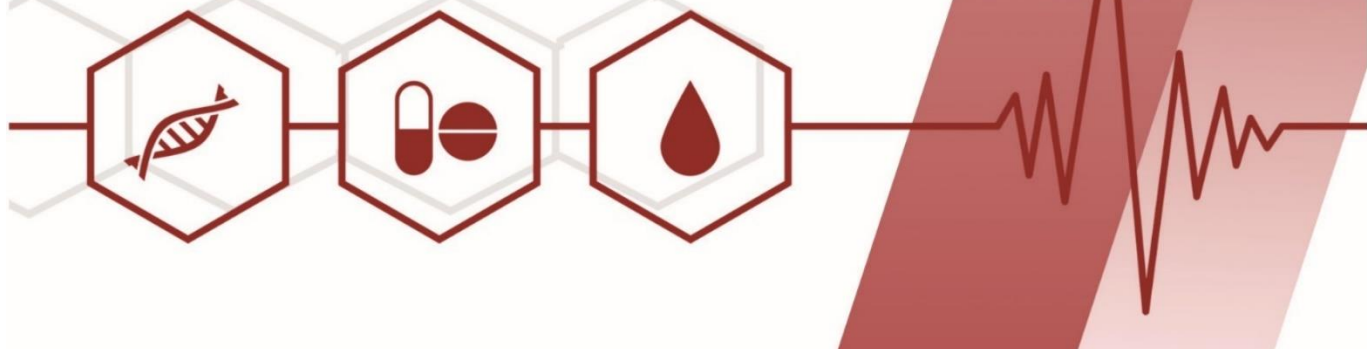




VIII НАЦИОНАЛЕН КОНГРЕС ПО ФАРМАКОЛОГИЯ, КЛИНИЧНА ФАРМАКОЛОГИЯ И ТЕРАПИЯ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ

*„ФАРМАКОЛОГИЯТА – ОТ ЕКСПЕРИМЕНТА
КЪМ КЛИНИКАТА”*
15-17 ноември 2024 г.

СБОРНИК ДОКЛАДИ



**„VIII Национален конгрес по фармакология, клинична фармакология и терапия“
„Фармакологията – от експеримента към клиниката”, 15-17 ноември 2024 г.**

Проф. д-р Галя Ставрева, д.м. - **Главен Редактор**
Проф. д-р Людмил Пейчев, д.м.н. – **Зам. Редактор**

Научен комитет/Рецензенти/:

Проф. д-р Добрин Свиначов, дмн
Проф. д-р Румен Николов, дм
Проф. Георги Момеков, дфн
Доц. д-р Илия Костадинов, дм
Проф. д-р Иванка Костадинова, дм
Проф. д-р Емил Христов, дф
Доц. д-р Диана Пендичева, дм
Проф. д-р Мария Ганева, дм
Доц. д-р Любина Тодорова, дм
Гл. ас. д-р Ива Първова, дм
Доц. Даниела Пехливанова, дм
Доц. д-р Силвия Маринова, дм

Силвия Емилева - **Предпечат**
© Издателски център МУ - Плевен, 2024
Сборник Доклади, Първо издание

ISBN 978-954-756-354-4 /pdf/

CONTENT

- 5 NIGELLA SATIVA OIL ALLEVIATES PAIN IN PACLITAXEL-INDUCED NEUROPATHY IN RATS
Aras Budak, Anita Mihaylova, Nina Doncheva, Mariana Katsarova, Mariya Vlasheva, Stela Dimitrova, Kostadin Gabrov, Delian Delev, Iliia Kostadinov
- 12 NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF GLP-1 RECEPTOR AGONIST TREATMENT – FUTURE PERSPECTIVES
Boris Dinkov, Evgeniya Tsoleva, Veselin Dinkov, Plamena Panayotova, Venka Tsankova, Galya Stavreva
- 20 EFFECT OF TANACETUM VULGARE ESSENTIAL OIL ON SERUM BIOCHEMICAL PARAMETERS
Borislava Lechkova, Petar Telbiyski, Michaela Shishmanova-Doseva, Kalin Ivanov, Niko Benbassat, Stanislava Ivanova, Zhivko Peychev
- 25 EFFECT OF TANACETUM VULGARE ETHANOL EXTRACT ON COGNITIVE FUNCTIONS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF SCOPOLAMINE-INDUCED AMNESIA
Borislava Lechkova, Michaela Shishmanova-Doseva, Kalin Ivanov, Niko Benbassat, Stanislava Ivanova, Zhivko Peychev, Katya Petrova
- 32 EFFECTS OF GLP-1 RECEPTOR AGONIST SEMAGLUTIDE ON GUT MICROFLORA IN RATS WITH EXPERIMENTAL MODEL OF OBESITY
Venelin Denchev, Teodora Handjieva-Darlenska
- 37 EFFECT OF GR 159897 ON COLONIC MOTILITY IN RATS AFTER ACUTE WATER AVOIDANCE STRESS
Venka Tsankova, Gergana Toteva, Evgenia Tsoleva, Boris Dinkov, Plamena Panajotova, Galya Stavreva
- 45 LEVETIRACETAM, BRIVARACETAM, SELETRACETAM AND SV2A IN THE THERAPY OF EPILEPSY
Georgi Maximov, Lyubina Todorova, Bogdan Kirilov
- 63 SPECIALIZED ANTI-INFLAMMATORY PHARMACOTHERAPY IN THE PATHOGENESIS OF CYTOKINE STORM IN SARS-COV-2 AND COVID-19
Georgi Maximov, Lyubina Todorova, Bogdan Kirilov
- 75 BENZIMIDAZOLE METAL COMPLEXES WITH ANTITUMOUR ACTIVITY
Gergana Georgieva, Luiza Sokolova
- 81 REAL WORLD DATA AND REAL WORLD EVIDENCE AND THEIR PLACE IN EVIDENCE BASED MEDICINE
Gergana Lazarova, Lyubina Todorova
- 84 OREXIN-1 ANTAGONISTS IN THE THERAPY OF PANIC DISORDER
Desislava Karatopraklieva, Silvia Gancheva
- 91 A CLINICAL CASE OF RESISTANT HYPERGLYCEMIA AND LIVER INJURY IN AN ELDERLY PATIENT WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA
Evgeniya Tsoleva, Antonio Antonov, Boris Dinkov, Plamena Panayotova, Genka Krasteva, Galya Stavreva
- 96 COMPARATIVE STUDY OF ANTIOXIDANT EFFECTS OF RESVERATROL AND RESVERATROL-LOADED NANOPARTICLES IN SCOPOLAMINE INDUCED DEMENTIA IN RATS
Elina Tsvetanova, Almira Georgieva, Miroslava Stefanova, Krasimira Tasheva, Lyubomira Radeva, Krassimira Yoncheva, Maria Lazarova
- 105 RETROSPECTIVE STUDY ON THE DRUG UTILIZATION OF BIOSIMILAR MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING MONOCLONAL ANTIBODIES IN BULGARIA
Emanuil Yordanov, Stefka Stoyanova, Nikolay Nachev, Iva Parvova
- 119 MOLECULAR DOCKING STUDY OF ISATIN DERIVATIVES AS POTENTIAL INHIBITORS OF KEY BACTERIAL ENZYMES
Ivelin Iliev, Kaloyan Mihalev, Svetlana Georgieva

- 128 EXPERIMENTAL STUDY ON THE EFFECTS OF COMBINED PLANT EXTRACTS ANTISTRESS I AND ANTISTRESS II IN AN ACTIVE AVOIDANCE MEMORY TEST
Ilin Kandilarov, Hristina Zlatanova-Tenisheva, Natalia Vilmosh, Maria Georgieva-Kotetarova, Stela Dimitrova, Mariana Katsarova, Iliia Kostadinov, Delian Delev
- 136 MARKETING AUTHORISATION OF MEDICINAL PRODUCTS – STATE OF PLAY AND WAY FORWARD THE ROLE OF THE BULGARIAN DRUG AGENCY
Lyubina Todorova
- 145 EFFECT OF CANNABIDIOL ON LEARNING AND MEMORY IN EXPERIMENTAL MODEL OF IMPAIRED MEMORY
Maria Georgieva-Kotetarova, Iliia Kostadinov, Ilin Kandilarov, Hristina Zlatanova-Tenisheva, Natalia Vilmosh, Delian Delev
- 152 PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF MOMORDIN IC – A REVIEW
Melis Ahmedova, Mehmed Reyzov, Silvia Gancheva
- 159 KOCHIA SCOPARIA SEED INFUSION IMPROVES TRIGLYCERIDES LEVELS AND GLUCOSE TOLERANCE IN RATS ON HIGH CALORIE-DIET
Mehmed Abtulov, Silvia Gancheva, Miroslav Eftimov, Milena Todorova, Stefka Valcheva-Kuzmanova, Maria Zhelyazkova-Savova
- 167 LIRAGLUTIDE ALLEVIATES NEUROPATHIC PAIN AND MITIGATES COMPULSIVE BEHAVIOR IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC MICE
Milen Hristov, Natasha Ivanova, Pavlina Gateva
- 174 APPROACHES TO EXPOSURE ASSESSMENT OF COSMETIC PRODUCTS AND COSMETIC INGREDIENTS - SYSTEMATIC REVIEW AND SCOPING REVIEWS
Nikolay Nachev, Stefka Stoyanova, Emanuil Yordanov, Emil Hristov, Iva Parvova
- 184 TREATMENT OF ACUTE COUGH IN CHILDREN: RECOMMENDATIONS AND REALITY
Nikolinka Koleva, Nedyalko Nedyalkov, Lyudmila Filipova, Galya Stavreva
- 194 COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECT OF U-74389G AND PREDNISOLONE IN AMIODARONE-INDUCED PULMONARY TOXICITY
Plamen Krastev, Violeta Dancheva, Galya Stavreva
- 205 INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF MANGANESE (III) TETRAKIS (4-BENZOIC ACID) PORPHYRIN IN LUNG HOMOGENATE IN AMIODARONE-INDUCED RAT TOXICITY
Plamena Panayotova, Boris Dinkov, Venka Tsankova, Evgenia Tsoleva, Nikolinka Koleva, Galya Stavreva
- 214 IMMUNOTHERAPY IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER – THE NEW THERAPEUTIC APPROACH
Simeon Ivanov, Jeliiazko Arabadjiev, Eliz Tazimova, Georgeta Bocheva
- 217 COMPARATIVE ANALYSIS BETWEEN PHARMACOVIGILANCE AND COSMETOVIGILANCE
Stefka Stoyanova, Emanuil Yordanov, Nikolay Nachev, Emil Hristov, Iva Parvova
- 224 PHARMACOLOGICAL MODULATION OF MITOCHONDRIAL FUNCTIONS IN DIABETES
Hashim Hashimov, Antoan Rangelov

NIGELLA SATIVA OIL ALLEVIATES PAIN IN PACLITAXEL-INDUCED NEUROPATHY IN RATS

Aras Budak¹, Anita Mihaylova², Nina Doncheva², Mariana Katsarova³, Mariya Vlasheva³, Stela Dimitrova^{3,4}, Kostadin Gabrov⁵, Delian Delev⁶, Iliia Kostadinov⁶

¹Faculty of Medicine, Medical University of Plovdiv, Bulgaria

²Department of Pharmacology, Toxicology and Pharmacotherapy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Plovdiv, Bulgaria

³Department of Bioorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Plovdiv, Bulgaria

⁴Research Institute, Medical University of Plovdiv, Bulgaria

⁵Clinic of Cardiosurgery, St George University Hospital, Plovdiv, Bulgaria

⁶Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Faculty of Medicine, Medical University of Plovdiv, Bulgaria

ABSTRACT

Objective: to investigate the pain-relieving properties of *Nigella sativa* oil (NSO) in an experimental model of paclitaxel-induced neuropathy.

Material and methods: Male Wistar rats were randomly divided into 6 groups (n=8): saline, negative control (paclitaxel), positive control (gabapentin) and three experimental groups treated with NSO 1; 3 and 5 ml/kg. Paclitaxel (2 mg/kg) was injected every other day to a cumulative dose of 8 mg/kg. Thereafter, rats were treated with NSO or gabapentine for 14 days. Thermal hypersensitivity (plantar test), cold and mechanical allodynia were tested. Criteria for analgesic effect were increase in withdrawal latency in plantar and cold plate test at 60, 120 and 180 minute and the lack of response to needle touch, respectively. High performance liquid chromatography was used for quantitative determination of thymoquinone in the oil.

Results: The amount of thymoquinone in NSO was 21.37 ± 0.38 mg/ml. Paclitaxel notably decreased latency in both tests employing thermal stimuli and rapid remove of the paw in response to needle touch was observed. In plantar test significant increase in latency in comparison with negative control was recorded in NSO treated animals at 180 minutes. In cold plate NSO treatment led to an increase in withdrawal latency at 60, 120 and 180 minutes. Rats in all experimental groups demonstrated less response to needle touch when compared with negative control. There was no statistical difference in the effect between gabapentin and NSO treated rats in all tests.

Conclusion: NSO exerts analgesic effect that is comparable to that of gabapentin.

Keywords: neuropathy, analgesia, thymoquinone, allodynia

Introduction

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is a common adverse effect associated with anticancer therapies. This neuropathic condition frequently arises in patients undergoing treatment with a variety of first-line chemotherapeutic agents, including taxanes, vinca alkaloids, cisplatin, proteasome inhibitors, and targeted monoclonal antibodies [1]. CIPN may require a reduction in the dosage of the chemotherapeutic agent or, in some cases, the cessation of treatment, necessitating the substitution of the recommended therapeutic agent with an alternative. Neuropathic pain associated with CIPN can persist after therapy, significantly impacting patients' quality of life. The predominant symptoms of CIPN include hypersensitivity to cold and mechanical stimuli. Paclitaxel, one of most used anticancer drugs, is commonly associated with CIPN [2].

Nigella sativa (NS), a widely used medicinal plant has a long history of therapeutic use, supported by extensive scientific research. This herb is well-recognized for its diverse pharmacological properties, including analgesic, neuroprotective, anticancer, anti-inflammatory, antidiabetic, antiepileptic, and antioxidant effects. These therapeutic benefits are primarily attributed to its broad-spectrum alkaloid composition, with thymoquinone being the predominant bioactive compound [3]. In a rat model of neuropathic pain induced by chronic compressive injury of the sciatic

nerve, administration of NS ethanolic extract demonstrated significant analgesic properties [4]. A recent clinical study has shown that NSO possesses an alleviating effect on neuropathic pain in diabetic patients [5]. However, the effects of Nigella sativa oil (NSO) on neuropathic pain have yet to be elucidated. Previous preclinical research has demonstrated that thymoquinone has antinociceptive and anti-inflammatory effects [6, 7]. It has been shown to confer therapeutic benefits in reducing experimental neuropathic pain following spinal cord injury [8]. Thymoquinone is a benzoquinone derivative characterized by its hydrophobic properties. Due to its limited lipid solubility, thymoquinone exhibits poor absorption and low bioavailability [9]. This pharmacokinetic limitation poses a significant barrier to its clinical application, despite its demonstrated neuroprotective effects and potential efficacy in managing neuropathic pain. Nigella sativa oil is a natural multi-compound formulation in which thymoquinone is naturally emulsified. This characteristic represents a significant advantage of phytotherapeutic products, as it enhances the bioavailability of active compounds while minimizing the risk of toxicity. Such formulations contribute to the diverse biological effects observed in medicinal plants, supporting their therapeutic potential across various applications.

Various pharmacological groups, including nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), opioids, antidepressants and antiepileptic drugs, have been employed with varying degrees of success in the treatment of neuropathic pain. Despite all previous investigations, only a few studies have compared the analgesic properties of NSO to other drugs used for pain management of neuropathic pain. Gabapentin (GBP) is a well-established drug used in the management of neuropathic symptoms; however, it is associated with significant adverse drug reactions which limits its therapeutic use [10].

Therefore, we aimed to investigate the protective effect of NSO against paclitaxel-induced neuropathic pain and to compare it with those of gabapentin.

Material and methods

Drugs reagents

Paclitaxel (Bulgermed), Gabapentin (Pfizer), Nigella sativa oil (Bioherba), Thymoquinone for HPLC (Sigma-Aldrich)

Ethical statement

All experiments were conducted in compliance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes.

Permission for this study was obtained from the Ethics Committee at the Medical University of Plovdiv, Bulgaria, under protocol № 3/7.04. 2022, as well as from the Animal Health and Welfare Directorate of the Bulgarian Food Safety Agency, permit № 328/09.12.2021.

High-performance liquid chromatography (HPLC)

The HPLC system was composed of a ProStar 230 solvent delivery module and photodiode array detector model 335 and Hitachi C18 AQ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. For identification of thymoquinone, the mobile phase H₂O (A) with pH 3.0 and acetonitrile/methanol in ratio 40:60 (B) was used in the following gradient mode - 0-7 min. 50A:50B; 7-14 min. 50A:50B - 20A:80B., 14-20 min. 20A:80B - 10A:90B, 20-23 min. 10A:90B - 50A:50B, 23-25 min. 50A:50B - 50A:50B, flow rate 1.0 ml/min and detection at 254 nm. The compound was identified by both retention time and comparison of its absorption spectrum with standard substance and was quantified using a calibration curve.

Animals and experimental design

In this study, adult male Wistar rats (body weight: 200 ± 20 g) were utilized. The animals were housed under standardized laboratory conditions, with a 12-hour light-dark cycle, an ambient temperature of 22 ± 2°C, and relative humidity maintained at 55 ± 5%. Food and tap water were provided ad libitum. Prior to the experimental procedures, the rats underwent a period of acclimatization to the laboratory environment, and all experiments were conducted during the light phase of the 12-hour light-dark cycle.

To assess the analgesic activity of Nigella sativa oil the animals were randomly divided into six groups (n=8).

Group 1: saline 1 ml/kg bw

Group 2: PTX (negative control) 2 mg/kg bw

Group 3: PTX + Gabapentin (positive control) 60 mg/kg bw

Group 4: PTX + NSO 1 ml/kg bw

Group 5: PTX + NSO 3 ml/kg bw

Group 6: PTX + NSO 5 ml/kg bw

PTX was administered at a dose of 2 mg/kg (intraperitoneal injection) every other day until a cumulative dose of 8 mg/kg was reached. Following this regimen, the rats were treated with either NSO or gabapentin, both given orally for a period of 14 days.

Nociceptive test

Plantar Test (Hargreaves' Method): Nociceptive thresholds to thermal stimuli were assessed using a plantar test apparatus (Ugo Basile, Italy). Animals were individually placed in transparent plastic chambers and allowed a 5-minute habituation period prior to testing. A small cylinder with an infrared emitter was positioned beneath the transparent floor of the chamber, with a beam diameter of approximately 12 mm. The cylinder was equipped with an infrared sensor that automatically ceased emission upon detection of paw withdrawal, thus recording the latency period and terminating the heat stimulus. The test was performed three times at 1, 2, and 3 hours (corresponding to 60, 120, and 180 minutes) post-drug administration. The latency to paw withdrawal was measured as the response parameter. To prevent tissue damage, a cut-off time of 30 seconds was established for each trial.

Cold plate test: A transparent glass cylinder was used to confine the rat on the surface of the cold plate (Ugo Basile). The plate temperature was maintained at 4°C. Latency was defined as the time interval between the placement of the animal on the cold plate and the first occurrence of either hind paw licking or a jump response, indicating an attempt to avoid the thermal stimulus. The test was conducted at 1, 2, and 3 hours (60, 120, and 180 minutes) following drug administration, with latency to paw withdrawal recorded as the primary response. To avoid potential tissue injury, a maximum exposure time of 30 seconds was imposed for each trial.

Crude touch with needle test: A 23-gauge spinal needle was used in this experiment. The sharp tip was applied to the center of the hind-paw with sufficient pressure to indent the skin without penetrating deeper tissues. The response was recorded as either negative (no response) or positive (withdrawal of the paw).

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using IBM SPSS Statistics version 19.0. Comparisons between groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test or Kruskal-Wallis test, followed by Mann-Whitney post hoc test. Data are presented as mean \pm SEM and mean ranks, respectively. A p-value of <0.05 was considered indicative of statistical significance.

Results

1. High-performance liquid chromatography (HPLC)

It was found that thymoquinone content of the oil is $21,37 \pm 0,38$ mg/ml.

2. Effects of NSO on pain threshold in plantar test

Animals treated with PTX only significantly decreased the latency time at 2nd ($p < 0.05$) and 3rd ($p < 0.001$) hours in comparison with the vehicle-treated group. Conversely, rats treated with NSO at doses of 1, 3, and 5 ml/kg body weight demonstrated a significant increase in reaction latency at the 3rd hour when compared with negative-control group ($p < 0.01$; $p < 0.01$; $p < 0.05$ resp.) (Fig. 1).

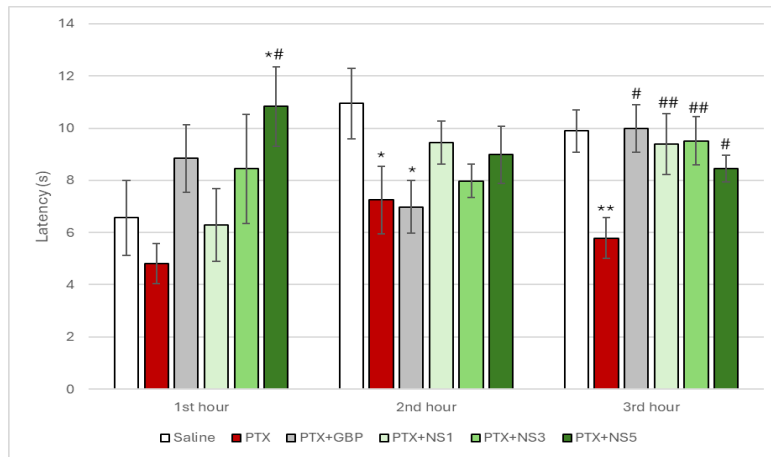


Figure 1. Effects of NSO on pain threshold in plantar test in rats. Data are expressed as mean±SEM. *p<0.05 compared with the saline group; **p<0.001 compared with the saline group; #p<0.05 compared with the negative control; ##p<0.01 compared with the negative control (ANOVA followed by Tukey’s post hoc test).

3. Effects of NSO on pain threshold in cold-plate test

Animals injected with PTX alone demonstrated a significant reduction in pain threshold compared to the saline group in all three trials (p<0.05). Rats treated with PTX and gabapentin exhibited a significant increase in latency across all three trials compared to the negative control group (p<0.05, p<0.0001, and p<0.0001, resp.).

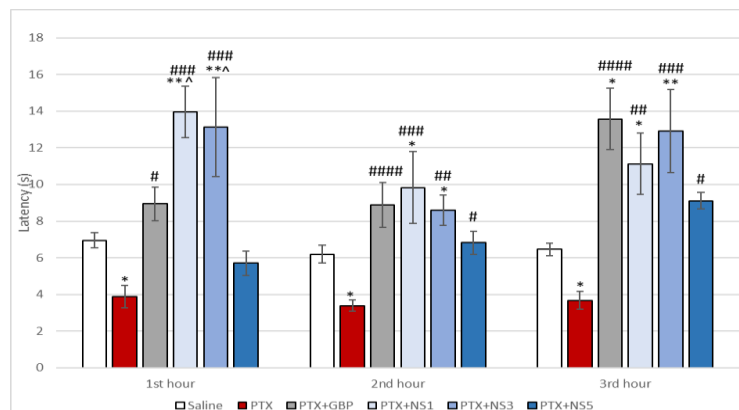


Figure 2. Effects of NSO on pain threshold in cold-plate test in rats. Data are expressed as mean±SEM. *p<0.05 compared with the saline group; **p<0.01 compared with the saline group; #p<0.05 compared with the negative control; ##p<0.01 compared with the negative control; ###p<0.001 compared with the negative control; ####p<0.0001 compared with the negative control (ANOVA followed by Tukey’s post hoc test).

Treatment with the two lower doses of NSO resulted in a marked increase in latency in comparison with the negative control group at the 1st (p< 0.001), 2nd (p<0.001, p<0.01), and 3rd (p<0.01, p< 0.001) hours. Rats that received the highest dose of NSO showed significant increase in latency on the 2nd and 3rd hour when compared with PTX treated control (p<0.05). A significant increase in latency was also observed in animals treated with 1 and 3 ml/kg body weight of NSO, when compared with the vehicle control group, at the 1st (p<0.01), 2nd (p<0.05), and 3rd (p<0.05, p<0.01) hours. No statistically significant difference was observed between the groups treated with NSO (Fig.2).

4. Effect of NSO on pain threshold in crude touch with needle

Kruskal-Wallis test showed that studied groups differ significantly in the response to crude touch ($\chi^2(5)=19,37$, p<0,002). Mann-Whitney post hoc test demonstrated statistical difference in the

response between control saline and negative control ($U=16$, $p<0,025$) as well as between the latter and positive control ($U=8$, $p<0,003$). Comparison between paclitaxel control and rats treated with NSO 1, 3 and 5 ml/kg bw also showed marked difference in the response ($U=8$, $p<0,005$; $U=16$, $p<0,003$; $U=0$, $p<0,001$).

Table. 1. Effect of NSO on pain threshold in crude touch

Groups	Mean Rank
Saline	26,75
PTX	38,5
PTX + Gabapentine	20,88
PTX + NS1	21,71
PTX + NS3	20,88
PTX + NS5	15,00

* $p<0,002$ (Kruskal-Wallis test for determination of difference between groups)

Discussion

The principal finding of our study is that NSO effectively alleviates neuropathic pain, with efficacy comparable to that of gabapentin. The observed antinociceptive effect may be primarily attributed to thymoquinone, which is present in substantial quantities in NSO. We can speculate that thymoquinone may play a significant role in mediating the analgesic properties of NSO in neuropathic pain models.

Our findings demonstrate that paclitaxel administration induces thermal hyperalgesia, as well as mechanical and cold allodynia, thereby validating the paclitaxel model of peripheral neuropathy. Various mechanisms contribute to paclitaxel-induced neuropathy, including oxidative stress, inflammation, alterations in neuronal excitability, mitochondrial dysfunction, and dysregulation of calcium signaling [11]. TLR4 stimulation plays role in NF- κ B activation and subsequent release of pro-inflammatory cytokines in paclitaxel-induced neuropathy [12]. Furthermore, gabapentin, an agent recognized for its efficacy in managing neuropathic pain, exhibited a protective effect against the development of paclitaxel-induced neuropathy.

Previous *in vivo* studies have shown that thymoquinone has analgesic properties in neuropathic pain models with spinal cord injury and chronic constructive injury of the sciatic nerve [6, 8]. Recent study has demonstrated the protective effect of thymoquinone against vincristine-induced neuropathic pain [7]. The analgesic effect of thymoquinone could be due to its anti-inflammatory and antioxidant properties. Thymoquinone prevents lipid peroxidation in the brain, decreases reactive oxygen species production and recovery the activity of antioxidant enzymes, such as catalase and superoxide dismutase, in brain [9]. Antioxidant effect plays an important role in its neuroprotective effect and probably contributes to its analgesic effect in paclitaxel-induced neuropathy. Antioxidant properties might also be important for prevention against mitochondrial dysfunction and nitro-oxidative stress observed in CIPN [1]. Anti-inflammatory effect of thymoquinone might also be important for its pain relieving properties since inflammation is involved in the pathogenesis of chemotherapy-induced pain [13]. It has been shown that paclitaxel stimulates the production of proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , and IL-6 and decreases the production of anti-inflammatory, such as IL-4 [14]. Numerous *in vivo* and *in vitro* studies showed that thymoquinone inhibits expression and synthesis of pro-inflammatory molecules and enzymes (TNF- α , IL-6, IL-1 β , inducible nitric oxide synthetase, cyclooxygenase, etc.) [15]. Chen L et al have demonstrated that in rats with diabetic neuropathy thymoquinone improves conduction velocity and decreases expression of COX-2, IL-1 β , IL-6 and Caspase-3 [16]. Inhibition of TLR4/MyD88 signaling pathway might play role in the mechanism of thymoquinone anti-inflammatory effect [17].

Other compounds found in NSO might also play a protective role against paclitaxel-induced neuropathy. Experimental data show that carvacrol alleviates neuropathic pain by decreasing NLRP3

(Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain-containing-3) and augmenting mitochondrial function [18].

In **conclusion** findings of our study demonstrate the pain-relieving effect of NSO in an experimental model of CINP. The observed analgesic effect is comparable to that of gabapentin and could at least partially be contributed to thymoquinone which is found in significant amounts in the oil. These results represent the base for further investigations about the clinical use of NSO as an adjuvant in the treatment of CINP.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This research was financially supported by a grant DPDP-№ 06/2021 from Medical University of Plovdiv.

References

1. Doyle TM, Salvemini D. Mini-Review: Mitochondrial dysfunction and chemotherapy-induced neuropathic pain. *Neurosci Lett*. 2021 Aug 24;760:136087. doi: 10.1016/j.neulet.2021.136087. Epub 2021 Jun 26. PMID: 34182057; PMCID: PMC9260825.
2. Bacalhau C, Costa-Pereira JT, Tavares I. Preclinical research in paclitaxel-induced neuropathic pain: a systematic review. *Front Vet Sci*. 2023 Dec 18;10:1264668. doi: 10.3389/fvets.2023.1264668. PMID: 38188718; PMCID: PMC10766764.
3. Talaie SA, Banafshe HR, Moravveji A, Shabani M, Tehrani SS, Abed A. Anti-nociceptive effect of black seed oil on an animal model of chronic constriction injury. *Res Pharm Sci*. 2022 Jul 14;17(4):383-391. doi: 10.4103/1735-5362.350239. PMID: 36034087; PMCID: PMC9400468.
4. Bashir MU, Qureshi HJ. Analgesic effect of Nigella sativa seeds extract on experimentally induced pain in albino mice. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2010 Jul;20(7):464-7. PMID: 20642947.
5. Khodaie SA, Nikkhah H, Namiranian N, Abotorabi M, Askari M, Khalilzadeh SH, Khatibi Aghda A, Kamalinejad M. Topical Nigella sativa L. product: a new candidate for the management of diabetic peripheral neuropathy. *Inflammopharmacology*. 2024 Feb;32(1):551-559. doi: 10.1007/s10787-023-01338-2. Epub 2023 Nov 13. PMID: 37957516.
6. Amin B, Taheri MM, Hosseinzadeh H. Effects of intraperitoneal thymoquinone on chronic neuropathic pain in rats. *Planta Med*. 2014 Oct;80(15):1269-77. doi: 10.1055/s-0034-1383062. Epub 2014 Oct 1. PMID: 25272235.
7. Alenezi SK. The Ameliorative Effect of Thymoquinone on Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy in Mice by Modulating Cellular Oxidative Stress and Cytokine. *Life (Basel)*. 2022 Dec 29;13(1):101. doi: 10.3390/life13010101. PMID: 36676049; PMCID: PMC9860544.
8. Celik F, Göçmez C, Karaman H, Kamaşak K, Kaplan I, Akıl E, Tufek A, Guzel A, Uzar E. Therapeutic effects of thymoquinone in a model of neuropathic pain. *Curr Ther Res Clin Exp*. 2014 Jan 2;76:11-6. doi: 10.1016/j.curtheres.2013.11.001. PMID: 25031663; PMCID: PMC3994924.
9. Isaev NK, Genrikhs EE, Stelmashook EV. Antioxidant Thymoquinone and Its Potential in the Treatment of Neurological Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2023 Feb 9;12(2):433. doi: 10.3390/antiox12020433. PMID: 36829993; PMCID: PMC9952318.
10. Ahmad N, Subhan F, Islam NU, Shahid M, Ullah N, Ullah R, Akbar S, Amin MU, Khurram M, Ullah I, Sewell RDE. A novel gabapentin analogue assuages neuropathic pain response in chronic sciatic nerve constriction model in rats. *Behav Brain Res*. 2021 May 7;405:113190. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113190. Epub 2021 Feb 16. PMID: 33607164.
11. Staff NP, Fehrenbacher JC, Caillaud M, Damaj MI, Segal RA, Rieger S. Pathogenesis of paclitaxel-induced peripheral neuropathy: A current review of in vitro and in vivo findings using rodent and human model systems. *Exp Neurol*. 2020 Feb; 324:113121. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.113121. Epub 2019 Nov 21. PMID: 31758983; PMCID: PMC6993945.

12. Li Y, Zhang H, Zhang H, Kosturakis AK, Jawad AB, Dougherty PM. Toll-like receptor 4 signaling contributes to Paclitaxel-induced peripheral neuropathy. *J Pain*. 2014 Jul;15(7):712-25. doi: 10.1016/j.jpain.2014.04.001. Epub 2014 Apr 19. PMID: 24755282; PMCID: PMC4
13. Chung KH, Park SB, Streckmann F, Wiskemann J, Mohile N, Kleckner AS, Colloca L, Dorsey SG, Kleckner IR. Mechanisms, Mediators, and Moderators of the Effects of Exercise on Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Cancers (Basel)*. 2022 Feb 26;14(5):1224. doi: 10.3390/cancers14051224. PMID: 35267533; PMCID: PMC8909585.
14. Xu Y, Jiang Z, Chen X. Mechanisms underlying paclitaxel-induced neuropathic pain: Channels, inflammation and immune regulations. *Eur J Pharmacol*. 2022 Oct 15;933:175288. doi: 10.1016/j.ejphar.2022.175288. Epub 2022 Sep 17. PMID: 36122757.
15. Hannan MA, Rahman MA, Sohag AAM, Uddin MJ, Dash R, Sikder MH, Rahman MS, Timalisina B, Munni YA, Sarker PP, Alam M, Mohibullah M, Haque MN, Jahan I, Hossain MT, Afrin T, Rahman MM, Tahjib-Ul-Arif M, Mitra S, Oktaviani DF, Khan MK, Choi HJ, Moon IS, Kim B. Black Cumin (*Nigella sativa* L.): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety. *Nutrients*. 2021 May 24;13(6):1784. doi: 10.3390/nu13061784. PMID: 34073784; PMCID: PMC8225153.
16. Chen L, Li B, Chen B, Shao Y, Luo Q, Shi X, Chen Y. Thymoquinone Alleviates the Experimental Diabetic Peripheral Neuropathy by Modulation of Inflammation. *Sci Rep*. 2016 Aug 22;6:31656. doi: 10.1038/srep31656. PMID: 27545310; PMCID: PMC4992870.
17. Xing H, Zhang S, You M, Yan M, Zhang J, Chen J, Chen Y, Liu X, Zhu J. Thymoquinone Alleviates Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy through Regulation of the TLR4-MyD88 Inflammatory Pathway. *ACS Chem Neurosci*. 2023 Oct 18;14(20):3804-3817. doi: 10.1021/acchemneuro.3c00411. Epub 2023 Oct 9. PMID: 37813830.
18. Arruri VK, Gundu C, Kalvala AK, Sherkhane B, Khatri DK, Singh SB. Carvacrol abates NLRP3 inflammasome activation by augmenting Keap1/Nrf-2/p62 directed autophagy and mitochondrial quality control in neuropathic pain. *Nutr Neurosci*. 2022 Aug;25(8):1731-1746. doi: 10.1080/1028415X.2021.1892985. Epub 2021 Feb 28. PMID: 33641628. 083500.

NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF GLP-1 RECEPTOR AGONIST TREATMENT – FUTURE PERSPECTIVES

Boris Dinkov^{1,2}, Evgeniya Tsoleva¹, Veselin Dinkov³, Plamena Panayotova¹, Venka Tsankova¹, Galya Stavreva¹

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Medical University – Pleven

²Clinic of Endocrinology and Metabolic Diseases, UMBAL "Dr. G. Stranski" – Pleven

³Faculty of Medicine, Medical University – Pleven

ABSTRACT

Introduction: GLP-1 and glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) are incretin hormones that are secreted from the intestinal tract during feeding and contribute to glucose-dependent insulin secretion. GLP-1 receptor agonists are used to treat type 2 diabetes mellitus, and their pleiotropic effects are determined by their binding to receptors in cells of the central and peripheral nervous system, muscle tissue, vascular endothelium, and multiple organs.

Methods: A literature review was performed, focusing on the potential neuroprotective effects of GLP-1 receptor agonists, molecular mechanisms, and activated signaling pathways in the CNS.

Results: The GLP-1 receptor is widely distributed in the CNS, including the striatum, hypothalamus, cortex, subventricular zone, and substantia nigra, as well as in the brainstem, with expression of GLP-1 receptors detected in endothelium, microglia, astrocytes, and neurons in humans and experimental animals. Results from in vivo and in vitro studies have demonstrated improvement of cognitive function, neuronal signaling, and insulin sensitivity, reduction of pro-apoptotic factors and neuronal death, as well as dose-dependent increase of neovascularization through activation of different intracellular signaling pathways.

Conclusion: These findings may be of clinical relevance for the administration of GLP-1 receptor agonists in patients with cognitive deficits and after stroke to improve prognosis and quality of life.

Key words: neuroprotection, GLP-1 receptor agonists, CNS

НЕВРОПРОТЕКТИВНИ ЕФЕКТИ ПРИ ЛЕЧЕНИЕТО С GLP-1 РЕЦЕПТОРНИ АГОНИСТИ – БЪДЕЩИ ПЕРСПЕКТИВИ

Борис Динков^{1,2}, Евгения Цолова¹, Веселин Динков³, Пламена Панайотова¹, Венка Цанкова¹, Галя Ставрева¹

¹ Катедра по фармакология и токсикология, МУ – Плевен

² Клиника по ендокринология и болести на обмяната, УМБАЛ "Д-р Г. Странски" – Плевен

³ Медицински факултет, Медицински университет – Плевен

Увод

GLP-1 и глюкозо-зависимият инсулинотропен пептид (GIP) са инкретинови хормони, които се секретират от чревния тракт по време на хранене и допринасят за глюкозо-зависимата секреция на инсулин (1). Естественият GLP-1 се синтезира от L-клетките в дисталния илеум. GIP се синтезира и секретира от K-клетките на дуоденума и проксимален йейунум. Двата чревни хормона са отговорни за т.нар. инкретинов ефект, отговорен за около 50-70% от инсулиновата секреция в здрави индивиди при перорален прием на глюкоза (2). GLP-1 индуцира инсулинова секреция от бета клетките на панкреаса по глюкозо-зависим начин, потиска изпразването на стомаха, намалява приема на храна като създава чувство на ситост. Инхибира секрецията на глюкагон, което води до нормализиране на кръвната захар. GLP-1

подобрява бета-клетъчната пролиферация и повишава бета клетъчната маса, намалява дедиференциацията, като има изразени антипроапоптотични свойства.

GLP-1 рецепторните агонисти са лекарства, одобрени за лечение на захарен диабет тип 2 и затлъстяване, повлияващи постпрандиалната глюкозна утилизация. Плейотропните ефекти на GLP-1 рецепторните агонисти се определят от свързването им с рецептори в клетките на централната и периферната нервна система, мускулната тъкан, съдовия ендотел и множество органи. Целта на настоящия литературен обзор е да се обобщят възможни невропротективни ефекти на GLP-1 рецепторните агонисти, и дали те биха имали потенциални ползи за лечение на невродегенеративни и когнитивни нарушения в бъдеще.

Материали и методи

Направен е литературен обзор, като акцентирахме върху ефектите на GLP-1 рецепторните агонисти в централната нервна система, молекулярни механизми и активирани сигнални пътища в ЦНС. Специален акцент поставихме върху проучванията, анализиращи ефектите на GLP-1 рецепторните агонисти при честите и значими невродегенеративни заболявания като болест на Алцхаймер и болест на Паркинсон.

Обсъждане

GLP-1 рецепторните аналози са лекарства, одобрени за лечение на захарен диабет тип 2 и затлъстяване. На база множество проучвания е известно, че те редуцират гликирания хемоглобин и подобряват дългосрочния гликемичния контрол, оценен чрез гликиран хемоглобин между 0,8-1,5% (3), повлияват благоприятно телесното тегло и инсулиновата чувствителност, подобряват липидния профил, намаляват атерогенната дислипидемия (4) и артериалното налягане.

Ендогенният GLP-1 се инактивира от ензима дипептидил пептидаза 4 (DPP-4), чрез отцепване на два аминокиселинни остатъка от N-терминалния край на пептида (5). Това обуславя селективното инхибиране на DPP-4, като таргет за лекарствено действие, като по този начин се повишават циркулиращите нива на GLP-1 (6). В бета клетките, сигналната трансдукция води до повишаване на вътреклетъчната калциева концентрация, водеща до глюкозо-зависима секреция на инсулин (7). Установено е, че при захарен диабет тип 2 инсулинотропният ефект на GLP-1 към бета клетките е съхранен, докато ефектът на GIP върху глюкозо-зависимата инсулинова секреция е намален. Разликата в биологичното действие на двата пептида се дължат на това, че в условията на хронична хипергликемия и персистираща бета клетъчна деполяризация се наблюдава превключване от Gs към Gq11 трансдукция при GLP-1 сигнализиране, но не и към GIP (8).

Установено е, че GLP-1 има ефект в централната нервна система, като намалява приема на храна, създавайки чувство на ситост. Пептидът преминава кръвно-мозъчната бариера и достига централната и периферната нервна система. Точният механизъм на навлизане на GLP-1 в ЦНС е все още не напълно изяснен. Един механизъм на преминаване на GLP-1 от циркулацията в мозъка (9) предполага, че пептидът се свързва с GLP-1 рецепторите по аферентните пътища на n.vagus и достига до ЦНС, свързвайки се с GLP-1 рецептори в nucleus tractus solitarius в мозъчния ствол, както и в аркуатното ядро на хипоталамуса. GLP-1 невроните в мозъка осъществяват синаптични контакти с вагусовите низходящи влакна до панкреаса, които от своя страна повишават холинергичната стимулация към бета клетките и стимулират секрецията на инсулин (10). В централната нервна система, GLP-1 също може да бъде синтезиран от неврони, които са разположени предимно в nucleus tractus solitarius. Невроните на това ядро осъществяват проекции към средния и предния мозък, като вентралната тегментална област, nucleus accumbens и хипоталамичните ядра, отговорни за хранителното поведение и енергийния прием (11). Микроглиални клетки също имат способност да синтезират GLP-1 от проглюкагон чрез повишаване на вътреклетъчния цАМФ. Персистиращо субклинично възпаление може да понижи цАМФ в мозъчната микроглия, а с това – до намаляване на получените от микроглията локално произведен GLP-1 (12).

GLP-рецепторът е широко експресиран в различни области на главния мозък, включително хипокамп, неокортекс, хипоталамуса и малкия мозък (11). Всички GLP-1 рецептори принадлежат към суперфамилията на G-протеин свързани рецептори (GPCR), които действат главно чрез активиране на аденилатциклаза и последващо повишаване на цАМФ и протеин киназа А (чрез Gs-протеин), или на нивото на протеин киназа С (чрез Gq₁₁-протеин), продуциране на инозитол 1,4,5-трифосфат и диацилглицерол (8).

GLP-1 рецептори са обилно експресирани върху дендрити и синаптични контакти в малкия мозък в субпопулации от изходящи неврони като пирамидални, гранулирани клетки и клетки на Пуркиние. GLP-1 рецепторът се експресира и в глиални клетки, които биха могли да индуцират експресия на GLP-1 по време на възпалителни реакции (13). Може да се предположи, че GLP-1 изпълнява функции на растежен фактор (14). Той повишава преживяемостта на невроните и намалява апоптозата им чрез цАМФ зависими сигнални каскади и up-регулация на GLP-1 рецептора. Свържекспресията на GLP-1 рецептори повишава способността за когнитивно заучаване, свързано с пространствената памет. Липсата на GLP-1 рецептори в мозъчните неврони уврежда формирането на паметта и намалява синаптичната невропластичност (15).

Скорешни проучвания върху клетъчни култури на нервни клетки, проведени с GLP-1 рецепторни агонисти, както и двойни и тройни ко-агонисти на GLP-1/GIP/glucagon рецепторите показват, че тези медикаменти осъществяват невротрофични и невропротективни ефекти, но също така имат противовъзпалителен ефект, като потискат експресията на индуцируема циклооксигеназа 2 (COX-2) от микроглиалните клетки, понижават производството на нитрити и освобождаването на проинфламаторни цитокини. Нещо повече, употребата на мулти-агонисти биха имали дори по-голям невропротективен потенциал от единичните GLP-1 рецепторни агонисти при лечение на невродегенеративни заболявания (16). Следователно, може да се предположи, че освен върху клетъчни култури *in vitro*, тези лекарства биха имали ефект в *in vivo* в животински модели и ефективност при невродегенеративни заболявания при хора.

GLP-1 рецепторни агонисти и болест на Алцхаймер

Наскоро болестта на Алцхаймер е идентифицирана от някои учени като по-особена форма на диабет, известен като захарен диабет тип 3. Причината за това е изява на инсулинова резистентност в мозъка, която повлиява неврокогнитивните способности (17). Заболяването има прогресиращ ход, характеризира се с тау-фосфорилиране, дефицит на невротрансмитери, невронална дегенерация, синаптична дисфункция, извънклетъчно натрупване на β -амилоид и неврофибриларни интрацелуларни възли (18). В мозъка, глюкозната утилизация зависи от една страна, от GLUT1 и GLUT3 транспортерите, експресирани от глиалните клетки (19), а от друга - от разграждането на гликогена в астроцитите до глюкоза, при активиране на β -адренергични рецептори. Описва се експресия на инсулин-зависимия транспортер GLUT4, основно в хипокампа. Този транспортер има централна роля в процесите на обработка на паметта, а намаленото активиране на този транспортер може да е в основата на когнитивните увреждания, разглеждани като последица от инсулинова резистентност (20).

Инсулиновата резистентност е състояние на рецепторна дисфункция, променена рецепторна експресия, отклонения в рецепторно свързване и/или намалена ефективност на вътреклетъчното фосфорилиране. На молекулярно ниво клетката е с понижена активност към инсулинова сигнализация чрез PI3K/Akt/mTOR сигналния път. Смята се, че тази дисфункция на инсулиновата сигнализация в нервните клетки е в основата на намалената способност за учене и формиране на паметта. Върху инсулиновата резистентност на нивото на мозъка значение се отдава на свободните мастни киселини и намалената антиоксидантна активност на ензими, като супероксид дисмутаза (18).

В няколко изследвания върху животински модели на болест на Алцхаймер е проучена ефективността на GLP-1 рецепторния агонист Liraglutide. Установява се намаляване на тау фосфорилирането, подобряване на инсулиновата синаптична сигнализация чрез повишаване

на вътреклетъчния α АМФ при маймуни от род *Synomolgus* (21). В друго проучване Liraglutide подобрява паметовия дефицит при мишки, оценено чрез поведенчески тест за разпознаване на предмети, а при хистологично изследване се установява намалено отлагане на бета амилоид и редуцирана активация на микроглиални клетки (22).

Обнадеждаващи резултати са получени и при изпитвания с liraglutide при хора. В двойно-сляпо контролирано проучване фаза II се наблюдава забавяне на прогресията на когнитивните увреждания и по-малка редуция на обемите на темпоралния, париеталния лоб, както и съхраняване на обема на мозъчния кортекс в групата на liraglutide в сравнение с групата плацебо, оценено чрез MRI изследване. Може да се предположи, че liraglutide намалява загубата на неврони в мозъка (23)

Подобни благоприятни ефекти са описани при приложение на semaglutide. В експериментален модел, semaglutide може да повиши нивата на експресия на SIRT1 и GLUT4 транспортера в хипокампа на 3хTg миши модел на болест на Алцхаймер, придружено от подобряване на заучаването и паметта, намалена депозиция на $A\beta$ амилоидни плаки и неврофибриларни възли (24). Установява се, че semaglutide показва ефективност за повишаване на клетъчния метаболизъм, мембранната транслокация на GLUT4 (чрез SIRT1) и намаляване на дисфункцията на глюкозния метаболизъм в клетъчни линии HT22 от миши хипокамп (24). В друго проучване не се установяват благоприятни резултати от приложение на semaglutide в 5XFAD и APP/PS1 мишки, като не са наблюдавани промени в степента на отлагане на амилоидни плаки, понижаване на mRNA биомаркери за възпаление и невродегенерация, както и липса на подобрене на поведенческата и когнитивната функция, оценени чрез тестове открито поле и воден лабиринт по Morris (25). Въпреки противоречивите данни от предклиничните изследвания със semaglutide, към момента са в ход два клинични изпитвания фаза III при пациенти с болест на Алцхаймер (26).

Добри резултати са получени при проучване на ефектите на новосинтезиран двоен ко-агонист на GLP-1/GIP рецептора DA4-JC. В миши модел на болест на Алцхаймер, DA4-JC е показал по-висока ефективност от liraglutide върху подобряване на когнитивната функция чрез усилване на синаптичната пластичност в хипокампа, намаляване на амилоидните отлагания и понижаване на проинфламаторните цитокини (27). Подобни данни са получени при изследване на GLP-1/GIP двойния агонист Tirzepatide в APP/PSS1 мишки (28). За период от 8 седмици, прилаган интраперитонеално, tirzepatide повишава експресията на иРНК за GLP-1 рецептори, глутаматни рецептори тип 2A и тип 2B, SCAF1 в хипоталамуса. Tirzepatide подобрява енергийния метаболизъм чрез модулиране на производство на реактивни кислородни радикали и модулиране на потенциала на митохондриалната мембрана, като по този начин намалява митохондриалната дисфункция и нивата на АТФ в астроцитите чрез агонизъм върху GLP-1 рецептора (28).

GLP-1 рецепторни агонисти и болест на Паркинсон

Болестта на Паркинсон е прогресиращо невродегенеративно заболяване, проявяващо се с моторни и немоторни симптоми. Характеризира се с тремор в покой, мускулна ригидност и брадикинезия, забавено движение с дисрегулация на фината моторика (29). Хистологично се установява депигментация на substantia nigra, locus coeruleus, загуба на допаминергични неврони в pars compacta на substantia nigra чрез повишена апоптоза и автофагия. Загуба на неврони се наблюдава и в базалното ядро на Meynert и дорзалното моторно ядро на блуждаещия нерв. В засегнатите мозъчни области, се наблюдават телца на Lewy, които са еозинофилни цитоплазмени протеинови включвания, съдържащи алфа синуклеин (29). Основната причина за болестта на Паркинсон не е изяснена. Съвременните теории включват оксидативен стрес, митохондриална дисфункция, възпаление, нарушения в метаболизма на протеините и намалена антиоксидантна активност. При болестта на Паркинсон е описана метаболитна дисфункция с нарушен глюкозен транспорт в допаминергичните неврони. Засегнати са няколко компонента на инсулиновото сигнализиране, включително фосфатидилинозитол 3 киназа/протеин киназа B (PI3K/Akt), гликоген синтаза киназа-3 бета

(GSK-3 β) и на ядрен фактор капа В (NF- κ B) (30). Инсулиновата резистентност на нивото на допаминергичните неврони, вероятно допринася за отлаганията на алфа синуклеин, поради намалено изчистване на неправилно нагънати вътреклетъчни протеини, липса на енергийни субстрати и нарушена епигенетична регулация на клетъчната автофагия (31)

При проучвания върху животински модели се установява, че употребата на GLP-1 рецепторни агонисти може да възстанови нивата на допамин в substantia nigra, да намали допаминергичната загуба на неврони, да потисне невроналната дегенерация и да подобри моторните и немоторните симптоми при болестта на Паркинсон (32). В рандомизирани контролирани проучвания с GLP-1 миметика exenatide при хора с болест на Паркинсон се описва подобряване на двигателните дефицити, с неясни резултати върху подобряване на качеството на живота и психологическите резултати (33,34).

В миши модел на болестта на Паркинсон, GLP-1 рецепторния агонист lixisenatide, е показал невропротективни свойства (35). На база на предклиничните данни е проведено фаза 2 двойно-сляпо рандомизирано проучване с lixisenatide при хора с болестта на Паркинсон с давност на заболяването до 3 години. При участници с ранна болест на Паркинсон терапията с lixisenatide за период от 12 месеца е довела до забавяне на прогресията на двигателните увреждания, в сравнение с плацебо (35)

Скорошни обнадеждаващи резултати в животински модел на болест на Паркинсон се описват при приложение на semaglutide, който осъществява невропротективен ефект чрез различни механизми: модулира невровъзпалението, подобряване на митохондриалната функция и насърчаване на неврогенезата (36). Semaglutide, подобно на други предствители като exenatide подобрява двигателната функция и облекчава загубата на допаминергични неврони. В друго проучване върху оксидопамин-индуцирана болест на Паркинсон при плъхове, semaglutide и нов двоен ко-агонист на GLP-1/GIP рецептора, DA5-CH са аплицирани интраперитонеално за 30 дни. Установява се намаляване на изчерпването на допамина и намалено синтезиране на проинфламаторни фактори в стриатума, например IL-1 β и TNF- α , както и намалено формиране на мономери и агрегати от α -синуклеин (37). В друго проучване (38) GLP-1/GIP рецепторният ко-агонист DA5-CH е сравнен с liraglutide в A53T мишки като модел на болестта на Паркинсон. И двата медикамента са демонстрирали ефективност по отношение на понижаване на отлагането на α -синуклеин в substantia nigra, нормализирането на митохондриалната функция, потискане на възпалителния отговор и намаляване на нивата на провъзпалителни цитокини в нигро-стриаталната област.

И в двете проучвания DA5-CH е показал по-изразени невропротективни ефекти в животинските модели, в сравнение със semaglutide и liraglutide (38).

В заключение, GLP-1 рецепторните агонисти, разработени за лечение на захарен диабет тип 2, навлизат широко в различни направления на медицината. В множество предклинични и клинични изследвания са доказани техните невропротективни ефекти. Може да се предположи, че двойните ко-агонисти на GLP-1/GIP рецепторите, които притежават по-висока способност за преминаване през кръвно-мозъчната бариера, биха имали потенциал на медикаменти, модифициращи заболяването, а тяхното приложение – като нов терапевтичен подход при лечение на болест на Алцхаймер и болест на Паркинсон. Необходимо е по-задълбочено изучаване на техните дългосрочни ефекти по отношение на прогресията на невродегенеративните заболявания в бъдеще.

Литература

1. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev.* 2007 Oct;87(4):1409-39. doi: 10.1152/physrev.00034.2006. PMID: 17928588.
2. Ahrén B. Incretin dysfunction in type 2 diabetes: clinical impact and future perspectives. *Diabetes Metab.* 2013 May;39(3):195-201. doi: 10.1016/j.diabet.2013.03.001. Epub 2013 May 2. PMID: 23643349.

3. Nauck MA, Meier JJ, Cavender MA, Abd El Aziz M, Drucker DJ. Cardiovascular actions and clinical outcomes with glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Circulation*. 2017;136:849–870. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028136
4. Burgmaier M, Liberman A, Mollmann J, Kahles F, Reith S, Leberherz C, Marx N, Lehrke M. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and its split products GLP-1(9-37) and GLP-1(28-37) stabilize atherosclerotic lesions in apoe(-)/(-) mice. *Atherosclerosis*. 2013;231:427–435. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.08.033
5. Nauck MA, Quast DR, Wefers J, Meier JJ. GLP-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes - state-of-the-art. *Mol Metab*. 2021;46:101102. doi: 10.1016/j.molmet.2020.101102
6. Lovshin JA, Drucker DJ. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5:262. doi:10.1038/nrendo.2009.48
7. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, Chick WL, Habener JF. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Nat Acad Sci*. 1987;84(10):3434–38. doi:10.1073/pnas.84.10.3434.
8. Okechi S, Oduori, Patrik Rorsman, Susumu Seino. Gs/Gq signaling switch in β cells defines incretin effectiveness in diabetes *J Clin Invest*. 2020;130(12):6639-6655. <https://doi.org/10.1172/JCI140046>.
9. Williams DL. Minireview: finding the sweet spot: peripheral versus central glucagon-like peptide 1 action in feeding and glucose homeostasis. *Endocrinology*. 2009;150(7):2997–3001. doi:10.1210/en.2009-0220.
10. Baggio LL, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptors in the brain: controlling food intake and body weight. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4223–26. doi:10.1172/JCI78371.
11. Hamilton A, Hölscher C. Receptors for the incretin glucagon-like peptide-1 are expressed on neurons in the central nervous system. *Neuroreport*. 2009;20(13):1161–66. doi:10.1097/WNR.0b013e32832fbf14.
12. Kappe C, Tracy LM, Patrone C, Iverfeldt K, Sjöholm A. GLP-1 secretion by microglial cells and decreased CNS expression in obesity. *J Neuroinflammation*. 2012;9:276. doi:10.1186/1742-2094-9-276
13. Iwai T, Ito S, Tanimitsu K, Udagawa S, Oka J-I. Glucagon-like peptide-1 inhibits LPS-induced IL-1 β production in cultured rat astrocytes. *Neurosci Res*. 2006;55(4):352–60. doi:10.1016/j.neures.2006.04.008.
14. Perry T, Lahiri DK, Sambamurti K, Chen D, Mattson MP, Egan JM, Greig NH. Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid- β peptide (A β) levels and protects hippocampal neurons from death induced by A β and iron. *J Neurosci Res*. 2003;72(5):603–12. doi:10.1002/jnr.10611.
15. Abbas T, Faivre E, Hölscher C. Impairment of synaptic plasticity and memory formation in GLP-1 receptor KO mice: interaction between type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Behav Brain Res*. 2009;205(1):265–71. doi:10.1016/j.bbr.2009.06.035.
16. Kopp KO, Li Y, Glotfelty EJ, Tweedie D, Greig NH. Incretin-Based Multi-Agonist Peptides Are Neuroprotective and Anti-Inflammatory in Cellular Models of Neurodegeneration. *Biomolecules*. 2024 Jul 19;14(7):872. doi: 10.3390/biom14070872. PMID: 39062586; PMCID: PMC11275108.
17. Nguyen TT, Ta QTH, Nguyen TKO, Nguyen TTD, Giau VV. Type 3 Diabetes and Its Role Implications in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 30;21(9):3165. doi: 10.3390/ijms21093165. PMID: 32365816; PMCID: PMC7246646.
18. Bedse, G.; di Domenico, F.; Serviddio, G.; Cassano, T. Aberrant insulin signaling in Alzheimer's disease: Current knowledge. *Front. Neurosci*. 2015, 9, 204. [CrossRef]
19. Apelt, J.; Mehlhorn, G.; Schliebs, R. Insulin-sensitive GLUT4 glucose transporters are colocalized with GLUT3-expressing cells and demonstrate a chemically distinct neuron-specific localization in rat brain. *J. Neurosci. Res*. 1999, 57, 693–705.

20. McNay EC, Pearson-Leary J. GluT4: A central player in hippocampal memory and brain insulin resistance. *Exp Neurol.* 2020 Jan;323:113076. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.113076. Epub 2019 Oct 12. PMID: 31614121; PMCID: PMC6936336.
21. Batista, A.F.; Forny-Germano, L.; Clarke, J.R.; Lyra, E.S.N.M.; Brito-Moreira, J.; Boehnke, S.E.; Winterborn, A.; Coe, B.C.; Lablans, A.; Vital, J.F.; et al. The diabetes drug liraglutide reverses cognitive impairment in mice and attenuates insulin receptor and synaptic pathology in a non-human primate model of Alzheimer's disease. *J. Pathol.* 2018, 245, 85–100
22. McClean, P.L.; Parthasarathy, V.; Faivre, E.; Holscher, C. The diabetes drug liraglutide prevents degenerative processes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2011, 31, 6587–6594.
23. Harrison, G. Tadros, A. Passmore, C. Ballard Evaluation of liraglutide in the treatment of Alzheimer's disease *Alzheimer & Dementia*, 17 (2022), Article S9
24. Wang ZJ, Li XR, Chai SF, Li WR, Li S, Hou M, Li JL, Ye YC, Cai HY, Hölscher C, Wu MN. Semaglutide ameliorates cognition and glucose metabolism dysfunction in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease via the GLP-1R/SIRT1/GLUT4 pathway. *Neuropharmacology.* 2023 Dec 1;240:109716. doi: 10.1016/j.neuropharm.2023.109716. Epub 2023 Sep 18. PMID: 37730113.
25. Forny Germano L, Koehler JA, Baggio LL, Cui F, Wong CK, Rittig N, Cao X, Matthews D, Drucker DJ. The GLP-1 medicines semaglutide and tirzepatide do not alter disease-related pathology, behaviour or cognitive function in 5XFAD and APP/PS1 mice. *Mol Metab.* 2024 Nov;89:102019. doi: 10.1016/j.molmet.2024.102019. Epub 2024 Aug 30. PMID: 39216535; PMCID: PMC11408156.
26. Christian Hölscher Glucagon-like peptide-1 class drugs show clear protective effects in Parkinson's and Alzheimer's disease clinical trials: A revolution in the making? <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2024.109952>
27. Maskery M, Goulding EM, Gengler S, Melchiorson JU, Rosenkilde MM, Hölscher C. The Dual GLP-1/GIP Receptor Agonist DA4-JC Shows Superior Protective Properties Compared to the GLP-1 Analogue Liraglutide in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2020 Jan-Dec;35:1533317520953041. doi: 10.1177/1533317520953041. PMID: 32959677; PMCID: PMC10623903.
28. Yang S, Zhao X, Zhang Y, Tang Q, Li Y, Du Y, Yu P. Tirzepatide shows neuroprotective effects via regulating brain glucose metabolism in APP/PS1 mice. *Peptides.* 2024 Sep;179:171271. doi: 10.1016/j.peptides.2024.171271. Epub 2024 Jul 11. PMID: 39002758.
29. Hayes MT. Parkinson's Disease and Parkinsonism. *Am J Med.* 2019 Jul;132(7):802-807. doi: 10.1016/j.amjmed.2019.03.001. Epub 2019 Mar 16. PMID: 30890425.
30. Sharma T, Kaur D, Grewal AK, Singh TG. Therapies modulating insulin resistance in Parkinson's disease: A cross talk. *Neurosci Lett.* 2021 Apr 1;749:135754. doi: 10.1016/j.neulet.2021.135754. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33610666.
31. Kakoty V, Kc S, Kumari S, Yang CH, Dubey SK, Sahebkar A, Kesharwani P, Taliyan R. Brain insulin resistance linked Alzheimer's and Parkinson's disease pathology: An undying implication of epigenetic and autophagy modulation. *Inflammopharmacology.* 2023 Apr;31(2):699-716. doi: 10.1007/s10787-023-01187-z. Epub 2023 Mar 23. PMID: 36952096.
32. Kalinderi K, Papaliagkas V, Fidani L. GLP-1 Receptor Agonists: A New Treatment in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2024 Mar 29;25(7):3812. doi: 10.3390/ijms25073812. PMID: 38612620; PMCID: PMC11011817.
33. Mulvaney CA, Duarte GS, Handley J, Evans DJ, Menon S, Wyse R, Emsley HC. GLP-1 receptor agonists for Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Jul 23;7(7):CD012990. doi: 10.1002/14651858.CD012990.pub2. PMID: 32700772; PMCID: PMC7390475.
34. Meissner WG, Remy P, Giordana C, Maltête D, Derkinderen P, Houéto JL, Anheim M, et al. LIXIPARK Study Group. Trial of Lixisenatide in Early Parkinson's Disease. *N Engl J Med.* 2024 Apr 4;390(13):1176-1185. doi: 10.1056/NEJMoa2312323. PMID: 38598572.

35. Nowell J, Blunt E, Gupta D, Edison P. Antidiabetic agents as a novel treatment for Alzheimer's and Parkinson's disease. *Ageing Res Rev.* 2023 Aug;89:101979. doi: 10.1016/j.arr.2023.101979. Epub 2023 Jun 14. PMID: 37328112.
36. Meca AD, Boboc IKS, Mititelu-Tartau L, Bogdan M. Unlocking the Potential: Semaglutide's Impact on Alzheimer's and Parkinson's Disease in Animal Models. *Curr Issues Mol Biol.* 2024 Jun 13;46(6):5929-5949. doi: 10.3390/cimb46060354. PMID: 38921025; PMCID: PMC11202139.
37. Zhang L, Li C, Zhang Z, Zhang Z, Jin QQ, Li L, Hölscher C. DA5-CH and Semaglutide Protect against Neurodegeneration and Reduce α -Synuclein Levels in the 6-OHDA Parkinson's Disease Rat Model. *Parkinsons Dis.* 2022 Nov 14;2022:1428817. doi: 10.1155/2022/1428817. PMID: 36419409; PMCID: PMC9678466.
38. Zhang Z, Shi M, Li Z, Ling Y, Zhai L, Yuan Y, Ma H, Hao L, Li Z, Zhang Z, Hölscher C. A Dual GLP-1/GIP Receptor Agonist Is More Effective than Liraglutide in the A53T Mouse Model of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis.* 2023 Sep 25;2023:7427136. doi: 10.1155/2023/7427136. PMID: 37791037; PMCID: PMC10545468.

EFFECT OF *TANACETUM VULGARE* ESSENTIAL OIL ON SERUM BIOCHEMICAL PARAMETERS

Borislava Lechkova^{1,2}, Michaela Shishmanova-Doseva^{2,3}, Niko Benbassat^{1,2}, Zhivko Peychev⁴

¹ Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Plovdiv, 4002 Plovdiv, Bulgaria

² Research Institute, Medical University of Plovdiv, 4002 Plovdiv, Bulgaria

³ Department of Pharmacology, Toxicology and Pharmacotherapy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Plovdiv, 4002 Plovdiv, Bulgaria

⁴ Department of Medical Informatics, Biostatistics and E-Learning, Faculty of Public Health, Medical University of Plovdiv, 4002 Plovdiv, Bulgaria

ABSTRACT

Tanacetum vulgare L. is an aromatic herbaceous plant with a rich background in the traditional medicine of many nations. Its rich phytochemical content (phenolic compounds, sesquiterpene lactones, essential oil) contributes to various biological effects – antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial, cytotoxic, and antihelminthic. However, data on the *in vivo* pharmacological activity of *T. vulgare* essential oil (EO) is limited. The present study aimed to evaluate the subacute toxicity of *T. vulgare* EO by observing serum biochemical parameters. We used 20 male rats, divided into two groups (n = 10). The animals were treated orally for 28 days as follows: control group – Oleum Helianthi (1.0 g/kg b.w.), test group - *T. vulgare* EO (1.5 ml/kg b.w.). At the end of the experiment, blood samples were drawn for the examination of serum biochemical parameters. In the test group was observed a significant increase in creatinine, AsAT, total bilirubin, HDL-cholesterol, albumin, and calcium, whereas a decrease in glucose, uric acid, AlAT, LDL-cholesterol, lactate dehydrogenase, creatine kinase-MB, iron, and phosphorus were detected. In conclusion, due to the low number of animals and short period of time, further investigations are needed to precisely evaluate the chronic effect of *T. vulgare* EO on biochemical parameters.

Keywords: *Tanacetum vulgare*, essential oil, serum biochemical parameters.

Acknowledgements: The authors gratefully acknowledge the support of Medical University of Plovdiv, project DPDP-07/2023.

ЕФЕКТ НА ЕТЕРИЧНО МАСЛО ОТ *TANACETUM VULGARE* ВЪРХУ СЕРУМНИ БИОХИМИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ

Борислава Лечкова^{1,2}, Михаела Шишманова-Досева^{2,3}, Нико Бенбасат^{1,2}, Живко Пейчев⁴

¹ Катедра „Фармакогнозия и фармацевтична химия“, Фармацевтичен факултет, Медицински университет - Пловдив

² Научноизследователски институт на Медицински университет - Пловдив

³ Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“, Фармацевтичен факултет, Медицински университет - Пловдив

⁴ Катедра „Медицинска информатика, биостатистика и електронно обучение“, Факултет по обществено здраве, Медицински университет – Пловдив

Въведение

Tanacetum vulgare L. е ароматно тревисто растение с широка употреба в традиционната медицина на много народи. Използвано е като противоглистно, противовъзпалително и антихипертензивно средство, при ревматизъм, главоболие, стомашно-чревни смущения,

диабет и др. здравословни проблеми, а също и като ароматизиращо средство в ястия и напитки (1,2).

Богатият му фитохимичен състав (фенолни съединения, сесквитерпенови лактони, етерично масло (ЕМ)) допринася за различни биологични ефекти. Coté et al. съобщават за антиоксидантен и противовъзпалителен ефект на ЕМ от вратига, обясняващи се с инхибиране свръхпродукцията на NO. Антиоксидантните свойства на екстракти от вида се асоциират със съдържанието на фенолни съединения (фенолни киселини и флавоноиди) (3–6). Антихелминтното действие на растението може да бъде свързано с присъствието на туйон (компонент в ЕМ) и фенолни съединения (7).

Данни от редица *in vitro* изследвания показват обещаващи антибактериални и противогъбични свойства на етеричното масло от вратига срещу *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Penicillium funiculosum*, *Escherichia coli* и *Enterobacter cloacae*, както и синергично действие с различни класове антибиотици (6,8,9). В проучване на Devrnja et al., ЕМ демонстрира *in vitro* цитотоксичен ефект спрямо HeLa клетки.

Данните за фармакологичната активност *in vivo* на етеричното масло обаче са ограничени. Цел на настоящото проучване е оценката на подостра токсичност на ЕМ от *T. vulgare* чрез изследване на серумни биохимични параметри.

Материал и методи

Етерично масло

Съцветията от диворастящ *T. vulgare* бяха събрани от находище в областта на Цигов чарк, Западни Родопи. Изсушеният растителен материал бе подложен на хидродестилация (апарат на Clevenger) за период от 4 часа за изолиране на етеричното масло.

Експерименталните животни

В опита бяха използвани 20 бели мъжки плъха (Wistar), отглеждани при стандартни лабораторни условия (12h:12h тъмен:светъл период), температура $22\pm 2^\circ\text{C}$, влажност – 50-55%. Вода и стандартна храна получаваха *ad libitum*. Експериментът е одобрен от Комисията по етика към МУ – Пловдив и Българската агенция по безопасност на храните (Разрешително No. 238/2019). Всички експериментални процедури бяха извършени в съответствие с препоръките на Европейската комисия за защита и хуманно отношение към лабораторните животни.

Плъховете бяха разделени в две групи ($n=10$). За период от 28 дни на животните бяха приложени перорално дневни дози, както следва: контролна група – *Oleum Helianthi* (1.0 g/kg т.м.), опитна група – ЕМ от *T. vulgare* (1.5 ml/kg т.м.). В края на експеримента бяха взети кръвни проби за изследване на серумни биохимични показатели.

Определяне на серумни биохимични показатели

Биохимичните параметри бяха анализирани с помощта на Automated Chemistry Analyzer (GuangZhou, China). Бяха анализирани следните показатели: серумни концентрации на глюкоза, аспартат аминотрансфераза (ASAT), аланин аминотрансфераза (ALT), алкална фосфатаза (ALP), лактат дехидрогеназа (LDH), креатин киназа (СК), креатин киназа-МВ (СК-МВ), алфа-амилаза, общ билирубин, общ холестерол, HDL холестерол, LDL холестерол, триглицериди, общ протеин, албумин, С-реактивен протеин (CRP), ревматоиден фактор, урея, креатинин, пикочна киселина, желязо, общ желязо-свързващ капацитет, натрий, калий, общ калций, неорганичен фосфат и общ магнезий.

Статистически анализ

Всички данни са представени като $\text{mean}\pm\text{S.E.M}$. След оценка на разпределението на получените стойности, проверено чрез непараметричен критерий на Kolmogorof-Smirnov, резултатите бяха подложени на параметричен и графичен анализ. Междугруповите различия бяха анализирани с еднофакторен (one-way ANOVA) дисперсионен анализ. При наличие на сигнификантна стойност на F-критерия в зависимост от хомогенността на дисперсиите (установена с тест на Levene), беше приложен Tukey *post hoc* или Games-Howell *post hoc* тест.

Статистически значими се приемаха различията при $p < 0.05$. За статистическа обработка на данните беше използвана програмата SPSS, 19.

Резултати и обсъждане

При двете групи животни не се отчете смъртност, не бяха наблюдавани симптоми на токсичност, както и статистически значими промени в теглото.

В Табл. 1 са представени данни от сравнителния анализ на биохимичните показатели на опитната група, третирана с етерично масло от *T. vulgare*, и тези на контролната група.

При провеждане на анализа установихме, че групата, третирана с етерично масло от вратига, доведе до значимо намаляване на нивата на глюкозата и пикочната киселина и повишаване на креатинина спрямо контролната група.

По отношение на чернодробните показатели маслото от *T. vulgare* доведе до значимо завишаване на стойностите на ASAT, тоталния билирубин, HDL и триглицеридите. Значимо понижаване се наблюдаваше при показателите ALAT и LDL спрямо контролната група.

Междугруповият анализ показва, че групата, третирана с масло от вратига, значимо повиши ревматоидния фактор, амилазата и албумина, докато обратен ефект се наблюдаваше по отношение на лактат дехидрогеназата (LDH) и Kreatin kinasa-MB спрямо контролната група.

Таблица 1. Биохимични показатели при плъхове, третирана с етерично масло от *T. vulgare* в продължение на 28 дни.

Показател	n	Контролна група X ± SEM	<i>T.vulgare</i> X ± SEM	P
Glucose (mmol/L)	10	7.85 ± 0.27	7.11 ± 0.16	P<0.05
AST (IU/L)	10	54.10 ± 2.52	71.80 ± 4.63	P<0.01
ALT (IU/L)	10	245.90 ± 11.18	188.30 ± 15.23	P<0.01
ALP (IU/L)	10	411.80 ± 21.64	361.60 ± 23.17	ns
Tot Billirubin (µmol/L)	10	3.98 ± 0.30	6.62 ± 0.52	P<0.001
Cholesterol (mmol/L)	10	1.70 ± 0.054	1.77 ± 0.06	ns
HDL (mmol/L)	10	1.01 ± 0.02	1.26 ± 0.02	P<0.001
LDL (mmol/L)	10	0.38 ± 0.01	0.26 ± 0.02	P<0.001
Triglycerides (mmol/L)	10	0.51 ± 0.04	0.89 ± 0.03	P<0.001
Alfa-Amilasa	10	2227.40 ± 84.99	3476.50 ± 99.24	P<0.001
LDH (IU/L)	10	2635.8 ± 38.85	1940.70 ± 97.27	P<0.001
Kreatin kinasa (IU/L)	10	2214.60 ± 107.40	2096.10 ± 100.08	ns
Kreatin kinasa-MB (IU/L)	10	2970.70 ± 183.86	1837 ± 108.04	P<0.001
Rheumatoid factor	10	3.72 ± 0.22	4.83 ± 0.17	P=0.01
C-Reactive Protein (mg/L)	10	0.77 ± 0.13	0.98 ± 0.10	ns
Albumin (g/L)	10	30.70 ± 0.37	36.20 ± 0.53	P<0.001
Total Protein	10	65.90 ± 0.72	68.80 ± 0.47	P<0.01
Creatinin (µmol/L)	10	30.60 ± 0.95	41.20 ± 1.05	P<0.001
Urea (mmol/L)	10	2.99 ± 0.18	3.46 ± 0.25	ns
Uric acid (µmol/L)	10	135.50 ± 5.51	98.90 ± 7.41	P = 0.001
Ferrum (µmol/L)	10	48.68 ± 1.93	38.77 ± 2.15	P<0.01
TFeSK	10	83.80 ± 0.90	95.54 ± 1.19	P<0.001

Sodium (mmol/L)	10	140.70 ± 0.26	5.32 ± 0.13	P=0.077
Potassium (mmol/L)	10	5.72 ± 0.19	5.32 ± 0.13	P=0.097
Calcium (mmol/L)	10	2.24 ± 0.01	2.41 ± 0.01	P<0.001
Magnesium (mmol/L)	10	1.05 ± 0.01	1.06 ± 0.02	ns
Phosphorus (mmol/L)	10	1.78 ± 0.03	1.55 ± 0.04	P<0.001

ns – без статистически значима разлика; P<0.05; P<0.01; P<0.001.

Значимо понижаване нивата на желязото и фосфора се наблюдаваше при групата, третирана с масло от вратига, докато обратен ефект се установи по отношение на показателите TFeSK и калция. Значителен спад в плазменото ниво на натрия се наблюдава при групата животни, третирани с *T. vulgare* ЕМ спрямо контролните животни ($p = 0.077$), което корелира с данните от народната медицина за диуретично действие на отвара от това растение.

Tanacetum vulgare се е използвал в миналото във високи дози за предизвикване на аборт, като се съобщават случаи на токсични ефекти, включително и смърт, най-вероятно дължащи се на високото количество туйон (2,10,11). Туйонът е монотерпен, който в големи дози проявява невротоксичност (12). Влиза в състава на ЕМ от редица широко използвани растения и количеството му в храни и други продукти се допуска до определени граници (11). *Tanacetum vulgare* се характеризира със значителни вариации по отношение състава на ЕМ и са установени голям брой хемотипове в зависимост от преобладаващите компоненти, като особен интерес представляват тези с ниско съдържание или липса на туйон (13).

Съвременните токсикологични проучвания върху вида са малко на брой. Lahlou et al. провеждат изследване на остра и хронична токсичност на лиофилизиран воден екстракт от листа на *T. vulgare* върху мишки. Поради високите стойности NOAEL и липсата на значителни ефекти върху биологичните, хематологични параметри и смъртността, авторите правят заключение, че екстрактът не е токсичен (10).

Заклучение

Етеричното масло от *T. vulgare* е практически нетоксично за плъхове порода Вистар. Поради малкия брой животни и краткия период от време, са необходими допълнителни изследвания за прецизна оценка на хроничния ефект на етеричното масло от *T. vulgare* върху биохимичните параметри.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност за подкрепата на Медицински университет – Пловдив, проект ДПДП-07/2023.

Литература

1. Khatib S, Sobeh M, Faraloni C, Bouissane L. *Tanacetum* species: Bridging empirical knowledge, phytochemistry, nutritional value, health benefits and clinical evidence. *Front Pharmacol.* 2023 Apr 20;14:1169629.
2. Lim TK. *Tanacetum vulgare*. In: *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014 [cited 2024 Nov 23]. p. 501–15. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7395-0_31
3. Mot CA, Lupitu AI, Bungau S, Iovan C, Copolovici DM, Purza L, et al. Composition and Antioxidant Activity of Aqueous Extracts Obtained from Herb of Tansy (*Tanacetum Vulgare* L.). *Rev Chim.* 2018 Jun 15;69(5):1041–4.
4. Juan-Badaturuge M, Habtemariam S, Jackson C, Thomas MJ. Antioxidant Principles of *Tanacetum vulgare* L. Aerial Parts. *Nat Prod Commun.* 2009 Nov;4(11):1934578X0900401.
5. Bączek KB, Kosakowska O, Przybył JL, Pióro-Jabrucka E, Costa R, Mondello L, et al. Antibacterial and antioxidant activity of essential oils and extracts from costmary (*Tanacetum balsamita* L.) and tansy (*Tanacetum vulgare* L.). *Ind Crops Prod.* 2017 Aug;102:154–63.

6. Devrnja N, Anđelković B, Arandžević S, Radulović S, Soković M, Krstić-Milošević D, et al. Comparative studies on the antimicrobial and cytotoxic activities of *Tanacetum vulgare* L. essential oil and methanol extracts. *South Afr J Bot*. 2017 Jul;111:212–21.
7. Kļaviņa A, Keidāne D, Ganola K, Lūsis I, Šukele R, Bandere D, et al. Anthelmintic Activity of *Tanacetum vulgare* L. (Leaf and Flower) Extracts against Trichostrongylidae Nematodes in Sheep In Vitro. *Animals*. 2023 Jul 2;13(13):2176.
8. Roman H, Niculescu AG, Lazăr V, Mitache MM. Antibacterial Efficiency of *Tanacetum vulgare* Essential Oil against ESKAPE Pathogens and Synergisms with Antibiotics. *Antibiotics*. 2023 Nov 17;12(11):1635.
9. Piras A, Falconieri D, Bagdonaite E, Maxia A, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, et al. Chemical composition and antifungal activity of supercritical extract and essential oil of *Tanacetum vulgare* growing wild in Lithuania. *Nat Prod Res*. 2014 Nov 2;28(21):1906–9.
10. Lahlou S, Israili ZH, Lyoussi B. Acute and chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Tanacetum vulgare* leaves in rodents. *J Ethnopharmacol*. 2008 May;117(2):221–7.
11. Šukele R, Lauberte L, Kovalcuka L, Logviss K, Bārzdiņa A, Brangule A, et al. Chemical Profiling and Antioxidant Activity of *Tanacetum vulgare* L. Wild-Growing in Latvia. *Plants*. 2023 May 12;12(10):1968.
12. Pelkonen O, Abass K, Wiesner J. Thujone and thujone-containing herbal medicinal and botanical products: Toxicological assessment. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2013 Feb;65(1):100–7.
13. Nurzyńska-Wierdak R, Sałata A, Kniaziewicz M. Tansy (*Tanacetum vulgare* L.)—A Wild-Growing Aromatic Medicinal Plant with a Variable Essential Oil Composition. *Agronomy*. 2022 Jan 21;12(2):277.

EFFECT OF *TANACETUM VULGARE* ETHANOL EXTRACT ON COGNITIVE FUNCTIONS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF SCOPOLAMINE-INDUCED AMNESIA

Borislava Lechkova^{1,2}, Niko Benbassat^{1,2}, Zhivko Peychev³, Michaela Shishmanova-Doseva^{2,4}

¹ Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Plovdiv, 4002 Plovdiv, Bulgaria

² Research Institute, Medical University of Plovdiv, 4002 Plovdiv, Bulgaria

³ Department of Medical Informatics, Biostatistics and E-Learning, Faculty of Public Health, Medical University of Plovdiv, 4002 Plovdiv, Bulgaria

⁴ Department of Pharmacology, Toxicology and Pharmacotherapy, Faculty of Pharmacy, Medical University of Plovdiv, 4002 Plovdiv, Bulgaria

ABSTRACT

Tanacetum vulgare L. is a perennial plant, widely distributed in the northern hemisphere. The species is characterized by an affluent content of secondary metabolites such as flavonoids, sesquiterpenoids, and essential oil, contributing to its anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, and cytotoxic properties. However, literature data about the cognitive effects of the herb is scarce. The aim of the present study was to evaluate the pro-cognitive effects of two doses *Tanacetum vulgare* hydroalcoholic extract in an experimental model of scopolamine-induced amnesia in rats. We used 40 male Wistar rats, divided into 5 groups (n = 8) as follows: C-veh, C-Scop, Gly-Scop, T.vulgare-Scop 200 and T.vulgare-Scop 1000. All rats were subjected to two passive avoidance tests (step-down and step-through) and an object recognition test (ORT). Statistical evaluation was done by one-way ANOVA and Tukey *post hoc* test. We found that in the step-down task only the low dose of 200 mg/kg *T. vulgare* improved the short and long-term memory, while in the step-through test both doses of *T. vulgare* showed a longer latency time in the light chamber compared to the Scop-treated groups. No effect was observed during both passive learning sessions. In the ORT, the two groups treated with *T. vulgare* managed to increase the discrimination index compared to the animals with drug-induced amnesia. In conclusion, we found that *T. vulgare* applied in two doses, 200 and 1000 mg/kg, showed cognitive-enhancing properties including improved formation of short- and long-term memory traces and better recognition memory in an experimental model of scopolamine-induced memory impairment.

