения. Агресивните мишки се отличават със силно влошена памет според Step-through теста, докато изненадващо мишките-изолати без агресивно поведение, бяха с най-добрите паметови показатели, сравнени с тези у контролите групово отглеждани мишки.

Данните ни върху плъхове, изолирани в периода на подрастването си (след отбиването си на 21^{-ви} ден след раждането), също показаха интересни различия в запамятаването, отчетени спрямо групово отглежданите контроли. За ефектите на социалната изолация върху техните показатели за пространствена и емоционална памет – виж следващия раздел от дискусията. Относно ефекта на съединенията върху емоционалната памет на социално изолирани мишки, наблюдавахме следното:

На първия ден М-6 не оказва положителен ефект върху паметта (каквото беше ефектът на ПМ върху групово отглежданите мишки), докато на седмия ден е налице подобряване на паметта. При неагресивните изолирани плъхове наблюдавахме както на първи ден, така и на седмия ден влошено представяне на теста пасивно избягване, спрямо двете групи контроли – групово отглеждани, неагресивни мишки. Това ни дава възможност да считаме, че

пептидомиметикът има различия в ефектите си на фона на променена невромедиация у гризачите със синдром на социална изолация.

Що се отнася до другия изомер - дериват на изоникотиновата киселина, Р-6 влошава паметта на неагресивните животни още на първия ден, макар и в по-малка степен от М-6. На седмия ден обаче, паметта, изследвана с пасивното избягване е много силно влошена в групата неагресивни мишки, третирани с Р-6. За разлика от тях, агресивните изоланти показаха противоположни резултати – силно влошена памет на първия ден, която на седмия ден значително се подобрява спрямо контролите агресивни мишки, и спрямо неагресивните, третирани с Р-6, макар и да не достигат стойностите при контролите групово отглеждани мишки.

Следователно и при социално изолираните агресивни мишки, третирани с двата пептидомиметика, откриваме по-силно подобряващ ефект от никотинамидният изомер върху паметта на изследваните животни, което потвърждава констатацията ни (в раздела за групово отглеждани мишки), че М-6 е с по-силен ефект върху паметта. От друга страна М-6 и Р-6 също силно повлияват запаметяването у неагресивните мишки, но в обратната посока – те го влошават го, като Р-6 има по-изразен ефект, в сравнение с М-6 (на седмия ден). Различията в степента на ефектите им, както и наличието на противоположно действие, са само при неагресивните мишки. При агресивните двата изомера са със еднопосочност в ефектите. Всичко това ни насочва към възможната хипотеза за различен механизъм на действие на позиционните изомери в зависимост от таргетните мозъчни структури. Двете различни лица на синдрома на социалната изолация (с развитие или не на агресия), се характеризират най-вероятно с променена невротрансмисия в конкретни мозъчни структури, в това число и хипокампа. Предполагаме, че този факт, както и позиционната изомерия, са възможни причини за наблюдаваните различия в ефектите на веществата.

Ефектите на социалната изолация върху поведенческите показатели на животните за запаметяване са коментирани по-задълбочено и в следващия раздел от дискусията.

5.3. А.2. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ ПЛЪХОВЕ

Ефектите на веществата върху мускулен тонус и двигателна координация на социално изолирани плъхове не бяха изследвани, тъй като животните след дългосрочната социална изолация бяха доста едри и агресивни и трудни за изследване.

При пресъздаването на експерименталния модел на социалната изолация оформихме две групи изолирани плъхове в експериментите – агресивни, със специфично mouse-killing поведение, и неагресивни. В нашите опити открихме интересни различия в поведенческите реакции на двете групи изолирани животни. При сравнително изследване паметовите функции с Hole-board теста и Step-through теста, двете групи показаха няколко основни различия в поведението си.

1. Съгласно Hole-board теста наблюдавахме, че при неагресивните изолирани плъхове не се развива обичайната хабитуация в рамките на 3 мин (статистически няма разлика между 1^{-та} и 3^{-та} минута), т.е. при неагресивните изолирани животни процесът на хабитуация на 1^{-вия} ден е силно потиснат. Също така, на седмия ден изследователската активност се характеризира с двойно повече надничания в дупките на хол-борда в сравнение с групово отглежданите контроли, а и в сравнение с агресивните плъхове, от което косвено съдим, че пространствената им памет не е толкова добра, колкото при групово отглежданите и развилите агресия след дългосрочната социална изолация плъхове. Активността на изследователското поведение (на 7^{-мия} ден) при агресивните животни е по-ниска, във всички изследвани минути, което е много възможно да означава по-добра пространствена памет в сравнение с тази на неагресивните изолирани плъхове.

Данните, получени от нас относно ориентировъчното поведение също са в съгласие с резултати, докладвани от Weinstock et al. [1978], които съобщават, че плъховете със синдром на социална изолация проявяват засилена изследователска активност, но без да посочват дали са работили с агресивни или неагресивни плъхове със синдром на социална изолация.

2. След тридневното третиране на плъховете с ефективни дози от пептидомиметиците, у агресивните, третирани с М-6 и Р-6, се наблюдаваше засилена активност на седмия ден, което за нас означава или намалена тревожност и от това засилен интерес към

хол-борда, или намалено запаметяване на средата, в която попадат за трети пореден път. Отново тук, както и при мишките, е уместен въпросът дали М-6 и Р-6 притежават анксиолитичен ефект, или по-скоро амнестичен ефект по отношение пространствената памет у агресивните животни. А дали двата ефекта не съществуват паралелно, това на този етап не можем да твърдим със сигурност. Във всеки случай, както и Сандра Файл отбелязва в своя статия за тревожността у мишки, хабитуацията между сесиите на хол-борда, дава полезна информация за заучаването у гризачи [File, 2001]. Ние действително се интересуваме повече от паметовите функции и способността на плъховете Wistar да заучават конкретна обстановка с емоционален стимул (Step-through теста) или без такъв (неутрална среда - хол-борд тест), предвид използвания от нас животински модел (който не е модел на повишена тревожност, какъвто е например с плъхове Wistar-Kyoto). Разбира се, не е изключено освен амнестичен веществата да притежават и анксиолитичен ефект. Това предположение обаче, би се потвърдило с използването на Wistar-Kyoto плъхове като животински модел на тревожност [Jiao et al., 2012].

Междувидовите различия несъмнено също са важни за целите на обсъждането – при мишките на седми ден наблюдаваме понижаване на изследователската активност под влияние на пептидомиметиците, особено у агресивните мишки, докато у агресивните плъхове е обратното – тя се повишава. Обяснение на този феномен вече бе предложено с примера за бензодиазепините и различните им ефекти им върху двигателната активност на групово отглеждани плъхове и мишки. Възможно е веществата, обект на нашите изследвания, да споделят някои фармакологични характеристики с бензодиазепините и при единия вид гризачи (групово отглеждани плъхове) да водят до потискане на двигателната активност, а оттук и на изследователската активност – пълхането на муцунките в дупките на хол-борда, както при агресивните мишки; докато при групово отглежданите мишки и агресивните плъхове – обратен ефект, засилване двигателната им активност.