Key words: *Tanacetum vulgare*, hydroalcoholic extract, cognitive function, scopolamine, amnesia.

ЕФЕКТ НА ЕТАНОЛОВ ЕКСТРАКТ ОТ *TANACETUM VULGARE* ВЪРХУ КОГНИТИВНИ ФУНКЦИИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА SCOPOLAMINE-ИНДУЦИРАНА АМНЕЗИЯ

Борислава Лечкова^{1,2}, Нико Бенбасат^{1,2}, Живко Пейчев³, Михаела Шишманова-Досева^{2,4}

¹ Катедра „Фармакогнозия и фармацевтична химия“, Фармацевтичен факултет, Медицински университет - Пловдив

² Научноизследователски институт на Медицински университет - Пловдив

³ Катедра „Медицинска информатика, биостатистика и електронно обучение“, Факултет по обществено здраве, Медицински университет – Пловдив

⁴ Катедра „Фармакология, токсикология и фармакотерапия“, Фармацевтичен факултет, Медицински университет - Пловдив

Въведение

Tanacetum vulgare L. (Обикновена вратига) е многогодишно растение, широко разпространено в северното полукълбо. Произхожда от Европа и Азия, а по-късно е въведено в страни от Северна Америка (1). Видът се характеризира с богато съдържание на вторични метаболити като фенолни съединения (флавоноиди, фенолни киселини), сесквитерпеноиди и етерично масло, които допринасят за неговите противовъзпалителни, антиоксидантни, антибактериални и цитотоксични свойства (2). Lahlou et al. установяват, че воден екстракт от *T. vulgare* проявява още вазодилатиращи свойства *in vitro*, което е в подкрепа на употребата на растението в традиционната медицина на някои народи като антихипертензивно средство (3). Екстрактът показва и диуретично действие в експеримент, включващ остро и субхронично перорално прилагане при плъхове (4). В друго проучване се съобщава за анти-улцерогенна активност на хлороформен екстракт от вратига и основния сесквитерпенов лактон в него (партенолид) (5). Литературните данни за когнитивните ефекти на растението обаче са оскъдни.

Нарушенията в когнитивните функции могат да са резултат от напредването във възрастта, мозъчни травми, прием на някои медикаменти, както и невродегенеративни заболявания (6). В световен мащаб се наблюдава нарастваща тенденция в случаите на деменция и когнитивни разстройства, което представлява сериозен социалнозначим проблем (7). Именно затова все повече усилия се насочват към проучването на продукти от растителен произход, които поради фитохимичния си състав имат потенциал да проявят невропротективен, антиоксидантен и/или противовъзпалителни ефекти и да подобрят когнитивните функции (8,9).

Цел на настоящото проучване е да се изследват прокогнитивните ефекти на две дози хидроалкохолен екстракт от *Tanacetum vulgare* в експериментален модел на Scopolamine-индуцирана амнезия при плъхове.

Материал и методи

В опита бяха използвани зрели мъжки плъхове (Wistar), с начално тегло 160-180 g, отглеждани при стандартни условия в пропиленови кафези, при съотношение на 12 h:12 h светъл:тъмен период, температура $22\pm 2^\circ\text{C}$, влажност – 50-55%. Вода и стандартна храна получаваша *ad libitum*. Телесната маса беше проследявана веднъж седмично. Експериментът е одобрен от Комисията по етика към МУ – Пловдив и Българската агенция по безопасност на храните (Разрешително No. 238/2019). Всички експериментални процедури бяха извършени в съответствие с препоръките на Европейската комисия за защита и хуманно отношение към лабораторните животни.

Плъховете бяха разделени на 5 групи (n=10):

- 1-ва група C-veh, третирана с физиологичен разтвор 1 ml p.os;
- 2-ра група C-Scop, третирана със Scopolamine (1 mg/kg, i.p.) и физиологичен разтвор 1 ml p. os;
- 3-та група Gly-Scop, третирана със Scopolamine (1 mg/kg, i.p.) и Glycerine 1 ml p. os;
- 4-та група *T.vulgare* 200-Scop, третирана със Scopolamine (1 mg/kg, i.p.) и 200 mg/kg алкохолен екстракт на *T. vulgare* p.os;
- 5-та група *T. vulgare* 1000-Scop, третирана със Scopolamine (1 mg/kg, i.p.) и 1000 mg/kg алкохолен екстракт на *T. vulgare* p.os.

На всички животни ежедневно беше прилаган Scopolamine, след това се третираха с изследвания алкохолен екстракт на *T. vulgare* и 30 мин по-късно бяха подложени на набор от поведенчески тестове.

- **Step through test**

Експериментът се проведе в клетка, която се състои от светла и тъмна част, разделени с вратичка. Всеки експериментален ден включваше три тренировки през 60 min, като характеристиката на една тренировка включва: закъснение (delay) от 7 sec преди да се отвори

вратата, последвано от 12 sec отворена врата. Ако плъхът не премине в тъмното помещение автоматично се включва брояч за време (sec), който отчита максимално 3 min (180 ± 2 sec). Обучителната сесия беше проведена на първия ден; на 24-тия час беше тест за краткосрочна памет; на 8-мия ден – тест за дълготрайно съхраняване на паметови следи. Като критерий за обученост се приема престоят на животното в светлото помещение на апарата в рамките на максималното време от 178 sec при 2 последователни тренировки (Shishmanova-Doseva et al., 2018).

- **Step down test**

Step-down (UgoBasile, Italy) – тест за пасивно обучение. Обучението и проверката за краткотрайна памет се проведе в два последователни дни по три тренировки ежедневно през 60 min с електрическа стимулация по решетъчния под (0.4 mA) и с продължителност от 10 sec. На осмия ден беше проведен тест за дълготрайна памет. Изследва се латентният период в секунди – време на престой на животното върху платформата (Shishmanova-Doseva et al., 2018).

- **Object recognition test (ORT)**

Този тест се използва за оценка на разпознавателната памет при плъхове и се провежда в апарата open field ($50 \times 50 \times 50$ cm³). При първоначалното тестване на животното се поставиха два еднакви обекта. При теста за наличие на паметови следи беше поставен единия от познатите обекти и един нов. При този тест се отчита дискриминационен индекс (DI), който представлява съотношение, като от времето прекарано в изследване на новия обект се изважда времето прекарано в изследване на познатия обект, разделено на общото време, прекарано в изследване на двата обекта (Shishmanova-Doseva et al., 2022).

Статистически анализ

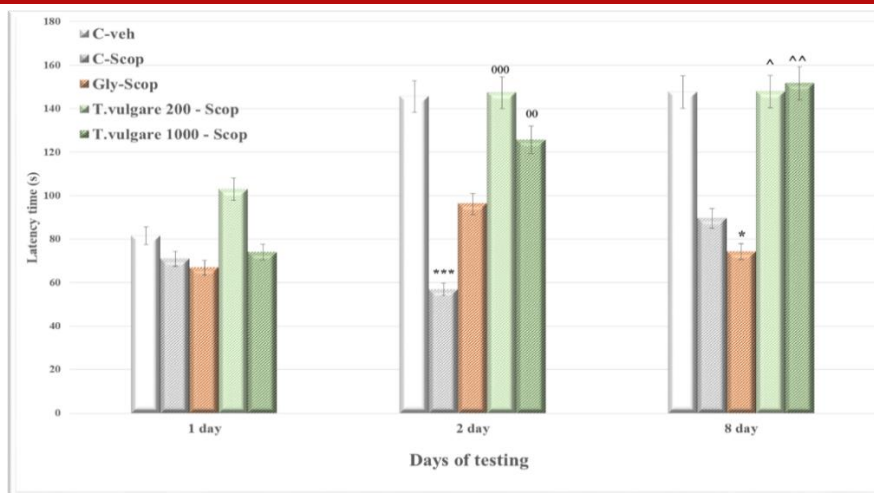
Всички данни са представени като средна аритметична \pm стандартна грешка на средната аритметична ($X \pm SEM$). След оценка на разпределението на получените стойности, проверено чрез непараметричен критерий на Kolmogorof-Smirnov, резултатите бяха подложени на параметричен и графичен анализ. Междугруповите различия от поведенческите тестове бяха анализирани с еднофакторен (one-way ANOVA) дисперсионен анализ. При наличие на сигнификантна стойност на F-критерия в зависимост от хомогенността на дисперсиите (установена с тест на Levene), беше приложен Tukey *post hoc* или Games-Howell *post hoc* тест. Статистически значими се приемаха различията при $p < 0.05$. За статистическа обработка на данните беше използвана програмата SPSS, 19.

Резултати

- **Step through test**

При отчитане на показателя латентен период при пасивно обучение step through по време на обучителната сесия не установихме значими разлики между отделните групи (Фиг. 1). При изследване на краткотрайната памет на 2-рия ден C-Scor групата имаше значимо по-кратко време на престой в светлото помещение на апарата спрямо контролните животни ($p < 0.001$), докато Gly-Scor показа само тенденция за подобен ефект ($p = 0.084$). Двете експериментални групи с модел на скополаминова амнезия и третирани с 200 и 1000 mg/kg алкохолен екстракт от *T. vulgare* имаха значимо по-дълго латентно време спрямо C-Scor животните ($p < 0.001$ и $p < 0.01$, съотв.). Само за групата, третирана с по-ниската доза от екстракта, установихме тенденция за удължаване на показателя и спрямо Gly-Scor животните ($p = 0.068$).

При ре-тест на 8-ми ден установихме, че Gly-Scor групата има значимо по-кратко време за престой в светлото помещение на апарата спрямо C-veh животните ($p < 0.05$) и тези третирани с 200 и 1000 mg/kg алкохолен екстракт от *T. vulgare* ($p < 0.05$ и $p < 0.01$, съотв., Фиг. 1). Само високата доза от вратигата показа тенденция за удължаване на показателя и спрямо C-Scor групата ($p = 0.070$).

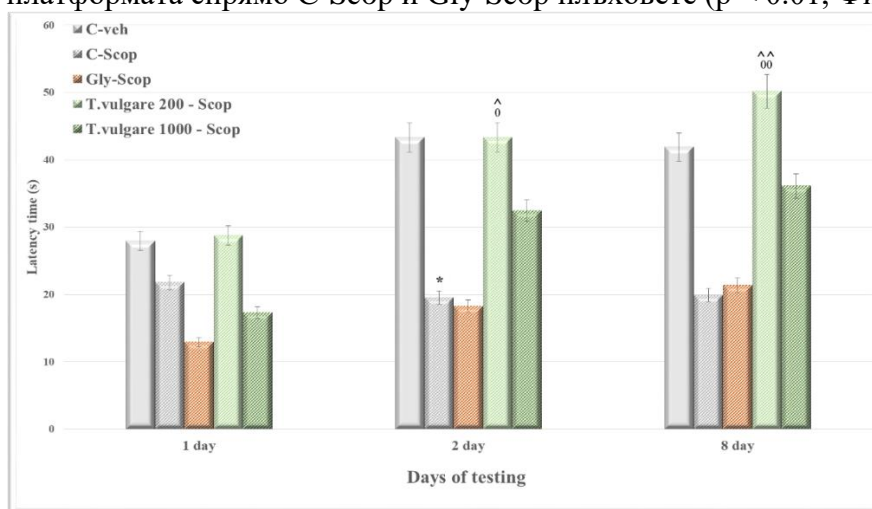


Фиг. 1. Ефект на алкохолен екстракт от *T. vulgare* при модел на скополаминова амнезия върху латентния период (s) при тест за пасивно избягване (step through). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ – спрямо контролната група C-veh; ⁰⁰ $p < 0.01$, ⁰⁰⁰ $p < 0.001$ – спрямо C-Scop групата; [^] $p < 0.05$, ^{^^} $p < 0.01$ – спрямо Gly-Scop групата.

• **Step down test**

При отчитане на показателя латентен период при пасивно обучение в step down не установихме разлики между отделните групи. При изследване на краткосрочната памет на 2-рия ден наблюдавахме, че C-Scop групата показва тенденция за по-кратко време на престой върху платформата ($p = 0.054$) спрямо контролните животни, докато Gly-Scop плъховете значимо намалиха това време ($p < 0.05$, Фиг. 2). Групата, третирана с ниската доза на алкохолния екстракт от вратига значимо удължи латентното време спрямо двете групи C-Scop и Gly-Scop ($p < 0.05$).

При провеждане на ре-тест за наличие на паметови следи на 8-ми ден установихме, че отново само групата *T. vulgare* 200 mg/kg и скополамин доведе до значимо по-дълго време на престой върху платформата спрямо C-Scop и Gly-Scop плъховете ($p < 0.01$, Фиг. 2).

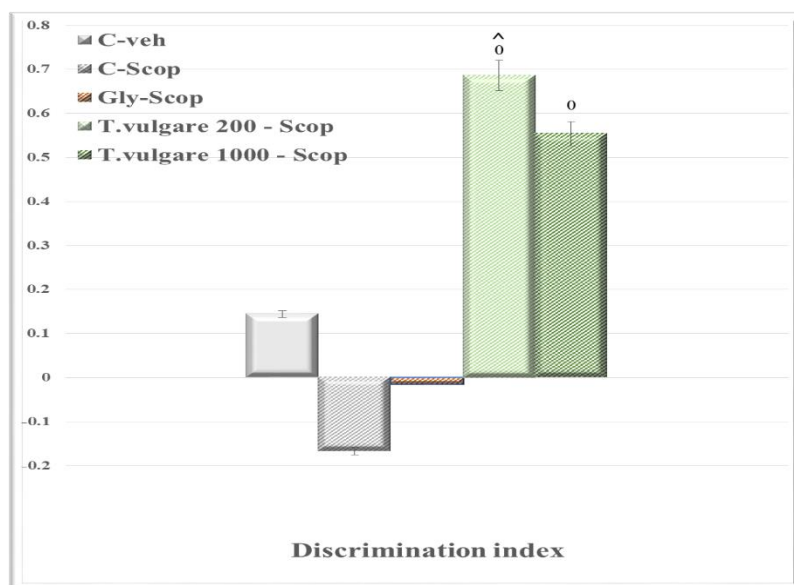


Фиг. 2. Ефект на алкохолен екстракт от *T. vulgare* при модел на скополаминова амнезия върху латентния период (s) при тест за пасивно избягване (step down). * $p < 0.05$ – спрямо C-veh групата; ⁰ $p < 0.05$, ⁰⁰ $p < 0.01$ – спрямо C-Scop групата; [^] $p < 0.05$, ^{^^} $p < 0.01$ – спрямо Gly-Scop групата.

• **Object recognition test**

От проведения междугрупов анализ установихме, че двете експериментални групи с модел на скополаминова амнезия и третирани с 200 и 1000 mg/kg алкохолен екстракт от *T. vulgare* имаха значимо по-висок дискриминационен индекс и подобриха разпознавателна

памет в сравнение в C-Scop плъховете ($p < 0.05$), а при ниската доза и спрямо Gly-Scop групата ($p < 0.05$, Фиг. 3).



Фиг. 3. Ефект на алкохолен екстракт от *T. vulgare* при модел на скополаминова амнезия върху разпознавателна памет. $^0p < 0.05$ – спрямо C-Scop групата; $^{\wedge}p < 0.05$ – спрямо Gly-Scop групата.

Обсъждане

Резултатите от настоящото проучване показват, че двете контролни групи с модел на скополамин-индуцирана амнезия имат значимо влошаване на пасивното обучение и памет и в двата теста с наказателно подкрепление. Заедно с това се отчита и влошаване на разпознавателната памет, като групите с модел на амнезия имат намалена изследователска активност. Тези резултати са в съответствие с други изследвания, установяващи когнитивен дефицит, след прилагане на скополамин (12-14). Когницията включва различни процеси като разбиране, обучение, памет, внимание, концентрация, интерпретация, мислене и вземане на решения (15). Скополаминът е неселективен антагонист на мускариновите рецептори, който инхибира холинергичната сигнализация и води до влошаване на процесите на обучение и памет, като значимо влошава краткосрочната и дългосрочната памет, както и способността за разбиране. В експериментални условия той се използва за предизвикване на амнезия. Установено е, че продължителното прилагане на скополамин повишава оксидативния стрес и намалява антиоксидантната защита (14, 16).

Нашето изследване установи, че алкохолният екстракт от *T. vulgare* и в двете приложени дози (200 и 1000 mg/kg) доведе до значимо подобряване както на пасивното обучение, така и на формирането на краткотрайни и дълготрайни паметови следи и при двата теста с наказателно подкрепление. Тези тестове за пасивно избягване се използват за оценка на ефектите на експериментални лекарства и вещества върху процесите на обучение и памет при експериментални модели на когнитивни дефицити, както и на възможните механизми, свързани с тези ефекти. Животните се опитват да избягат от среда, в която преди това им приложен неблагоприятен стимул (17). Субектите с не увредени когнитивни функции могат да избягат от местата където вече са били подложени на стимулация с краткотраен ток. Този отговор е измерено чрез определяне на времето, необходимо за преминаване през вратата в друго отделение на апарата или чрез не напускане на безопасната зона (18).

В нашето изследване наблюдавахме и значимо подобряване на разпознавателната памет и при двете дози на алкохолния екстракт от *T. vulgare*, като животните прекараха значимо по-дълго време при изследване на новия обект в тестовата фаза, което показва повишена изследователска активност и съхранена памет за стария обект. Този метод без награда или

положителна мотивация се фокусира върху спонтанния анализ на уникални и свързани стимули. Тестът се основава на вътрешната тенденция за изследване на нови обекти в сравнение с вече познатите. Този тест дава представа както за изследователско поведение на опитните животни, така и за паметовите възможности на индивида (19).

Заклучение

Резултатите, получени в настоящото изследване, предполагат, че прилагането на алкохолен екстракт от *T. vulgare* намалява индуцираното от скополамин когнитивно нарушение и амнезия. Протективният ефект е свързан с подобряване на процесите на пасивно обучение и формиране на краткотрайна и дълготрайна памет, както и със значителното увеличаване на времето, прекарано в изследване на нови елементи. Въпреки това, механизмите, отговорни за тези благоприятни ефекти, изискват допълнително проучване.

Благодарности: Авторите изказват своята благодарност за подкрепата на Медицински университет – Пловдив, проект ДПДП-07/2023.

Литература

1. Coté H, Boucher MA, Pichette A, Legault J. Anti-Inflammatory, Antioxidant, Antibiotic, and Cytotoxic Activities of *Tanacetum vulgare* L. Essential Oil and Its Constituents. *Medicines*. 2017 May 25;4(2):34.
2. Khatib S, Sobeh M, Faraloni C, Bouissane L. *Tanacetum* species: Bridging empirical knowledge, phytochemistry, nutritional value, health benefits and clinical evidence. *Front Pharmacol*. 2023 Apr 20;14:1169629.
3. Lahlou S, Tangi KC, Lyoussi B, Morel N. Vascular effects of *Tanacetum vulgare* L. leaf extract: In vitro pharmacological study. *J Ethnopharmacol*. 2008 Oct;120(1):98–102.
4. Lahlou S, Tahraoui A, Israili Z, Lyoussi B. Diuretic activity of the aqueous extracts of *Carum carvi* and *Tanacetum vulgare* in normal rats. *J Ethnopharmacol*. 2007 Apr;110(3):458–63.
5. Tournier H, Schinella G, De Balsa EM, Buschiazzo H, Mañez S, De Buschiazzo PM. Effect of the Chloroform Extract of *Tanacetum vulgare* and one of its Active Principles, Parthenolide, on Experimental Gastric Ulcer in Rats. *J Pharm Pharmacol*. 2010 Feb 18;51(2):215–9.
6. Caruso G, Godos J, Privitera A, Lanza G, Castellano S, Chillemi A, et al. Phenolic Acids and Prevention of Cognitive Decline: Polyphenols with a Neuroprotective Role in Cognitive Disorders and Alzheimer’s Disease. *Nutrients*. 2022 Feb 15;14(4):819.
7. Islam B, Li T, Xu M, Yang D, Lv H, Gassara G, et al. Emerging trends in cognitive impairment and dementia among older populations in Asia: A systematic review. *J Glob Health*. 2024 Nov 8;14:04233.
8. Kabra S, Priya T, Basu T, Bashir T, Sachdeva M. A Review Study on Herbal Nutraceuticals: A Leading Edge in the Treatment of Neurological Disorders with the Help of Medicinal Plants. *J Nat Remedies*. 2024 May 28;995–1004.
9. Narayana DBA, Joshi H, Tiwari VHS. Overview of approaches in ayurveda for neurological health and disorders. In: *Ayurvedic Herbal Preparations in Neurological Disorders* [Internet]. Elsevier; 2023 [cited 2024 Jun 10]. p. 41–88. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780443190841000090>
10. Shishmanova-Doseva M, Peychev L, Koeva Y, Terzieva D, Georgieva K, Peychev Z. Chronic treatment with the new anticonvulsant drug lacosamide impairs learning and memory processes in rats: A possible role of BDNF/TrkB ligand receptor system. *Pharmacol Biochem Behav*. 2018 Jun; 169:1-9. doi: 10.1016/j.pbb.2018.03.009.
11. Shishmanova-Doseva M, Atanasova D, Ioanidu L, Uzunova Y, Atanasova M, Peychev L, Tchekalarova J. The anticonvulsant effect of chronic treatment with topiramate after pilocarpine-induced status epilepticus is accompanied by a suppression of comorbid behavioral impairments

- and robust neuroprotection in limbic regions in rats. *Epilepsy Behav.* 2022; 134:108802. doi: 10.1016/j.yebeh.2022.108802.
12. Sankar A, Kandasamy D, Jones S, Radhakrishnan A, Janaki CS, Sheriff D, Prabhu K. Manasamitra Vatakam on Scopolamine-Induced Amnesia in Female Wistar Rats. *J Pharm Bioallied Sci.* 2024 Apr;16(Suppl 2):S1824-S1828. doi: 10.4103/jpbs.jpbs_9_24. Epub 2024 Apr 16.
 13. Ganeshpurkar A, Singh R, Tripathi P, Alam Q, Krishnamurthy S, Kumar A, Singh SK. Effect of sulfonamide derivatives of *phenylglycine* on scopolamine-induced amnesia in rats. *Ibrain.* 2023; 14;9(1):13-31. doi: 10.1002/ibra.12092.
 14. Chaturvedi S, Ganeshpurkar A, Shrivastava A, Dubey N. Protective effect of co-administration of caffeine and piracetam on scopolamine-induced amnesia in Wistar rats. *Curr Res Pharmacol Drug Discov.* 2021; 8;2:100052. doi: 10.1016/j.crphar.2021.100052.
 15. Laureiro-Martínez D, Brusoni S, 2018. Cognitive flexibility and adaptive decisionmaking: evidence from a laboratory study of expert decision makers. *Strat. Manag. J.* 39 (4), 1031–1058.
 16. Zhang J, Wang J, Zhou GS, Tan YJ, *et al.* Studies of the Anti-amnesic Effects and Mechanisms of Single and Combined Use of Donepezil and Ginkgo Ketoester Tablet on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2019, 18; 2019: 8636835. doi: 10.1155/2019/8636835.
 17. Rush DK. Scopolamine amnesia of passive avoidance: a deficit of information acquisition. *Behav Neural Biol.* 1988 Nov;50(3):255-74. doi: 10.1016/s0163-1047(88)90938-7.
 18. Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Brain Res Rev.* 2003 Mar;41(2-3):268-87. doi: 10.1016/s0165-0173(02)00268-0.
 19. Rajagopal L, Massey BW, Huang M, Oyamada Y, Meltzer HY. The novel object recognition test in rodents in relation to cognitive impairment in schizophrenia. *Curr Pharm Des.* 2014;20(31):5104-14. doi: 10.2174/1381612819666131216114240. PMID: 24345269.

EFFECTS OF GLP-1 RECEPTOR AGONIST SEMAGLUTIDE ON GUT MICROFLORA IN RATS WITH EXPERIMENTAL MODEL OF OBESITY

Venelin Denchev, Teodora Handjieva-Darlenska

Department of pharmacology and toxicology, Medical Faculty, Medical University – Sofia

ABSTRACT

Obesity is a chronic metabolic disorder characterized by excessive accumulation of subcutaneous and visceral adipose tissue. Latest research shows connection between changes in structure and function of gut bacterial microflora and pathogenesis of the disease. In the previous decade there was great success in pharmacological therapy of type 2 diabetes and obesity with introduction of drugs from group of GLP-1 receptor agonists. The aim of the current research is to establish effects of GLP-1 receptor agonist Semaglutide on microflora in rats with experimental model of obesity.

The experiment is conducted in two stages as follows. Stage 1 with duration of 12 weeks – for implementation of experimental model of obesity in mature male Wistar rats (n=20), experimental animals receive free access to standardized laboratory chow food with high fat content 22.5% and tap water with high D-fructose content 25% for induction of obesity. Stage 2 with duration of 8 weeks – after induction of obesity, the experimental animals are divided using the following principle: first group (n=10), treated with Semaglutide subcutaneous injections at dose of 0.1 mg/kg/24h and second (n=10) control group, treated with saline solution subcutaneous injections. During the entire duration of the experiment, biometric data from experimental animals is collected regularly (once weekly).

The ability of GLP-1 agonists to modulate the gut microbiome could be a possible mechanism and part of the complex pharmacological effect through which this group of medications influences obesity.

Keywords: Obesity, Semaglutide, Gut microflora.

ЕФЕКТИ НА GLP-1 РЕЦЕПТОРНИЯ АГОНИСТ SEMAGLUTIDE ВЪРХУ ЧРЕВНАТА МИКРОФЛОРА ПРИ ПЛЪХОВЕ С ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА ЗАТЛЪСТЯВАНЕ

Венелин Денчев, Теодора Ханджиева-Дърленска

Катедра по фармакология и токсикология, Медицински Факултет, Медицински Университет – София

Увод

В съвременното общество с всяка изминала година затлъстяването се превръща във все по-значим проблем за здравословното състояние на населението (както във възрастната популация, така и при децата), който превалява особено в развитите и развиващите се държави [1-3]. Затлъстяването представлява хронично метаболитно заболяване със сложна мултифакторна генеза, което се характеризира с прекомерно натрупване на подкожна и висцерална мастна тъкан, може да доведе до значителни нарушения на множество от физиологичните функции в организма и е предпоставка за развитието на над 250 усложнения от страна на много органи и системи [1-3]. Поради осезаемото въздействие, което това комплексно заболяване оказва върху здравословното състояние на пациентите, е нужно детайлно проучване и разработване на ефективни и безопасни методи за превенция и лечение с цел предотвратяване на усложненията и подобряване на качеството на живот на пациентите [1-3].

Чревната микрофлора представлява съвкупността от коменсални бактерии, намиращи

се в гастроинтестиналния тракт на човека (в най-значимо количество в дебелото черво). Благодарение на обширни проучвания през последните години, съществуват подробни данни за състава, нормалната физиологична функция на чревния микробиом и неговата връзка с патогенезата на множество заболявания [4,5]. Човешкият гастроинтестинален тракт (ГИТ) съдържа огромен брой бактерии – от няколко десетки до около сто трилиона – именно те изграждат изключително сложния чревен микробиом. Основни представители са няколко филотипни групи, както следва: отдел Bacteroidetes (с родовете Bacteroides и Prevotella) и отдел Firmicutes (с родовете Clostridium, Enterococcus и Lactobacillus), а допълнително се срещат, но в по-малко количество – отдел Actinobacteria (с род Bifidobacterium) и отдел Proteobacteria (с родовете Helicobacter и Escherichia) [4,5]. Тези микроорганизми са от изключително важно значение за нормалното функциониране на ГИТ и цялостно за човешкия организъм. Все повече проучвания се фокусират над техните ефекти на локално и системно ниво, които включват: потискане на развитието на патогенни за макроорганизма бактерии, участие в процеса на храносмилане чрез осъществяване на ферментационни процеси, производство на витамини, участие в поддържане на хомеостазата в организма чрез регулацията на множество ендокринни и метаболитни процеси [4,5].

Чревната микрофлора има способността да повлиява усвояването на макронутриенти и енергия от хранителните вещества (в зависимост от състава на приетата храна) и по този начин да повлиява енергийната хомеостаза. Съществуват различни хипотези как се осъществява това действие, като някои от предполагаемите механизми включват: увеличаване на усвояването на монозахариди, метаболизиране на несмилаеми полизахариди от храната (фибри) – като крайни продукти на тези ферментационни процеси са късоверижните мастни киселини (SCFA – Short-Chain Fatty Acids), например ацетат, пропионат и бутират, стимулиране на липогенезата в хепатоцитите (повишава се експресията на ключови за липогенезата ензими, а като източник на енергия се използват именно SCFA, които са абсорбирани от ГИТ мукозата), стимулиране на складирането на липиди в мастната тъкан – в адипоцитите (увеличаване на активността на ензима LPL – липопротеин липаза – не чрез директното ѝ активиране, а чрез потискане на фактори, които я инхибират), инхибиране на окислението на мастни киселини в черния дроб и мускулите [4,5]. Всички тези процеси показват значимата функция на бактериалната микрофлора върху регулацията на енергийния баланс в макроорганизма. Именно от тук произхожда и хипотезата за връзката на чревния микробиом със затлъстяването – все повече проучвания с експериментални модели при опитни животни и хора, показват как промяна в съдържанието на диетата може да повлияе състава и да наруши нормалните функции на тези бактерии, обитатели на гастроинтестиналния тракт (дисбиоза) – и това от своя страна да се окаже ключов момент в патогенезата на заболяването [4,5].

В литературата е описана значителната разлика между бактериите от микробиома при пациенти без и със затлъстяване. При хора без затлъстяване, основните представители на нормалната микрофлората са двата големи рода – Firmicutes и Bacteroidetes, които съвместно съставят около 90% от всички микроорганизми в ГИТ [6,7]. Проучванията показват, че затлъстяването се характеризира с промяна в съотношението между тези двата рода [6,7]. Установено е, че наднорменото тегло и приема на диета с високо калорийно съдържание водят до ясно изразено увеличаване на броя на Firmicutes, за сметка на намаляване на броя на Bacteroidetes. Тази закономерност се наблюдава както при хора, така и при експериментални модели с животни /плъхове/, въпреки някои съществени различия в състава на чревните микроорганизми, съотношението Firmicutes/Bacteroidetes е един от универсалните показатели, които имат съпоставими стойности при хора и при гризачи [6,7].

Най-голям успех във фармакологичното повлияване на затлъстяването беше постигнат в последното десетилетие с въвеждането на иновативната инкретин-базирана терапия – лекарствата наречени инкретинови миметици имат първостепенно значение за лечението на ендокринно-метаболитните заболявания – те са основно средство на избор в терапията както на захарен диабет тип 2, така и на затлъстяване [8]. GLP-1 рецепторните агонисти са

синтетични пептидни молекули (с частично изменен аминокиселинен състав), чието действие е аналогично на ендогенния GLP-1: проявяват хипогликемизиращ ефект, поради стимулиране на отделянето на инсулин от β -клетките на панкреаса и потискане на отделянето на глюкагон от α -клетките на панкреаса [8]. Същевременно, обаче, активирането на GLP-1 рецепторите води до проява на няколко други ефекта: на периферно ниво се забавя изпразването на стомаха и пасажа на храна през ГИТ, а на централно ниво се наблюдава намален апетит и намален прием на храна – комбинацията от тези фактори в крайна сметка води до редукция на телесното тегло [8].

Към момента в научната литература съществуват ограничени данни относно връзката между приложението на GLP-1 рецепторните агонисти и повлияването на коменсалните микроорганизми в ГИТ. В базите данни е достъпна информация само за най-често прилагания представител на групата – лекарството Liraglutide – като за него е установено, че води до промени в състава на чревната микрофлора, характерни за редукция на тегло – нормализира съотношението Firmicutes/Bacteroidetes като намалява количеството Firmicutes и увеличава количеството Bacteroidetes, увеличава броя на пробиотични бактерии – от род *Vifidobacterium* и род *Lactobacillus* [9-15]. Въпреки широкото приложение на новият GLP-1 рецепторен агонист Semaglutide в клиничната практика през последните години, в научната литература до момента не са представени данни за неговото взаимодействие с чревната микрофлора. Настоящото проучване има за цел да установи евентуалното наличие на такава връзка, което би подпомогнало по-нататъшното разбиране на фините регулаторни механизми, чрез които лекарственото средство води до редукция на телесното тегло и подобрява метаболитния статус.

Нашата хипотеза е, че GLP-1 рецепторния агонист Semaglutide модулира чревния микробиом, като създава благоприятна метаболитна среда за последващите ефекти на лекарството (редукция на телесно тегло). Проучването относно ефектите на GLP-1 рецепторния агонист Semaglutide върху чревната микрофлора при плъхове с експериментален модел на затлъстяване ще бъде проведено по следната методика.

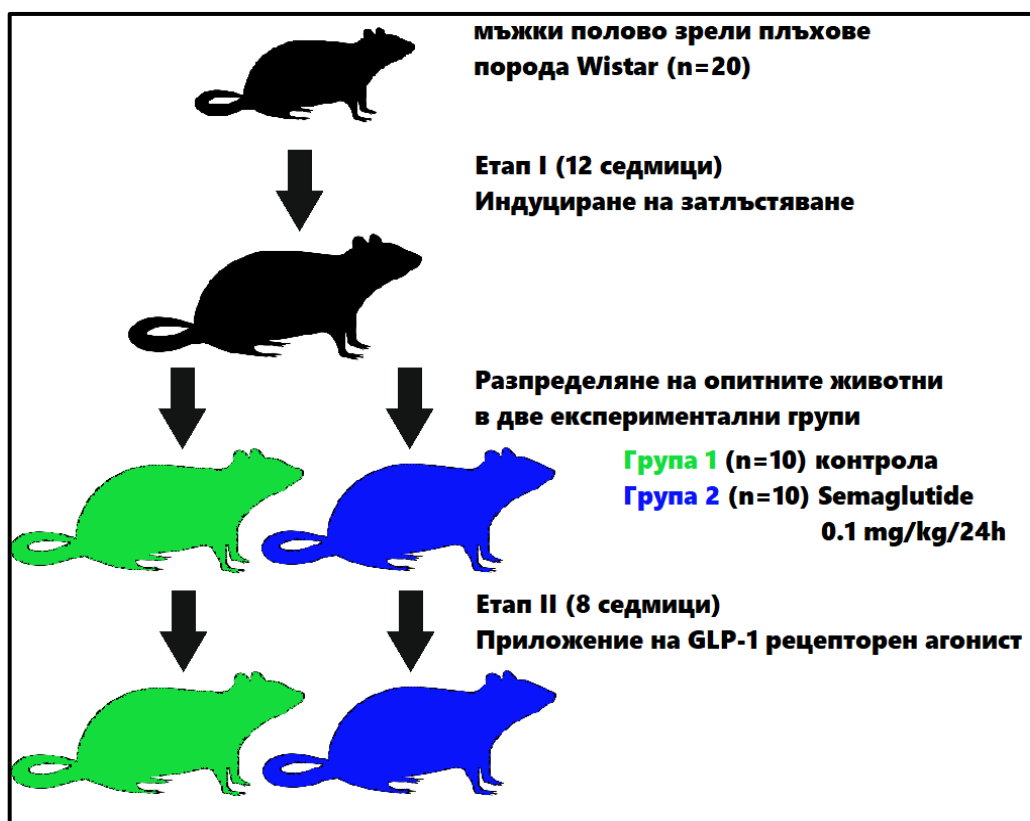
Етап 1 на експеримента с продължителност 20 седмици, по време на който ще бъде осъществен експериментален модел на затлъстяване в гризачи – за първоначалната част на експеримента ще бъдат използвани полово зрели мъжки плъхове (n=20) порода Wistar със средно телесно тегло 300 грама. Опитните животни ще бъдат отглеждани в отделни клетки, при постоянна стайна температура (23°C) с 12 часов дневен цикъл светлина/тъмнина и ще имат свободен достъп до храна и вода. След провеждане на 1 седмица адаптация, животните (n=20), ще получават стандартизирана лабораторна храна с високо съдържание на мазнини 22.5% (фирма Altromin) и вода с 25% съдържание на D-(-)-фруктоза (фирма Sigma-Aldrich) за индуциране на затлъстяване за период от 12 седмици. По време на цялата продължителност на експериментална ще се осъществява регулярно (ежеседмично) измерване на биометрични показатели на опитните животни – телесно тегло, абдоминална обиколка, назо-анална дължина, индекс на телесна маса и индекс на Лий. Телесното тегло (гр) и абдоминалната обиколка (см) се измерват по едно и също време (сутрин) ежеседмично за целия период на експеримента. Индекса на телесна маса отразява съотношението на телесното тегло разделено на корен квадратен от ръста. За плъхчета от породата Вистар варира от 0.45-0.68 гр/см². Над тези стойности се отчита затлъстяване. Индексът на Лий се формира като кубичен корен от теглото (грамовете) разделен на назо-аналната дължина на тялото (сантиметри). Плъхове с индекс на Лий над 0,31 се считат за затлъстели.

Етап 2 на експеримента с продължителност 8 седмици – след като се индуцира затлъстяване в експерименталните животни започва вторият етап на проучването. Те се разделят на случаен принцип в две групи: първа група (експериментална група, n=10), третирана със Semaglutide веднъж дневно в доза 0.1 mg (100 mcg)/kg телесно тегло, въведен интраперитонеално и втора група (контролна група, n=10), третирана с физиологичен разтвор 0.9% NaCl, въведен интраперитонеално. По време на цялата продължителност на втория период ще се осъществява ежеседмично измерване на антропометрични показатели на

опитните животни. По време на цялата продължителност на експериментална продължава регулярно (ежеседмично) измерване на биометрични показатели на опитните животни – телесно тегло, абдоминална обиколка, назо-анална дължина, индекс на телесна маса и индекс на Лий.

В края на проучването (20та седмица) ще бъдат взети биологични проби (изпражнения) от всяко от опитно животно за анализиране чрез PCR тестове за количествено установяване на бактерии представители на чревната микрофлора – комплекти MutaPLEX® EU/BAC/BIF Real-Time PCR Kit и MutaPLEX® AKM/FAEP Real-Time PCR Kit. В края на опита на при всички животни ще се осъществи анестезия чрез интраперитонеално инжектиране на разтвор, съдържащ Тиопентал (60 мг/кг телесно тегло) и последващо евтаназиране на плъховете чрез декапитация.

GLP-1 рецепторните агонисти като Semaglutide намират все по-широко приложение в съвременната клинична практика, поради което резултатите от настоящето проучване могат да помогнат за допълнително разбиране на фините механизми на редукция на телесното тегло. Връзката на чревната микрофлора с патогенезата на затлъстяването и възможността за повлияване чрез фармакологични методи е перспективна насока за проучване.



Фигура 1. Дизайн на проучването.

Литература

1. Lustig RH, Collier D, Kassotis C, Roepke TA, Kim MJ, Blanc E, et al. Obesity I: Overview and molecular and biochemical mechanisms. *Biochemical Pharmacology*. 2022;199:115012.
2. Masood B, Moorthy M. Causes of obesity: a review. *Clinical Medicine*. 2023;23(4):284-91.
3. Yang M, Liu S, Zhang C. The Related Metabolic Diseases and Treatments of Obesity. *Healthcare*. 2022;10(9):1616.
4. Cani PD, Delzenne NM. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Current Opinion in Pharmacology*. 2009;9(6):737-43.
5. Cani PD, Delzenne NM. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacology &*

- Therapeutics. 2011;130(2):202-12.
6. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444(7122):1022-3.
 7. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-31.
 8. Popoviciu M-S, Păduraru L, Yahya G, Metwally K, Cavalu S. Emerging Role of GLP-1 Agonists in Obesity: A Comprehensive Review of Randomised Controlled Trials. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(13):10449.
 9. Moreira G, Azevedo F, Ribeiro L, Santos A, Guadagnini D, Gama P, et al. Liraglutide modulates gut microbiota and reduces NAFLD in obese mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2018;62:143-54.
 10. Zhang Q, Xiao X, Zheng J, Li M, Yu M, Ping F, et al. Featured article: Structure moderation of gut microbiota in liraglutide-treated diabetic male rats. *Experimental Biology and Medicine*. 2018;243(1):34-44.
 11. Zhao L, Chen Y, Xia F, Abudukerimu B, Zhang W, Guo Y, et al. A Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Agonist Lowers Weight by Modulating the Structure of Gut Microbiota. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9.
 12. Liu Q, Cai B-Y, Zhu L-X, Xin X, Wang X, An Z-M, et al. Liraglutide modulates gut microbiome and attenuates nonalcoholic fatty liver in db/db mice. *Life Sciences*. 2020;261:118457.
 13. Zhang N, Tao J, Gao L, Bi Y, Li P, Wang H, et al. Liraglutide Attenuates Nonalcoholic Fatty Liver Disease by Modulating Gut Microbiota in Rats Administered a High-Fat Diet. *BioMed Research International*. 2020;2020:1-10.
 14. Zhao L, Qiu Y, Zhang P, Wu X, Zhao Z, Deng X, et al. Gut microbiota mediates positive effects of liraglutide on dyslipidemia in mice fed a high-fat diet. *Frontiers in Nutrition*. 2022;9.
 15. Ying X, Rongjiong Z, Kahaer M, Chunhui J, Wulasihan M. Therapeutic efficacy of liraglutide versus metformin in modulating the gut microbiota for treating type 2 diabetes mellitus complicated with nonalcoholic fatty liver disease. *Frontiers in Microbiology*. 2023;14.

EFFECT OF GR 159897 ON COLONIC MOTILITY IN RATS AFTER ACUTE WATER AVOIDANCE STRESS

Venka Tsankova¹, Gergana Toteva², Evgenia Tsoleva¹, Boris Dinkov¹, Plamena Panajotova¹,
Galya Stavreva¹

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Medical University – Pleven

²Vivarium, Medical University – Pleven

ABSTRACT

Introduction. GR 159897 is a potent, selective antagonist of neurokinin NK2 receptor. It inhibits NK2-mediated contraction of experimental animals' tracheal and intestinal smooth muscle and has anxiolytic properties.

Aim and purpose. The purpose of this study was to evaluate the effect of GR 159897 on changes in gastrointestinal motility in rats after water avoidance stress (WAS).

Material and methods. Wistar rats received WAS for 1 h and the fecal pellet output was counted; colorectal transit, plasma CTRH, ACTH, cortisol, and pro- and anti-inflammatory cytokines by ELISA were measured. Spontaneous and electrically stimulated motor activity of circular (CM) and longitudinal (LM) colonic muscle was investigated.

Results. Acute WAS accelerated transit time and increased the level of stress hormones. Amplitudes and frequency of spontaneous asynchronous contractions of CM and LM after WAS were higher than controls, while GR 159897 intraperitoneal injection (0.5 mg/kg) significantly suppressed them. Electrical field stimulation (EFS; 0.8 ms, 40 V, 10 Hz, 20 s) elicited contractions of CM were most pronounced in control animals (9.6±0.8 mN), followed by those subjected to WAS (8.41±0.55; p<0.05) and lowest after GR 159897 pretreatment (5.26±0.28). NG-nitro-L-arginine enhanced the contraction of CM from controls by 47.08%, from the WAS rats by 17.59% and by 3.04% after GR 159897 administration, which shows the reduced sensitivity to NO inhibitory transmission. The addition of atropine reduced contractions of CM by 31.30% in controls, by 41.86% after WAS, and by 23.74% after GR 159897 injection.

Conclusion. GR 159897 affected stress hormones and altered spontaneous motor activity after acute WAS. Pretreatment with GR 159897 showed more significant effect on nitric oxide than cholinergic transmission.

Key words: atropine, neurokinin NK2 receptor, NG-nitro-L-arginine, rat colon, water avoidance stress

ВЛИЯНИЕ НА GR 159897 ВЪРХУ МОТИЛИТЕТА НА ДЕБЕЛОТО ЧЕРВО ПРИ ПЛЪХОВЕ СЛЕД ОСТЪР СТРЕС ПРЕДИЗВИКАН ПО МЕТОДА НА ИЗБЯГВАНЕ НА ВОДА

Венка Цанкова¹, Гергана Тотева², Евгения Цолова¹, Борис Динков¹, Пламена Панайотова¹, Галя Ставрева¹

¹Катедра по фармакология и токсикология, Медицински университет – Плевен

²Вивариум, Медицински университет – Плевен

Излагането на стрес е основен рисков фактор в патогенезата на различни заболявания на стомашно-чревния тракт (СЧТ): гастроезофагеална рефлуксна болест, пептична язва, функционална диспепсия, възпалително заболяване на червата (ВЗЧ), синдром на раздразненото дебело черво (СРДЧ) и други функционални нарушения на стомашно-чревния тракт. Засяга се стомашно-чревния мотилитет, чревната пропускливост, висцералната чувствителност, активират се мастоцитите, освобождават се възпалителни цитокини и се повлиява чревния микробиом. Дисрегулацията на мозъчно-чревната ос играе централна роля в патогенезата на тези промени. Стресът, определен като заплаха за хомеостазата на организма

чрез системни (физически) или психоемоционални събития, инициира адаптивни защитни физиологични и поведенчески реакции [1, 2]. Алостазата, т. е. способността да се поддържа хомеостазата чрез активирани на невронни, ендокринни и имунни системи за отговор, гарантира оцеляване на организма. Въпреки това, активирането на алостатичните системи може да стане неадаптивно поради чести, много интензивни или хронични стресови фактори. Стресори могат да имат роля на рискови фактори за развитие на функционални гастроинтестинални разстройства, да отключат или обострят съществуващ болестен процес или да доведат до хронифициране на симптомите [3, 4].

През последните десетилетия се затвърди ролята на двупосочното взаимодействие между мозъка и червата при функционални заболявания на червата [5, 6, 7]. Тези взаимодействия се осъществяват по невронални пътища чрез еферентните и аферентните компоненти на парасимпатиковата, симпатиковата и ентэралната нервна система (ЕНС) [8], хормонален път, включително хипоталамо-хипофизно-надбъбречната (ХХН) ос [10] и/или компоненти на имунната система и чревния микробиом [9]. Последни проучвания идентифицираха невромедиатори и рецептори в централната нервна система и червата, които участват в взаимодействията им при здраве и болести [9, 11]. Ключова роля в отговора към различни стресори и взаимодействието между мозъка и червата имат сигналните пътища на кортикотропин освобождаващият хормон (CRH) [12, 9]. Стресът е свързан със стимулиране на ХХН ос.

Хистамини, протеази, метаболити на полиненаситени мастни киселини и тахикинини вече са признати за някои от основните медиатори на възпалението и играят основна роля при функционални стомашно-чревни разстройства [13, 14, 15]. Тахикинините са особено важни поради значението, което имат при предаването на болката, и регулацията на чревния мотилитет.

Тахикинините, включително субстанция Р (СР), неврокинин А (НКА) и неврокинин В, са важни невропептидни медиатори, които допринасят за функциите на стомашно-чревния тракт, като например мотилитет и секреция, и за патофизиологичните процеси, които допринасят за чревното възпаление и нарушената чревна перисталтика [16, 17]. Ефектите на СР, НКА и неврокинин В се медиират предимно чрез действието на неврокинин-1 рецептори (NK1R), неврокинин-2 рецептори (NK2R) и неврокинин-3 рецептори, съответно (NK3R) [18]. GR 159897 е селективен антагонист на неврокининовия NK2 рецептор, който потиска контракциите на трахеалната и чревната гладка мускулатура на експериментални животни и има анксиолитични свойства.

Механизмът, чрез който стресът повлиява мотилитета на дебелото черво при пациенти със СРДЧ, не е изцяло изяснен. Поради тази причина влиянието му върху СЧТ може да бъде проследено върху опитни животни, подложени в лабораторни условия на остър или хроничен стрес. При лабораторни условия стресът може лесно да се възпроизвежда чрез множество методи при спазването на общите мерки, които гарантират възпроизводимостта на експерименталните данни (напр. порода на животните, пол, възраст, източник, атмосферни условия, умения на персонала и т.н.), предварителното разглеждане на определени проблеми могат да подобрят ефективността на модела на стрес при животните [19].

В дизайна на нашето проучване сме избрали модел на остър стрес (water avoidance stress, WAS) с характеристика на психогенен. Освен изследване на отговорите на кръговата и надлъжната мускулатура от изолиран сегмент от колон към субстанции агонисти и антагонисти на основни медиатори в ЕНС, са проследени нивата на стресови хормони.

Целта на проучването е да проследим влиянието на GR159897 върху мотилитета на дебелото черво при плъхове след остър стрес предизвикан по метода на избягване на вода.

Материали и методи.

Експериментът е извършен в съответствие с разпоредбите за хуманно отношение към животните и е одобрен от БАБХ.

Субстанции

GR 159897 (C₂₃H₂₇FN₂O₂S; CAS 158848-32-9) закупен от Santa Cruz Biotechnology, Inc. Rat CRH (E-EL-R0270), Rat ACTH (E-EL-R0048), Rat CORT(E_EL_R0160), Rat IL-1alpha _Interleukin 1 Beta (E-EL-R0011), Rat IL-6 (E-EL-R0015) ELISA Kits закупени от Elabscience.

Животни и експериментален протокол

Експериментите се провеждат върху мъжки бели плъхове порода *Wistar* с тегло 250-300 грама, които бяха разделени в 4 групи (контрола, Sham контрола, WAS и WAS+GR). Животните са получени от Научно-лабораторния животновъден център в Сливница (България) и са отглеждани в университетския вивариум за 1 месец при температура 22±2°C и влажност 50±10%, при нормална гранулирана диета и вода *ad libidum*.

Групата WAS+GR бе претретирана с GR159897 инжектирано интраперитонеално в доза 0.5 mg/kg b. w., 15 мин преди WAS.

Стресът бе предизвикан по WAS [20]. Експериментите се провеждаха сутрин между 9:00 и 11:00 часа. Този добре характеризирани тест представлява мощен психологически стресор, съпроводен с повишение на адренекортикотропен хормон (ACTH) и кортизол в рамките на 30 минути. Животните бяха поставяни на кръгла платформа (диаметър 8 cm и 9 cm височина), монтирана в центъра на бял полупрозрачен пластмасов контейнер (50 cm, 35 cm, 33 cm), напълнен с прясна чешмяна вода при стайна температура до 1 cm под повърхността на платформата и оставяни необезпокоявани за 60 мин. Процедурата се провеждаше еднократно. *Изследване на субстанции агонисти и антагонисти върху съкратителната активност на изолирани препарати от дистален колон*

От всяко животно се изолира дистален колон с интактни нервни плексуси и гладкомускулни слоеве, без отстраняване на мукозата. Изолираха се циркулярни гладкомускулни ринг-препарати с ширина 2 mm от дисталната и проксималната част на препарата и ивици с дебелина от 2 mm и дължина 18-20 mm по надлъжна ос. Препаратите, фиксирани в две противоположни точки се монтираха в органични вани в постоянно оксигениран разтвор на Krebs с температура 36,5°C. За предизвикване на възбуждане на нервните структури се използва електрическа полева стимулация (EFS). Приложиха се провъгълни импулси с продължителност от 0.8 ms и електрическо напрежение от 40 V с честота от 10 Hz за 20 s през интервал не по-малък 5 min. Компютъризирана механографска on-line техника се използва за регистриране на моторната активност.

Холинергичните въздействия изследвахме чрез прилагане на неселективния М-холинолитик atropine sulfate, нитрергичните – на инхибитора на азотнооксидната синтаза NG-nitro-L-arginine (L-NAME). Индуцираните от EFS контрактилни отговори са анализирани в отсъствие или присъствие на L-NAME и/или атропин.

Имунологични изследвания

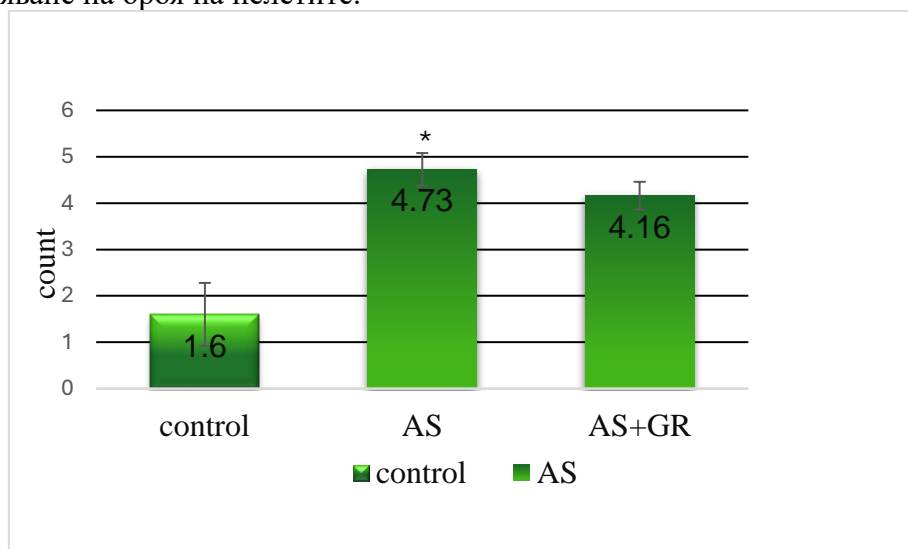
Кръвта за измерване на нивата на CRH, ACTH и кортикостерон чрез ELISA се взе от сърцето на анестезираните животни. Тестовете се извършиха с помощта на комплект за имуноанализ съгласно инструкциите на производителя. Всяка проба се анализира в два екземпляра. Кръвта за имунологичните изследвания се събираше до 1 час след приложението на стресора.

Статистическа обработка на резултатите

Организацията и статистическата обработка на първичната информация се извърши с програмните продукти MS Office Excel 2019 и SPSS v.24.0. Направи се дескриптивен и корелационен анализ на количествени променливи. Нормално разпределените данни са представени като средна стойност (±) стандартна грешка, а при липса на нормално разпределение данните са представени с помощта на позиционни средни величини – медиана (Me) и отстояние между кватилите (IQR) - разлика между 25-ия и 75-ия. Статистическата достоверност на различията е оценявана с помощта на параметрични тестове (t-тест). За значими са приети различията при ниво P<0.05 при двустранен тест. Графичният анализ се извърши с помощта на софтуерния пакет Excel 2019, който дава по-добри възможности за графично представяне от SPSS.

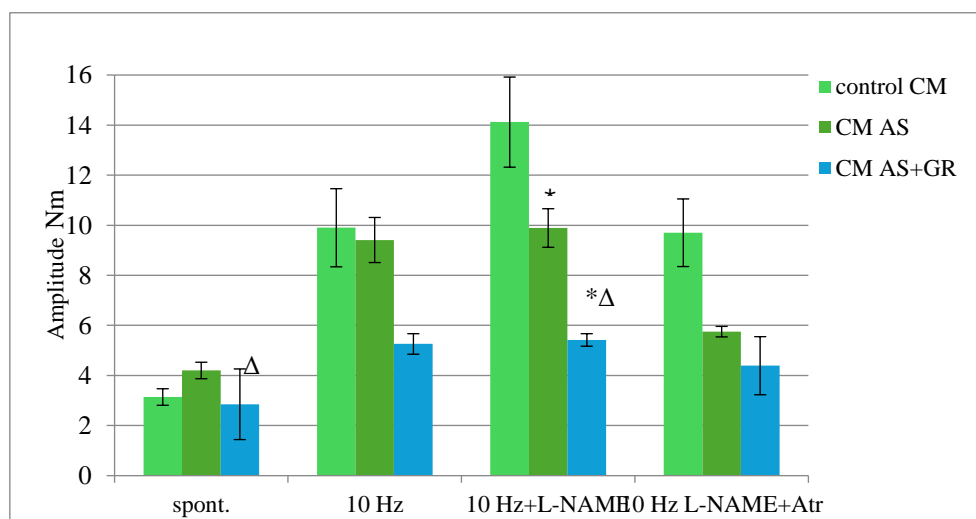
Резултати

Острият WAS стрес увеличава екскрецията на фекални пелети при всички животни (Фиг. 1). Отделянето на фекални гранули от контролите е 3 пъти по-малко от броя на фекалните гранули, отделени по време на 60-минутния WAS. При претретираната с GR 159897 група се отчете намаляване на броя на пелетите.



Фиг. 1 Среден брой отделени пелети при контролна, AS и AS+GR групи. * $p < 0.05$ спрямо контролната група

При циркулярна мускулатура в ринг препарати от колон спонтанните асинхронни контракции на CM след WAS бяха с по-високи амплитуди и честота от контролите, инжектирането на GR 159897 значително ги потиска (Фиг. 2). Предизвиканите от електрическа стимулация (EFS; 0.8 ms, 40 V, 10 Hz, 20 s) контракции на CM са най-изразени при контролните животни, следвани от тези на WAS и най-ниски след претретиране с GR 159897. След приложението на L-NAME амплитудата на контракцията на CM е статистически значимо най-висока при контролите спрямо WAS и WAS+GR, а добавянето на Atr потиска амплитудите на контракциите, индуцирани от L-NAME.

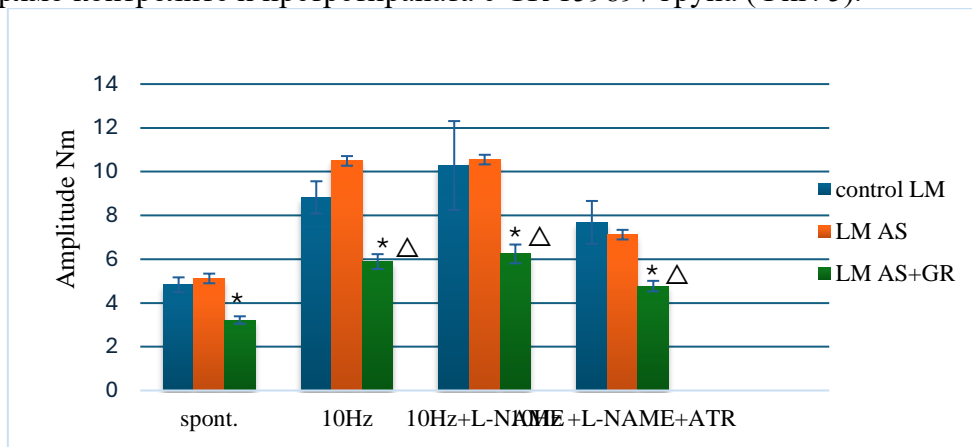


Фиг. 2 Спонтанна и електрически-стимулирана двигателна активност на CM при прилагане на L-NAME и Atropin sulfate. * $p < 0.05$ спрямо контролната група, Δ $p < 0.05$ спрямо AS група

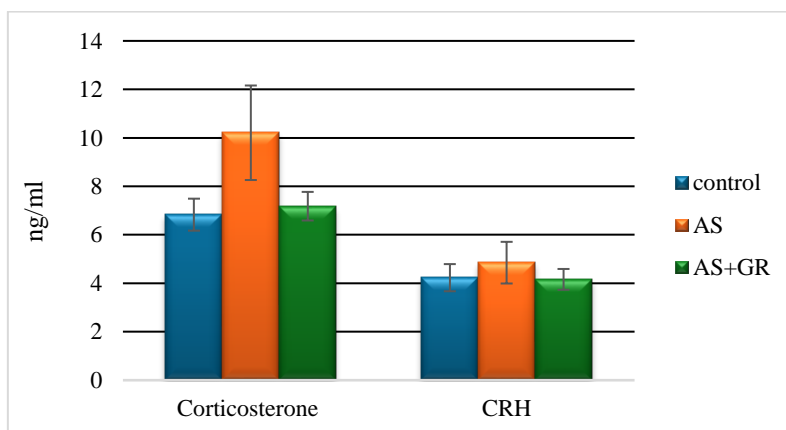
При препаратите от лонгитудинална мускулатура спонтанните асинхронни контракции след остър WAS бяха по-високи по честота и амплитуда от контролите, а инжектирането на GR 159897 значително ги потиска (Фиг. 3). След електрическа стимулация (EFS; 0.8 ms, 40 V, 10

Hz, 20 s) контракциите на LM са най-изразени при WAS, L-NAME повлиява незначително амплитудите, като добавянето на Atr ги инхибира. В претретираната с GR група контракциите на лонгитудиналната мускулатура са потиснати статистически значимо.

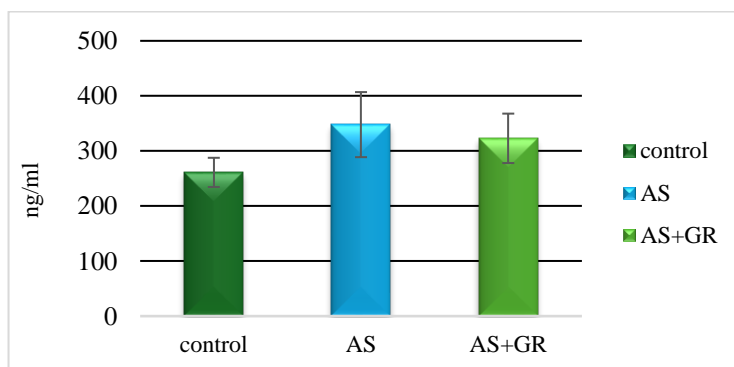
На 60-тата минута след острия WAS нивата на CRH и кортикостерон бяха увеличени без статистически значима разлика спрямо контролите. В претретираната с GR 159897 група те са съпоставими със серумните концентрации в контролната група (Фиг. 4). В серумните нива на АКТН на 60-тата минута след острия стрес се отчете повишение, без статистически значима разлика спрямо контролите и претретираната с GR 159897 група (Фиг. 5).



Фиг. 3 Спонтанна и електрически-стимулирана двигателна активност на LM при прилагане на L-NAME и Atorin sulfate. * $p < 0.05$ спрямо контролната група, Δ $p < 0.05$ спрямо AS група



Фиг. 4 Плазмени нива на CRH и кортикостерон измерени чрез ELISA, при контролната, AS и AS+GR групи



Фиг. 5 Плазмени нива на АКТН измерени чрез ELISA при контролната, AS и AS+GR групи

Дискусия

Това проучване предоставя доказателства в подкрепа на ролята на тахикинините в модулирането на биологичната стресова система. Семейството на неврокинините имат различни физиологични и патофизиологични роли, включително невротрансмисия, възпаление, предаване на болка и контракции на гладката мускулатура. GR 159897 ((R)-1-[2-(5-флуоро-1H-индол-3-ил)етил]-4-метокси-4-[(фенилсулфинил)метил] пиперидин) е високо ефективен селективен антагонист на тахикининовите NK2 рецептори. В трахеята на морско свинче GR 159897 предотвратява контракциите, предизвикани от NK2 рецепторния агонист [Lys3,Gly8-R-gamma-lactam-Leu9]-неврокинин A-(3-10) (GR64349). In vivo GR159897 (0,12 mg/kg i.v.) демонстрира дълга продължителност на действие (3 часа) при морски свинчета, като ефективно противодейства на бронхоконстрикцията, предизвикана от GR64349 [21]. Освен това Delvalle и съавтори (2017) показват, че GR 159897 предпазва от невровъзпаление в ентэралната нервна система при DNBS модел на колит при мишки [22].

Оценихме ефекта на GR 159897 върху индуцираната от стреса пропульсивна подвижност на дебелото черво, като преброихме броя на фекалните пелети, отделени по време на стрес. GR 159897 инжектиран интраперитонеални 15 минути преди стреса значително намали броя на пелетите отделени по време на 60 минутния WAS. Rupniak и съавтори (2017) изследват ефектите на NK2R антагонист върху колоректалното налягане и хипотонията, предизвикана от три NK2 агонистични пептида при кучета. Прилагането на GR 159897 (1 mg/kg IV) премахва контракциите на дебелото черво, предизвикани от агонистите, което потвърждава, че този отговор се медира от NK2 рецептора [23].

В нашето проучване нивата на CRH, AKTH и кортикостерон бяха повишени макар и не сигнификантно след острия WAS, докато в групата претретирана с GR159897 се отчете понижение в техните серумни нива. Сигналните пътища на CHR играят ключова роля в отговора на различни стресови фактори и взаимодействието между мозъка и червата [12, 24]. CRH модулира функциите на стомашно-чревния тракт чрез невронни пътища в централната и автономната нервна система [25, 26]. Активирането на мозъчните CRH рецептори води до забавено изпразване на стомаха и повишена моторна функция на дебелото черво при остър психологически, физически или химически стрес, както и при активиране на имунната система. Последните открития за подтиповете на CRH рецепторите подчертават ролята на медуларния CRH-R2 в инхибирането на изпразването на стомаха. За разлика от тях централното инжектиране на CRF и психологическият стрес активират CRF-R1, което води до анксиогенни и мотилни реакции в дебелото черво [27].

Заклучение.

Въз основа на нашите резултати можем да заключим, че WAS увеличава пропульсивната моторика на дебелото черво, оценена чрез броя отделени за 60 мин пелети, както и спонтанните контракции на циркулярната и лонгитудинална гладка мускулатура на дебелото черво по амплитуда и честота. GR 159897 потиска пропульсивната моторика на дебелото черво и спонтанната моторна активност на двата мускулни слоя. При остър WAS холинергичната възбудна трансмисия има значителна роля.

Претретирането с GR 159897 повлиява по-значително L-NAME индуцираните контракции в ринг препарати от циркулярна мускулатура, докато в препаратите от лонгитудинална мускулатура по-значително е повлияна възбудната холинергична трансмисия.

Литература

1. Selye H. Syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature 1936;138:32.
2. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders: Overview of physical and behavioral homeostasis. JAMA 2001; 1992:1244–1252.
3. Mayer EA. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. Gut 2000;47:861–869
4. Mönnikesa J.J H. Tebbeb M. Hildebrandta P. Arcka E. Osmanogloua M. Rosea B. Klappa B. Wiedenmanna I. Heymann-Mönnikesa Role of Stress in Functional Gastrointestinal Disorders

- Evidence for Stress-Induced Alterations in Gastrointestinal Motility and Sensitivity *Dig Dis* 2001;19:201–211
5. Fukudo S, Kanazawa M. Gene, environment, and brain-gut interactions in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26(suppl 3):110-115.
 6. Jones MP, Dillely JB, Drossman D, Crowell MD. Brain-gut connections in functional GI disorders: anatomic and physiologic relationships. *Neurogastroenterol Motil* 2006;18:91-103.
 7. Al Omran Y, Aziz Q. The brain-gut axis in health and disease. *Adv Exp Med Biol* 2014;817:135-153.
 8. Furness JB. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012; 9(5):286–294.
 9. Holzer P, Farzi A. Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis. *Adv Exp Med Biol* 2014;817:195-219.
 10. Filaretova L. The hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: hormonal brain-gut interaction and gastroprotection. *Auton Neurosci* 2006;125:86-93.
 11. Stengel A, Taché Y. Corticotropin-releasing factor signaling and visceral response to stress. *Exp Biol Med (Maywood)* 2010; 235: 1168-1178.
 12. Taché Y, Brunnhuber S. From Hans Selye's discovery of biological stress to the identification of corticotropin-releasing factor signaling pathways: implication in stress-related functional bowel diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1148:29-41
 13. Corsetti M, Akyuz F, Tack J. Targeting tachykinin receptors for the treatment of functional gastrointestinal disorders with a focus on irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2015;27:1354.
 14. Wouters MW, Balemans D, Van Wanrooy S, Dooley J, Cibert-Goton V, Alpizar YA, et al. Histamine receptor H1-mediated sensitization of TRPV1 mediates visceral hypersensitivity and symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2016;150:875–987.e9.
 15. Cenac N, Bautzova T, Le Faouder P, Veldhuis NA, Poole DP, Rolland C, et al. Quantification and potential functions of endogenous agonists of transient receptor potential channels in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2015;149:433–444.e7.
 16. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol Ther* 1997;73:173–217.
 17. Steinhoff MS, von Mentzer B, Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett NW. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol Rev* 2014;94:265–301.
 18. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinin receptors in the gut: physiological and pathological implications. *Curr Opin Pharmacol* 2002;1:583–590.
 19. Patchev VK, Patchev AV. Experimental models of stress. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. 2006;8(4):417-32.
 20. Mayer EA. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* 2000;47:861–869
 21. Beresford, I.J., Sheldrick, R.L., Ball, D.I., Turpin, M.P., Walsh, D.M., Hawcock, A.B., et al.. GR159897, a potent non-peptide antagonist at tachykinin NK2 receptors. *European journal of pharmacology*, 1995; 272(2-3): 241-248.
 22. Delvalle, N. M., Gulbransen, B. The neurokinin-2 receptor antagonist GR 159897 protects against neuroinflammation in the mouse enteric nervous system during colitis. *The FASEB Journal*, 2017; 31: 893-2.
 23. Rupniak, N. M. J., Katofiasc, M., Marson, L., Thor, K. B. NK2 and NK1 receptor-mediated effects of NKA and analogs on colon, bladder, and arterial pressure in anesthetized dogs. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2017; 391(3): 299–308.
 24. Holzer P, Farzi A. Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis. *Adv Exp Med Biol* 2014;817:195-219.
 25. Larauche M, Gourcerol G, Wang L, Pambukchian K, Brunnhuber S, Adelson DW, et al. Cortagine, a CRF1 agonist, induces stresslike alterations of colonic function and visceral

- hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* juill 2009;297(1):G215-227.
26. Taché Y. Corticotrophin-releasing factor 1 activation in the central amygdale and visceral hyperalgesia. *Neurogastroenterol Motil.* janv 2015;27(1):1–6.
 27. Martínez V, Taché Y. Role of CRF receptor 1 in central CRF-induced stimulation of colonic propulsion in rats. *Brain Research*, 2001; 893(1-2): 29–35.

LEVETIRACETAM, BRIVARACETAM, SELETRACETAM AND SV2A IN THE THERAPY AND PATHOGENESIS OF EPILEPSY

Georgi K. Maximov¹, Lyubina Todorova^{1,2}, Bogdan Kirilov³

¹Department „Marketing Authorisation of Medicinal Products“, Bulgarian Drug Agency to the Minister of the Health of Republic of Bulgaria.

²Medical College, University „Prof. D-r. Assen Zlatarov“, Burgas, Bulgaria

³Executive Director of Bulgarian Drug Agency to the Minister of Health of Republic of Bulgaria.

ABSTRACT

Introduction: Epilepsy is a chronic brain disease, characterized by permanent predisposition to generate repeated short-term epileptic seizures at different time intervals. Epilepsy therapy is difficult because of the specific congenital or acquired structural-functional disturbances occurring in the damaged nerve tissue. Often, monotherapy is not sufficient, which necessitates the combination of several antiepileptic drugs to limit epileptic seizures.

The group of "racetams" is one of the most relevant in combined epilepsy's therapy, including levetiracetam, brivaracetam and seletracetam. They are indicated for the treatment of various types of epileptic seizures with genetic or acquired etio-pathogenesis, in patients under and over 18 years of age. These three antiepileptic active substances have an atypical mechanism of action. They do not affect epileptic seizures by acting on ATP-ase ion channels, but by acting on the poorly studied synaptic vesicle protein SV2A.

Objective: To elucidate the mechanisms through which „racetams“ interact with SV2A to affect epileptic seizures.

Materials and methods: A comprehensive scientific review of specialized publications concerning the pharmacomechanisms between “racetams” and SV2A was performed.

Conclusion: This report presents the molecular mechanisms of antiepileptic action of the main group of antiepileptic drugs, expressed in the modulation of voltage-gated and ligand-gated ion channel receptors, in contrast to the mechanisms through which levetiracetam, brivaracetam and seletracetam suppress epileptogenic activity of neurons in the epileptogenic focus, and their association with synaptic vesicle protein SV2A. The genetics, structure, and function of the synaptic vesicle protein SV2A itself in the pathogenesis and pharmacotherapy of epilepsy are also discussed.

Key words: Epilepsy, Levetiracetam, Brivaracetam, Seletracetam, SV2A

ЛЕВЕТИРАЦЕТАМ, БРИВАРАЦЕТАМ, СЕЛЕТРАЦЕТАМ И SV2A ВЪВ ФАРМАКОТЕРАПИЯТА И ПАТОГЕНЕЗА НА ЕПИЛЕПСИЯ

Георги Константинов Максимов¹, Любина Тодорова^{1,2}, Богдан Кирилов³

¹Дирекция „Разрешения за употреба на лекарствените продукти“, Изпълнителна агенция по лекарствата към Министъра на здравеопазването на Република България

²Университет „Проф. Д-р Асен Златаров“, Бургас, България

³Изпълнителна агенция по лекарствата към Министъра на здравеопазването на Република България

Увод

Епилепсията е хронично, полиетиологично, вродено или придобито заболяване на централната нервна система и главния мозък, което се характеризира с трайно предразполагане към генериране на повтарящи се краткотрайни епилептични пристъпи през различен неравномерен интервал от време, изразяващи се с клинична и параклинична симптоматика. Епилептичният пристъп представлява спонтанно, внезапно възникващо,

краткотрайно (секунди до максимум 5 минути), бързо преходно, нарушение във функциите на групи неврони от определена мозъчна област или различни структури на главния мозък, в резултат на внезапни и неочаквано възникващи синхронизирани ексцесивни електрични разряди от същите тази групи неврони, които оформят „епилептогенно огнище“.

„Епилептогенното огнище“ е определена зона в главния мозък, съставена от „загинали неврони“, тежко-увредени неврони и съседните на тях неувредени неврони, които проявяват повишена електрическа възбудимост, изразяваща се с генериране на хиперсинхронни свръхелектрически разряди от невронно електричество, въз основа на електричния потенциал на нервоните. Епилептичен статус е животозастрашаващо състояние, при което епилептичните пристъпи следват един след друг, без болния да идва в съзнание и без да излиза от епилептичния пристъп. Различните научни изследователи и клиницисти приемат различна продължителност във времетраенето на всеки вид епилептичен пристъп, според характеристиките му, тъй както и за епилептичния статус. Времетраенето на всеки епилептичен пристъп е различно. Различните епилептични пристъпи не продължават повече от 1 до 5 минути (1). Миоклоничните епилептични пристъпи са най-краткотрайни, най-често с продължителност до 150 милисекунди (2). Типичните абсанси имат продължителност най-често между 2,75 и 26,2 секунди до максимум 30 секунди, докато атипичните абсанси се проявяват в рамките на 2 до 100 секунди (2). Тоничните епилептични пристъпи най-често продължават от секунда и половина до 36 секунди (2). Атоничните епилептични пристъпи са с най-честа продължителност от 0,1 до 12,5 секунди (2). Генерализираните клонични пристъпи имат продължителност най-често между 1 и 24 секунди (2). Тонично-клоничните епилептични пристъпи най-често имат продължителност между 57 и 102 секунди (2). Фокалните епилептични пристъпи най-често са с продължителност между 1,25 и 166 секунди, докато епилептичните пристъпи с нарушено съзнание имат продължителност най-често от 9,5 до 271 секунди (2). Фокалните епилептични пристъпи, които прогресират до двустранни тонично-клонични епилептични пристъпи имат най-честа продължителност от 77,5 до 237 секунди. Всички генерализирани тонично-клонични епилептични пристъпи имат продължителност до 5 минути (1, 2). Епилептичен пристъп, който продължава повече от 5 минути се счита за епилептичен статус (3). Характерната клинична картина, която се проявява по време на епилептичен пристъп е най-важната като критерии за поставяне на диагнозата „епилепсия“, защото в извънпристъпния интервал, е възможно, някои пациенти да не проявяват абнормна епилептиформена промяна в електровълновата активност на главния мозък. Така, при някои пациенти, по време на електроенцефалографския запис на електроенцефалограмата при провеждане на електроенцефалография (ЕЕГ), която представлява неврофизиологичен метод за регистриране на биоелектричната активност на различните видове неврони в различните структури от кората на главния мозък, е възможно да няма проявена и отчетена абнормна патологична епилептиформена електровълнова активност. Подобен тип параклинична лабораторна находка, обаче, по никакъв начин не отрича диагнозата „епилепсия“, тъй като детайлите и характеристиките в свидетелското описание на претърпения епилептичен пристъп са определящи за поставяне на диагнозата „епилепсия“ и определяне на подходящата фармакотерапия. Диагноза „епилепсия“ е недопустимо да бъде поставяна само по наличието на десинхронизирана абнормна проява в електровълновата активност на невроните в кората на главния мозък, без наличието на каквито и да било адекватни данни или свидетелски показания за клинична проява на епилептичен пристъп. Тогава, когато, се отчете характерната за епилептичните пристъпи или в извънпристъпния интервал синхронна електровълнова активност при наличието на поне два епилептични пристъпи по свидетелски показания, тогава може да бъде поставена диагнозата „епилепсия“. Регистрираната, чрез електроенцефалографския запис при провеждането на ЕЕГ, абнормна синхронна епилептиформена електровълнова активност по време на епилептичен пристъп или в междупристъпния интервал се проявява с изразяване на електроенцефалограмата с характерни графоеlementи – най-често острие, множествени остриета, комплекс „острие-бавна вълна“, бавен комплекс „острие-бавна вълна“, бърз комплекс „острие-бавна вълна“,

комплекс „множествени острия-бавна вълна“ и т.н. Тези различни най-често срещани епилептични графоеlementи са също доста интересни като времетраене. Графоеlementът „острие (spike/point)“ е характерен при регистрацията на краткотрайни моно-, би-, три- или полифазни вълни от 10-70 милисекунди, с голяма амплитуда, които в повечето случаи са фокални, понякога синхронни двустранно, но рядко са синхронно-генерализирани (4). Графоеlementът „множествени острия (multiple spike/polypointes)“ представляват поредица от острия (20-60/секунда), обикновено като генерализирани разряди – при миоклонични пристъпи, при тонично-клонични пристъпи, синдром на Lennox-Gastaut и др. (4). Графоеlementът „shape wave/pointe lente, onde pointue“ е типичен за вълни с продължителност 80-150-200 милисекунди, по-често фокални – при парциални пристъпи или генерализирани пристъпи от тип „Grand mal“ (5). Графоеlementите „комплекс острие-бавна вълна - 3/секунда“ настъпват като генерализирани разряди, двустранни, синхронни и симетрични с честота 3 цикъла за секунда, като се наблюдават при типичните абсанси (Petit mal) (5). Графоеlementите „бавен комплекс острие-бавна вълна 1-2,5 секунди (slow-spike wave complex/pointe-onde lente)“ настъпват като генерализирани разряди, двустранно, като са асинхронни и асиметрични с честота под 3 цикъла за секунда – наблюдават се при атипичните абсанси, при синдром на Lennox-Gastaut и др. (5). Графоеlementите „бърз комплекс острие-бавна вълна 4-5/секунда (fast spike-wave complex/pointe-onde rapide)“ са генерализирани и обикновено симетрични – при миоклонии и интериктално при генерализирани тонично-клонични пристъпи (5). Графоеlementите „комплекс множествени острия-бавна вълна (multiple spikes-wave complex/polypointe-onde)“ се наблюдават при генерализирания миоклонус (масивен билатерален миоклонус) (5).

От описаното до тук става ясно, че разнообразните клинични и параклинични характеристики при различните форми на епилепсия и различните видове епилептични пристъпи „рисуват пъстра картина“ в многообразието на тази „свещена болест“, при която всеки детайл е важен, особено когато лекарите са изправени в толкова сериозна битка срещу недобре познат противник. От такава гледна точка правилното разграничаване на формата на епилепсия и вида на епилептичния пристъп според тяхната класификация е от ключово значение за поставянето на прецизната диагноза и определяне на правилния терапевтичен подход, развитието и прогнозата на това неясно заболяване. На международно ниво, организации като Международната лига за борба с епилепсията (International League Against Epilepsy, ILAE) и Международното бюро по епилепсия (International bureau for epilepsy, IBE) в сътрудничество с международни специалисти по епилепсия, играят ключова роля за определянето, класифицирането и лечението на различните форми на епилепсия, различните епилептични синдроми и различните видове епилептични пристъпи (3,6,7,8,9,10,11,12,13,14). В България официалното ръководство относно характеристиките, класификация, етиологията, диагностика и лечение на епилепсиите, епилептичните синдроми и епилептичните пристъпи е постигнатия Национален консенсус за диагностика и лечение на епилепсията, по инициатива на Българското дружество по неврология (15) в съответствие с приетите норми и характеристики на ILAE и IBE. Освен това различни книги и монографии, издавани през годините от международно признати български специалисти в областта на неврологията, невронауките и епилептологията детайлно обясняват познатите до този момент факти и характеристики по отношение на дефиницията, епидемиологията, класификацията, етиологията, патогенезата, клиничната картина, параклиничните, образните и лабораторните методи за диагностика, диференциалната диагноза, подходящата и правилната фармакотерапия, и прогнозата на тази „свещена болест“, тъй както нейните пристъпи (1,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34).

Накратко класификацията на епилепсиите се разделя на генетична епилепсия, симптоматична епилепсия и епилепсия с неясна етиология/криптогенна епилепсия. Епилептичните пристъпи се разделят на фокални епилептични пристъпи със или без промяна в съзнанието, генерализирани епилептични пристъпи, и вторично-генерализирани тонично-клонични пристъпи или двустранни тонично-клонични епилептични пристъпи (според

актуалната класификация на ПЛАЕ и в Националния консенсус за диагностика и лечение на епилепсията). За повече информация относно историческата еволюцията в класификацията на епилепсията, епилептичните синдроми и епилептичните пристъпи, може да се консултират издаваните през годините монографии, тъй както и национални консенсуси по епилепсия (16,33,34,35,36,37,38)

Етиологията на епилепсиите, епилептичните синдроми и епилептични пристъпи е подробно описана в Национален консенсус за диагностика и лечение на епилепсията (15), тъй както и в някои специализирани монографии (18,20,22,23,33,34,40). Най-честите етиологични причини за появата на генетична епилепсия са генетични нарушения и увреди в различни гени, кодиращи структурата и функцията на различните клетъчно-мембранни канали – натриеви, калиеви, хлорни, калциев и т.н., тъй както генетично-обусловени малформации в развитието на мозъчната кора и др. Сред най-честите етиологични причини за възникване на симптоматична епилепсия са придобита увреда в цитоархитектониката (структурата) на нервната тъкан в главния мозък, тъй както и метаболизма – структурно-метаболитни причини: дородова патология вследствие на патологична бременност с мекониални околоплодни води, патология в момента на раждането свързана с мозъчна хипоксия на новороденото дете, черепно-мозъчни травми, мозъчни тумори, мозъчно-съдови заболявания, мозъчни инфекции, автоимунни и възпалителни заболявания на главния мозък, мозъчни паразитози, матаболитни увреди, химични интоксикации, медикаментозни интоксикации, както и други физични и биологични етиологични фактори. В анализът на етиологията се отделя внимание и „неясни етиологични причини“ за възникването и развитието на епилепсия.

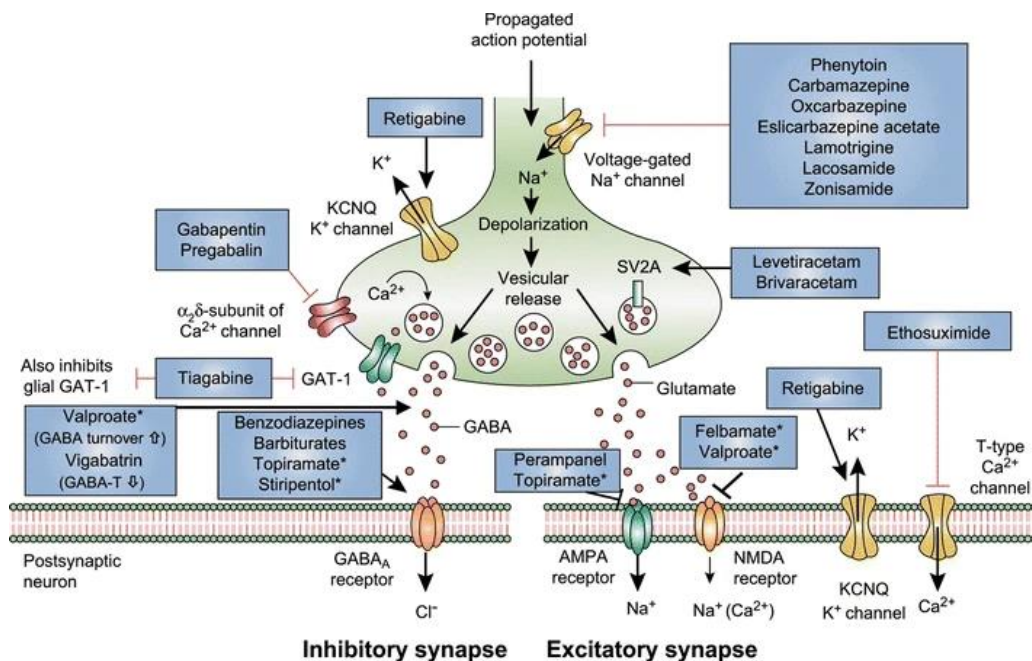
Различни външни или вътрешни фактори могат да провокират проявата на епилептични пристъпи при пациенти с епилепсия. Между най-често срещаните външни провокиращи фактори са внезапно умишлено или небрежно прекъсване на антиепилептичното лечение, прием на алкохол, прием на различни органични или синтетични наркотични вещества, прием на лекарства които са противопоказани при болни с епилепсия, слънчево-топлинни прегрявания, дехидратация, външна хипоксия в околната среда, свръхфизическа активност, физическо или психо-емоционално изтощение, сънна депривация с липса на достатъчно сън, фоточувствителност – мигащи светлини, ярки цветове, сменящи се цветове, сменящи се картини, кинопрожекции, пътуване с редуване на светли и тъмни участъци, отблясъци от стъкло и водна повърхност и т.н., фоночувствителност – внезапен силен шум, неприятни/дразнещи звуци, слушане на музика и т.н., четене, математическо смятане, гледане на Слънцето, както и други външни провокиращи фактори. Между най-често срещаните вътрешни провокиращи фактори са възпалителни заболявания, инфекции, фебрилните състояния, вътрешна хипоксия, хипогликемия, хипонатриемия, уремия, менструацията при жените и други вътрешни фактори.

Патогенетичните механизми за възникване и развитие на различните видове епилепсия, епилептични синдроми и епилептични пристъпи са „най-тъмната“ и недобре изучена част в науката за епилепсията. Към момента се знае, че между най-често срещаните патогенетични механизми за възникване и развитие на епилепсия са различни генетично-обусловени дефекти или придобити увреди в структурата и функцията на невронната мембрана, йонните рецептори, йонните канали – натриеви, калиеви, калциеви, хлорни и т.н., натриево-калиевата аденозинтрифосфатаза, калциево-магнезиевата аденозинтрифосфатаза, нарушени механизми в транспорта на натрия, калия, хлора, калция, магнезия и т.н., дефицит на аденозинтрифосфат в неврона обуславящ дисфункция на невронните мембранни аденозинтрифосфатази с йонни канали, дефекти в аденозинтрифосфатазата, генетично-обусловена митохондриална дисфункция с нарушения в синтеза на АТФ, генетично-обусловено некачествено усвояване на кислорода от клетката и т.н. Придобитата структурно-метаболитна увреда на невроните в главния мозък, която може да доведе до появата на симптоматична епилепсия се извършва по класическите механизми на клетъчно увреждане – исхемично-хипоксичен механизъм, хипоенергиинно-дисметаболитен механизъм, калций-зависим механизъм, оксидативно-автопероксидационен механизъм, механизъм на директно травматично увреждане, механизъм

на директно токсично увреждане, възпалително и инфекциозно увреждане, или клетъчна увреда поради вътреклетъчно или извънклетъчно натрупване. Механизмите на клетъчно увреждане, клетъчна адаптация и клетъчна смърт са добре описани в научната литература (41,42,43,44,45,46,47,48,49). В придобитата структурно-метаболитна увреда на невроните, ключова роля играят отново структурата и функцията на невронната мембрана, йонните рецептори, йонните канали – натриеви, калиеви, калциеви, хлорни и т.н., натриево-калиевата аденозинтрифосфатаза (Na^+/K^+ помпа), калциево-магнезиевата аденозинтрифосфатаза ($\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ помпа), нарушени механизми в транспорта на натрия, калия, хлора и калция поради дефицит на аденозинтрифосфат в неврона, водещ до дисфункция на невронната мембрана с йонните канали и нарушения в акционните потенциали, водещи до генериране на патологични пароксизмални акционни потенциали, предизвикващи хиперсинхронизирана електрическа активност от страна на невроните в епилептогенното огнище. Много важна за патогенезата на различните епилептични пристъпи е функцията на различни невронни рецептори като NMDA и AMPA, защото в епилептогенното огнище в момента на възникване на епилептичен пристъп се генерира повишено количество глутамат, който отваря рецепторите NMDA и AMPA на съседните неувредени неврони, което предизвиква натриево-калциев инфлукс и калиев ефлукс в тях, с повишено интрацелуларно количество на калциеви и натриеви йони, водещи до калциева цитотоксичност, натриева оточност, увреждане на митохондриите и техните функции, недостиг на АТФ, хипофункция на натриево-калиевата и калциево-магнезиевата помпа, промяна на поларизацията на невронната мембрана, съпроводена с пароксизмална деполаризация, хиперсинхронно генериране на ексцесивни свръхелектрически разряди, което предизвиква епилептичния пристъп (схема 1 след описанието на библиографията). От съществено значение в патогенезата на епилепсията се явява и функционалната активност с контролът и регулацията на различни невромедиатори – най-вече синтезата, секрецията, освобождаването и функцията на възбудния невромедиатор глутамат, спрямо синтезата, секрецията, освобождаването и функцията на потискащия невромедиатор гама-аминомаслена киселина (ГАМК). Не трябва да се подценява и функцията на други невромедиатори като ацетилхолин, серотонин, допамин и норадреналин, тъй както и на различни ензими, невропептиди, неврохормони, проинфламторни цитокини (TNF- α , IL-6 и др.), молекулярни сигнално-трансдукционни пътища и синаптични везикуларни протеини в патогенезата на епилепсията и епилептичните пристъпи. Именно синаптичния везикуларен протеин SV2A става обект на все повече научни изследвания, както в патогенезата, така и във фармакотерапията на епилепсията и епилептичните пристъпи.

Фармакотерапията на епилепсията е изкуство на медицинската професия, научните познания, лекарската практика и специализирания опит с умения на лекарите. Лечението на епилепсията е изкуство в рамките на принципите на добрата клинична практика (50), което изисква голямо умение, основаващо се на широки познания (51). Самият избор на терапевтично поведение е последица от интегративна мисловна дейност – знания, опит и интуиция (50). Тук е валиден с особена сила принципът, че трябва да се лекува не болестта, а всеки отделен болен с особеностите на неговото заболяване (51). Най-сложните въпроси във фармакотерапията на епилепсията е свързана с това, кога и как да се започне антиепилептичната терапията; какъв антиепилептичен лекарствен продукт да се предприеме; моно- или политерапия да се приложи, за да се осъществи оптимален контрол над проявата на епилептичните пристъпи, без да се допусне медикаментозна интоксикация при пациента; как да се сведе до допустимия минимум проявата на нежелани лекарствени реакции при фармакодинамичното въздействие на антиепилептичните активни вещества върху организма; как да се мониторира най-правилно плазмените концентрации, ефективността и ефикасността при фармакокинетичният отговор от страна на организма към избраното терапевтично активно вещество; какъв подход да се предприеме при фармакотерапията на бременни и родилки с епилепсия и т.н. За да се отговори на тези въпроси се изискват задълбочени широкоспектърни хоризонтални и вертикални познания не само по епилептология, неврология, фармакология и патофизиология, но и в другите специалности от медицинската

практика. Принципите на антиепилептичната фармакотерапия са ясно описани в Националния консенсус за диагностика и лечение на епилепсията (52). Определянето на антиепилептичната фармакотерапия се извършва въз основа на правилно поставената диагноза, характеристиките на епилептичните пристъпи, клиничната симптоматика, спрямо характеристиките на активните вещества, които са терапевтично показни и одобрени за лечението при епилепсия. Антиепилептичните активни вещества, които са познати до този момент, са представени в таблица, в края на доклада, след библиографията (таблица 1). Различните антиепилептични активни вещества имат различен фармакотерапевтичен и патофизиологичен механизъм на действие. Механизмът на действие, дозировката, начинът на прилагане, лекарствените взаимодействия, нежеланите лекарствени реакции, специалните предупреждения и употребата по време на бременност и кърмене, за всяко различно антиепилептично активно вещество са описани в кратката характеристика на всеки лекарствен продукт (КХП) и различни фармакотерапевтични справочници (53,53,55). Накратко патофизиологичните механизми на действие за всяко активно вещество могат да се обобщят по следния начин. Активните вещества Phenytoin, Carbamazepine, Oxcarbazepine, Eslicarbazepine, Lamotrigine, Lacosamide и Zonisamide въздействат върху натриевите волтаж-зависими канали. Retigabine оказва влияние върху KCNQ калиевите канали. Gabapentin и Pregabalin оказват влияние върху калциевите канали и по-специално върху тяхната $\alpha_2\delta$ -субединица; докато Ethosuximide също въздейства върху калциевите канали, но основно върху тези калциеви канали, които са от Т-тип. Felbamate и Valproate оказват въздействие върху NMDA-рецепторите; а Parampanel и Topiramate върху AMPA-рецепторите. Валпроатите въздействат основно върху ГАМК-ергичната активност като я подсилват. Vigabatrin потиска ензима ГАМК-трансаминаза, който разгражда ГАМК и по този начин се стреми да повиши концентрациите на ГАМК в нервната тъкан. Бензодиазепините, барбитуратите, Topiramate и Stiripentol оказват влияние върху А-рецептора на ГАМК. Tiagabine потиска глиалния ГАМК-транспортен GAT-1 като увеличава концентрацията на ГАМК в мозъчната тъкан. Леветирацетам, Бриварацетам и Селтрацетам въздействат върху изключително интересния синаптичният везикуларен протеин SV2A, които има неизяснено комплексно въздействие в патогенезата на епилептичния пристъп, тъй като оказва, както възбуждащо, така и потискащо въздействие, чрез стимулиране отделянето, както на глутамат, така и на ГАМК от синаптичния везикул.



Фигура 1: Кратък механизъм на действие на различните антиепилептични активни вещества при фармакотерапията в патогенезата на епилепсията и епилептичните пристъпи (56):

Цел

Целта на настоящата научна разработка е да се опита да изясни до колкото са известни по настоящем механизмите, по които взаимодействат фармакотерапевтичната група на „рацетамите“ – Левтирацетам, Бриварацетам и Селетрацетам със синаптичния везикуларен протеин SV2A в патогенезата и фармакотерапията на епилептичните пристъпи при епилепсия.

Материали и методи

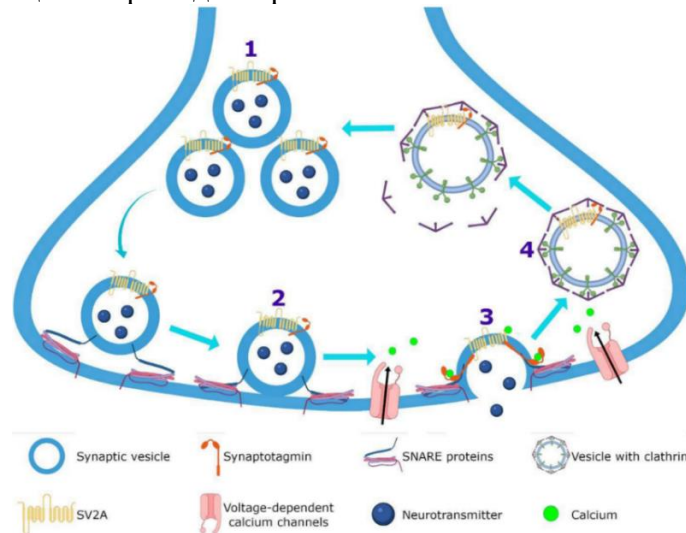
Извършено е обзорно научно проучване на специализираните медицински, клинични, фармакологични и патофизиологични литературни източници, засягащи фармакотерапевтичните механизми на взаимодействие между Леветирацетам, Бриварацетам и Селетрацетам със синаптичния везикуларен протеин SV2A в патогенезата на епилептичните пристъпи при епилепсия.

Дискусия

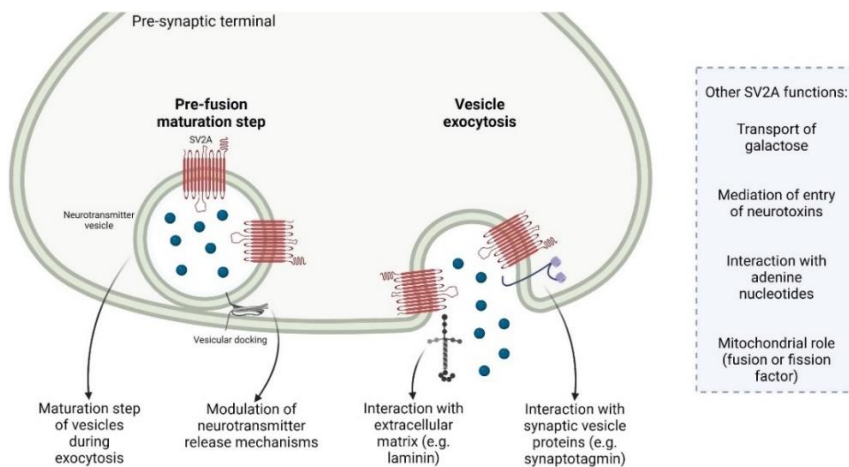
Синаптичният везикуларен протеин 2A (Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A, SV2A) е интегрален трансмембранен гликопротеин, който принадлежи към групата на кератан сулфат протеогликаните. SV2A е една от трите изоформи на SV2 гликопротеина, като другите са SV2B и SV2C. SV2 гликопротеинът е широко разпространен както в синаптичните везикули от синаптичните окончания на невроните, така и в ендокринните клетки (57,58). SV2A е най-широко разпространената изоформа из между трите изоформи на SV2 гликопротеина (57,58). Практически се среща в синаптичните везикули от всички структури на главния мозък (59). SV2A е също така хомолог на семейството на протонните котранспортери, като вероятно медира обратното захващане на различни невромедиатори в синаптичните везикули (60,61); включително глутамат и ГАМК; а това е процес, който изисква проявата на протонен градиент (60). Тази характеристика го прави не само много интересен за изучаване и научно разработване, но той най-вероятно проявява уникални функционални способности, тъй като едновременно би могъл да стимулира секрецията и на глутамат и на ГАМК от пресинаптичните везикули в синаптичната цепка. SV2A проявява различни транспортни функции в синаптичните везикули (60). SV2A участва и в регулацията на вътрешния осмоларитет на синаптичните везикули (60). SV2A участва в комбинация с други транспортерни протеини във функциите на синаптичните везикули. В рамките на тези процеси се осъществява захващане на различни невромедиатори, протони, хлорни йони (противодейства се на появата на електрохимичния градиент, породен от захващането на протони), АТФ-молекули и калциеви йони (60). Транспортните протеини проявяват и регулаторни функции за поддръжка на вътрешния осмоларитет в синаптичните везикули (62). Преносът на невромедиатори е процес, който изисква задължително наличието на протонен градиент (60). След като SV2A е хомолог на семейството на протонните котранспортери и проявява протонен градиент, логично е той да бъде един от важните участници в транспорта на невромедиаторите вътре и вън от синаптичните везикули – процеси, които изискват протонен градиент! SV2A притежава още много изяснени и неизяснени функции до този момент. Най-важната функция на SV2A е активното му участие в регулацията на освобождаването на невромедиатори от синапсите на невроните (57,58,63,64). SV2A активно взаимодейства с другите синаптични везикуларни протеини (65). Това е ключова функция в молекулярната физиология и патофизиология на синаптичните структури. SV2A е необходим за освобождаването на калций-зависимите везикуларни невротрансмитери (66). SV2A активно участва в транспорта на галактозата (67). SV2A взаимодейства със синаптотагмин (68,69), представляващ мултифункционален протеин за мембранно сливане, който чрез свързването си с калциевите йони, действа като калциев сензор за регулацията и секрецията на различни невромедиатори и секреторни гранули, чрез процес на екзоцитоза, процес който може да се окаже много важен в разностранната генеза на епилептичните пристъпи. SV2A участва и в процеса на узряване на везикулите по време на калций-индуцираната екзоцитоза (70). В този процес, SV2A участва и съвместно с SV2B (71, 72). Нещо повече, SV2A, заедно с SV2B

участват активно в регулацията, експресията, секрецията и преноса на синаптотагмин (68, 69, 73, 74, 75, 76, 77, 78). SV2A участва и в модулацията на обема и големината на синаптичните везикули (79). Установено е, че SV2A заедно с SV2B и SV2C съвместно участват и в медирането при навлизането на ботулиновия и тетаничният токсин (80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90). SV2A взаимодейства с аденин нуклеотидите (91) и подпомага митохондралната функция в процесите на синтез и везикуларно сливане (92). Важно е да се знае, че SV2A участва в синаптичните везикули на всички синпаси, като нивото му на експресия спада значително в нервната тъкан на пациенти с епилепсия (93). Генната експресия на SV2A, който е целево място за свързване на антиепилептичните активни вещества левтирацетам, бриварацетам и селстрацетам, е понижена в хода на епилептогенезата (94). Недостигът или липсата на SV2A има пряко отношение към повишената епилептогенност (94). Промени в експресията на SV2A оказват неблагоприятно въздействие за влошаване на епилепсията (94).

Все още малко се знае по отношение на известните функции на SV2A. Видимо е, че повечето функции на този синаптичен везикуларен протеин все още не са добре изяснени. Между неизяснените му функции, основната е свързана с хипотезата, че, чрез синаптичните везикули и някои техни взаимодействия с различни молекули и активни вещества, SV2A контролира и регулира, както секрецията на възбудния невромедиатор глутамат, така и секрецията на потискащия невромедиатор ГАМК.

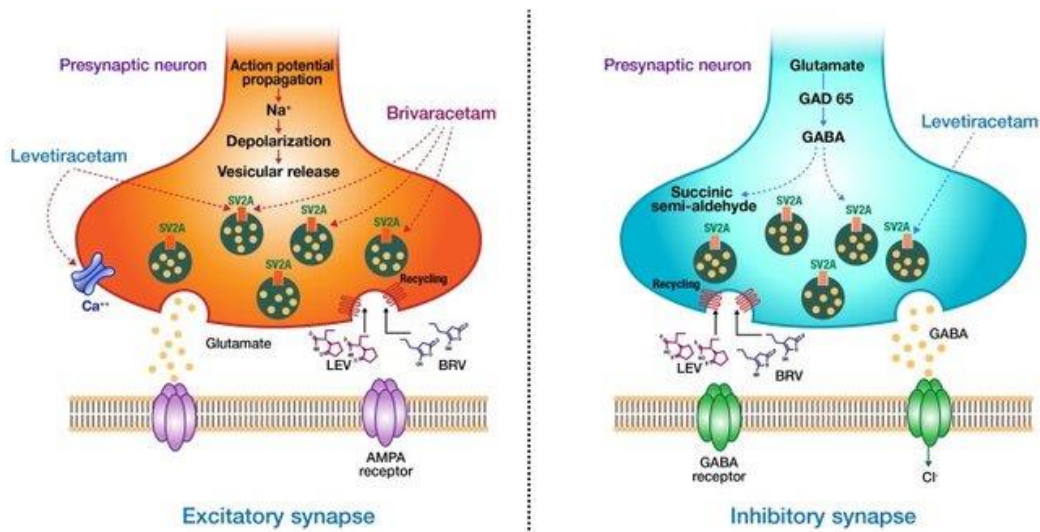


Фигура 2: Функция на SV2A в регулацията на калциевите йони и калциевите волтаж-зависими канали (95)



Фигура 3: Позиции на SV2A и част от модулиращите му функции в рамките на синаптичния везикул, и неговото сливане с пресинаптичната мембрана, последвано от екзоцитоза (59)

SV2A се оказва и ключово прицелно място за свързване с молекулите на антиепилептичните активни вещества Леветирацетам, Бриварацетам и Селетрацетам, които са широко разпространени при терапията на различни фокални или генерализирани епилептични пристъпи, вкл. при различни форми на медикаментозно резистентна епилепсия.



Фигура 4: Примерен модел на действие на Леветирацетам и Бриварацетам с SV2A и освобождаването на невромедиаторите в синаптината цепка (96).

Активното вещество леветирацетам е терапевтично показано като монотерапия при лечение на парциални (фокални) пристъпи със или без вторична генерализация при възрастни и юноши на възраст 16 и повече години с новодиагностицирана епилепсия. Леветирацетам е показан също така за допълващо лечение при парциални (фокални) пристъпи със или без вторична генерализация при възрастни, юноши, деца и кърмачета на възраст 1 и повече месеци с епилепсия; при миоклонични пристъпи при възрастни и юноши на възраст 12 и повече години с ювенилна миоклонична епилепсия; и при първично генерализирани тонично-клонични пристъпи при възрастни и юноши на възраст 12 или повече години с идиопатична генерализирана епилепсия. Дозировката, начинът на прилагане, противопоказанията, специалните предупреждения и предпазни мерки при употребата, взаимодействията с другите лекарствени продукти, другите форми на взаимодействия, употребата при фертилитет, бременност и кърмене, ефектите върху способността за шофиране и работа с машини, нежеланите лекарствени реакции, фармакокинетиката и фармакодинамиката на лекарствения продукт, съдържащи активното вещество Леветирацетам са описани подробно в кратката характеристика на лекарствения продукт, като са отразени и в листовката за пациента. Тъй както функциите на SV2A, така и механизмите на действие на Леветирацетам все още не са напълно изяснени. Множество *In vitro* и *In vivo* научни изследвания продължават да се провеждат в тази насока. Използвайки информацията, отразена в кратката характеристика на лекарствения продукт, накратко можем да обобщим, че механизмът на действие на леветирацетам е свързан с преобладаващо въздействие върху интерневроните в мозъчната тъкан. Леветирацетам демонстрира свързване към специфични места в мозъчната тъкан, а едно от тях е именно SV2A. Свързването на Леветирацетам със SV2A се извършва на ниво синаптични везикули в пресинаптичните области на невронния синапс. Леветирацетам въздейства върху калциевите йонни канали и по-специално върху калциевите йонни канали от N-тип. По този начин Леветирацетам предотвратява дисрегулацията на калциевия инфлукс по време на високо волтажното активиране на невронната мембрана, което е типичен процес по време на епилептичния пристъп. Чрез този фармакологичен механизъм Леветирацетам предотвратява интерневронната калциева цитотоксичност в патогенезата на епилепсията. Леветирацетам частично намалява редуцията в потока на ГАМК и глицин-зависимите

канали, индуцирани от цинк и β -карболини, като оказва в различна степен контролно и регулаторно влияние върху глутаматната възбуда или ГАМК-ергичната инхибиция на ниво невронен синапс. Това е механизмът, чрез който се счита, че Леветирацетам може да контролира и регулира появата и честотата на епилептичните пристъпи.

Активното вещество бриварацетам е показано като допълваща терапия при лечението на парциални (фокални) пристъпи със или без вторична генерализация при възрастни, юноши и деца на възраст над 2 години с епилепсия. Така Бриварацетам се различава от Леветирацетам по отношение на одобрените терапевтични показания; но и с това, че Бриварацетам проявява висока пропускливост през кръвно-мозъчната бариера, като за разлика от Леветирацетам има по-висока липофилност ($\text{LogD brivaracetam } 1.04 \text{ vs levetiracetam } -0.64$) (97). Както за всеки лекарствен продукт и всяко активно вещество, дозировката, начинът на прилагане, противопоказанията, специалните предупреждения и предпазни мерки при употребата, взаимодействията с другите лекарствени продукти, другите форми на взаимодействия, употребата при фертилитет, бременност и кърмене, ефектите върху способността за шофиране и работа с машини, нежеланите лекарствени реакции, фармакокинетиката и фармакодинамиката на лекарствените продукти, съдържащи активното вещество Бриварацетам са описани подробно в кратката характеристика на продукта (КХП), като са отразени и в листовката за пациента. Основният механизъм на действие на Бриварацетам се изразява с високия афинитет за целево свързване със SV2A в синаптичните везикули на пресинаптичната мембрана в невроните на всички структури в мозъка, като най-често това взаимодействие се извършва в интерневроните. Бриварацетам проявява 15, 20 до 30 пъти по-мощен селективен афинитет за свързване със SV2A в синаптичните везикули на главния мозък отколкото Леветирацетам (98, 99, 100). Свързвайки се със SV2A, Бриварацетам участва в сливането на синаптичните везикули с пресинаптичната мембрана, като модулира екзоцитозата - процес, който предизвиква освобождаване на невромедиатори в синаптичната цепка и по този начин проявява антиконвулсивно действие. През 2004 г. Lynch и сътрудници установяват, че SV2A играе ключова роля при освобождаването на калций-зависимите везикуларни невромедиатори (66). Интересно е, че при проведени неклинични проучвания до 2011 г., Gillard и сътрудници установяват, че Бриварацетам, не проявява въздействие върху редица ензими, йонни канали, различни рецептори, транспортери, специализирани рецептори, участващи в патогенезата на епилепсия като AMPA-рецепторите, включително и йонни канали (99). Комбинацията от тези две научни изследвания дава повод да се предположи, че комбинацията на Бриварацетам с SV2A (но не по отделно), най-вероятно предизвиква модулиращият ефект за потискане функцията на волтаж-зависимите калциеви канали, чрез ограничаване потокът на калциеви йони, за да се намали калциевият инфлукс и да се потиснат абнормните невронни електрически разряди, които да доведат до промяна в акционния потенциал на невронната мембрана, намалявайки свръхвъзбудимостта и хиперсинхронизацията на електричните разряди в различни невронни мрежи. Най-вероятно по този механизъм и Бриварацетам предотвратява появата на епилептични пристъпи. Така, основният антиепилептичен ефект на Бриварацетам се смята, че е свързан с модулацията на калциевия инфлукс и екзоцитозата на невротрансмитери.

Селетрацетам е третото активно вещество от групата на „рацетамите“. Той също е активно вещество, производно на пирилодина и е структурен аналог на Леветирацетам. За разлика от Леветирацетам и Бриварацетам, към днешна дата Селетрацетам не е разрешен за употреба в Европейския съюз. Селетрацетам проявява бърза абсорбция след прием на таблетна форма през устата, като достига C_{max} за 1 час, показвайки орална бионаличност $>90\%$. Обемът на разпределение е 0,6 л/кг, като това е стойност, която е близка до тази на общото съдържание на вода в организма. Селетрацетам се свързва слабо ($<10\%$) с плазмените протеини; елиминира се основно чрез хидролиза на амидната група; елиминира се чрез бъбречна екскреция с урината; и има около 8 часа полуживот. Механизмът на действие на Селетрацетам също не е изяснен окончателно. Установено е, че Селетрацетам също се свързва селективно и стереоспецифично с SV2A. Селетрацетам модулира функцията на SV2A. Чрез свързването си

с SV2A, Селетрацетам прониква в пресинаптичните везикули, като заедно с SV2A участват първо в сливането на пресинаптичните везикули за пресинаптичната мембрана, след което заедно участват в синаптичната везикуларна екзоцитоза, а след това и в освобождаването на невромедиатори от синапса в синаптичната цепка. Свързването на Селетрацетам с SV2A въздействие върху α -субединицата на калциевите йонни канали от N-тип като ги блокира. По този начин Селетрацетам и SV2A ограничават потокът на калциеви йони, намаляват калциевият инфлукс и потискат функцията на волтаж-зависимите калциеви канали. По този механизъм потискат абнормните невронни електрически разряди, променят акционния потенциал и волтажа на невронната мембрана, като намаляват свръхвъзбудимостта и хиперсинхронизацията на електричните разряди в невронните мрежи, най-вече на пирамидните неврони в *hippocampus* и интерневроните в различни структури на главния мозък, участващи в епилептогенезата, както на фокалните, така и на генерализираните епилептични пристъпи. Чрез тези механизми Селетрацетам и SV2A регулират и възстановяват освобождаването на невромедиатори от пресинаптичната мембрана на невроните. Някои от тези механизми са докладвани на Eight Eilat Conference (EILAT VIII) (101).

Заклучение и перспективи

Епилепсията, епилептичните синдроми и епилептичните пристъпи продължават да бъдат с ненапълно изяснена патогенеза и често пъти трудна за овладяване клинична проява, въпреки фармакотерапевтичния широк избор на антиепилептични медикаменти с различни механизми на действие, които също остават за доизясняване. Епилептичните пристъпи все още остават загадка, която вероятно ще бъде разгадана в бъдеще, но не и понастоящем. За да се опитаме да осветлим „тъмнината“, която обгръща неизяснените механизми в патогенезата и фармакотерапията на епилепсията, нови научни изследвания трябва да бъдат извършени. Насоките за последващи научни изследвания в тази област трябва да бъдат насочени към изясняване на молекулярните механизми в патогенезата на епилептичните пристъпи и механизмите на действие на антиепилептичната фармакотерапия. Въпреки ненапълно изяснения механизъм на действие на Levetiracetam, Brivaracetam и Seletacetam, те остават успешна монотерапия или допълваща терапия към други антиепилептични медикаменти в терапията на епилепсия.

Литература

1. Максимов Г., Максимов К. Молекулярни механизми на антиепилептичните медикаменти – медикаментозна резистентност, хипотези, перспективи. Изд. Камея Груп ЕООД, София, 2016 г., стр. 13. ISBN 978-619-7084-24-5.
2. Larsen P.M., Wustenhagen S., Terney D., Gardella E., Aurlien H., Beniczky S. Duration of epileptic seizure types: A data-driven approach. *Epilepsia*, 2023 Feb; 64 (2): 469-478. Doi: 10.1111/epi.17492.
3. Trinka E., Cock H., Hesdorffer D., Rossetti A.O., Scheffer I.E., Shinnar Sh. et al. A definition and classification of status epilepticus – Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*, 56(10):1515–1523, 2015doi: 10.1111/epi.13121
4. Максимов К. Епилептични пристъпи – Клиника и лечение. Медицинско издателство „АРСО“, София, 2002, стр. 23. ISBN 954-8967-85-5.
5. Максимов К. Епилептични пристъпи – Клиника и лечение. Медицинско издателство „АРСО“, София, 2002, стр. 24. ISBN 954-8967-85-5.
6. Berg AT, Bercovic ST, Brodie M.J., Buchhalter J., Cross H., Van Emde Boas W. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies. Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009, *Epilepsia*, 2010, vol. 51, issue 4, p. 676-685.
7. Shorvon S.D. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*, vol. 52, issue 6, p. 1052-1057. <http://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03041.x>

8. Scheffer I.E. Epilepsy: A classification for all seasons. *Epilepsia*, vol. 53, issue s2, p. 6-9. <http://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2012.03551.x>
9. Fisher R.S., Cross H.J., D’Souza C., French J.A., Haut S.R., Higurashi N. et al. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*, vol. 58, issue 4, p. 531-542. <https://doi.org/10.1111/epi.13671>
10. Fisher R.S., Cross H.J., French J.A., Higurashi N., Hirsch E., Jansen F.E. et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, vol. 58, issue 4, p. 522-530. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>
11. Scheffer I.E., Berkovic S., Capovilla G., Connolly M.B., French J. Guilhoto L. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, vol. 58, issue 4, p. 512-521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
12. Fisher R.S., Acevedo C., Arzimanoglou A., Bogacz A., Cross H., Elger C.E. et al. A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 2014, vol. 55, issue 4, p. 475 – 482. Doi: 10.1111/epi.12550
13. Wirrell E, Tinuper P, Perucca E, Moshé SL. Introduction to the epilepsy syndrome papers. *Epilepsia*. 2022;63:1330–1332. <https://doi.org/10.1111/epi.17262>
14. Zuberi SM, Wirrell E, Yozawitz E, Wilmshurst JM, Specchio N, Riney K, et al. ILAE classification and definition of epilepsy syndromes with onset in neonates and infants: Position statement by the ILAE Task Force on Nosology and Definitions. *Epilepsia*. 2022;63:1349– 1397. <https://doi.org/10.1111/epi.17239>
15. Национален консенсус за диагностика и лечение на епилепсията. (под редакцията на Миланов Ив., Божинова В.) *Българска неврология*, Том 24, Допълнение 6, Декември, 2023. ISSN 1311-8641 (Print), ISSN 2815-2522 (Online).
16. Максимов К. Медикаментозно-резистентни епилепсии – клинични форми, диференциална диагноза, лечение. Издателска къща СТЕНО, Варна, 2004.
17. Колчев Х.Б. Практически подходи при лечението на епилепсиите. Изд. „Знание“, Стара Загора, 1995.
18. Захариев З., Хранов Л. Епилепсия. 1999.
19. Колчев Х.Б. Епилепсия. Книга за пациента и неговите близки. София, 2015.
20. Божинов Пл. (ред.). Епилепсия – свещената болест. Изд. Стаменов, София, 2005.
21. Максимов К. Влияние на екстрацеребралната стимулация на тригеминалните нерви върху някой епилептични и неепилептични пристъпи и механизми на потискането им. София, 1991.
22. Цеков Ст. Епилепсия; същност, диагностични възможности и терапевтични принципи. Изд. Зограф, 2003. ISBN 954-150-105-2
23. Капрелян А. Епилепсия – съвременна диагностика и лечение. Изд. Хеликс Прес, Варна, 2013 г.
24. Чавдаров Д. Терапия на епилепсията. Изд. Гей-Либрис, 2004. ISBN 9543000549
25. Витева Е., Захариев З. Резистентни епилепсии – клинични особености и социални измерения. Изд. МУ-Пловдив, Пловдив, 2014. ISBN 978-619-7085-35-8
26. Чакова Л. Епилепсия в детска възраст. ВМИ, Пловдив, 1998.
27. Калпачки Р., Бочева А. Епилепсията – какво трябва да знаем за нея. Изд. ЗИП, София, 2006.
28. Божинов Пл., Божинова Св. Цеков Ст., Калпачки Р. Епилепсия, бременност и развитие на детето. Изд. Арт Трейсър ООД, Варна, 2016. ISBN 9786197094183.
29. Тодорова К. Качество на живот, свързано със здравето – подходи за оценка и психосоциални аспекти при епилепсия. Изд. Славен, Варна, 2015.
30. Maksimoff K. Nouvelle methode de suppression de la crise Grand Mal a son debut par la compression bilaterale des branches maxillares du nerf trijumeau. *Revue Neurologique*, Paris, 1972, 127, 6, 627-628.
31. Алексиев А. Клинична електроенцефалография. София, 2003.
32. Минчев Д. (ред.). Основи на клиничната електроенцефалография. Изд. Зограф, Варна, 2008.

33. Максимов К. Епилептични пристъпи – Клиника и лечение. Медицинско издателство „АРСО“, София, 2002. ISBN 954-8967-85-5.
34. Колчев Хр. Ръководство по епилептология – фундамент, клинична феноменология и терапевтично поведение. Мед. Изд. АРСО – АРСО-КП ЕООД, София, 2019. ISBN: 978-619-197-045-2
35. Консенсус за диагностика, лечението и организацията на противоепилептичната помощ у нас. Българска неврология, Том 1, Брой 1, юни 2001, Стр. 29-40.
36. Национален консенсус за диагностика и лечение на епилепсията. (под редакцията на Миланов Ив.) Двигателни нарушения, юли 2011, 9, 2.
37. Национален консенсус за диагностика и лечение на епилепсията. (под редакцията на Миланов Ив., Боцинова В., Търнев Ив.). Българска неврология, април 2014, Том 15, Брой 1, Допълнение 1.
38. Национален консенсус за диагностика и лечение на епилепсията. (под редакцията на Миланов Ив., Захариев З., Боцинова В.). Българска неврология, май 2017, Том 18, Брой 1, Допълнение 2.
39. Национален консенсус за диагностика и лечение на епилепсията. (под редакцията на Миланов Ив., Захариев З., Боцинова В.) Българска неврология, февруари 2020, Том 21, Допълнение 1.
40. Максимов Г., Максимов К. Молекулярни механизми на антиепилептичните медикаменти – медикаментозна резистентност, хипотези, перспективи. Изд. Камея Груп ЕООД, София, 2016 г. ISBN 978-619-7084-24-5.
41. Лазаров С., Тафраджийска-Хаджиолова Р. Патолофизиологични основи на клиничната медицина – Обща патологична физиология. Медицинско издателство АРСО, 2022, София, стр. 19-56.
42. Лазаров С., Тафраджийска-Хаджиолова Р. Патолофизиологични основи на клиничната медицина – Клинична патологична физиология. Медицинско издателство АРСО, 2022, София, стр. 55-61.
43. Miller M.A., Zachary J.F. Mechanisms and morphology of cellular injury, adaptation and death. Pathologic Basis of Veterinary Disease, 2017, Feb 17:2–43.e19. doi: 10.1016/B978-0-323-35775-3.00001-1
44. Mims C., Nash A., Stephen J. Mechanisms of Cell and Tissue Damage. Mims' Pathogenesis of Infectious Disease, 2007, May, 9:216-306. Doi:10.1016/B978-012498264-2/50012-8.
45. Cobb J.P., Hotchkiss R.S., Karl I.E., Buchman T.G. Mechanisms of cell injury and death. British Journal of Anaesthesia, 1996; 77:3-10.
46. Sumadewi K.T., Harkitasari S., Tjandra D.Ch. Biomolecular mechanisms of epileptic seizures and epilepsy: a review. Acta Epileptologica, 2003, 5, 28. <https://doi.org/10.1186/s42494-023-00137-0>
47. Chi H., Chang H-Y., Sang T-K. Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. Int J Mol Sci.
48. Moujalled D., Strasser A., Liddell J.R. Molecular mechanisms of cell death in neurological diseases. Cell Death & Differentiation, 2021, 28, 2029-2044.
49. Fricker M., Tolkovsky A.M., Borutaite V., Coleman M., Brown G.C. Neuronal Cell Death. Physiol. Rev. 2018, Feb., 28; 98 (2): 813-880. doi:10.1152/physrev.00011.2017
50. Колчев Хр. Ръководство по епилептология – фундамент, клинична феноменология и терапевтично поведение. Мед. Изд. АРСО – АРСО-КП ЕООД, София, 2019, стр. 192. ISBN: 978-619-197-045-2
51. Захариев З., Храмов Л. Епилепсия. 1999, стр. 109.
52. Национален консенсус за диагностика и лечение на епилепсията. (под редакцията на Миланов Ив., Божинова В.). Българска неврология, Декември 2023, Том 24, Допълнение 6, стр. 44-45. ISSN 1311-8641 (Print), ISSN 2815-2522 (Online).
53. Brunton L., Knollmann B. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 14th Edition. McGraw Hill, 2022. ISBN-13 978-1264258079

54. Ламбев Ив., Крушов И. Фармакотерапевтичен справочник – седмо основно преработено издание. Медицинско издателство „АРСО“, 2010. ISBN: 978-954-9301-59-5
55. Миленков Ст. Лекарствен справочник (девето преработено издание). Лакс бук, 2017. ISBN:978-619-189-051-4
56. Loscher W., Gillard M., Sands Z.A., Kaminski R.M., Klitgaard H. Synaptic vesicle glycoprotein 2A ligands in the treatment of epilepsy and beyond. *CNS Drugs* (2016) 30:1055–1077 DOI 10.1007/s40263-016-0384-x
57. Janz R., Sudhof T.C. SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience*. 1999; 94(4):1279-90. doi: 10.1016/s0306-4522(99)00370-x.
58. Janz R., Goda Y., Geppert M., Missler M., Sudhof T.C. SV2A and SV2B function as redundant Ca²⁺ regulators in neurotransmitter release. *Neuron*. 1999 Dec; 24(4):1003-16. doi: 10.1016/s0896-6273(00)81046-6.
59. Rossi R, Arjmand S, Bærentzen SL, Gjedde A, Landau AM. Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A: Features and Functions. *Front Neurosci*. 2022 Apr 28;16:864514. doi: 10.3389/fnins.2022.864514. PMID: 35573314; PMCID: PMC9096842.
60. Bajjalieh S.M., Peterson K., Shinghal R., Scheller R.H. SV2, a Brain synaptic vesicle protein homologous to Bacterial Transporters. *Science*, 1992, Vol. 257, 5074, pp. 1271 – 1273. Doi:10.1126/science.1519064.
61. Bajjalieh S.M., Peterson K., Linial M., Scheller R.H., Brain contains two forms of synaptic vesicle protein 2., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1993).90 (6) 2150-2154, <https://doi.org/10.1073/pnas.90.6.2150>
62. Maycox PR, Hell JW, Jahn R. Amino acid neurotransmission: spotlight on synaptic vesicles. *Trends Neurosci*. 1990 Mar;13(3):83-7. doi: 10.1016/0166-2236(90)90178-d. PMID: 1691873.
63. Crowder KM, Gunther JM, Jones TA, Hale BD, Zhang HZ, Peterson MR, Scheller RH, Chavkin C, Bajjalieh SM. Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 21;96(26):15268-73. doi: 10.1073/pnas.96.26.15268. PMID: 10611374; PMCID: PMC24809.
64. Bradberry MM, Chapman ER. All-optical monitoring of excitation-secretion coupling demonstrates that SV2A functions downstream of evoked Ca²⁺ entry. *J Physiol*. 2022 Feb;600(3):645-654. doi: 10.1113/JP282601. Epub 2022 Jan 13. PMID: 34957569; PMCID: PMC8810609.
65. Wittig S, Ganzella M, Barth M, Kostmann S, Riedel D, Pérez-Lara Á, Jahn R, Schmidt C. Cross-linking mass spectrometry uncovers protein interactions and functional assemblies in synaptic vesicle membranes. *Nat Commun*. 2021 Feb 8;12(1):858. doi: 10.1038/s41467-021-21102-w. PMID: 33558502; PMCID: PMC7870876.
66. Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, Fuks B. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 29;101(26):9861-6. doi: 10.1073/pnas.0308208101. Epub 2004 Jun 21. PMID: 15210974; PMCID: PMC470764.
67. Madeo M, Kovács AD, Pearce DA. The human synaptic vesicle protein, SV2A, functions as a galactose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2014 Nov 28;289(48):33066-71. doi: 10.1074/jbc.C114.584516. Epub 2014 Oct 17. PMID: 25326386; PMCID: PMC4246065.
68. Schivell AE, Batchelor RH, Bajjalieh SM. Isoform-specific, calcium-regulated interaction of the synaptic vesicle proteins SV2 and synaptotagmin. *J Biol Chem*. 1996 Nov 1;271(44):27770-5. doi: 10.1074/jbc.271.44.27770. PMID: 8910372.
69. Lambeng N, Grossmann M, Chatelain P, Fuks B. Solubilization and immunopurification of rat brain synaptic vesicle protein 2A with maintained binding properties. *Neurosci Lett*. 2006 May 1;398(1-2):107-12. doi: 10.1016/j.neulet.2005.12.059. Epub 2006 Jan 24. PMID: 16434140.
70. Xu T, Bajjalieh SM. SV2 modulates the size of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Nat Cell Biol*. 2001 Aug;3(8):691-8. doi: 10.1038/35087000. PMID: 11483953.

71. Custer KL, Austin NS, Sullivan JM, Bajjalieh SM. Synaptic vesicle protein 2 enhances release probability at quiescent synapses. *J Neurosci.* 2006 Jan 25;26(4):1303-13. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2699-05.2006. PMID: 16436618; PMCID: PMC6674579.
72. Chang WP, Südhof TC. SV2 renders primed synaptic vesicles competent for Ca²⁺-induced exocytosis. *J Neurosci.* 2009 Jan 28;29(4):883-97. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4521-08.2009. PMID: 19176798; PMCID: PMC2693337.
73. Lazzell DR, Belizaire R, Thakur P, Sherry DM, Janz R. SV2B regulates synaptotagmin 1 by direct interaction. *J Biol Chem.* 2004 Dec 10;279(50):52124-31. doi: 10.1074/jbc.M407502200. Epub 2004 Oct 5. PMID: 15466855.
74. Pyle RA, Schivell AE, Hidaka H, Bajjalieh SM. Phosphorylation of synaptic vesicle protein 2 modulates binding to synaptotagmin. *J Biol Chem.* 2000 Jun 2;275(22):17195-200. doi: 10.1074/jbc.M000674200. PMID: 10747945.
75. Schivell AE, Mochida S, Kensel-Hammes P, Custer KL, Bajjalieh SM. SV2A and SV2C contain a unique synaptotagmin-binding site. *Mol Cell Neurosci.* 2005 May;29(1):56-64. doi: 10.1016/j.mcn.2004.12.011. PMID: 15866046.
76. Nowack A, Yao J, Custer KL, Bajjalieh SM. SV2 regulates neurotransmitter release via multiple mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010 Nov;299(5):C960-7. doi: 10.1152/ajpcell.00259.2010. Epub 2010 Aug 11. PMID: 20702688; PMCID: PMC2980308.
77. Yao, J., Nowack, A., Kensel-Hammes, P., Gardner, R. G. & Bajjalieh, S. M. Cotrafficking of SV2 691 and synaptotagmin at the synapse. *J Neurosci* 30, 5569-5578, doi:10.1523/jneurosci.4781-692.09.2010 (2010).
78. Zhang N, Gordon SL, Fritsch MJ, Esoof N, Campbell DG, Gourlay R, Velupillai S, Macartney T, Peggie M, van Aalten DM, Cousin MA, Alessi DR. Phosphorylation of synaptic vesicle protein 2A at Thr84 by casein kinase 1 family kinases controls the specific retrieval of synaptotagmin-1. *J Neurosci.* 2015 Feb 11;35(6):2492-507. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4248-14.2015. PMID: 25673844; PMCID: PMC4323530.
79. Budzinski KL, Allen RW, Fujimoto BS, Kensel-Hammes P, Belnap DM, Bajjalieh SM, Chiu DT. Large structural change in isolated synaptic vesicles upon loading with neurotransmitter. *Biophys J.* 2009 Nov 4;97(9):2577-84. doi: 10.1016/j.bpj.2009.08.032. PMID: 19883601; PMCID: PMC2770603.
80. Dong M, Liu H, Tepp WH, Johnson EA, Janz R, Chapman ER. Glycosylated SV2A and SV2B mediate the entry of botulinum neurotoxin E into neurons. *Mol Biol Cell.* 2008 Dec;19(12):5226-37. doi: 10.1091/mbc.e08-07-0765. Epub 2008 Sep 24. PMID: 18815274; PMCID: PMC2592654.
81. Dong M, Yeh F, Tepp WH, Dean C, Johnson EA, Janz R, Chapman ER. SV2 is the protein receptor for botulinum neurotoxin A. *Science.* 2006 Apr 28;312(5773):592-6. doi: 10.1126/science.1123654. Epub 2006 Mar 16. PMID: 16543415.
82. Rummel A, Häfner K, Mahrhold S, Darashchonak N, Holt M, Jahn R, Beermann S, Karnath T, Bigalke H, Binz T. Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor. *J Neurochem.* 2009 Sep;110(6):1942-54. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06298.x. Epub 2009 Jul 23. PMID: 19650874.
83. Yeh FL, Dong M, Yao J, Tepp WH, Lin G, Johnson EA, Chapman ER. SV2 mediates entry of tetanus neurotoxin into central neurons. *PLoS Pathog.* 2010 Nov 24;6(11):e1001207. doi: 10.1371/journal.ppat.1001207. PMID: 21124874; PMCID: PMC2991259.
84. Kroken AR, Karalewitz AP, Fu Z, Kim JJ, Barbieri JT. Novel ganglioside-mediated entry of botulinum neurotoxin serotype D into neurons. *J Biol Chem.* 2011 Jul 29;286(30):26828-37. doi: 10.1074/jbc.M111.254086. Epub 2011 Jun 1. PMID: 21632541; PMCID: PMC3143643.
85. Peng L, Tepp WH, Johnson EA, Dong M. Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors. *PLoS Pathog.* 2011 Mar;7(3):e1002008. doi: 10.1371/journal.ppat.1002008. Epub 2011 Mar 31. PMID: 21483489; PMCID: PMC3068998.

86. Blum FC, Chen C, Kroken AR, Barbieri JT. Tetanus toxin and botulinum toxin utilize unique mechanisms to enter neurons of the central nervous system. *Infect Immun*. 2012 May;80(5):1662-9. doi: 10.1128/IAI.00057-12. Epub 2012 Mar 5. PMID: 22392932; PMCID: PMC3347426.
87. Mahrhold S, Strotmeier J, Garcia-Rodriguez C, Lou J, Marks JD, Rummel A, Binz T. Identification of the SV2 protein receptor-binding site of botulinum neurotoxin type E. *Biochem J*. 2013 Jul 1;453(1):37-47. doi: 10.1042/BJ20130391. PMID: 23621114.
88. Weisemann J, Stern D, Mahrhold S, Dorner BG, Rummel A. Botulinum Neurotoxin Serotype A Recognizes Its Protein Receptor SV2 by a Different Mechanism than Botulinum Neurotoxin B Synaptotagmin. *Toxins (Basel)*. 2016 May 17;8(5):154. doi: 10.3390/toxins8050154. PMID: 27196927; PMCID: PMC4885069.
89. Yao G, Zhang S, Mahrhold S, Lam KH, Stern D, Bagramyan K, Perry K, Kalkum M, Rummel A, Dong M, Jin R. N-linked glycosylation of SV2 is required for binding and uptake of botulinum neurotoxin A. *Nat Struct Mol Biol*. 2016 Jul;23(7):656-62. doi: 10.1038/nsmb.3245. Epub 2016 Jun 13. PMID: 27294781; PMCID: PMC5033645.
90. Gustafsson R, Zhang S, Masuyer G, Dong M, Stenmark P. Crystal Structure of Botulinum Neurotoxin A2 in Complex with the Human Protein Receptor SV2C Reveals Plasticity in Receptor Binding. *Toxins (Basel)*. 2018 Apr 12;10(4):153. doi: 10.3390/toxins10040153. PMID: 29649119; PMCID: PMC5923319.
91. Yao J, Bajjalieh SM. Synaptic vesicle protein 2 binds adenine nucleotides. *J Biol Chem*. 2008 Jul 25;283(30):20628-34. doi: 10.1074/jbc.M800738200. Epub 2008 Jun 4. Erratum in: *J Biol Chem*. 2008 Sep 5;283(36):25103. PMID: 18524768; PMCID: PMC2475693.
92. Stockburger C, Miano D, Baeumlisberger M, Pallas T, Arrey TN, Karas M, Friedland K, Müller WE. A Mitochondrial Role of SV2a Protein in Aging and Alzheimer's Disease: Studies with Levetiracetam. *J Alzheimers Dis*. 2016;50(1):201-15. doi: 10.3233/JAD-150687. PMID: 26639968.
93. Contreras-García IJ, Gómez-Lira G, Phillips-Farfán BV, Pichardo-Macías LA, García-Cruz ME, Chávez-Pacheco JL, Mendoza-Torreblanca JG. Synaptic Vesicle Protein 2A Expression in Glutamatergic Terminals Is Associated with the Response to Levetiracetam Treatment. *Brain Sci*. 2021 Apr 23;11(5):531. doi: 10.3390/brainsci11050531. PMID: 33922424; PMCID: PMC8145097.
94. van Vliet EA, Aronica E, Redeker S, Boer K, Gorter JA. Decreased expression of synaptic vesicle protein 2A, the binding site for levetiracetam, during epileptogenesis and chronic epilepsy. *Epilepsia*. 2009 Mar;50(3):422-33. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01727.x. Epub 2008 Aug 19. PMID: 18717715.
95. Contreras-García IJ, Cárdenas-Rodríguez N, Romo-Mancillas A, Bandala C, Zamudio SR, Gómez-Manzo S, Hernández-Ochoa B, Mendoza-Torreblanca JG, Pichardo-Macías LA. Levetiracetam Mechanisms of Action: From Molecules to Systems. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Apr 13;15(4):475. doi: 10.3390/ph15040475. PMID: 35455472; PMCID: PMC9030752.
96. Feyissa AM. Brivaracetam in the treatment of epilepsy: a review of clinical trial data. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2019 Sep 9;15:2587-2600. doi: 10.2147/NDT.S143548. PMID: 31571877; PMCID: PMC6750854.
97. Nicolas JM, Hannestad J, Holden D, Kervyn S, Nabulsi N, Tytgat D, Huang Y, Chanteux H, Staelens L, Matagne A, Mathy FX, Mercier J, Stockis A, Carson RE, Klitgaard H. Brivaracetam, a selective high-affinity synaptic vesicle protein 2A (SV2A) ligand with preclinical evidence of high brain permeability and fast onset of action. *Epilepsia*. 2016 Feb;57(2):201-9. doi: 10.1111/epi.13267. Epub 2015 Dec 10. PMID: 26663401.
98. Rogawski MA, Bazil CW. "New molecular targets for antiepileptic drugs: alpha(2)delta, SV2A, and K(v)7/KCNQ/M potassium channels". *Current Neurology and Neuroscience Reports*. July 2008, 8 (4): 345–352. doi:10.1007/s11910-008-0053 7. PMC 2587091. PMID 18590620
99. Gillard M, Fuks B, Leclercq K, Matagne A. Binding characteristics of brivaracetam, a selective, high affinity SV2A ligand in rat, mouse and human brain: relationship to anti-convulsant

properties. Eur J Pharmacol. 2011 Aug 16;664(1-3):36-44. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.04.064. Epub 2011 May 8. PMID: 21575627.

100. Matagne A, Margineanu DG, Kenda B, Michel P, Klitgaard H. Anti-convulsive and anti-epileptic properties of brivaracetam (ucb 34714), a high-affinity ligand for the synaptic vesicle protein, SV2A. Br J Pharmacol. 2008 Aug;154(8):1662-71. doi: 10.1038/bjp.2008.198. Epub 2008 May 26. PMID: 18500360; PMCID: PMC2518465.

101. Bialer M., Johannessen., Kupferberg H.J., Levy R.H., Perucca E., Tomson T. Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Eighth Eilat Conference (EILAT VIII). Epilepsy Research, Volume 73, Issue 1, January 2007, Pages 1-52

Схема 1: Примерен патогенетичен механизъм за поява на епилептични пристъпи при структурно-метаболитни причини.

**Поява на епилептични пристъпи
при структурно-метаболитни причини
(молекулярни механизми)**

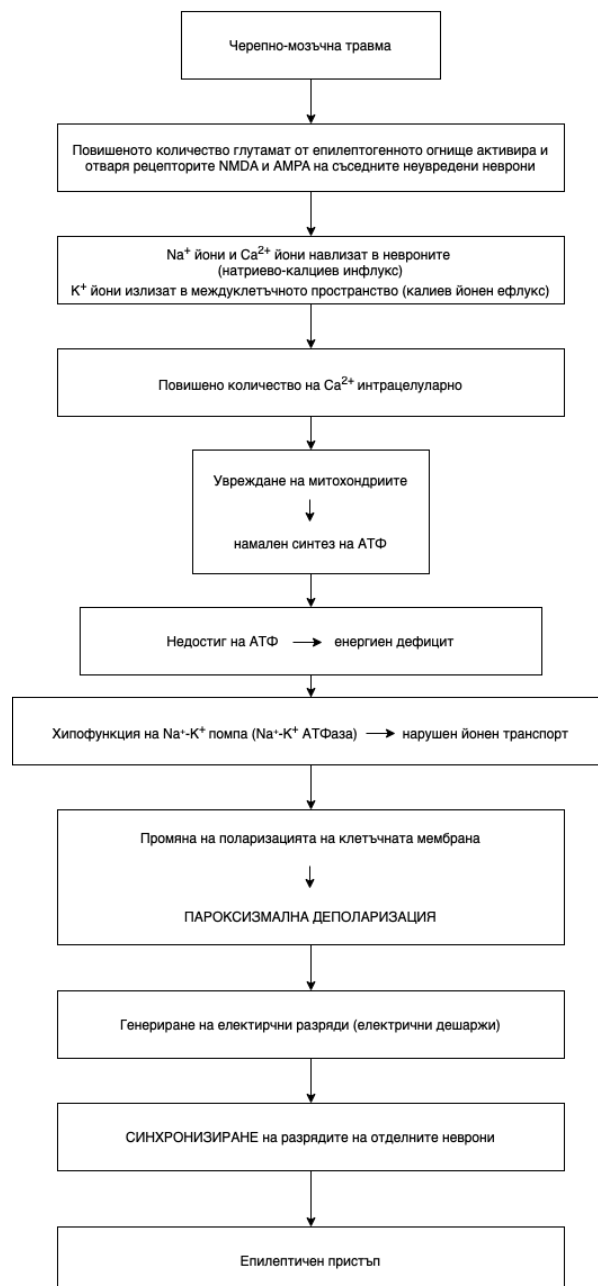


Таблица 1: Активни вещества, използвани във фармакотерапията при епилепсия.

Антиепилептични активни вещества	Съкращения
Carbamazepine CB	CBZ
Oxcarbazepine	OXC
Eslicarbazepine	ESC
Phenytoine	PHT
Phosphenitoine	PPHT
Lacosamide	LCM
Phenobarbitae	PB
Primldone	PRM
Valproate	VPA
Ethosuximid	ESM
Diazepam	DZP
Clonazepam	CLN
Nitrazepam	NZP
Lorazepam	LZP
Midazolam	MDZ
Clobazam	CLB
Clorazepate	CRZ
Lamotrigine	LTG
Topiramate	TPM
Tiagabine	TGB
Vigabatrine	VGB
Gabapentine	GBP
Pregabaline	PGB
Progabide	PRG
Felbamate	FBM
Pyracetam	PRC
Levetiracetame	LEV
Brivaracetam	BRI
Seletracetam	SEL
Zonisamide	ZNS
Retigabine	STR
Rufinamide	RFA
Sulthiame	SLT
Acetazolamide	AZA
ACTH	ACTH
Fenofibrate	FNF
Perampanel	PAP
Ganaxolone	GNX
Stiripentol	STR

SPECIALIZED ANTI-INFLAMMATORY PHARMACOTHERAPY IN THE PATHOGENESIS OF CYTOKINE STORM IN SARS-CoV-2 AND COVID-19

Georgi K. Maximov¹, Lyubina Todorova^{1,2}, Bogdan Kirilov³

¹Department „Marketing Authorisation of Medicinal Products“, Bulgarian Drug Agency to the Minister of the Health of Republic of Bulgaria

²Medical College, University „Prof. D-r. Assen Zlatarov“, Burgas, Bulgaria

³Executive Director of Bulgarian Drug Agency to the Minister of Health of Republic of Bulgaria

ABSTRACT:

Introduction: Coronaviruses are RNA viruses, causing inflammatory infectious diseases of the respiratory tract, with different clinical symptoms with complete or partial recovery, post-CoViD syndrome, or fatal outcome. The main cause of mortality in SARS-CoV-2/CoViD-19 is the genetically determined overreaction of the immune system to its viral irritation, expressed in excessive secretion of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IL-23 inducing a cytokine storm.

The development of a large-scale inflammatory process with a cytokine storm can affect to varying degrees the parenchyma of the lower respiratory tract, endocrine organs, kidneys, heart and brain, with subsequent structural and functional disorders. During the course of the pandemic, the European Medicines Agency (EMA) approved several medicinal products for use in the treatment of SARS-CoV-2 infection.

Active substances or monoclonal antibodies with different mechanism of action such as anakinra, tixagevimab, cilgavimab and ragdanvimab could limit the inflammatory response and cytokine storm.

Objective: To elucidate different mechanisms by which cytokine storm occurs but can be suppressed by anakinra, tixagevimab, cilgavimab, or ragdanvimab therapy.

Materials and methods: A scientific review of various mechanisms by which the cytokine storm occurs and develops in SARS-CoV-2 infection, as well as the mechanisms by which anakinra, tixagevimab, cilgavimab or ragdanvimab act, was performed.

Conclusion: Cellular pro-inflammatory cytokine mediators play a key role in the development of the cytokine storm in SARS-CoV-2 infection, but active substances or monoclonal antibodies such as anakinra, tixagevimab, cilgavimab or ragdanvimab can pharmacotherapeutically suppress the inflammatory process by different mechanisms.

Key words: Cytokine storm, SARS-CoV-2/CoVid-19, Monoclonal pharmacotherapy, Pro-inflammatory and anti-inflammatory mechanisms

СПЕЦИАЛИЗИРАНА ПРОТИВОВЪЗПАЛИТЕЛНА ФАРМАКОТЕРАПИЯ В ПАТОГЕНЕЗАТА НА ЦИТОКИНОВАТА БУРИЯ ПРИ SARS-CoV-2 И COVID-19

Георги Константинов Максимов¹, Любина Тодорова^{1,2}, Богдан Кирилов³

¹Дирекция „Разрешения за употреба на лекарствените продукти“, Изпълнителна агенция по лекарствата към Министъра на здравеопазването на Република България

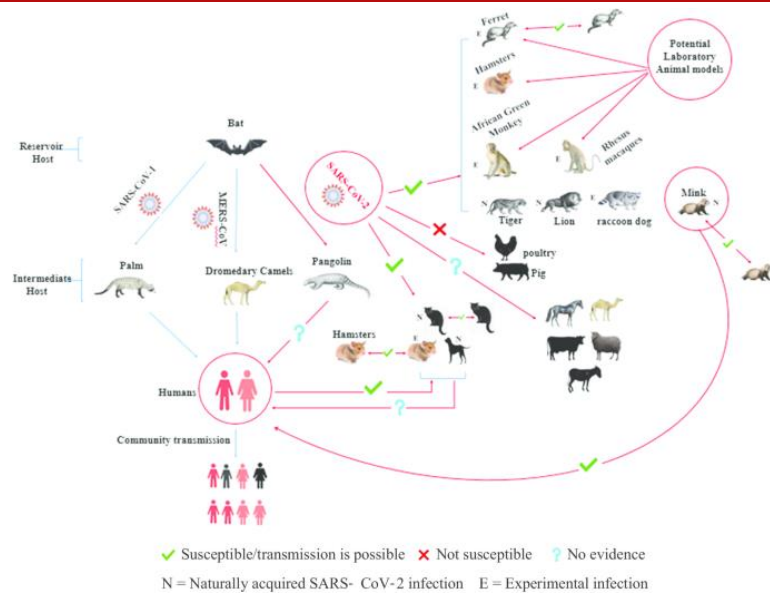
²Университет „Проф. Д-р Асен Златаров“, Бургас, България

³Изпълнителен директор на Изпълнителна агенция по лекарствата към Министъра на здравеопазването на Република България

Въведение

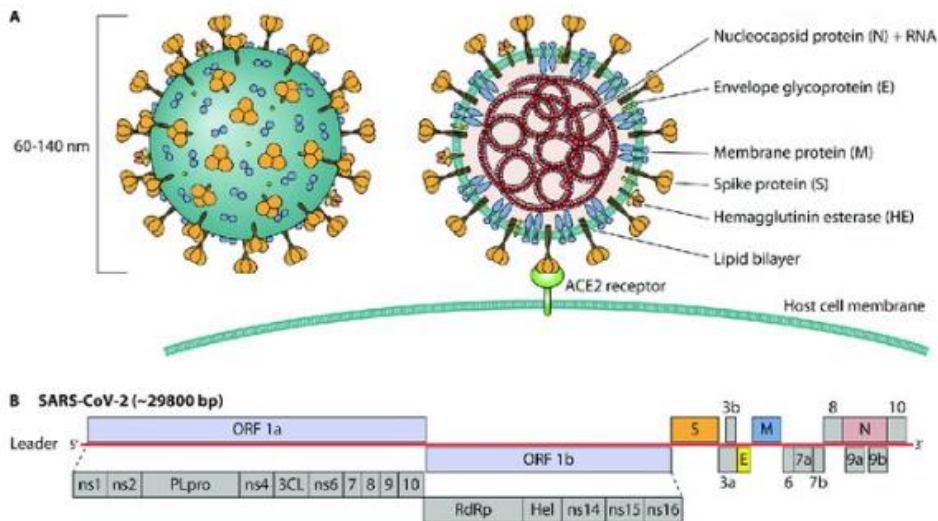
Коронавирусите са едноврижни РНК вируси (1), които са изолирани през 1937 г. (2) и принадлежат към семейство *Coronaviridae*. В Семейство *Coronaviridae*, съществуват две

подсемейства – *Letovirinae* и *Coronavirinae*. Подсемейство *Letovirinae* притежа само един род – *Alphaletovirus*. Подсемейство *Coronavirinae* притежава четири подсемейства: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus*. Из между тях, с най-голямо значение за медицинската практика са коронавирусате от подсемейства *Alphacoronavirus* и *Betacoronavirus* (3). В периода 2002 – 2019 г. се появиха зоонозните коронавируси SARS-CoV-1 (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS, Тежък остър респираторен синдром), MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome, MERS, Блискоизточен респираторен синдром) и SARS-CoV-2 (причиняващ CoViD-19, CoronaVirus Disease-19), които причиниха тежки инфекции с висока смъртност (3). Във времевия интервал от появата на SARS-CoV-2 и CoViD-19 през месец декември 2019 г. до месец април 2022 г. починалите от усложнения в следствие на инфекцията със SARS-CoV-2 са 10% от инфектираните (3). Класификацията, епидемиологията, морфологичната структура, чувствителността, механизмът на предаване, патогенезата, цикъла на размножаване, лабораторната диагностика и заболяванията, които коронавирусате причиняват, са описани ясно и подробно в редица български учебници (1,2,3,4,5,6,7,8), както и в специализираната медицинска литература. Появата на високовирулентни животински видове коронавируси, които се пренасят от животно на човек, чрез зооноза, бъдейки патогенни за човека, поставя въпроса за тяхното възникване (3). Еволюцията на SARS-CoV-2 остава спорна (3). Поради неизяснени причини, вирусът прескача междувидовата бариера като се предава от животно на човек – възниква зооноза. Механизмът на веригата на инфекцията е класически за зооноза: Инфекциозен причинител (SARS-CoV-2) → Резервоар на инфекцията (животно първоизточник на инфекцията → животни междинни гостоприемници → животни от пазара в Ухан, Китай) → Изходна врата за разпространение на инфекцията (инфектираното животно) → Път на предаване на инфекцията (чрез пренасяне на инфекцията от инфектираните животни и инфектираните площи в хората, по неясен нетипичен механизъм – по контактно-битов път, чрез консумация на инфектирани животни, по въздушно-капков път → Входна врата за приемане на инфекцията (горните дихателни пътища и свързаните с тях структури – уста, нос, очи (от очите чрез *canalis nasolacrimalis* до лигазицата на носа и горните дихателни пътища) → Чувствителен гостоприемник (човека) → Пренасяне на инфекцията (от човек на човек по въздушно-капков път; аерозолен път в непроветриви помещение; чрез докосване на заразени повърхности по контактно-битов път) и разпространение на инфекциозния причинител (от човек на човек към цялото общество). Повдигнатата хипотеза гласи, че вирусът е прескочил от първичния гостоприемник (прилепите) в междинни гостоприемници (змии и панголин), а от тях в мишки, хамстери, котки, енотоподобни кучета, сивки и т.н., които са го пренесли на хората – фигура 1 (9). Въпросът за изкуственият лабораторен произход на вируса остава спорно дискутабилен (10). Основният начин, по който хората се заразяват със SARS-CoV-2 е чрез излагане на респираторни капчици, пренасящи инфекциозен вирус, обикновено на разстояние около 2 м. (4). Допълнителните механизми включват контактно предаване (напр. ръкостискане) и въздушно-капково предаване на капчици, които се задържат във въздуха на големи разстояния (обикновено над 2 м.) (4). Вирусът, освободен от респираторните секрети по време на кашляне, кихане и говорене, може да зарази други хора, чрез контакт с лигавиците (4), като предизвика различна по тежест инфекция с/без полиорганно засягане.



Фигура 1: Хипотеза за зоонозата на SARS-CoV-2, предизвикала CoViD-19, според Kiros M. и съавтори (9).

Структурата и функцията на SARS-CoV-2 са добре изучени. SARS-CoV-2 притежава четири структурни протеини, известни като S (Spike – шипчест протеин), E (Envelope – протеин изграждащ обвивката), M (Membrane – Мембранен протеин), N (Nucleocapsid – Нуклеокапсиден протеин) и шестнадесет неструктурни протеини, известни като NSP от 1 до 16 (NSPs, Non-structural proteins) (11,12). Геномната и физическата структура на SARS-CoV-2 е представена на Фигура 2 (13). Класификацията на NSPs е представена на Фигура 3 (11).



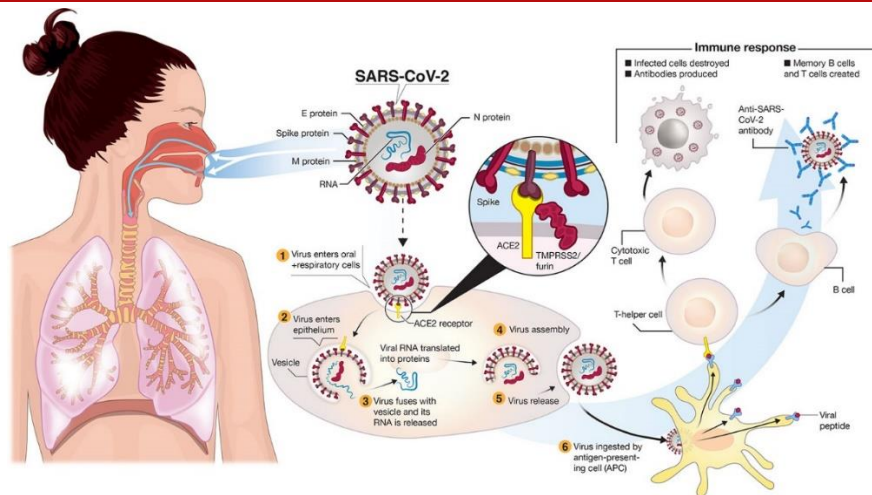
Фигура 2: Геномна и физическа структура с четирите структурни протеини на SARS-CoV-2, според Safiabadī Tali SH и съавтори (13):

List of non-structural proteins in SARS-CoV-2 and their molecular functions.

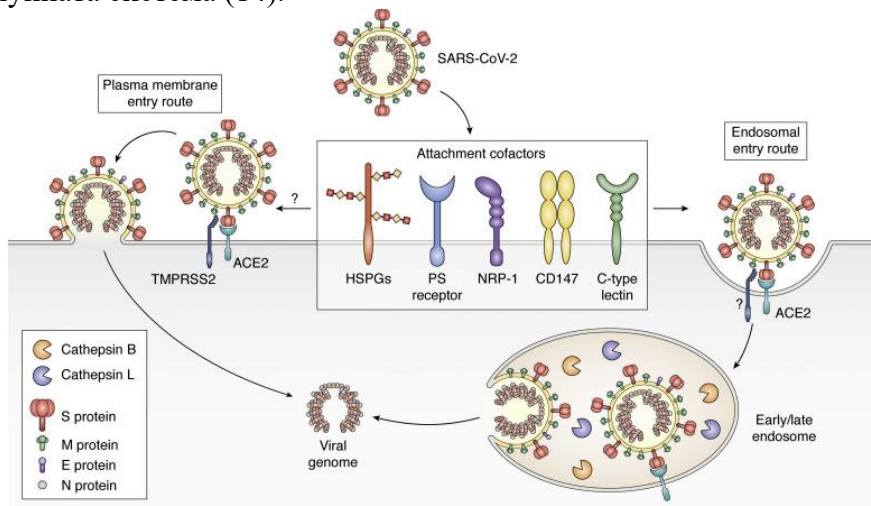
S. No.	Range	Protein name and ID	Description	Proposed function
1.	1–180	Nsp1 YP_009725297.1	Nsp1 is the N-terminal product of the viral replicase	Leader protein host translation inhibitor. Mediates RNA replication and processing. Involved in mRNA degradation [41].
2.	181–818	Nsp2 YP_009725298.1	Nsp2 is a replicase product essential for proofreading viral replication	Modulation of host cell survival signalling pathway by interacting with host PHB and PHB2 [42].
3.	819–2763	Nsp3 YP_009725299.1	Nsp3 is a papain-like proteinase contains several domains.	Functions as a protease to separate the translated polyprotein into its distinct proteins [43,44].
4.	2764–3263	Nsp4 YP_009725300.1	A membrane-spanning protein contains transmembrane domain 2 (TM2)	Believed to anchor the viral replication-transcription complex to modified ER membranes [45].
5.	3264–3569	Nsp5 YP_009725301.1	3C-like proteinase and main proteinase	Involved in viral polyprotein processing during replication [46].
6.	3570–3859	Nsp6 YP_009725302.1	Putative transmembrane domain	Plays a role in the initial induction of autophagosomes from host endoplasmic reticulum.
7.	3860–3942	Nsp7 YP_009725303.1	Nsp7 is an RNA-dependent RNA polymerase	It forms a hexadecameric super-complex with nsp8 that adopts a hollow cylinder-like structure implicated replication [47,48].
8.	3943–4140	Nsp8 YP_009725304.1	Multimeric RNA polymerase; replicase	It forms a hexadecameric super-complex with nsp7 that adopts a hollow cylinder-like structure implicated replication [47,48].
9.	4141–4253	Nsp9 YP_009725305.1	A single-stranded RNA-binding viral protein	Participate in viral replication by acting as an ssRNA-binding protein [49].
10.	4254–4392	Nsp10 YP_009725306.1	Growth-factor-like protein contains two zinc-binding motifs	In viral transcription by stimulating both nsp14 3'-5' exoribonuclease and nsp16 2'-O-methyltransferase activities. Therefore plays an essential role in viral mRNAs cap methylation [50].
11.	4393–5324	Nsp12 YP_009725307.1	RNA-dependent RNA polymerase (Pol/RdRp)	Responsible for replication and transcription of the viral RNA genome [51].
12.	5325–5925	Nsp13 YP_009725308.1	Zinc-binding domain, NTPase/helicase domain, RNA 5'-triphosphatase	A helicase core domain that binds ATP. Zinc-binding domain is involved in replication and transcription [52,53].
13.	5926–6452	Nsp14 YP_009725309.1	Proofreading Exoribonuclease domain (ExoN/nsp14)	Exoribonuclease activity acting in a 3' to 5' direction and N7-guanine methyltransferase activity.
14.	6453–6798	Nsp15 YP_009725310.1	EndoRNase; nsp15-A1 and nsp15B-NendoU	Mn(2+)-dependent endoribonuclease activity
15.	6799–7096	Nsp16 YP_009725311.1	2'-O-ribose methyltransferase	Methyltransferase that mediates mRNA cap 2'-O-ribose methylation to the 5'-cap structure of viral mRNAs [54].
16.	4393-4405	Nsp11 YP_009725312.1	Made of 13 amino acids (sadaqsflngfav) and identical to the first segment of Nsp12.	Unknown

Фигура 3: Класификация, наименование, описание и предполагаема функция на неструктурните протеин в SARS-CoV-2, според Naqvi AAT и съавтори (11)

Механизмите на SARS-CoV-2 вирусна адхезия с клетката-гостоприемник и вирусната репликация вътре в нея са добре изучени (фигура 4). SARS-CoV-2 прониква в тъканите на горните дихателни пътища, атакува целевите епителни клетки, които притежават ACE2-рецептори и TMPRSS2 протеазни корецептори (14). Spike-протеиновият рецептор е изграден структурно от две части – S1 и S2 рецепторна част. S1-рецепторната част се свързва с ACE2-рецептора, чрез рецептор-свързващ домейн (Receptor-binding domain, RBD) (4). Тогава Spike-протеинът се разцепва на две неравномерни и несиметрични части. Настъпват конформационни промени в S-протеина (4). S1 и S2 рецепторните части се „разделят“, оставайки свързани помежду си. S1-рецепторната част остава свързана с ACE2 рецептора. S2-рецепторната част се свързва за TMPRSS2-корецептора, който представлява протеазен ензим (TMPRSS2, Transmembrane protease serine 2). Свързката между S1 с ACE2 и S2 с TMPRSS2 се осъществява, чрез помощното въздействие на различни трансмембранни ко-рецепторни, протеинови и ензимни ко-фактори (като PS-receptor, C-type lectin, HSPGs, NRP-1, CD147), илюстрирани във фигура 5 и обяснени в (15), които подпомагат SARS-CoV-2 вирусната адхезия към клетката-гостоприемник, чрез рецепторната S1-ACE2 и ко-рецепторната S2-TMPRSS2 адаптация на принципа „ключ-ключалка“. След като S1 се е свързал за ACE2, а S2 за TMPRSS2, се образува общ вирусно-клетъчно-ензимен рецепторен комплекс „S1-ACE2-S2-TMPRSS2“. В момента на паралелно рецепторно свързване на S1 с ACE2 и ко-рецепторно свързване на S2 с TMPRSS2, в този общ вирусно-клетъчно-ензимен рецепторен комплекс „S1-ACE2-S2-TMPRSS2“ конформационни промени, които инициират сливането на вируса с мембраната на клетката-гостоприемник, като по този начин „отваря врата“ на SARS-CoV-2 за проникване вътре в прицелната клетка.

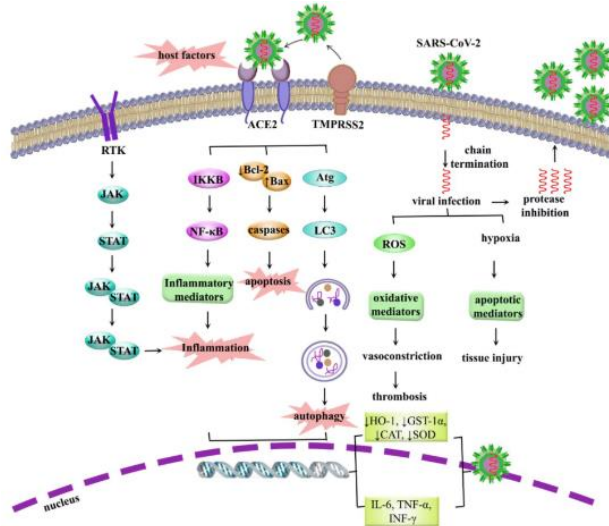


Фигура 4: Механизъм на проникване на SARS-CoV-2 в горните дихателни пътища, свързване с рецептора ACE2 и ко-рецептора TMPRSS2 на прицелната клетка-гостоприемник, за сливане с мембраната ѝ на принципа „ключ-ключалка“, с последваща репликация и активиращо дразнене на имунната система (14).



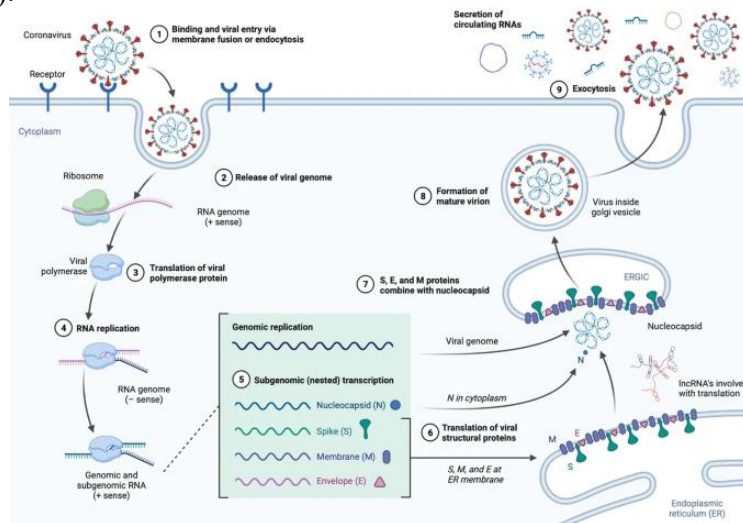
Фигура 5: Въздействие на различни трансмембранны ко-рецепторни, протеинови и ензимни ко-фактори (като PS-receptor, C-type lectin, HSPGs, NRP-1, CD147) за свързката между S1 с ACE2 и S2 с TMPRSS2 (15).

След като SARS-CoV-2 проникне в клетката-гостоприемник се активират различни биохимично-метаболитни процеси, в които активно участие взимат митохондриите (16). При взаимодействието на вируса с клетката-гостоприемник възниква дисрегулация на множество класически патогенетични и сигнално-трансдукционни пътища вътре в клетката (представени на фигура 6), като JAK-STAT и NK- κ B, които предизвикват реакция на възпаление с отделяне на провъзпалителни медиатори; активира се процеса на апоптоза по патогенетичния механизъм на вътрешния митохондриален проапоптотичен път, в който участват регулаторните BCL-2 и Вах протеини, за да активират каспазната каската и да предизвикат програмирана клетъчна смърт; активира се процеса на автофагия; а вирусната инфекция предизвиква оксидативен стрес, хипоксия, вазоконстрикция, тъканна увреда, увреда на съдовия ендотел, засилена секреция на медиатори възпалението като (TNF- α , IL-6, IFN- γ и др.), тромбоза и т.н. (17). В процеса на хипоксия, роля играе и дисрегулацията на HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor-1 α), който стимулира инфекцията, засилва провъзпалителния отговор, предизвиква увреда в митохондриалната функция, стимулира Mito-ROS продукцията, и засилва секрецията на цитокини (18).