3. Друга характерна поведенческа особеност у агресивните плъхове, за разлика от неагресивните изоланти беше установена на теста Step-through. Агресивните плъхове, изненадващо, показаха по-добра памет дори от групово отглежданите контроли, докато неагресивните изоланти не помнеха така добре, както групово отглежданите плъхове. Това са напълно противоположни резултати на тези, които получихме при сравняването на степен на запаметяване при Step-through на социално изолираните агресивни и неагресивни мишки. Наблюдаваните различия в изследователското поведение на двете групи изолирани животни, както и различията в запаметяването (емоционалната памет) между двата вида лабораторни гризачи, които сме използвали, най-вероятно се дължат на съществени различия в механизмите на мозъчната невротрансмисия у агресивни и неагресивни плъхове, както и при агресивни и неагресивни мишки със синдром на СИ [V.V. Petkov, 1999].

Агресивното поведение е до голяма степен свързано с лимбичната система в мозъка, осъществяваща многобройни асоциативни и интегративни функции. Голям брой поведенчески реакции, включително агресивното поведение, както и реакциите на тревожност, могат да бъдат свързани с определени структури на лимбичната система – амигдала, хипокамп, хипоталамични ядра. Фактът, че у агресивни мишки и неагресивни плъхове изоланти паметта е по-слаба в сравнение с агресивните плъхове и неагресивните мишки-изоланти, би могъл да се обясни с междувидови различия в невротрансмисията, както и различно повлияване на мозъчните структури в зависимост от период на изолация, сезон на изолация, степен на съзряване на мозъчните структури преди начало на социалната изолация; а твърде възможно и с различна степен на тревожност у животните [Lukkes et al, 2009; Tanas et al., 2015].

Развитието на агресивно поведение при гризачи чрез изолация е свързано до голяма степен с повишаването на концентрацията на кортикостерон в плазмата. Така например при мишки е наблюдавано нарастване с 48% в сравнение с неагресивните групово отглеждани мишки. Известно е, че стресовият хормон кортикостерон има двуфазов ефект върху паметовите функции (първоначално ги стимулира, а по-късно ги уврежда). Не е изключено наблюдаваните различия между изолираните мишки и плъхове, развили и неразвили агресия, да са свързани донякъде и с флуктуациите на кортикостероновите нива и техните модулиращи ефекти върху паметовите функции [Krohn et al 2006, Fitchett et al, 2009].

Когнитивните дисфункции, както при изолирани животни - при гризачите, така и при хора [Caspi et al. 2001], обикновено са израз на изменения в свойствата на невромедиаторните рецептори, като изолацията предизвиква промени във функционирането на неврохимични и невроендокринни механизми [Olivier & Oorschot, 2005, Haller et al 2005, Valzelli 1978, Petkov 1999, 1980, Nelson & Chiavegatto, 2001].

В съгласие с редица автори, ние наблюдавахме промени в паметовите функции и способността за обучение, както и промени в изследователското поведение при агресивните плъхове, в сравнение с групово отглежданите животни. Част от тях, свързани с агресивното поведение имат потвърдителен характер относно ефекта на продължителната социална изолация и предизвиканата агресия върху паметовите функции на животните, както и бе споменато по-горе. Не можем да подминем обаче факта, че съществува голям брой противоречия в литературата по отношение на изследваните поведенчески реакции [Krohn et al. 2006]. Голямата разнородност на експерименталните данни върху плъхове и върху мишки вероятно се дължи на различия в ползваните генетични линии, в условията на експеримента и в постановката на експерименталния модел.

Ефектите и на двата позиционни изомера М-6 и Р-6 върху паметта на агресивни плъхове бяха в посока влошаване запамятаването, за разлика от ефектите на същите вещества върху агресивни мишки, където вече отбелязахме особено положителен ефект на М-6. С този си амнестичен ефект у агресивни плъхове, както и у неагресивни мишки-изоланти, изследваните от нас съединения доказват способността си да модулират паметовите функции у гризачи в различна посока, в зависимост най-вероятно от невротрансмитерния терен у животните.

5.3. В. ИЗСЛЕДВАНИЯ ВЪРХУ МЛАДИ МЪЖКИ И ЖЕНСКИ ПЛЪХОВЕ СЛЕД МАЙЧИНА ДЕПРИВАЦИЯ В КОМБИНАЦИЯ СЪС СОЦИАЛНА ИЗОЛАЦИЯ

В този раздел данните за ефектите на М-6 се обсъждат в светлината на един нов модел на преждевременна и окончателна раздяла с майките (късна майчина депривация), в началото на периода на подрастването у плъховете Wistar, като акцент се поставя на междуполовите различия. За ефекта от лишаването от майчини грижи има редица данни в литературата. В труда си „Майчина грижа и психическо здраве“ Джон Боулди, английски психиатър и психоаналитик посочва за пример първи изследвания на Liddell върху козлета близнаци, едното от които е отделяно от майката за 40 минути всеки ден, докато другото – не. Впоследствие, отделяното от майката козле развива много силна тревожност, изразяваща се в замръзване в един ъгъл на помещението, докато козлето, което не е лишавано от майката стои спокойно и се движи свободно независимо от дразнещия стимул (периодично изгасване на светлините), който нормално води до тревожност у козите [Bowlby, J. (1952). Maternal care and mental health. Bulletin of the World Health Organization].

В литературата изобилстват данни за ролята на ранното отделяне на новородени плъхчета, маймунки и други опитни животни от майките им, за кратко време ежедневно в крехка възраст, докато не са отбити още, т.е. ранна майчина депривация, докато данни за късна майчина депривация след отбиване, съответно по-ранно отбиване и пълно лишаване от майките, са по-малко [Pryce et al., 2005].

Развитието на мозъчните структури у плъха ни най-малко не би могло да се счита за завършено на 21^{-вия} постнатален ден, нито по-късно в ранния адолесцентен период. Следователно очакваме да има промени в поведението и в способността на животните да заучават нови неща, или в тяхната адаптивност. В обзора си за неврохимичните и поведенчески последици от социалната изолация след отбиване у гризачи, Fone и Porkess изтъкват, че тези последици много наподобяват някои ключови характеристики на психичното заболяване шизофрения [Fone and Porkess, 2008]. В тази насока на мисли, нашият комбиниран модел с двойно лишаване от социални контакти: и с майките, и с връстниците, съпоставен с мъжки и женски плъхчета, отглеждани в група със връстниците си, със сигурност ще допринесе за разбирането на поведенческите промени, които настъпват в двата пола подрастващи плъхове при

среден по сила хроничен стрес (социално изолираните) в сравнение с умерено лек такъв (у групово отглежданите, разделени окончателно от майките).