Фигура 6: Проява на класически патогенетични процеси и дисрегулация на сигнално-трандукционни пътища при инфекция със SARS-CoV-2 (17)

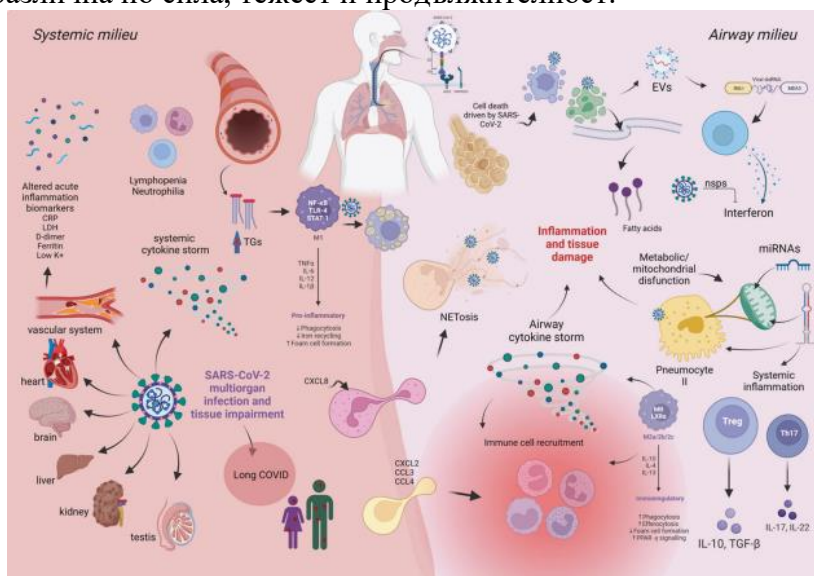
След проникване в клетката гостоприемник, SARS-CoV-2 освобождава вирусния си РНК-геном, възниква транслация на вирусни полимеразни протеини, вирусна РНК-репликация, транслация на вирусни структурни протеини, комбиниране на вирусните S, E и M структурни протеини с нуклеокаспид, оформяне на зрял вирус, чрез проникване във везикул от Апарата на Голджи и последващо освобождаване на вирусните частици, извън клетката гостоприемник (19).



Фигура 7: Жизнен цикъл на размножаване на SARS-CoV-2, предизвикващ CoViD-19, според Narayanan SA и съавтори (19).

В следствие на възникналата SARS-CoV-2 вирусна инфекция, в човешкия организъм настъпва комбинация от няколко класически общи патофизиологични процеси – инфекциозен процес, клетъчно увреждане, възпаление, микроциркулаторни нарушения, хипоксия, реакция на свръхчувствителност, и възможен фебрилитет, поради инфекциозни нарушения в термогенезата. Проявата на всеки един от тези класически патофизиологични процеси, зависи от личната генетична конституция, контролираща и регулираща всички възможни реакции на всички органи, системи, тъкани, и клетки в организма спрямо дразненето от страна на SARS-CoV-2 и породените процеси от него. Инфекцията със SARS-CoV-2 може да протече чрез проявата на различни защитно-приспособителни и компенсаторни патофизиологични реакции, с проява на лека, средна, тежка или критично-летална клинична симптоматика от страна на различни органи и системи. Патофизиологичните прояви са илюстрирани на фигура

8. Могат да бъдат засегнати всички органи и системи, а клиничната симптоматика да бъде разнообразна и различна по сила, тежест и продължителност.



Фигура 8: Патофизиологични прояви, засягащи различните органи и системи при инфекция със SARS-CoV-2 според Alhumaid S и сътрудници (20):

Проявата на тежка клинична симптоматика при инфекция със SARS-CoV-2 е свързана най-вече с възникващия патофизиологичен процес на мощно възпаление, предизвикващ тежки до необратими микроциркулаторни нарушения. Патофизиологичната реакция на възпаление е съпроводена с мощна активация на различните групи клетъчни и плазмени медиатори на възпалението. Основните групи клетъчни медиатори, които реагират при това SARS-CoV-2 възпаление са вазоактивните амини, ейкозаноидите, азотния окис, цитокини, хемокини, монокини, реактивни форми на кислорода и азота с образуване на свободни радикали, секретирани лизозомни ензими, тромбоцитен активиращ фактор (ТАФ) и невропептиди. Основните групи плазмени медиатори на възпалението са системата на комплемента, каликрейн-кининовата система, коагулационната система, фибринолитичната система и CRP. Едни от най-важните медиатори участващи в процеса на възпаление при инфекцията със SARS-CoV-2 са цитокините, хемокините, брадикининът от каликрейн-кининовата система, различни компоненти от системата на комплемента, хистаминът като основен представител на вазоактивните амини, различни ейкозаноиди, лизозомни ензими, азотния окис, ТАФ и различни компоненти от коагулационната система. Особено внимание трябва да се обърне на брадикининът и цитокините. Именно хиперсекрецията на брадикинин играе ключова роля за възникването на хипервазодилатация с тежки до необратими увреди в ендотела на кръвоносните съдове. Именно тази хипервазодилатация води до съдова свръхпропускливост и оформянето на масивен ексудат в интерстициалното пространство, който може да бъде серозен, фибринозен, хеморигичен и смесен при най-тежките форми на CoViD-19, предизвикващи необратими тъканни увреди с полиорганна недостатъчност. Именно този масивен серозно-фибринозно-хеморагичен ексудат, в комбинация с прекомерната свръхсекреция на цитокини и хемокини, предизвикващи цитокинова буря, образува гъст концентриран желеподобен секрет, който инфилтрира белодробната тъкан и я унищожава. В следствие на унищожения белодробен паренхим и тежките микроциркулаторни нарушения най-често се развива хипоксия с хипоксемия и кислородната сатурация значително спада, в съответствие със степента на тъканната увреда и масивността на възпалителния процес. Тежката до „необратима“ увреда в стената на кръвоносните съдове и съдовия ендотел, в комбинация с настъпилите тежки хемодинамични и хемореологични микроциркулаторни нарушения, предизвикващи промени в скоростта, характера и състава на циркулиращата кръв, и повишена коагулационна способност на кръвта, по механизма на Триадата на Вирхов,

предизвикват процес на тромбообразуване с формиране на тромби и риск от откъсване на емболи с последващи тромбози, емболии или тромб-емболии в различни органи и системи. Възникналата цитокинова буря в следствие на хиперсекрецията на цитокини от страна на различните имунни клетки, предизвиква хиперцитокинемия и Синдром на „цитокиновата буря“. Най-важните цитокини, които оформят тази цитокинова буря са TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IP-10, TGF, GM-CSF, MCP-1, CXCL-10, и други. Именно някои от тези цитокини са целеви обект на интерес на разработване и прилагане на нова модерна фармакотерапия за лечение при инфекция със SARS-CoV-2 и CoViD-19. Проявите при вирусната инфекция със SARS-CoV-2 могат да бъдат ограничени или напълно предотвратени при употреба на специализирана фармакотерапия или чрез разработването на нова такава. Европейската агенция по лекарствата (European Medicines Agency, EMA) е разрешила три различни лекарствени продукта с терапевтични показания за лечение при инфекция със SARS-CoV-2 и CoViD. Това са моноклоналните антитела Tixagevimab и Cilgavimab, Regdanvimab и човешкия IL-1 рецепторен антагонист Anakinra.

Цел

Целта на настоящата научна разработка е да се изяснят фармакотерапевтичните механизми, по които може да се потисне патогенезата на цитокиновата буря, чрез терапия с моноклоналните антитела Тиксагевимаб + Цилгавимаб и Рагданвимаб, както и чрез прилагане на човешкия IL-1 рецепторен антагонист Анакинра.

Материали и методи:

Извършено е обзорно научно проучване на механизмите, чрез които лекарствените продукти Тиксагевимаб с Цилгавимаб, Рагданвимаб и Анакинра възпират възникналата инфекция със SARS-CoV-2, предизвикваща CoViD-19 и появата на цитокинова буря.

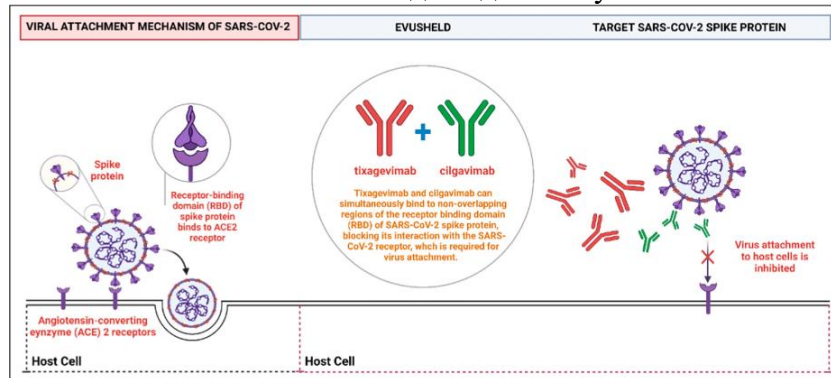
Обсъждане

Към средата на 2024 г. Европейската агенция по лекарствата (European Medicines Agency, EMA) официално е разрешила три лекарствени продукта във фармакотерапията на инфекцията със SARS-CoV-2, предизвикваща CoViD-19. Това са моноклоналните антитела Tixagevimab и Cilgavimab, Regdanvimab и човешкия IL-1 рецепторен антагонист Anakinra.

Медикаментозните характеристики, дозировката, начинът на прилагане, противопоказанията, специалните предупреждения и предпазни мерки при употребата, взаимодействията с другите лекарствени продукти, другите форми на взаимодействия, употребата при фертилитет, бременност и кърмене, ефектите върху способността за шофиране и работа с машини, нежеланите лекарствени реакции, фармакокинетиката и фармакодинамиката на лекарствените продукти, съдържащи моноклоналните антитела Tixagevimab с Cilgavimab, и Regdanvimab, тъй както човешкия IL-1 рецепторен антагонист Anakinra са описани подробно в кратката характеристика на продукта (КХП), като са отразени и в листовката за пациента.

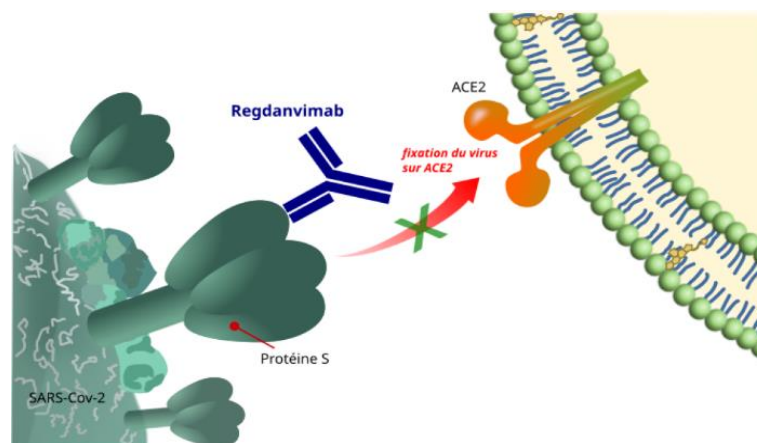
TIXAGEVIMAB и CILGAVIMAB представляват човешки рекомбинантни IgG1к моноклонални антитела, произведени в клетки от яйчници на китайски хамстер (CHO), чрез рекомбинантна ДНК технология. Те са разрешени за употреба от EMA с терапевтични показания за прилагане при предекспозиционна профилактика и лечение на инфекция със SARS-CoV-2/CoViD-19; както и за предекспозиционна профилактика: преди експозиция на SARS-CoV-2/CoViD-19 при възрастни и юноши на възраст над 12 години с тегло най-малко 40 кг., които не се нуждаят от допълнителен кислород, и които са изложени на повишен риск от прогресия до тежка форма на CoViD-19. Според продуктовата информация, описана в КХП на Tixagevimab и Cilgavimab, те са две рекомбинантни човешки IgG1к моноклонални антитела с аминокиселинни субституции в регионите Fc за удължаване на полуживота на антителата и за намаляване на ефекторната функция и потенциалния риск от антитяло-зависимо усилване на заболяването. Tixagevimab и Cilgavimab могат едновременно да се свържат с неприпокриващи

се региони на рецептор-свързващия домейн на шиповия S-протеин (Receptor-Binding Domain, RBD) на SARS-CoV-2. Комбинацията на Tixagevimab със Cilgavimab води до тяхното свързване с шиповия S-протеин, чрез равновесни дисоциационни константи и по този механизъм се блокира взаимодействието на шиповия S-протеин с ACE2 рецептора. По този механизъм комбинацията от двете моноклонални антитела Tixagevimab и Cilgavimab предотвратяват свързването към ACE2-рецептора и сливане на SARS-CoV-2 с мембраната на клетката-гостоприемник, тъй както и проникването му в нея. При тези обстоятелства, инфекция не може да възникне; а вече възникналата лесно може да бъде излекувана.



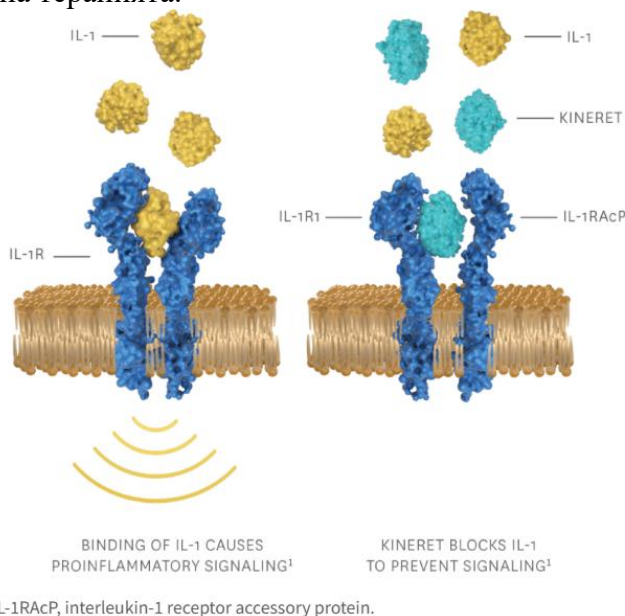
Фигура 9: Неутрализиране на SARS-CoV-2 Spike-протеина, чрез свързването на двете моноклонални антитела Tixagevimab и Cilgavimab с него. По този начин се блокира свързването на SARS-CoV-2 Spike-протеина с ACE2-рецептора на клетката гостоприемник, според Alhumaid S и сътрудници (20).

REGDANVIMAB е рекомбинантно човешко IgG1 моноклонално антитяло, произведено, чрез рекомбинантна ДНК технология в клетъчна линия на бозайници (яйчник на китайски хамстер). Ragdanvimab е предназначен за лечение на възрастни пациенти с CoViD-19, които са с повишен риск от прогресиране на заболяването, но при които не е необходим допълнителен кислород. Употребата на Ragdanvimab се прилага интравенозно, най-често при леки, средни по тежест или тежки клинични симптоми. Механизмът на действие на Ragdanvimab се изразява, чрез конкурентното му свързване с рецептор-свързващата част (Receptor-Binding Domain, RBD) на шиповия S-протеин. По този начин се блокира свързването на SARS-CoV-2 с ACE2-рецептора на клетката-гостоприемник и се избягва възможността за нова вирусна репликация, поддържаща инфекцията и прогресираща клиничната симптоматика. Клиничните симптоми постепенно намаляват по тежест и най-често изчезват в рамките на 48 часа до 14 дни след началното прилагане на моноклоналното антитяло Ragdanvimab.



Фигура 10: Свързване на моноклоналното антитяло Ragdanvimab с шиповия S-протеин на SARS-CoV-2, при което се блокира възможността за свързване на SARS-CoV-2 с ACE2-рецептора на клетката-гостоприемник и възможността за проникване в нея (https://acthera.univ-lille.fr/co/Regdanvimab_REGKIRONAJ_2.html) (21)

ANAKINRA представлява човешки интерлевкин-1 рецепторен антагонист (r-metHuIL-1r), произведен в клетки на *Escherichia coli*, чрез рекомбинантна ДНК технология. Терапевтичните показания на Anakinra са свързани с лечението на ревматоиден артрит в комбинация с метотрексат, след като монотерапията с метотрексат не е дала адекватен фармакотерапевтичен отговор. Лекарственият продукт Anakinra е разрешен в терапия на SARS-CoV-2 и CoViD-19 от ЕМА, поради имunosупресивният ефект върху IL-1, секретирани от различни имунни клетки, а в допълнение и поради проявата на потискащ ефект върху урокиназният плазминогенен активатор рецептор (uPAR). Механизмът на действие на Anakinra е патогенетичен, чрез неутрализиране на основния проинфламаторен цитокин IL-1 (IL-1 α и IL-1 β), който медира множество клетъчни отговори в рамките на възпалителния процес. Употребата му се прилага тогава когато възниква остра възпалителна реакция срещу инфекцията със SARS-CoV-2, съпроводена от възпалителни микроциркулаторни нарушения, високи плазмени нива на урокиназен плазминогенен активатор рецептор (uPAR) и свръхпродукция на IL-1 с опасност от възникване на цитокинова буря или при вече възникнала такава. Прилагането на Anakinra 100 mg веднъж дневно, чрез подкожно инжектиране (s.c.) в продължение на 10 дни (според клиничното проучване SAVE-MORE (NCT04680949), оказва имunosупресивен ефект. Anakinra неутрализира биологичната активност на основния проинфламаторен цитокин IL-1 (IL-1 α и IL-1 β), чрез конкурентно инхибиране при свързването му с интерлевкин-1 тип I рецептора (IL-1R1). Anakinra оказва и потискащ ефект върху интерлевкин-синтезиращата функция на Т-лимфоцити, В-лимфоцити, моноцити, макрофаги, НК-клетки, Епителойдни клетки, Дендритни клетки и т.н. Клиничният отговор към Anakinra се появява най-често в рамките на 14 дни от началото на терапията, поддържа се с продължаващо прилагане, а максималният клиничен отговор е в рамките на 12 седмици след началото на терапията.



Фигура 11: Конкурентно блокиране на IL-1 и IL-1RAcP от Anakinra в патогенезата на CoViD-19 и инфекцията със SARS-CoV-2 (<https://www.kineretrxhpc.com/about-kineret.php>) (22)

Заклучение

Инфекцията със SARS-CoV-2, предизвикваща CoViD-19, създава опасност от тежки, дългосрочни, прогресиращи увреди в различни органи и системи от човешкия организъм, вкл. с инвалидизиращ и животозастрашаващ характер. Бурната реактивна реакция на имунната система спрямо дразненето ѝ от страна на SARS-CoV-2 може да предизвика цитокинова буря, изразяваща се с ексцесивна секреция на цитокини и други клетъчни и плазмени медиатори на възпалението, при наличие на брадикинин-обусловена съдова хиперпропускливост, позволяваща екстравазално интерстициално образуване на свръхколичество ексудат, който

може да има серозно-фибринозно-хеморагичен характер. Така често при генетично-обусловена бурна, недобре контролирана и дисрегулирана реакция от страна на различните компоненти на имунната система към инфекцията със SARS-CoV-2, възниква цитокинова буря, като в допълнение се образува и гъст серозно-фибринозно-хеморагичен ексудат. Двете в комбинация формират гъст „желеподобен“ секрет в екстравазалното интерстициално пространство, който е много труден за овладяване и летален за инфилтрираната паренхимна тъкан. Контролът и регулацията на имунната система, изучаването на патофизиологичните механизми, по които възникват и се развиват цитокиновата буря, съдовите увреди и съдовата хиперпропускливост, тъй както тяхното потискане и овладяване са от съществено значение в превенцията на тежките форми на инфекцията със SARS-CoV-2 и CoViD-19. С напредване на новите фармакотерапевтични технологии и развитие на модерната фармакотерапия, активни вещества като Anakinra могат да потиснат възпалителния процес по различни патогенетични механизми, а моноклонални антитела като Tixagevimab, Cilgavimab и Regdanvimab да блокират свързването на вирусите с рецепторите на клетката-гостоприемник, за да предпазят или излекуват човешкия организъм от вирусната инфекция.

Литература

1. И. Хайдушка, М. Атанасова, В. Кирина, З. Кълвачев. Медицинска Микробиология. Лакс Бук, 2016, стр. 357.
2. Хаджиолова Т., Павлова С., Коцева Р. Коронавируси (Coronaviridae), (в КЛИНИЧНА ВИРУСОЛОГИЯ, под редакцията на Стефан Дундаров, Даниела Дундарова, Радка Аргирова и Веселин Русев). Медицина и физкултура, София, 2006, стр. 142 – 145.
3. Митов Ив., Митов Г. Коронавируси (сем. Coronaviridae), (в Медицинска микробиология, под редакцията на Иван Митов). Медицинско издателство „АРСО“, София, 2023, стр. 372.
4. Янчева-Петрова Н. Коронавируси и CoViD-19, (в Учебник по инфекциозни болести (под редакцията на доц. Нина Янчева-Петрова), Арбилис, 2003, стр. 133-152.
5. Комитова Р. Тежък остър респираторен синдром. В Инфекциозни болести – учебник за студенти по медицина под редакцията на Проф. Радка Комитова. Лакс бук, Пловдив, 2022, стр. 146 – 149.
6. Комитова Р. Пандемията CoViD-19. В Инфекциозни болести – учебник за студенти по медицина под редакцията на Проф. Радка Комитова. Лакс бук, Пловдив, 2022, стр. 149 - 157.
7. Тихолова М., Митов Ив., Кълвачев Зл., Каменов Г. Инфекции на дихателните пътища – Остри респираторни заболявания – Коронавирусни инфекции. В Инфекциозни болести (под редакцията на Майда Тихолова), АРСО, София, 2008.
8. Въртигова М.С. Инфекциозни болести – учебник за медицински специалисти, студенти по дентална медицина и компендиум за студенти по медицина. Лакс бук, Пловдив, 2023.
9. Kiros M, Andualem H, Kiros T, Hailemichael W, Getu S, Geteneh A, et al. COVID-19 pandemic: current knowledge about the role of pets and other animals in disease transmission. *Virology*. 2020 Oct 2;17(1):143. doi: 10.1186/s12985-020-01416-9. PMID: 33008410; PMCID: PMC7530550.
10. Segreto R, Deigin Y, McCairn K, Sousa A, Sirotkin D, Sirotkin K, et al. Should we discount the laboratory origin of COVID-19? *Environ Chem Lett*. 2021;19(4):2743-2757. doi: 10.1007/s10311-021-01211-0. Epub 2021 Mar 25. PMID: 33786037; PMCID: PMC7993900.
11. Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, Fatima U, Singh IK, Singh A, et al. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020 Oct 1;1866(10):165878. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165878. Epub 2020 Jun 13. PMID: 32544429; PMCID: PMC7293463.
12. Kakavandi, S., Zare, I., VaezJalali, M. *et al.* Structural and non-structural proteins in SARS-CoV-2: potential aspects to COVID-19 treatment or prevention of progression of related diseases. *Cell Commun Signal* **21**, 110 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01104-5>
13. Safiabadi Tali SH, LeBlanc JJ, Sadiq Z, Oyewunmi OD, Camargo C, Nikpour B, Armanfard N, Sagan SM, Jahanshahi-Anbuhi S. Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome

- Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clin Microbiol Rev.* 2021 May 12;34(3):e00228-20. doi: 10.1128/CMR.00228-20. PMID: 33980687; PMCID: PMC8142517.
14. Funk CD, Laferrière C, Ardakani A. A Snapshot of the Global Race for Vaccines Targeting SARS-CoV-2 and the COVID-19 Pandemic. *Front Pharmacol.* 2020 Jun 19; 11:937. doi: 10.3389/fphar.2020.00937. PMID: 32636754; PMCID: PMC7317023.
 15. Evans JP, Liu SL. Role of host factors in SARS-CoV-2 entry. *J Biol Chem.* 2021 Jul;297(1):100847. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100847. Epub 2021 May 28. PMID: 34058196; PMCID: PMC8160279.
 16. Jamison, D.A., Anand Narayanan, S., Trovão, N.S. *et al.* A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 1: Intracellular overdrive for SARS-CoV-2 infection. *Eur J Hum Genet* **30**, 889–898 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41431-022-01108-8>
 17. Fakhri S, Nouri Z, Moradi SZ, Akkol EK, Piri S, Sobarzo-Sánchez E, et al. Targeting Multiple Signal Transduction Pathways of SARS-CoV-2: Approaches to COVID-19 Therapeutic Candidates. *Molecules.* 2021 May 14;26(10):2917. doi: 10.3390/molecules26102917. PMID: 34068970; PMCID: PMC8156180.
 18. Tian M, Liu W, Li X, Zhao P, Shereen MA, Zhu C, et al. HIF-1 α promotes SARS-CoV-2 infection and aggravates inflammatory responses to COVID-19. *Signal Transduct Target Ther.* 2021 Aug 18;6(1):308. doi: 10.1038/s41392-021-00726-w. PMID: 34408131; PMCID: PMC8371950.
 19. Narayanan SA, Jamison DA Jr, Guarnieri JW, Zaksas V, Topper M, Koutnik AP, et al. A comprehensive SARS-CoV-2 and COVID-19 review, Part 2: host extracellular to systemic effects of SARS-CoV-2 infection. *Eur J Hum Genet.* 2024 Jan;32(1):10-20. doi: 10.1038/s41431-023-01462-1. Epub 2023 Nov 8. PMID: 37938797; PMCID: PMC10772081.
 20. Alhumaid S, Al Mutair A, Alali J, Al Dossary N, Albattat SH, Al HajjiMohammed SM, et al. Efficacy and Safety of Tixagevimab/Cilgavimab to Prevent COVID-19 (Pre-Exposure Prophylaxis): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diseases.* 2022 Dec 1;10(4):118. doi: 10.3390/diseases10040118. PMID: 36547204; PMCID: PMC9777759.
 21. https://acthera.univ-lille.fr/co/Regdanvimab_REGKIRONAJ_2.html
 22. <https://www.kineretrxhcp.com/about-kineret.php>

BENZIMIDAZOLE METAL COMPLEXES WITH ANTITUMOUR ACTIVITY

Gergana Georgieva, Luiza Sokolova

Bulgarian Drug Agency

ABSTRACT

Introduction: The need for the development of new and innovative antitumor agents has increased tremendously over the past two decades. Adverse reactions accompanying current therapies such as apoptosis, gastrointestinal toxicity, cardiotoxicity, neurotoxicity, immunosuppression, tumor cell resistance must be overcome. In the present work, a new type of biologically active substances are considered, the advantage of which is, their precise biological activity due to their specific structure and similarity to other biological molecules. Benzimidazole as a pharmacophore has been used as a basis for the synthesis of selective drugs of interest in multiple therapeutic areas, including as an HIV-RT inhibitor, anticancer, antimicrobial, antihistamine, antioxidant, antihypertensive, antiviral, anticoagulant, and others. The development of metallo-drugs based on coordination compounds is rapidly expanding, encompassing a wide variety of transition metals (Cu>Co>Zn>Ni) and ligands with specific structure in their composition.

Materials and Methods: A literature review is performed in which the most widely used cytotoxicity assays are briefly described and the results obtained are referenced to scientific articles.

Results: The combination of I-row transition metals and benzimidazole ligands is attractive to the scientific world, opening up new directions for enhancing the cytotoxic or antiproliferative activities of heterocycles, as some of the complex compounds are able to interact with the active center of enzymes, improving their biocompatibility, bioavailability, and lipophilicity.

Conclusion: Expanding research around the synthesis of new molecules that integrate benzimidazole as a pharmacophore, an important structural agent found in a large number of natural and biologically active molecules, and metal compounds of the I and II row is providing impetus in the design of new biologically active complexes with potential activity for chemotherapeutic applications.

БЕНЗИМИДАЗОЛОВИ МЕТАЛНИ КОМПЛЕКСИ С ПРОТИВОТУМОРНА АКТИВНОСТ

Гергана Георгиева, Луиза Соколова

Изпълнителна агенция по лекарствата

Ракът е едно от най-животозастрашаващите заболявания в световен мащаб, характеризира се с дерегулация на клетъчния цикъл, която води до прогресивна загуба на клетъчна диференциация и неконтролиран клетъчен растеж. Независимо от постигнатите положителни резултати свързани с лечението му, необходимостта от разработване на нови лекарства и лекарствени комбинации продължава. Азотсъдържащите хетероциклени съединения играят значителна роля в съвременната медицинска химия, като многобройни изследвания са посветени на дизайна и синтеза на нови лекарствени молекули, включително и такива с противоракова активност. Сред тях бензимидазолът като изостер на пуриновите бази е важен структурен скелет в различни клинично прилагани антинеопластични средства като нокодазол, бендамустин, довитиниб, велипарип, както и много други лабораторно тествани съединения. [1]

Преходните метали като мед, кобалт, цинк, никел, манган, ванадий и желязо са основни микроелементи, които играят ключова роля за функционирането на клетките както на химично, така и на биологично ниво. Те служат като кофактори в ензимите или стабилизират техните структури, както и тези на протеините. Също така, тези метали са жизненоважни за

регенеративните и метаболитните процеси, предпазват организма от оксидативен стрес и допринасят за поддържането на имунитета срещу патогени и различни физиологични агенти. [2] Освен това терапевтичните агенти на основата на преходни метали са склонни да имитират фитохимикали с ниска токсичност и ефективно да се свързват с ДНК, което води до нейното разцепване като една от характеристиките на ефективните противоракови лекарства, като цисплатина. По същия начин, в зависимост от техните координационни числа, металните йони могат да създават различни геометрии, включително линейни, тригонални, тетраедрични и октаедрични структури. Доказано е, че структурното разнообразие има огромен ефект върху проектирането на нови лекарства, които повишават биологичната активност за лечение на рак. [3]

Медта е третият по значимост микроелемент в човека и има множество биологични функции. Правилното функциониране на редица метаболитни ензими зависят от наличието и в човешкото тяло, като същото така проявява антиоксидантна и прооксидантна активност, неутрализира свободните радикали и предотвратява клетъчните увреждания. Освен това медта е необходима при производството на енергия (цитохром с оксидаза), в синтеза на колаген (лизилоксидаза), както и в производството на миелин, меланин (тирозиназа) и хемоглобин (церулоплазмин). [4]

Кобалтът присъства в организма както в неорганична, така и в органична форма. Токсичен е в неорганичната си форма, но в органичната си форма е част от витамин В12 и е от основно значение при синтеза на аминокиселини и протеини, необходими за изграждането на миелиновата обвивка. Солите на кобалта намират приложение в медицината срещу анемия и в спорта като подходящ заместител на традиционния кръвен допинг. Подпомага синтеза на невротрансмитери и усвояването на цинка и желязо в червата. [4]

Цинкът е вторият по важност преходен метал, който може да бъде намерен в целия човешки организъм. Има каталитична и регулаторна функция. Полезен е при синтеза на протеини и колаген, поддържане на хомеостазата, намаляване оксидативния стрес, стимулиране на имунните реакции и репликация на ДНК. [4]

Никелът се среща в нуклеиновите киселини, главно в РНК като подпомага обмяната на веществата и се включва в метаболитните процеси като кофактор. [4]

Манганът се намира главно в митохондриите, част е от някои ензими и действа като активатор на много други, например декарбоксилази, кинази, хидролази и трансферази. От значение е Mn-SOD (манганов супероксид дисмутаза), който е основният ензим за детоксикация на ROS (реактивни кислородни видове) в клетките поради локализацията си в митохондриите. [4]

Ванадий се открива в кръвната плазма, тъканите, черния дроб и бъбреците, както и в костите (колянната става, хрущяли и др.). [4]

Желязото е много важен микроелемент в човешкия организъм като съставлява хемната група в цитохрома, миоглобина и хемоглобина и участва в различни биологични процеси, свързано е с множество ензими, като каталази, пероксидази, редуктази, дехидрогенази и пиролази. [4]

Изследвания за определяне на количеството на клетъчните пролиферации, клетъчната жизнеспособност и цитотоксичност много често се използват за установяване на това здрави ли са клетките след третиране с чисти синтезирани молекули. Тези анализи се състоят в количествено определяне на маркер, отразяващ броя на жизнеспособните клетки, в сравнение с броя на положителни (съединение с добре известна активност) и отрицателни (носител) контролни третираня. Повечето от тези тестове се базират на клетъчна ензимна активност, синтез на ДНК, АТФ (аденозинтрифосфат) и целостта на мембраната, които са известни като индикатори за жизнеспособността на клетката.

Медните комплекси се изследват и комбинират с различни хетероциклически части в процеса на откриване на нови лекарства. Тъй като сред металите медта фигурира като ендегенен метал, а не екзогенен, поради което е по-малко токсична, а също така е и селективно пропусклива за мембраните на раковите клетки, тя притежава окислително-редукционни

свойства и потенциал за разцепване на ДНК. Самата бензимидазолова част има редица биологични активности (антимикробна, противогъбична, антихелминтна, антивирусна, антихипертензивна, антихистаминова, противовъзпалителна), включително и противораков потенциал. [5]

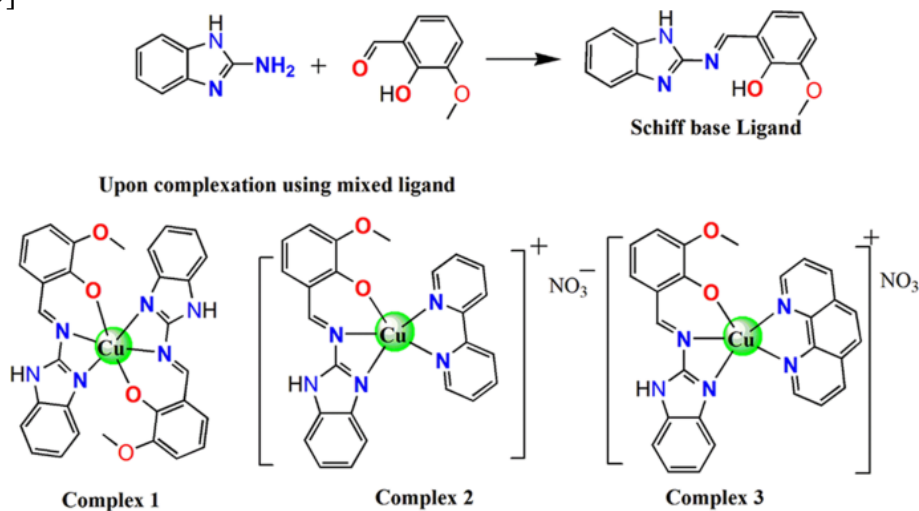


Схема 1. Синтез на лиганда на Шифова основа и структури на трикомпонентните комплекси.[6]

Afzal Hussain и колектив изследват цитотоксичността на трите медни(II) комплекса (1-3), която бива тествана върху култивирани MCF-7 (човешки рак на гърдата) клетъчни линии чрез излагане в продължение на 24 часа на среда, съдържаща концентрациите на комплекса 1-100 μ M, в сравнение с широко използваното лекарство цисплатин при идентични условия чрез МТТ тест. Наблюдава се зависим от концентрацията цитотоксичен отговор след излагане на различни концентрации на комплексите. Установява се, че комплекс 3 е по-цитотоксичен, следван от комплекс 2 и комплекс 1, но и трите комплекса са обещаващи като бъдещи противоракови средства.[6]

Кобалтът играе съществена биологична роля и е необходим елемент за човешкия организъм. Освен това се използва в термотерапията, а изотопът кобалт-60 (⁶⁰Co) е необходим в лъчевата терапия за лечение на рак. Също така е свързан и с централната част в структурата на витамин В12 (хидроксикобаламин), който обуславя различни процеси в човешкия метаболизъм, както и по отношение на вътреутробното развитие, наред с други функции. Наред с това витамин В12 е използван за подобряване на изображението за идентифициране на ракови клетки, за маркиране на ракови клетки при хирургична резекция, за проследяване на пролифериращ тумор с помощта на химически тракери и за визуализиране на специфични рецептори, увеличени в положителните тумори. Използван е и при разработването на пролекарства, насочени към тумори, при разработването на полимерни мицели, пренасящи лекарства, за борба с рака, както и в биомаркери и протеини за пренос на лекарства до раковите клетки.[4]

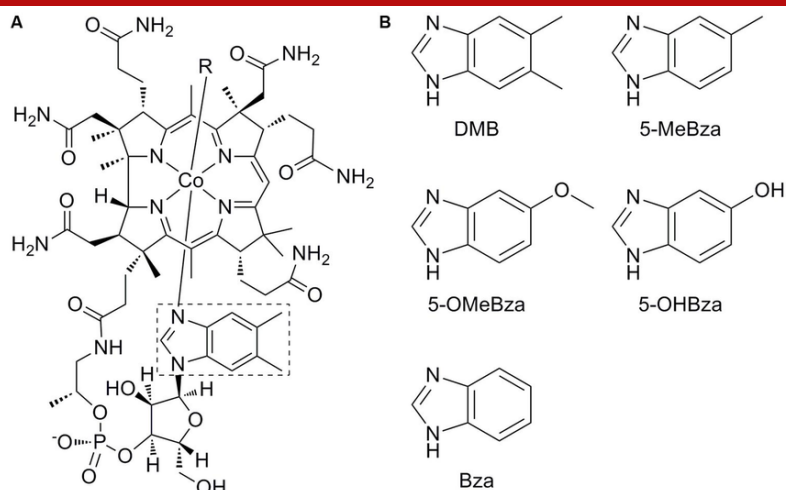


Схема. 2 Структура на кобаламин и бензимидазолови долни лиганди. (А) Структура на кобаламина. 5,6-диметилбензимидазол (DMB) е заграден в каре. (Б) Структура на лигандите 5-метилбензимидазол (5-MeBza), 5-метоксибензимидазол (5-OMeBza), 5-хидроксибензимидазол (5-OHBza) и бензимидазол (Bza). [7]

Цинкът е основен елемент на организма като количеството му варира между 1 и 2,5 g при възрастни. Той участва в някои важни биологични процеси, заедно с това е необходим за дейността на 300 ензима, които участват в много ензимни и метаболитни процеси. Недостигът на цинк води до забавяне на растежа, до имунна дисфункция и когнитивни увреждания, а повишените нива на цинк, от своя страна, могат да доведат до намаляване на растежа на клетките на простатата. Въпреки значимостта на този метал, не е обърнато достатъчно внимание на биологичните функции на синтетичните съединения на основата му.

Въз основа на гореизложеното нерядко се смята, че комбинацията от цинк и бензимидазол би могла да играе важна роля в откриването на нови противоракови молекули, които потенциално са в състояние да засилят противораковите ефекти. В този смисъл прилагането на цинкови добавки може да намали оксидативния стрес и да подобри имунните функции, което на свой ред е свързано с потенциални механизми, касаещи превантивната дейност срещу рака. Напоследък се изследва съотношението между медта и цинка в кръвта на пациенти с различни видове рак, като е установен недостиг на цинк при пациенти с рак на белия дроб и гинекологични неоплазми.[4]

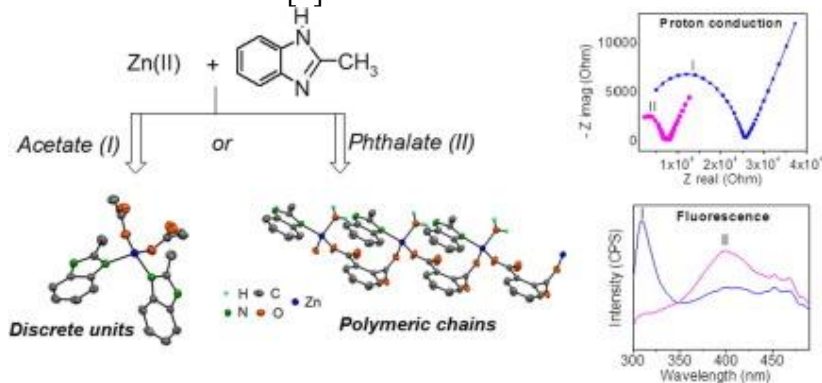


Схема 3 Структурно и спектроскопски са характеризирани нови цинкови карбоксилати на основата на 2-метилбензимидазол. Разпознати са надмолекулни прилики на комплексите с цинкови ензими, участващи в механични процеси, свързани с преноса на протони. Променливотоковите импедансни изследвания разкриват характеристиките на протонната проводимост на комплексите, базирани на влажността, с величини, сравними с характеристиките на други класически протонни електролити.[8]

Afzal Hussain и колектив са проектирали, синтезирали и охарактеризирали три комплекса от преходни метали, Cu(II), Co(II) и Zn(II), с биологично значима органична част, получена от бензимидазол. И трите комплекса (1-3) са доказани чрез елементарен анализ и спектроскопски методи. Комплексите се свързват лесно с молекулата на ДНК. Комплекс 1 демонстрира най-активно свързване при съпоставка с 2 и 3. Резултатите показват значителна нуклеазна активност при относително по-ниска концентрация на комплексите. Комплекси 1-3 са подложени на анализ срещу 5 различни човешки ракови клетъчни линии HepG2 (черен дроб), SK-MEL-1 (кожа), HT018 (дебело черво) HeLa (шийка на матката) и MDA-MB231 (гърда) ракови клетки. Резултатите демонстрират, че комплекс 3 е по-активен от комплекси 1 и 2, което контрастира с горепосочените резултати за свързване на ДНК. Един от интересните резултати в настоящия анализ се свежда до това, че цинковият комплекс (3) проявява значителна цитотоксичност в сравнение с цисплатина върху всички тествани клетъчни линии. [9]

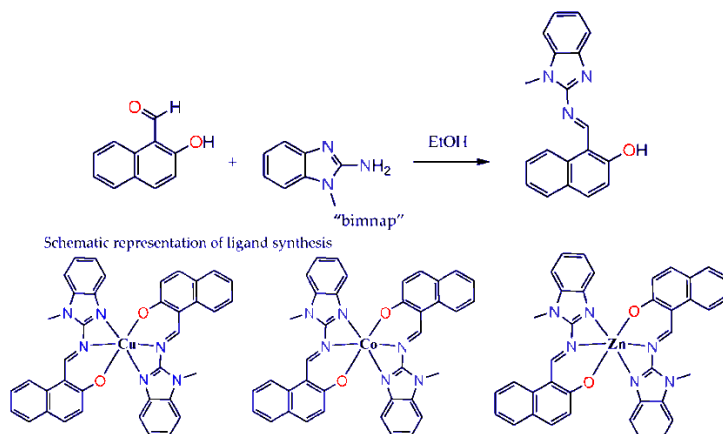


Схема 4. Схематично представяне на синтеза на лиганда и предложените структури на комплексите Cu(II) (1), Co(II) (2) и Zn(II) (3). [9]

Никелът е микроелемент, чиито биологични функции при хората са пряко свързани с усвояването на желязото в организма и с производството на пролактин при кърмещите жени. Освен това никелът бива регистриран във високи концентрации в нуклеиновите киселини и намира приложение в разпознаването на гуанин и вероятно играе роля в стабилизирането на РНК. В неорганичната химия никелови съединения като NiS и NiO, причиняват белодробна фиброза и рак на белия дроб.. При все това производни на никел(II) като съединения **21-26** вече са разкрили определена потенциална инхибираща активност спрямо различни ракови клетки, което се дължи на свойствата на никел(II) за кръстосано свързване в молекулата на ДНК. [4]

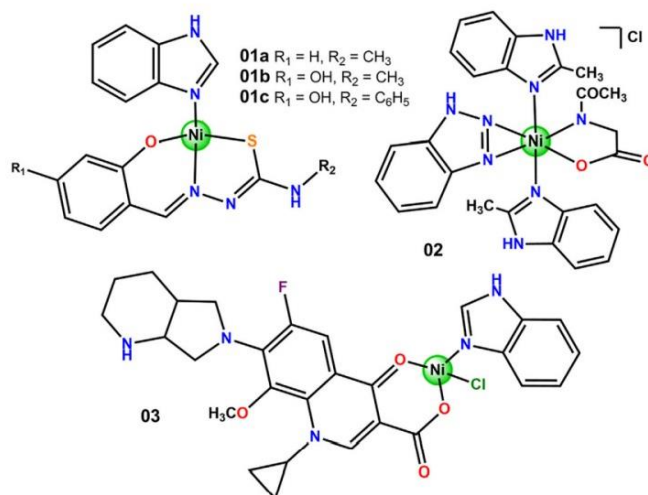


Схема 5. Съединения на никел (II) с различни бидентатни бензимидазолови лиганди [4]

Разширяването на изследванията върху синтеза на нови молекули, които обединяват бензамидазол, като фармакофор важен структурен агент срещан в голям набор от природни и биологично-активни молекули и метални съединения от I и II ред, дава тласък в дизайна на нови биологично активни комплекси с потенциално действие за химиотерапевтични приложения. Разработването на лекарства с метални комплекси на базата на координационни съединения бързо се разширява, като наред с това обхваща голямо разнообразие от преходни метали ($Cu > Co > Zn > Ni$) и лиганди със специфична структура в състава си. Очертават се нови насоки за увеличаване на цитотоксичните или антипролиферативната активност на хетероцикъла, тъй като някои от комплексните съединения са способни да взаимодействат с активния център на ензимите, подобрявайки тяхната биосъвместимост, бионаличност и липофилност.

Литература

1. S. Tahlan, S. Kumar, S. Kakkar, B. Narasimhan. Benzimidazole scaffolds as promising antiproliferative agents: a review *BMC Chem.* 2019. *BMC Chem.* 2019 May 15;13(1):66. doi: 10.1186/s13065-019-0579-6. PMID: 31384813; PMCID: PMC6661752..
2. Van Cleave C, Crans DC. The First-Row Transition Metals in the Periodic Table of Medicine. 2019. *Inorganics.* 2019; 7(9):111. <https://doi.org/10.3390/inorganics7090111>.
3. Nguyen VT, Huynh TK, Ho GT, Nguyen TH, Le Anh Nguyen T, Dao DQ, et al. Metal complexes of benzimidazole-derived as potential anti-cancer agents: synthesis, characterization, combined experimental and computational studies. *R Soc Open Sci.* 2022 Sep 21;9(9):220659. doi: 10.1098/rsos.220659. PMID: 36147940; PMCID: PMC9490329..
4. D. Hernandez-Romero, S. Rosete-Luna, A. Lopez-Monteon, A. Chávez-Pina, N. Perez-Hernandez, J. Marroquin-Flores et al. First-row transition metal compounds containing benzimidazole ligands: An overview of their anticancer and antitumor activity. *Coordination Chemistry Reviews, Volume 439*, 2021,213930,ISSN00108545,<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213930>.(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854521002046>).
5. K, Anichina. synthesis of mixed ligand copper (ii) complex of benzimidazole schiff base with 1,10-phenanthroline as potential antitumor agent. 2021,DOI:10.31435/rsglobal_conf/30012021/7385.
6. Hussain A, AlAjmi MF, Rehman MT, Amir S, Husain FM, Alsalmeh A, et al. Copper(II) complexes as potential anticancer and Nonsteroidal anti-inflammatory agents: In vitro and in vivo studies. *Sci Rep.* 2019 Mar 27;9(1):5237. doi: 10.1038/s41598-019-41063-x. PMID: 30918270; PMCID: PMC6437194..
7. Crofts TS, Men Y, Alvarez-Cohen L, Taga ME. A bioassay for the detection of benzimidazoles reveals their presence in a range of environmental samples. *Front Microbiol.* . 2014 Nov 13;5:592. doi: 10.3389/fmicb.2014.00592. PMID: 25431570; PMCID: PMC4230183..
8. D. Saravanabharathi, M. Obulichetty, S. Rameshkumar, M. Kumaravel. New 2-methyl benzimidazole based zinc carboxylates: Supramolecular structures, biomimetic proton conductivities and luminescent properties. 2015,ISSN 0020-1693,<https://doi.org/10.1016/j.ica.2015.08.018>, (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020169315004119>).
9. Hussain A, AlAjmi MF, Rehman MT, Khan AA, Shaikh PA, Khan RA. Evaluation of Transition Metal Complexes of Benzimidazole-Derived Scaffold as Promising Anticancer Chemotherapeutics. *Molecules.* 2018; 23(5):1232. <https://doi.org/10.3390/molecules23051232>.

REAL WORLD DATA AND REAL WORLD EVIDENCE AND THEIR PLACE IN EVIDENCE BASED MEDICINE

Lazarova G. A.^{1,3}, Todorova L.R.^{2,3}

¹ Department of Pharmacology and toxicology, MU-Sofia, Bulgaria

² Medical college, University “prof. Dr. Asen Zlatarov”, Burgas, Bulgaria

³ Bulgarian Drug Agency

ABSTRACT

Introduction. In the current medical reality there are a lot of conditions that do not have a treatment alternative, opening highly unmet medical need for a number of patients. Scientific and regulatory societies are searching for ways to fill in the knowledge gaps to be able to meet those new challenges and provide the ones in need with the best possible alternative for their condition, based on evidence for efficacy and safety. When not enough data is available in order a medical or regulatory decision to be made there opens a need of a new tool to help fill in the knowledge gaps. Real world data (RWD) and Real world evidence (RWE) is a new way to generate data adding to CTs accumulated one to help decision-making of regulators and healthcare specialists. **Aim.** To analyze the advantages and disadvantages of RWD as well as the challenges in using RWD in decision-making. **Methods and materials.** Using the literature we will review the currently available knowledge and used practices concerning RWD and real world evidence (RWE). **Results and conclusions.** Real world data (RWD) is increasingly incorporated in the evaluation of human medicines. The need of RWD and RWE to give additional information and supplement the information from clinical trials (CTs) helps decision making in complicated cases where is no strong position standing out.

ДАННИ И ДОКАЗАТЕЛСТВА ОТ РЕАЛНИЯ ЖИВОТ И ТЯХНОТО МЯСТО В МЕДИЦИНАТА БАЗИРАНА НА ДОКАЗАТЕЛСТВА

Лазарова Г.А.^{1,3}, Тодорова Л.Р.^{2,3}

¹ Катедра по Фармакология и токсикология, МУ-София, България

² Медицински колеж, Университет „проф. д-р Асен Златаров“, Бургас, България

³ Изпълнителна агенция по лекарствата

Въведение

В днешната регулаторна обстановка на стимулиране на иновациите при разработване на лекарства изникват все повече предизвикателства пред изследователи и регулатори. При разработване на лекарствени продукти и подаване на заявление за разрешение за употребата им, освен доказване на качеството на продукта, е необходимо да се представят достатъчно и релевантни данни относно ефикасността и безопасността му. За златен стандарт, относно доказване на ефикасност, се считат рандомизираните контролирани проучвания (RCTs). Основното предимство на получените резултати от рандомизирани контролирани клинични проучвания е, че при тях е сведено до минимум влиянието на пристрастия. Недостатъците на тези проучвания са, че са скъпи за провеждане, с много дълга продължителност и резултатите представят условия, които не винаги са приложими в клиничната практика. Необходимо е да се намери алтернатива за получаване на допълнителни данни, с цел подпомагане вземането на регулаторни решения.

Данни от реалния живот

Европейската агенция по лекарствата (EMA) определя данните от реалния живот (RWD) като рутинно събирани данни, свързани със здравния статус на пациента или предоставянето на здравни грижи от източници, различни от традиционните клинични изпитвания, т.е. данни от

регистри, данни за здравно осигуряване, данни от биобанки, записи от електронно здравеопазване, дори данни от здравни приложения и социални медии. RWD са широко използвани в пост-маркетингови проучвания и за мониториране на безопасността на вече разрешени за употреба лекарства, но все повече се работи към интегрирането им като помощно средство при вземането на регулаторни решения на по-ранен етап от жизнения цикъл на лекарствения продукт.

Доказателства от реалния живот, като инструмент за вземане на решения

Доказателство от реалния живот (RWE) е клинично доказателство, получено от неинтервенционни проучвания (NIS), използващи RWD, по отношение на употребата, потенциалните ползи и потенциалните рискове, свързани с даден лекарствен продукт и/или активно вещество. RWE могат да бъдат получени от обсервационни проучвания, ретроспективни проучвания или прагматични клинични проучвания. Обсервационните проучвания предлагат ценна представа за въздействията в реалния живот на здравните практики и интервенции. Те могат да бъдат кохорти, cross-sectional проучвания или case-control проучвания (1). Ретроспективните проучвания предоставят поглед върху интервенциите в здравеопазването и техните ефекти. Прагматичните клинични проучвания изследват дали една интервенция работи в реалния живот и са предназначени да увеличат максимално приложимостта и възможността за обобщаване на резултатите. Резултатите получени от тези проучвания са основно насочени към пациента, за разлика от класическите крайни точки измерени в симптоми или биомаркери (5). Предимствата на доказателствата получени от реалния живот са: намалено време и разходи за изпълнение в сравнение с RCTs, представяне на насоченост за рандомизираните контролирани проучвания, могат да се проучат безопасно високорискови групи, откриване на нежелани ефекти с по-малка честота, бърз достъп и по-лесно извличане на информация, изготвяне на модели за прогноза (2). Въпреки посочените предимства в провеждането на RWE анализи има и много ограничения, част от които са: анализите разчитат на предполагаемата връзка, а не причинни-следствени взаимовръзки, следователно обикновено отговарят на различни въпроси към RCT, съществува риск от недобросъвестност и демонстриране на пристрастия поради липса на рандомизация и проблеми с качеството на събирането на данни, източникът и типът на използваните данни могат да ограничат възможността за обобщаването им.

Използване в момента

Понастоящем RWD основно се анализират при постмаркетингово наблюдение за мониторинг и оценка на безопасността и ефективността на лекарства, които вече са разрешени за рутинни грижи. Например предполагаемите нежелани лекарствени реакции се управляват и анализират в системата EudraVigilance, управлявана от Европейската агенция по лекарствата (ЕМА). Друг пример са фармакоепидемиологични анализи на данни за здравно осигуряване, които могат да дадат информация за ефективността на дадено лекарство, т.е. ефекта на практика, за разлика от ефикасността, която е ефективността при идеалните и контролирани обстоятелства на клинично изпитване. Честотата на използване на RWE в по-ранните етапи от жизнения цикъл на лекарството е била ниска и едва наскоро започва да се увеличава. Проучване на ЕМА относно разработването на лекарствени продукти, разрешени в Европа по централизирана процедура за периода 2018-2019 г. е установило, че RWE са включени във фазата на предварително разрешение за употреба на нови лекарства в различна степен според етапа: от 35% в ранна разработка и 49% в пълно развитие до 98% при откриване (епидемиология на заболяването) и 100% при управление на жизнения цикъл във фаза на предварително одобрение (3). В друг систематичен анализ на всички заявления за разрешаване за употреба и разширяване на обхвата, подадени до ЕМА в периода 2018-2019 г., 40% от разрешенията за употреба и 18% от разширяванията на обхвата съдържат RWE, като източниците на RWE са главно регистри и болнични данни (4).

Предизвикателства

В Европа липсват източници на данни за RWE, подходящи за вземане на регулаторни решения. Понастоящем Групата за управление на големи данни създава RWD инфраструктура в Европа чрез различни инициативи като координационния център „Анализ на данни и мрежа за запитване в реалния свят“ (DARWIN EU®) или рамката „Европейско пространство за здравни данни“ (EHDS).

Въпреки цялото вълнение около трансформирания потенциал на данните от реалния живот, предизвикателствата в използването на RWE са разнообразни – от събирането на данни и контрола на качеството им до вземането на решения, все още съществуват във всички етапи от жизнения цикъл на RWD (5).

Литература

1. Dang A. Real-World Evidence: A Primer. *Pharmaceut Med.* 2023 Jan;37(1):25-36. doi: 10.1007/s40290-022-00456-6. Epub 2023 Jan 5. PMID: 36604368; PMCID: PMC9815890.
2. Kim HS, Lee S, Kim JH. Real-world Evidence versus Randomized Controlled Trial: Clinical Research Based on Electronic Medical Records. *J Korean Med Sci.* 2018 Jun 26;33(34):e213. doi: 10.3346/jkms.2018.33.e213. PMID: 30127705; PMCID: PMC6097073.
3. Eskola, SM, et al. Use of Real-World Data and Evidence in Drug Development of Medicinal Products Centrally Authorized in Europe in 2018-2019. 1, January 2022, *Clin Pharmacol Ther.*, Vol. 111, pp. 310-320.
4. Flynn, R, et al. Marketing Authorization Applications Made to the European Medicines Agency in 2018-2019: What was the Contribution of Real-World Evidence? January 2022, *Clin Pharmacol Ther.*, pp. 90-97.
5. Liu F, Panagiotakos D. Real-world data: a brief review of the methods, applications, challenges and opportunities. *BMC Med Res Methodol.* 2022 Nov 5;22(1):287. doi: 10.1186/s12874-022-01768-6. Erratum in: *BMC Med Res Methodol.* 2023 May 2;23(1):109. doi: 10.1186/s12874-023-01937-1. PMID: 36335315; PMCID: PMC9636688.

OREXIN-1 RECEPTOR ANTAGONISTS IN THE THERAPY OF PANIC DISORDER

Desislava Karatopraklieva¹, Silvia Gancheva²

¹ Student, Faculty of Medicine, Medical University of Varna „Prof. Dr. Paraskev Stoyanov“

² Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, Medical University of Varna „Prof. Dr. Paraskev Stoyanov“

ABSTRACT

Introduction: Orexins are neuropeptides involved in the regulation of sleep-wake behaviour, feeding, emotions, and other physiological processes. In recent years, orexin-1 receptor (OXR1) antagonists have attracted the attention of researchers as a potential new treatment of psychiatric disorders. Panic disorder encompasses spontaneous panic attacks. Main therapeutic approaches are cognitive-behavioral therapy along with SSRIs and benzodiazepines. Disadvantages of current pharmacotherapy have motivated research for a better alternative and OXR1 antagonists appear to be a promising option.

Aim: The present research aims to review the available preclinical and clinical studies on the role of OXR1 antagonists in the therapy of panic disorder.

Materials and Methods: We performed a search in PubMed and Dovepress databases by using the key words “panic disorder” and “orexin antagonists”. Systematic reviews as well as preclinical and clinical studies were included.

Results: In animal studies, three OXR1 antagonists demonstrated an ability to attenuate anxiety-like behavior, assessed by a social interaction test, and cardiovascular responses in two different panic provocation models on rats. The experimental compounds did not present significant sedative side effects. In several clinical studies, two OXR1 antagonists showed improvement of panic responses in a CO₂-inhalation challenge in healthy volunteers. The compounds demonstrated good safety profile with few reports of adverse effects, mainly somnolence and headache.

Conclusion: The preclinical and clinical studies indicate that OXR1 antagonists are promising novel-mechanism-based anti-panic compounds with good efficacy, tolerability and short-term safety. However, further research is needed for confirming their clinical usefulness in patients with panic disorder.

Key words: panic disorder, orexin-1 receptor antagonists, animal studies, clinical studies

Introduction

Panic disorder is a mental and behavioral disease whose prevalence has increased recently. It is one of the most common anxiety disorders which are a leading cause of disability, especially in young adults. The lifetime prevalence of panic disorder in the general population ranges between 2.1 – 4.7%. Women are twice as likely to be affected as men (1). The disorder often begins in the late teens or early adulthood. Typically, it progresses chronically and is therefore associated with economic burden and impairment of well-being and lifestyle of the affected subjects. The quality of life is dramatically reduced as a result of the main feature of the disorder – the panic attack. Prior to the attack there might have not been any triggers present. The attacks are usually unexpected with rapidly developing symptoms. Panic attacks occur as often as several times per day or as infrequently as only a few attacks per year. The main symptom of the panic attack is a sudden wave of fear or a sense of losing control. The mental symptoms are often accompanied by physical symptoms which differ from person to person. Most attacks though include cardiorespiratory responses, such as racing heartbeat, increased blood pressure, accelerated and difficult breathing, chest tightness, and others. Altogether, the anticipatory anxiety about having an attack and dysfunctional changes in behavior lead to agoraphobia in about 60% of individuals (2).

There is no complete understanding about what lies behind panic attacks. Etiologically it may be provoked by genetic factors, traumatic or stressful life experiences, and hormonal imbalance. There are different neurochemical hypotheses that have been proposed to explain the underlying

mechanisms of panic attacks development. The specific brain regions involved in the clinical manifestations of the attacks are the limbic and frontal regions (3). It is suggested that panic disorder is associated to deficiency of serotonergic inhibition and endogenous opioid system in the dorsal periaqueductal grey matter (4). The disruption of GABAergic inhibition in dorsal periaqueductal grey matter and other panic-generating CNS sites such as the dorsomedial/perifornical hypothalamus and amygdala leads to panic-like behavior and increased cardiorespiratory responses (5). Many other neurotransmitters, neurotrophins and neuromodulators appear to be involved in the pathogenesis, incl. norepinephrine, glutamate, adenosine and neuropeptides such as orexins.

Currently the limitation on the exact pathophysiology on how panic attacks occur makes panic disorder hard to treat. Treatment of panic disorder begins with cognitive behavioral therapy along with pharmacotherapy. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and serotonin-norepinephrine inhibitors (SNRIs) are considered to be first-line treatment as effective drugs with favourable toxicological profiles. The second-line treatment includes benzodiazepines (BDZs) and tricyclic antidepressants (TCAs) (6). Although the treatment usually improves the clinical manifestations of the disorder, around 20-40% of patients do not achieve full remission. In addition, the percent of patients that bounce back to their original state of fear and other panic related symptoms is more than half (6). Furthermore, the current guideline therapies also have drawbacks in their pharmacokinetics and pharmacodynamics. SSRIs have a delayed onset of action and could cause sedation, headaches, gastrointestinal disturbances, possible rise in anxiety at the beginning of treatment, weight gain. A possibility of sexual dysfunction is a longer lasting side effect that worries patients. TCAs could lead to weight gain, orthostatic hypotension and common anticholinergic effects. BDZs have fast action and provide rapid short-term relief of symptoms. However, their use is associated with multiple side effects, incl. sedation, fatigue, ataxia, cognitive and psycho-motor impairment and concerns regarding abuse and dependence (7).

Overall, a new, fast-acting, more effective and safer treatment is needed. Research groups seek for novel mechanism-based anti-panic therapeutics and orexin 1 receptor (OXR1) antagonists have been proposed as promising future drugs.

Aim

The present research aimed to review the available preclinical and clinical studies on the role of OXR1 antagonists in the therapy of panic disorder.

Materials and Methods

We performed a search in PubMed and Dovepress databases by using the key words “panic disorder” and “orexin antagonists”. Systematic reviews, preclinical studies that used valid cross-species models of panic symptoms and phase one clinical studies were included. Only articles with full text availability were reviewed.

Results

Orexins and panic disorder

Orexin neuropeptide system was discovered in 1998 when different research groups simultaneously identified two novel neuropeptides released by neurons whose cell bodies were localized within and around the lateral and posterior hypothalamus. It was found that the fibers of these neurons project to various brain regions, such as locus coeruleus, dorsal raphe nucleus, central amygdala, periaqueductal grey, and others (8-10). There are two active orexins, orexin A and orexin B, that are endogenous ligands of two G protein-coupled receptors termed orexin 1 receptor (OXR1) and orexin 2 receptor (OXR2). Orexin A binds to and activates both OXR1 and OXR2, whereas orexin B acts mainly on OXR2 (9). It has been suggested that orexins act as modulators of various autonomic, physical and behavioral functions and regulate the blood pressure, body temperature, sleep-waking cycle, arousal, vigilance, feeding behavior, and emotions (8-10). The localization of orexin neurons and brain areas reached by their projections indicate that orexins might play a role in acute and pathological anxiety states.

Several experimental studies have demonstrated the relation between orexins, orexin receptors and anxiety-like behavior. The intracerebroventricular injection of orexin A in experimental animals induced an anxiogenic effect. Orexin increased time spent in the dark compartment in the light-dark test and time spent on the closed arms in the elevated plus-maze test in mice and rats, respectively. The locomotor activity of the animals was not affected thus excluding a sedative or activity-inducing effect of orexin A (11). Other studies reported that intracerebroventricular administration of orexins resulted in activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympathetic responses (12, 13). In animal models of panic disorder, using intravenous infusion of sodium lactate or inhalation of carbon dioxide to induce panic-like symptoms, the panicogenic stimuli increased the activity of orexin neurons (14, 15). Orexin receptors are colocalized in many brain regions. However, OXR2 are more dominant in wake-promoting systems, and OXR1 are expressed mainly in regions involved in anxiety, fear and panic, such as locus coeruleus and amygdala, making them potential candidates for new anti-panic drug targets (16).

The pathogenetic role of orexins in panic disorder, suggested by the above-mentioned experimental research, was validated clinically in a study on 53 medication-free subjects with suicidal behavior. Cerebrospinal fluid samples were collected and the presence of symptoms of panic anxiety was assessed. The levels of orexins in the samples of the subjects with panic anxiety were increased compared to these of the subjects without panic symptoms (14).

Orexin receptor antagonists

Currently several orexin receptor antagonists are approved for treatment of primary insomnia. The drugs are dual OXR1 and OXR2 antagonists (DORAs) that increase the REM and NREM sleep duration compared to placebo and reduce the REM latency. Generally, they appear to affect minimally the sleep architecture in insomnia patients by favoring slightly REM over slow wave sleep/NREM sleep (17, 18). Data also show that suvorexant decreases the levels of cortisol and norepinephrine in psychiatric patients with insomnia (19). Adverse effects such as next-morning somnolence, muscle weakness, weird dreams, sleep walking, sleep paralysis, worsening of depressive symptoms and suicidal thoughts have been reported (18). It is believed that selective OXR2 antagonists would demonstrate some advantages over DORAs for treatment of insomnia and these are currently being investigated.

Preclinical studies on selective OXR1 antagonists in models of panic-like behavior

In most preclinical studies, the stimulus inducing panic-like behavior is an inhalation of carbon dioxide (CO₂) enriched air. Exposure to 20% CO₂, evokes a panic-like escape behavior in mice and increases cortisol level (20). Moreover, inhalation of CO₂ enriched air is a well-established method for induction of panic symptoms in healthy volunteers. Therefore, CO₂ exposure can serve for a translational cross-species experimental model for induction of panic symptoms (21). Hypercapnia is a suffocation signal and therefore induces not only feelings of fear and anxiety, but also cardiorespiratory responses in experimental animals and healthy volunteers. In animal models, low concentrations of CO₂ (7%) in the inhaled air cause a compensatory increase of respiratory rate to reduce hypercapnia without inducing other components of a 'panic-like' response. However, CO₂ in a greater than 10% concentration elicits additional components of panic-associated responses as evidenced by increase in sympathetic activity and blood pressure, and mobilization of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. CO₂ crosses the blood-brain barrier readily and directly interacts with specialized chemosensory neurons in the medulla. It seems that orexin neurons also display sensitivity to CO₂ concentration and are therefore activated by inhalation of 20% CO₂ (15).

In order to identify which orexin receptor plays a salient role in the control of panic related behavior, Johnson et al. performed a study by using three different antagonists of orexin receptors: a dual antagonist of OXR1 and OXR2 (DORA, a close structural analogue of suvorexant), a selective OXR1 antagonist (SORA1, compound 56), and a selective OXR2 antagonist (SORA2, JnJ10397049). The authors utilized the 20% CO₂ inhalation model to evoke panic behavior in rats and used the benzodiazepine lorazepam as an established panicolytic agent. Open field test and Social interaction test were performed for assessment of locomotor activity and the level of anxiety. Mean arterial pressure and heart rate were measured for evaluation of cardiovascular responses. CO₂ inhalation

increased the locomotor activity, reduced the time of social interaction, elevated the blood pressure and decreased the heart rate of the experimental animals. Lorazepam alleviated the cardiovascular responses and increased the time of social interaction when used at low doses. However, it demonstrated its sedative action and reduced the locomotor activity of the animals. All of the tested orexin receptor antagonists crossed the blood-brain barrier and occupied the orexin receptors. SORA1 and SORA2 showed high selectivity in their receptor binding. DORA and SORA1, but not SORA2, attenuated the CO₂-induced reduction in social interaction behavior. The CO₂-induced cardiovascular responses were effectively prevented only by SORA1. None of the tested orexin receptor antagonists produced a sedative effect, as there were no significant changes in the locomotor activity. It is interesting that DORA did not produce a sedative action, as suvorexant and other similar compounds have been shown to promote sleep in various species and are approved for use in patients with insomnia. The results of the study suggest that orexins produce their anxiogenic properties by activating OXR1 and the substances that block these receptors may represent a novel method of treating anxiety disorders (16).

In another experimental study, Bonaventure et al. tested the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of another selective OXR1 antagonist (JNJ-54717793) in two rat models of panic attack provocation. The selectivity of the antagonist was tested *in vitro* by radioligand binding assays. The substance showed high affinity binding not only to rat, but also to human OXR1. Its binding selectivity at the human OXR1 compared to the human OXR2 was substantial (~50 fold). In addition, the orexin antagonist did not demonstrate significant affinity to other receptors, ion channels or transporters. *In vitro* functional assays on human and rat cell cultures showed that the high affinity OXR1 binding of the substance was reflected in potent antagonistic action and the activation of the receptors by orexin A was prevented. When administered orally in rats, the tested antagonist showed sufficient oral bioavailability and brain penetration. The antagonist affected minimally the spontaneous sleep in rats – NREM sleep latency and duration were not altered and REM sleep latency was slightly but significantly reduced without a significant impact on REM sleep duration. To test the anxiolytic properties of the experimental substance, the authors utilized two panic provocation models – CO₂ inhalation and sodium lactate infusion. In both models, the OXR1 antagonist attenuated the anxiety behavior with no apparent sedative effects, as assessed by Social interaction test and Open field test. The cardiovascular responses induced by CO₂ inhalation (increase of arterial pressure and bradycardia) were also alleviated. In sodium lactate induced panic provocation model, the antagonist attenuated the pressor response but did not affect the sodium lactate-induced tachycardia (22).

The efficacy of OXR1 antagonists as anxiolytic drugs in panic disorder was further studied by the same research group who tested the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of another SORA1, the substance JNJ-61393215. The design and the results of the experimental study was similar to the above described. The tested substance demonstrated high affinity to OXR1 and potent antagonistic action without showing a significant affinity to other receptors, transporters and ion channels. When administered orally, the antagonist had sufficient bioavailability and crossed the blood-brain barrier. The sleep parameters in rats were affected minimally by the treatment – there was no alteration in either NREM or REM sleep duration and a significant decrease in the latency of both NREM and REM sleep. In this study, the panicolytic properties of the experimental substance were tested only in a CO₂ inhalation panic provocation model. SORA1 blocked the CO₂-induced reduction in the time of social interaction without affecting rat locomotor activity and attenuated bradycardia. The pressor responses were not alleviated by the treatment (23).

Clinical studies on selective OXR1 antagonists as anti-panic agents

The effects of the selective OXR1 antagonist JNJ-61393215 were studied by Salvatore et al. not only in experimental animals, but also in humans. The authors performed a single-ascending dose and a multiple-ascending dose study in healthy human volunteers in order to assess the pharmacokinetic profile and the safety and tolerability of the tested substance. The studies were designed as randomized, double-blind, placebo-controlled trials. In the single-ascending dose study, the participants, healthy male volunteers, were divided in 8 cohorts, and each cohort received orally a

single dose of the experimental substance ranging from 1 to 90 mg. The mean values of main pharmacokinetic parameters increased dose-proportionally with increasing dose up to 30 mg. The main reported side effects were headache and somnolence, but the adverse events did not show severity or diversity compared to the placebo group even at the highest tested dose. The multiple-ascending dose study was performed in 2 parts. In part 1 the participants were randomized in 4 cohorts that received different doses of the tested substance and pharmacokinetic parameters C_{max} and AUC_{24} were determined at the 1st and 7th day of the administration. The values of the pharmacokinetic parameters increased with increasing doses. Overall, the mean values for the dose-normalized parameters slightly decreased with increasing doses and the increase of the parameters was less than dose-proportional. The side effects reported were similar to those observed in the single-ascending dose study, mainly headache and somnolence. They were mild in severity and their frequency was the same as that in placebo-treated participants. There were no changes in clinical laboratory parameters, and no abnormalities were observed during physical examination. Part 2 of the study aimed to assess the panicolytic activity of the orexin antagonist. Participants were randomized in 4 groups: 2 of the groups received the tested antagonist at different doses, 1 group received alprazolam as an established anti-panic agent and 1 group received placebo. The participants received the treatment for 6 days and then underwent a 35% CO₂ double-inhalation challenge for induction of panic-like symptoms. The symptoms of fear were measured immediately after CO₂ inhalation by using a standard method the clinical evaluation of panic attacks. The high dosed orexin antagonist significantly reduced the fear symptoms and the anxiolytic effect resembled that of alprazolam. The low dose of the substance produced a slight and nonsignificant anxiolytic effect. Neither the orexin antagonist, nor the benzodiazepine produced significant effects on blood pressure and heart rate in this study (23).

Another selective OXR1 antagonist, ACT-539313, was studied by Kaufmann et al. The substance is an orally active, reversible, selective OXR1 antagonist that readily crosses the blood-brain barrier and shows antagonism at the human OXR1 in cell cultures. The compound was tested in a double-blind, placebo-controlled, single-ascending dose study aiming to assess its pharmacokinetic properties, safety and tolerability in human volunteers. The participants were healthy male subjects that were divided in 5 groups receiving a different dose of the compound (from 10 mg up to 400 mg). In fasted conditions, the tested antagonist was rapidly absorbed and cleared from plasma with a mean terminal half-life of 3.3–5.7 h across dose levels. The increase in AUC was dose-proportional, whereas C_{max} increased dose-proportionally up to 30 mg and less than proportionally thereafter. At all dose levels, more than 99% of the compound was bound to plasma proteins. In the presence of food, C_{max} increased while AUC remained unchanged. The absorption was slightly delayed and the elimination rate was slightly increased. Similarly to the above-described clinical studies, the reported adverse events were somnolence and headache. They were transient and of mild or moderate intensity. There were no changes in vital signs and clinical laboratory parameters. Moreover, the compound did not produce relevant effects on mood, calmness, drowsiness, subjective internal and external perception (24).

Kaufmann et al. continued their research on the selective OXR1 antagonist ACT-539313 by performing two double-blind, placebo-controlled, randomized, multiple-dose studies for assessment of pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of the compound. This was the first clinical trial on selective OXR1 antagonists that included females as participants. In study 1 the orexin antagonist was administered in ascending doses to 3 groups of volunteers. The lower doses of the compound were given to male subjects for 3.5 days and the highest tested dose was administered for 6.5 days to both males and females. The orexin antagonist was taken orally twice daily under fed conditions. The treatment duration of the last group was longer for assessment of the effect on CYP3A4 activity. The determined pharmacokinetic parameters were similar to those reported in the previous study with rapid absorption and a half-life of 3.8–6.5 h that increased with the dose. No relevant differences in the pharmacokinetic parameters were observed between male and female subjects. The compound slightly reduced the activity of CYP3A4. The reduction was more pronounced in female subjects. Study 2 aimed to assess the panicolytic properties of the compound

after a CO₂ double inhalation challenge for induction of panic symptoms. Male and female subjects participated and received either 200 mg of the compound or placebo for 2.5 days followed by a CO₂ challenge. The pharmacokinetic parameters determined in study 2 were similar to those of study 1 of the same dose group. CO₂ inhalation increased the level of cortisol and ACTH in the placebo-treated group. The orexin antagonist prevented the elevation of cortisol level. The compound produced a panicolytic effect in the subjects as assessed by the clinical scores used for evaluation of the panic symptoms. Female subjects treated with the compound presented trends for lower values of the clinical scores. In both studies, no severe adverse effects occurred. The main side effects reported were headache and somnolence. The compound did not affect the vital signs, ECG recordings, clinical laboratory parameters, body weight, body temperature and physical examination (25).

Conclusion

In summary, experimental studies indicate that inhalation of CO₂ enriched air induces panic-like symptoms through activation of orexin neurons and orexins produce their anxiogenic effects via orexin 1 receptors. The preclinical and clinical studies on selective orexin 1 receptor antagonists suggest that these substances are promising future anti-panic drugs. They demonstrate good pharmacokinetic properties with sufficient oral bioavailability and blood-brain barrier penetration. They reduce the symptoms of anxiety-like behavior without causing sedation and severe side effects in panic provocation models in experimental animals and healthy volunteers. Selective OX₁R antagonists show some advantages compared to the established drugs used in the pharmacotherapy of panic disorder because of their rapid onset of action and lack of sedation. However, further research is needed for confirming their clinical usefulness in patients with panic disorder.

References

1. Kim YK. Panic Disorder: Current Research and Management Approaches. *Psychiatry Investig.* 2019;16(1):1-3. doi: 10.30773/pi.2019.01.08.
2. Breier A, Charney DS, Heninger GR. Agoraphobia with panic attacks. Development, diagnostic stability, and course of illness. *Arch Gen Psychiatry.* 1986;43(11):1029-36. doi: 10.1001/archpsyc.1986.01800110015003.
3. Cackovic C, Nazir S, Marwaha R. Panic Disorder. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430973/>
4. G Frederico. Translational approach to the pathophysiology of panic disorder: Focus on serotonin and endogenous opioids. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2017; 76:48-55
5. Shekhar A, Sajdyk TJ, Gehlert DR, Rainnie DG. The amygdala, panic disorder, and cardiovascular responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 985:308-25. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07090.x
6. Perna G, Caldirola D. Management of Treatment-Resistant Panic Disorder. *Curr Treat Options Psychiatry.* 2017;4(4):371-386. doi: 10.1007/s40501-017-0128-7.
7. Bennett JA, Moioffer M, Stanton SP, Dwight M, Keck PE Jr. A risk-benefit assessment of pharmacological treatments for panic disorder. *Drug Saf.* 1998;18(6):419-30. doi: 10.2165/00002018-199818060-00003.
8. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(1):322-7. doi: 10.1073/pnas.95.1.322.
9. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell.* 1998;92(4):573-85. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80949-6.
10. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci.* 1998;18(23):9996-10015. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-23-09996.1998.

11. Suzuki M, Beuckmann CT, Shikata K, Ogura H, Sawai T. Orexin-A (hypocretin-1) is possibly involved in generation of anxiety-like behavior. *Brain Res.* 2005;1044(1):116-21. doi: 10.1016/j.brainres.2005.03.002.
12. Samson WK, Taylor MM, Follwell M, Ferguson AV. Orexin actions in hypothalamic paraventricular nucleus: physiological consequences and cellular correlates. *Regul Pept.* 2002;104:97–103. doi: 10.1016/s0167-0115(01)00353-6
13. Shirasaka T, Nakazato M, Takasaki M, Matsukura S, Kannan H. Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am. J. Physiol.* 1999; 46: 1780-5; doi: 10.1152/ajpregu.1999.277.6.r1780
14. Johnson PL, Truitt W, Fitz SD, Minick PE, Dietrich A, Sanghani S, Träskman-Bendz L, Goddard AW, Brundin L, Shekhar A. A key role for orexin in panic anxiety. *Nat Med.* 2010; 16(1):111-5. doi: 10.1038/nm.2075.
15. Johnson PL, Samuels BC, Fitz SD, Lightman SL, Lowry CA, Shekhar A. Activation of the orexin 1 receptor is a critical component of CO₂-mediated anxiety and hypertension but not bradycardia. *Neuropsychopharmacology.* 2012;37(8):1911-22. doi: 10.1038/npp.2012.38.
16. Johnson PL, Federici LM, Fitz SD, Renger JJ, Shireman B, Winrow CJ, Bonaventure P, Shekhar A. Orexin 1 and 2 receptor involvement in CO₂-induced panic-associated behavior and autonomic responses. *Depress Anxiety.* 2015; 32(9):671-83. doi: 10.1002/da.22403.
17. Snyder E, Ma J, Svetnik V, Connor KM, Lines C, Michelson D, Herring WJ. Effects of suvorexant on sleep architecture and power spectral profile in patients with insomnia: analysis of pooled phase 3 data. *Sleep Med.* 2016; 19:93-100. doi: 10.1016/j.sleep.2015.10.007.
18. Jacobson LH, Callander GE, Hoyer D. Suvorexant for the treatment of insomnia. *Expert Review of Clinical Pharmacology* 2014; 7(6), 711–730. doi: 10.1586/17512433.2014.966813
19. Nakamura M, Nagamine T. Neuroendocrine, Autonomic, and Metabolic Responses to an Orexin Antagonist, Suvorexant, in Psychiatric Patients with Insomnia. *Innov Clin Neurosci.* 2017;14(3-4):30-37.
20. Spiacci A Jr, Vilela-Costa HH, Sant'Ana AB, Fernandes GG, Frias AT, da Silva GSF, Antunes-Rodrigues J, Zangrossi H Jr. Panic-like escape response elicited in mice by exposure to CO₂, but not hypoxia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018; 81:178-186. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.10.018.
21. Leibold NK, van den Hove DL, Viechtbauer W, Buchanan GF, Goossens L, Lange I, Knuts I, Lesch KP, Steinbusch HW, Schruers KR. CO₂ exposure as translational cross-species experimental model for panic. *Transl Psychiatry.* 2016; 6(9):e885. doi: 10.1038/tp.2016.162.
22. Bonaventure P, Dugovic C, Shireman B, Preville C, Yun S, Lord B, Nepomuceno D, Wennerholm M, Lovenberg T, Carruthers N, Fitz SD, Shekhar A, Johnson PL. Evaluation of JNJ-54717793 a Novel Brain Penetrant Selective Orexin 1 Receptor Antagonist in Two Rat Models of Panic Attack Provocation. *Front Pharmacol.* 2017; 8:357. doi: 10.3389/fphar.2017.00357.
23. Salvadore G, Bonaventure P, Shekhar A, Johnson PL, Lord B, Shireman BT, Leibold TP, Nepomuceno D, Dugovic C, Brooks S, Zuiker R, Bleyes C, Tatikola K, Remmerie B, Jacobs GE, Schruers K, Moyer J, Nash A, Van Nueten LGM, Drevets WC. Translational evaluation of novel selective orexin-1 receptor antagonist JNJ-61393215 in an experimental model for panic in rodents and humans. *Transl Psychiatry.* 2020;10(1):308. doi: 10.1038/s41398-020-00937-9.
24. Kaufmann P, Ort M, Golor G, Kornberger R, Dingemans J. First-in-human study with ACT-539313, a novel selective orexin-1 receptor antagonist. *Br J Clin Pharmacol.* 2020; 86(7):1377-1386. doi: 10.1111/bcp.14251.
25. Kaufmann P, Ort M, Golor G, Kornberger R, Dingemans J. Multiple-dose clinical pharmacology of the selective orexin-1 receptor antagonist ACT-539313. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2021; 108: 110166 doi: 10.1016/j.pnpbp.2020.110166

A CLINICAL CASE OF RESISTANT HYPERGLYCEMIA AND LIVER INJURY IN AN ELDERLY PATIENT WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Evgeniya Tsoleva¹, Boris Dinkov¹, Plamena Panayotova¹, Genka Krasteva¹, Galya Stavreva¹, Antonio Antonov²

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Medical University – Pleven

²Department of Internal Medicine, Medical University – Pleven, Clinic of Hematology, St. Marina UMBAL, Pleven

ABSTRACT

L-asparaginase is part of highly effective chemotherapy for the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children. In recent years it has been included in modern chemotherapy protocols in adults. It realizes a selective action on the lymphoblastic population by blocking malignant protein synthesis and cell proliferation.

L-asparaginase is associated with numerous adverse drug reactions (ADRs). Significant are rapid-type hypersensitivity, hepatotoxicity, pancreatitis, hypercoagulation with pathological thromboses, and bone marrow suppression. Their incidence is significantly higher in adults compared to childhood, which limits the use and requires careful preliminary assessment.

Our clinical case presents resistant hyperglycemia and hepatotoxicity in an elderly patient with ALL. A 69-year-old man with B-ALL, high risk (CNS infiltration), was treated with induction chemotherapy according to protocol DFCI 91-01/A1.4. On day 8 of the regimen, PEG-L-asparaginase was administered. Hyperglycemia, discrete bilirubinemia, and elevated transaminases were recorded two days later. It followed a daily increase in glycemia with a lack of effect of insulin infusion, advancing liver toxicity with hyperbilirubinemia and impaired protein synthetic function against the background of severe drug-induced pancytopenia.

Despite the complex treatment of overcoming pancytopenia, on day 12, the patient was somnolent, with jaundice, persistent hyperglycemia, manifestations of respiratory failure, and death followed. The potential of polychemotherapy to induce multiorgan toxicity is well known. Hepatotoxicity and hyperglycemia are characteristic ADRs of L-asparaginase. Age, discrete pre-existing liver damage, and dosage regimen can be considered as risk factors.

The clinical case confirms the need for a preliminary systematic assessment of risk factors and an individual benefit-risk assessment in adults.

Keywords: L-asparaginase, acute lymphoblastic leukemia, hepatotoxicity, hyperglycemia

КЛИНИЧЕН СЛУЧАЙ НА РЕЗИСТЕНТНА ХИПЕРГЛИКЕМИЯ И ЧЕРНОДРОБНА УВРЕДА ПРИ ВЪЗРАСТЕН ПАЦИЕНТ С ОСТРА ЛИМФОБЛАСТНА ЛЕВКЕМИЯ

Евгения Цолова¹, Борис Динков¹, Пламена Панайотова¹, Генка Кръстева¹, Галя Ставрева¹, Антонио Антонов²

¹Катедра по Фармакология и токсикология, МУ- Плевен

²Катедра по Вътрешни болести, МУ- Плевен, Клиника по Хематология, УМБАЛ „Света Марина“, Плевен

Въведение

L-asparaginase е високоефективен медикамент, прилаган в съвременното лечение на ОЛЛ при деца и възрастни. ОЛЛ е най-честата левкемия в детска възраст, в чието лечение в комбинираната антитуморна терапия Л-аспарагиназа заема водещо място. В тази група 5 годишна обща преживяемост /OS/ след лечение се постига в до 90 %. В групата на възрастни пациенти успехът при лечение на ОЛЛ е значимо по-малък. Базирайки се на добрите резултати

при деца и участието на L-asparaginase като ключов медикамент в полихимиотерапевтичните схеми с висока резултатност, понастоящем терапията с L-asparaginase е част от модифицирани терапевтични протоколи за лечението на лимфобластни левкемии и при възрастни. [1-3] Антитуморната активност на L-asparaginase влиза в полезрението на учените през петдесетте години на 20 век, когато Kidd [4] описва потискане на туморния растеж при мишки с лимфом чрез серум на морско свинче, за който вече е известно, че съдържа ензима.

През 1978 FDA одобрява за употреба L-asparaginase от микробиален произход от E. coli, под името Elspar, като антинеопластичен агент за лечение на ОЛЛ. Тази лекарствена форма има значими недостатъци - кратък плазмен полуживот и бързо разграждане, налагащи чести апликации, изразени реакции на свръхчувствителност, вследствие бактериалният произход. Лекарствената форма пегелирана Л-аспаргиназа (PEG-l-asparaginase) е модифицирана форма на E. coli аспаргиназа свързана с полиетиленгликол (PEG), което значимо променя фармакокинетичните характеристики.[5-7] PEG-l-asparaginase е по-стабилна, с понижена имуногенност и удължен плазмен полуживот, което допринася за терапевтична ефективност.[8,9]

Обичайно L-asparaginase се прилага като част от полихимиотерапевтична схема с други антинеопластични агенти като vincristine, methotrexate, daunorubicin и prednisone. Днес е ключов медикамент в индукционните протоколи на терапия на ОЛЛ при деца и възрастни. Високата ефективност на лечението, обаче, се съпътства с редица нежелани ефекти, отчетливо с по-висока честота и тежест при възрастни пациенти.

Клинично значимите нежеланите лекарствени реакции са свръхчувствителност от бърз тип, хепатотоксичност, невротоксичност, хипергликемия, панкреатит, хиперкоагулация с патологични тромбози и костно-мозъчно потискане.[10,11] Токсичността може да се разглежда като последица на бактериалният произход, чужд за организма белтък (хиперсензитивност) и вследствие нарушен протеинов синтез на клетките (хипергликемия, хепатотоксичност, коагулационни нарушения). Възрастта и дозовият режим са основен рисков фактор в лекарствената токсичност.[12,13]

Клиничен случай

Представяме клиничен случай с рано настъпили нежелани лекарствени реакции - трудно овладяема хипергликемия и хепатотоксичност, при възрастен пациент с ОЛЛ, лекуван с Л-аспаргиназа (PEG-l-asparaginase), като част от индукционния протокол.

69 годишен мъж с Ph (-) pre- В ОЛЛ, висок риск /ЦНС инфилтрация/, е лекуван с индукционна химиотерапия по протокол DFCI 91-01/A1.4, модифициран за възрастни пациенти над 60 години, както следва: Dexamethasone 40 mg PO Дни 1-4, 9--2; Doxorubicin 30 mg/m² IV Дни 1, 2; Vincristine 2 mg IV Дни 1, 8, 15; Methotrexate 40 mg/m² IV Ден 3; при BCR-ABL1 отрицателни PEG asparaginase 3750 IU/s.c. Ден 8.

Пациентът е диагностициран по повод анемичен синдром, тромбоцитопения, спленомегалия и прогресираща астеноадинамия след имунофенотипизиране на патологичен клетъчен клон от Б-лимфоласти в периферна кръв и костно-мозъчен материал. Установена е лимфобластна инфилтрация на ЦНС при липсваща периферна, медиастинална и абдоминална лимфаденомегалия.

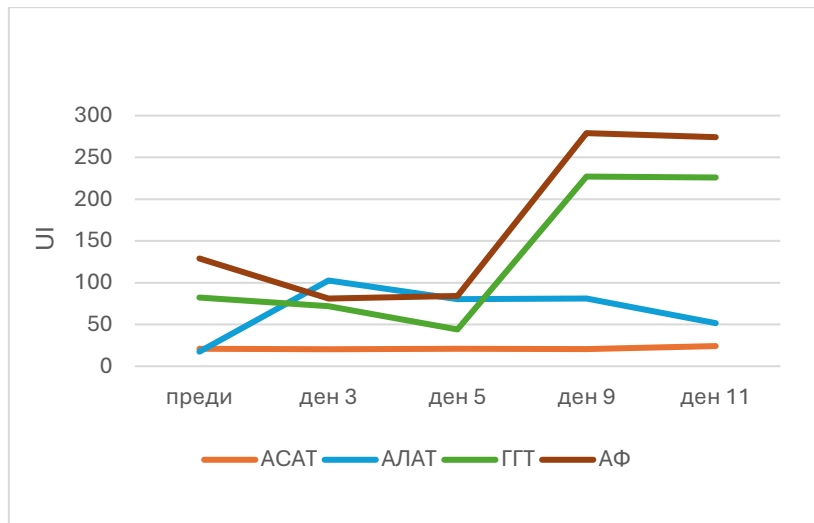
Минала анамнеза за оперативно лечение по повод чернодробен абсцес с последваща холецистектомия и ендоскопско протезиране на дуктус холедохус. Преживян масивен БТЕ с остро белодробно сърце с проведена фибринолиза и имплантиран кава филтър.

Преди стартиране на индукционна терапия липсват отклонения в биохимични маркери за холестаза и чернодробна дисфункция. Маркери за хепатит В и С са отрицателни.

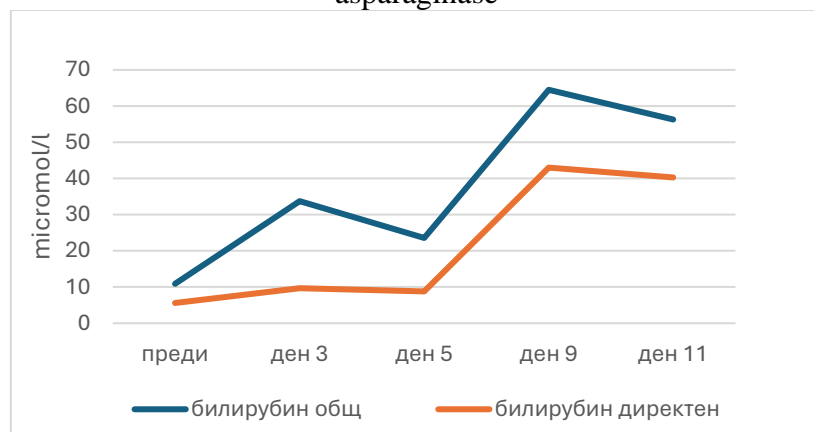
Стартирана е индукционна терапия по посочения протокол. Успоредно интратекално са приложени МТХ и Cytarabine, поради данни за инфилтрация на ЦНС.

На ден 8-ми, съобразно протокола, е приложена PEG L-Asparaginase. Два дни по-късно е регистрирана трансaminaземия, АЛАТ 145 UI (горна референтна граница 50UI); ГГТ 96 UI (горна референтна граница 55UI); билирубинемия 33,7 микромола/л (горна референтна граница

21 микромол/л) и хипергликемия – 15 ммол/л. В последвалите няколко дни се отчита прогресираща чернодробна токсичност, документирана чрез биохимични маркери (фиг.1 и 2).

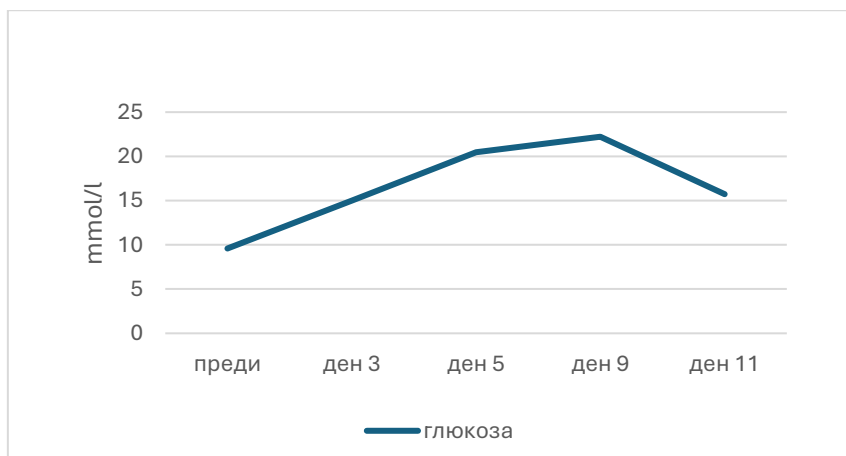


Фиг.1. Динамика на показатели за чернодробна функция и холестаза след апликация на L-asparaginase



Фиг. 2. Динамика на билирубинемия след апликация на L-asparaginase

Хипергликемията налага продължителна инсулинова инфузия с незадоволителен хипогликемичен ефект (фиг. 3).



Фиг. 3. Динамика на гликемия след апликация на L-asparaginase

Налице е ежедневен ръст на гликемията с краткотраен ефект от инсулинова инфузия, без данни за кетоацидоза, задържане на чернодробната токсичност с билирубинемия (билирубин – до 65 $\mu\text{mol/l}$ и нарушена протеинсинтетична функция с хипоабуминемия (албумин – до 22.3 г/л) и хипопротромбинемия (ПИ % 59.4%) на фона на тежка медикаментозно провокирана панцитопения.

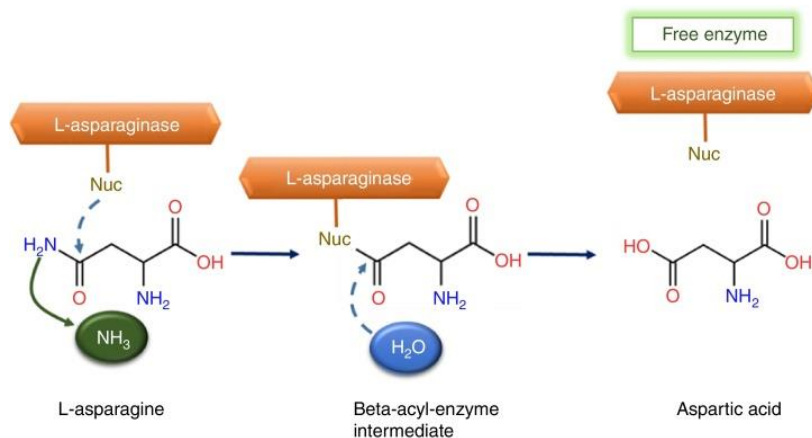
Въпреки комплексната терапия с овладяване на панцитопенията, на ден 11 пациентът е сомнолентен, иктеричен, с персистираща хипергликемия. Проведена е подпомагаща терапия с хепатопротектори, L-карнитин, антибиотична и антимикотична терапия, растежни фактори, водно-солева и албумин субституция, бързодействащ инсулин в инфузия.

На 20 ден от старта на химиотерапия и 12. ден от приложението на L-asparaginase. след бързо влошаване в общото състояние на пациента, с прояви на прогресираща чернодробна увреда с билирубинемия, хипопротеинемия, хипергликемия и дихателна недостатъчност е отчетен летален изход.

Дискусия

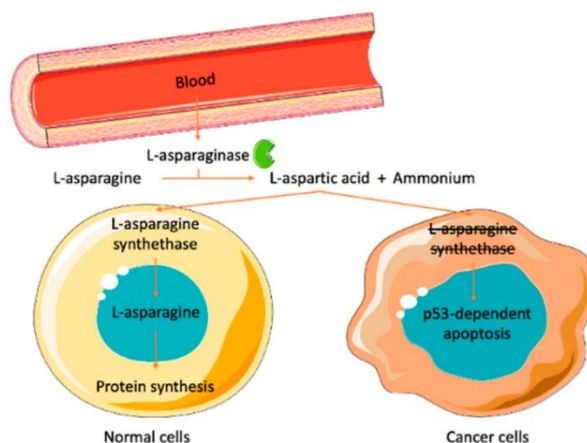
Основният механизъм на действие на L-аспарагиназа, като антитуморен агент, е разграждане на аминокиселината аспарагин, есенциална за растежа и деленето на левкемичните клетки. Аспарагина не е есенциална аминокиселина за макроорганизма, но е такава за левкемичните клетки, които се нуждаят от външни източници на доставка. За да осъществяват интензивен туморен растеж левкемичните клетки се нуждаят от големи количества аспарагин.[14,15]

Аспарагиназата е ензим, хидролизиращ аспарагин до аспартат и амоняк (фиг. 4)[16]. Приложението на L-аспарагиназа води до значителен спад в нивото на аспарагин в кръвта и в злокачествените клетки. Дефицитът на аспарагин блокира белтъчният синтез, следва фрагментация на ДНК, блок на клетъчния растеж и апоптоза (програмирана клетъчна смърт). Медикамента е фазово-специфичен с най-висока активност във G1 (пресинтетична фаза) от клетъчния цикъл, характеризираща се с растеж на клетката и интензивен протеинов синтез[17].



Фиг. 4. Хидролиза на аспарагин до аспартат чрез L-asparaginasa [16]

Ефектът на L-аспарагиназа в организма показва селективност върху левкемичните клетки, т.к. здравите клетки в организма могат да синтезират аспарагин сами чрез аспарагинсинтетаза и не са така засегнати от лечението с аспарагиназа, докато раковите клетки, с ниски нива на този ензим, значимо страдат от дефицита на аспарагин.(фиг.5) [18,19].



Фиг. 5. Механизъм на антитуморна активност [19]

При голяма част от пациентите, получили Л-аспарагиназа се установат отклонения в стойностите на чернодробните трансминази, понижени на серумният албумин и кръвосъсирващи фактори, дължащи се на потискане на чернодробната протеинова синтеза. Обичайно тези промени настъпват в рамките на 2-ра 3-та седмица от терапията и търпят обратно развитие до 2-4 седмици след края. Възможна е и значително по-тежка чернодробна увреда с иктер и чернодробна недостатъчност до кома. Като форма на директна медикаментозна хепатотоксичност чернодробната увреда прогресира бързо и е дозозависима. За нейната изява вероятно допринася и известна глутаминазна активност на Л-аспарагиназа, с изчерпване на глутамин, като афинитетът на ензима към глутамин е по-нисък от този към Л-аспарагин [20].

Хипергликемията е също свързан нежелан ефект, обясним с понижени на инсулиновата продукция от панкреаса. Инсулинът съдържа в структурните си вериги 3 молекули аспаргин, следователно ниските нива на аминокиселината биха могли да рефлектират в понижена продукция на инсулин [21]. Хипергликемия е докладвана в около 2,5 до 23% от педиатричната популация, лекувани с Л-аспарагиназа, и в до 76% при възрастни. Обичайно протича без кетоацидоза и е реверзibilна след продължителен период от време. В генезата на хипергликемията се обсъжда и директна увреда на бетаклетките на панкреаса, следствие медикаментозно индуциран панкреатит и инсулинова резистентност. Безспорна е и ролята на съпътстващата кортикостероидна терапия [22].

Клиничният случай демонстрира остро настъпила чернодробна токсичност с холестаза, както и трудно повлияваща се хипергликемия, след приложение на пегелирана L-asparaginase, при предшестваща чернодробна и билиарна патология у възрастен пациент, лекуван с полихимиотерапия за ОЛЛ.

Възможността на полихимиотерапията да предизвика полиорганна токсичност е добре известна. Хепатотоксичността и хипергликемията са характерни НЛР на L-asparaginase. Към настоящият момент липсва ясно формирана терапевтична стратегия за преодоляване на настъпилите холестази и чернодробни усложнения. Хипергликемията е терапевтично предизвикателство, за което допринася и съпътстващата кортикостероидна терапия. Като рискови фактори в описания клиничен случай могат да се приемат възрастта, дискретната предшестваща чернодробна увреда и дозовия режим.

Необходима е предварителна системна оценка на рискови фактори и придружаваща патология, както и индивидуална преценка на полза-риск при употреба на Л-аспарагиназа за възрастни пациенти, с оглед тежки нежелани лекарствени реакции с отражение върху ефективността на терапията и морбидността на пациентите.

Литература

1. Juluri, K. R., Siu, C. & Cassaday, R. D. Asparaginase in the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults: Current Evidence and Place in Therapy. *Blood Lymphat. Cancer Targets Ther.* 2022;12 55–79 (2022).
2. Egler, R. A., Ahuja, S. P. & Matloub, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2016; **7**: 62–71.
3. Poch Martell, M. et al. Treatment of elderly patients with acute lymphoblastic leukaemia using a paediatric-based protocol. *Br. J. Haematol.* 2013;163: 458–464.
4. Kidd, J. G. REGRESSION OF TRANSPLANTED LYMPHOMAS INDUCED IN VIVO BY MEANS OF NORMAL GUINEA PIG SERUM. *J. Exp. Med.* 1953;98: 583–606.
5. Fu, C. H., Sakamoto, K. M. PEG-asparaginase. *Expert Opin. Pharmacother.* 2007;8:1977–1984.
6. Asselin, B. L. *et al.* Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. *J. Clin. Oncol.* 1993;11:1780–1786.
7. Harris, J. M., Chess, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; 2: 214–221.
8. Dinndorf, P. A., Gootenberg, J., Cohen, M. H., Keegan, P., Pazdur, R. FDA Drug Approval Summary: Pegaspargase (Oncaspar®) for the First-Line Treatment of Children with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *The Oncologist* 2007;12: 991–998.
9. Heo, Y.-A., Y Syed, Y., Keam, S. J. Pegaspargase: A Review in Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Drugs.* 2019; 79: 767–777.
10. Keating, M. J., Holmes, R., Lerner, S., Ho, D. H. L-Asparaginase and PEG Asparaginase—Past, Present, and Future. *Leuk. Lymphoma* 1993; 10: 153–157.
11. Killander, D. et al. Hypersensitive reactions and antibody formation during L-asparaginase treatment of children and adults with acute leukemia. *Cancer* 1976; 37: 220–228.
12. Koprivnikar, J., McCloskey, J., Faderl, S. H. Safety, efficacy, and clinical utility of asparaginase in the treatment of adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *OncoTargets Ther.* 2017; 10: 1413–1422.
13. Oettgen, H. F. et al. Toxicity of E. coli L-asparaginase in man. *Cancer* 1970; 25: 253–278.
14. Narta, U. K., Kanwar, S. S., Azmi, W. Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2007; 61: 208–221.
15. Shrivastava, A. et al. Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2016; 100: 1–10.
16. Cachumba, J. J. M. et al. Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production. *Braz. J. Microbiol.* 2016; 47: 77–85.
17. Ueno, T. et al. Cell cycle arrest and apoptosis of leukemia cells induced by L-asparaginase. *Leukemia* 1997; 11: 1858–1861.
18. Van Den Berg, H. Asparaginase revisited. *Leuk. Lymphoma* 2011; 52: 168–178.
19. Nunes, J. C. F. et al. Recent Strategies and Applications for l-Asparaginase Confinement. *Molecules* 2020; 25: 5827.
20. Villa, P., Corada, M., Bartosek, I. l-Asparaginase effects on inhibition of protein synthesis and lowering of the glutamine content in cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Lett.* 1986; 32: 235–241.
21. Gailani, S., Nussbaum, A., Ohnuma, T. & Freeman, A. Diabetes in patients treated with asparaginase. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1971; 12: 487–490.
22. Ahmad MH, Shafiq I. Diabetic ketoacidosis following PEG-asparaginase therapy. *Endocrinology, Diabetes & Metabolism Case Reports.* 2018; 18(1).

COMPARATIVE STUDY OF ANTIOXIDANT EFFECTS OF RESVERATROL AND RESVERATROL-LOADED MICELLES IN SCOPOLAMINE-INDUCED DEMENTIA IN RATS

Elina Tsvetanova¹, Almira Georgieva¹, Miroslava Stefanova¹, Krasimira Tasheva²,
Lyubomira Radeva³, Krassimira Yoncheva³, Maria Lazarova¹

¹*Institute of Neurobiology, Bulgarian Academy of Science, Sofia, Bulgaria*

²*Institute of Plant Physiology and Genetics, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria*

³*Faculty of Pharmacy, Medical University of Sofia, Sofia, Bulgaria*

ABSTRACT

Plant extracts and different natural products have been effectively used in traditional medicine for over 2000 years. Resveratrol (RVT) is a plant-derived polyphenol which exhibits a wide range of beneficial effects – antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, neuroprotective etc. However, its poor bioavailability is a challenge for therapeutic application. Nanoparticles are promising systems capable to solve this limitation. The aim of our preliminary study was to investigate and compare antioxidant effects of pure resveratrol and resveratrol-loaded micelles (mRVT) in cortex of rats with scopolamine-induced dementia. Micelles were prepared from the biocompatible Pluronic P123 and Pluronic F127 copolymers. Male Wistar rats were divided into the following groups: 1) Controls; 2) Scopolamine (Sco); 3) Sco + RVT; 4) Sco + mRVT. Sco 2 mg/kg was applied intraperitoneally (i.p.) for 11 days, RVT (30% hydroethanolic solution), and mRVT (aqueous solution) in doses 10 mg/kg i.p. 1h before Sco. After verification of the model with behavioral tests the animals were decapitated, cortex dissected and prepared for spectrophotometrically measurement of main antioxidant parameters: levels of lipid peroxidation (LPO) and total glutathione (GSH), activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). The results showed that Sco induced oxidative stress in all studied markers. The pure RVT and mRVT significantly decreased the elevated from Sco LPO and SOD. However, mRVT demonstrated better restorative effect on the Sco-induced changes in GSH levels and CAT activity compared to the pure drug. As a conclusion, in our preliminary study we observed strong antioxidant potential of mRVT in Sco model of dementia that suggested its further exploration in neurodegenerative disorders.

Key words: resveratrol, micelles, antioxidants, oxidative stress, neurodegeneration.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder that is progressively increasing worldwide in the aging population, severely affecting both the quality and duration of life. These disorders are particularly associated with chronic oxidative stress, mitochondrial dysfunction, protein aggregation and accumulation, neuroinflammation, dysregulated autophagy and apoptosis, all of which contribute to selective neuronal cell death and cognitive deficits [1]. A wide range of genetic, lifestyle, and environmental factors contribute to the development of AD [1]. Effective treatment for Alzheimer's disease (AD) remains lacking, with traditional clinical interventions mainly focused on slowing disease progression using cholinesterase inhibitors and NMDA receptor antagonists.

Oxidative stress has been found to be one of the major pathways of cellular damage in both acute and chronic neurological diseases [2]. Endogenous/intracellular antioxidants, such as glutathione, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase eliminate free radicals and inhibit chain reactions, deactivate metal ions, reduce singlet oxygen and enhance antioxidant renewal. Exogenous antioxidants are widely used especially those derived from natural sources, and play an emerging role, even at low doses. In AD – effectively reduce the oxidative damages by interacting with free radicals and neutralize them, mitigate lipid peroxidation, decrease inflammation, modify signaling pathways, and maintain the intracellular oxidative balance [3]. The use of antioxidants to

prevent and treat various neurodegenerative pathologies is a valuable therapeutic strategy, but often led to failures due to the difficulties in crossing the blood–brain barrier.

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene, RVT) is one of the most extensively studied natural polyphenols, with high antioxidant capacity. First described by Takaoka in 1939, resveratrol was discovered in the roots of the white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). However, it is best known as the phytoalexin presented in red wine [4] and has since garnered significant scientific attention. The antioxidant properties of RVT influence several mechanisms - including radical scavenging, metal ion chelation, indirect induction of the cellular antioxidant system through the modulation of various antioxidant pathways, and the reduction of pro-inflammatory cytokines [5-7]. In addition to its role as an oxidative stress-balancing agent, RVT has also been reported to possess antitumor and anticancer properties, as well as cardioprotective, vasorelaxant, phytoestrogenic, blood sugar-lowering, anti-aging, and neuroprotective activities [8-13]. Furthermore, RVT's effectiveness in treating age-related neurological disorders, such as Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases, as well as brain ischemia and epilepsy, has also been reported [14]. However, the poor solubility, chemical instability, and rapid metabolism of RVT result in reduced bioavailability and worsen its pharmacokinetic properties - limitations that make its therapeutic application a significant challenge for the pharmaceutical industry.

One modern approach to overcoming these physicochemical limitations is the encapsulation of hydrophobic drugs like RVT in nano-based drug delivery systems.

Nanotechnology opens opportunities for development of innovative drug delivery systems that are capable to overcome the disadvantages of conventional drug products. Nanoparticles (NPs) are with a small size between 1 and 100 nm, differing in origin (organic or inorganic), shape and morphology. Nanoparticles can specifically deliver drugs to certain cells and tissues due to their adaptable characteristics [15, 16]. Owing to their intrinsic properties, they can encapsulate both hydrophilic and hydrophobic drug molecules. Furthermore, some nanoparticles were reported to overcome effectively the blood–brain barrier [17]. It could be concluded that nanoparticles loaded with antioxidants may represent a promising strategy to slow neurodegeneration and alleviate associated symptoms by modulation of reactive oxygen species levels. Thus, considering these properties nanoparticles appear as attractive drug delivery systems for AD treatment. The encapsulation of resveratrol in nanoparticles could bring to important benefits, e.g. increase of its absorption and bioavailability [18-21].

The purpose of this preliminary study was to investigate and compare antioxidant effects of pure resveratrol (hydroethanolic solution) and resveratrol-loaded micelles (mRVT, aqua solution) in the cortex of rats with scopolamine (Sco) induced dementia.

Materials and methods

Materials

Pluronic® F 127 (PEO₁₀₁PPO₅₆PEO₁₀₁) and Pluronic® P 123 (PEO₂₀PPO₇₀PEO₂₀) were obtained from BASF (Ludwigshafen, Germany). Scopolamine and resveratrol were provided from (Sigma-Aldrich Co. LLC, USA or Germany), as well as the other reagents, used in the experiments – potassium chloride, Folin reagent etc.

Formulation of RVT loaded micelles

Resveratrol loaded micelles were prepared via film hydration method at a ratio between the drug and the polymers 1:10 (wt./wt.). Briefly, resveratrol was added to a methanol solution of Pluronic F127 and P123 (ratio between the polymers 1:1 wt/wt). Thereafter, the solvent was evaporated at room temperature, the obtained film was redispersed in distilled water and the dispersion was filtered (0.2 µm). The filter was rinsed with 50 % ethanol and the concentration of non-loaded resveratrol in the rinsed fraction was determined UV- spectrophotometrically at 306 nm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A standard curve in the range 2–10 µg/mL ($r > 0.9996$) was used for calculating the concentration. The loading degree (LD) of micelles was determined applying the following equation:

$$LD = (\text{Total amount of drug} - \text{Non-loaded drug}) / \text{Volume of drug loaded micellar dispersion}$$

Animals

In this experimental work were used male Wistar rats (200-250g) provided from Erboj, Bulgaria. The animals were kept under standard laboratory conditions ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 12/12 h light/dark cycle), with food and water at libitum and 5 days habituation period before start of the experiments. The requirements of European Communities Council Directive (86/609/EEC) were taken into account in the following experimental protocol.

Experimental Design

The rats ($n=6$ in each group) were divided as follow:

1) Controls; 2) Scopolamine; (Sco) 3) Sco + RVT; 4) Sco + mRVT. The control group received intraperitoneal (i.p) injections of 0.9% NaCl (0.1 ml/ 10 g. bw). Sco in dose 2mg/kg was applied i.p. for 11 consecutive days. RVT (10 mg/kg i.p.) and mRVT (10 mg/kg i.p.) were injected 1h before Sco.

Scopolamine was dissolved in distilled water before each administration. For verification of the model the animals from all groups were subjected to behavioural tests 12 days after the first Sco treatment. One hour after the tests the animals were euthanized.

Tissue preparations

After the animals were decapitated, brains were dissected and quickly removed on ice and the cortex was separated. A 10%-homogenate in 0.15 M KCl-10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) was obtained by a Potter-Elvehjem glass homogenizer with a Teflon pestle. The homogenates were centrifuged for 10 min at 3000 rpm, and a post nuclear fraction was obtained. This preparation was used for quantitative measurement of the levels of total glutathione and lipid peroxidation. A part of the post nuclear homogenate was centrifuged for 20 min at 12,000 rpm (temperature control, between 0° and $+4^{\circ}\text{C}$). The resulting postmitochondrial supernatant was used for measuring the antioxidant enzyme activities.

Methods

Biochemical Analyzes

- ***Determination of protein content***

Protein content was measured by the method of Lowry et al. [22]. This method is more sensitive than others - 1 mole of Cu binds 7-8 amino acid residues, while in the biuret method only 4. A complex compound of copper with the aromatic amino acids tyrosine and tryptophan is formed. The reaction is carried out in an alkaline medium. The resulting complex gives blue coloration with a Folin reagent. The intensity of staining is proportional to the amount of protein in the sample at 700nm. Protein content was determined using a calibration curve obtained with bovine serum albumin - Pentex USA.

Oxidative stress biomarkers were measured spectrophotometrically using commercially available Kits and the manufacturer's working instructions were strictly followed.

- ***Lipid Peroxidation*** (MDA) Assay Kit MAK085,
- ***Total Glutathion*** Assay Kit CS0260;
- ***Superoxide dismutase*** Assay Kit-WST 19160;
- ***Catalase*** Assay Kit CAT100;
- ***Glutathione Peroxidase*** Cellular Activity Assay, Cat. № CGP 1;

Statistical analysis

Descriptive data statistics, the Shapiro–Wilks test of normality and One-Way ANOVA with Tukey post hoc test were calculated using the statistical program GraphPad Prism 8.0.1. In the text, all data are presented as the mean standard deviation (SD) and in the figures as the mean standard error of measurement (SEM).

Results

The obtained results showed that all examined oxidative stress markers were affected by scopolamine, and modulated by RVT and mRVT.

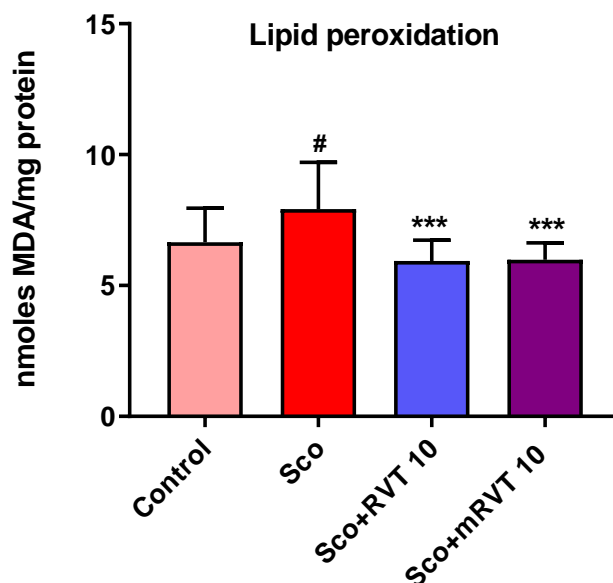


Fig.1. Effects of resveratrol and resveratrol-loaded micelles on levels of lipid peroxidation in rat's cortex in scopolamine-induced dementia. Data are expressed as the mean \pm SEM, # vs control and * vs scopolamine: significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Sco treatment raised MDA levels in comparison with a control group in a statistically significant manner ($p < 0.05$). The application of RVT 10 and mRVT 10 led to a decrease in MDA to values close to those of the controls.

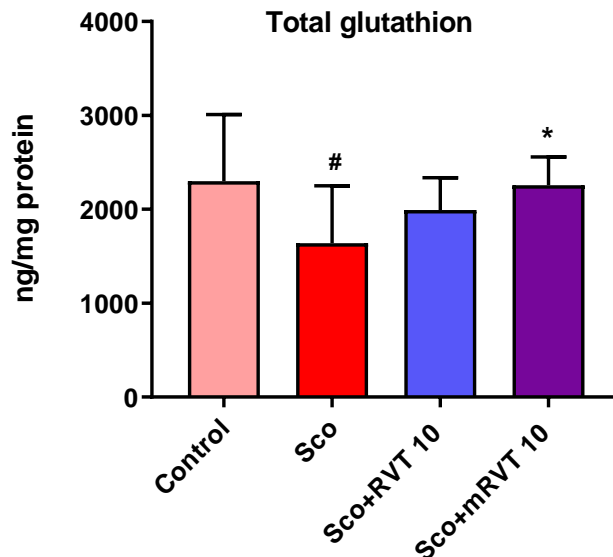


Fig.2. Effects of resveratrol and resveratrol-loaded micelles on levels of total glutathion in rat's cortex in scopolamine-induced dementia. Data are expressed as the mean \pm SEM, # vs control and * vs scopolamine: significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

The levels of glutathion in rats' cortex in the Sco group was statistically significant ($p < 0.05$) lower than that of the controls. From the tested substances, only mRVT10 restores the decreased glutathion levels.

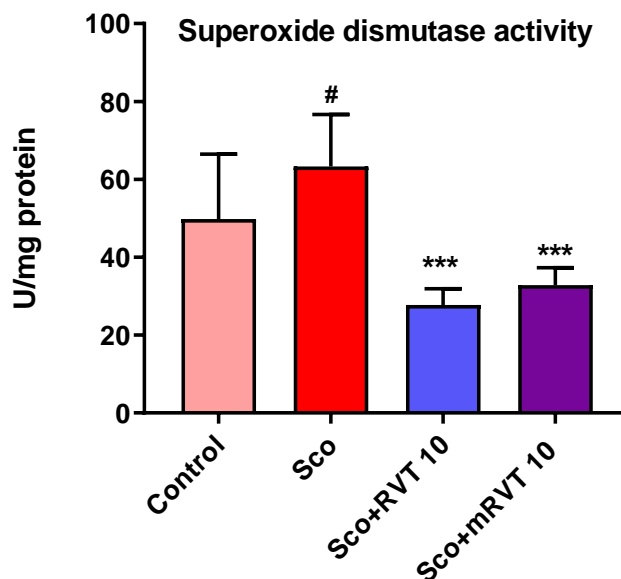


Fig.3. Effects of resveratrol and resveratrol-loaded micelles on superoxide dismutase activity in rat's cortex in scopolamine-induced dementia. Data are expressed as the mean \pm SEM, # vs control and * vs scopolamine: significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

The activity of superoxide dismutase in the rat cortex of the Sco group was higher than that of the controls ($p < 0.05$). Using RVT10 and mRVT10 lead to a significant decrease of scopolamine-induced SOD activity ($p < 0.001$), even lower than the controls.

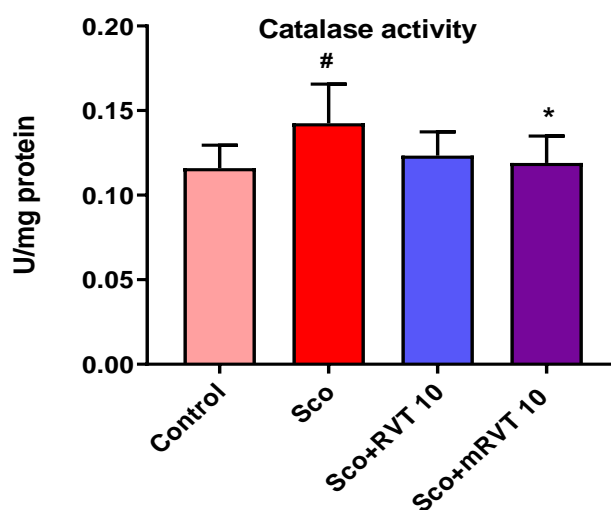


Fig.4. Effects of resveratrol and resveratrol-loaded micelles on catalase activity in rat's cortex in scopolamine-induced dementia. Data are expressed as the mean \pm SEM, # vs control and * vs scopolamine: significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Scopolamine elevated catalase activity and restoration from tested substances were observed, but only the application of mRVT10 showed statistically significant differences in comparison with that in the Sco group ($p < 0.05$).

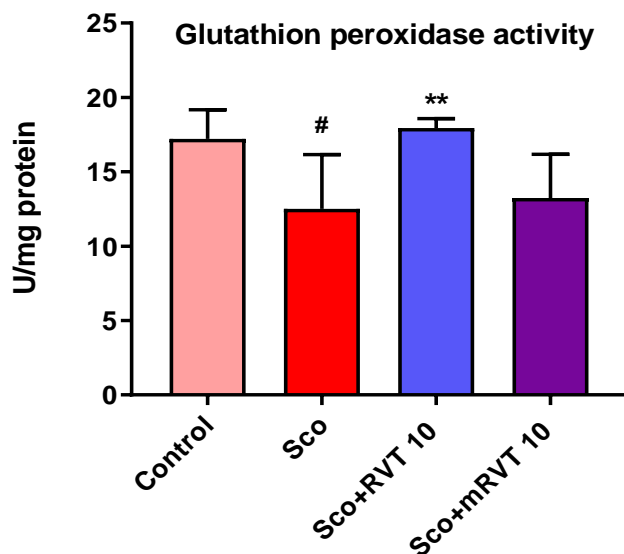


Fig.5. Effects of resveratrol and resveratrol-loaded micelles on glutathion peroxidase activity in rat's cortex in scopolamine-induced dementia. Data are expressed as the mean \pm SEM, # vs control and * vs scopolamine: significance: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

The activity of glutathion peroxidase in the Sco group was lower than that in the control group ($p < 0.05$). Unlike the other markers of oxidative stress, only the application of RVT10 raised the Sco-decreased glutathion peroxidase ($p < 0.01$) and restored enzyme activity to values close to that of the control group.

Discussion

In the present preliminary study, we aimed to investigate and compare antioxidant effects of pure resveratrol hydroethanolic solution and resveratrol-loaded polymeric micelles in aqueous solution, in the cortex of rats with scopolamine-induced dementia.

Scopolamine is a drug often used for inducing Alzheimer's type dementia in animal models, via generating oxidative stress through up-regulating the endogenous antioxidant system, and synaptic dysfunction, which impairs learning/memory [2, 23].

As a suitable natural agent, we focused on resveratrol, broadly documented and discussed in the literature as powerful antioxidant and multi-functional bioactive compound with comprehensively therapeutic application. RVT exhibits several properties like: ability for direct ROS (hydroxyl radical, hydrogen peroxide and peroxynitrite) neutralization [11]; promotion of glutathione synthesis, influences regulation of redox-homeostasis in general [24]. Furthermore, scientists reported that in the brain RVT contributed to maintaining the levels of antioxidant enzymes like GPx, glutathione-S-transferase (GST) and reductase (GR), SOD, as well as CAT [25]). In addition, RVT-based nanoparticles improved oxidative stress injuries after induced neurodegeneration, also displayed anti-inflammatory effect, mitochondrial dysfunction attenuation and A β (β -amyloid peptide) - clearance [26].

Due to its low bioavailability and solubility, RVT has limited permeation across the blood-brain barrier (BBB), which is considered as a one of the main obstacles to its therapeutic application. To address this, we encapsulate hydrophobic drug RVT in water-soluble nanomaterials. In this view, the improvement of water solubility of RVT by micellization may give excellent feedback of its efficacy.

In our study, we established that Sco induced oxidative stress in all studied markers whereas pure RVT (30% hydroethanolic solution) and mRVT (aqueous solution) treatment, applied at doses 10 mg/kg i.p, ameliorated these effects. mRVT keep biological activity of pure RVT according LPO levels and enzyme activity of SOD and CAT, but potentiated its recovery effect according total GSH content.

In conclusion, both tested substances predetermined Sco-affected oxidative stress parameters in the cortex, manifested similar antioxidant properties, minding the difference in the solubility (pure RVT10 was dissolved in hydroethanolic solution, whereas the micelles give an opportunity to apply an aqueous nanodispersion). Furthermore, mRVT10 exerted a little bit more pronounced antioxidant capacity than pure RVT10 – in four of the investigated five biomarkers were established effects. Thus, mRVT10 hydrophilic nature gave it a huge superiority over hydrophobic RVT10, contributing to inside look and marking current used methodology for future therapeutic application - might be a promising strategy for resveratrol delivery into the brain.

Acknowledgements: This work was supported by the Bulgarian National Science Fund, Grant number КП-06-H73/10-15.12.2023.

References

1. Hussain, R., Zubair, H., Pursell, S., Shahab, M. Neurodegenerative diseases: Regenerative mechanisms and novel therapeutic approaches. *Brain Sci.* 2018, 8,177.
2. Chen, X., Guo, C., Kong, J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.*, 7, 2012, № 5, 376-385.
3. Kamaljeet, S.S, Gupta, G.D., Khadga, R.A. Emerging role of antioxidants in Alzheimer's disease: Insight into physiological, pathological mechanisms and management, *Pharmaceutical Science Advances*, 2024, № 2, 100021.
4. Siemann, E.H., Creasy, L.L. Concentration Of The Phytoalexin Resveratrol InWine. *Am. J. Enol. Vitic.* 1992, № 43, 49–52.
5. Malhotra, A., Bath, S., Elbarbry, F. An organ system approach to explore the antioxidative, anti-inflammatory, and cytoprotective actions of resveratrol. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 2015, 803971.
6. Means, J.C., Gerdes, B.C., Koulen, P. Distinct mechanisms underlying resveratrol-mediated protection from types of cellular stress in C6 glioma cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, № 18, 1521.
7. Bellaver, B., Souza, D.G., Souza, D.O, Quincozes-Santos, A. Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats. *Toxicol In Vitro.* 2014, 28, 479–84.
8. Fan, P., Marston, A., Hay, A.E. Hostettmann, K. Rapid separation of three glucosylated resveratrol analogues from the invasive plant *Polygonum cuspidatum* by high-speed countercurrent chromatography. *J. Sep. Sci.* 2009, № 32, 2979–2984.
9. Marques, F.Z., Markus, M.A., Morris, B.J. Resveratrol: Cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2009, № 41, 2125–2128.
10. Bishayee, A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: From rodent studies to clinical trials. *Cancer Prev. Res.* 2009, № 2, 409-418.
11. Yan, F., Sun, X., Xu, C. Protective effects of resveratrol improve cardiovascular function in rats with diabetes. *Exp Ther Med.* 2018, № 15, 1728-1734.
12. Wahab, A., Gao, K., Jia, C, Zhang, F., Tian, G. Murtaza, G.; Chen, J. Significance of resveratrol in clinical management of chronic diseases. *Molecules*, 2017, № 22, 1329.
13. Zhou, Z.X., Mou, S.F., Chen, X.Q., Gong, L.L., Ge, W.S. Anti-inflammatory activity of resveratrol prevents inflammation by inhibiting NF- κ B in animal models of acute pharyngitis. *Mol. Med. Rep.* 2018, № 17, 1269-1274.
14. Pandita, D., Kumar, S., Poonia, N., Lather, V. Solid lipid nanoparticles enhance oral bioavailability of resveratrol, a natural polyphenol. *Food Res Int.* 2014, № 62, 1165-74.
15. Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, A., Danquah M.K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J Nanotechnol.* 2018, № 9,1050-1074.

16. Mitchell, M.J., Billingsley, M.M., Haley, R.M., Wechsler, M.E., Peppas, N.A., Langer, R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2021, № 20, 101-124.
17. Saraiva, C., Praça, C., Ferreira, R., Santos, T., Ferreira, L., Bernardino, L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release.* 2016, № 235, 34-47.
18. Neves, A.R., Queiroz, J.F., Reis, S. Brain-Targeted Delivery of Resveratrol Using Solid Lipid Nanoparticles Functionalized with Apolipoprotein E. *J. Nanobiotechnol.* 2016, № 14, 27.
19. Khatun, M., Choudhury, S., Liu, B., Lemmens, P., Pal, S.K., Mazumder, S. Resveratrol–ZnO Nanohybrid Enhanced Anti-Cancerous Effect in Ovarian Cancer Cells through ROS. *RSC Adv.* 2016, № 6, 105607-105617.
20. Bozorgi, A., Haghighi, Z., Khazaei, M.R., Bozorgi, M., Khazaei, M. The Anti-Cancer Effect of Chitosan/Resveratrol Polymeric Nanocomplex against Triple-Negative Breast Cancer; an in Vitro Assessment. *IET Nanobiotechnol.* 2023, № 17, 91-102.
21. Muller, A.G., Sarker, S.D., Fatokun, A.A., Hutcheon, G.A. Formulation of Resveratrol into PGA-Co-PDL Nanoparticles Increases Its Cytotoxic Potency against Lung Cancer Cells. *RPS Pharm. Pharmacol. Rep.* 2, 2023, № 1, rqac007.
22. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, № 193, 265-275.
23. Gul, S., Attaullah, S., Alsugoor, M.H., Bawazeer, S., Shah, S.A., Khan, S., Salahuddin, H.F., Ullah, M. Folicitin abrogates scopolamine induced hyperlipidemia and oxidative stress mediated neuronal synapse and memory dysfunction in mice, *Heliyon*, 15, 2023, № 96, e16930.
24. Moussa, C., Hebron, M., Huang, X, et al. Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer’s disease. *J. Neuroinflammation.* 14, 2017, № 1, 1.
25. de La Lastra, C.A., Villegas, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions.* 35, 2007, № 5, 1156-1160.
26. Palle, S., Neerati, P. Improved neuroprotective effect of resveratrol nanoparticles as evinced by abrogation of rotenone-induced behavioral deficits and oxidative and mitochondrial dysfunctions in rat model of Parkinson’s disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 391, 2018, № 4, 45-53.

RETROSPECTIVE STUDY ON THE DRUG UTILIZATION OF BIOSIMILAR MEDICINAL PRODUCTS CONTAINING MONOCLONAL ANTIBODIES IN BULGARIA

Emanuil Yordanov¹, Stefka Stoyanova¹, Nikolay Nachev¹, Iva Parvova², Irfan Irfan³

¹Faculty of Chemistry and Pharmacy, Sofia University “Saint Kliment Ohridski”, Bulgaria

²Clinic of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Medical University of Sofia, Bulgaria

³Clinic of Cardiology, University Hospital „Aleksandrovska“, 1 George Sofiiski blvd., Sofia, Bulgaria

ABSTRACT

The introduction of biologics has raised complex regulatory issues and pharmacoeconomic concerns due to the associated high costs of therapy compared to conventional drugs. As periods of "data exclusivity" expire, biosimilars are emerging on the market that are expected to lower costs and increase patient access to biologic treatments. **The aim** of the study is to analyze the use of BSMP containing monoclonal antibodies in Bulgaria. **Materials and methods.** We conducted a retrospective study of data from the public registers of the EMA, the National Council on Prices and Reimbursement of Medicinal Products and the NHIF in Bulgaria for the period 2015 - 2023. The results were processed using descriptive statistical methods. **Results and discussion.** At EU level, BSMPs granted marketing authorization are within 10 INNs. The positive drug list of Bulgaria includes 32 BSMPs with the same INNs. The total expenditure on BMPs and BSMPs for the period was BGN 1 005 923 870 of which the share of BSMPs was 13%. BSMPs are available, but despite falling in the lower price range, the reference medicinal products remain the preferred therapeutic choice. The reason could be the lack of national standards for interchangeability, the mistrust of prescribers to the so-called replacement therapies and aggressive drug promotion to medical professionals.

Keywords: Biosimilars, availability, affordability, drug utilization, monoclonal antibodies.

РЕТРОСПЕКТИВНО ПРОУЧВАНЕ НА ЛЕКАРСТВЕНАТА УПОТРЕБА НА БИОПОДОБНИ ЛЕКАРСТВЕНИ ПРОДУКТИ, СЪДЪРЖАЩИ МОНОКЛОНАЛНИ АНТИТЕЛА В БЪЛГАРИЯ

Емануил Йорданов¹, Стефка Стоянова¹, Николай Начев¹, Ива Първова², Ирфан Ирфан³

¹Факултет по химия и фармация, СУ “Св. Климент Охридски”, София, България

²Клиника по ревматология, Катедра по вътрешни болести, Медицински университет, София, България

³Клиника по кардиология, Университетска болница „Александровска“, бул. „Георги Софийски“ 1, София, България

Увод. Биоподобните лекарствени продукти са биологични продукти, които са много сходни с вече одобрени в ЕС референтни биологични лекарствени продукти. Биоподобните лекарствени продукти се одобряват съгласно същите стандарти за качество, безопасност и ефикасност, както всички разрешени за употреба референтни биологични лекарствени продукти в ЕС. Очаква се биоподобните лекарствени продукти да улеснят достъпа на пациентите до биологични терапии, предлагайки сходна безопасност и ефикасност на по-достъпна цена, благодарение на строгия регулаторен контрол и изискванията за доказано сходство с референтните биологични продукти [1-4].

Цел на проучването е да анализираме употребата на БПЛП, съдържащи моноклонални антитела в България.

Материали и методи. Дизайн на проучването – ретроспективно обсервационно проучване на данни от публичните регистри на ЕМА, Национален съвет по цени и реимбурсиране на лекарствените продукти и Националната здравно-осигурителна каса (НЗОК) в България за периода 2015 - 2023 г. От регистрите на ЕМА определихме броя и видовете БПЛП, съдържащи моноклонални антитела и разрешени за употреба в ЕС, респективно България, за цитирания период [5]. От публичните регистри на Национален съвет по цени и реимбурсиране на лекарствените продукти (НСЦРЛП) определихме кои БПЛП, съдържащи моноклонални антитела имат регистрирана цена в България и/или са включени Позитивния лекарствен списък [6]. От регистрите на НЗОК определихме разходите за лекарствени терапии с БПЛП, съдържащи моноклонални антитела и включени в системата за реимбурсиране от НЗОК [7]. Обработихме получените резултати чрез дескриптивни статистически методи.

Резултати и обсъждане. В съответствие със Закона за лекарствените продукти в хуманната медицина (ЗЛПХМ), на пазара могат да бъдат пускани лекарствени продукти само след като са получили разрешение за употреба по съответния ред и имат регистрация на цена [8]. Т.е. един лекарствен продукт може да бъде дефиниран като наличен само, ако е разрешен за употреба и има регистрирана цена. Същият лекарствен продукт се дефинира като достъпен, ако е наличен и е включен в системата за реимбурсиране от публичния фонд [9-11].

Таблица 1. Периоди на включване на БЛП и БПЛП в системата на Позитивния лекарствен списък в България и достъп до ефективно реимбурсиране

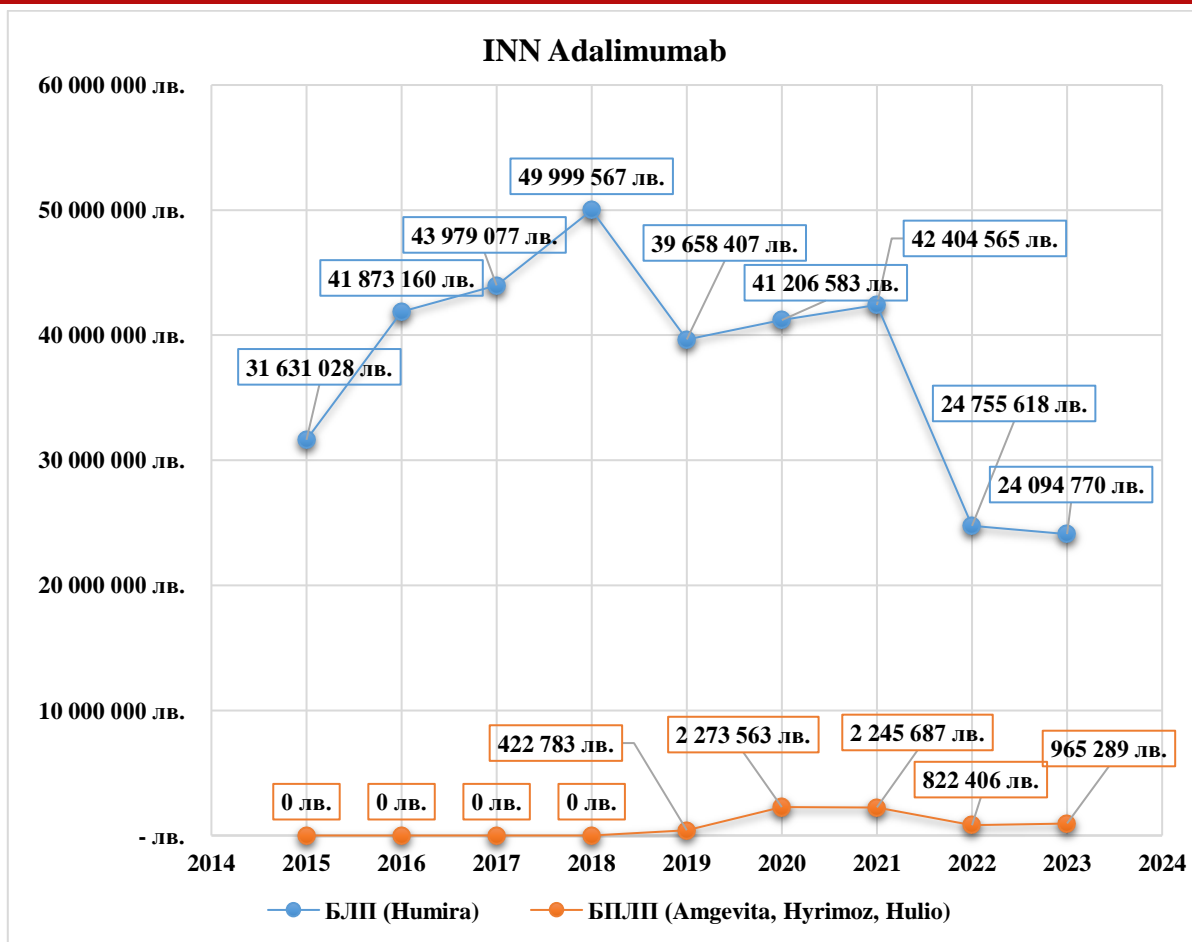
INN	Дата на РУ на Референтен БЛП	Включване в ПЛС на БЛП	БПЛП	Дата на РУ на БПЛП	Включване в ПЛС на БПЛП
Adalimumab	Humira 10.09.2003	12.02.2009	Amgevita	24.03.2017	22.10.2018
			Hyrimoz	30.07.2018	18.03.2019
			Hulio	19.10.2018	22.03.2019
			Yuflyma	11.02.2021	20.05.2021
			Hukyndra	15.11.2021	28.03.2022
Infliximab	Remicade 10.09.2003	20.04.2019	Inflextra	12.09.2013	28.11.2013
			Remsima	12.09.2013	12.12.2013
			Zessly	23.05.2018	12.04.2019
Rituximab	MabThera 03.06.1998	13.02.2009	Truxima	22.02.2017	04.01.2019
			Rixathon	19.06.2017	01.11.2018
			Ruxience	01.04.2020	20.04.2023
Bevacizumab	Avastin 12.01.2005	02.03.2009	MVASI	15.01.2018	28.09.2020
			Zirabev	14.02.2019	05.11.2020
			Oyavas	26.03.2021	03.06.2021
			Alymsys	26.03.2021	25.06.2021
			Abevmy	21.04.2021	23.08.2024
			VEGZELMA	17.08.2022	02.06.2023
Trastuzumab	Herceptin 04.09.2000	02.03.2009	Herzuma	13.02.2018	27.10.2018
			Kanjinti	18.05.2018	02.08.2018

			Trazimera	30.07.2018	02.04.2019
			Ogivri	14.12.2018	02.04.2019
			Zercepac	27.07.2020	07.11.2022
Eculizumab	Soliris 20.06.2007	x	Bekemv	19.04.2023	20.12.2023
Natalizumab	Tysabri 26.04.2022	26.04.2022	Tyruko	12.07.2024	x
Tocilizumab	RoActemra 16.01.2009	21.11.2014	x	x	x
Omalizumab	Xolair 25.10.2005	14.10.2021	x	x	x
Ustekinumab	Stelara 15.01.2009	31.01.2024	Pyzchiva	19.04.2024	26.09.2024

Към 31 Декември 2023 ЕМА е издала разрешения за употреба на 89 биоподобни лекарствени продукти, като от тях 31 продукта съдържат моноклонални антитела, като 25 от тях са включени в ПЛС. Делът на БПЛП, съдържащи моноклонални антитела е 1/3 от общия брой или 34.83%. Одобрените БПЛП се разпределят в 10 INN – Adalimumab, Bevacizumab, Infliximab, Rituximab, Trastuzumab, Natalizumab, Ustekinumab, Tocilizumab, Omalizumab, Eculizumab. В табличен вид представяме сравнителен анализ и разпределение на референтните и биоподобните продукти по INN, периоди на разрешаване за употреба и включването им в ПЛС [12].

От таблицата е видимо, че малка част от Притежателите на РУ (ПРУ) на БПЛП стартират процедура по ценообразуване и реимбурсиране в България, веднага след получаване на РУ. Повечето БПЛП дават начало на процедурата не по-рано от 7 месеца, след получаване на РУ, а в някои случаи този срок се удължава на повече от 12 месеца. Това поведение на фармацевтичните компании ПРУ на БПЛП може да се интерпретира, като ниско ниво на интерес за навлизане на лекарственият пазар в България [13].

В следващите графики и таблици ще се опитаме да отговорим на въпроса: „Рационална ли е употребата на биоподобни лекарствени продукти с моноклонални антитела в България?“.



Фигура 1. Разпределение на разходите за БЛП и БПЛП за INN Adalimumab

На фигура 1 представяме графично под формата на пълзяща (плъзгаща се) средна стойност (Moving Average - MA) на разходите за терапия с БПЛП и БЛП от 2015 до 2023 г. Всеки възел представлява една година, като целта е да се изясни макротенденцията – обхватна и устойчива промяна в посоката на ценовите динамичности при тези лекарствени продукти. На пръв поглед във фигура 1 се наблюдава рязък спад в разходите за референтния биологичен лекарствен продукт с 10,341,160 лв. (20.68%) непосредствено след появата на биоподобните лекарствени продукти през 2019 г. От жълтата средна стойност във фигурата става ясно, че разходите за БПЛП за 2019 г. сумарно не превишават 422 783 лв. Налична е разлика от 9,918,377 лв.

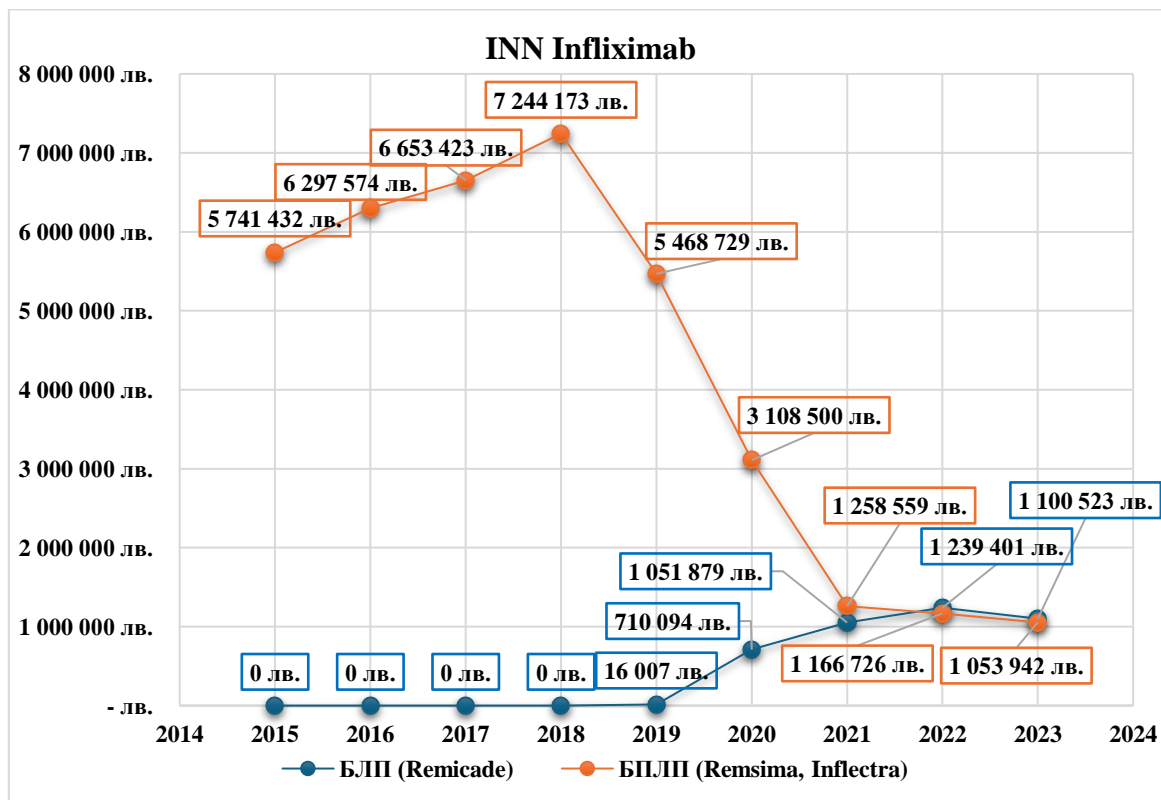
През 2020 и 2021 г., се наблюдава известно възстановяване на разходите за биологични лекарствени продукти (БЛП), достигайки съответно 41,206,583 лв. и 42,404,565 лв., докато разходите за биоподобни лекарствени продукти (БПЛП) нарастват до малко над 2 млн. лв. за всяка от двете години. През 2022 г. разходите за БЛП спадат рязко до 24,755,618 лв., като този спад е съпътстван и от намаление на разходите за БПЛП до 822,406.30 лв.

През 2023 г. тенденцията на по-ниски разходи за БЛП се запазва, достигайки 24,094,770 лв., докато разходите за БПЛП остават относително стабилни – 965,288.78 лв.

Още в края на 2018 г., по данни на НСЦРЛП, ПРУ AbbVie Biotechnology GmbH, Ludwigshafen, Германия редуцира цената на Humira. Може да се предполага, дали това е „щастливо“ съвпадение с появата на БПЛП или е добре обмислена маркетингова стратегия, целяща да упражни допълнителен натиск върху навлизащите нови участници на пазара.

В Раздел I. (Условия, правила и критерии за включване на лекарствени продукти в Позитивния лекарствен списък) на НАРЕДБА ЗА УСЛОВИЯТА, ПРАВИЛАТА И РЕДА ЗА РЕГУЛИРАНЕ И РЕГИСТРИРАНЕ НА ЦЕНИТЕ НА ЛЕКАРСТВЕНИТЕ ПРОДУКТИ е разписано условие при ценнообразуването на БПЛП, с което се определя, че тяхната цената не

може да надвишава **80 на сто** от цената на производител на лекарствен продукт със същото международно непатентно наименование, лекарствена форма и количество на активното вещество в дозова единица, включен в ПЛС, и който се счита за референтен лекарствен продукт. Това условие играе ролята на механизъм, който би трябвало да подобри достъпността на лекарствените продукти за населението, като в същото време намали разходите на заплащащата институция НЗОК [14].



Фигура 2. Разпределение на разходите за БЛП и БПЛП за INN Infliximab

Анализът на разходите за INN Infliximab, представен на Фигура 2, разкрива динамична промяна в пазарните позиции на референтния биологичен лекарствен продукт Remicade и биоподобните лекарства Remsima и Inflectra в периода 2015–2023 г.

През периода 2015–2018 г. се наблюдава значително нарастване на разходите за биоподобни лекарствени продукти (БПЛП), които нарастват от 5,741,432 лв. през 2015 г. до 7,244,173 лв. през 2018 г. Това се дължи на отсъствието на Remicade от пазара през този период.

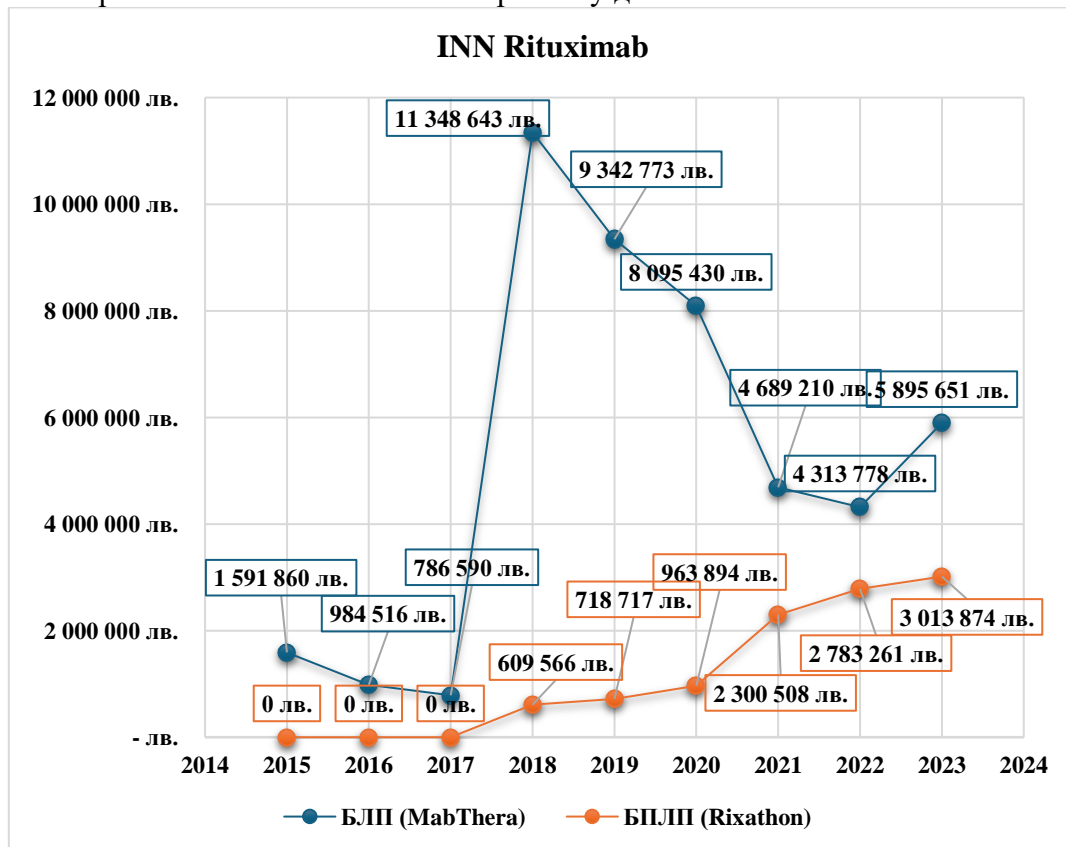
През 2019 г. Remicade се появява на пазара с разходи в размер на 16,006.70 лв., като едновременно с това разходите за БПЛП намаляват до 5,468,729 лв., което представлява спад от около 24% спрямо предходната година. През 2020 г. разходите за Remicade нарастват значително до 710,094 лв., докато тези за БПЛП спадат драстично до 3,108,500 лв., което представлява спад от около 43%. Тази промяна демонстрира агресивното навлизане на референтния продукт на пазара и загубата на пазарен дял от страна на биоподобните продукти.

Тенденцията на промяна в пазарните позиции продължава и през 2021 г., когато разходите за Remicade достигат 1,051,879 лв., докато тези за БПЛП намаляват до 1,258,559 лв. През 2022 г. разходите за Remicade продължават да нарастват до 1,239,401 лв., докато разходите за БПЛП спадат до 1,166,726 лв. Това показва съществено преразпределение на пазарния дял в полза на референтния продукт.

През 2023 г. се наблюдава лек спад в разходите за Remicade до 1,100,523 лв., докато разходите за БПЛП се стабилизират на ниво от 1,053,942 лв. Въпреки това, биоподобните лекарствени продукти губят значителна част от своя пазарен дял за кратко време след появата

на референтния продукт Remicade. През 2022 г. Remsima напуска пазара, което подчертава значителното влияние на референтния продукт и неговото агресивно навлизане.

Тази доминантност на Remicade може да се дължи на няколко фактора. Като референтен биологичен лекарствен продукт той има изградена репутация и доверие сред лекарите и пациентите, което води до предпочитане на оригиналния продукт пред биоподобните му алтернативи. В допълнение потенциални агресивни маркетингови стратегии вероятно спомагат за бързото възстановяване на пазарния му дял.



Фигура 3. Разпределение на разходите за БЛП и БПЛП за INN Rituximab

Анализът на разходите за INN Rituximab показва интересни тенденции в пазарните позиции между референтния биологичен лекарствен продукт MabThera и биоподобния лекарствен продукт Rixathon в периода 2015–2023 г.

През периода 2015–2017 г. разходите за MabThera намаляват значително – от 1,591,860 лв. през 2015 г. до 786,590.16 лв. през 2017 г. През този период не са отчетени разходи за биоподобния продукт Rixathon, поради отсъствие на конкуренция в същия INN.

През 2018 г. Rixathon се появява на пазара с отчетени разходи от 609,565.87 лв., докато разходите за MabThera се увеличават значително до 11,348,642.96 лв. Това вероятно се дължи на разширяване на пазарното търсене и на увеличаване на броя на пациентите, използващи референтния продукт.

През 2019 г. разходите за MabThera намаляват до 9,342,773.43 лв., а тези за Rixathon нарастват до 718,717.04 лв., което показва постепенно навлизане на биоподобния продукт на пазара. През 2020 г. разходите за MabThera намаляват допълнително до 8,095,430 лв., докато пазарния дял на Rixathon нараства до 963,894 лв.

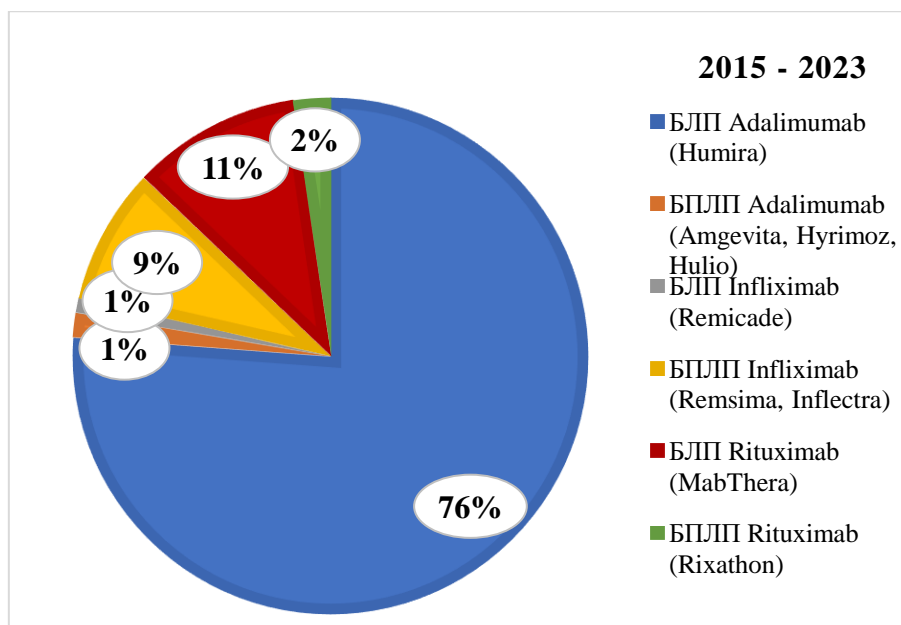
През 2021 г. разходите за MabThera спадат значително до 4,689,210 лв., докато разходите за Rixathon достигат 2,300,508 лв., което демонстрира засилено присъствие на биоподобния лекарствен продукт. Тази тенденция продължава и през 2022 г., когато разходите за MabThera спадат до 4,313,778 лв., а тези за Rixathon нарастват до 2,783,261 лв., което показва стабилизиране и утвърждаване на биоподобния продукт на пазара.

През 2023 г. разходите за MabThera нарастват до 5,895,651 лв., докато тези за Rixathon достигат 3,013,874 лв. Въпреки че разходите за референтния продукт нарастват, биоподобният лекарствен продукт продължава да държи значителен пазарен дял.

Тези данни показват, че след появата на Rixathon на пазара през 2018 г., той постепенно увеличава своя пазарен дял, докато MabThera губи част от своята доминираща позиция.

БЛП Adalimumab заема 76% от целия пазар на биологични и биоподобни лекарствени продукти.

– Фигура 4.

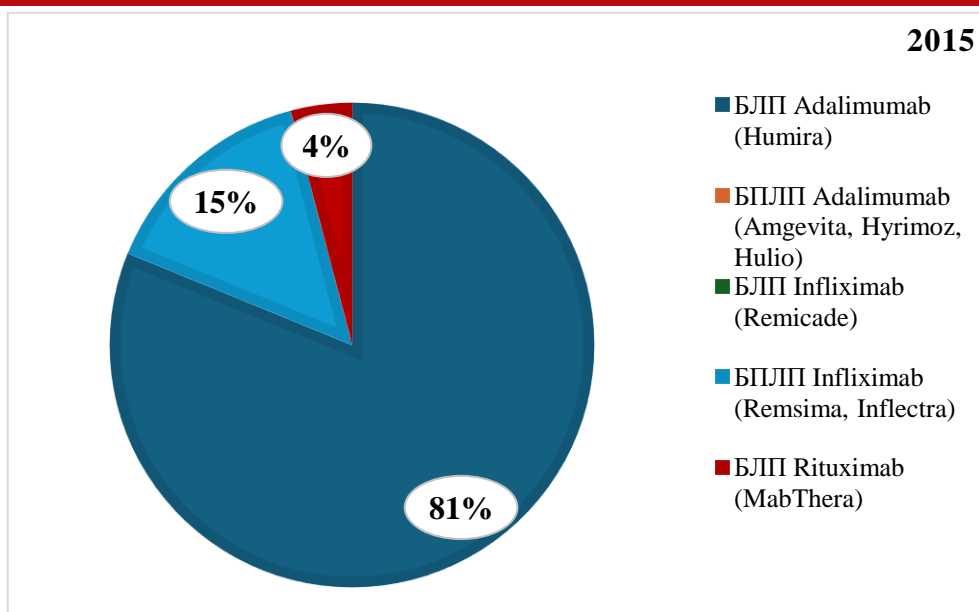


Фигура 4. Дял на разходите за БЛП и БПЛП за INN Adalimumab, Infliximab, Rituximab за 2015 – 2023 г.

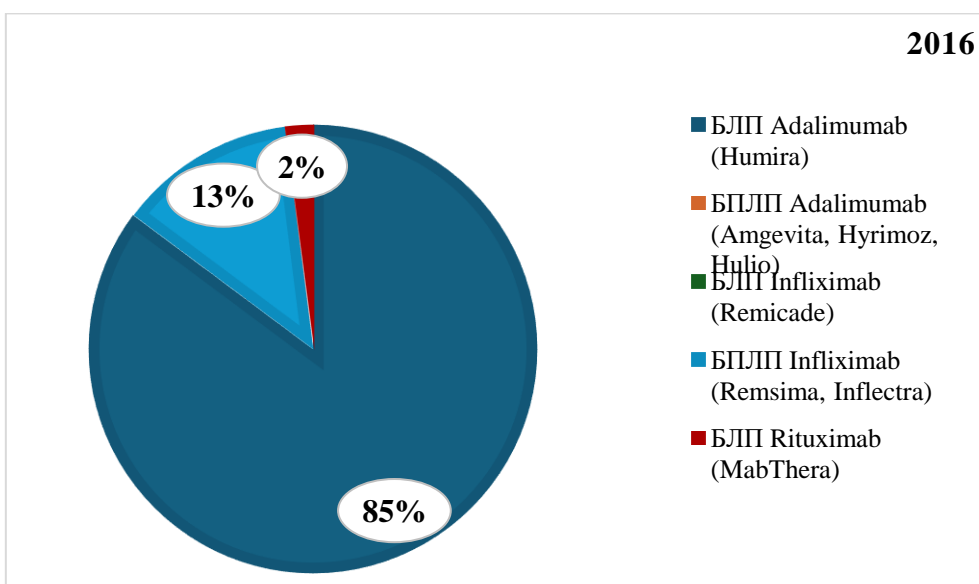
Графиката ясно илюстрира разликите в пазарното разпределение на различните лекарствени продукти, като показва доминирането на референтния продукт Adalimumab (Humira) в сравнение с другите биоподобни и референтни продукти в този период.

Като цяло изглежда, че конкуренцията между биологичните и биоподобните лекарства, както и ценовите стратегии на различните притежатели на разрешение за употреба, могат да окажат значително влияние върху продажбите и пазарния дял на цяла плеяда от лекарствени продукти. Важно е тези фактори да бъдат внимателно разглеждани, когато се анализира гледната точка на медицинските специалисти изписващи дадените лекарствени продукти.

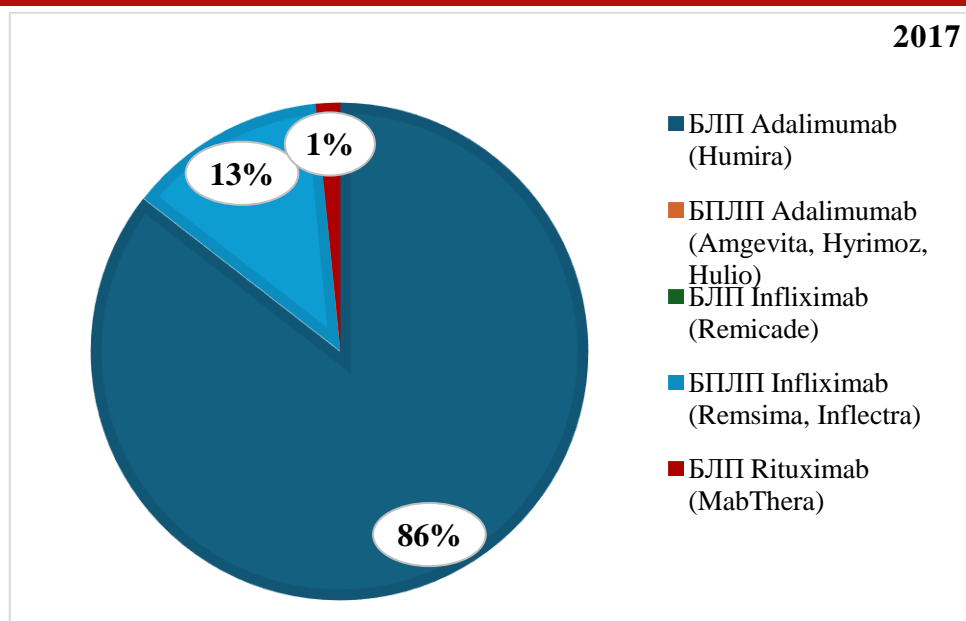
В следващите няколко фигури представяме промяната в пазарния дял през годините на референтните и биоподобните лекарствени продукти с INN Adalimumab, Infliximab и Rituximab.



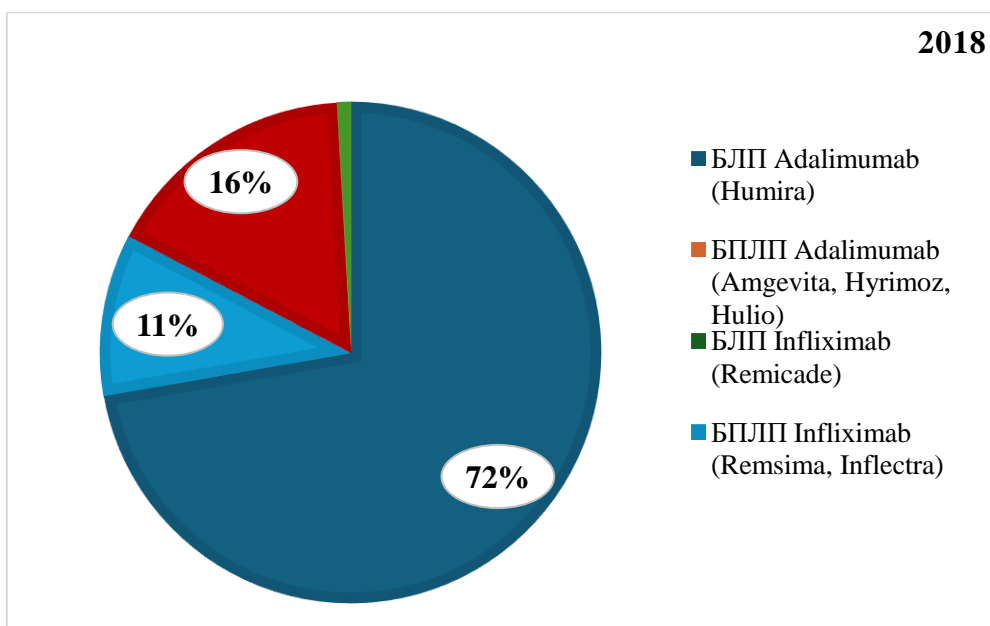
Фигура 5. Разпределение на разходите за БЛП и БПЛП за INN Adalimumab, Infliximab, Rituximab за 2015 г.