1. Както вече беше коментирано в раздела за ефекти на веществата върху мъжки и женски групово отглеждани подрастващи плъхчета, и тук, при изолираните, в двата пола плъхчета се наблюдава силно влошаване на невромускулната координация на 24^{-тия} час след прилагане на М-6, което може да е свързано с нарушена невропластичност вследствие на по-ранното отбиване (със 7 дни по-рано, на 21^{-ви} ден вместо на препоръчвания от някои автори 28^{-ми} ден след раждането). Нарушената адаптивност на подрастващите плъхове най-вероятно възниква на база лишаването от майките, което само по себе си представлява стрес, макар и лек по степен. У мъжките животни понижаването на времето на престой върху рота-рода беше еднакво и на първия, и на 24^{-тия} час, докато у женските се наблюдаваше много силно понижаване на способността им да се задържат на въртящия се лост 24 часа по-късно. За сравнение, контролните женски на 24^{-тия} час имат обученост в двигателни умения, т.е. плъхчетата са се научили да се задържат за по-дълго при повторно поставяне на вече познатия лост. Прави впечатление, че изолираните плъхчета са с намалено време на задържане върху лоста както на първия час, така и при последващото тестиране ден по-късно, като това важи само за мъжките плъхчета. У женските изолирани контроли се установява по-дълго време на задържане спрямо групово отглежданите контроли, което време обаче силно се намалява под действие на тридневното третиране М-6 и ефектът на веществото е сходен с ефекта му върху женските групово-отглеждани плъхчета, а именно - потисната двигателната координация у женските плъхове. Следователно, ефектът на М-6 анулира обучимостта у женските животни. Важно е да отбележим, че у мъжките животни ефектите на веществата са също така потискащи двигателната координация, или обучението в двигателни умения.

Междувидовите различия в ефектите на веществата се затвърдиха при тестовите за невромускулна координация. И двата ПМ повлияват положително мускулния тонус и нервно-мускулната координация у мишки, докато при групово отглеждани плъхове е видно, че и двете вещества са с противоположен ефект – потискащ. По друг начин стоят нещата с агресивните и неагресивните мишки изоланти. Причини за междувидовите различия и за различията между двата подвида мишки изоланти (изявили агресия, или неагресивни), могат да бъдат съществуващи разлики в рецепторната експресия и невротрансмитерните механизми на централно ниво, които от своя страна могат да бъдат променени малко или много, според „физиономията“ на синдрома на социалната изолация.

2. Ориентировъчното (изследователско) поведение при женските е по-силно изразено, отколкото при мъжките колективни животни (очаквано, и според литературни данни – [Lynn & Brown, 2009], докато при социално изолираните плъхчета, разликите между двата пола са пренебрежимо малки. Следователно изолацията води до промени в изследователското поведение, в посока хиперактивност върху хол-борда особено у мъжките изоланти. В литературата има хистоморфологични данни (изследвания върху неврогенеза в хипокамп), и данни от поведенчески тестове, които са в подкрепа на нашите резултати. Така например Westenbroek и Conrad в техни изследвания изясняват, че пространствената памет у мъжките, за разлика от женските, се уврежда вследствие хроничен стрес, какъвто представлява социалната изолация, докато при женските по-скоро се наблюдава подобрение на пространствената памет [Westenbroek et al. 2004, Conrad et al. 2003].

Приемайки, че с Хол-борд теста ние изследваме памет за обстановка, нашите изследвания потвърждават установеното от току-що споменатите автори за ефект на социалната изолация върху пространствената памет на мъжките плъхове. Предвид засилената хабиутация у женските изолирани плъхове, възможно е това да важи и за женските плъхчета – на третата минута върху хол-борда те имат най-ниска изследователска активност в сравнение с групово отглежданите изследвани животни.

3. Междуполови различия в ефекта на М-6 върху изследователското поведение у млади плъхове Wistar след хронична изолация

При все че няма пълно уеднаквяване с изследователската активност на груповите контроли, все пак, третирането с М-6 значимо понижава засилената у изолираните мъжки

плъхове изследователска активност. Тази находка за нас означава една подобрена хабитуация на мъжките плъхчета, с уговорката отново, че за тревожност, или анксиогенен ефект трудно бихме могли да съдим в този животински модел.

При женските плъхчета се наблюдаваше обратен ефект на веществото – нарушена хабитуация в рамките на трите изследвани минути, което беше в много силен контраст с добрата хабитуация у социално изолираните женски животни. Този може би объркващ пространствената ориентация на женските плъхове ефект на веществото М-6 би могъл да се дължи или на типични за пола различия в невротрансмисията у женските животни, или дори на променена модулация на невротрансмисията от невростероиди, в зависимост от фазата на половия цикъл у женските плъхчета.

Известно е, че женските плъхове достигат полова зрялост на възраст към 5 месечна възраст, като половият цикъл у тях се редува през забележително кратко време, 4 - 6 дена. Не е изключено, социалната изолация и лишаване от родителска грижа, да повлияват в някаква степен настъпването на този полов цикъл, но не сме изследвали в детайли този въпрос. Известно е например, че отглеждането в социална колония с присъствие на бащите, забавя половото съзряване, а също и че бащите играят по-голяма роля в социализацията на младите плъхове, особено в периода на подрастването [Drews et al., 1982].

Британският учен Телма Ловик [2012] в свой обзор за ролята на прогестерона върху женския мозък под стрес изтъква, че цикличните промени в продукцията на прогестерон по време на половия цикъл могат да имат мощен ефект върху тревожността на женските животни, и реактивността им към анксиогенен стрес. Досега, преобладаващото мнозинство от статии и изследвания се фокусират върху мъжки животни за животински модели, като се извиняват с голямата вариабилност на резултатите у женските животни вследствие на саботиращи хормонални влияния [Lovick, 2012]. Ние също, подобно на авторката на проучването за ролята на прогестерона и рецепторите му в ЦНС, смятаме, че в свят, в който половината от населението са жени, различията между половете както в поведенчески аспект, така и по отношение лекарствения отговор, не бива да бъдат повече игнорирани.

4. Социалната изолация оказва полово-обусловено влияние върху паметта на младите Wistar плъхове.

Установихме, че социалната изолация у млади полово зрели плъхове след преждевременно отбиване и окончателна майчина депривация на 21^{-ви} постнатален ден води до полово-обусловени промени в запаметяването, изследвано със Step-through. У мъжките социалната изолация води до подобрена памет, както на първия час, така и особено силно подобрена на 24^{-тия} час. У женските ефектът на социалната изолация върху паметта е противоположен – на първия час няма промени спрямо групово отглежданите контроли, но на 24^{-тия} час паметта е очевидно по-слаба, сравнено с групово-отглежданите, според теста за пасивно избягване Step-through.

Тук става ясно, че корелати между представянето на мъжките изоланти на Hole-board и на Step-through, т.е. между пространствената памет и паметта за аверзивен стимул е трудно да намерим. Възможно е, социалната изолация селективно да уврежда пространствената памет у мъжки животни, а да подобрява емоционалната им памет. У женските ефектът на социалната изолация е възможно да е противоположен – подобрена хабитуация (подобрена памет за обстановка), а нарушена емоционална памет, в сравнение с групово отглежданите плъхове контроли.

Вече изказаното по-горе наше предположение, че веществото М-6 има директен ефект върху серотонинергичната невротрансмисия, намира косвена подкрепа в изследванията за междуполови различия в тази медиаторна система у хора. Така например, някои автори намират засилен отговор спрямо селективните инхибитори на обратния захват на 5-HT (SSRIs), в сравнение с трицикличните антидепресанти (MAOIs) у младите жени, но не и при мъжете, като дават възможно обяснение на междуполовите различия с женските полови хормони, които могат да изиграят пермисивна, или инхибиторна роля в антидепресантната активност, например като засилват отговора към SSRIs, а потискат отговора към TCA [Kornstein

et al., 2000]. В тази връзка, Cosgrove и съавтори предлагат илюстративна схема за междуполовите различия в серотонинергичния синапс. От схемата е видно, че серотониновият транспортер, както и 5-HT_{1A} – постсинаптичните рецептори, са много повече на брой у жените, в сравнение с мъжете [Cosgrove et al., 2007].

5. Третирането с М-6 подобрява емоционалната памет единствено при женските изоланти, докато при групово отглежданите женски ефектът е влошаващ, а у мъжките – групово отглеждани, или изолирани – неутрален.

Въпросът защо у мъжките изоланти ефектът на веществото е неутрален – т.е. няма повлияване в негативна, или положителна посока, докато у женските плъхове паметта се подобрява, вероятно ще намери отговор в междуполовите различия на мозъчните структури у плъха. Предвид, че мъжките плъхове достигат полова зрялост към 60-70 ден, а нашите животни са изследвани около и след тази възраст, възможно е у женските изолирани животни все пак също да настъпват вече циклични промени, които да рефлектират върху невротрансмисията и реактивността към фармакологичния агент.

Не е изключено една от причините женските групово отглеждани животни да се представят след третирането с М-6 толкова зле на теста за пасивно избягване, да се крие във повишена реактивност към фармакологичния агент, така както например е известно, че женските Калифорнийски моногамни мишки, се отличават с хипер-реактивност към глюкокортикоиди в сравнение с мъжките, но при последните това е установено в условия на остър социален стрес [Bambico et al., 2013; Trainor et al., 2010]. Не е ясно обаче дали установеното от Trainor и сътрудници междуполово различие в реактивността към ГКС в моногамния вид мишки, е валидно и при полигамните Wistar плъхове. Допускаме, че е възможно да е така и у плъховете. Освен това, възможно е да има взаимодействие между половите хормони и фармакологичния агент в зависимост от фазата на половия цикъл, което да лежи в основата на междуполовите различия в ефекта на М-6.

От обсъденото дотук има категорични данни за междуполови различия както в ефектите на социалната изолация върху поведенческите показатели на плъховете, така и в ефектите на изследвания пептидомиметик М-6 върху тези поведенчески показатели.

5.4. БИОХИМИЧНИ КОРЕЛАТИ НА КОГНИТИВНИТЕ ПРОМЕНИ В МОЗЪЧНИ СТРУКТУРИ У ГРИЗАЧИ – ПРОМЕНИ ОТ М-6 И Р-6.

Изследването дали има паралел между биохимичните промени в хипокампа (мозъчната структура, свързана тясно с паметта), и влошените паметови показатели у агресивни плъхове, може да предостави нови детайли относно механизмите на увреждащото действие на социалната изолация върху паметта и обучението при бозайници. Освен научно, темата на дисертационния труд има и практическо значение, свързано с възможността за разработване и внедряване на нови фармакологични протектори.

Отдавна е установено, че някои аминокиселини, пиридинови производни и никотинамид, имат защитен ефект спрямо паметовите дефицити при агресия и други ментални увреждания, или предотвратяват паметови и когнитивни нарушения, индуцирани от химични вещества [Yang et al. 2002, Morales P. et al. 2009]. Предполага се, че ефектът им се опосредства от 5-HT-ергичната невромедиация. Нашите изследвания показаха, че новосинтезирани аминокиселинни производни на никотиновата киселина могат значимо да подобрят когнитивните функции у гризачи отглеждани при нормален режим, а също и при агресивни мишки [Tancheva et al. 2006, 2010, Encheva et al. 2009, Stancheva et al. 2010] по неизвестен за сега механизъм.

1. Представените по-горе експериментални данни за промени в поведението на агресивните животни бяха придружени и с тенденция към завишено освобождаване на серотонин у изолираните агресивни животни (както в цял мозък на мишка, така и в хипокамп на плъх), в сравнение с групово отглежданите. По литературни данни промени в серотониновите нива настъпват след социална изолация и в различни други мозъчни структури - префронтална кора, амигдала и хипоталамус у агресивни животни- [Nelson and Chiavegatto, 2001; Olivier and

Oorschot, 2005], и висши маймуни и хора [Valzelli 1978, Maestripieri 2006, Caspi et al. 2001, Haller et al. 2005].

Някои автори считат, че 5-HT-ергичната невромедиаторна система участва в генезата на синдрома на изолация и определя до голяма степен вида и интензивността на поведенчески прояви, присъщи за този синдром [Bibancos et al. 2007]. У мишки с агресивно поведение е установен понижен търновър на серотонина [Chiavegatto & Nelson, 2003]. Също така, скорошно изследване на Мосиенко и сътр, върху генно модифицирани мишки с дефицит на серотонин в мозъка потвърждава, и допълва познанията за импулсивната агресия, като авторите установяват и понижена тревожност на експерименталните мишки [Mosienko et al., 2012]. В съгласие с тези данни ние установихме, че освобождаването на 5-HT в цял мозък на мишки, както и в хипокампа на плъх е само леко завишено у животни с агресивно поведение спрямо групово отглежданите на фона на засилено обратно поемане на 5-HT в агресивните гризачи от двата вида, което явно говори за един повишен търновър на серотонина, който би могъл да корелира или с нормални, или със занижени нива на серотонина и неговите метаболити в мозъчната тъкан. Авторите на горепосоченото изследване наблягат на ключовата роля на серотонина за състояния на агресия и тревожност. Нашите резултати потвърждават това, дори и повече – серотонинът играе много важна роля и за паметовите функции у агресивните животни, което е *оригинално* в нашите данни. При неагресивни плъхове със синдром на социална изолация не се наблюдава подобен повишен търновър, дори напротив – обратното поемане на 5-HT в хипокампа им е най-ниско, дори в сравнение с групово отглежданите контроли. При изследванията си върху синдрома на социалната изолация, В.В. Петков и сътрудници намират понижение на броя и особено на афинитета и активността на 5-HT₁ рецепторите в хипокампа у агресивните плъхове, в сравнение с неагресивните изоланти [Проф. В.В.Петков, дисертация, 1991]. Възможно е тези особености да се в основата на агресивното поведение у плъха. В кратко обобщение за съвременните данни върху серотониновите рецептори в ЦНС и тяхната локализация, функционална роля и възможни техни рецепторни антагонисти и агонисти, Watry и Lu посочват 5-HT_{1A}-рецепторите като добре представени в клетките на хипокампа по сомата и дендритите им, докато 5-HT_{1B} са по-скоро по окончанията на аксоните, т.е. пресинаптични рецептори из ЦНС [Watry & Lu, 2013]. Ние предполагахме, че установените промени в броя и афинитета на мозъчните 5-HT_{1A}-рецептори при плъхове с агресивно поведение са израз на промени на активността на тези рецептори, и че тази активност би могла да търпи модулация под действието на фармакологични агенти като пептидомиметиците М-6 и Р-6, предвид високата липоразтворимост на последните.