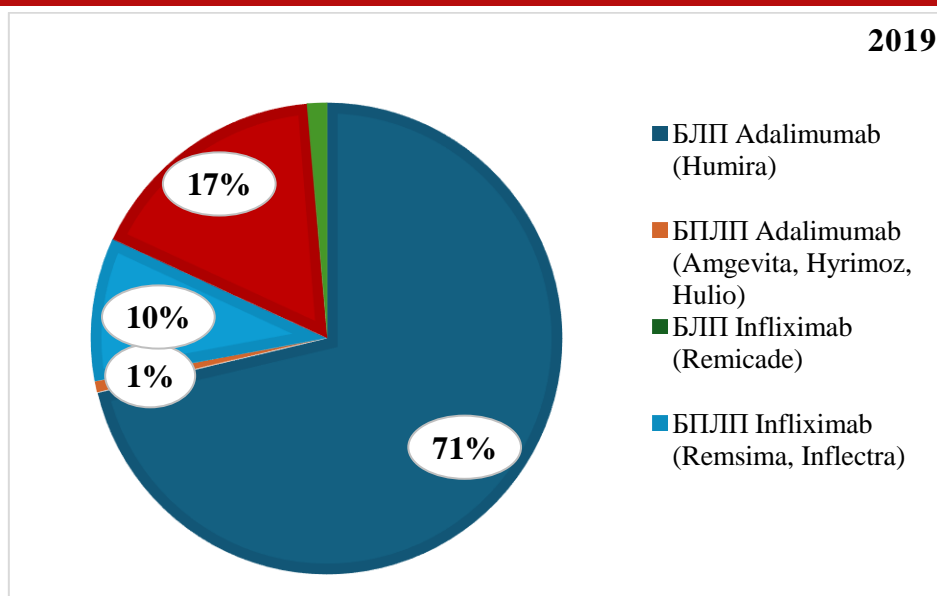
Фигура 6. Разпределение на разходите за БЛП и БПЛП за INN Adalimumab, Infliximab, Rituximab за 2016 г.



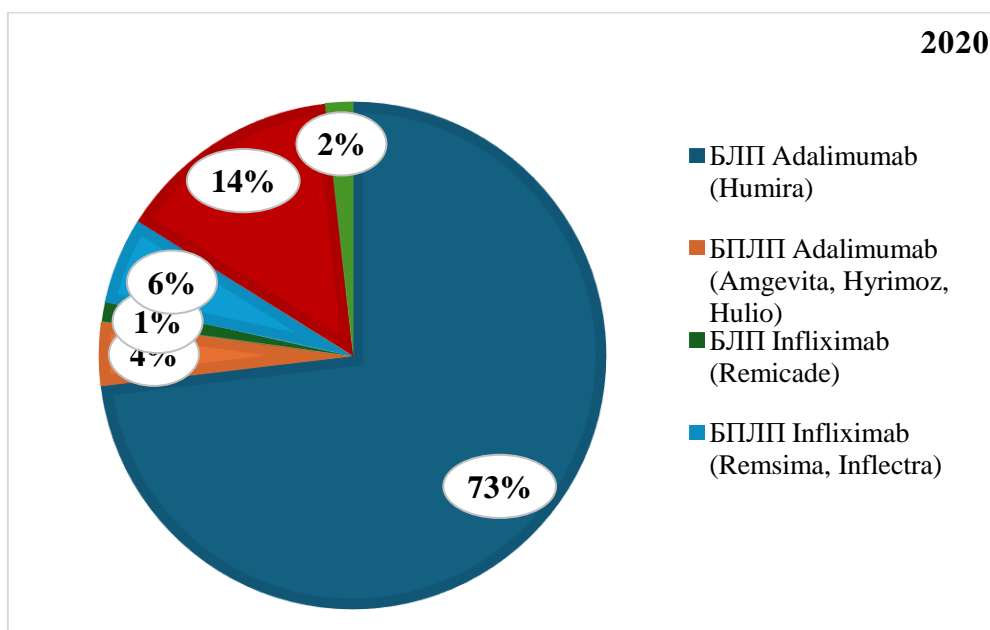
Фигура 7. Разпределение на разходите за БЛП и БПЛП за INN Adalimumab, Infliximab, Rituximab за 2017 г.



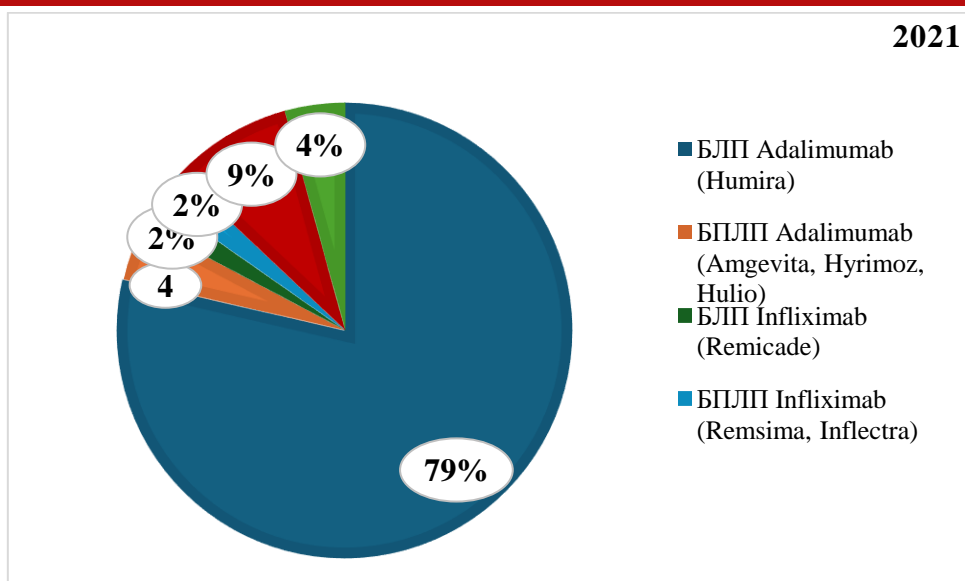
Фигура 8. Разпределение на разходите за БЛП и БПЛП за INN Adalimumab, Infliximab, Rituximab за 2018 г.



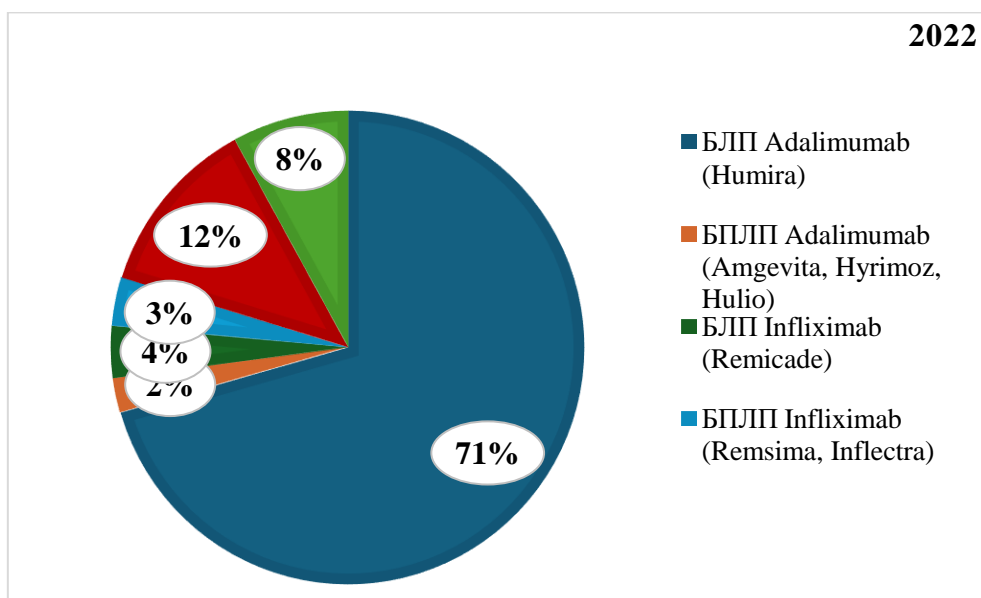
Фигура 9. Разпределение на разходите за БЛП и БПЛП за INN Adalimumab, Infliximab, Rituximab за 2019 г.



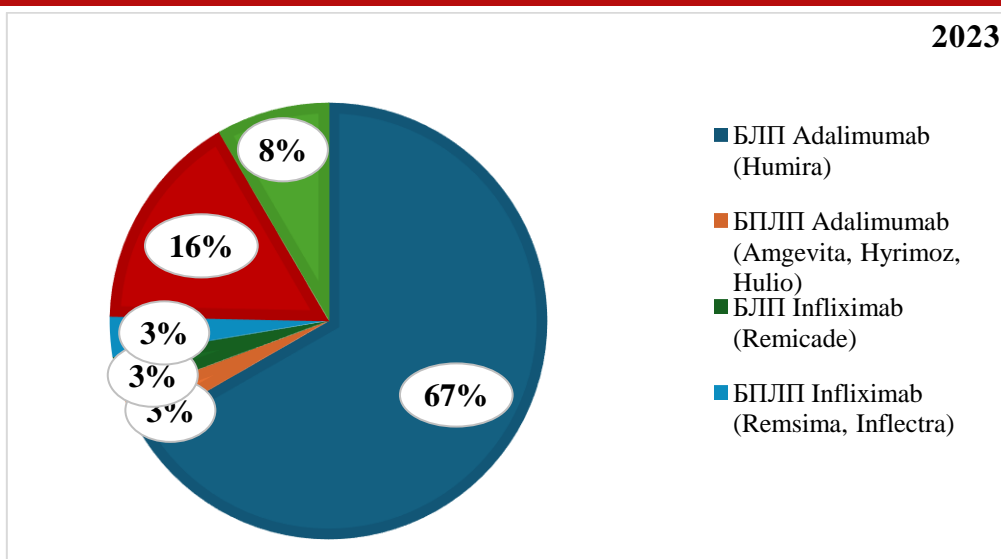
Фигура 10. Разпределение на разходите за БЛП и БПЛП за INN Adalimumab, Infliximab, Rituximab за 2020 г.



Фигура 11. Разпределение на разходите за БЛП и БПЛП за INN Adalimumab, Infliximab, Rituximab за 2021 г.



Фигура 12. Разпределение на разходите за БЛП и БПЛП за INN Adalimumab, Infliximab, Rituximab за 2022 г.



Фигура 13. Разпределение на разходите за БЛП и БПЛП за INN Adalimumab, Infliximab, Rituximab за 2023 г.

Въпреки видимото увеличение на пазарния дял на биоподобните лекарствени продукти през последните години, референтните лекарствени продукти продължават да доминират на пазара, което демонстрира трайно предпочитание към тях от страна на предписващите здравни специалисти. Тази тенденция показва, че, въпреки наличието на по-евтини алтернативи, клиничната увереност и познаването на референтните продукти остават решаващи фактори за предписване.

Заклучение.

Един лекарствен продукт може да бъде дефиниран като наличен само, ако е разрешен за употреба и има регистрирана цена. Същият лекарствен продукт се дефинира като достъпен, ако е наличен и е включен в система за реимбурсиране от публични фондове.

В условията на членството на България в ЕС, считано от 01 януари 2007 г., българските граждани имат гарантирана наличност на качествени, безопасни и ефикасни биоподобни лекарствени продукти, еднаква с останалите граждани на ЕС. Разрешаването за употреба на биоподобни лекарствени продукти е централизирано на ниво ЕС и се обезпечава чрез правилата въведени от Директива 2001/83/ЕС и Регламент (ЕС) No 726/2004.

В България времето за регистрация на цена и включване в системата за реимбурсиране се извършва в съответствие с изискванията на Директива 89/105/ЕЕС – сроковете са от 2 до 3 пъти по-кратки от установените в Директивата. Средната продължителност на времето от РУ на един биоподобен лекарствен продукт до ефективното му реимбурсиране в България е 180 дни (6 месеца). Осигуряването на наличност и достъпност е гарантирано и съответства на стандартите утвърдени в държавите- членки на ЕС [15].

Разходите за биологично лечение (биологични и биоподобни лекарства) за осемгодишен период в абсолютна сума са равни на 1 005 923 870 лв. Общият бюджет за лекарствено лечение за същия период е 6 675 000 600 лв. Относителният дял на биологичните продукти е 15.08%, което показва отлична наличност, достъпност и използваемост на макроравнище, оценено през бюджетните показатели.

Включването на БПЛП в една и съща група за реимбурсиране с БЛП води до определянето на по-ниска реимбурсна сума за заплащане от НЗОК на база на т.н. вътрешно рефериране в съответния INN.

Правилото, че цената на БПЛП не може да надвишава 80% от регистрираната цена на референтния биологичен продукт, води до намаляване на общите разходи за лечение в рамките на бюджета на НЗОК и осигурява достъп до лечение на по-голям брой пациенти.

Логично би било да се очаква, че разширяването на достъпа се дължи на навлизането на БПЛП. На практика това е следствие само на ефекта от намаляването на разходите на НЗОК за съответния INN.

Въпреки, че попадат в по-висок ценови диапазон, референтните лекарствени продукти са предпочитано средство за предписване, отпускане и лечение. В съответствие с установените правила за предписване и отпускане на БЛП и БПЛП в България предписването все още е по търговско наименование, а не по INN. БЛП и БПЛП се предписват по специален ред от комисия от трима лекари с призната специалност в съответната терапевтична област и се издава т.н. „Протокол за скъпоструващо лечение IA“. Този вид предписание е със срок на валидност 6 месеца и също се издава по търговско наименование [16].

Получените от нас резултати показват, че предписването и отпускането на биоподобни лекарствени продукти е на пренебрежимо ниско равнище – само 1,89% от общото предписание оценено през бюджетните разходи на НЗОК.

На този етап на анализите, бихме могли да предположим, че вероятните причини са – липсата на адекватни национални стандарти за заменяемост/взаимозаменяемост на биологичните и биоподобните лекарствени продукти с биологични и/или биоподобни, предписването по търговски наименования, консерватизъм и недоверие на предписващите към т.н. заместващи терапии, агресивната лекарствена промоция пред медицинските специалисти и др.

Примерът с наличността, достъпността и лекарствената използваемост на Infliximab обаче, показва друга тенденция – липсата на референтен биологичен лекарствен продукт на българския пазар води до незабавното предписване и отпускане на биоподобни лекарствени продукти, като посочените по-горе основания се явяват концептуално несъстоятелни.

Библиография

1. Parvova, I., Stoilov, R., Hristov, E. Similar biological medicinal products-application in rheumatology (2015) *Revmatologija* (Bulgaria), 22 (1), pp. 3-16.
2. Consolidated text: Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. [Cited 2024 October 07]. Available from: <http://data.europa.eu/eli/dir/2001/83/2012-11-16>
3. Official Journal of the European Union. Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency. [Cited 2024 October 07]. Available from: <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/726/oj>.
4. European Medicines Agency. Guideline on similar biological medicinal products. [Cited 2024 October 07]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-rev1_en.pdf
5. EMA. Availability of medicines. [Cited 2024 November 10]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/availability-medicines#guidance-for-regulators-on-public-communication-section>
6. Lex.bg. Bulgarian Law on Medicinal Products in Human Medicine (Закон за лекарствените продукти в хуманната медицина (in force since 13.04.2007) [Cited 2024 November 07]. Available from: <http://www.lex.bg/bg/laws/ldoc/2135549536>
7. Electronic registers of National Council of Price and Reimbursement of Medicinal Products. Bulgaria. [Cited 2024 November 10]. Available from: <https://portal.ncpr.bg/registers/pages/register/list-medicament.xhtml>
8. Website of the National Health Insurance Fund. Bulgaria. [Cited 2024 November 11]. Available from: <https://www.nhif.bg/page/218>
9. Vance MA, Millington WR. Principles of irrational drug therapy. (1986) *Int J Health Serv.* 16(3):355–61.

10. WHO. International Working Group for Drug Statistics Methodology, WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology & WHO Collaborating Centre for Drug Utilization Research and Clinical Pharmacological Services. (2003). Introduction to drug utilization research. World Health Organization. [Cited 2024 October 11]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42627>
11. WHO. Resolution WHA60.16. Progress in the rational use of medicines. The Sixtieth World Health Assembly, [Cited 2024 November 07]. Available from: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHASSA_WHA60-Rec1/E/reso-60-en.pdf?ua=1#page=27
12. Yordanov TM (2023) A retrospective study of the availability, affordability and drug utilization of biosimilar medicinal products, containing monoclonal antibodies in Bulgaria. PhD Thesis, Sofia University “Saint Kliment Ohridski”, Sofia, Bulgaria
13. Parvova I, Yordanov E, Hristov E, Petkova V (2024) Application of biological medicinal products and tyrosine kinase inhibitors in rheumatoid arthritis and COVID-19: A systematic review of scientific literature. *Pharmacia* 71:1-8 doi:10.3897/pharmacia.71.e124471
14. Yordanov E, Parvova I, Hristov E, Petkova V. Evaluation of the drug utilization of biosimilar medicinal products containing monoclonal antibodies: A systematic review. *Journal of Generic Medicines*. 2022;18(3):145-153. doi:10.1177/17411343221076371
15. Council Directive 89/105/EEC of 21 December 1988 relating to the transparency of measures regulating the prices of medicinal products for human use and their inclusion in the scope of national health insurance systems. OJ L 40, 11.2.1989, p. 8–11 (ES, DA, DE, EL, EN, FR, IT, NL, PT) In force. [Cited 2024 November 11]. Available from: ELI: <https://data.europa.eu/eli/dir/1989/105/oj>
16. Lex.bg. Law of the Budget of NHIF 2024. [Cited 2024 November 11]. Available from: <https://lex.bg/bg/laws/ldoc/2137238711>

MOLECULAR DOCKING STUDY OF ISATIN DERIVATIVES AS POTENTIAL INHIBITORS OF KEY BACTERIAL ENZYMES

Ivelin Iliev, Kaloyan Mihalev, Svetlana Georgieva

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Varna

ABSTRACT

The development of novel antimicrobial agents is crucial in the ongoing battle against resistant bacterial strains. This study focuses on the molecular docking of a series of isatine derivatives, which are theoretically designed via reactions between isatine and various amines, specifically 4-aminomorpholine, 2-aminopyridine, 3-aminopyridine, and 4-aminopyridine. These reactions are expected to yield 3-mono substituted isatine derivatives. The docking simulations were performed using AutoDock software to evaluate the binding affinities of these derivatives with two target enzymes: the crystal structure of a 59 kDa fragment of topoisomerase IV subunit A (GrlA) from *Staphylococcus aureus* and the crystal structure of putative modulator of gyrase (PmbA) from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. The docking studies revealed diverse binding energies for the derivatives against both enzymes, suggesting differential inhibitory potential.

This research aims to assess the antimicrobial potential of the newly designed compounds by analyzing their predicted reactivity and binding interactions with the bacterial enzymes. Although these isatine derivatives have not yet been synthesized, their theoretical models provide valuable insights into their potential effectiveness as antimicrobial agents. By identifying promising candidates through molecular docking, we can streamline the subsequent synthesis and biological testing phases. Our findings contribute to the understanding of structure-activity relationships in isatine derivatives and highlight their potential as inhibitors of key bacterial enzymes, paving the way for the development of new therapeutic agents to combat bacterial infections.

Keywords: Antimicrobial, Isatine derivatives, Docking, Structure-activity relationship, Theoretical modeling

МОЛЕКУЛЯРНО ДОКИНГ ИЗСЛЕДВАНЕ НА ПРОИЗВОДНИ НА ИЗАТИН КАТО ПОТЕНЦИАЛНИ ИНХИБИТОРИ НА КЛЮЧОВИ БАКТЕРИАЛНИ ЕНЗИМИ

Ивелин Илиев, Калоян Михалев, Светлана Георгиева

Катедра „Фармацевтична химия“, Факултет по фармация, Медицински университет – Варна

Въведение

Антибиотичната резистентност представлява едно от най-сериозните предизвикателства пред глобалното здравеопазване, водещо до значителни ограничения в ефективността на стандартните терапевтични подходи при лечение на инфекциозни заболявания [1]. Резистентността се характеризира с развитието на механизми, чрез които бактериите преодоляват действието на антибиотиците, превръщайки последните в неефективни [2]. Основните причини за този проблем включват прекомерната и нерационална употреба на антибиотици в хуманната и ветеринарната медицина, неподходящи практики за контрол на инфекциите, както и мащабната употреба на антибиотици в селското стопанство за стимулиране на растежа при животни [3]. Тези фактори водят до селекционен натиск върху бактериалните популации, който улеснява разпространението на резистентни щамове. Последиците от това явление включват повишена заболеваемост, смъртност и значителни икономически загуби за здравните системи [4].

Механизмите на бактериална резистентност са разнообразни и включват производството на ензими като β -лактамази, които инактивират β -лактамните антибиотици, модификации в

ензимните мишени, които намаляват способността на антибиотиците да се свързват, активиране на ефлуксни помпи, които изхвърлят антибиотиците от бактериалната клетка, и формиране на биофилми, които създават физическа бариера срещу лекарствата [5]. Разпространението на гените за резистентност чрез хоризонтален генен трансфер допълнително утежнява проблема, което улеснява глобалното разпространение на някои резистентни щамове [6]. Поради ограниченото въвеждане на нови антибиотици през последните десетилетия, се наблюдава спешна необходимост от иновативни подходи за разработване на нови терапевтични агенти, способни да противодействат на резистентните бактерии [7].

През последните години процесът на откриване на напълно нови антибиотични молекули значително изостава спрямо нарастващите потребности. Финансовите разходи, продължителните времеви рамки и научните предизвикателства, свързани с разработването на нови антибиотични класове, водят до преориентиране на научните изследвания към оптимизация на вече известни молекули с доказани биологични активности [8]. Тази стратегия включва преоценка на съществуващи съединения и създаване на техни производни с подобрени фармакологични характеристики, разширен спектър на действие и повишена ефикасност. Такъв подход позволява преодоляване на съществуващите механизми на резистентност и възраждане на терапевтичния потенциал на тези молекули [9].

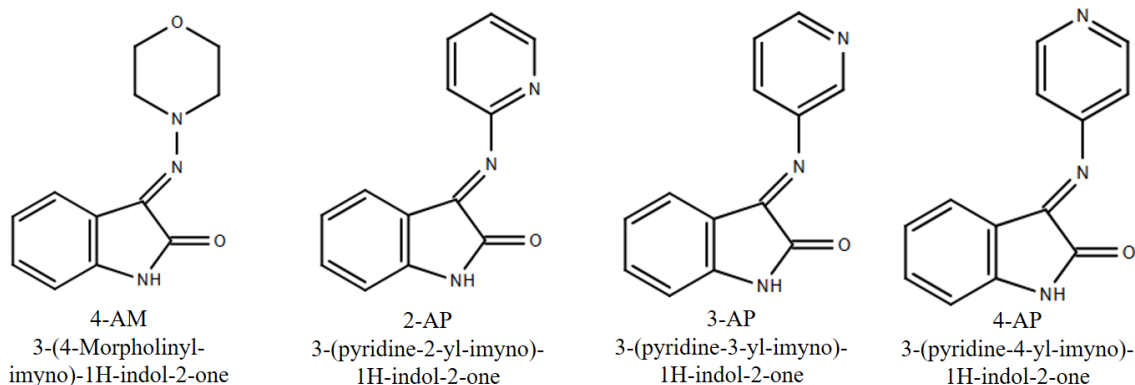
Едно от най-обещаващите съединения, изследвани в този контекст, е изатинът (1H-индол-2,3-дион) и неговите производни. Изатинът е хетероциклично органично съединение, открито за първи път през 1841г. от Ердман и Лоран в процеса на окисление на индигово багрило. Той представлява структурно многообразен и функционално активен химичен скелет, който се среща както в природата, така и може да бъде синтезиран лабораторно [10]. В природата изатинът е идентифициран в редица растения, гъби и микроорганизми, където се предполага, че играе защитна роля. Освен това изатинът се среща ендогенно в човешкия организъм като метаболит, произлизащ от триптофан – основна аминокиселина. Открит е в различни биологични течности и тъкани, което предполага потенциални физиологични роли, включително модулиране на невротрансмитери и участие в регулирането на стресовите реакции [11].

Изатинът и неговите производни проявяват широк спектър от биологични активности, сред които антимикробна, антивирусна, антиракова, противовъзпалителна и антиконвулсанта. Тези свойства се дължат на способността на съединението да взаимодейства с разнообразни молекулни мишени, включително ензими, рецептори и нуклеинови киселини [12, 20-29]. Особен интерес предизвикват производните на изатина като потенциални модулатори на бактериални ензими, което ги прави обещаващи кандидати за създаване на нови антибактериални лекарства. Уникалните структурни характеристики на изатина, като индоловото ядро и електрофилните кето групи, допринасят за неговата висока реактивоспособност и способност да образува стабилни комплекси с биологични мишени [13].

Молекулните докинг изследвания са утвърден инструмент в ранните етапи на процеса на откриване на лекарства, предоставяйки ценна информация за взаимодействията между малки молекули и техните ензимни мишени. Тези изчислителни подходи позволяват идентифицирането на съединения с високи афинитети на свързване и благоприятни профили на взаимодействие, като значително ускоряват процеса на разработване на ефективни ензимни модулатори [14]. Въпреки че някои производни на изатина са изследвани за техните биологични активности, потенциалът им като модулатори на бактериални ензими остава недостатъчно проучен. Освен това структурните фактори, които допринасят за тяхната модулаторна активност спрямо специфични ензимни мишени, не са добре установени, което създава значителна празнина в оптимизацията на изатиновите производни за антибактериално приложение.

Материали и методи

В настоящото изследване са теоретично проектирани четири шифови бази на изатина, а именно изатин с 4-аминоморфолин (4-AM), 2-аминопиридин (2-AP), 3-аминопиридин (3-AP) и 4-аминопиридин (4-AP). Четирите Шифови бази са представени на Фигура 1.



Фигура 1. Структурни формули на четирите новопроектирани Шифови бази.

Докинг изследванията са проведени с помощта на AutoDock4, свободно достъпен софтуер, разработен от The Scripps Research Institute. Тези изследвания използват Ламаркския генетичен алгоритъм, внедрен в AutoDock версия 4.2.6 [15]. Структурата на ензимите, използвани в докинг симулациите, са рентгенокристалните структури на Топоизомераза IV от *Staphylococcus aureus* (Protein Data Bank ID: 2INR), и предполагаемият модулатор на гираза (PmbA) от *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Protein Data Bank ID: 3QTD) [19].

Преди извършването на докинг изследванията, всички молекулни структури са оптимизирани и предварително обработени с помощта на Open Babel 2.4.0 [16], Avogadro [17], ChimeraX [18] и AutoDock Tools. Този процес осигури еднородност и консистентност на структурите.

Лигандите са подложени на “Blind docking” със 100 независими изпълнения на генетичен алгоритъм (GA) за търсене. При използването на метода на Ламаркския генетичен алгоритъм параметрите включват: максимум 25,000,000 енергийни оценки; 27,000 максимални итерации; скорост на мутация на гени от 0.02 и коефициент на кросоувър от 0.8. Изградена е решетка с размери 73, 63 и 117 точки по осите x, y и z съответно за 2INR и 93, 85 и 127 – за 3QTD, с интервал от 1.000 Å между точките. Клъстерен анализ на резултатите от докинга е извършен с толеранс по RMS от 2 Å.

Конформацията с най-ниска енергия на свързване от всяка докинг симулация е избрана като най-добър резултат от докинга. Анализът на връзките в най-стабилните комплекси е извършен и илюстриран с помощта на AutoDock Tools и Discovery Studio 2024.

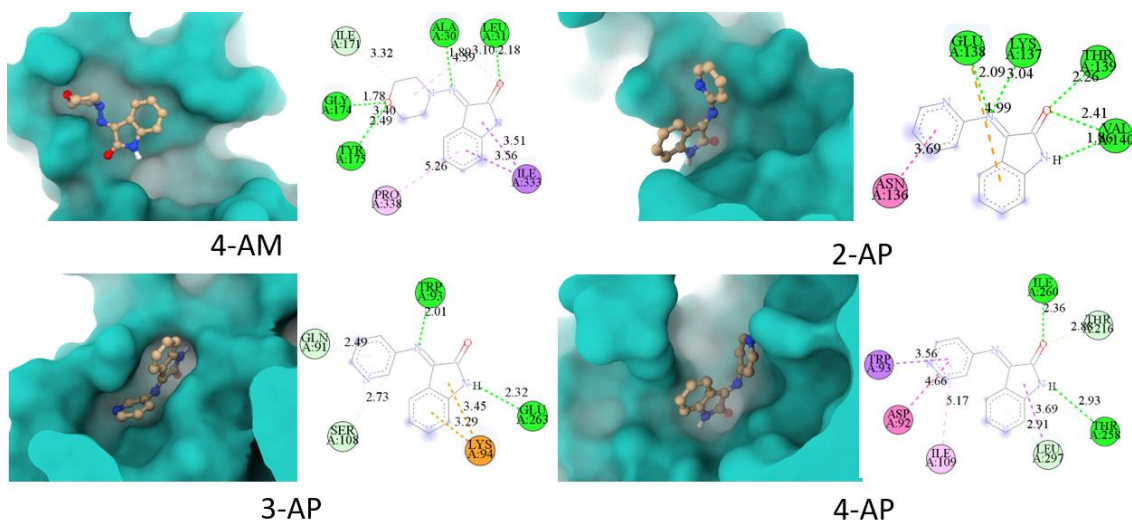
Резултати

Валидационната стъпка на докинг анализа е извършена чрез повторно докиране на ко-кристализираната конформация на специфичните лиганди в триизмерната структура на 2INR и 3QTD. Този подход има за цел да валидира способността на метода да предсказва известни позиции на свързване, като по този начин оцени надеждността на докинг протокола.

Резултатите от докинг анализа разкриват молекулните взаимодействия между изатиновите шифови бази и двата бактериални ензима. Пространственото разположение на съединенията в различни джобове на ензимите подчертава наличието на характерни взаимодействия които способстват за стабилизирането на образуваните комплекси. Получените визуални данни потвърждават способността на четирите новопроектирани изатинови шифови бази да образуват стабилни връзки с ензимите, като ориентацията на функционалните групи участва в ефективното взаимодействие с определени аминокиселинни

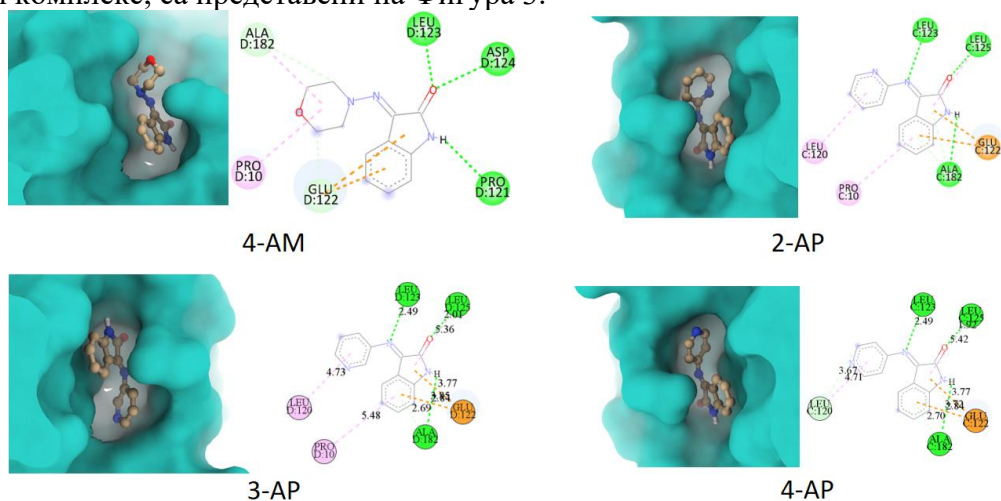
остатъци на ензимните молекули. Наблюдаваните взаимодействия предоставят информация относно молекулните механизми на свързване и подчертават потенциала на тези съединения като модулатори на бактериалните ензими. Те имат потенциал да модулират функционалната активност на ензимите и да послужат като основа за разработването на нови антимикробни агенти.

Пространственото разположение на четирите изатинови Шифови бази в различни джобове на 2INR, както и различните типове връзки, образувани при формирането на стабилния комплекс, са представени на Фигура 2.



Фигура 2. Пространствено разположение на новопроектираните съединения в различни джобове на 2INR.

Пространственото разположение на четирите изатинови Шифови бази в различни джобове на 3QTD, както и различните типове връзки, образувани при формирането на стабилния комплекс, са представени на Фигура 3.



Фигура 3. Пространствено разположение на новопроектираните съединения в различни джобове на 3QTD.

На **Таблица 1** и **Таблица 2** са представени обобщените резултати от докинг анализа на четирите новопроектирани съединения при свързването им с двата бактериални ензима.

Таблица 1. Данни от докинг анализа на четирите изатинови производни с 2INR.

Параметри	4-AM	2-AP	3-AP	4-AP
Клъстери	6	31	3	50
RMSD от референтна структура	36.816 Å	26.449 Å	31.484 Å	31.403 Å
Енергия на свързване	-4.68 kcal/mol	-5.42 kcal/mol	-5.47 kcal/mol	-5.07 kcal/mol
Инхибиторна константа, K_i	369.95 μ M	107.03 μ M	97.74 μ M	192.62 μ M
Обща вътрешна енергия	-0.21 kcal/mol	-0.46 kcal/mol	-0.39 kcal/mol	-0.40 kcal/mol
Свободна енергия на въртене	+0.60 kcal/mol	+0.30 kcal/mol	+0.30 kcal/mol	+0.30 kcal/mol
Неосвободена енергия	-0.21 kcal/mol	-0.46 kcal/mol	-0.39 kcal/mol	-0.40 kcal/mol

Таблица 2. Данни от докинг анализа на четирите изатинови производни с 3QTD.

Параметри	4-AM	2-AP	3-AP	4-AP
Клъстери	1	5	7	3
RMSD от референтна структура	223.333 Å	159.196 Å	222.746 Å	159.387 Å
Енергия на свързване	-5.08 kcal/mol	-6.32 kcal/mol	-6.14 kcal/mol	-6.13 kcal/mol
Инхибиторна константа, K_i	189.91 μ M	23.17 μ M	31.80 μ M	32.21 μ M
Обща вътрешна енергия	-0.05 kcal/mol	-0.48 kcal/mol	-0.30 kcal/mol	-0.34 kcal/mol
Свободна енергия на въртене	+0.30 kcal/mol	+0.30 kcal/mol	+0.30 kcal/mol	+0.30 kcal/mol
Неосвободена енергия	-0.05 kcal/mol	-0.48 kcal/mol	-0.30 kcal/mol	-0.34 kcal/mol

Взаимодействие на 4-AM с 2INR и 3QTD

Докинг симулациите показват, че 4-AM демонстрира най-неблагоприятни характеристики на свързване с двата ензима. За 2INR са идентифицирани шест конформации на свързване, като най-високо класираната показва енергия на свързване от -4.68 kcal/mol и инхибиторна константа (K_i) от 369.95 μ M. Тези стойности показват слаб афинитет на свързване и ограничен инхибиторен потенциал. Изчислената обща вътрешна енергия на комплекса лиганд-ензим е -0.21 kcal/mol, а торсионната свободна енергия и неосвободената енергия са съответно +0.60 kcal/mol и -0.21 kcal/mol, което потвърждава слабата стабилност на взаимодействието.

Що се отнася до 3QTD, е идентифицирана само една конформация на свързване, с енергия на свързване от -5.08 kcal/mol и K_i от 189.91 μ M. Тези резултати също показват слаб афинитет на свързване и нисък инхибиторен потенциал. Общата вътрешна енергия на

комплекса е -0.05 kcal/mol, а торсионната свободна енергия и неосвободената енергия са съответно $+0.30$ kcal/mol и -0.05 kcal/mol, което допълнително потвърждава липсата на стабилност при взаимодействието.

Взаимодействие на 2-AP с 2INR и 3QTD

За ензима 2INR са идентифицирани 31 конформации на свързване с 2-AP, като най-високо класираната има енергия на свързване от -5.42 kcal/mol и K_i от 107.03 μ M. Стабилността на комплекса лиганд-протеин е потвърдена от общата вътрешна енергия на комплекса (-0.46 kcal/mol), торсионната свободна енергия ($+0.30$ kcal/mol) и неосвободената енергия (-0.46 kcal/mol). Тези стойности сочат към формирането на стабилен комплекс с умерен инхибиторен потенциал.

Относно 3QTD, идентифицирани са пет конформации на свързване, като най-високо класираната демонстрира енергия на свързване от -6.32 kcal/mol и K_i от 23.17 μ M. Тези резултати показват по-силен афинитет на свързване и подобрен инхибиторен потенциал в сравнение с 2INR. Общата вътрешна енергия (-0.48 kcal/mol), торсионната свободна енергия ($+0.30$ kcal/mol) и неосвободената енергия (-0.48 kcal/mol) потвърждават стабилността на взаимодействието.

Взаимодействие на 3-AP с 2INR и 3QTD

Докинг симулациите за 3-AP с 2INR идентифицира три конформации на свързване, като най-високо класираната показва енергия на свързване от -5.47 kcal/mol и K_i от 97.74 μ M, което сочи към умерен афинитет на свързване и формирането на стабилен комплекс. Изчислената обща вътрешна енергия от -0.39 kcal/mol, заедно с торсионната свободна енергия ($+0.30$ kcal/mol) и неосвободената енергия (-0.39 kcal/mol), потвърждават стабилността на взаимодействието.

Относно 3QTD, идентифицирани са седем конформации на свързване, като най-високо класираната показва енергия на свързване от -6.14 kcal/mol и K_i от 31.80 μ M. Тези стойности показват по-силен афинитет на свързване и подобрен инхибиторен потенциал в сравнение с 2INR. Общата вътрешна енергия (-0.30 kcal/mol), торсионната свободна енергия ($+0.30$ kcal/mol) и неосвободената енергия (-0.30 kcal/mol) потвърждават стабилността на взаимодействието между лиганд и ензим.

Взаимодействие на 4-AP с 2INR и 3QTD

За 4-AP са идентифицирани 50 конформации на свързване с 2INR, като най-високо класираната показва енергия на свързване от -5.07 kcal/mol и K_i от 192.62 μ M. Тези стойности показват умерен афинитет на свързване и формирането на стабилен комплекс лиганд-протеин. Общата вътрешна енергия (-0.40 kcal/mol), торсионната свободна енергия ($+0.30$ kcal/mol) и неосвободената енергия (-0.40 kcal/mol) потвърждават стабилността на взаимодействието.

За 3QTD са идентифицирани три конформации на свързване, като най-високо класираната показва по-силна енергия на свързване от -6.13 kcal/mol и K_i от 32.21 μ M. Тези резултати показват значително по-висок афинитет на свързване и инхибиторен потенциал в сравнение с 2INR. Общата вътрешна енергия (-0.34 kcal/mol), торсионната свободна енергия ($+0.30$ kcal/mol) и неосвободената енергия (-0.34 kcal/mol) допълнително потвърдиха стабилността на комплекса.

Резултатите от докинг симулациите показват значителни разлики в характеристиките на свързване и инхибиторния потенциал на изследваните лиганди с 2INR и 3QTD. Сред изследваните лиганди, 2-AP и 3-AP демонстрират обещаващ афинитет на свързване и стабилност, особено към 3QTD, което предполага, че този ензим могат да бъде цел за по-нататъшно изследване. Разликите в афинитетите на свързване и конформационните профили вероятно се дължат на вариации в структурните и химични свойства на активните центрове на ензимите, което влияе на стабилизацията на лиганда и неговия потенциал за взаимодействие. Допълнителната оптимизация на структурата на лигандите може да подобри тяхната специфичност, предоставяйки път за разработване на нови антибактериални агенти.

Молекулярните докинг симулации разкриват и потенциалните взаимодействия между четирите новопроектирани съединения и аминокиселинните остатъци в двата рецептора.

Таблицы 3, 4, 5 и 6 обобщават наблюдаваните взаимодействия между четирите съединения и конкретни аминокиселинни остатъци от двата ензима, включително образуването на водородни връзки, въглерод-въглеродни връзки, въглерод-водородни връзки, алкилни връзки и пи-сигма връзки с конкретни аминокиселинни остатъци.

Таблица 3. Взаимодействия между Съединение 1 и 2INR и 3QTD.

Тип връзка	2INR аминокиселинни остатъци	3QTD аминокиселинни остатъци
Водородни връзки	ALA30, LEU31, GLY174, TYR175	LEU123, ASP124, PRO121
Алкилови връзки	PRO338	PRO10
Въглерод-водородни връзки	ILE171	GLU122
Пи-Сигма връзки	ILE333	-
Пи-Анион връзки	-	GLU122

Таблица 4. Взаимодействия между Съединение 2 и 2INR и 3QTD.

Тип връзка	2INR аминокиселинни остатъци	3QTD аминокиселинни остатъци
Водородни връзки	GLU138, LYS137, THR139, VAL140	LEU123, LEU125, ALA182
Пи-Анион връзки	GLU138	GLU122
Пи-Амид връзки	ASN136	-
Пи-донорни водородни връзки	-	ALA182
Пи-Алкил връзки	-	LEU120, PRO10

Таблица 5. Взаимодействия между Съединение 3 и 2INR и 3QTD.

Тип връзка	2INR аминокиселинни остатъци	3QTD аминокиселинни остатъци
Водородни връзки	TRP93, GLU263	LEU123, LEU125, ALA182
Въглерод-водородни връзки	SER108	-
Пи-Катион връзки	LYS94	-
Пи-донорни водородни връзки	GLN91	ALA182
Пи-Анион връзки	-	GLU122
Пи-Алкил връзки	-	LEU120, PRO10

Таблица 6. Взаимодействия между Съединение 4 и 2INR и 3QTD.

Тип връзка	2INR аминокиселинни остатъци	3QTD аминокиселинни остатъци
Водородни връзки	ILE260, THR258	LEU123, LEU125, ALA182
Въглерод-водородни връзки	THR216, LEU297	LEU120
Пи-донорни водородни връзки	THR216, LEU297	ALA182
Пи-сигма връзки	TRP93	-
Пи-Амид връзки	ASP92	-
Пи-Алкил връзки	ILE109	LEU120, LEU125
Пи-Анион връзки	-	GLU122

Докинг изследването, проведено върху взаимодействията между четирите съединения и двата ензима, разкрива разнообразие от свързващи взаимодействия. Тези взаимодействия са от значение за образуването на стабилни комплекси между лигандите и ензимите, подчертавайки техния потенциал като модулатори на ензимната активност. Разнообразието от типове връзки, формирани между тези лиганди и съответните аминокиселинни остатъци на ензимите, демонстрира потенциала им за образуване на стабилни комплекси. Наличието на множество водородни връзки, пи-взаимодействия (включително пи-анионни и пи-катионни), както и алкилни взаимодействия предполага, че тези съединения могат ефективно да модулират ензимната активност.

Различните видове връзки показват, че лигандите могат да взаимодействат с ензимите по множество начини. Например, водородните връзки осигуряват основна стабилност на комплексите, докато хидрофобните алкилни взаимодействия допринасят за общата енергийна стабилност. Тази разнообразна химична природа на взаимодействията е от значение за правилното функциониране на ензимите.

Заклучение

В настоящото изследване са проучени четири новопроектирани шифови бази на изатин, оценявайки тяхното взаимодействие с два бактериални ензима — топоизомераза IV и гираза. Резултатите от молекулните докинг проучвания показват, че тези съединения демонстрират потенциал като модулатори на ензимната активност.

Докинг анализът разкрива основни молекулни взаимодействия, включително хидрофобни контакти и водородни връзки, които стабилизират образуваните комплекси. Резултатите подчертават способността на новопроектираните молекули да образуват стабилни комплекс с бактериалните ензими, което е от значение за разработването на нови антимикробни агенти.

От четирите изследвани съединения, 2-AP показва най-силен афинитет към 3QTD с енергия на свързване от -6.32 kcal/mol и инхибиторна константа (K_i) от 23.17 μ M, което предполага умерена инхибиторна активност. Най-оптимално съединение за модулиране на активността на 2INR е 3-AP (с енергия на свързване -5.47 kcal/mol и $K_i = 97.74 \mu$ M), поради по-добрата инхибиторна активност и по-ниската инхибиторна константа в сравнение с останалите съединения.

Тези резултати не само предоставят основа за по-нататъшно изследване на изатиновите производни като потенциални антимикробни средства, но също така подчертават необходимостта от оптимизация на структурните характеристики на тези молекули.

Литература

1. Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277-283.
2. World Health Organization. (2021). Antimicrobial resistance: Key facts. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
3. Laxminarayan, R., et al. (2013). Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), 1057-1098.
4. O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. *Review on Antimicrobial Resistance*.
5. Murray, C. J. L., et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655.
6. Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433.
7. Boucher, H. W., et al. (2009). 10 x '20 Progress—Development of New Antibacterial Drugs for the Future: A Report from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48(1), 1-12.

8. Hughes, D., & Venkatraman, P. (2017). The future of antibiotic discovery: a new approach to drug development? *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 299-307.
9. Khan, M. I., et al. (2021). Recent advances in isatin derivatives as potential therapeutic agents: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 224, 113688.
10. Babu, K., et al. (2020). Isatin and its derivatives: A review on their biological activities and synthetic approaches. *Journal of Molecular Structure*, 1219, 128614.
11. Ghosh, A., et al. (2018). Isatin: A versatile scaffold for the development of bioactive molecules with diverse pharmacological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 1161-1175.
12. Bhat, R., et al. (2019). Biological activities of isatin derivatives: A review on their pharmacological potential and therapeutic applications. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 11(2), 84-93.
13. Sharma, S., et al. (2020). Isatin derivatives as potential anti-cancer agents: A comprehensive review on their synthesis and biological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 207, 112735.
14. Jain, S., et al. (2021). Molecular docking studies in drug discovery: An overview of recent advances and future perspectives. *Frontiers in Pharmacology*, 12, Article 622345.
15. Morris, G. M., et al. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785-2791.
16. O'Boyle, N. M., et al. (2017). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, 3(1), Article 33.
17. Hanwell, M. D., et al. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor and visualization tool. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), Article 17.
18. Pettersen, E.F., et al. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 30(1), 70-82.
19. Protein Data Bank (n.d.). Retrieved from <https://www.rcsb.org/>
20. Tiwari, S.K., & Kumar V.(2018). Isatin derivatives as potential anti-cancer agents: A review on their synthesis and biological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 1161-1175.
21. Choudhary, P.K., & Sharma S.(2020). Recent advances in isatin derivatives as potential therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 207, 112735.
22. Alvi, S.A., & Khan M.I.(2020). Isatin derivatives as promising agents against various diseases: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 207, 112735.
23. Kaur, G., & Kaur H.(2020). Recent advances in isatin derivatives as potential therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 207, 112735.
24. Verma R.K., & Gupta R.(2020). Isatin derivatives as potential therapeutic agents against various diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 207, 112735.
25. Singh S.K., & Kumar V.(2020). Isatin derivatives as potential anti-cancer agents: A review on their synthesis and biological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 1161-1175.
26. Kumar V., & Sharma M.(2020). Recent advances in isatin derivatives as potential therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 207, 112735.
27. Shukla R.K., & Singh P.(2020). Isatin derivatives as promising candidates against various diseases: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 207, 112735.
28. Thakur S.S., & Kumar V.(2020). Recent advances in isatin derivatives as potential therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 207, 112735.
29. Gupta S.C., & Kumar V.(2020). Isatin derivatives as potential anti-cancer agents: A review on their synthesis and biological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 1161-1175.

EXPERIMENTAL STUDY ON THE EFFECTS OF COMBINED PLANT EXTRACTS ANTISTRESS I AND ANTISTRESS II IN AN ACTIVE AVOIDANCE LEARNING AND MEMORY TEST

Ilin Kandilarov¹, Hristina Zlatanova-Tenisheva¹, Natalia Vilmosh¹, Maria Georgieva-Kotetarova¹, Stela Dimitrova², Mariana Katsarova², Ilija Kostadinov¹, Delian Delev¹

¹Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Medical Faculty, Medical University of Plovdiv

²Department of Bioorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Medical University of Plovdiv

ABSTRACT

Chronic untreated stress can lead to the development of depression, neurodegenerative diseases, and cognitive disorders. Adaptogens are substances that enhance the body's resilience to various types of stress and improve cognitive functions. In phytotherapy, multiple plant products are often combined to achieve better therapeutic effects and fewer side effects. This study aims to evaluate the effects on learning and memory of the combined plant extracts Antistress I and Antistress II, as well as the impact of the individual extracts included in their formulations. 64 male Wistar rats, divided into 8 groups of 8 animals each, were treated for 8 weeks with 5 individual extracts - *Serratula coronata*, *Hypericum perforatum*, *Valeriana officinalis*, *Crataegus monogyna*, and *Melissa officinalis*—as well as with two combinations, Antistress I and Antistress II, all at a dose of 500 mg/kg body weight. The animals were then tested for their learning and memory processes using the Shuttle box apparatus. The procedure included four days of training, a short-term memory test on day 5, and a long-term memory test on day 12. The group treated with Antistress II, as well as the groups treated with individual extracts of *Serratula coronata* and *Hypericum perforatum*, showed statistically significant ($p < 0.05$) improvements in active avoidance compared to the control group treated with distilled water, in both the short-term and long-term memory tests.

The Antistress II combination improves learning and memory processes in rats and is suitable for inclusion in clinical trials.

Key words: combined plant extracts, adaptogens, *Serratula coronata*, learning and memory, active avoidance

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНО ПРОУЧВАНЕ НА ЕФЕКТИТЕ НА КОМБИНИРАНИ РАСТИТЕЛНИ ЕКСТРАКТИ АНТИСТРЕС I И АНТИСТРЕС II В ТЕСТ ЗА ОБУЧЕНИЕ И ПАМЕТ С АКТИВНО ИЗБЯГВАНЕ

Илин Кандиларов¹, Христина Златанова-Тенишева¹, Наталия Вилмош¹, Мария Георгиева-Котетарова¹, Стела Димитрова², Марияна Кацарова², Илия Костадинов¹, Делян Делев¹

¹Катедра Фармакология и клинична фармакология, Медицински факултет, Медицински университет Пловдив

²Катедра Биоорганична химия, Фармацевтичен факултет, Медицински университет Пловдив

Въведение

Стресът е в основата на развитието на различни заболявания като тревожност, депресия и когнитивни нарушения. С напредване на възрастта, се намаляват способностите на организма да се справя със стреса, както и да поддържа клетъчна и системна хомеостаза, които са в основата на физиологичните му функции. Често се наблюдава невродегенерация, атеросклероза, понижена имунна функция, ендокринна и метаболитна дисфункция [1].

Стресът влияе на когнитивните функции по различни начини - бързо чрез катехоламините и по-бавно чрез глюкокортикоиди. Действието на катехоламините включва бета-адренергични рецептори и осигуряване на глюкоза, докато глюкокортикоидите модулират синаптичната пластичност по двуфазен механизъм в рамките на часове и предизвикват дългосрочни промени в структурата на дендритите, които могат да продължат седмици. Продължителното излагане на стрес води до загуба на неврони, особено в хипокампуса. Съвременни доказателства показват, че когнитивните увреждания, свързани с глюкокортикоидите и стреса, включително тези, засягащи фактологичната памет, вероятно се дължат на промените, които настъпват в хипокампуса. От друга страна, ефектите на стреса върху емоционално наситените спомени, предизвикани от катехоламини, включват структури като амигдала [2]. Адаптогените са вещества, които спомагат за възстановяването на нормалните функции на организма и укрепват системите, засегнати от стрес. Терминът е въведен от Лазарев през 1947 година и се отнася основно за растителни субстанции с три ключови свойства: 1. Те са безопасни за употреба и нетоксични за организма; 2. Увеличават неспецифичната устойчивост на организма, като му помагат да се справи с различни вътрешни и външни стресови фактори; 3. Регулират и възстановяват функциите на засегнатите системи [3]. Повтарящото се леко излагане на ниски дози стрес, повишава устойчивостта на клетките и организма и води до адаптация. Растенията произвеждат вторични метаболити за защита от вредители и неблагоприятни условия, а при хората тези съединения, в ниски дози, предизвикват леки клетъчни стресови отговори. Този процес, известен като хормезис, активира механизми за възстановяване и защита срещу бъдещи стресови въздействия. Адаптогените, като растителни вторични метаболити, са първата линия на защита, която стимулира адаптивните стресови отговори. Те подпомагат клетъчната поддръжка и предпазват от хроничен стрес и възпаление, асоциирани с развитието на заболявания [4]. Адаптивният стресов отговор, възпалението и стареенето, са многоетапни процеси, които включват разнообразие от външноклетъчни и вътреклетъчни взаимодействия и не могат да бъдат сведени до няколко биохимични взаимодействия, които се случват в мозъка или други тъкани. Очевидно е, че за описанието на механизма на действие на адаптогените моделът, който предполага взаимодействие на един медикамент с един рецептор, е недостатъчен и невалиден. Адаптогените имат множество молекулни цели, които участват в метаболитната регулация на хомеостазата както на клетъчно, така и на системно ниво, и играят роля на модификатори на стресовия отговор. Те нормализират повишените нива на кортизол/кортикостерон в кръвта и слюнката при хора или животни, вероятно чрез пряко взаимодействие с глюкокортикоидните рецептори (GRs). Освен това, адаптогените намаляват високите нива на c-Jun N-терминална киназа (JNK) и кортизол по време на стрес и активират генерирането на Heat Shock Protein Hsp70, който инхибира JNK. В резултат нивото на азотен оксид не се увеличава, а производството на АТФ не се инхибира [5].

Растението *Serratula coronata* (фиг. 1) съдържа екдистероида 20-хидроксиекдизон, който се характеризира с адаптогенно действие и се среща и в други растения с адаптогенни свойства като *Rhaponticum carthamoides* (Левзея) [6]. Използването на сложни фиксирани комбинации от няколко растителни екстракта, има дълга история в традиционната китайска медицина, Аюрведа и други традиционни медицински системи. Потенциалните ползи за здравето предизвикват значителен интерес, благодарение на концепцията за синергизъм. Комбинирането на две или повече растения предполага, че хибридният препарат е по-ефективен поради синергистични ефекти, които се проявяват чрез различни механизми. При растения, съдържащи многокомпонентни активни съединения, взаимодействията между тях могат да доведат до нова, неочаквана фармакологична активност поради синергични, но също така и поради антагонистични ефекти. При някои комбинации, например при арктически корен (*Rhodiola rosea*) с черен кохош, арктически корен с ашваганда, арктически корен със зелен чай, арктически корен с гинко билоба, се наблюдава подобрен адаптогенен ефект, в сравнение със самостоятелното прилагане на тези растения. В други случаи комбинации, като

Rhodiola с *Cordyceps*, се оказват неефективни в редица клинични проучвания, вероятно поради антагонистични взаимодействия [7].

Цел

Установяване ефекта върху обучението и паметта на комбинираните растителни екстракти Антистрес I и Антистрес II и на самостоятелните растителни екстракти, в теста за активно избяване при плъхове, както и сравняване на силата на ефекта на комбинираните растителни екстракти спрямо самостоятелните растителни екстракти включение в състава им.

Материал и методи

Растителни екстракти:

Използвани са растенията: Валериана (*Valeriana officinalis*) корен, Маточина (*Melissa officinalis*) стрък, Глог (*Crataegus monogyna*) цвят и лист, Жълт кантарион (*Hypericum perforatum*) стрък и Серагула (*Serratula coronata*) стрък. Събирането и сушенето на растенията е извършено при спазване на изискванията на Европейска фармакопея 7.0.

Сухите екстракти от отделните билки (*V.officinalis*, *M. officinalis*, *C. monogyna*, *H. perforatum* и *S. coronata*) и комбинациите от тях Антистрес 1 и Антистрес 2 са получени по промишлена технология на фирма „ЕКСТРАКТФАРМА” ЕООД гр. София.

Дрогите и сухите екстракти са предоставени от фирма „АВИЦЕНА ХЕРБ” ООД.

Антистрес 1 е комбинация от *V. officinalis*, *M. officinalis*, *C. monogyna* и *S. coronata* в съотношение 4:3:3:1, а Антистрес 2 – *V. officinalis*, *H. perforatum* и *S. coronata* в съотношение 4.5:4.5:1.

Качественото охарактеризиране на растителни екстракти се прави по определени вещества с изразена биологична активност. Най-често това са полифеноли, терпени, фитостероиди. Според Европейска фармакопея 7.0 екстракт от *Valeriana officinalis* се характеризира по наличието на валеренова киселина и борнил ацетат, *Melissa officinalis* по розмаринова и кафеена киселини, *Crataegus monogyna* по рутин, кверцетин и розмаринова киселина, *Serratula coronata* по 20-хидроксиекдизон и кверцетин, *Hypericum perforatum* по хиперицин.

Количественото определяне на кафеена, ферулова, р-кумарова, розмаринова, валеренова киселина, рутин, кверцетин, апигенин, витексин, борнил ацетат, хиперозид, хиперицин и 20-хидроксиекдизон е извършено в катедра Химия и биохимия, Фармацевтичен факултет към Медицински университет Пловдив по разработените от колектива HPLC-DAD методи. Количествата биологично активни вещества са посочени в табл.1.

Таблица 1. Количества розмаринова, валеренова, р-кумарова, ферулова и кафеена киселини, рутин, кверцетин, апигенин, витексин, хиперозид, борнил ацетат, хиперицин и 20-хидроксиекдизон, определени в $\mu\text{g/g}$ сух екстракт.

Екстракти Вещества, $\mu\text{g/g}$	V.officin alis	M.officin alis	C.monog уна	S.corona ta	H.perforat um	Антист рес 1	Антист рес 2
Кафеена киселина	65±3.2	1230±23	следи	-	-	475±11. 3	-
Рутин	40±1.1	256±8.4	1560±56. 3	-	39358±33 7	530±9.2	22785±1 03
Витексин	следи	224±8.2	740±28	следи	-	283±7.8	-
Хиперозид	следи	504±12.5	984±36.7	599±24. 6	15285±23 4	335±8.1	7960±29 7

р-кумарова киселина	65±3.5	45±1.8	следи	-	следи	38±0.9	-
Ферулова киселина	30±1.2	205±3.6	-	-	-	96±3.5	-
Кверцетин	следи	следи	5913±121	5470±119	6015±103	2135±68	3800±342
Апигенин	-	следи	следи	765±25	1700±35	79±3.1	350±11.8
Розмаринова киселина	1100±33	55600±313	3541±72	-	-	20629±89	-
20-хидроксиекдизон	-	-	-	19080±224	-	1528±93	1157±84
Хиперицин	-	-	-	-	858±36.3	-	390±23
Борнил ацетат	66±1.3	-	-	-	-	следи	следи
Валеренова киселина	775±21	-	-	-	-	265±16.9	388±22

Опитни животни

Използвани са мъжки плъхове порода Wistar със средно тегло 180-200 g. Животните са отглеждани при стандартни лабораторни условия: 12:12 часа тъмно-светъл цикъл, 45 % относителна влажност на въздуха, температура 26,5 ± 10 С и свободен достъп до храна и вода. Експериментите са одобрени от Комисията по етика към животните на Българската агенция по безопасност на храните и етичната комисия при МУ – Пловдив.

Опитните животни (64 на брой) се разделят на 8 групи по 8 животни. На таблица 2 е показано разпределението по групи

Таблица 2 Разпределение по групи при изследване на обучение и памет с активно избягване на Антистрес I и Антистрес II, както и на самостоятелните екстракти, които се съдържат в тях.

Група	Легенда	Описание
1	C	Перорално дестилирана вода 10ml/kg т.м.
2	AS1 ₅₀₀	Перорално Antistress I 500 mg/kg т.м.
3	AS2 ₅₀₀	Перорално Antistress II 500mg/kg т.м.
4	SER ₅₀₀	Перорално Serratula coronata 500mg/ kg т.м.
5	HYP ₅₀₀	Перорално Hypericum perforatum 500mg/ kg т.м.
6	VAL ₅₀₀	Перорално Valeriana officinalis 500mg/ kg т.м.
7	CRA ₅₀₀	Перорално Crataegus monogyna 500mg/ kg т.м.
8	MEL ₅₀₀	Перорално Melissa officinalis 500mg/ kg т.м.

В продължение на три месеца животните се третират всеки ден перорално с горепосочените екстракти. След края на третия месец се подлагат на метод за активно обучение.

Метод за активно обучение – Two way active avoidance test (TWAAT, shuttle-box test):

Стандартният апарат (Ugo Basile, Italy) е разделен на две помещения чрез вертикална преграда с отвор в центъра, през който преминават плъховете. Подът представлява решетка от успоредно разположени метални пръчки. На тавана е монтирана лампа, подаваща светлинен сигнал едновременно със звуковия дразнител (условни стимули). Обучителната програма е от 30 тренировки със следните параметри: едновременно приложени светлинен и звуков

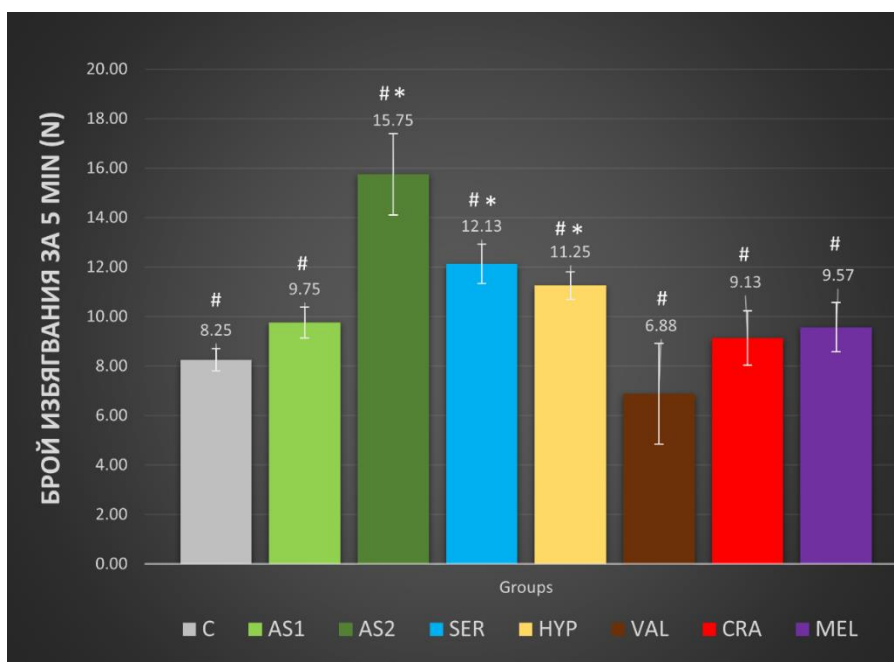
дразнител (670 Hz, 70 dB) в продължение на 6 секунди, последван от 0.4 mA електрическа стимулация по решетъчния под на клетката с продължителност 3 секунди. Паузата между отделните тренировки е 12 секунди. Обучителната сесия е 4 последователни дни. Тестът за краткосрочна памет е на 5^{ти} ден, а тестът за дълготрайни паметови следи – на 12^{ти} ден. Отчитат се: брой активни избягвания (avoidances).

Статистически анализ:

Статистическата обработка на получените резултати се осъществява със софтуерен продукт IBM SPSS 19.0. За всеки показател се определя средна аритметична стойност (mean) и стандартна грешка на средната аритметична (\pm SEM). Сравняване на резултатите между групите се извършва с One way ANOVA test, а като Post-Hoc анализ се използва LSD. За статистически значими се приемат резултати при уровень на значимост $p < 0,05$.

Резултати

Резултатите от теста за краткосрочна памет са представени на фигура 1.



Фигура 1. Резултати в теста за краткосрочна памет, отчетени като брой активни избягвания
* $p < 0,05$ при сравнение на изследваните групи с контролната група с дестилирана вода – C,
$p < 0,05$ при сравнение на всички групи с AS2.

Експерименталната група третирана с комбинацията AS2, както и групите, третирани със самостоятелните екстракти SER и HYP повишават статистически значимо ($p < 0,05$) броят на активните избягвания, при сравнение с контролната група - C, третирана с дестилирана вода. Групата третирана със самостоятелен екстракт – VAL понижава броя на активните избягвания спрямо контролата, но разликата не е статистически значима.

Броят на активните избягвания при групата третирана с комбинацията AS2 е по-голям от този на всички останали групи животни, като разликата е статистическа значима.

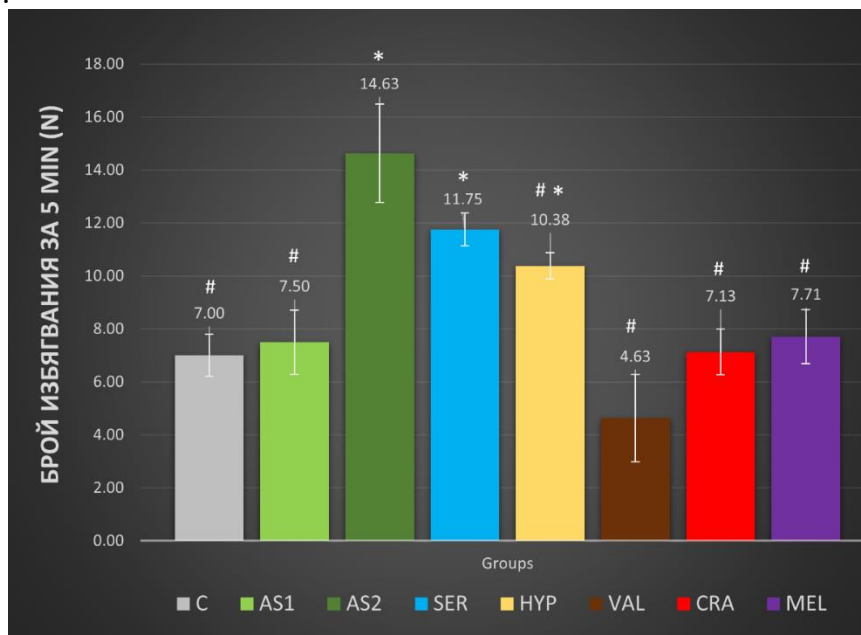
Резултатите от теста за дългосрочни паметови следи са представени на фигура 2.

В теста за дълготрайни паметови следи, броят на активните избягвания е статистически значимо ($p < 0,05$) по-висок в групата, третирана с комбинацията AS2, както и в групите, получаващи самостоятелни екстракти - SER и HYP, в сравнение с контролната група (C). При експерименталната група, третирана със самостоятелен екстракт - VAL, се отчита несигнификантно понижение в изследвания показател спрямо контролата.

Броят на активните избягвания в групата, третирана с комбинацията AS2, е по-висок в сравнение с останалите изследвани групи, като разликата е статистически значима за всички групи, с изключение на тази, третирана със самостоятелен екстракт - SER.

Обсъждане

Съществуват редица данни в достъпната литература, които обясняват благоприятното действие върху обучението и паметта на 20-хидроксиекдизон – екдистероидът, който се съдържа в растителният екстракт от *Serratula coronata*. В предклинично проучване проведено върху плъхове с модел на Алцхаймер се установява, че 20-хидроксиекдизон подобрява процесите на обучение и памет, отчетени с тест за пасивно избягване и тест за пространствена ориентация [8].



Фигура 2. Резултати в теста за дълготрайни паметови следи, отчетени като брой активни избягвания * $p < 0,05$ при сравнение на изследваните групи с контролната група с дестилирана вода – C, # $p < 0,05$ при сравнение на всички групи с AS2.

Веществото подобрява антиоксидантната активност и предотвратява загубата на неврони, индуцирана от бета-амилоид. Механизмът на действие вероятно се дължи на повишаване на нивата на мозъчния невротрофичен фактор – BDNF, който играе ключова роля в невроналната защита, паметта и обучението [9]. 20-хидроксиекдизон също така подобрява генната експресия на маркерите за невронална активност [10] и противодейства на възпалителните фактори [11].

В клинично проучване, при което пациенти на различна възраст получават сух екстракт от *Serratula coronata*, съдържащ 20-хидроксиекдизон се наблюдава повишаване в параметрите, както на краткосрочната, така и на дългосрочната памет. Подобрието е по-изразено при начални промени в мозъчната съдова структура. Понижението в нивата на кортизол, което 20-хидроксиекдизон предизвиква, е свързано с увеличаване на функциите на имунната система, което пък намалява атеросклеротичните процеси в съдовете. Освен това се подобрява оползотворяването на кислорода и хранителните вещества в тъканите [12].

В експериментално проучване на ефектите на *Hypericum perforatum* върху плъхове, подложени на различни видове стресогенно въздействие, се установява, че растението подобрява обучението и паметта, както в тестовете за пасивно, така и в тези за активно избягване, с използване на апарата Shuttle box. Ефектите са сравними с тази на екстракт от женшен (*Panax Ginseng*), което е добре проучено адаптогенно растение [13]. В друго проучване се установява, че приложението на екстракт от *Hypericum perforatum* повлиява когнитивните параметри и пространствената ориентация при плъхове чрез промяна в синаптичната

пластичност в хипокампа и префронталния кортекс [14]. Основната активна съставка, която се съдържа в растението – хиперфорин, също така понижава нивата на азотен оксид (NO), като потиска експресията на индуцируемата NO-синтетаза [15]. Нашите резултати противоречат на резултатите от друго проучване, в което хроничното приложение на *Hypericum perforatum* понижава нивата на BDNF и влошава обучението и паметта в тестове за пасивно избягване и разпознаване на нов обект [16].

Във фитотерапията често се предпочита използването на комбинации от два или повече растителни продукта, тъй като това може да осигури по-добър терапевтичен ефект и по-малко нежелани реакции. Богатството на биологично активни вещества в растенията обуславя възможността за различни взаимодействия, както положителни, така и отрицателни. Например, танините, съдържащи се в много растения, могат да възпрепятстват усвояването на алкалоидите. От друга страна, правилното и целесъобразно комбиниране на растителни екстракти може да доведе до потенциране и синергизъм на фармакологичните им свойства. При синергичните комбинации растителните продукти се използват в по-ниски дози в сравнение с техните терапевтични дози при самостоятелно приложение. Това позволява разширяване на терапевтичните показания и откриване на нови ефекти, които не се проявяват при употреба на растителните продукти поотделно [17]. В нашето проучване, комбинираният екстракт Антистрес II подобрява, както краткосрочната, така и дългосрочната памет, като ефектът е по-изразен от този на самостоятелните екстракти от *Serratula coronata* и *Hypericum perforatum* включени в него. В проучване на Lee и съавтори, се установява, че комбинация съдържаща *Hypericum perforatum* и *Salvia officinalis* подобрява процесите на обучение и памет, отчетени с теста Morris water maze и T-maze, което определя синергистични взаимоотношения между съставките [18]. В друго проучване се съпоставя терапевтичния ефект на комбинацията на сухи екстракти от *Hypericum perforatum* и *Valeriana officinalis* с този на сух екстракт от *Hypericum perforatum*, приложен самостоятелно при лечението на депресия, съчетана с тревожност и се установява по-добър ефект на комбинацията, спрямо самостоятелния екстракт [19].

В достъпната научна литература има ограничени данни за комбинации на екдистероиди с *Hypericum perforatum* и/или *Valeriana officinalis*, което означава, че синергизмът между тях и *Serratula coronata* наблюдаван в нашето проучване, може да бъде предпоставка за допълнителни изследвания върху употребата на комбинирани растителни продукти, съдържащи екдистероиди с цел по-добро изясняване на точния механизъм на тези взаимодействия.

Заклучение

Комбинацията Антистрес II и самостоятелните екстракти от *Serratula coronata* и *Hypericum perforatum* показват значителен положителен ефект, както върху краткосрочната и дългосрочната памет при плъхове. Ефектът на комбинацията е по-изразен, отколкото съставките ѝ поотделно. Необходими са допълнителни изследвания, за да се установят механизмите на действие, както и да се предвиди потенциалната ефективност при хора.

Литература

1. Panossian AG, Efferth T, Shikov AN, Pozharitskaya ON, Kuchta K, Mukherjee PK, et al. Evolution of the adaptogenic concept from traditional use to medical systems: Pharmacology of stress- and aging-related diseases. Vol. 41, Medicinal Research Reviews. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 630–703.
2. McEwen BS, Sapolsky RM. Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol.* 1995;5(2):205–16.
3. Panossian A, Wikman G, Wagner H. Plant adaptogens III.* Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action. *Phytomedicine.* 6(4):287–300.
4. Thorin-Trescases N, Thorin E. Vascular aging and oxidative stress: hormesis and adaptive cellular pathways. *Aging and Age-Related Disorders.* 2010;309–21

5. Panossian A, Gabrielian E, Wagner H. On the mechanism of action of plant adaptogens with particular reference to cucurbitacin R diglucoside. *Phytomedicine*. 1999;6(3):147–55.
6. Todorova V, Ivanov K, Delattre C, Nalbantova V, Karcheva-Bahchevanska D, Ivanova S. Plant adaptogens—History and future perspectives. *Nutrients*. 2021;13(8):2861.
7. Panossian A, Lemerond T, Efferth T. State-of-the-Art Review on Botanical Hybrid Preparations in Phytomedicine and Phytotherapy Research: Background and Perspectives. *Pharmaceuticals*. 2024 Apr 1;17(4).
8. Gholipour P, Komaki A, Ramezani M, Parsa H. Effects of the combination of high-intensity interval training and Ecdysterone on learning and memory abilities, antioxidant enzyme activities, and neuronal population in an Amyloid-beta-induced rat model of Alzheimer’s disease. *Physiol Behav*. 2022 Jul 1;251.
9. Choi SH, Bylykbashi E, Chatila ZK, Lee SW, Pulli B, Clemenson GD, et al. Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer’s mouse model. *Science (1979)*. 2018;361(6406):8821.
10. Yang S fen, Yang Z qin, Zhou Q xin, Wu Q, Huang X nan, Shi J shan. Effect of ecdysterone on the expression of c-fos in the brain of rats induced by microinjection beta-AP25-35 into the hippocampus. *Yao Xue Xue Bao*. 2004 Apr;39(4):241—244.
11. Xia X, Zhang Q, Liu R, Wang Z, Tang N, Liu F, et al. Effects of 20-hydroxyecdysone on improving memory deficits in streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rat. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:45–52.
12. Vetosheva VI, Volodin V V, Volodina SO. Phytopharmacological Correction of Functional State, Hormonal Status, and Memory Performance in Patients of Different Ages with Organic Changes in Brain Vasculature. *Advances in Gerontology*. 2019;9:447–52.
13. Kumar V, Singh PN, Bhattacharya SK. Anti-stress activity of Indian *Hypericum perforatum* L. *Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)*. 2001.
14. Trofimiuk E, Adam H, Braszko JJ. St. John’s wort may relieve negative effects of stress on spatial working memory by changing synaptic plasticity. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*. 2011;383:415–22.
15. Kraus B, Wolff H, Elstner EF, Heilmann J. Hyperforin is a modulator of inducible nitric oxide synthase and phagocytosis in microglia and macrophages. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2010;381:541–53.
16. Valvassori SS, Borges C, Bavaresco D V., Varela RB, Resende WR, Peterle BR, et al. *Hypericum perforatum* chronic treatment affects cognitive parameters and brain neurotrophic factor levels. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2018 Oct 1;40(4):367–75.
17. Williamson EM. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*. 2001;8(5):401–9.
18. Lee J, Lee S, Jo W, Ji HW, Pyeon M, Moon M, et al. Effect of a *Salvia officinalis* and *Hypericum perforatum* mixture on improving memory and cognitive decline. *Advances in Traditional Medicine*. 2024;24(2):633–49.
19. Müller D, Pfeil T, von den Driesch V. Treating depression comorbid with anxiety – results of an open, practice-oriented study with st john’s wort WS® 5572 and valerian extract in high doses. *Phytomedicine*. 2003;10:25–30.

MARKETING AUTHORISATION OF MEDICINAL PRODUCTS – STATE OF PLAY AND WAY FORWARD THE ROLE OF THE BULGARIAN DRUG AGENCY.

Lyubina Todorova

Department Marketing Authorisations of Medicinal Products, BDA

ABSTRACT:

Objective: to summarize and present the contemporary regulatory framework that defines the procedures for early access to treatment and granting marketing authorization for a medicinal product. In order for a medicinal product to be placed on the market in EU and/or Bulgaria, it must have a valid marketing authorization in Bulgaria and/or EC, issued by the national competent authority, or the European Commission (EC). The report presents the procedures for issuing a marketing authorization: national, decentralized, and centralized, which medicinal products must be considered by the European Medicines Agency (EMA), how they work the separate committees at EMA. I present the participation of the BDA assessors in the European procedures for the designation of orphan medicinal products, as well as the participation in multinational teams in the preparation of the scientific assessment of the documentation submitted for the authorisation of new medicinal products in the CHMP: abciximab, bevacizumab (i-Pique), pegfilgastrim and as peer-reviewers of procedures for giving scientific advice to applicants.

Conclusion: The EU's regulatory framework and scientific capacity ensure safe and effective medicines for European patients. The BDA assessors are equal partners in the European procedures for the assessment and granting of Marketing Authorisations of new medicinal products.

Key words: medicinal products, marketing authorisation, procedures, BDA, EMA

АКТУАЛНО СЪСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВИ ПРИ РАЗРЕШАВАНЕ ЗА УПОТРЕБА НА НОВИ ЛЕКАРСТВЕНИ ПРОДУКТИ. РОЛЯ И МЯСТО НА ИЗПЪЛНИТЕЛНА АГЕНЦИЯ ПО ЛЕКАРСТВАТА.

Любина Тодорова

Изпълнителна агенция по лекарствата

Разработването на нови лекарства е предизвикателен и сложен процес, свързан с дълги срокове на разработка и успеваемост на клиничните изпитвания за съединения, навлизащи във фаза I от около 10% [1, 2]. Това е въпреки публикуването на много научни насоки, взаимодействията/срещите с регулаторите и установяването на конкретен график за преглед и оценка от страна на регулаторните структури в много страни. За да ускорят достъпа на пациентите до лечение главно в области със сериозни и животозастрашаващи заболявания и неудовлетворени медицински нужди, много регулаторни органи са въвели регулаторни пътища за ускоряване на разработването и одобрението на лекарствени продукти. Първоначално ускорените пътища са били въведени в началото на 90-те години на миналия век в Съединените американски щати (САЩ), с идеята антиретровирусните лечения за пациентите да станат достъпни възможно най-бързо, за да се противодейства на заплахата от пандемията от HIV/СПИН.

Наличието на разрешение за употреба на фармацевтичен продукт представлява разрешение на фармацевтична компания да пусне лекарство на пазара в определена държава или група държави. Разрешенията за употреба се издават от национални регулаторни органи, често наричани компетентни органи. Ролята на регулацията е да се установят и поддържат строги стандарти за безопасност за новите лекарствени продукти, в съответствие със законодателните регулаторни рамки.

Както е добре известно, Европейският съюз (ЕС) е политически и икономически съюз, състоящ се от 27 държави-членки, разположени в европейския регион. В ЕС държавите-членки имат свои национални регулаторни органи, като Националната агенция за безопасност на лекарствата и здравните продукти на Франция и Агенцията за медицински продукти на Швеция, BfArM (респ. PEI) в Германия, и Изпълнителната агенция по лекарствата на България. В допълнение, в ЕС е създадена и функционира Европейската агенция по лекарствата (ЕМА). ЕМА е регулаторен орган, чиято цел е хармонизиране на фармацевтичните регулаторни въпроси в ЕС и ЕИП (Европейското икономическо пространство) и постигане на научни постижения в оценката и надзора на лекарствените продукти в ЕС.

ЕМА има юрисдикция във всички 27 държави-членки на ЕС и членове на ЕИП, а именно Лихтенщайн, Норвегия и Исландия. ЕМА използва научната експертиза на националните компетентни органи на ЕС за оценка на съотношението полза/риск на даден лекарствен продукт, но няма законови правомощия да издава разрешение за употреба в ЕС. Издаването на такъв акт е от правомощията на ЕК след получаване на положително становище от страна на Комитета за лекарствени продукти в хуманната медицина (CHMP) към ЕМА.

Чл. 6 от Директива 2001/83/ЕО [3] на Европейския Парламент и Съвета, твърди, че лекарствен продукт не трябва да се предлага на пазара без валидно разрешение за употреба, издадено от компетентен национален орган. В Европейския съюз лекарствен продукт може да получи разрешение за употреба чрез една от 4-те регулаторни процедури: национална процедура, централизирана процедура, процедура по взаимно признаване или децентрализирана процедура, описани в детайли в Насоки към заявителите [4].

В Европейския съюз регулаторната рамка за разрешаване за употреба на нови лекарствени продукти се дефинира от Регламент 726/2004 и Директива 2001/83/ЕО. През изминалите години от влизането в сила на тези документи Европейската Агенция по лекарствата постепенно усъвършенства процедурите за разрешаване за употреба на нови лекарства и непрекъснато търси и въвежда нови пътища за по-ускорено разработване и пускане на пазара на ЛП, които отговарят на споменатите по-горе критерии. Възникването на пандемията от COVID-19 разкри нови възможности в тази посока, като даде тласък както в технологиите, така и в регулацията.

На настоящия етап от развитието на фармацевтичната регулация са установени няколко регулаторни възможности, насочени към разработването и одобряването на иновативни лекарства в области на сериозни и животозастрашаващи заболявания и неудовлетворени медицински нужди.

В Регламент 726/2004 са изброени всички условия на които трябва да отговаря даден продукт, за да бъде оценен (и издадено разрешение за употреба) по т.нар. централизирана процедура, при която оценката се извършва от ЕМА и експерти от целия ЕС, а РУ се издава от ЕК. Така издадено разрешението за употреба е валидно на територията на всички държави-членки на ЕС, Исландия, Норвегия (т.е. страните от ЕИП).

Централизираната процедура предлага хармонизиран регулаторен път за получаване на разрешение за употреба в ЕС и предоставя някои предимства пред заявителите/бъдещи ПРУ, включително бърз достъп до фармацевтичния пазар във всички държави-членки и осигуряване на по-бърз достъп до терапия за пациентите.

Някои видове лекарства попадат в задължителния обхват на централизираната процедура [5], например нови активни вещества предназначени за лечение на онкологични заболявания или HIV/СПИН и други вирусни заболявания, захарен диабет, автоимунни заболявания, биотехнологични продукти, лекарства за редки болести (orphan medicinal products), както и тези за модерна терапия (Advanced therapy medicinal products). Някои продукти могат да използват централизираните процедури, взаимно признаване или децентрализираните процедури, като нови активни вещества за лечение на заболявания извън обхвата на задължителната централизирана процедура или лекарства със значителна иновация и интерес за общественото здраве в целия ЕС.