Интересно е, че други автори отчитат значително забавяне на търновъра на серотонина в мозъка на агресивни мишки, както и у социално изолирани плъхове. Това е интересен контрапункт спрямо находката ни за повишен търновър на серотонина у агресивни плъхове, причината за който може да се крие в различни сезони на отглеждане на животните в изолация, или в някои междувидови различия в механизмите на агресията у мишки спрямо плъхове Wistar. Наред със забавения търновър на серотонина, в случаите на агресивно поведение, предизвикано от изолация е установено и понижено количеството на есенциалната аминокиселина триптофан, основен прекурсор на серотонина, която постъпва в организма, респ. в мозъка, единствено чрез храната [Проф. В.В.Петков, дисертация, 1991].

Някои автори намират потвърждение в изследванията си за наличие на междувидови различия у мишки спрямо плъхове в серотонинергичните механизми на офанзивната агресия. Така например, понижаването на серотонина от инхибиране на триптофанхидроксилазата (с инхибитор рСРА, р-хлорофенилаланин) у мишки води до потискане на вътревидовата агресия, докато у плъхове до обратното, засилване на агресивното поведение [Kulikov et al., 2012; Carrillo et al., 2009; Vergnes et al., 1986].

В хипокампа са представени не само 5-HT_{1A}, но и различни други изоформи на серотониновите рецептори, описани в литературния обзор, което потвърждава ролята на този невромедиатор за обучението и паметта при афективни състояния.

Освен при плъхове, установихме и при мишки с експериментална агресия промени в познавателните функции, които бяха свързани с изменения в нивата на норадреналин, допамин и серотонин в мозъчна кора [Encheva et al. 2009, Stancheva et al. 2010]. Очевидно състоянията на агресия предизвикват освобождаването и на множество други невромедиатори, както и на

катехоламини, което потвърждава сложността на между медиаторните взаимодействия в мозъка [Petkov V.V. et al. 1999, Miczek KA et al. 2007].

Потвърдихме отново факта, че социалният стрес изиграва решаващата роля в провокирането на агресивно поведение у лабораторни гризачи, а изолацията от околната социална среда може да модифицира някои когнитивни функции, както е доказано при ракообразни [Kaczer et al., 2006]. Счита се, че при гризачи-мишки и при плъхове, агресивното поведение, провокирано от социална изолация до голяма степен се определя и от нарушеното равновесие на процесите на ЦНС за самоотбрана [Olivier and Oorschot, 2005, Haller et al. 2005, Nelson and Chiavegatto, 2001], а настъпилите поведенчески промени у агресивните животни до голяма степен са израз на изменения в броя/свойствата на невромедиаторните рецептори. Това от своя страна отново затвърждава теорията за високата степен на модулируемост на рецепторите на ЦНС и ролята на тяхната активност за възникването на промени в познавателните функции.

От друга страна изследванията не само при бозайници, но и при риби, птици, както и при хора, установяват, че социалните взаимодействия представляват абсолютно необходимо условие за оформянето на нормалното поведение в животинския свят [Olivier and Oorschot, 2005, Haller et al. 2005, Caspi et al. 2001]. Дълбоките промени, настъпващи в основни ендокринни функции в резултат на изолацията, формират особеностите на т.нар. синдром на изолация и свързаната с него агресивност, като биохимичните промени са обичайно съпътствани от анатомофизиологични промени в мозъка. Така напр. паралелно с описаните данни от експериментите, ние регистрирахме намалено относително тегло на мозъка при агресивните, социално изолирани плъхове, в сравнение с групово отглежданите животни. Макар данните за това да не са представени в дисертационния труд, те потвърждават косвено резултатите, които Scaccianoce и съавтори публикуват в кратко съобщение, а именно, че социалната изолация редуцира BDNF (мозъчния растежен фактор) в хипокамп без да променя плазмения кортикостерон [Scaccianoce et al., 2006]. Бедната, еднообразна и статична среда на отглеждане има за естествени последици по-ниско мозъчно тегло и намалена дебелина на кората на главния мозък [Petkov V.V. et al. 1999].

Много интересна находка в нашите изследвания е, че противоположността в ефектите на двата изомерни пептидомиметика върху когнитивните функции е свързана и с разнопосочно повлияване на стимулираното освобождаване на 5-НТ в срезове на цял мозък на мишка (М-6 увеличава, а Р-6 го намалява). Потискащият ефект на М-6 върху двигателната координация е свързан с увеличено отделяне на серотонин от мозъчните срезове, докато пониженото под действие на Р-6 стимулирано отделяне на серотонин се свързва с по-добро представяне на теста у агресивни мишки.

Влияние на пептидомиметиците върху нивата на серотонина (5-НТ) в хипокамп на агресивни плъхове

Важна част от съвременните изследователски стратегии е управляването и фармакологичното модулиране на невромедиаторния синтез и метаболизъм. Известно е, че агресивното поведение при гризачи може да се модулира чрез повлияване нивата на 5-НТ и неговите прекурсори и метаболити [Caspi et al. 2001, Knyshevski et al. 2005, deBoer, SFetal. 2005]. Например с агонисти на серотониновите рецептори [Nelson and Chiavegatto 2001; Olivier and Oorschot 2005] се повлиява 1-В– серотониновия рецептор, който е ключов за медирането на агресивното поведение при мишки [Centenaro LA et al. 2008].

В нашите опити наблюдавахме увеличаване на 5-НТ освобождаване в хипокампа при агресивните плъхове третирани с М-6, което може отчасти да се дължи на активация на пресинаптичните авторецептори за серотонин от М-6. Съединение Р-6 проявява тенденция да приближава стойностите на агресивните плъхове до тези на контролните групови животни.

В същото време и двата пептидомиметика М-6 и Р-6 достоверно понижават обратното поемане на 5-НТ в хипокампа, което вероятно е свързано с повишаване нивата на 5-НТ в синапсите при агресивните третирани плъхове.

Данните показват, че новоизследваните пептидомиметици са ефективни модулатори на 5-НТ метаболизъм, прилагането им води до увеличени нива на 5-НТ при третираните агресивни животни в сравнение с контролните агресивни животни и респ. групови контроли.

Получените нови данни демонстрират способността на новосинтезираните вещества М-6 и Р-6 да променят някои поведенчески параметри, по които можем да съдим за познавателни функции у животните. Съединенията влошават паметта по-изразено при групово отглежданите женски плъхове (налични данни само за М-6) и по-слабо при изолираните агресивни животни, като серотониновото освобождаване е увеличено от М-6, а обратното му поемане – намалено у агресивните плъхове. Механизмът на тези ефекти за сега е неизвестен.

Може да се допусне, в предвид дизайна на М-6, създаден по аналогия на естествени пептидни структури, че веществото М-6 има афинитет към някои невротрансмитерни рецептори в мозъка. От друга страна и двете вещества намаляват достоверно 5-НТ обратно поемане, в сравнение с контролните агресивни и контролните групови животни, което показва, че те са ефективни модулатори на серотониновия метаболизъм.

Тяхната добрата липорастворимост и наличието на никотинови остатъци също предполагат афинитет към ЦНС и вероятно за тях има добър пермеабилитет на липидните мембрани в мозъчните структури, което допринася за тяхното действие върху ЦНС [Tsekova et al, 2008].

Поради присъщата им пептидомиметична природа вероятно е М-6 и Р-6 да имат афинитет към 5-НТ рецептори и /или ацетилхолинови рецептори, без да сме наясно към кои подтипове от двата вида. В предвид, че установените от нас биохимични промени са с характер на тенденции, вероятно влиянията на веществата върху 5-НТ освобождаване и обратно поемане в хипокампа не са единствените фактори, определящи наблюдаваните промени в изследователското поведение и в механизмите на действие на веществата. Най-вероятно тяхното влияние върху 5-НТ предаване в ЦНС е частично. Наред с тези данни, предвид установените данни в литературата за понижено ниво в мозъка на агресивни мишки на триптофан - аминокиселината, която в зависимост от концентрацията си, определя нивото на синтезирания серотонин в мозъка, можем да предположим, че е възможно новоизследваните пептидомиметици да въздействат върху съдържанието на 5-НТ прекурсори, какъвто е триптофана в мозъка, като го изместват от рецепторите.

По-ниското ниво на триптофан в мозъка на агресивни мишки при синдром на изолация в сравнение с групово отглеждани мишки подсказва, че съдържанието на предшественика на серотонина в мозъка е съществен фактор в генезата на агресивното поведение. Предишни наши изследвания показват, че наблюдаваните промени в когнитивните функции на агресивни мишки вероятно са свързани и с други невромедиаторни механизми (нива на биогенните моноамини в мозъка) [Stancheva et al. 2010].

Като миметици на аминокиселини с разклонени странични вериги, новите вещества биха могли също да намаляват образуването на свободни радикали, и да увеличават клетъчния енергиен метаболизъм (според предишни данни). Още един довод в полза на възможен антиоксидантен /неутрален ефект и анксиолитичен ефект от съединенията е фактът, че прилаганите вещества при тридневно третиране, никъде, освен с малки изключения, не водят до потискане на изследователското поведение у животните. Подобна поведенческа находка би могла да бъде резултат на прооксидантна активност в хипокампа. Така например, de Oliveira и съавтори, съобщават за оксидативен стрес в хипокампа у плъхове, анксиогенен ефект и потисната изследователска активност в опитните животни, след хронично третиране в различни дози с витамин А (de Oliveira et al., 2007).

Различията, наблюдавани в ефектите на двете вещества са интересни, и вероятно се дължат предимно на различната им позиционна структурна изомерия, а може би и на вариращ метаболизъм на изомерите, в зависимост от клетките, в които попадат веществата, ако има достатъчно добър невронален пермеабилитет за тях, което не е изключено като възможен път на веществата в ЦНС, предвид добрата им липорастворимост.

Влияние на пептидомиметиците върху електрически стимулираното освобождаване на ACh – опит за обяснение на когнитивните промени у третираните агресивни животни

Установихме, че в хипокампалните срези на третираните с М-6 се наблюдаваше съвсем лека тенденция към завишаване електрически стимулираното ацетилхолиново освобождаване, докато при Р-6 беше намерено по-съществено занижаване стимулираното освобождаване на ACh. Тези ефекти на веществата са аналогични на разнопосочните им ефекти върху серотониновото освобождаване.

Известно е, че някои подвидове агресия са свързани и с промени в холинергичната невротрансмисия [Siegel et al., 2007].

Нашите изследвания показаха, обаче, че на срезове от хипокамп няма съществена разлика в електрически стимулираното отделяне на ацетилхолин у агресивните плъхове спрямо контролите неагресивни. От друга страна обаче, намерихме съществено понижаващо влияние от страна на единия изомер (Р-6) върху ацетилхолиновото освобождаване под електрическа стимулация. Тези резултати биха могли да обяснят донякъде влошаването на емоционалната памет у агресивните третиранни плъхове, което е по-силно у третираните именно с този изомер.

Интересно е обаче да се намери обяснение на това защо М-6, след като не повлиява значимо ацетилхолиновото отделяне, също скъсява латентното време на светло у тестираните за пасивно избягване плъхове спрямо агресивните им контроли. Вероятно тук именно промените върху серотониновия търновър изиграват решаващата роля по отношение емоционалната памет. От резултатите ни е видно, че М-6, за разлика от Р-6 увеличава отделянето на 5-НТ, а подобно на Р-6 намалява обратното му поемане. Следователно, логично е да предположим, че М-6 води до по-голямо наличие на серотонин в синапса, в сравнение с Р-6, който има противоположно, понижаващо действие върху химически стимулираното освобождаване на 5-НТ.

Предполагаме, че М-6 води до по-голямо отделяне на ацетилхолин именно в следствие на стимулирането на отделяне на повече серотонин в хипокампалните срезове. Докато Р-6, понижавайки отделянето на серотонина, води и до понижено отделяне и на ацетилхолин, което има за логично следствие един по-силен амнестичен ефект, в сравнение с М-6. Това се потвърждава от нашите поведенчески резултати у групово отглеждани мишки при оценка на ефекта на Р-6 върху хабитуацията, както и у неагресивните мишки-изоланти при оценка на запаметяването след аверзивен стимул на фона на третиране с Р-6. Особено актуално е потвърждението, което намираме в третираните с Р-6 агресивни плъхове, при които имаме данни за частично нарушена хабитуация (1' върху хол-борда), и за още по-значимо понижение в показателя за памет спрямо агресивните контроли под действие на изоникотинамидния изомер в сравнение с М-6.

По отношение ролята на ацетилхолина за агресивното поведение, известно е, че мускаринови рецептори опосредстват дефанзивната агресия [Siegel et al., 1999]. Фактът, че Р-6 понижава ацетилхолиновото освобождаване ни дава основание да предположим, че този изомер е възможно да оказва серенично (антиагресивно, антипсихотично) действие. Не сме изследвали промени в агресивното поведение под действие на двата пептидомиметика, което е недостатък на нашата работа. Предвид данните за промени в серотонинергичната и ацетилхолинова невротрансмисия в мозъка на лабораторни гризачи с агресия, подобни изследвания биха били оправдани с цел изясняване ефектите на веществата като потенциални антипсихотици.

В заключение и обобщение, наблюдаваните различия в силата и бързината на ефектите на двата изомера М-6 и Р-6 върху поведенческите показатели на групови и социално изолирани мишки и плъхове вероятно се дължат на различия в тяхната фармакокинетика и в скоростта на достигане на мозъчни структури. Вероятно това е поради позиционната структурна изомерия и значението на хиралния фактор в молекулите на пептидомиметиците, което определя и различията в повлияване на мозъчните невромедиатори серотонин и ацетилхолин.