Комитетът за лекарствени продукти за хуманна употреба (CHMP) е комитет на ЕМА, който отговаря за цялостната оценка на заявленията и документацията за издаване на разрешение за употреба по централизирана процедура, оценката на промените и разширяване на обхвата на съществуващите разрешения за употреба. Комитетът работи съвместно с Комитета за оценка на риска в областта на фармакологичната бдителност (PRAC) на ЕМА. PRAC оценява безопасността на предлаганите на пазара лекарствени продукти за хуманна употреба и, следвайки техните препоръки, CHMP може да посъветва Европейската комисия да направи промени в разрешението за употреба.

Комитетите се състоят от членове от всяка от държавите-членки на ЕС и от Исландия и Норвегия, плюс кооптирани членове, които предоставят допълнителна експертиза в определени научни области.

След положително становище от CHMP по отношение на заявление за разрешение за употреба, ЕМА изпраща становище до Европейската комисия да предостави на заявителя разрешение за употреба.

След като бъде предоставено от Европейската комисия, централизираното разрешение за употреба е валидно във всички държави-членки на ЕС, както и в страните от Европейското икономическо пространство (ЕИП) Исландия, Лихтенщайн и Норвегия.

Решенията на Комисията се публикуват в Регистъра на Общността на лекарствените продукти за хуманна употреба. ЕМА публикува Европейски публичен оценъчен доклад (EPAR) за всеки лекарствен продукт.

Когато ново заявление за разрешение за употреба бъде отказано, ЕМА публикува EPAR за отказ, включително документ с въпроси и отговори.

CHMP оценява документацията за качеството (производствени процеси, контрол и валидиране) на лекарствения продукт, съответствието с международните стандарти за добри практики и фармакопейните изисквания (ако има такива), механизъм на действие, фармакокинетиката, ефикасността при таргетната група пациенти, нежелани лекарствени реакции, План за управление на риска, подробностите за бъдещите последващи проучвания и информацията за продукта (включително Кратка характеристика на продукта), преди да препоръча на Европейската комисия да издаде Разрешение за употреба.

Обичайната централизирана процедура продължава 210 дни без да се включват периодите на clock-stop, при които компанията заявител следва да даде отговор на възникнали в хода на оценката въпроси или установени неясноти или непълноти в документацията на продукта. Максималната продължителност на спирането на часовника зависи от това колко време смята заявителят, че ще отнеме да отговори, и задължително предложението на компанията се дискутира на заседание на CHMP. Първото спиране на часовника обикновено продължава три месеца, а второто спиране на часовника един месец. Най-често оценката продължава около година.

Допълнително, този период се удължава от необходимостта да се оцени дали дадения продукт отговаря на критериите за централизирана процедура. За да разберат дали даден продукт може да бъде оценен по централизираната процедура, заявителите винаги подават заявление за допустимост, което трябва да се случи 18 до 7 месеца преди планираната дата за подаване [6]. При положително становище се номинират докладващ и съ-докладващ от членовете на Комитета за лекарствени продукти в хуманната медицина, а при лекарствен продукт, който е определен като такъв за модерна терапия (ATMP) винаги в екипа се включва и докладващ от САТ.

Времето за оценка може да бъде намалено до 150 дни вместо 210 дни, ако на компанията разработила лекарствения продукт бъде предоставена някаква възможност за ускорена оценка. Необходимостта от стимулиране на иновациите и по-бърз достъп до лечение на пациенти, с непокрити медицински нужди (особено за тези с редки болести) или някои животно-застрашаващи заболявания доведе до разработването на нови процедури за издаване на разрешение за употреба, които повтарят до известна степен стандартната централизирана процедура, но дават шанс на компаниите, които са се фокусирали в споменатите области на

медицината и на пациентите с такива заболявания за по-ранен достъп до лечение. Възможностите в тази посока са следните:

1. Първоначално разрешение въз основа на ограничени клинични данни: В повечето страни този път включва регулаторно одобрение въз основа на сурогатна или ранна крайна точка. РУ по този път трябва да бъде допълнено от допълнителни клинични данни, генерирани след разрешаването, както е посочено в ангажименти, като например ускорено одобрение в САЩ или разрешение за употреба под условие в ЕС (conditional MA)
2. Повтарящо се засилено взаимодействие между регулатора и заявителя. Тази опция се фокусира върху повишена честота на взаимодействия, започващи рано и продължаващи по време на разработването на лекарството и включва обозначения като пробив и бърз път в САЩ или приоритетна медицина (PRIME) в ЕС.
3. Съкратени пътища за оценка и издаване на РУ: предназначени са да съкратят сроковете за оценка на представената документация. Регулаторните агенции предоставят допълнителни ресурси за ускоряване на оценката. Това включва такива пътища като приоритетен преглед в САЩ или ускорена оценка в ЕС (accelerated assessment).

Ускорена процедура за издаване на разрешение за употреба (*Accelerated assessment*):

Ускорената оценка намалява срока за оценка на заявлението и документацията за разрешаване за употреба от СНМР. Заявленията може да отговорят на условията за ускорена оценка, ако СНМР реши, че продуктът представлява сериозен интерес за общественото здраве и терапевтичните иновации [7]. Все пак, съгласно съображение 33 и член 14, параграф 9 от Регламент (ЕО) № 726/2004 [8], заявителят може да поиска ускорена процедура за оценка, за да отговори по-специално на легитимните очаквания на пациентите и да вземе предвид все по-бързото напредъка на науката и терапиите за лекарствени продукти от голям интерес от гледна точка на общественото здраве и по-специално от гледна точка на терапевтичните иновации [9].

Ако СНМР приеме искането, времевата рамка за оценка ще бъде намалена на 150 дни. Тази времева рамка ще бъде разделена на 3 фази от 90+30+30 дни оценка. На заявителя ще бъде разрешено едномесечно спиране на часовника по подразбиране за подготовка на отговорите на Ден 90 по Списък с въпроси, и без спиране на часовника по подразбиране след Ден 120.

В случай на лекарствени продукти за модерна терапия, поради необходимостта от включване на повече научни комитети в прегледа на заявлението, 150-дневният график се адаптира по различен начин и обикновено се разделя на 2 фази от 120+30 дни на оценка.[10].

Заявителите, които искат ускорена процедура за оценка, следва надлежно да обосноват искането си и по-специално да обосноват очакванията си, че лекарственият продукт е от голям интерес за общественото здраве, особено от гледна точка на терапевтичните иновации. Обосновката трябва да включва основните очаквани ползи и да представя аргументи в подкрепа на твърдението, че лекарственият продукт въвежда нови методи на лечение или подобрява съществуващите методи, като по този начин адресира в значителна степен по-големите незадоволени нужди за поддържане и подобряване на общественото здраве. Ключовите елементи, които трябва да бъдат описани в обосновката, и подходящото ниво на детайлност трябва да се оценяват за всеки отделен случай.

PRIME

PRIME е схема, въведена от Европейската агенция по лекарствата (ЕМА) за подобряване на подкрепата за разработването на лекарства, които са насочени към неудовлетворени медицински нужди. Тази доброволна схема се основава на засилено взаимодействие и ранен диалог с разработчиците на обещаващи лекарства, за да се оптимизират плановете за развитие и да се ускори оценката, така че тези лекарства да могат да достигнат по-рано до пациентите [11].

PRIME се основава на съществуващата регулаторна рамка и вече налични инструменти, като научни съвети и ускорена оценка. Като се ангажира с компаниите, които разработват нови лекарства на ранен етап, PRIME има за цел да подобри генерирането на научни доказателства, така че данните да са достатъчни за оценка, когато се подадат заявлението и документацията за издаване на разрешение за употреба.

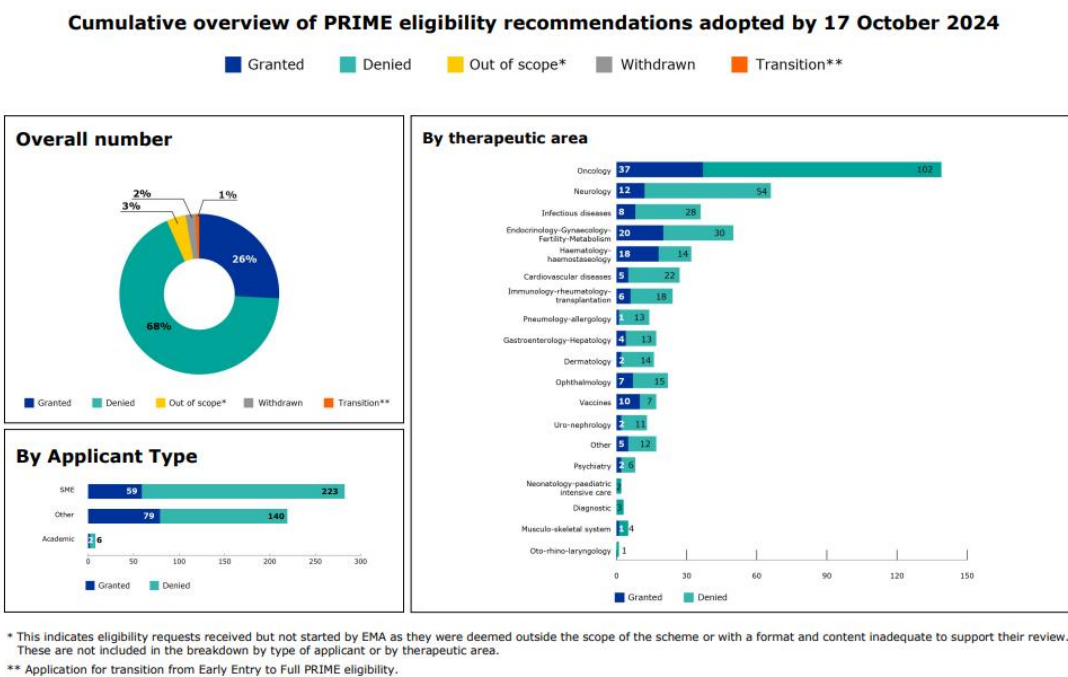
Критерии за допустимост [12]

Схемата PRIME се фокусира върху лекарства в процес на разработка, които все още не са разрешени в ЕС. Те са насочени към състояния с неудовлетворена медицинска нужда, за които не са налични терапевтични алтернативи или при които могат да предложат голямо терапевтично предимство пред съществуващите лечения. За да бъде прието за PRIME, дадено лекарство трябва да демонстрира потенциал да отговори на неудовлетворена медицинска нужда в значителна степен. Това може да означава, например, въвеждане на нови методи на лечение или подобряване на съществуващите.

За да докажат такъв потенциал, заявителите трябва да предоставят всички налични данни, показващи значимо подобрение на клиничните резултати, като например:

- повлияване на превенцията, началото и продължителността на дадено състояние;
- намаляване на заболяемостта (или болестността) или смъртността от дадено заболяване.

На фигура 1 е представена обобщената информация за броя подадени заявления за включване в PRIME и реално какъв брой лекарствени продукти са били достатъчно иновативни и от значение на здравеопазването, които са получили такава възможност.



Фигура 1. Броя подадени заявления за включване в PRIME и обобрани [13]

Всеки спонсор, ангажиран във фазата на разработване на проучвателното клинично изпитване, може да подаде заявка за влизане в схемата PRIME въз основа на наличието на предварителни клинични доказателства, за да демонстрира обещаваща активност на лекарствения продукт и неговия потенциал да отговори в значителна степен на неудовлетворена медицинска нужда (доказателство за концепцията).

Заявителите от академичните среди, както и микро-, малки и средни предприятия (SME) могат да подадат заявление за допустимост на по-ранен етап на разработване, ако разполагат с:

- убедителни неклинични данни в подходящ модел, които предоставят ранни доказателства за обещаваща активност на веществото/продукта (*proof-of-principle*) и
- първите изследвания върху хора (*first-in-human*) показват адекватна експозиция за желаните фармакотерапевтични ефекти и поносимост [14];

Разрешение за употреба под условие (*Conditional Marketing Authorisation*) – чл. 14а от Регламент 726/2004/ЕС и Регламент 507/2006/ЕС

Европейската агенция по лекарствата (ЕМА) подкрепя разработването на лекарства, които отговарят на незадоволени медицински нужди. В интерес на общественото здраве на заявителите може да бъде предоставено условно разрешение за употреба с такива лекарства въз основа на **по-малко изчерпателни клинични данни** от обикновено изискваните, когато ползата от незабавната наличност на лекарството надвишава риска, присъщ на факта, че все още са необходими допълнителни данни.

Лекарствата за хуманна употреба са допустими, ако са предназначени за лечение, профилактика или диагностика на сериозно инвалидизиращи или животозастрашаващи заболявания. Това включва лекарства сираци.

Използването му е предвидено и за спешни ситуации (напр. пандемия). За тези лекарства може да се приемат и по-малко изчерпателни фармацевтични и неклинични данни.

СНМР на ЕМА може да издаде условно разрешение за употреба за лекарствен продукт, ако установи, че са изпълнени всички от следните критерии:

- съотношението полза-риск на лекарството е положително;
- има вероятност заявителят да може да предостави изчерпателни данни след разрешението;
- лекарството отговаря на неудовлетворена медицинска нужда;
- ползата от незабавната наличност на лекарството за пациентите е по-голяма от риска, присъщ на факта, че все още са необходими допълнителни данни.

Разрешенията за употреба под условие са валидни за една година и могат да бъдат подновявани ежегодно, ако ПРУ изпълни конкретни задължения в рамките на определени срокове. Тези задължения могат да включват завършване на текущи или нови проучвания или събиране на допълнителни данни, за да се потвърди, че съотношението полза/риск на лекарствения продукт остава благоприятно.

Rolling Review (текуща оценка):

Текущата (непрекъсната) оценка е регулаторен инструмент, който ЕМА използва, за да ускори оценката на обещаващо лекарство или ваксина по време на извънредна ситуация за общественото здраве. За първи път този подход беше въведен при възникване на пандемията от Covid-19. Обикновено всички данни за ефикасност, безопасност и качеството на лекарството и всички необходими документи трябва да бъдат представени в началото на оценката в официално заявление за разрешение за употреба. При тази процедура СНМР оценява данните от текущи проучвания, когато станат достъпни, преди да бъде подадено официално заявление. След като СНМР реши, че са налични достатъчно данни, официалното заявление може да бъде подадено от компанията. Като преглежда данните, когато станат налични, СНМР може да достигне до своето становище по-рано дали лекарството или ваксината могат да бъдат разрешени за употреба или не.

По време на текущия преглед и по време на пандемията ЕМА и нейните научни комитети бяха подкрепени от работна група на ЕМА за пандемията COVID-19 (COVID-ETF).

Разрешение за употреба при изключителни обстоятелства (*MA under exceptional circumstances*)

Правното основание за разрешението за употреба при извънредни обстоятелства е член 14, параграф 8 от Регламент (ЕО) № 726/2004, а съответната документация за заявления при извънредни обстоятелства е посочена в част II от приложение I на Директива 2001/83/ЕО,

както е изменена [15]. Тази процедура е особено приложима за лекарства сираци и много редки заболявания, ако са изпълнени критериите за одобрение при изключителни обстоятелства.

Разрешението за употреба при извънредни обстоятелства е правен инструмент за насърчаване на ускорения достъп на пациентите до лекарствени продукти, включително лекарствени продукти за модерна терапия, за които изчерпателните данни за безопасност и ефикасност и клинични доказателства, необходими за стандартно разрешение за употреба, никога не се очаква да бъдат напълно получени от заявителя.

Критериите за приемане и издаване на РУ при изключителни обстоятелства са следните [16, 17]:

- състоянието, за което е предназначен въпросният продукт, се среща толкова рядко, че не може разумно да се очаква от заявителя да предостави изчерпателни клинични доказателства, или
- при настоящото състояние на научните познания не може да бъде предоставена изчерпателна информация, или
- би било в противоречие с общоприетите принципи на медицинската етика събирането на такава информация;

Независимо от това, наличните данни трябва да показват, че ползите от лекарството превишават рисковете (положително съотношение полза-риск) и заявителят е длъжен непрекъснато да уведомява компетентните органи за всеки инцидент, свързан с употребата на лекарствените продукти и действията, които трябва да бъдат предприети взети. Разрешението, предоставено при изключителни обстоятелства, се преразглежда ежегодно, за да се преоцени съотношението полза-риск, в годишна процедура за преоценка, провеждана от ЕМА.

Друго особености на РУ при изключителни обстоятелства:

- Лекарствата, получили статут на лекарства-сираци са допустими за РУ при изключителни обстоятелства само ако отговарят на споменатите критерии.
- КХП и листовката с упътвания трябва да посочват, че е издадено разрешение за употреба, което е предмет на определени специфични задължения, които трябва да се преразглеждат ежегодно.
- Подновяването на разрешението за употреба на лекарствен продукт при изключителни обстоятелства следва същите правила като „нормалното“ разрешение за употреба. След 5 години разрешението за употреба ще бъде подновено при изключителни обстоятелства за неограничен период от време, освен ако компетентният орган не реши, въз основа на основателни причини, свързани с фармакологичната бдителност, да продължи с едно допълнително петгодишно подновяване [18].

Роля и място на Изпълнителна агенция по лекарствата:

След присъединяването на България към ЕС през 2007 година страната ни участва в заседанията на различните комитети и работни групи към ЕМА, както следва: Комитет за лекарствени продукти в хуманната медицина, Комитет за лекарства сираци, Комитет за модерни терапии, а в последствие и в Комитета за фармакологична бдителност.

През годините членове на СНМР са били проф. Димитър Терзииванов, доц. Иванка Атанасова (заместник), проф. Мила Власковска, д-р Мария Попова (заместник, ИАЛ), проф. Илко Гетов, Велислава Тодорова (заместник, ИАЛ) и д-р Любина Тодорова (ИАЛ) и Гергана Лазарова (заместник, ИАЛ).

След първоначално натрупване на регулаторни знания, експертиза и опит представителите на България и ИАЛ в СОМР и СНМР участваха в множество процедури:

Д-р Л. Тодорова, като член на Комитета за лекарства сираци (СОМР) беше докладващ (Rapporteur) по 26 заявления за даване на статут на лекарство сирак на нови активни вещества и 2 процедури за поддържане статуса на лекарство-сирак по време на разрешаване на употреба.

Представителите на ИАЛ участват в мултинационални екипи, съвместно с регулаторните агенции на Германия и Австрия като докладващи (Rapporteur) и съ-докладващи (Co-Rapporteur) в оценката на документация за издаване на разрешение за употреба на нови лекарствени продукти по централизирана процедура:

Рецензии (peer-review) в хода на процедура за оценка на документация за издаване на РУ: 12 броя

Даване на научни консултации (Scientific advice) – 5 броя

Процедури за промяна в разрешенията за употреба: 1 за (голяма) промяна тип II, 3 промени тип IB, за продукт по който България е основен докладващ.

Съвместно с VFarM - оценка на модул 4 (Non-clinical) на ново активно вещество от групата на ДНК-гиразните инхибитори;

Съвместно с BAGS – оценка на модул 4 (Non-clinical) в многонационален екип за ново активно вещество от групата на Janus-киназа инхибитори, както и при оценка на моноклонално анти тяло по типа „добре установена употреба“.

Един от оценъчните доклади в изготвянето на който участва екип от България съвместно с BAGS, на вътрешна за СМНР процедура беше определен за най-добър оценъчен доклад за месец януари 2021 г.

През 2023 година България е съ-докладващ по арбитражна процедура по чл. 30 от Директивата, за хармонизиране на продуктовата информация на ваксините Navrix. Самостоятелно, а в последствие и съвместно с Италия (като основен докладчик) беше изготвен оценъчен доклад и направено предложение за уеднаквяване на текстовете на КХП и ЛП на всички ваксини с търговско име Navrix на територията на ЕС и ЕИП.

Процедурата включваше оценка на над 38 клинични изпитвания с различна давност и 45 научни публикации през годините от преди първото разрешаване за употреба на лекарствените продукти до момента. Арбитражната процедура приключи успешно (с консенсус от страна на СМНР и CMDh) през лятото на 2024 г на ниво СМНР и с решение за изпълнение на ЕК.

Перспективи:

По-голямата част от екипа оценители на ИАЛ е от млади хора, които имат възможности и желание да развият своя научен потенциал и да натрупат регулаторен опит. ЕК подкрепя развиването на нови оценители като дава възможност за текущо (непрекъснато) обучение под ръководството и надзора на водещи експерти от различни държави-членки по конкретни раздели от досието на лекарствените продукти (проект Increase). Целта на проекта и желанието и амбицията на ИАЛ е да направим научната експертиза от България по-видима на европейската регулаторна сцена.

Литература

1. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9(3):203-14.
2. Eichler HG, Pignatti F, Flamion B, Leufkens H, Breckenridge A. Balancing early market access to new drugs with the need for benefit/risk data: a mounting dilemma. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(10):818-26.
3. European Commission. DIRECTIVE 2001/83/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on the Community code relating to medicinal products for human use. *Official Journal of the European Communities*. November 28, 2001, Vol. L 311, pp. 0067-0128
4. European Commission, ENTERPRISE DIRECTORATE-GENERAL. Notice to Applicants. *The Rules governing Medicinal Products in the European Community*. Rev. 5. Brussels : European Commission, 2007, Vol. 2A, 2, pp. 7
5. Европейски парламент и Съвета. РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 726/2004 НА ЕВРОПЕЙСКИЯ ПАРЛАМЕНТ И НА СЪВЕТА за установяване на процедури на Общността за разрешаване

- и контрол на лекарствени продукти за хуманна и ветеринарна употреба и създаване на ЕМА. *Официален вестник на ЕС*. март 31, 2004, pp. 1-33
6. ЕМА, Human Medicines Division [Internet]. Pre-authorisation guidance. *EMA Web site*. October 24, 2024. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/european-medicines-agency-pre-authorisation-procedural-advice-users-centralised-procedure_en.pdf. EMA/821278/2015.
 7. European Medicines Agency. [Internet] Accelerated assesment. *EMA Web site*. 2021-2024. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/marketing-authorisation/accelerated-assessment>.
 8. Европейски парламент и Съвета. РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 726/2004 НА ЕВРОПЕЙСКИЯ ПАРЛАМЕНТ И НА СЪВЕТА за установяване на процедури на Общността за разрешаване и контрол на лекарствени продукти за хуманна и ветеринарна употреба и създаване на ЕМА. *Официален вестник на ЕС*. март 31, 2004, pp. 1-33
 9. ЕМА. [Internet] Accelerated assessment. *EMA Web site*. February 17, 2021. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/marketing-authorisation/accelerated-assessment>
 10. European Medicines Agency. [Internet] Procedural timetables. *EMA Web site*. December 18, 2020. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/marketing-authorisation/submission-dates/procedural-timetables>. EMA/347524/2016 Rev. 6
 11. ЕМА. [Internet] PRIME: Priority medicines. *EMA Web site*. October 3, 2024. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/european-medicines-agency-guidance-applicants-seeking-access-prime-scheme_en.pdf. EMA/7872/2021
 12. European Medicines Agency. [Internet] PRIME: Priority medicines. *EMA Web site*. 2016 - 2023. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/research-development/prime-priority-medicines>
 13. EMA Press Office. [Internet] Recommendations on eligibility to PRIME scheme. *EMA Web site*. October 23, 2024. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/chmp-annex/recommendations-eligibility-prime-scheme-adopted-chmp-meeting-14-17-october-2024_en.pdf. EMA/457029/2024
 14. European Medicines Agency . Guidance for applicants seeking access to PRIME scheme . [Online] 10 03 , 2024. EMA/7872/2021.
 15. Европейски парламент и Съвета. РЕГЛАМЕНТ (ЕО) № 726/2004 НА ЕВРОПЕЙСКИЯ ПАРЛАМЕНТ И НА СЪВЕТА за установяване на процедури на Общността за разрешаване и контрол на лекарствени продукти за хуманна и ветеринарна употреба и създаване на ЕМА. *Официален вестник на ЕС*. март 31, 2004, pp. 1-33
 16. ЕМА, Human Medicines Division [Internet]. Pre-authorisation guidance. *EMA Web site*. October 24, 2024. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/european-medicines-agency-pre-authorisation-procedural-advice-users-centralised-procedure_en.pdf. EMA/821278/2015.
 17. ЕМА, [Internet] Pre-authorisation Evaluation of Human Medicines. *Guideline on procedures for the granting of a marketing authorisation under exceptional*. London : EMA, 2005. EMEA/357981/2005.
 18. ЕМА, Human Medicines Division [Internet]. Pre-authorisation guidance. *EMA Web site*. October 24, 2024. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/european-medicines-agency-pre-authorisation-procedural-advice-users-centralised-procedure_en.pdf. EMA/821278/2015.

EFFECT OF CANNABIDIOL ON LEARNING AND MEMORY IN EXPERIMENTAL MODEL OF IMPAIRED MEMORY

Maria Georgieva-Kotetarova, Iliа Kostadinov, Ilin Kandilarov, Hristina Zlatanova-Tenisheva, Natalia Vilmosh, Delian Delev

Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Medical Faculty, Medical University of Plovdiv

ABSTRACT

Introduction: Cannabidiol (CBD) is a non-psychotomimetic phytocannabinoid found in Cannabis sativa plant. Experimental evidence indicates that CBD possess antioxidant, anxiolytic effects and neuroprotective effects in neurodegenerative conditions such as Alzheimer's disease and multiple sclerosis.

Aim: The aim of the present study was to evaluate the effect of cannabidiol on the processes of learning and memory in scopolamine -induced memory impairment.

Materials and methods: Male Wistar rats were divided into 5 groups (n=8). The animals were treated orally for 14 days as follows: the 1st and the 2nd group received olive oil; 3rd, 4th and 5th – CBD 2.5, 5 and 10 mg/kg bw respectively. After two-week period learning ability and memory retention were evaluated using Novel object recognition test (NORT) and elevated T-maze test. Memory impairment was induced on the days of the experiment 30 minutes after administration of the substances by applying scopolamine 1 mg/kg bw intraperitoneally to groups 2 to 5. The recognition index and spatial memory index were registered in NORT and T-maze test respectively. Statistical analyses were performed using SPSS 19.

Results: In the novel object recognition test CBD in dose 10 mg/kg showed significantly increased recognition index compared to the scopolamine-treated control group. In the T-maze test animals treated with 2,5 and 10 mg/kg bw significantly increased spatial memory index compared to the control group with memory impairment.

Conclusion: Cannabidiol improved learning and memory in scopolamine-induced memory in a non-dose-dependent manner.

Key words: neuroprotection, cannabidiol, memory, learning, novel object recognition, T-maze, scopolamine

ЕФЕКТ НА CANNABIDIOL ВЪРХУ ПРОЦЕСИТЕ НА ОБУЧЕНИЕ И ПАМЕТ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА УВРЕДЕНА ПАМЕТ

Георгиева-Котетарова М, Костадинов И, Кандиларов И, Златанова-Тенишева Х, Вилмош Н, Делев Д.

Катедра „Фармакология и клинична фармакология“, Медицински факултет, Медицински Университет Пловдив

Въведение

Терапевтичните ползи от приложението на канабис са известни от древността. В традиционната китайска медицина канабис се е използвал за лечение на астма, малария и подагра, а в Индия за невралгии, конвулсии и мигрени [1]. През 19-ти век употребата на канабис става много популярна в Европа и САЩ, където етанолни екстракти от канабис (известни като канабисова тинктура) също били използвани за лечение на различни нарушения като конвулсии при кърмачета, тетанус, холера и бяс [2]. През 19-ти век в Бразилия е използван

чай от "maconha" (бразилско име за марихуана) за успокоение, а в началото на 20-ти век са предлагани цигари, съдържащи *Cannabis indica* за лечение на безсъние [3].

Основни фитоканабиноиди в състава на *Cannabis sativa* са делта-9-тетрахидроканадиол (THC) и канабидиол (CBD). THC притежава психоактивни свойства, води до зависимост и може да предизвика психоза, докато канабидиол е биоактивна, непсихогенна субстанция. Канабидиол е изолиран от *Cannabis sativa* през 1940, но структурата му е установена през 1963 г. Заради липсата на психоактивно действие изследванията върху канабидиол са били пренебрегнати в продължение на години [4].

През последните десетилетия научният интерес към канабидиол е засилен поради широките му терапевтични свойства при редица невропсихиатрични разстройства - антипсихотично, аналгетично, антиконвулсивно, антиеметично, противовъзпалително, анксиолитично действие [5,6]. Редица предклинични проучвания установяват подобряване на работната, разпознавателната и пространствената памет при няколко невродегенеративни модела, включително модел на болестта на Алцхаймер (AD), както след хронично, така и при остро приложение на CBD [7]. *In vitro* изследвания установяват, че CBD притежава невропротективен ефект, предотвратява хипокампадна и кортикална невродегенерация, има противовъзпалителни, антиоксидантни и антиапоптоични свойства, намалява тау хиперфосфорилирането и регулира миграцията на микроглиални клетки [8,9].

Целта на нашето проучване е да изследваме ефектите на канабидиол върху процесите на обучение и памет при скополамин-индуцирано мозъчно увреждане.

Материал и методи

1. Приготвяне на субстанциите

Канабидиолът се приготвя като 0,1% маслен разтвор, от който се прилагат 0,25мл/100г, 0,5мл/100г и 1мл/100г съответно за дозите 2,5мг/кг, 5мг/кг и 10мг/кг. Животните от двете контролни групи се третират със зехтин 1мл/100г т.м. Посочените обеми се въвеждат перорално с помощта на стомашна сонда и са в съответствие с препоръките в достъпната ни литература. (Washington State University)

Скополаминът се приготвя като 1% воден разтвор, който се поставя интраперитонеално в експерименталните дни в доза 0,1мл/100г т.м.

2. Експериментални животни

Изследването е проведено в съответствие с разрешително № 257/2019, издадено от Българска Агенция по Безопасност на Храните и с одобрение на Етична комисия при Медицински Университет Пловдив.

В експеримента са използвани 40 бели мъжки плъха, порода Wistar с тегло (200±20г), осигурени от Вивариум при Медицински Университет Пловдив. Животните са разпределени в 5 групи по 8 плъха и са отглеждани при стандартни лабораторни условия – 12-часов цикъл светлина/тъмнина, температура 20±2⁰С с неограничен достъп до храна и вода. Разпределението на животните по групи е представено на Таблица 1.

Таблица 1. Разпределение на експерименталните групи

Група	Експериментална субстанция	Доза	Индукция на паметово увреждане
I	Зехтин	1ml/100g b.w.	
II	Зехтин	1ml/100g b.w.	Да Scopolamine 1мг/кг
III	CBD	2.5мг/кг	Да Scopolamine 1мг/кг
IV	CBD	5мг/кг	Да Scopolamine 1мг/кг
V	CBD	10мг/кг	Да Scopolamine 1мг/кг

3. Дизайн на експеримента

Животните от всички групи се третират ежедневно в продължение на 14 дни с посочените в Таблица 1 вещества и дози. На 15^{-и} ден от началото на опита започва индуцирането на увреждане на паметта чрез интраперитонеално инжектиране на Scopolamine, 30 мин. след прилагане на експерименталните субстанции. Половин час по-късно по-късно се пристъпва провеждане на тестове за оценка на пространствената и разпознавателна памет чрез повдигнат Т лабиринт и опознавателен тест. Индуцирането на паметово увреждане се извършва през всички дни на тестовете. Дизайнът на проучването е схематично представен на Фигура 1.



Фигура 1. Дизайн на експеримента

3. Тест за разпознавателна памет

Тестът се провежда в три последователни дни. Първият и вторият ден са тренировъчни. Първият ден тестваният плъх се поставя в апарат „открито поле“ за 5 мин за опознаване на обстановката. Вторият ден в противоположните краища на апарата са поставени два идентични обекта, които плъха обследва за 10мин, след което се връща в клетката. На третия ден се провежда тестовата фаза, при която единия от вече познатите обекти се заменя с нов, различен по форма. Плъхът се оставя да изследва обектите в продължение на 3 мин. Отчита се времето прекарано в обследване на всеки от обектите и общото време на изучаване. Показател за разпознавателната памет е разпознавателният индекс – РИ, който се изчислява по следната формула:

$$РИ = \frac{\text{изследване нов обект}}{\text{общо време на изследване на обектите}}$$

Повишаването на РИ е критерий за по-добра разпознавателна памет [10].

4. Повдигнат Т лабиринт

Устройството с форма на буква „Т“ е повдигнато на 50см над повърхността на пода. Животните се оставят без храна за 24 часа преди провеждането на теста. Този метод включва една опознавателна сесия, при която едното рамо на Т-лабиринта е затворено, а в другото – отворено и в него е поставена храна (награда). Опитното животно се поставя в основата на вертикалата със свободен достъп до наградата като се очаква да я намери. Следват 10 тренировъчни сесии. При тях се отваря и второто рамо на апарата. Наградата се поставя на същото място като при тренировъчната сесия. Гризачът отново се оставя в основата на вертикалното рамо със свободен достъп до наградата. Ако животното не желае да се движи, се изчаква две минути, след което се сваля от апарата. Изчислява се индекс на пространствена памет (ИПП) посредством формулата:

$$ИПП = \frac{\text{брой правилни избори}}{\text{общ брой сесии}}$$

Повишаването на ИПП е критерий за по-добра пространствена памет [11].

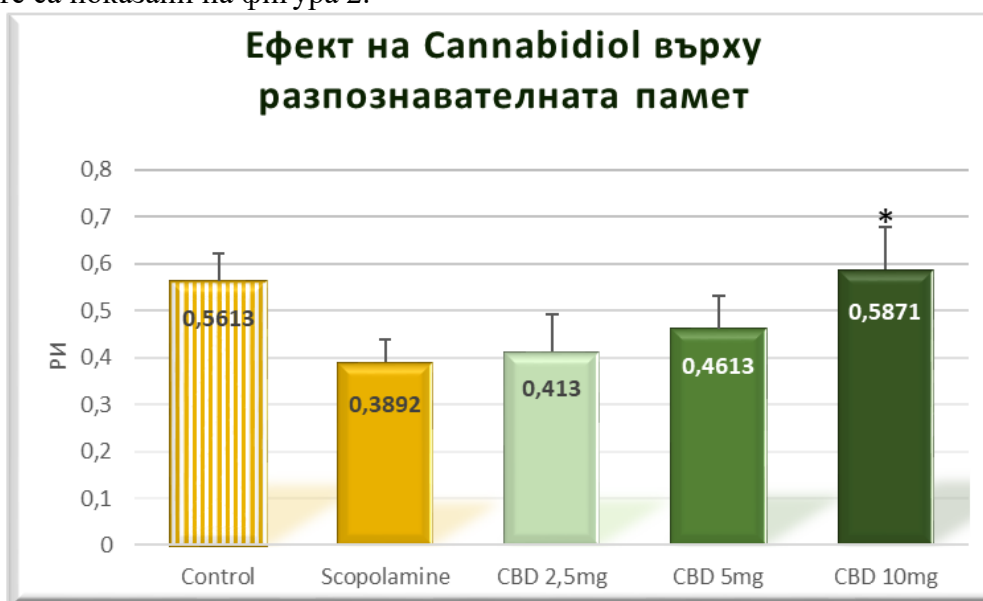
5. Статистически анализ

Статистическата обработка на получените резултати се извършва със софтуер IBM SPSS 19.0. За определяне на разпределението се провежда тест на Kolmogorov-Smirnov. За всеки показател се определя средна аритметична стойност (mean), и стандартна грешка на средната аритметична (\pm SEM). Сравняването на резултатите се извършва с One Way ANOVA тест и LSD Post Hoc анализ. За статистически значими се приемат резултати при уroveň на значимост $p < 0,05$.

Резултати

1. Тест за разпознавателна памет

CBD в доза 10 mg/kg т.м. увеличава статистически значимо РИ в сравнение с позитивната контролна група, третирана със скополамин ($p < 0,05$). Такъв ефект не се наблюдава при плъховете, получили CBD в дози от 2,5 mg/kg и 5 mg/kg. При съпоставянето на двете контролни групи се отчита единствено тенденция за намаляване на разпознавателната памет. Резултатите са показани на фигура 2.

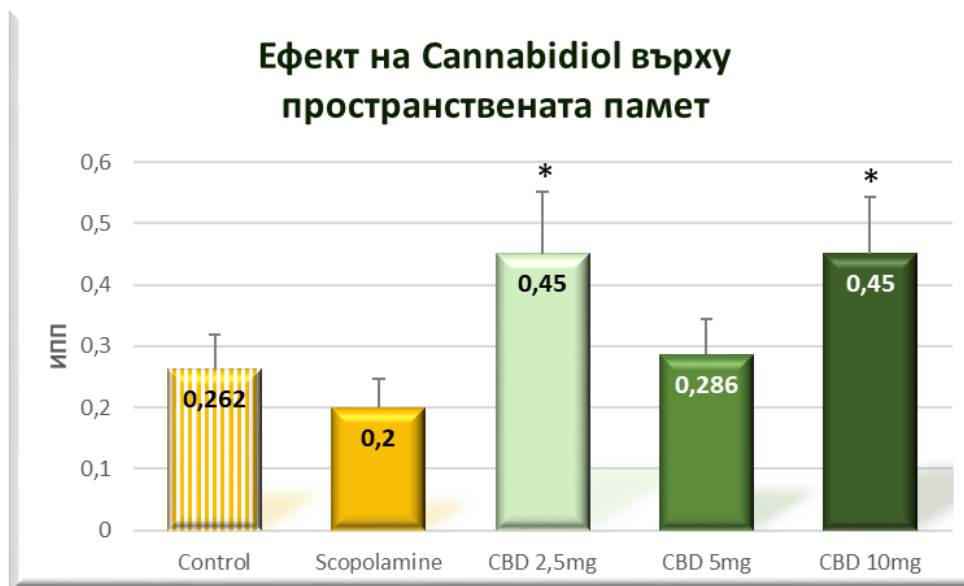


Фигура 2. Ефект на Cannabidiol върху разпознавателната памет

* Сигнификантно увеличаване на РИ спрямо позитивната контролна група, третирана със Scopolamine

2. Повдигнат Т лабиринт

ИПП е сигнификантно увеличен в групите, третирани с CBD в дози от 2,5mg/kg и 10mg/kg, но не и при плъховете, получавали CBD 5mg/kg, в сравнение с позитивната контрола със Scopolamine. При съпоставянето на двете контролни групи не се открива статистически значимо понижение на пространствената памет при животните, третирани със Scopolamine. Резултатите са представени на фигура 3.



Фигура 3. Ефект на Cannabidiol върху пространствената памет

* Сигнификантно увеличаване на ИПП спрямо позитивната контролна група, третирана със Scopolamine

Дискусия

При нашето проучване за увреждане на паметта на опитните животни прилагаме скополамин, доказан инхибитор на холиергичната медиация. Ацетилхолинът (ACh) и холинергините неврони в хипокампа и кортекса имат съществено значение за регулиране на процесите на обучение и памет. Установено е, че дегенерацията на неврони, водеща до дисфункция на холинергичната система, е най-значимата промяна при болест на Alzheimer (AD). Това дава основание за широкото използване на скополамин за индуциране на AD-подобна патология *in vivo* и *in vitro*. Скополаминът може да компрометира процесите на обучение, значително да намали активността на ACh и може да повиши оксидативния стрес в хипокампа и префронталния кортекс при мишки [12].

В научната литература са описани голям брой методи, изследващи процесите на обучение и памет при гризачите, всеки от които има свои предимства и недостатъци.

Тестът за разпознаване на нов обект е често използван метод в проучванията, засягащи процесите на памет и обучение. Той се основава на спонтанното поведение на гризачите и вроденото им любопитство [13]. Този метод е бърз, лесен за приложение и в него участват много зони на ЦНС [14]. В допълнение позволява анализирането не само на процесите на памет и обучение, но и на интереса към изучаване на среда и нови обекти, разпознаване на вече позната обстановка и участието на различни зони в ЦНС върху тези процеси [15]. Тези характеристики го правят подходящ скринингов тест за установяване на потенциален ефект върху процесите на паметта на нови лекарствени молекули.

Повдигнатият Т лабиринт е метод за оценка на специфични аспекти на пространствената работна памет [11], който се характеризира с минималното стресиране на опитните животни в сравнение с други апарати и процедури [16]. Различните протоколи на експеримента позволяват изследването на запаметяването на информация, необходима за изпълнение на текуща задача (базов протокол) или за нейни различни вариации (алтернативен протокол) [11]. Тези предимства на повдигнатия Т лабиринт са причина той да бъде избран в настоящето проучване за оценка на ефекта на CBD върху пространствената работна памет (базов протокол).

При нашето проучване CBD подобрява разпознавателния индекс и пространствената памет при различни дози, което вероятно е свързано с многобройните му механизми на действие.

Ендогенната канабиноидна система (eCB) играе важна роля в различни физиологични функции, включително невропротекция, синаптична пластичност, памет. Канабиноидният рецептор тип (CB1) е основният рецептор на eCB системата в мозъка с високи нива на експресия в региони, участващи в когнитивната функция, включително префронталния кортекс и хипокампа [17]. CBD има слаб афинитет към CB1 и CB2 рецепторите, но може индиректно да активира CB1 рецепторите чрез повишаване нивата на ендогенни ендоканабиноиди. Проучванията върху модели на гризачи показват, че фармакологичното активиране на eCB системата чрез CB1-рецепторни агонисти води до намален поведенчески отговор към неприятни спомени чрез инхибиране на повторното консолидиране на паметта [18].

Освен това е установено, че системното приложение на CBD на мишки повишава нивата на Ach в мозъка в рамките на часове. Следователно има доказателства за връзка между канабидиола, холинергичната невротрансмисия и когнитивната функция [19].

В достъпната ни литература редица проучвания при различни предклинични модели на когнитивно увреждане потвърждават, че CBD подобрява паметовите способности. Osborne et al. изследват ефекта на канабидиол върху когнитивните способности при експериментален модел на шизофрения, предизвика чрез пренаталната инфекция с полиинозинова-полицитидилова киселина (poly I:C), синтетичен двуверижен РНК вирус [20]. Работната памет и разпознавателната способност са оценени чрез разпознавателен тест (novel object recognition test, NORT) и Т-лабиринт с подкрепление, използвани и при нашето проучване, а тестът за социално взаимодействие е използван за оценка на общителността. Приложението на CBD значително е повишило разпознавателния индекс, подобрило е работната памет и социалното взаимодействие, без да влияе на общото телесно тегло, приема на храна или вода като ефекта не се наблюдава при контролните животни [20]. Допълнително е установявано, че продължителното третиране с канабидиол в доза 10 mg/kg предотвратява увреждането на паметта при плъхове с модел на пневмококов менингит при тест за пасивно избягване с наказателно подкрепление [21].

Заклучение

Резултатите от нашето проучване ни позволяват да заключим, че канабидиол подобрява процесите на обучение и памет при скополамин-индуцирано мозъчно увреждане, ефект независим от дозата.

Признателност: Настоящото проучване е финансирано от МУ-Пловдив, ДПДП 9/2020 г.

Литература

1. Maule WJ. Medical uses of marijuana (*Cannabis sativa*): fact or fallacy? *Br J Biomed Sci.* 2015;72(2):85–91.
2. Fraguas-Sanchez AI, Torres-Suarez AI. Medical use of cannabinoids. *Drugs.* 2018; 78:1665-1703.
3. Carlini E.A., Cunha J.M. Hypnotic and antiepileptic effects of cannabidiol. *J Clin Pharmacol.* 1981; 21 (S1):417S-427S.
4. Reddy D.S. The utility of cannabidiol in the treatment of refractory epilepsy. *Clin Pharmacol Ther.* 2017; 101(12):182-184.
5. Campos AC, Moreira FA, Gomes FV, Del Bel EA, Guimaraes FS. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci.* 2012;367:3364-3378.
6. Blessing E.M., Steenkamp M.m., Mazanares J, Marmar C.R. Cannabidiol as a potential treatment for anxiety disorders. *Neurotherapeutics.* 2015; 12 (4): 825–836.
7. Kozela E, Krawczyk M, Kos T, Juknat A, Vogel Z, Popik P. Cannabidiol improves cognitive impairment and reverse cortical transcriptional changes induced by ketamine, in schizophrenia-like model in rats. *Mol Neurobiol.* 2020; 57:1733-1747.

8. da Silva VK, de Freitas BS, Garcia RCL, Monteiro RT, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JAS, Schroeder N. Antiapoptotic effects of cannabidiol in an experimental model of cognitive decline induced by brain iron overload. *Transl Psychiatry*. 2018; 8:176.
9. Watt G, Karl T. In vivo evidence for therapeutic properties of cannabidiol (CBD) for Alzheimer's disease. *Front Pharmacol*. 2017; 8:20.
10. Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V. *et al.* Object recognition test in mice. *Nat Protoc* 8, 2013: 2531–2537.
11. Wenk GL. Assessment of spatial memory using the T maze. *Curr Protoc Neurosci*. 2001; Chapter 8: Unit 8.5B.
12. Liu Z, Qin G, Mana L, Dong Y, Huang S, Wang Y, Wu Y, Shi J, Tian J, Wang P. GAPT regulates cholinergic dysfunction and oxidative stress in the brains of learning and memory impairment mice induced by scopolamine. *Brain Behav*. 2020; 10:e01602.
13. Pitsikas N. The role of nitric oxide in the object recognition memory. *Behav Brain Res*. 2015; 285: 200-7.
14. Lueptow LM. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J Vis Exp*. 2017; (126): 55718.
15. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*. 2012 May;13(2):93-110.
16. Davis KE, Burnett K, Gigg J. Water and T-maze protocols are equally efficient methods to assess spatial memory in 3xTg Alzheimer's disease mice. *Behav Brain Res*. 2017; 331: 54-66.
17. Lu, H.-C., Mackie, K. An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol Psychiatry*. 2016; 79: 516–525.
18. Elms L, Shannon S, Hughes S, Lewis N. Cannabidiol in the treatment of posttraumatic stress disorder: a case series. *J Altern Complement Med*. 2019;25:392-7.
19. Naranjo CJ, Osborne AL, Weston-Green K. Effect of cannabidiol on muscarinic neurotransmission in the pre-frontal cortex and hippocampus of the poly I:C rat model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019; 94:109640.
20. Osborne AL, Solowij N, Babic I, Huang XF, Weston-Green K. Improved social interaction, recognition and working memory with cannabidiol treatment in a prenatal infection (poly I:C) rat model. *Neuropsychopharmacology*. 2017; 42(7): 1447-1457.
21. Barichelo T, Ceretta RA, Generoso JS, Moreira AP, Simoes LR, Comim CM, Quevedo J, Vilela MC, Zuardi AW, Crippa JA, Teixeira AL. Cannabidiol reduces host immune response and prevents cognitive impairments in Wistar rats submitted to pneumococcal meningitis. *Eur J Pharmacol*. 2012; 697:158-64.

PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF MOMORDIN 1C - A REVIEW

Melis Ahmedova, Mehmed Reyzov, Silvia Gancheva

Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine,
Medical University of Varna

ABSTRACT

Introduction: Momordin Ic (MIc) is a natural triterpenoid derived from *Kochia scoparia*. Currently, there are no reviews available in the scientific literature about its biological activities.

Objective: Present review aims to summarise the available information about the biological effects of MIc.

Methods: Pubmed and Google Scholar databases were searched using the keyword “momordin Ic”. Nineteen publications were considered relevant to the topic.

Results: MIc has been primarily studied for its effects on GIT. MIc possesses a gastroprotective action and inhibits gastric emptying in experimental animals mainly by activating capsaicin-sensitive nerves. Additionally, MIc suppresses the intestinal glucose absorption, thus producing an antihyperglycemic action, and inhibits pancreatic lipase activity. In a model of acute liver damage, MIc has demonstrated a hepatoprotective effect through activation of the liver antioxidant defense system. Further *in vitro* studies have confirmed the reported antioxidant action. MIc inhibits intracellular inflammatory pathways mainly by acting as a sentrin-specific protease 1 (SEN1) inhibitor which leads to accumulation of sumoylated proteins in the macrophages and reduced activation of NF- κ B signaling. The inhibition of SEN1 is one of the mechanisms of the anticancer activity of MIc that has been demonstrated in recent *in vitro* and *in vivo* studies. Furthermore, MIc induces apoptosis of malignant cells through oxidative stress-regulated mitochondrial dysfunction involving pathways like MAPK and P13K.

Conclusion: MIc appears to be a multifunctional bioactive compound with potential applications in various pathological conditions, incl. metabolic disturbances, inflammation, and cancer. However, clinical trials are necessary to clarify its efficacy and safety in humans.

Key words: momordin Ic, *Kochia scoparia*, inflammation, cancer

Introduction

Natural products are continuously evaluated in preclinical and clinical studies to detect pharmacological activities and therapeutic potential. Momordin Ic (M1c) is oleanolic acid-3-O- β -D-xylopyranose(1 \rightarrow 3) β -D-pyranoid glucose – a pentacyclic triterpenoid derived from oleanolic acid (Fig. 1). M1c is found in various Chinese traditional plants and is considered to be the main biologically active substance isolated from the fruits and seeds of *Kochia scoparia* [1]. *Kochia scoparia* has been used for centuries by traditional Eastern medicine for its beneficial effects in chronic disorders, incl. diseases of skin, eyes and urinary tract and disturbances of energy metabolism such as obesity and type 2 diabetes. The fruits and seeds of *Kochia scoparia* contain high amounts of biologically active substances such as triterpenoids (e.g. M1c and oleanolic acid), flavonoids, phytoecdysteroids and essential oils [1-3]. The biological activities of most of these substances is well documented. However, currently there are no reviews available in the scientific literature about the biological activities of M1c.

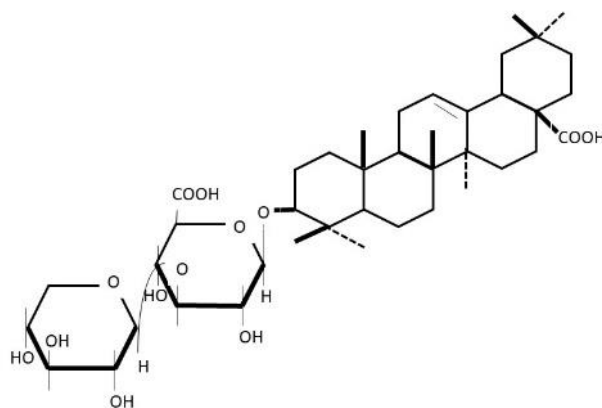


Fig. 1. Chemical structure of Momordin Ic.

Materials and methods

The purpose of the present review was to summarize the available information about the potential biological effects of M1c *in vitro* and *in vivo* and the related molecular pathways. Databases Pubmed and Google Scholar were searched using the keyword “momordin 1c”. A total of 19 publications were considered relevant to the topic.

Results

Effects on gastrointestinal tract and anti-diabetic properties

M1c has been primarily studied for its effects on carbohydrate metabolism because in traditional Chinese medicine *Kochia scoparia* is included in the therapy of metabolic disorders such as type 2 diabetes and obesity. The results of the experimental research have concluded that M1c affects the carbohydrate metabolism peripherally – in the gastrointestinal tract.

In summary, M1c affects gastric emptying and intestinal motility, possesses a gastroprotective action, and inhibits the absorption of glucose and lipids in experimental animals.

In mice, M1c suppresses gastric emptying. The action is potentiated by coadministration of parenteral glucose, indicating that the effect is glucose-dependent. Moreover, pretreatment with capsaicin reduces the observed effect thus showing that the mechanism is related, at least partially, to action on capsaicin-sensitive sensory nerves [4]. Stimulation of local release and/or production of dopamine is likely to contribute to the suppressive effect on gastric emptying [5]. Surprisingly, another experimental study has concluded that M1c enhances the intestinal transit in healthy mice and animals subjected to an experimental model of ileus. Capsaicin-sensitive sensory nerves do not seem to be involved in the effect on intestinal motility, as pretreatment with capsaicin does not alter it [6]. This action appears to depend on stimulation of serotonin synthesis, with endogenous prostaglandins also playing a role [7].

M1c has also demonstrated a gastroprotective effect in models of peptic ulcer disease. In rats treated with indomethacin and ethanol, M1c has showed a protective effect on gastric mucosal lesions without suppressing gastric acid secretion [8]. Activation of capsaicin-sensitive sensory nerve pathways, prostaglandins, and NO release are involved in this action of M1c [9].

Research involving carbohydrate-loaded experimental animals and M1c has shown promising results regarding its beneficial effect on blood glucose level. In these studies, mice and rats are typically given a high-glucose diet or a glucose challenge to induce hyperglycemia. In oral glucose-loaded mice and rats, M1c inhibits the increase of blood glucose level in a dose-dependent manner. The suppressive effect on gastric emptying contributes to this action. An additional mechanism is the inhibition of the glucose transport system at the small intestinal brush border. [10, 11]. It seems that the essential component for this action is the 3-O-monodesmoside structure in the molecule of oleanolic acid saponins and the carboxyl group at position 28 [12].

In addition, M1c and its 2-O-beta-D-glucopyranoside affect the intestinal absorption of dietary fat by inhibition of pancreatic lipase activity [13].

The effects of M1 on gastric emptying and carbohydrate and fat absorption explain the beneficial actions of *Kochia scoparia* seeds and fruits in disorders of energy metabolism, such as obesity and type 2 diabetes.

Anti-cancer activity

Prostate cancer

Prostate cancer is highly prevalent among men and ranks as one of the most common cancers. Its impact on mortality is significant, with it being the second leading cause of cancer-related deaths among men [14]. Small ubiquitin-like modifiers (SUMOs) are proteins that play a crucial role in the regulation of various cellular processes by modifying the functions of target proteins. Mammalian cells express SUMO1, SUMO2, SUMO3. They attach to target proteins in a process called SUMOylation, thus altering their activity, localization, stability, or interactions with other molecules. This post-translational modification mediated by SUMOs is essential for the regulation of diverse cellular functions, including gene expression, DNA repair, cell cycle progression, and protein trafficking. Sentrin-specific protease 1 (SEN1) is an enzyme that causes hydrolysis of the peptide bond between SUMOs and their target proteins and reverses the SUMOylation process [15]. SEN1 overexpression is found in different pathological conditions, incl. prostate cancer and is probably involved in its pathogenesis. M1c suppresses proliferation and induces apoptosis of malignant cells in a prostate cancer cell line. M1c directly interacts with and inhibits SEN1 in cancer cells thus increasing SUMOylated protein levels. SEN1 overexpression seems to be essential for antiproliferative action of M1c since it produces a negligible effect on normal epithelial cells that do not overexpress the protease. Additionally, M1c suppresses cell proliferation and induces cell death *in vivo* in a xenograft prostate cancer tumor mouse model. These findings demonstrate that M1c is a novel SEN1 inhibitor with potential therapeutic value for prostate cancer [16].

Colorectal cancer

Other studies have demonstrated the antitumor activity of M1c in colorectal cancer. Treatment of colorectal cancer is still a challenge, despite prevention and early detection methods. Advanced stages of colorectal cancer are treated with chemotherapeutics with multiple side effects. Consequently, there is a need to discover new adjuvant therapies. C-Myc is a member of the myc protooncogene family, responsible for cell growth and proliferation. Overexpression of SEN1 correlates with high c-Myc in cancer tissues [17]. Using colon cancer cell lines, Xianjun *et al.* have demonstrated that M1c exerted an anti-tumor activity by inhibiting SEN1 and interfering with SEN1/c-Myc signalling pathway. M1c inhibited cell proliferation with G0/1 phase cell cycle arrest in the colon cancer cells and increased apoptosis compared to untreated cells [18]. Overall, research on M1c for colorectal cancer therapy is promising and M1c might become a new approach for its treatment or prevention. However, more studies, including experimental studies on animal models, are needed to fully understand its efficacy, safety, and potential as a therapeutic agent for colorectal cancer treatment and/or prevention.

Cholangiocarcinoma

Cholangiocarcinoma is a type of cancer that originates in the bile ducts. It is known to be a particularly aggressive cancer with limited options for treatment, so researchers are constantly exploring new compounds and treatment strategies, including natural substances as M1c, to find more effective ways to manage this disease. M1c has been shown to induce apoptosis in cholangiocarcinoma cells by a mitochondrial-dependent pathway – M1c upregulated cleaved-caspase-9, cytochrome C and pro-apoptotic protein BAX expression [19]. While the *in vitro* findings are promising, further research, particularly in animal models, is necessary to fully understand its therapeutic potential and mechanisms of action. Animal models provide a more complex and physiologically relevant environment to assess the effects of M1c on cholangiocarcinoma *in vivo*. Such studies can help for validation of the observed effects in a more realistic context, for evaluation of potential side effects and toxicity, and for assessment of the overall efficacy of M1c as a therapeutic agent for cholangiocarcinoma.

Hepatocellular cancer

Several *in vitro* studies have revealed the effects of M1c on human hepatocellular cancer cell lines (HepG2). Initially, Wang *et al.* reported that M1c induced cell apoptosis through oxidative stress-regulated mitochondrial dysfunction involving the MAPK and PI3K signaling pathways [20]. A subsequent study complemented the data on the intracellular mechanisms of action of M1c, establishing activation of PPAR γ and inhibition of COX-2 [21]. Later, Yashi *et al.* have studied the anticancer properties of M1c through a colony formation assay, a technique used to assess the ability of cells to proliferate and form colonies under specific conditions. The study demonstrated that the group of HepG2 cells treated with M1c had a decreased ability to form colonies compared to the untreated group [22]. The anticancer activity of M1c on HepG2 line cells is complemented by its ability to inhibit the binding, migration, and metastasis of malignant cells. The tumor microenvironment is a complex network of cells and molecules playing a critical role in tumor growth, invasion, and metastasis. M1c inhibits MMP-9 (matrix metalloproteinase-9), which degrades the extracellular matrix, as well as adhesion molecules, such as VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) and ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1). On another hand, it activates E-cadherin (epithelial cadherin), which inhibits the process of metastasis. Wang *et al.* found also that M1c possessed inhibitory effects on VEGF (vascular endothelial growth factor) promoted cell migration in an *in vitro* transwell migration assay. This assay is a commonly used experimental technique to study cell migration, where cells migrate through a porous membrane in response to a chemotactic stimulus, such as VEGF [23]. These results highlight the potential of M1c as a therapeutic agent for targeting metastasis in cancer treatment.

Multiple myeloma

Multiple myeloma is a hematological malignancy that is treated with combination of chemotherapy and targeted therapy. Targeted therapy includes drugs such as proteasome inhibitors and immunomodulatory drugs. Monoclonal antibodies, such as daratumumab, target specific proteins on myeloma cells to help the immune system destroy them. These drugs have many disadvantages including poor tissue penetration, expensive synthesis, low oral bioavailability, and immunologic side effects. These monoclonal antibodies target and inhibit the programmed cell death ligand-1 (PD-L1). PD-L1 is a checkpoint protein on immune cells that, when engaged, can inhibit immune responses, allowing cancer cells to evade detection [24]. Wu *et al.* studied the effects of M1c on tumor xenograft mice model. They found that M1c modulates immune response by influencing PD-L1. M1c induces PD-L1 degradation by ubiquitin-proteasome dependent pathway thus boosting the immune system's ability to fight cancer cells [25].

Hepatoprotective effect

The hepatoprotective effect of M1c was studied in rats with carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver damage. CCl₄ is a toxic chemical that, when administered to animals, particularly rodents, causes severe liver injury and mimics certain aspects of human liver diseases, such as fibrosis and cirrhosis. In the study of Kim *et al.*, CCl₄-treated rats had significantly lower activities of glutathione and antioxidant enzymes. M1c alleviated the adverse effects of CCl₄ treatment by enhancing the hepatic antioxidant defense system. The M1c pretreatment resulted in lower serum transaminase, lactic dehydrogenase, and gamma-glutamyltransferase levels and maintained the activity of the antioxidant enzymes [26]. The antioxidant effect of M1c was confirmed by a further *in vitro* study that demonstrated its ability to inhibit effectively the oxidation and carbonylation of proteins [27].

Anti-inflammatory effect

Studies have suggested that M1c inhibits inflammatory pathways in the body, which could be beneficial for conditions involving inflammation, such as arthritis [28], and produces antiallergic properties [29]. Some *in vitro* studies have demonstrated that M1c inhibits the production or activity of pro-inflammatory cytokines and chemokines, as well as that of enzymes involved in inflammation. In an *in vitro* model of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation, M1c suppressed the expression of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha, and mediators as prostaglandin E₂ in a mouse macrophage cell line [3]. The anti-inflammatory activity of M1c is related to its inhibitory action on SENP1. LPS-induced inflammation is associated with

overexpression of SENP1 in macrophages. M1c treatment results in intracellular accumulation of sumoylated proteins which impairs the activation of NF- κ B signaling pathway and suppresses cytokine production [30].

Overall, these *in vitro* findings suggest that M1c has the potential to exert anti-inflammatory effects by targeting multiple molecular pathways involved in the inflammatory process. However, it is important to recognize that *in vitro* studies have limitations and may not fully represent the complex interactions that occur in the human body. Therefore, further research, including *in vivo* studies and clinical trials, is necessary to validate these findings and assess the therapeutic potential of M1c for treating inflammatory conditions.

The anti-inflammatory properties of M1c have been confirmed recently by an experimental study of Wang *et al.* They tested the effects of M1c in an *in vivo* model of psoriasis in mice and found that M1c exerted skin-protective activity. M1c significantly alleviated skin damage and inhibited hyperproliferation of keratinized cells in psoriasis mice. The mechanisms involved were related to inhibition of pro-inflammatory pathways, activation of antioxidant enzymes and suppression of VEGF which is critical for angiogenesis [31].

Conclusions

The data available so far show that M1c produces valuable biological effects, such as anti-inflammatory, antioxidant, anti-cancer, hepatoprotective and antihyperglycemic. M1c is potentially useful in various pathological conditions such as disorders of energy metabolism, inflammatory and malignant diseases. However, its efficacy and safety in humans remains unclear.

References

1. Wen Y, Chen Y, Cui Z et al, Triterpenoid glycosides from the fruits of *Kochia scoparia*. *Planta Med*, 1995, 61:450
2. Dinan L. Phytoecdysteroids in *Kochia scoparia* (burning bush). *Journal of Chromatography A*. 1994; 658 (1): 69-76. doi: 10.1016/0021-9673(94)85207-3
3. Yoo SR, Jeong SJ, Lee NR, Shin HK, Seo CS. Quantification Analysis and In Vitro Anti-Inflammatory Effects of 20-Hydroxyecdysone, Momordin Ic, and Oleanolic Acid from the Fructus of *Kochia scoparia*. *Pharmacogn Mag*. 2017;13(51):339-344. doi: 10.4103/0973-1296.211023.
4. Matsuda H, Li Y, Yamahara J, Yoshikawa M. Inhibition of gastric emptying by triterpene saponin, momordin Ic, in mice: roles of blood glucose, capsaicin-sensitive sensory nerves, and central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;289(2):729-34.
5. Yoshikawa M, Matsuda H. Antidiabetogenic activity of oleanolic acid glycosides from medicinal foodstuffs. *Biofactors*. 2000;13(1-4):231-7. doi: 10.1002/biof.5520130136.
6. Li Y, Matsuda H, Yoshikawa M. Effects of oleanolic acid glycosides on gastrointestinal transit and ileus in mice. *Bioorg Med Chem*. 1999;7(6):1201-5. doi: 10.1016/s0968-0896(99)00036-x.
7. Li Y, Matsuda H, Yamahara J, Yoshikawa M. Acceleration of gastrointestinal transit by momordin Ic in mice: possible involvement of 5-hydroxytryptamine, 5-HT(2) receptors and prostaglandins. *Eur J Pharmacol*. 2000;392(1-2):71-7. doi: 10.1016/s0014-2999(00)00121-7.
8. Matsuda H, Li Y, Murakami T, Yamahara J, Yoshikawa M. Protective effects of oleanolic acid oligoglycosides on ethanol- or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci*. 1998;63(17):PL245-50. doi: 10.1016/s0024-3205(98)00426-3.
9. Matsuda H, Li Y, Yoshikawa M. Roles of capsaicin-sensitive sensory nerves, endogenous nitric oxide, sulfhydryls, and prostaglandins in gastroprotection by momordin Ic, an oleanolic acid oligoglycoside, on ethanol-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci*. 1999;65(2):PL27-32. doi: 10.1016/s0024-3205(99)00241-6.
10. Matsuda H, Murakami T, Shimada H, Matsumura N, Yoshikawa M, Yamahara J. Inhibitory mechanisms of oleanolic acid 3-O-monodesmosides on glucose absorption in rats. *Biol Pharm Bull*. 1997;20(6):717-9. doi: 10.1248/bpb.20.717.

11. Miyasaka K, Takada R, Wu J, Takeda S, Manse Y, Morikawa T, Shimoda H. Hypoglycemic effects of mountain caviar extract and inhibitory mechanism of saponins, including momordin Ic, on glucose absorption. *J Nat Med*. 2024;78(3):693-701. doi: 10.1007/s11418-024-01791-5.2.
12. Matsuda H, Li Y, Murakami T, Yamahara J, Yoshikawa M. Structure-related inhibitory activity of oleanolic acid glycosides on gastric emptying in mice. *Bioorg Med Chem*. 1999;7(2):323-7. doi: 10.1016/s0968-0896(98)00207-7.
13. Han LK, Nose R, Li W, Gong XJ, Zheng YN, Yoshikawa M, et al. Reduction of fat storage in mice fed a high-fat diet long term by treatment with saponins prepared from *Kochia scoparia* fruit. *Phytother Res*. 2006;20(10):877-82. doi: 10.1002/ptr.1981.
14. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(1):5-29. doi: 10.3322/caac.21254.
15. Wilson VG. Introduction to Sumoylation. *Adv Exp Med Biol*. 2017;963:1-12. doi: 10.1007/978-3-319-50044-7_1.
16. Wu J, Lei H, Zhang J, Chen X, Tang C, Wang W, et al. Momordin Ic, a new natural SENP1 inhibitor, inhibits prostate cancer cell proliferation. *Oncotarget*. 2016;7(37):58995-9005. doi: 10.18632/oncotarget.10636
17. Kress TR, Sabò A, Amati B. MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production. *Nat Rev Cancer* 15, 593–607 (2015). <https://doi.org/10.1038/nrc3984>
18. Xianjun F, Xirui X, Jie T, Huiwen M, Shaojun Z, Qiaoyun L, Yunxin L, Xuqun S. Momordin Ic induces G0/1 phase arrest and apoptosis in colon cancer cells by suppressing SENP1/c-MYC signaling pathway. *J Pharmacol Sci*. 2021 Aug;146(4):249-258. doi: 10.1016/j.jphs.2021.04.007.
19. Malikrong P, Prawan A, Kongpetch S et al. Momordin IC triggers mitochondria-mediated apoptosis of cholangiocarcinoma cells and enhances the efficacy of conventional chemotherapeutic drugs. *Farmacia*, 2023; 71(3): 518-525.
20. Wang J, Yuan L, Xiao H, Xiao C, Wang Y, Liu X. Momordin Ic induces HepG2 cell apoptosis through MAPK and PI3K/Akt-mediated mitochondrial pathways. *Apoptosis*. 2013;18(6):751-65. doi: 10.1007/s10495-013-0820-z.
21. Wang J, Yuan L, Xiao H, Wang C, Xiao C, Wang Y, et al. A novel mechanism for momordin Ic-induced HepG2 apoptosis: involvement of PI3K- and MAPK-dependent PPAR γ activation. *Food Funct*. 2014;5(5):859-68. doi: 10.1039/c3fo60558b.
22. Yashi Mi, Chunxia Xiao, Qingwei Du et al. Momordin Ic couples apoptosis with autophagy in human hepatoblastoma cancer cells by reactive oxygen species (ROS)-mediated PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016, 90: 230-242.
23. Wang J, Liu Q, Xiao H, Luo X, Liu X. Suppressive effects of Momordin Ic on HepG2 cell migration and invasion by regulating MMP-9 and adhesion molecules: Involvement of p38 and JNK pathways. *Toxicol In Vitro*. 2019;56:75-83. doi: 10.1016/j.tiv.2019.01.007.
24. Tremblay-LeMay R, Rastgoo N, Chang H. Modulating PD-L1 expression in multiple myeloma: an alternative strategy to target the PD-1/PD-L1 pathway. *J Hematol Oncol*. 2018;11(1):46. doi: 10.1186/s13045-018-0589-1
25. Wu S, Yan W, Li G et al. Discovery of Momordin Ic that selectively reduces PD-L1 expression in multiple myeloma cells by recruiting SYVN1. *Food Bioscience* 2024;61;104732; doi:10.1016/j.fbio.2024.104732
26. Kim NY, Lee MK, Park MJ, Kim SJ, Park HJ, Choi JW, Kim SH, Cho SY, Lee JS. Momordin Ic and oleanolic acid from *Kochiaefructus* reduce carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *J Med Food*. 2005;8(2):177-83. doi: 10.1089/jmf.2005.8.177.
27. Wang J, Yuan L, Cheng B, Li W, Xiao C, Wang Y, et al. Antioxidant capacity and antitumor activity of *Fructus Kochiae* extracts. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*: 2014a; 6(4):383-93. doi: 10.3920/QAS2012.0218

28. Choi J, Lee KT, Jung H, Park HS, Park HJ. Anti-rheumatoid arthritis effect of the *Kochia scoparia* fruits and activity comparison of momordin Ic, its prosapogenin and sapogenin. *Arch Pharm Res.* 2002;25(3):336-42. doi: 10.1007/BF02976636.5.
29. Matsuda H, Dai Y, Ido Y, Yoshikawa M, Kubo M. Studies on *kochiae fructus*. IV. Anti-allergic effects of 70% ethanol extract and its component, momordin Ic from dried fruits of *Kochia scoparia* L. *Biol Pharm Bull.* 1997;20:1165–70.
30. Zheng C, Li D, Zhan W, He K, Yang H. Downregulation of SENP1 suppresses LPS-induced macrophage inflammation by elevating Sp3 SUMOylation and disturbing Sp3-NF- κ B interaction. *Am J Transl Res.* 2020;12(11):7439-48. PMID: 33312380
31. Wang C, Jiao S, Zhou R, Huang P, Zeng B, Yang Z, Wang J. Momordin Ic ameliorates psoriasis skin damage in mice via the IL-23/IL-17 axis. *Arch Dermatol Res.* 2024;316(7):474. doi: 10.1007/s00403-024-03023-y.

KOCHIA SCOPARIA SEED INFUSION IMPROVES TRIGLYCERIDES LEVELS AND GLUCOSE TOLERANCE IN RATS ON HIGH CALORIE-DIET

Mehmed Abtulov, Silvia Gancheva, Miroslav Eftimov, Milena Todorova, Stefka Valcheva-Kuzmanova, Maria Zhelyazkova-Savova

Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, Medical University of Varna “Prof. Dr. Paraskev Stoyanov”

ABSTRACT

Introduction. *Kochia scoparia* (KS) seeds contain biologically active substances with anti-obesity, antidiyslipidemic and antihyperglycemic properties.

Aim. To investigate the effects of aqueous KS seed infusion (KSSI) in three different concentrations on visceral adiposity and lipid and glucose metabolism in rats fed a high-fat high-fructose (HFHF) diet.

Materials and methods. Fifty male Wistar rats were divided into 5 groups (n=10): Control, HFHF, KSSI_{1.5}, KSSI₃ and KSSI₆. During 10 weeks, the Control group received standard laboratory chaw and tap water, while the other groups received an HFHF diet and 10% fructose dissolved in the drinking water or the KSSI. Groups KSSI_{1.5}, KSSI₃, and KSSI₆ received KSSI in increasing concentrations – 1.5%, 3% and 6%, respectively, by *ad libitum* oral administration. The consumption of food and fluids was recorded daily, and animal body weight was monitored weekly. At the end of the experiment, a glucose tolerance test (GTT) was performed and serum levels of triglycerides and cholesterol were measured. Visceral fat depots were weighted and fat depot indices were calculated.

Results. GTT revealed a dose-dependent improvement of glucose tolerance at the 90th minute in KSSI-treated groups (p<0.05 for linear trend). Triglyceride levels were increased in the HFHF group compared to Control (p<0.05), and decreased in groups KSSI₃, and KSSI₆ compared to HFHF (p<0.01 and p<0.05 respectively). There were no significant differences in serum cholesterol levels or final body weight and fat depot indices between the experimental groups.

Conclusion. KSSI showed beneficial effects on triglyceride levels and glucose tolerance in rats on high-calorie diet.

Key words: *Kochia scoparia*, high calorie-diet, triglycerides, glucose tolerance

Introduction

Diet is considered an important contributor to human health. Dietary choices are influenced by geographic, political, economic, cultural as well as by individual factors [1]. Proper nutritional support could be a valuable approach for healthy ageing as well as for prevention or therapy of diseases. In this regard, plants appear to be a suitable option since they possess diverse biologically active substances.

Kochia scoparia (KS) is a medicinal plant widely distributed in Europe, Asia, Southern and Northern America. Its fruits have knobby lobes and horizontal wings and the seeds inside the fruits are egg-shaped and flattened, with a size of approximately 1-2 mm [2]. Studies have shown that KS fruits demonstrate variety of pharmacological activities, among which anti-inflammatory, anti-obesity, and anti-hyperglycemic properties [2, 3]. The effects of KSSI on markers of energy metabolism in rats receiving high-fat high-fructose (HFHF) diet have not yet been investigated.

Aim

The purpose of the present study was to investigate the effects of aqueous KS seed infusion (KSSI) in three different concentrations, on the visceral adiposity as well as lipid and glucose metabolism in rats fed a HFHF diet.

Materials and methods

All experiments involving animal treatment and research were carried out in compliance with applicable national and international rules and regulations (EU directive 2010/63/EU for animal experiments), and were approved by the Bulgarian Food Safety Agency (document 177/07/2017).

Experimental groups, dietary and treatment protocol

In the current investigation, fifty male Wistar rats were included and they were randomly assigned into 5 groups (n=10 each): Control, HFHF, KSSI_{1.5}, KSSI₃ and KSSI₆. The rats were housed in plastic cages under standard laboratory conditions, with a 12-hour light/dark cycle, average ambient temperature of 25°C, and unlimited access to food and water.

In the course of ten weeks, the Control group was given conventional laboratory chaw and tap water while the other groups received HFHF diet. The HFHF diet was implemented using the approach outlined by Gancheva et al. [4], and it consisted of 17% lard and 17% fructose added to ordinary rat chow, with an additional 10% fructose solution to boost the energy intake. With the regular laboratory diet, control rats received 279 kcal/100g food, while animals on HFHF diet received 445 kcal/100 g (405 kcal/100 g food from the HFHF diet, 40 kcal from the fructose in the drinking water).

Treatment consisted of KSSI administration *ad libitum* to groups KSSI_{1.5}, KSSI₃ and KSSI₆ at increasing concentrations of 1.5%, 3%, and 6%, respectively. KSSIs were prepared by soaking dry seeds in hot water in three distinct doses: 1.5g/100 ml, 3.0g/100 ml, and 6.0g/100 ml, respectively.

Food and fluid intake was recorded on a daily basis, and the animal's body weight was measured on a weekly basis.

Biochemical tests

Glucose tolerance test (GTT)

The test was carried out at the end of the tenth week of the experiment. After 12 hours of fasting, the rats received an intraperitoneal glucose injection at a dose of 2 g/kg body weight as a 40% solution. A blood sample was taken from the distal end of the tail. The ACCU-CHEK Performa glucometer was used to monitor blood glucose immediately before injection (0 min) and at intervals of 30, 60, and 90 minutes. Blood glucose levels were provided as absolute values (mmol/l).

Serum triglycerides (TG) and Total Cholesterol (TC)

At the end of the tenth week, the rats were sacrificed, blood was taken from the sublingual veins, then it was centrifuged and the collected serum was kept at -20°C till the time of analysis. TG and TC levels in the serum were quantified using a colorimetric kit (Bio Maxima, Poland) and spectrophotometer AURIUS 2021 (Cecil Instruments Ltd.).

Calculation of fat depot indices

After the animal sacrifice, the mesenteric, perigonadal, paranephral, and retroperitoneal fat pads were dissected and measured. The total amount of visceral adipose tissue was determined and fat depot indices were computed using the formula: fat pad weight/total body weight x 10².

Statistical analysis

GraphPad Prism 5 statistical software using one-way ANOVA, two-way ANOVA and post-tests (Dunnett's and for linear trend) was utilized for analysis of the results. P-value less than 0.05 was considered to indicate a statistical significance.

Results

Food and liquid consumption, calorie intake and body weight

HFHF diet induced significant decrease in the food consumption (g/rat/day) in all groups compared to the Control group (p<0.001 vs. Control group). Compared to HFHF group, no increase in the consumption was found in groups KSSI_{1.5} and KSSI₃ but it was increased significantly in group KSSI₆ (p<0.001 vs. HFHF) (**Figure 1**).

Liquid consumption (ml/rat/day) increased in all groups and statistically significant differences were found in all groups fed HFHF diet compared to Control group (p<0.001). Compared to the HFHF group, KSSI treatment did not affect the total amount of the liquids consumed (**Figure 1**).

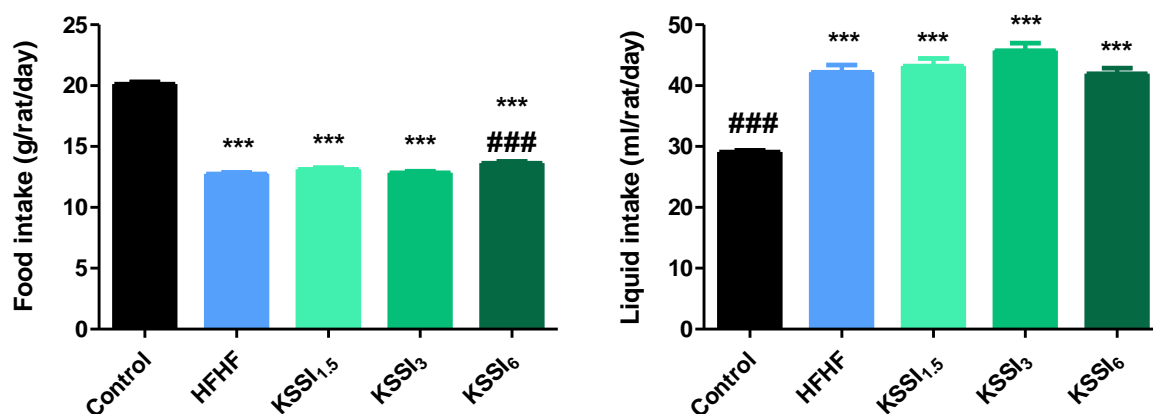


Figure 1. Food and liquid consumption in rats on HFHF diet treated with 1.5, 3.0 and 6.0% KSSI; *** $p < 0.001$ vs. Control group, ### $p < 0.001$ vs. HFHF group

Calorie intake was increased significantly in all HFHF fed groups compared to the Control group ($p < 0.001$). Significantly increased energy intake was detected in KSSI₆ group compared to the HFHF group ($p < 0.001$) (**Figure 2**).

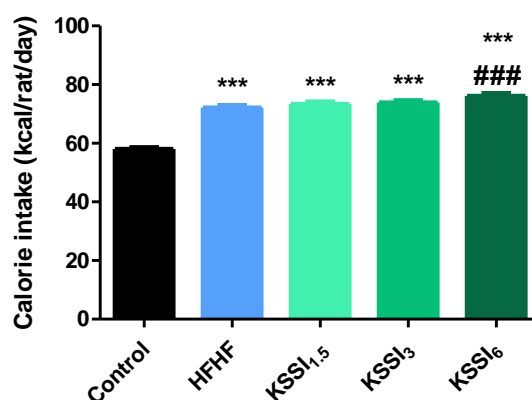


Figure 2. Calorie intake in rats on HFHF diet treated with 1.5, 3.0 and 6.0% KSSI; *** $p < 0.001$ vs. Control group, ### $p < 0.001$ vs. HFHF group

Progressive increase in the body weight over time was documented in all experimental groups, as detected by two-way ANOVA ($p < 0.0001$ for Row factor Time). On the other hand, no significant differences were observed between the groups using one-way ANOVA ($p < 0.9895$) (**Figure 3**).

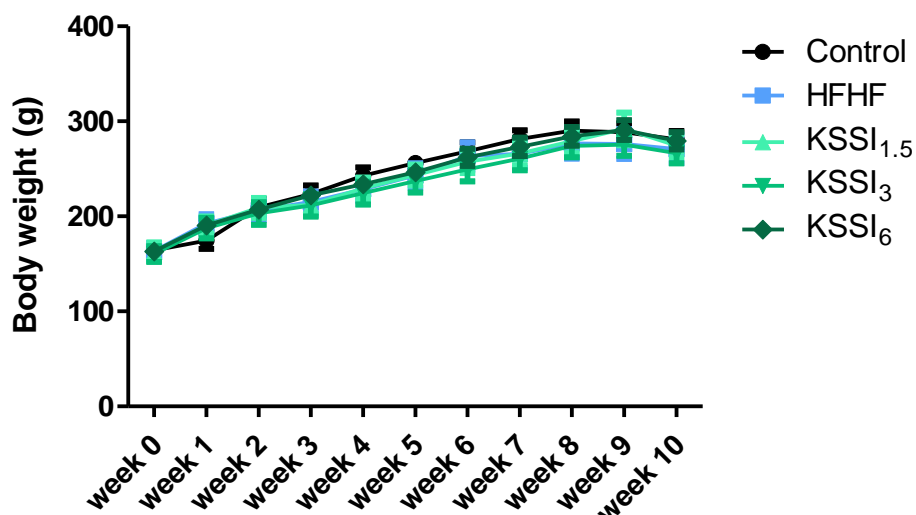


Figure 3. Body weight of rats on HFHF diet treated with 1.5, 3.0 and 6.0% KSSI
Fat depot indices

One-way ANOVA did not detect significant differences in the fat depot indices in all animal groups (**Table 1**).

Table 1. Fat depot indices of rats on HFHF diet treated with 1.5, 3.0 and 6.0% KSSI

	Control	HFHF	KSSI _{1.5}	KSSI ₃	KSSI ₆	One-way ANOVA p-value
Total fat index	2.53±0.15	2.87±0.29	2.86±0.21	2.77±0.24	2.79±0.29	0.6759
Retroperitoneal fat index	0.70±0.05	0.88±0.12	0.87±0.09	0.79±0.12	0.94±0.10	0.5014
Mesenterial fat index	0.75±0.06	0.91±0.10	0.95±0.08	0.99±0.09	1.02±0.06	0.1798
Paranephral fat index	0.12±0.02	0.14±0.04	0.16±0.01	0.10±0.02	0.11±0.02	0.5134
Perigonadal fat index	0.92±0.05	0.95±0.09	0.88±0.07	0.90±0.09	0.96±0.05	0.9396

Glucose tolerance test (GTT)

Although no significant differences were detected by two-way ANOVA, glucose levels after glucose loading were elevated in all time intervals in all experimental groups. KSSI decreased the level of the glucose in all groups and linear trend was documented on the 90th minute during GTT ($p < 0.05$ for linear trend) using one-way ANOVA. The results are shown in **Table 2** and on **Figure 4**.