Невромедиаторните механизми на ефектите в хипокамп на агресивни плъхове, се състояха в достоверно повишаване освобождаването на 5-НТ под действие на М-6 докато Р-6 имаше противоположен ефект. Сходни бяха ефектите на двете вещества и върху освобождаването на ацетилхолина от срезове на хипокамп у плъхове с агресия, което потвърждава хипотезата ни за взаимовръзка между двата невромедиатора в хипокамп и ролята им за паметовите процеси.

VI. ИЗВОДИ

1. Новосинтезираните L-валинови пептидомиметици (P-6 и M-6) доза-зависимо подобряват мускулния тонус, невро-мускулната координация и повишават изследователското поведение на групово отглежданите мишки.
2. M-6, при подрастващи плъхове от двата пола, потиска невро-мускулната координация.
3. Двата изомера P-6 и M-6 подобряват паметовите процеси на групово отглежданите мишки, като ефектът на M-6 е по-ясно изразен.
4. M-6 подобрява влошената памет на социално изолираните неагресивни женски плъхове и на социално изолираните агресивни мишки.
5. Двата L-валинови пептидомиметика потискат обратното поемане на серотонин в синаптозомална фракция от хипокампална тъкан на плъх и от цял мозък на мишки, в сравнение с групово отглежданите и социално изолираните агресивни контроли.
6. M-6 повишава, а P-6 потиска стимулираното освобождаване на серотонин в срезове от цял мозък на социално изолираните агресивни мишки и от хипокамп на социално изолираните агресивни плъхове.
7. Ефектите на M-6 и P-6 върху стимулираното освобождаване на ацетилхолин от хипокамп на социално изолирани агресивни плъхове са противоположни: M-6 слабо го повишава, докато P-6 значимо го потиска.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За първи път е показано, че двата новосинтезирани изомерни L-валинови пептидомиметика М-6 и Р-6 модулират паметови функции при агресивни животни. Установено е, че ефектът на М-6 върху паметта на гризачите е зависим от пола и социалната изолация на животните, което демонстрира сложното взаимодействие между биологични, химични и социални фактори.
2. Приносен характер има установяването, че социалната изолация в комбинация с лишаването от майка след отбиване и третиране с М-6, и при двата пола подрастващи плъхове води до влошаване на невромускулната координация, както и до междуполови различия в изследователското поведение и паметовите процеси.
3. За първи път е показано, че М-6 повишава мозъчните нива на серотонин, докато Р-6 има противоположен ефект.
4. Оригинални са данните, че изоникотинамидният изомер (Р-6) потиска електрически-стимулираното отделяне на ацетилхолин от хипокампа, което корелира с негативния ефект на този изомер върху паметовите показатели на агресивните плъхове.
5. Получените данни за ефектите на новосинтезираните изомерни L-валинови пептидомиметици (Р-6 и М-6) имат фундаментално значение, но биха могли да имат и практико-приложно, свързано с по-нататъшното разработване на L-валиновите пептидомиметици като ефективни фармакологични агенти.

VIII. ПРИЛОЖЕНИЯ

8.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Tancheva L., M. Novoselski, **E. Encheva**, V. Petkov, G. Gorneva, D. Tsekova, J. Tchekalarova, I. Gurt, E. Katz, & E. Pavlova, In Vitro & in Vivo Studies on Toxicity & Pharmacological Activity of New L-Valine Peptidomimetics, J. Med.CBR, 2010; I, vol 8:277-284
2. Tancheva L., V. V. Petkov, **E. Encheva**, M. Novoselski, D. Tsekova, Protective Effect of New L-Valine Derivatives on Brain Function in Experimental Model of Aggression in Mice after Social Isolation, J. Med.CBR, 2010; I, vol 8:270-276, ISBN 978-954-9993-91-2
3. Stancheva S., L. Alova, L. Tancheva, V. V. Petkov, **E. Encheva**, D. Tsekova, M. Novoselski, Learning, Memory & Biogenic Amine Levels in Rat Hippocampus after Treatment with New L-Valine Derivatives, J. Med.CBR 2010; I, vol 8:293-297
4. Tancheva, L., **Encheva, E.**, Novoselski, M., Petkov, V., & Klisurov, R. (2012). Sex-dependent effect of a new peptidomimetic on cognitive function of isolated rats after maternal deprivation. In Proceedings of the X. National Congress of Bulgarian Society for Physiological Sciences (p. 19- 21).
5. Tancheva, L. P., **Encheva, E. N.**, Tsekova, D. S., Alova, L. G., Stancheva, S. L., Petkov, V. V., ... & Klisurov, R. (2012). New L-valine peptide mimetics as potential neuropharmacological agents. BULGARIAN CHEMICAL COMMUNICATIONS, 44(3), 262-266 IF=0,349(2013)
6. Tancheva, L., **Encheva, E.**, Alova, L., Belova, N., Klisurov, R., Novoselski, M., ... & Tsekova, D. (2013) Effects of newly synthesized peptide mimetics on exploratory behaviour, memory & serotonin release in hippocampus of rats with social isolation syndrome. Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci, Vol 66, No 1, pp.133-138 IF=0,211 (2012)
7. **Eleonora Encheva**, Lyubka Tancheva, Liana Alova, Radoslav Klisurov, Nina Belova, Daniela S. Tsekova, Vesselin V. Petkov Pharmacological modulation of serotonin levels in hippocampus of socially isolated rats. Archives of the Balkan Medical Union, 2013, vol. 48, no. 3, pp. 295-299 SJR=0,16 (2013)
8. Tsekova, D. S., Klissurov, R., Tancheva, L., **Encheva, E.**, & Genadieva, M. (2013). The Influence Of Solvents On The Molecular Structure & Biological Activity Of N,N/-Bis (N-Nicotinoyl-L-Valyl)-Diaminohexane. Journal of Chemical Technology & Metallurgy, 48(6), 637-641.

8.2. НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Eleonora N. Encheva**, Lyubka P. Tancheva, Liana G. Alova, Lyudmila I. Shikova, Maria I. Kaneva, Radoslav Ts. Klisurov, Daniela S. Tsekova, Vesselin V. Petkov, Novel L-valine peptidomimetics modulate cognition & neurotransmission in hippocampus of socially isolated rodents, VII National Congress on Pharmacology 17 – 10 October 2014, Pleven. Journal of Biomedical & Clinical Research, 2014, Volume 7, No.1, Suppl.1, p.21.
2. **Eleonora N. Encheva**, Lyubka P.Tancheva, Miroslav T.Novoselski, Radoslav Ts.Klisurov, Vesselin V. Petkov, Daniela S.Tsekova Novel peptidomimetic affects cognition of young socially isolated rats, VII National Congress on Pharmacology 17 – 10 October 2014, Pleven. Journal of Biomedical & Clinical Research, 2014, Vol.7, No. 1, Supplement 1, page 22.
3. Liana Alova, Lyubka P. Tancheva, **Eleonora N. Encheva**, Radoslav Ts. Klisurov, Daniela S. Tsekova Modulation of serotonin levels in hippocampus of socially isolated rats by new l-valine peptidomimetics, VII National Congress on Pharmacology 17 – 10 October 2014, Pleven. Journal of Biomedical & Clinical Research, 2014, Volume 7, Number 1, Supplement 1, page 23.

4. Alova, L., Tancheva, L., **Encheva, E.**, Klisurov, R., & Tsekova, D. (2014, September). New L-valine peptide mimetics can modulate serotonin levels in hippocampus of socially isolated rats. (33rd European Peptide Symposium, Sofia, Bulgaria) In *Journal of Peptide Science* (Vol. 20, pp. s164-s165). 111 River St, Hoboken 07030-5774, NJ USA: Wiley-Blackwell. **IF 1,86**
5. **Encheva, E. N.**, Tancheva, L. P., Alova, L., Shikova, L., Kaneva, M., Klisurov, R., & Tsekova, D. (27th ECNP Congress 18-21 October 2014. Berlin, Germany) P. 1. g. 068 Effect of L-valine peptidomimetics on cognition and neurotransmission in the hippocampus of socially isolated rats. *European Neuropsychopharmacology*, 24, S 243. **IF 5,39**
6. Stoeva, S., **Encheva, E. N.**, Tancheva, L. P., Klisurov, R., Georgieva, A., Pajpanova, T., & Kalfin, R. (27th ECNP Congress 18-21 October 2014. Berlin, Germany). P. 1. g. 101 Effects of two new neuropeptides with short chains on cognitive functions of mice. *European Neuropsychopharmacology*, 24, S 263. **IF 5,39**
7. **Encheva, E.N.**, L.P. Tancheva, M. Novoselski, V.V. Petkov, R. Klisurov (2014, July) P 2. 130 Effect of a new peptidomimetic on cognition of socially isolated rats after maternal deprivation. 20th Biennial meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (ISDN), Montreal, Canada.
8. **Encheva, E.**, Tancheva, L., Alova, L., Petkov, V. V., Klissurov, R., Novoselski, M., Tsekova D. & Belova, N. (2013). P. 1. g. 080 Modulation of cognitive function and 5-HT hippocampal levels in socially isolated rodents after peptidomimetic treatment. *European Neuropsychopharmacology*, 23(Supplement 2). **IF 5,39**
9. Novoselski, M., **Encheva, E.**, Tsekova, D., Klissurov, R., Stoeva, S., & Tancheva, L. (2013). P. 8. a. 002 Pharmacological effects & toxicity of newly synthesised peptidomimetic compounds. *European Neuropsychopharmacology*, 23 (Supplement 2). **IF 5,39**
10. Klisurov, R., **Encheva, E.**, Tancheva, L., Shikova, L., Alova, L., Kaneva, M., & Tsekova, D. (2013). P. 1. g. 073 Modulation of 5-HT-Ach interactions in the hippocampus by newly synthesised peptidomimetics in an experimental model of aggression in rats. *European Neuropsychopharmacology*, 23(Supplement 2), S232-S233. **IF 5,39**
11. **E. Encheva**, M. Novoselski, L. Tancheva, V. V. Petkov, R. Klisurov (2011) DO3. Effect of amino acid derivative on cognitive function of socially isolated rats after maternal deprivation The second workshop *Experimental Models & Methods In Biomedical Research Program & Abstracts* May 16 -18., Sofia, IEMPAM, BAS, pp21-22.
12. **Encheva, E.**, Tancheva, L., Novoselski, M., & Petkov, V. (2011). P. 1. g. 031 Protective effect of L-valine derivative on declined cognitive function in isolated rats with early maternal deprivation. *European Neuropsychopharmacology*, 21, S346 **IF 5,39**.
13. **Encheva, E.**, Stancheva, S., Alova, L., Tancheva, L., Petkov, V. V., & Tsekova, D. (2010). P. 1. c. 048 Modulating effect of new L-valine derivatives on brain serotonin uptake in aggressive socially isolated mice. *European Neuropsychopharmacology*, 20, S262-S263 **IF 5,39**.
14. **Encheva, E.**, L. Tancheva, M. Novoselski, V. Petkov, J. Tchekalarova, G. Gorneva, D. Tsekova, I. Gurt, E. Katz, Neuropharmacological activity of new L-valine peptidomimetics - in vitro & in vivo studies, 22nd ECNP Congress, 12-16 Sept 2009, Istanbul, Turkey, *J. Eur. Neuropsychopharmacol*, vol. 19, Suppl. 3, S 260-2, ISSN: 0924-977X **IF 5,39**
15. **Encheva, E.**, M. Novoselski, L. Tancheva, V.V. Petkov, S. Stancheva, L. Alova, D. Tsekova, Protective effect of new l-valine derivatives on brain function in experimental model of aggression in mice, 22nd ECNP Congress, 12-16 Sept 2009, Istanbul, Turkey, *J. Europ. Neuropsychopharmacol*, vol. 19, Suppl. 3, S 323-324, ISSN: 0924-977X **IF 5,39**

8.3. УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД И НАГРАДИ

3.1. Проект към ХТМУ и БАН: “Синтез на нови нискомолекулни производни на валина и триптофана - изследване на техните физико-химични свойства, токсичност и биологична активност.” **Дог. 10654/2008-2010**

3.2. Изследователски проект към СМН, Медицински Университет София – 2010/2011, с ръководител доц. Н. Белова: Договор 21/2011 **Когнитивни нарушения и биохимични корелати в хипокамп на плъхове с експериментална агресия.** Механизми на защитно действие на новосинтезирани аминокиселини; в СБОРНИК Резюмета на изследователски проекти 2010-2011 Медицински Университет – София, Отдел „Наука“ - Бюджетно финансирани проекти на медицински научни изследвания, стр.74-75, с **отлична оценка**

3.3. Грант за участие в 20-та конференция на International Society for Developmental Neuroscience в Монреал, Канада – Development, Functions & Disorders of the Nervous System - 19-24 юли, 2014 - с постер на тема „Effect of a new peptidomimetic on cognition of socially isolated rats after maternal deprivation”

IX. БЛАГОДАРНОСТИ

Преди всичко бих искала да изкажа дълбоката си признателност към моя научен ръководител за търпението, насърчението, безрезервната подкрепа и вярата, която ми беше за пример и мотивация през всичките години работа.

Също съм много благодарна специално на Проф. Рени Калфин, директор на Института по Невробиология, Проф. Стиляна Белчева, Проф. Веселин В. Петков, както и на колегите биолози от института, Людмила Шикова, Лиана Алова и химикът Мария Кънева, без които съществената биохимична част от разработката би била невъзможна.

Много благодаря и на Доц. Н. Белова, Проф. Р. Гърчев, Доц. Даниела Цекова, и на колегите Д-р Мирослав Новоселски и ас. Радослав Клисуров за ценните напътствия, техническа и морална подкрепа.

Последно, но не и по важност, искрено благодаря на моите родители и семейство, на които посвещавам своя труд.