Table 2. Glucose values (mmol/l and % from the initial value) at the 30th, 60th and 90th minute during the GTT in rats on HFHF diet treated with 1.5, 3.0 and 6.0% KSSI

	30 th minute		60 th minute		90 th minute	
	mmol/l	% from the initial value	mmol/l	% from the initial value	mmol/l	% from the initial value
Control	12.59±1.09	278.2±23.71	9.62±0.53	216±17.84	8.81±0.39	195.1±9.45
HFHF	14.09±1.00	302.4±0.6	11.26±0.73	240.2±19.91	10.69±8.27	224.1±20.93
KSSI_{1.5}	14.37±0.40	309±23.41	11.76±0.33	244.7±18.31	9.78±0.17	196.5±10.92
KSSI₃	11.79±0.60	262.6±23.10	11.45±0.39	252.9±16.20	9.11±0.33	204.4±8.57
KSSI₆	13.72±1.04	285.6±30.95	11.03±0.84	232.3±26.30	8.50±0.32	187.6±21.30

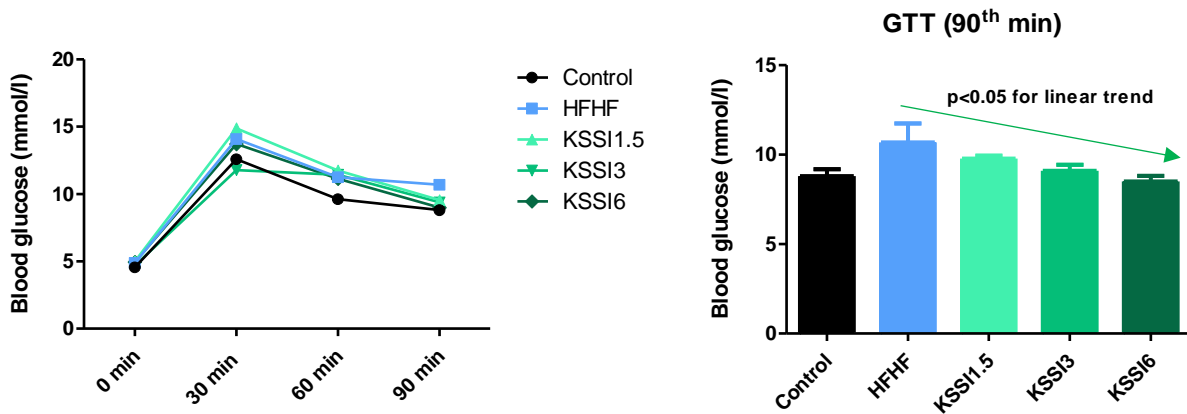


Figure 4. Blood glucose levels (mmol/l) in the GTT at time 0, 30, 60 and 90 min in rats on HFHF diet treated with 1.5, 3.0 and 6.0% KSSI

Triglycerides (TGs)

HFHF diet induced significant increase in the serum level of the TG in the HFHF group compared to the Control group ($p<0.05$). KSSI treatment reduced the levels dose-dependently compared to the HFHF group, the effects being significant in groups KSSI₃ and KSSI₆ ($p<0.01$ and $p<0.05$, respectively).

The results are shown in **Figure 5**:

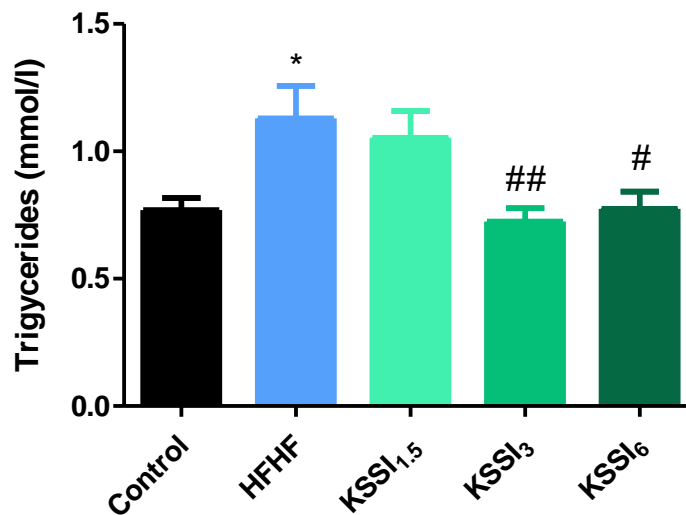


Figure 5. Serum triglycerides (mmol/l) of rats on HFHF diet treated with 1.5, 3.0 and 6.0% KSSI; * $p<0.05$ vs. Control group, # $p<0.05$ vs. HFHF group, ## $p<0.01$ vs. HFHF group

Total cholesterol (TC)

No significant differences in TC values among all experimental groups were detected (**Table 3**):

Table 3. Serum total cholesterol of rats on HFHF diet treated with 1.5, 3.0 and 6.0% KSSI

	Control	HFHF	KSSI _{1.5}	KSSI ₃	KSSI ₆	p-value
One-way ANOVA	2.23±0.23	2.84±0.27	3.08±0.25	2.77±0.24	2.28±0.17	0.0651

Discussion

Obesity is considered the new time's pandemic since as it continues to rise and represents a significant medical threat. As of 2022, 2.5 billion adults have been classified as overweight, 890 million of them being obese [5]. Health risks of obesity include higher rate of type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, cardiovascular diseases, obstructive sleep apnea and malignancy [6]. To prevent these consequences, new therapeutic strategies are being explored. In this regard, plants could be used to combat/prevent obesity-associated comorbidities. Different parts of the plants (stem, blossom, leaves, fruits, seeds) contain phytochemicals possessing potential health-beneficial effects which could be implemented as alternative therapy in diseases.

Our study examined the effect of KSSI, administered in three different concentrations, on the food and liquid intake, visceral adiposity, lipid profile (total cholesterol and triglycerides) and the glycemic control (blood glucose during GTT) in rats receiving calorie-dense diet. HFHF diet decreased the food intake and increased the liquid and energy intake. The TG levels were significantly elevated and trend for impaired glucose tolerance was detected. The body weight, visceral fat depots and TC were not affected. KSSI increased significantly the food consumption and the calorie intake, respectively, in the highest concentration used compared to the HFHF group. Our previous investigation has shown HFHF diet is able to decrease the total amount of food consumed since it is more calorie-dense and increase the liquid and energy intake [4]. This study highlights for the first time that *Kochia* infusion can contribute to additional increase in the food intake. It is possible KSSI can affect the food preference, but in order to elucidate the exact mechanism responsible for this finding, additional research is required. The total body weight, visceral fat depots and the level of the TC were not affected by KSSI administration. On the other hand, administration of aqueous KSSI improved the TG levels and the glucose control after glucose load.

The infusion used in the current study was prepared from the seeds of the plant's fruits, which contain certain chemicals – saponins (momordin Ic and its esters), oleanolic acid (OA), kochianosides II/IV [3]. Similarity in the phytochemical content between the fruits and seeds were also documented – highest concentrations in the seed were documented for OA and her saponins [7]. Phytosteroids (20-hydroxyecdysone (20-OH-E), 5 β 20-dihydroxyecdysone) [8] and phenolic compounds (3-hydroxytyrosol, morin hydrate) [9] were also found in KS seeds.

OA and its derivatives have been shown to possess anti-obesity and anti-diabetic activities. *In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that OA is able to regulate the preadipocyte differentiation into adipocytes by affecting the expression of several lipogenic factors (peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/gamma, sterol regulatory element-binding protein -1, FAS, ChREBP, C/EBP α , glucose-6-phosphatase) and suppressing fat tissue inflammation. The anti-inflammatory effect in the adipose tissue was linked to the ability of OA to reduce the production of the pro-inflammatory adipocyte-derived hormones visfatin and resistin [10]). The anti-hyperglycemic effect of OA was assigned to several actions: an insulin-mimetic effect, an ability to inhibit the intestinal glucose absorption through inhibition of the enzyme α -glucosidase and to improve glucose metabolism [11].

Another component of *Kochia* seeds – the 20-OH-E, has also been documented to improve the glucose regulation, the lipid profile (elevation in HDL, reduction in TG and LDL) and the body weight as shown in animal studies and in clinical trials among diabetic, obese and metabolic syndrome patients. The anti-hyperglycemic effect was thought to be due to its insulin-sensitizing and gluconeogenesis-suppressing actions and the antihyperlipidemic effect was related to its ability to inhibit lipogenesis and the intestinal fat absorption. The anti-obesity effect resulted from the anti-inflammatory and aforementioned metabolic benefits [12].

The main phenolic component of KS seeds – the 3-hydroxytyrosol, has been shown to exert anti-adipogenic effect responsible for weight loss, and to improve the lipid profile in animal studies [13]. The other seed polyphenol – morin hydrate, was also able to improve the glycemic control as documented in *in vitro* and *in vivo* animal studies by augmenting the insulin receptor activation,

suppressing the hepatic gluconeogenesis and protecting the pancreatic beta cells from oxidative damage [14].

Saponins have also demonstrated beneficial effects on body weight, lipid profile and glucose homeostasis. Saponins, isolated from *Gynostemma pentaphyllum* Makino, *Lysimachia foenum-graecum* Hance, *Platycodon grandiflorum* roots inhibit adipogenesis through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) [15]. An additional mechanism for the TG-lowering effect of KS could be the inhibition of the intestinal lipase activity. Han *et al.* have shown that treatment with KS fruit-derived saponins, mainly momordin Ic, prevented the elevation of the serum TGs in mice receiving high-fat diet and the effect was attributed to the decrease in the lipase activity *in vitro*. The same mechanism has been proposed for the anti-obesity effect observed in the same study [16]. Our previous study has shown KSSI is able to decrease the total fat mass and the level of the triglycerides in rats with metabolic syndrome induced by high-fat, high-fructose diet, without observed effect on the total cholesterol level [17].

KS seeds are rich in the phytochemicals discussed above, therefore we consider they might have contributed overall to the results documented in this study.

The main drawback of this study is the lack of phytochemical analysis of the seeds used to obtain the infusion. This opens a window for further studies which would help us clarify which seed ingredients might be responsible for the described effects.

Conclusion

In the current study, the oral administration of aqueous KSSI in three different concentrations (1.5, 3.0 and 6.0 %) to rats receiving HFHF-diet was able to improve the glucose utilization during GTT as well as to lower the elevated triglyceride levels. These effects are presumably related to the active ingredients in the seeds which have been documented to possess metabolic benefits.

References

1. Rattan SIS, Kaur G. Nutrition, food and diet in health and longevity: we eat what we are. *Nutrients*. 2022;14(24):5376.
2. Ali Esmail Al-Snafi. A review on pharmacological activities of *Kochia Scoparia*- a review. *Indo Am J Pharm Sci*. 2018;05(04):2213–21.
3. Grabowska K, Buzdygan W, Galanty A *et al.* Current knowledge on genus *Bassia* All.: a comprehensive review on traditional use, phytochemistry, pharmacological activity, and nonmedical applications. *Phytochem Rev*. 2023;22:1197–1246.
4. Gancheva S, Zhelyazkova-Savova M, Galunska B, Chervenkov T. Experimental models of metabolic syndrome in rats. *Scr Sci Medica*. 2015;47(2):14-21.
5. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
6. Fruh SM. Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable long-term weight management. *J Am Assoc Nurse Pract*. 2017;29(S1):S3-S14.
7. Kernan JA, Coxworth E, Fleming S. Microdetermination of triterpene saponin content of *Kochia scoparia* seed using gas-liquid chromatography. *J Agric Food Chem*. 1973;21(2):232-34.
8. Dinan L, Lafont R. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J Endocrinol*. 2006;191(1):1-8.
9. Cho HD, Kim JH, Park JK, *et al.* *Kochia scoparia* seed extract suppresses VEGF-induced angiogenesis via modulating VEGF receptor 2 and PI3K/AKT/mTOR pathways. *Pharm Biol*. 2019;57(1):684-93.
10. Verma N, Raghuvanshi DS, Singh RV. Recent advances in the chemistry and biology of oleanolic acid and its derivatives. *Eur J Med Chem*. 2024;276:116619.
11. Li Y, Wang J, Gu T *et al.* Oleanolic acid supplement attenuates liquid fructose-induced adipose tissue insulin resistance through the insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;277(2):155-63.

12. Dinan L, Diah W, Veillet S et al. 20-Hydroxyecdysone, from plant extracts to clinical use: therapeutic potential for the treatment of neuromuscular, cardio-metabolic and respiratory diseases. *Biomedicines*. 2021;9(5):492.
13. Bertelli M, Kiani AK, Paolacci S et al. Hydroxytyrosol: A natural compound with promising pharmacological activities. *J Biotechnol*. 2020;309:29-33.
14. Rajput SA, Wang XQ, Yan HC. Morin hydrate: a comprehensive review on novel natural dietary bioactive compound with versatile biological and pharmacological potential. *Biomed Pharmacother*. 2021;138:111511.
15. Marrelli M, Conforti F, Araniti F et al. Effects of saponins on lipid metabolism: a review of potential health benefits in the treatment of obesity. *Molecules*. 2016;21(10):1404.
16. Han LK, Nose R, Li W et al. Reduction of fat storage in mice fed a high-fat diet long term by treatment with saponins prepared from *Kochia scoparia* fruit. *Phytother Res*. 2006 Oct;20(10):877-82.
17. Gancheva S, Tzaneva M, Valcheva-Kuzmanova S, Zhelyazkova-Savova M. Antiobesity, antioxidant and hepatoprotective properties of aqueous infusion of *Kochia scoparia* seeds in rats with diet-induced metabolic syndrome. *Bulg Chem Commun*. 2020;52(D):60-7.

LIRAGLUTIDE ALLEVIATES NEUROPATHIC PAIN AND MITIGATES COMPULSIVE BEHAVIOR IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETIC MICE

Milen Hristov¹, Natasha Ivanova², Pavlina Gateva¹

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Medicine, Medical University of Sofia

²Institute of Neurobiology, Behavioral Neurobiology, Bulgarian Academy of Sciences

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a widespread chronic disease. Its most common complication, diabetic neuropathy, causes sensory loss and pain. Additionally, diabetes increases the risk of psychiatric disorders like depression and anxiety. Liraglutide, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, has shown neuroprotective properties. This study aims to investigate the effects of liraglutide on cold-induced hyperalgesia and depression- and anxiety-like behaviors in diabetic mice. Experimental studies were conducted on male ICR mice. Type 1 diabetes was induced with a single intraperitoneal injection of streptozotocin (150 mg/kg). Starting on day 8, diabetic mice received daily subcutaneous liraglutide (0.4 mg/kg) for 10 days. Cold-induced hyperalgesia was assessed with the cold plate test. Depression- and anxiety-like behaviors were evaluated using the tail suspension test and marble burying test, respectively. Each group had 9 animals. Data were analyzed using Shapiro-Wilk, one-way ANOVA, Kruskal-Wallis, and Student-Newman-Keuls tests. Administration of streptozotocin resulted in significant cold-induced hyperalgesia, as evidenced by decreased paw withdrawal latency to cold stimuli. Treatment with liraglutide significantly alleviated this hyperalgesia. Diabetic mice exhibited increased marble burying at both 20 and 30 minutes compared to control mice, indicating enhanced obsessive-compulsive behavior. Liraglutide treatment reduced the number of buried marbles. No significant differences were observed in the tail suspension test among the three experimental groups. Liraglutide treatment effectively mitigates cold-induced hyperalgesia and reduces compulsive behavior in diabetic mice, highlighting its potential neuroprotective benefits in managing diabetes-related neuropathic pain and anxiety.

Key words: diabetes, neuropathy, pain, anxiety, liraglutide.

ЛИРАГЛУТИД ОБЛЕКЧАВА НЕВРОПАТИЧНАТА БОЛКА И НАМАЛЯВА КОМПУЛСИВНОТО ПОВЕДЕНИЕ ПРИ МИШКИ СЪС СТРЕПТОЗОТОЦИН-ИНДУЦИРАН ДИАБЕТ

Милен Христов¹, Наташа Иванова², Павлина Гатева¹

¹Катедра по фармакология и токсикология, Медицински факултет, Медицински университет - София

²Институт по невробиология, Поведенческа невробиология, Българска академия на науките

Въведение

Диабетът е широко разпространено хронично заболяване, което представлява значително предизвикателство за общественото здраве в глобален мащаб. Разпространението на диабета продължава да нараства с тревожни темпове, като през 2019 г. се изчислява, че 9.3% от населението (463 милиона души) са засегнати [1]. Хроничната хипергликемия, свързана с диабета, влошава качеството на живот, допринасяйки за макроваскуларни усложнения (като исхемична болест на сърцето, инсулт и периферна артериална болест) и микроваскуларни усложнения (включително невропатия, нефропатия и ретинопатия) [2].

Сред тези усложнения диабетната невропатия е най-разпространена и се характеризира със загуба на сетивност, болка и значителна заболяемост. Обикновено се проявява като дистална сетивна дисфункция, засягаща долните крайници и често водеща до значителни нарушения [3].

В допълнение към физическите усложнения, диабетът се свързва все повече с психиатрични състояния. Въпреки че точните биологични механизми остават неясни, натрупващите се доказателства сочат силна връзка между диабета и разстройства на настроението като депресия [4]. Лицата с диабет имат двойно по-голям шанс да изпитат коморбидна депресия в сравнение с хората без диабет [5], като коморбидността е свързана с тежки последици, включително повишен риск от самоубийство и хоспитализация [6]. Освен това, диабетът се асоциира с по-голяма вероятност от развитие на различни тревожни разстройства, като генерализирано тревожно разстройство, социална тревожност и паническо разстройство [7].

Агонистите на рецептора за глюкагоноподобния пептид-1 (GLP-1) са утвърдени за ролята си в контрола на кръвната захар при лечението на диабет. През последните години се натрупват доказателства за невропротективния потенциал на GLP-1 рецепторните агонисти, които осъществяват своя ефект чрез модулация на възпаление, оксидативен стрес и митохондриална дисфункция. Лираглутид, дългодействащ аналог на GLP-1, демонстрира невропротективни свойства при различни неврологични състояния, включително болест на Алцхаймер, болест на Паркинсон, остър исхемичен инсулт и травматично увреждане на мозъка [8-13].

С оглед на значителното въздействие на диабетната невропатия и свързания с нея риск от психиатрични състояния при индивиди с диабет, са необходими повече изследвания на потенциални терапевтични интервенции. Настоящото проучване изследва ефектите на лираглутид върху индуцираната от студ хипералгезия и поведение, характеризиращо се с тревожност и депресия, при диабетни мишки.

Материали и методи

Фармакологични средства

Стрептозотоцин (S0130) и лираглутид (SML3925) бяха закупени от Sigma-Aldrich, Германия.

Животни

В експеримента бяха използвани мъжки мишки ICR (20–25 g, на възраст 6–7 седмици). Мишките имаха свободен достъп до стандартна храна и вода и бяха държани в помещение с контролирана температура (20–22°C) при 12:12-часов светло-тъмен цикъл (07:00 до 19:00 ч.). Всички процедури бяха проведени в съответствие с Директива 2010/63/ЕС на Европейския парламент за защита на животни, използвани за научни цели. Всяка експериментална група включваше по 9 животни.

Експериментален протокол

Диабет тип 1 беше индуциран при мишките чрез еднократна интраперitoneална инжекция на стрептозотоцин (150 mg/kg, разтворен в цитратен буфер, pH 4.5). Контролните мишки получиха еквивалентен обем физиологичен разтвор. Диабетните мишки показаха типични симптоми като хипергликемия, полидипсия, полиурия, полифагия, загуба на козина и затруднение при наддаване на тегло [13]. От 8-мия ден след индукцията, диабетните мишки получаваха ежедневни подкожни инжекции на лираглутид (0.4 mg/kg) за 10 последователни дни. Провеждаха се поведенчески тестове: тест със студена плоча за студ-индуцирана хипералгезия, тест „окачване на опашката“ за депресивно поведение и тест „заравяне на топчета“ за оценка на тревожност и компулсивно поведение.

Тест със студена плоча

Този тест оценяваше студ-индуцираната хипералгезия. Мишките бяха поставени в прозрачен цилиндър върху студена плоча (Hot/Cold Plate, Ugo Basile, Италия) настроена на

5°C [14]. Времето за вдигане на лапата беше записано в секунди. Ограничението беше 30 секунди. Всяка мишка беше тествана три пъти.

Тест „окачване на опашката“

За оценка на депресивно поведение мишките бяха окачени за опашката с помощта на адхезивна лента. Тестът беше записан за 6 минути, като се измерваше времето на неподвижност (в секунди) като индикатор за депресивно поведение [15].

Тест „заравяне на топчета“

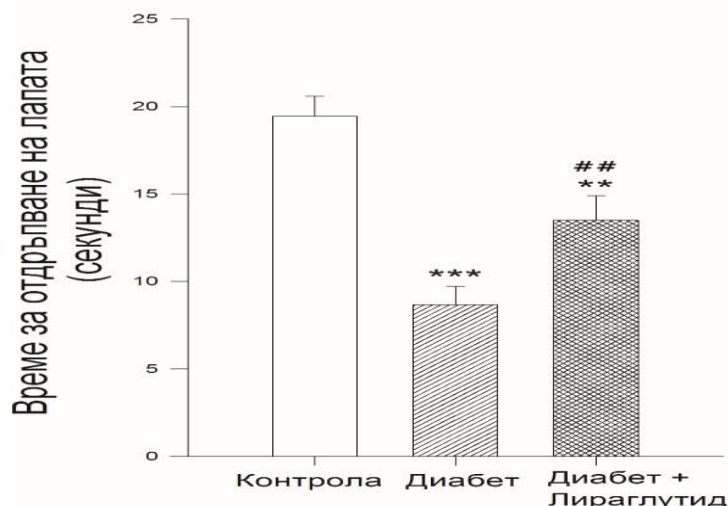
Мишките бяха поставени в клетки с 3 см слой талаш, върху който равномерно бяха разположени двадесет стъклени топчета (диаметър 1 см). На всеки 10 минути по време на 30-минутен интервал наблюдател броеше заритите топчета (считани за зарити, ако бяха покрити на две трети или повече от повърхността им). Този параметър се счита за показател за тревожност и компулсивно поведение [16].

Статистически анализ

Анализът на данните беше извършен със софтуер SigmaPlot 12.5 (Systat Software GmbH, Еркат, Германия). Нормалността беше оценена с теста на Шапиро-Уилк. Параметричните данни бяха анализирани чрез еднопосочен ANOVA, последван от пост-хок тест на Стюдънт-Нюман-Кеулс (приложен за тестовете със студена плоча и „окачване на опашката“). Непараметричните данни бяха анализирани с еднопосочен ANOVA на Крускал-Уолис, последван от тест на Стюдънт-Нюман-Кеулс (за теста със зариване на топчета). Статистическа значимост беше приета при ниво на значимост $p < 0.05$.

Резултати

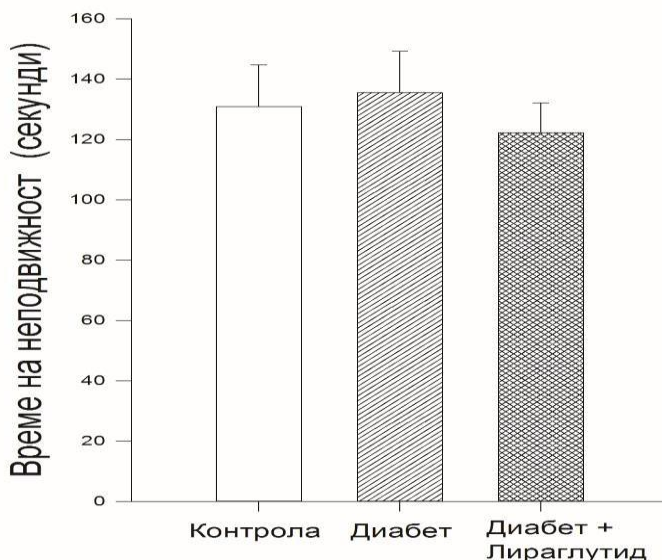
Ефекти на лираглутид върху студ-индуцирана хипералгезия при диабетни мишки. Въвеждането на стрептозотоцин индуцира значителна студ-индуцирана хипералгезия, както се вижда от намаленото време за реакция при студени стимули (Фигура 1). Еднопосочният ANOVA анализ показва значителен ефект от третирането с лираглутид ($F(2,24) = 19.506$, $p < 0.001$) с висока сила на теста от 1.000. Лечението с лираглутид облекчи значимо тази хипералгезия (виж Фигура 1).



Фигура 1. Ефекти на лираглутид върху студ-индуцираната хипералгезия при диабетни мишки. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната стойност (SEM). Средното време за отдръпване на лапата (секунди) при тест със студена плоча е показано за контролните мишки, диабетните мишки без третиране и диабетните мишки, третирани с лираглутид. Лираглутид значително облекчава студ-индуцираната хипералгезия при диабетни мишки (** $p < 0.01$ в сравнение с контролната група; *** $p < 0.001$ в сравнение с контролната група; ## $p < 0.01$ в сравнение с диабетната група без третиране; $n=9$ животни/група).

Ефекти на лираглутид върху депресивно поведение при диабетни мишки

Фигура 2 показва резултатите от теста за окачване на опашката. Не се установи значима разлика във времето на неподвижност между трите експериментални групи ($F(2,24) = 0.289$, $p = 0.752$). Въпреки това, силата на теста беше ниска (0.049), което предполага намалена вероятност за откриване на съществуваща разлика.



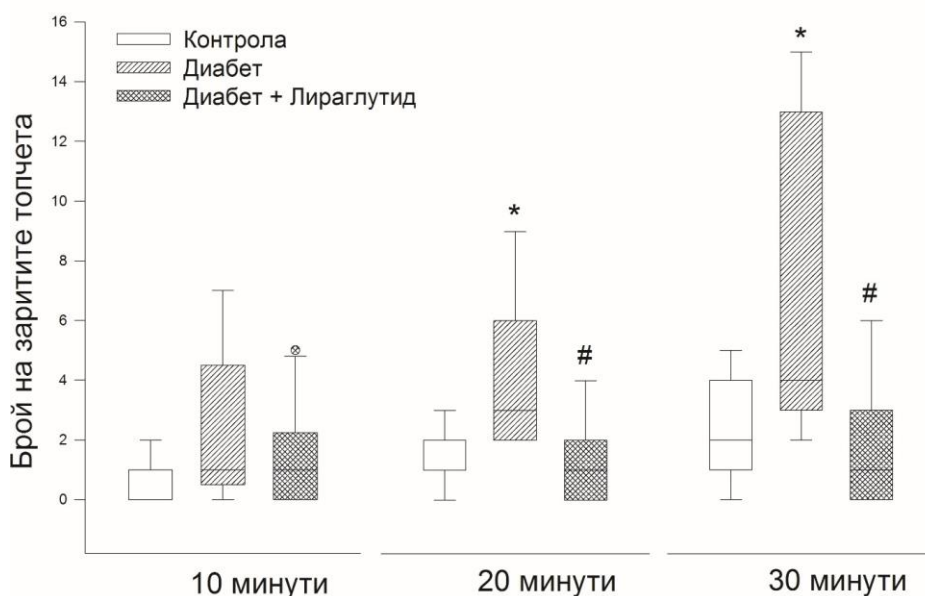
Фигура 2. Ефекти на лираглутид върху депресивното поведение при диабетни мишки.

Времето на неподвижност (секунди) в теста „окачване на опашката“ е показано за контролните мишки, диабетните мишки без третиране и диабетните мишки, третирани с лираглутид. Не се наблюдават значими разлики между трите групи ($n=9$ животни/група).

Данните са представени като средна стойност \pm SEM.

Ефекти на лираглутид върху компулсивното поведение в теста „заравяне на топчета“ при диабетни мишки

През първите 10 минути не се наблюдаваше значима разлика в броя на заритите топчета между групите (Фигура 3, $H = 1.276$, $df = 2$, $p = 0.528$). Въпреки това, след 20-та ($H = 9.665$, $df = 2$, $p = 0.008$) и 30-та минути ($H = 6.836$, $df = 2$, $p = 0.033$) се установиха значими разлики. Диабетните мишки зариха значително повече топчета, но третирането с лираглутид намали броя на заритите топчета до ниво сравнимо с това на контролните мишки (Фигура 3).



Фигура 3. Ефекти на лираглутид върху компулсивното поведение при диабетни мишки.

Средният брой зарити топчета в теста „заравяне на топчета“ е показан за контролните мишки, диабетните мишки без третиране и диабетните мишки, третирани с лираглутид, измерен на интервали от 10, 20 и 30 минути. Диабетните мишки показват значително по-висок брой зарити топчета в сравнение с контролните мишки, докато лечението с лираглутид води до намаляване на броя на заритите топчета до нива, подобни на тези при контролните мишки (* $p < 0.05$ в сравнение с контролната група; # $p < 0.05$ в сравнение с диабетната група без третиране; $n=9$ животни/група). Данните са представени като медиана \pm интерквартилен диапазон.

Дискусия

В нашето проучване установихме, че третирането с лираглутид на диабетни мишки значително облекчава студ-индуцираната хипералгезия. Тези открития съвпадат с други предклинични проучвания, които демонстрират невропротективните свойства на агонистите на GLP-1 рецептора при диабетна невропатия [17]. Например, Ma et al. (2018) използваха подобен модел на стрептозотоцин-индуциран диабет при плъхове, третирани с лираглутид в доза от 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ дневно в продължение на 8 седмици. Проучването установи частично възстановяване на плътността на миелиновите нервни влакна и подобрене в проводимостта на моторните и сетивни нерви след лечение с лираглутид. Освен това, лираглутид намали нивата на проинфламаторните цитокини, междуклетъчната адхезионна молекула-1 и NADPH оксидаза 4 в седалищния нерв, което показва противовъзпалителен и антиоксидативен ефект [18].

Въпреки тези обещаващи предклинични резултати, клиничните доказателства за невропротективните ефекти на GLP-1 рецепторните агонисти при диабетна периферна невропатия остават ограничени и противоречиви [17]. Например, Brock et al. (2019) проведоха рандомизирано, плацебо-контролирано проучване за оценка на лираглутид при пациенти с тип 1 диабет, прилаган в дози от 1.2–1.8 mg дневно в продължение на 26 седмици. Въпреки че лираглутид намали нивото на IL-6 и леко намали други проинфламаторни цитокини, не беше установено значимо въздействие върху функциите на централната, автономната или периферната нервна система [19]. Тези разминавания подчертават необходимостта от по-нататъшни изследвания за разбиране на ефектите на GLP-1 рецепторните агонисти върху невропатичната болка както в предклиничен, така и в клиничен контекст.

Освен това, в нашето проучване установихме, че лечението с лираглутид намалява компулсивното поведение при диабетни мишки, което се изразява в намалено зариване на топчета. Интересно е, че не наблюдавахме депресивно поведение при никоя от експерименталните групи, което може да се дължи на времето на поведенческата оценка в ранния стадий на развитието на диабета. Предишни проучвания обаче показват, че депресивни поведения могат да се проявят още в ранните етапи на диабета в някои модели [15]. Интересно е да се отбележи изследването на Palleria et al. (2017), които проучват ефектите на лираглутид върху когнитивния упадък и поведението при модел на стрептозотоцин-индуциран диабет при плъхове Wistar. При прилагане на лираглутид (300 µg/kg дневно) за 6 седмици, изследването показва, че лираглутид подобрява обучението и паметта при диабетни животни, има анксиолитични ефекти, но парадоксално проявява про-депресантни ефекти при контролни животни [20]. На молекулярно ниво, лираглутид показва способност да намалява невродегенерацията в хипокампа чрез модулиране на mTOR пътя, като бяха наблюдавани промени във фосфорилирането на АКТ, AMPK, ERK и p70S6K. Тези невропротективни ефекти бяха съпътствани от подобрена активност при поведение, свързано с тревожност, въпреки че лечението с лираглутид намали издръжливостта, което може да е повлияло на поведенческите резултати, като намалена двигателна активност по време на теста за принудително плуване. Тези открития подчертават, че GLP-1 рецепторните агонисти като лираглутид могат да имат многогранни ефекти върху мозъка, засягащи не само гликемичния контрол, но и невропротекцията, настроението и поведението [20].

Докато предклиничните изследвания до голяма степен подкрепят положителните ефекти на GLP-1 рецепторните агонисти върху настроението и поведението, клиничните резултати, особено по отношение на депресията и тревожността, остават неубедителни [21]. Различията в резултатите между животински модели и проучвания върху хора показва, че са необходими допълнителни изследвания за изясняване на ефектите на GLP-1 рецепторните агонисти, особено при диабетни популации.

Заклучение

Нашето проучване показва, че лираглутид ефективно облекчава студ-индуцираната хипералгезия и намалява компулсивното поведение при диабетни мишки, като подчертава терапевтичния потенциал на агонистите на GLP-1 рецептора при лечението на диабетната невропатия и свързаните с нея поведенчески промени. Тези резултати съответстват на предклиничните данни за невропротективни ефекти на GLP-1 рецепторните агонисти, въпреки че резултатите при хора остават неубедителни.

Благодарност: Подкрепено от Фонд научни изследвания, МОН, Дог.КР-06-Н63/9 от 13.12.2022г.

Библиография

1. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;157:107843.
2. Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clin. Diabetes.* 2011;29:116–122.
3. Feldman EL, Callaghan BC, Pop-Busui R, et al. Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):41.
4. Grigolon RB, Brietzke E, Mansur RB, et al. Association between diabetes and mood disorders and the potential use of anti-hyperglycemic agents as antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2019;95:109720.
5. Anderson RJ, Freedland KE, Clouse RE, Lustman PJ. The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 2001;24(6):1069-1078.
6. Kim GM, Woo JM, Jung SY, et al. Positive association between serious psychiatric outcomes

- and complications of diabetes mellitus in patients with depressive disorders. *Int J Psychiatry Med.* 2015;50(2):131-146.
7. Smith KJ, Béland M, Clyde M, et al. Association of diabetes with anxiety: a systematic review and meta-analysis. *J Psychosom Res.* 2013;74(2):89-99.
 8. Zeng SS, Bai JJ, Jiang H, et al. Treatment With Liraglutide Exerts Neuroprotection After Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats via the PI3K/AKT/GSK3 β Pathway. *Front Cell Neurosci.* 2020;13:585.
 9. Basalay MV, Davidson SM, Yellon DM. Neuroprotection in Rats Following Ischaemia-Reperfusion Injury by GLP-1 Analogues-Liraglutide and Semaglutide. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2019;33(6):661-667.
 10. Song S, Guo R, Mehmood A, et al. Liraglutide attenuate central nervous inflammation and demyelination through AMPK and pyroptosis-related NLRP3 pathway. *CNS Neurosci Ther.* 2022;28(3):422-434.
 11. Zhu H, Zhang Y, Shi Z, et al. The Neuroprotection of Liraglutide Against Ischaemia- induced Apoptosis through the Activation of the PI3K/AKT and MAPK Pathways. *Sci Rep.* 2016;6:26859.
 12. Yan W, Pang M, Yu Y, et al. The neuroprotection of liraglutide on diabetic cognitive deficits is associated with improved hippocampal synapses and inhibited neuronal apoptosis. *Life Sci.* 2019;231:116566.
 13. Gateva P, Hristov M, Ivanova N, et al. Antinociceptive Behavior, Glutamine/Glutamate, and Neopterin in Early-Stage Streptozotocin-Induced Diabetic Neuropathy in Liraglutide- Treated Mice under a Standard or Enriched Environment. *Int J Mol Sci.* 2024;25(19):10786.
 14. Hristov M, Sabit Z, Kirilov T, Bakalov D, Tzoneva R, Apostolova S, et al.. Effects of riboflavin on hyperalgesia and serum glutamine-to-glutamate ratio in rats with painful diabetic neuropathy. *Pharmacia* 2024;71:1–7.
 15. Castillo-Gómez E, Coviello S, Perez-Rando M, et al. Streptozotocin diabetic mice display depressive-like behavior and alterations in the structure, neurotransmission and plasticity of medial prefrontal cortex interneurons. *Brain Res Bull.* 2015;116:45-56.
 16. Kedia S, Chattarji S. Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice. *J Neurosci Methods.* 2014;233:150-154. Liu C, Wu T, Ren N. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists for the management of diabetic peripheral neuropathy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2024;14:1268619.
 17. Ma J, Shi M, Zhang X, et al. GLP-1R agonists ameliorate peripheral nerve dysfunction and inflammation via p38 MAPK/NF- κ B signaling pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Mol Med.* 2018;41(5):2977-2985
 18. Brock C, Hansen CS, Karmisholt J, et al. Liraglutide treatment reduced interleukin-6 in adults with type 1 diabetes but did not improve established autonomic or polyneuropathy. *Br J Clin Pharmacol.* 2019;85(11):2512-2523.
 19. Palleria C, Leo A, Andreozzi F, et al. Liraglutide prevents cognitive decline in a rat model of streptozotocin-induced diabetes independently from its peripheral metabolic effects. *Behav Brain Res.* 2017;321:157-169.
 20. Kornelius E, Huang JY, Lo SC, Huang CN, Yang YS. The risk of depression, anxiety, and suicidal behavior in patients with obesity on glucagon like peptide-1 receptor agonist therapy. *Sci Rep.* 2024;14(1):24433.

APPROACHES TO EXPOSURE ASSESSMENT OF COSMETIC PRODUCTS AND COSMETIC INGREDIENTS - SYSTEMATIC REVIEW AND SCOPING REVIEWS

Nikolay Nachev¹, Stefka Stoyanova¹, Emanuil Yordanov¹, Iva Parvova², Emil Hristov¹

¹Faculty of Chemistry and Pharmacy, Sofia University “St. Kliment Ohridski”

²Clinic of Rheumatology, Department of Internal Medicine, MU, Sofia, Bulgaria

ABSTRACT

Introduction: Any product directly and/or indirectly related to the health of the general public and which is to be placed on the EU market must be accompanied by clear instructions for use. Directions for normal and reasonable use are defined as cosmetic product claims and are a direct consequence of exposure to cosmetic substances/products. With a view to the foreseeable use of the products, all possible routes of exposure - dermal, oral and inhalation - must be considered. Various parameters (although not exhaustively) have been studied and are available in practice to describe different types of exposure scenarios.

The aim of this study is to analyse new approaches for exposure assessment of cosmetic products and cosmetic ingredients.

Materials and Methods: We conducted a systematic review and scoping review of scientific and regulatory documents at EU level (directives, guidelines, regulations), regulatory standards of the ECHA and the Scientific Committee on Consumer Safety, etc.

Results and discussion: The basic responsibility of the SCCS is to develop and recommend a set of guidelines to be taken into account by the cosmetic industry in developing adequate studies to be used in the safety assessment of cosmetic substances. In order to assess the exposure of end-users, relevant exposure scenarios must be identified which include all relevant functions and uses of a cosmetic ingredient. These scenarios should describe the 'reasonably foreseeable exposure conditions' under which the cosmetic product should be safe. With regard to the foreseeable use of products, all possible routes of exposure - dermal, oral and inhalation - must be considered.

Key words: cosmetic product, exposure, systemic dose, dermal exposure, inhalation exposure

НОВИ ПОДХОДИ ПРИ ОЦЕНКА НА ЕКСПОЗИЦИЯТА НА КОЗМЕТИЧНИТЕ ПРОДУКТИ И КОЗМЕТИЧНИ СЪСТАВКИ – СИСТЕМАТИЧЕН ПРЕГЛЕД И “SCOPING REVIEWS”

Николай Начев¹, Стефка Стоянова¹, Емануил Йорданов¹, Ива Първова², Емил Христов¹

¹Факултет по Химия и Фармация, Софийски университет „Св. Климент Охридски“

²Клиника по ревматология, Катедра по вътрешни болести, МУ, София, България

Въведение

Всеки продукт, свързан пряко и/или косвено със здравето на населението и на който предстои да бъде пуснат на пазара на ЕС, трябва да се съпровожда с ясно разписани указания за употреба. Козметичните продукти (КП), които се предоставят на пазара, трябва да са безопасни за човешкото здраве, когато се използват при нормални или разумно предвидими условия, и като се вземат предвид етикетирването и инструкциите за употреба и унищожаване след употреба. [1] Едва след като е доказана безопасността на козметичния продукт и въз основа на данните в техническото досие, той може да претендира за ефект (ефективност) и да предяви т.нар. претенция за ефект. В съответствие с правото на ЕС, всеки козметичен продукт трябва да отговаря на изисквания за нормална и разумно предвидима употреба. Претенциите

на козметичните продукти са доброволни маркетингови послания, използвани от икономическите оператори при етикетирването, пускането на пазара или рекламирането на техните продукти. Указанията за нормална и разумно употреба се определят като претенции на козметичните продукти и са пряко следствие на експозицията от тях. За да се оцени експозицията на крайните потребители, трябва да се идентифицират съответните сценарии, които включват всички важни функции и употреби на дадена козметична съставка. Тези сценарии трябва да описват „разумно предвидими условия на експозиция“, при които козметичният продукт трябва да бъде безопасен. [2]

Цел

Да представим последните и най-актуални подходи за оценка на експозицията на козметични продукти и козметични съставки. Вторична цел е да представим данни от литературата по ключови думи чрез систематичен преглед и “scoping reviews”.

Материали и методи

Направихме систематичен преглед и “scoping review” на научни публикации по ключови думи. Проведохме документален анализ и анализ на съдържанието на публичнодостъпни нормативни документи и ръководства, регулиращи оценката на експозицията на козметични продукти и козметични съставки.

Систематичните прегледи представляват сбор на научни изследвания, които се извършват с цел да идентифицират международни доказателства, които са от значение за конкретни въпроси, и да оценят и обобщят резултатите от търсенето, за да предоставят информация за практиката, политиката и в някои случаи за по-нататъшни изследвания.

“Scoping reviews” са инструмент за определяне на обхвата на дадена литература по дадена тема и дават ясна представа за обема на наличната литература и проучвания, както и преглед на тяхната насоченост, без да дават обобщени резултати.

Систематичен преглед на научни публикации по темата

Извършихме систематичен преглед на научни публикации в съответствие с препоръките на Cochrane Collaboration и Ръководството за предпочитани елементи за докладване на систематични прегледи и метаанализи (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines). Изготвихме протокол на изследването в съответствие с PRISMA 2009 Checklist, с предварително определени: тема, дизайн, стратегия за търсене, включващи и изключващи критерии, методи за събиране на данни, анализ на данни и статистическа оценка, изводи.

Тема на систематичния преглед. Нови подходи при оценка на експозицията на козметичните продукти и козметични съставки – систематичен преглед и “scoping reviews”.

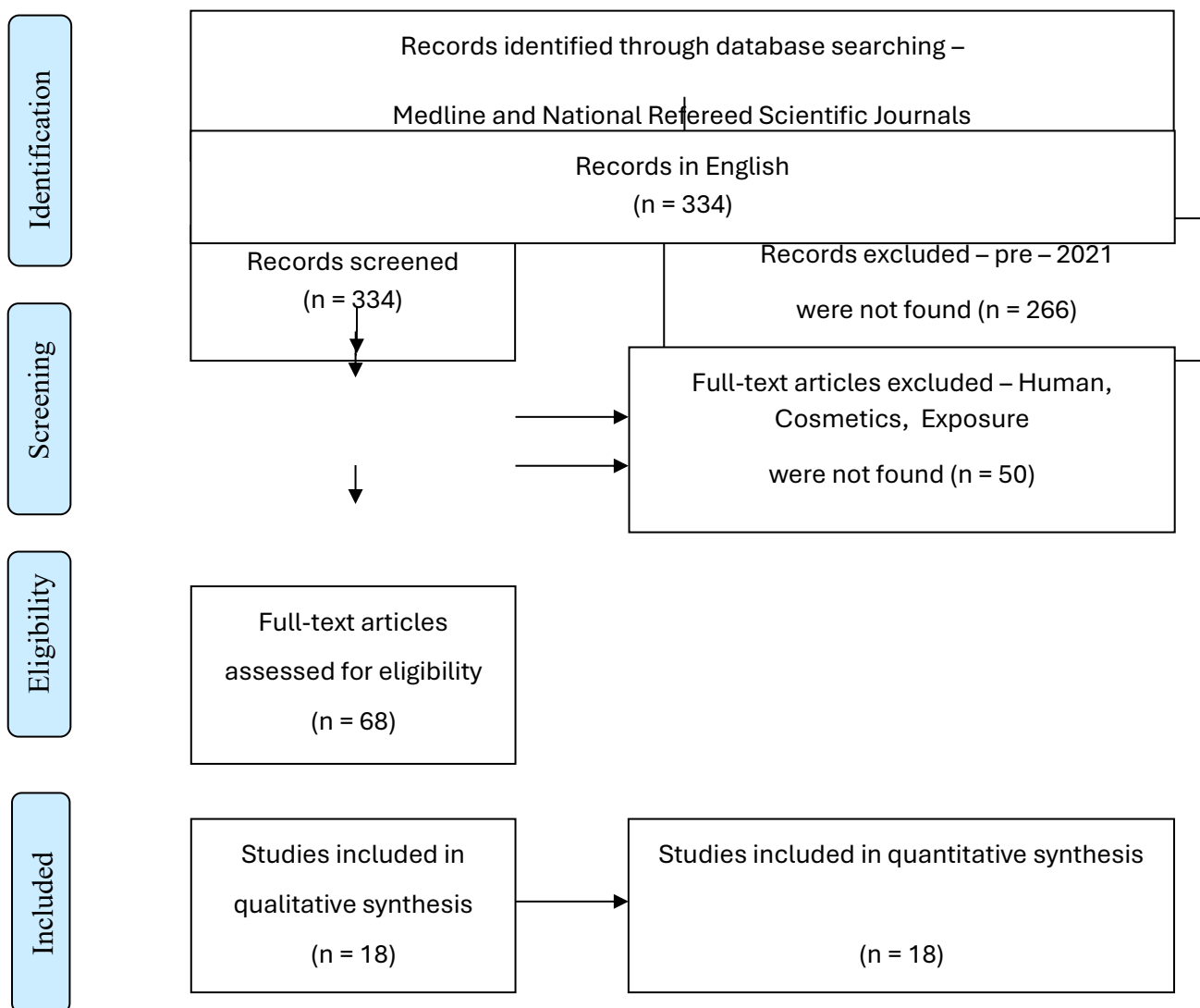
Стратегия за търсене. Проведохме активно търсене на научни публикации по следните ключови думи: козметични съставки, козметични продукти, експозиция на човека на козметични вещества, нормални или разумно предвидими условия на употреба.

Период на проучването. Търсенето на научни публикации бе проведено в бази данни MEDLINE и PubMed за периода януари 2009 г. – юни 2024 г. За период от 15 години открихме 334 научни публикации.

Оценявани резултати и критерии за включване. Анализирахме само научни публикации, съдържащи поне една от следните ключови думи: експозиция на човека на козметични вещества, нормални или разумно предвидими условия на употреба; публикувани в периода 2021 – 2024 г.

Резултати. Сканирахме 334 научни публикации. Изключихме 266, защото са публикувани в периода преди 2021 г. На последния етап изключихме 50 пълнотекстови статии, защото не съдържат данни за експозиция на козметични продукти и вещества при човека. Като краен резултат, остават 18 публикации, от които да се извличат данни. Подборът на

анализираните научни статии, проведен в съответствие със стратегията за търсене, е представен като PRISMA flow – diagram (Фиг.1).



Фигура 1. Преглед на процеса на търсене – PRISMA блок-схема

Резултати

Изучени са различни параметри (макар и неизчерпателно), с които се описват различните видове сценарии на експозиция:

1. Типове козметичен продукти, в които може да се използва съставката;
2. Начин на приложение, например втриване, пръскане, нанасяне, отмиване и др.; да се оцени дали продуктът е изплакващ се или продукт без отмиване и какъв фактор на задържане трябва да се приложи;
3. Концентрация на съставката в предлагания на пазара козметичен продукт;
4. Количество на продукта, използвано при всяко приложение;
5. Честота на употреба;
6. Обща площ на контакт с кожата;
7. Продължителност на експозицията;
8. Целеви потребителски групи (напр. деца, хора с чувствителна, увредена или компрометирана кожа), когато това е специално необходимо;
9. Приложение върху участъци от кожата, изложени на слънчева светлина;
10. Място за използване (на закрито/ открито) и вентилация.

Определяне на целевата „доза“ за оценка на безопасността се извършва чрез идентифициране на следните параметри: или като системни ефекти, които изискват сравнение със системната доза за експозиция (SED), или като локални ефекти:

- дразнене на кожата/очите,
- кожна сенсибилизация,
- кожни реакции, предизвикани от слънцето,
- или ефекти върху белите дробове, които най-вече зависят от количеството вещество,

действащо върху повърхностните тъкани на съответната част от тялото и изискват сравнение с локална външна доза (LED).

При оценката на експозицията първо се определя локална външна доза, която се очакват на специфични места от човешкото тяло и е налична за поемане. Най-важните „входове“ за навлизане на козметични вещества в тялото са кожата, дихателния тракт и устата. Те съответстват на пътищата на поглъщане за вътрешна експозиция (дермален път, вдишване и орално поглъщане). В зависимост от вида на продуктите са възможни и други пътища за навлизане – през очите (напр. грим за очите) или чрез гениталните области (напр. интимен спрей, интимни кремове). Като пример, локалната външна доза в белия дроб (количеството съставка на g белодробна тъкан) може да се сравни с „локален“ No Observed Adverse Effect Level (NOAEL), а локалната граница на безопасност (Margin of Safety – MoS) може да бъде изчислена за ефекти върху белите дробове. Външната експозиция може допълнително да се използва за изчисляване на вътрешна (или системна) експозиция, която съответства на вътрешна доза. За изчисляването на SED трябва да се вземе предвид абсорбцията (или поглъщането), специфична за съответния път на експозиция. За оценка на риска MoS се основава на вътрешната доза, т.е. SED [3].

Обикновено външната експозиция се изчислява чрез умножаване на концентрацията/фракцията на вещество в източник с количеството от източника, което се прилага върху или достига до определено място. За да се спестят време и ресурси, се следва многостепенен подход, който първо изследва експозицията въз основа на общи сценарии с консервативни точкови стойности като параметри на модела (ниво на скрининг). Когато е необходимо, тези консервативни оценки се прецизират на по-високо ниво чрез използване на вероятностни подходи. За регулаторни цели вероятностният подход трябва да бъде консервативен, но реалистичен и прозрачен. Навиците и практиките в населението по отношение на използването на продуктови категории могат да се третират вероятно, при допускането, че те няма да се променят бързо с течение на времето. Целта за защита ще бъде 95-ия перцентил от европейското население. Следователно, за вероятностна оценка съответният SED за извличане на MoS ще бъде 95-ия перцентил на вероятно оценената експозиция на населението.

Както споменахме, за изчисляване на общата експозиция се използват сумите от няколко различни видове експозиция, в което число влиза дермалната. При изчисляването на дермалната експозиция трябва да се вземе предвид, че само част от продукта се задържа върху кожата. Поради това се използва коефициент на задържане (f_{ret}), който представлява фракцията, достъпна за поглъщане. Формулата, по която се изчислява дермалната експозиция е следната:

$$E_{dermal\ x} = C_x \times Q_x \times f_{ret\ x}, \text{ където:}$$

$E_{dermal\ x}$ – Външна експозиция харктерна за продуктовата категория

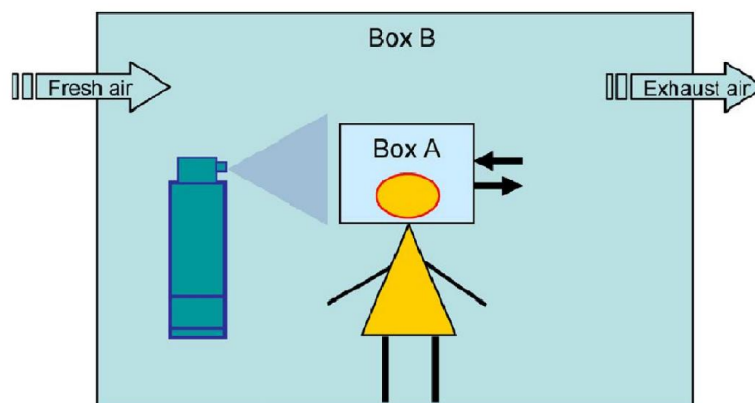
X – Продуктова категория;

C_x – Концентрация на продукта;

Q_x – количеството нанесен продукт от дадена категория.

Вторият компонент при определянето на общата експозиция е инхалаторната. Козметичните продукти могат да бъдат вдишани или след изпаряване от мястото на употреба, или когато се използват под формата на спрей/прах. Изпаряването е от значение само за

летливите вещества. Външната експозиция на пари може да се изчисли директно въз основа на измерване на концентрацията на веществото във въздуха. При вдишване на вещества в спрейове и прах за оценката трябва да се вземе предвид разпределението на частиците по размер и съответните скорости на отлагане в различните части на белите дробове. Нивото на експозиция може да бъде оценено чрез използване на математически модели или да бъде директно измерено при стандартни условия. Когато се използват математически модели, трябва да се следва многостепенен подход. Познати са два основни модела: модел с 1 кутия и модел с 2 кутии. В класическият модел с 1 кутия се приема, че цялото количество спрей се освобождава моментално във въздуха и се разпределя в кутия с определен размер, която например симулира дихателната зона. Моделът с 2 кутии отчита разреждането на веществото с течение на времето. Допуска се, че спреят се освобождава мигновено и се разпределя в кутия около главата, кутия А. Аерозолът присъства за определено време, след което цялото количество аерозол в първата кутия се прехвърля в по-голяма втора кутия, кутия Б, където е на разположение за вдишване за втори определен период от време. Моделите на инхалаторна експозиция са представени на Фигура 2.



Фигура 2. Модел на експозиция с една и две кутии.

Вътрешната експозиция може да бъде измерена при хората или да бъде изчислена от външната експозиция, например чрез прилагане на стойности за абсорбция, специфични за пътя, които превръщат количеството вещество, постъпващо в организма, в количество, което е налично в кръвообращението и представлява „дозата“, действаща на органно ниво. За да достигнат до кръвообращението (кръвоносните и лимфните съдове), козметичните продукти трябва да преминат през редица клетки, от които за определящ се счита слой на кожата наречен *stratum corneum*. Важно е да се знае дали съставът може да повлияе на бионаличността на някоя от съставките в продукта. Съществуват много усилватели на проникването и помощни вещества (например липозоми), които могат да бъдат специално добавени към козметичния състав, за да улеснят дермалната абсорбция на определени съставки. Препоръчително е в процеса на оценка на риска да се провеждат изследвания на дермалната абсорбция. При липса на експериментално установена дермална абсорбция, стойността по подразбиране е 50 %. При продукти, предназначени за орална употреба, като пасти за зъби и води за уста, известно количество ще бъде погълнато. Ако не са предоставени експериментално получени данни, се приема консервативната стойност на абсорбция след поглъщане от 100 %.

Изчисляването на SED се извършва по два начина, в зависимост от метода, по който се отчита дермалната абсорбция на дадена козметични съставка. Първият начин се основава на абсолютното количество бионаличност ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) след определен период от време, въз основа на най-високата очаквана концентрация. Вторият начин се основава на процента на дермална абсорбция. Това зависи от количеството на крайния продукт, нанесено върху кожата. Математическият израз за системната доза на експозиция изглежда по следния начин:

$SED = DA_a \times 10^{-3} \times SSA \times f_{appl} / 60kg$, където:

SED – Системна доза за експозиция

DA_a (µg /cm²) – Дермална абсорбция като количество на повърхност, получено от анализ при условия, имитиращи употреба

SSA (cm²) Площ на повърхността на кожата, която се очаква да бъде третирана с готовия продукт козметичен продукт

f_{appl} (ден-1) – Честота на нанасяне на готовия продукт

bw (kg bw) – телесно тегло на човека (стойност по подразбиране: 60 kg)

Друг много важен показател, който измерваме при експозицията на козметични продукти е инхалационната системна доза на експозиция (SED_{inh}). Експозицията на дадено вещество при вдишване след изпаряване се изчислява, като дневното приложение на продукта се умножава по концентрацията на веществото. В някои ситуации е допустимо прилагането на консервативен метод за изчисляване на изпаряващата се част. Формулата, по която се изчислява SED_{inh} е следната:

$SED_{inh} = E_{product} \times C \times f_{evap} / 100$, където:

SED_{inh} – Системна доза на експозиция при вдишване

E_{product} – Честота на прилагане на КП

C – Концентрация на КП

f_{evap} – Коефициент на изпарение на КП

Обсъждане

Akhtar A. и сътрудници провеждат проучване в което разглеждат токсичните вещества в различни КП за лице и потенциалните рискове за увреждане на здравето от тях. Въпреки широката си употреба КП за лице може да съдържат токсични вещества, които да се абсорбират от кожата и да попаднат в кръвообращението. Проучването подчертава значението на мониторинга и регулирането на токсичните вещества съдържащи се в козметиката за лице. [4]

Подобни резултати се наблюдават и в проучване на Sanajou S. и сътр., разглеждащо употребата на алуминиеви соли в КП и продуктите за лична хигиена. Въпреки че алуминият има приложение в медицината за хиперхидроза, се изразяват опасения за потенциалната му корелация със заболявания като рак на гърдата, кисти на гърдата и болестта на Алцхаймер. Авторите съветват всички бъдещи проучвания да се фокусират върху дългосрочната реална експозиция на антиперспирантите и други продукти, съдържащи алуминий. [5]

Tha EL. и сътр., проучват инхалаторната експозиция на КП. Независимо от липсата на утвърдени стандарти за изпитвания, свързани с раздразнението на дихателните пътища и сенсibiliзация, алтернативни методи за оценка на тези фактори все още не са установени. Рисковете, свързани с вдишването, се определят чрез екстраполация на данни, получени от различни видове тъкани и органи, основавайки се на наличните данни при хора и животни. Необходимо е провеждането на точни токсикологични оценки, които да определят безопасността на тези продукти. [6]

Екипът на Tozer S. изготвя оценка на експозицията на потребителите на КП на няколко нива. Ниво 1 е най-лошият сценарий, където потребителят използва всички продукти с максимална честота и с висока концентрация. За по-реалистични оценки, се използват доказателства от проучвания на реалната употреба на съставките и вероятностни модели от ниво 2. Резултатите подчертават важността на прехода от консервативни към реалистични оценки, за да се докаже безопасността на КП за потребителите. [7]

Irfan M и сътрудници разглеждат рисковете от възможното съдържание на тежки метали, хидрохинон и микроорганизми в КП за лице. Авторите изследват девет различни КП. Тежките метали са: цинк (Zn), живак (Hg), кадмий (Cd), хром (Cr), никел (Ni), олово (Pb).

Препоръчва се разумната употреба на тези продукти, за да се гарантира безопасността за здравето на потребителите. [8]

Chandra S и сътрудници представят стандартите на международната асоциация за аромати и методите, по които се контролира използването на естествено получения аромат метил-N-метилантранилат (DMA) в КП. Има ограничени проучвания относно фототоксичността и фотогенотоксичността на DMA при излагане на UVA/ слънчева светлина. DMA причинява фрагментация на ДНК и показва следи на оксидативен стрес и апоптоза в клетките на човешката кожа. Въпреки това, са необходими допълнителни проучвания, за да се разбере пълната фототоксичност на DMA. [9]

Gao Y заедно със своя екип описват значително увеличение на използването на растителни съставки в потребителските продукти, особено в КП и грижата за домакинството. Понастоящем е изготвен референтен набор от 14 растителни съставки, които се използват за предизвикване на кожна сенсибилизация. Той може да бъде полезен при оценката на наличните методи за тестване или при разработването на нови модели за прогнозиране на кожна сенсибилизация. [10]

Bowden AM и сътр. правят проучване относно понятието за праг на токсикологична опасност (ПТО) като една от възможностите за оценка на безопасността на вещества с ограничен набор от данни за токсичност. Прилагането на ПТО е широко прието за КП, изложени на орална или дермална експозиция. През последните години са разработени различни подходи към концепцията за ПТО при вдишване. Подчертан е напредъкът, постигнат до момента в разработката на инхалационни ПТО, както и следващите стъпки, предвидени за регулаторно одобрение и използване. [11]

Laga-Torres S и сътр. правят проучване за присъствието на токсични метали в червила, които могат да имат риск за здравето и много потребители на подобен тип КП. Цел на проучването е да се оценят последиците свързани с дермална и орална експозиция на токсични метали (алуминий, кадмий, платина) в червила, произведени в Китай и Европа. Оценката на риска от онкологично заболяване причинето от Cd и Pb завършва с тотален риск по-малко от 1. [12]

Rehman N и сътр. провеждат проучване за репродуктивната токсичност на наночастици от цинков оксид (ZnO-NP) при мъжки плъхове от вида Спраг Доули. Целта на изследването е да се изясни степента на репродуктивна токсичност, предизвикана от ZnO-NPs и да се разберат потенциалните ендокринни и репродуктивни нарушения. Резултатите подчертават нуждата от строги предпазни мерки при използването на ZnO-NPs в КП, за да се намали токсичното въздействие върху репродуктивната система. [13]

Екипът на Wang M провеждат проучване, чиято цел е да оцени риска от изложение на наночастици цинков оксид (ZnO-NPs) при лечение на възпалителни кожни заболявания. Проучването се провежда на нормални човешки кератиноцити и възпалителни кератиноцити, индуцирани от тумор-некротизиращ фактор алфа (TNF- α). Резултатите показват, че ZnO-NPs стимулират цитопротективната автофагия на възпалителните кератиноцити и блокират автофагичния поток, свързан с p62, което довежда до намаляване на клетъчната жизнеспособност. [14]

Kunita R, заедно със своя екип провеждат проучване, което потвърждава приложимостта на теста на Ames за оценка на козметичните опаковки. Токсикологични данни за 37 вещества показват, че поне 32 от тях нямат мутагенни и канцерогенни рискове, когато се използва тестът на Ames с процес на концентриране на пробите. Това предполага, че приложението на теста на Ames е полезно за гарантиране на безопасността на козметичните опаковки, като се използва и Cramer-ТТС за системна токсичност. [15]

Екипът на Mustieles V проучват употребата на бензофенон-3 (BP-3) и бензофенон-1 (BP-1) като UV филтри в слънцезащитни продукти и КП за предотвратяване на увреждане на кожата. Настоящото проучване представя доказателствата за безопасността на тези вещества. Анализират се данните от различни категории изследвания – източници на експозиция и прогнозни фактори, нива на експозиция чрез биомониторинг на хора, токсикокинетични данни

за експериментални животни и хора, проучвания за токсичност при гризачи и данни за биомаркери на ефекта и здравни резултати при хора. [16]

Vandenberg LN и Bugos J разглеждат безопасността на парабените, с фокус върху пропилапарабена (PP). Проучването обръща внимание на разискванията относно възможната връзка между изложението на PP и рак на гърдата. Чрез анализ на характеристиките на „известни“ ендокринни дизруптори, се оценяват възможните нарушения в ендокринната система, специфични за PP. В заключение, наличните доказателства не са достатъчни, за да се докаже безопасността на употребата на PP. [17]

Monnot AD и сътр. провеждат проучване с цел оценка на имуногенния потенциал на WEN by Chaz Dean (WCD) почистващия балсам чрез използване на нов *in vitro* тест с експланти от човешка кожа. За това са събрани мононуклеарни клетки от периферна кръв и биопсии от човешка кожа на доброволци. Проучването доказва, че е валидна алтернатива на изпитванията върху животни за продукти, които съдържат сложни смеси или са налице на пазара. [18]

В проучването си за нанокозметиката Сао М и сътр. установяват, че тя притежава потенциални рискове за безопасността на потребителите, свързани с токсичността и перкутанното проникване на наноматериалите в човешкото тяло. В това изследване се проучва перкутанното проникване и дермалната безопасност на златни нанослоеве в козметичен крем, използвайки морски свинчета. Проучване предоставя надеждни методи за изследване на перкутанното проникване, биоразпределението и дермалната безопасност на нанокозметични продукти. [19]

Ма Х заедно с екипа си провежда проучване на използваните тестове *in vitro* за да се определи безопасността и ефикасността на лекарствените продукти. В тази насока, изследователите проучват възможността за използване на 3D модели на кожата, които имат естествени характеристики, за да се анализират КП и техните съставки. Времето, необходимо за експозиция на локални КП е 18 часа, а времето за почистващи продукти е 1 час. [20]

Mewes KR и сътр. провеждат проучване относно важността на токсикологичната оценка на козметични съставки, специално по отношение на тяхната способност да предизвикват сензибилизация на кожата. За тази цел се използва тестът "h-CLAT", който анализира експресията на специфични протеини в клетките след излагане на КП. В статията се предлага алтернативна система за откриване, използваща APC-маркирани антители, които не се сблъскват с проблема на автофлуоресценцията. Това доказва еквивалентността на двата метода и показва, че APC може да се използва като алтернатива за преодоляване на автофлуоресцентната интерференция и разширяване на приложимостта на h-CLAT. [21]

Заклучение

За КП и козметичните съставки рискът от системни ефекти се определя до голяма степен от абсорбцията през кожата, която може да бъде измерена *in vitro*. Количественото определяне чрез използване на биомаркери се използва все по-често, за да се осигури интегрирана мярка за многобройните пътища на експозиция на дадено лице на отделните козметични съставки. Разглеждането на съответните сценарии на експозиция, които обхващат всички функции на козметичната съставка е ключово при определянето на границата на безопасност за КП.

Литература

1. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council, of 30 November 2009, on Cosmetic Products; Official Journal of the European Union, 2009; p. 59. Available online: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/endocrine_disruptors/docs/cosmetic_1223_2009_regulation_en.pdf (accessed on 11 March 2018).
2. Commission Regulation (EU) No 655/2013 of 10 July 2013 Laying Down Common Criteria for the Justification of Claims Used in Relation to Cosmetic Products; Official Journal of the

- European Union, 2013; p. 31. Available online: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32013R0655> (accessed on 11 March 2018).
3. Bernauer U, L. Bodin, Q. Chaudhry, P.J. Coenraads, M. Dusinska, et al.. The SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation- 12th Revision - SCCS/1647/22. Commission européenne. 2023. (hal-04100663)
 4. Akhtar A, Kazi TG, Afridi HI, Khan M. Human exposure to toxic elements through facial cosmetic products: Dermal risk assessment. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2022 Jun;131:105145. doi: 10.1016/j.yrtph.2022.105145. Epub 2022 Feb 24. PMID: 35219764.
 5. Sanajou S, Şahin G, Baydar T. Aluminium in cosmetics and personal care products. *J Appl Toxicol.* 2021 Nov;41(11):1704-1718. doi: 10.1002/jat.4228. Epub 2021 Aug 15. PMID: 34396567.
 6. Thá EL, Canavez ADPM, Schuck DC, Gagosian VSC, Lorencini M, Leme DM. Beyond dermal exposure: The respiratory tract as a target organ in hazard assessments of cosmetic ingredients. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2021 Aug;124:104976. doi: 10.1016/j.yrtph.2021.104976. Epub 2021 Jun 15. PMID: 34139277.
 7. Sarah Tozer, Camilla Alexander-White, Ripal Amin, Françoise Audebert, Catherine Barratt, John O'Brien, et al. From worst-case to reality – Case studies illustrating tiered refinement of consumer exposure to cosmetic ingredients, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 143, 2023, 105436, ISSN 0273-2300, <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2023.105436>.
 8. Irfan M, Shafeeq A, Siddiq U, Bashir F, Ahmad T, Athar M, Butt MT, Ullah S, Mukhtar A, Hussien M, Lam SS. A mechanistic approach for toxicity and risk assessment of heavy metals, hydroquinone and microorganisms in cosmetic creams. *J Hazard Mater.* 2022 Jul 5;433:128806. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.128806. Epub 2022 Mar 29. PMID: 35398795.
 9. Chandra S, Qureshi S, Chopra D, Shukla S, Patel SK, Singh J, Ray RS. UVR-induced phototoxicity mechanism of methyl N-methylantranilate in human keratinocyte cell line. *Toxicol In Vitro.* 2022 Apr;80:105322. doi: 10.1016/j.tiv.2022.105322. Epub 2022 Jan 25. PMID: 35085765.
 10. Gao Y, Ryan CA, Ellingson K, Krutz N, Kern PS. A botanical reference set illustrating a weight of evidence approach for skin sensitization risk assessment. *Food Chem Toxicol.* 2024 Feb;184:114413. doi: 10.1016/j.fct.2023.114413. Epub 2023 Dec 19. PMID: 38128687.
 11. Bowden AM, Escher SE, Rose J, Sadekar N, Patlewicz G, O'Keeffe L, Bury D, Hewitt NJ, Giusti A, Rothe H. Workshop report: Challenges faced in developing inhalation thresholds of Toxicological Concern (TTC) - State of the science and next steps. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2023 Aug;142:105434. doi: 10.1016/j.yrtph.2023.105434. Epub 2023 Jun 9. PMID: 37302561; PMCID: PMC10494708.
 12. Lara-Torres S, Figueiredo D, Paz S, Gutiérrez AJ, Rubio C, González-Weller D, Revert C, Hardisson A. Determination and risk assessment of toxic metals in lipsticks from Europe and China. *J Trace Elem Med Biol.* 2021 Sep;67:126792. doi: 10.1016/j.jtemb.2021.126792. Epub 2021 May 17. Erratum in: *J Trace Elem Med Biol.* 2021 Dec;68:126838. PMID: 34022566.
 13. Rehman N, Jabeen F, Asad M, Nijabat A, Ali A, Khan SU, et al. Exposure to zinc oxide nanoparticles induced reproductive toxicities in male Sprague Dawley rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2024 May;83:127411. doi: 10.1016/j.jtemb.2024.127411. Epub 2024 Feb 12. PMID: 38387428.
 14. Wang M, Zheng H, Chen J, Tang Y, Feng M, Li L. ZnO nanoparticles impair autophagic flux and cell viability through the TRIM16-NRF2-p62 pathway in inflammatory keratinocytes. *Food Chem Toxicol.* 2023 Dec;182:114177. doi: 10.1016/j.fct.2023.114177. Epub 2023 Nov 15. PMID: 37977258.
 15. Kunita R, Kawamoto T, Nishijima T, Miyazawa M. Evaluating the applicability of the Ames test for cosmetic packaging assessment by comparing carcinogenic risk levels of migrants from plastics with biological detection limits. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2023 Mar;139:105363. doi: 10.1016/j.yrtph.2023.105363. Epub 2023 Feb 16. PMID: 36805912.

16. Mustieles V, Balogh RK, Axelstad M, Montazeri P, Márquez S, Vrijheid M, Draskau MK, Taxvig C, Peinado FM, Berman T, Frederiksen H, Fernández MF, Marie Vinggaard A, Andersson AM. Benzophenone-3: Comprehensive review of the toxicological and human evidence with meta-analysis of human biomonitoring studies. *Environ Int.* 2023 Mar;173:107739. doi: 10.1016/j.envint.2023.107739. Epub 2023 Jan 6. PMID: 36805158.
17. Vandenberg LN, Bugos J. Assessing the Public Health Implications of the Food Preservative Propylparaben: Has This Chemical Been Safely Used for Decades. *Curr Environ Health Rep.* 2021 Mar;8(1):54-70. doi: 10.1007/s40572-020-00300-6. Epub 2021 Jan 8. PMID: 33415721.
18. Monnot AD, Towle KM, Ahmed SS, Dickinson AM, Fung ES. An in vitro human assay for evaluating immunogenic and sensitization potential of a personal care and cosmetic product. *Toxicol Mech Methods.* 2021 Mar;31(3):205-211. doi: 10.1080/15376516.2020.1868640. Epub 2021 Jan 13. PMID: 33371753.
19. Cao M, Li B, Guo M, Liu Y, Zhang L, Wang Y, Hu B, Li J, Sutherland DS, Wang L, Chen C. In vivo percutaneous permeation of gold nanomaterials in consumer cosmetics: implication in dermal safety assessment of consumer nanoproducts. *Nanotoxicology.* 2021 Feb;15(1):131-144. doi: 10.1080/17435390.2020.1860264. Epub 2020 Dec 28. PMID: 33370537.
20. Ma X, Wang F, Wang B. Application of an in vitro reconstructed human skin on cosmetics in skin irritation tests. *J Cosmet Dermatol.* 2021 Jun;20(6):1933-1941. doi: 10.1111/jocd.13789. Epub 2020 Oct 29. PMID: 33053260.
21. Mewes KR, Engels U, Eicker B, Petersohn D. Extending the applicability domain of the human cell line activation test (h-CLAT). *ALTEX.* 2021;38(1):95-110. doi: 10.14573/altex.2001242. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32754772.

TREATMENT OF ACUTE COUGH IN CHILDREN: RECOMMENDATIONS AND REALITY

Nikolinka Koleva¹, Nedyalko Nedyalkov², Ludmila Filipova², Galya Stavreva¹

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Medical University – Pleven

²Student, Medical University – Pleven

ABSTRACT

The best approaches to treating acute cough in children remain unclear, despite knowledge of the cough reflex, the availability of many classes of drugs, and the long history of their use. Studies in the pediatric population are few; there are no clear indications for the dosage and duration of treatment, and a large number of OTC products with numerous active components are used. There is no good evidence for or against the effectiveness of medicines for acute cough. All this contributes to inappropriate therapy, delay in the diagnostic process, overdose, and adverse events. In 2008, the FDA restricted the approval of OTC medicines for the treatment of cough in children under 2 years of age. Manufacturers voluntarily announced their use for children over 4 years of age. American Academy of Pediatrics recommended avoiding them in children under 6. European Academy of Pediatrics does not support their prescribing and use in young children (December 2023).

Methods. A literature review and review of the summaries of product characteristics of approved OTC medicinal products for the treatment of cough was performed.

Results. The number of products indicated for children over 6 years of age is limited. More drugs are recommended for children over 2 years of age. Drug products containing the same active ingredients are recommended for children of different ages.

Conclusion. Clinical trials are needed to elucidate the efficacy and safety of current therapies for acute cough, to better characterize subpopulations of children with cough, and to make corrections in recommendations for use. The responsibility of the pharmacist is great when dispensing OTC products for the treatment of acute cough in children.

Key words: acute cough, children, recommendations, summary of product characteristics

ЛЕЧЕНИЕ НА ОСТРА КАШЛИЦА ПРИ ДЕЦА: ПРЕПОРЪКИ И РЕАЛНОСТ

Николинка Колева¹, Недялко Недялков², Людмила Филипова², Галя Ставрева¹

¹Катедра „Фармакология и токсикология“, Факултет „Фармация“, Медицински университет – Плевен

²Студент, Медицински университет – Плевен

Въведение

Кашлицата е форсиран маньовър на изгонване на въздух, съпроводен с характерен звук, обикновено при затворен глотис [1]. Тя е ефективен защитен механизъм за освобождаване на дихателните пътища от гъсти, но неустойчиви секрети, които са в излишък и чиято издръжливост се определя, като векторна сума от адхезивността и кохезията. Възниква когато има нарушен мукоцилиарен клирънс или възпаление на белите дробове.

Рефлексът на кашлицата се предизвиква от стимулиране на дразними рецептори в аферентните бронхопулмонални C влакна на вагусовия нерв и механично-чувствителните рецептори, сигнализиращи към центъра на кашлицата в продълговатия мозък. Смята се, че причината за хроничната кашлица е повишена чувствителност и свръхчувствителност, вследствие на постоянно дразнене и сенсibiliзиране на тези нерви от кашличния процес [2].

В зависимост от своята продължителност, кашлицата при деца се разделя на остра и хронична. Острата кашлица е с внезапно начало и продължителност до 3 седмици. Причини

за остра кашлица в детска възраст са заболявания на дихателните пътища (вирусни инфекции, алергия, синусит, бронхиална астма, аспирация на чуждо тяло, инхалационни интоксикации, постинфекциозна кашлица), на плеврата и екстрапулмонални причини. По-голямата част от децата с остра кашлица, страдат от вирусни инфекции на горните дихателни пътища (ГДП), като в тези случаи най-често се прилага симптоматично лечение. При хроничната кашлица вероятността за инфекциозна генеза намалява. Съществува и подостра кашлица, която е остатъчна кашлица след вирусна инфекция или коклюш и симптомите отзвучават бавно за период от 3 до 8 седмици [3]. Кашлицата при деца се различава от кашлицата при възрастни, по отношение на продължителност, представяне, етиология и лечение. Кашлицата повлиява нивото на активност на детето, качеството на съня, апетитът и възможността да посещава учебно заведение и е източник на родителско безпокойство. Фактори, които влияят върху ефективността на кашлицата са калибъра на дихателните пътища (стесняване на ДП, намалява ефективността), наличната слуз, дихателните мускули, които при децата не са добре развити.

Като се има предвид това, че кашлицата е защитен рефлекс е важно да не се потиска, без идентифициране и лечение на основната причина [4]. Деца под 5 години рядко отделят хрчки, дори когато са налице секрети от дихателните пътища, а по-скоро ги поглъщат. Основна причина за влажната кашлица е лигавична хиперсекреция или нарушен мукоцилиарен клирънс, докато суха кашлицата предполага дразнене на дихателните пътища, възпаление или липса на причина, свързана с дихателните пътища [5-7].

Средно нормално децата кашлят по 11 пъти на ден, когато са добре и това се увеличава по честота и тежест през зимата, когато инфекциите на ГДП са чести. Здравите деца боледуват от инфекции на горните дихателни пътища няколко пъти в годината. Кашлицата, причинена от тях обикновено отзвучава, в рамките на 1 до 3 седмици. Проспективно кохортно проучване на остра кашлица при деца в предучилищна възраст показват, че 50% от децата са се възстановили за 10 дни, като 10% от децата са имали симптоматична кашлица до 25 дни [8]. При повечето деца остра кашлица, причинена от вируси е самоограничаваща се и изисква само поддържащо лечение, като например антипиретици за треска и адекватен прием на течности.

Според Cochrane ревю няма доказателства за ефективността на ОТС лекарствата за лечение на остра кашлица при деца и възрастни в амбулаторни условия [9]. През последните години се забелязва повишен интерес към използване на мед за лечение на остра кашлица при деца. Обзор на Cochrane за оценка на ефективността на меда съобщава за по-добър резултат от дифенхидрамин и плацебо за симптоматичното облекчаване на кашлицата. Авторите заключават, че „Няма сериозни доказателства за или против използването на мед“ [10].

През 2008 година FDA ограничава отпускането на ОТС лекарства за лечение на кашлица при деца под 2-годишна възраст [11]. Скоро след това производителите доброволно обявяват използване им при деца над 4 години, а Американската академия по педиатрия (AAP) препоръчва избягване им под 6 години. През 2014 г. AAP призова FDA и производителите на лекарства за настинка/кашлица без рецепта да използват препоръки за дозиране, базирани на теглото, а не на възрастта, както дозиращите устройства да имат капацитет за ограничаване на дозата, за да се предотврати предозиране [12]. Европейската академия по педиатрия не подкрепя изписването и употребата им при малки деца [13].

Поставихме си за цел да направим обзор на препоръките за лечение на остра кашлица при деца и преглед на кратките характеристики на разрешените за употреба у нас ОТС лекарствени продукти.

Лекарствените продукти против кашлица са две категории: такива които потискат (антитусивни) кашлицата и които я насърчават (експекторанти и муколитици). Първите се прилагат при непродуктивна кашлица, а вторите при наличие на секрети в дихателните пътища. [2]. Освен лекарствата, хидратацията на организма също подпомага терапията на кашлицата.

Резултати и дискусия

Експекторантите представляват фармакотерапевтична група лекарства, които стимулират отделянето на бронхиални секрети. Наименованието им произлиза от латинската дума *expectorate* (*ex* – навън и *pectus* – гръден кош). Те включват голям брой лекарствени продукти с растителен произход и могат да съдържат различни активните субстанции: сапонини, терпени, етерични масла, слюзни вещества, както и комбинации от тях. Експекторантите увеличават обема на слюзта, което улеснява клирънса на дихателните пътища чрез кашлица. Слюзният секрет покрива и предпазва дихателните пътища, като улавя вдишваните частици и предотвратява загуба на вода. Производството на слюз се регулира директно от парасимпатиковата нервна система, действаща върху секреторните мускаринови рецептори на клетъчната повърхност и се стимулира от вдишване на алергени и инфекциозни агенти.

В таблица 1 са представени лекарствени продукти, разрешени за употреба при деца в България-експекторанти. Тритерпеновите сапонини се съдържат в екстракт от бръшлян, активна съставка на Проспан и Хеделикс сироп и разтвор (Таблица 1). Прилагат се симптоматично при остри и хронични възпалителни заболявания на белия дроб, придружени с продуктивна кашлица. Екстрактът от бръшлян притежава секретолитичен, муколитичен и бронхоспазмолитичен ефект, дължащ се на тритерпеновите сапонини хедеракозид С, L-хедерин, алкалоида еметин, флаваноидите рутин, кверцетин и кемпферол.

Таблица 1. Лекарствени продукти – експекторанти, разрешени за употреба при деца в България

№	Лекарствен продукт	Състав	Дозов режим при деца	Противопоказания
1.	Prospan syrup	Hedera helix folium extractum siccum	2-5 год. -3 пъти по 2.5 ml 6-9 год. – 3 пъти по 5 ml 2-5 год. – 3 пъти по 5 ml	деца под 2 год.
2.	Prospan oral drops	Hedera helix folium extractum siccum	2-4 год. – 3 пъти по 12 капки 4-10 год. – 3 пъти по 16 капки над 10 год. – 3 пъти по 24 капки	деца под 2 год.
3.	Hedelix syrup	Hedera helix folium extractum spissum	0-1 год. – 1 x 2,5 ml 1-4 год. – 3 x 2,5 ml 4-10 год. – 4 x 2,5 ml над 10 год. – 3 x 5 ml	
4.	Hedelix oral drops	Hedera helix folium extractum spissum	2-4 год. – 3 x 16 капки 4-10 год. – 3 x 21 капки Над 10 год. – 3 x 31 капки	деца под 2 год. пациенти с бронхиална астма
5.	Myrtol 120 mg caps.	Alphaphene ,D-limonene,1,8-cineole	4-10 год. – 4-5 x 1 капсула 4-10 год. – 3 x 1 капсула над 10 год. – 4-5 x 2 капсули при остри състояния над 10 год. – 3-4 x 2 капсули при хронични състояния	при деца под 4 год. при пациенти с гастроинтестинални и чернодробни заболявания

6.	Hustagil syrup	Thymi herba extractum fluidum	1-4 год. на всеки 3 часа по 2,5 ml 6-12 год. на всеки 3 часа по 5 ml	деца под 1 год.
7.	Mucoplant syrup	Plantago lanteolata folium extractum fluidum	2-6 год. на всеки 2-3 часа по 2,5 ml 7-10 год. на всеки 2- 3 часа по 5 ml	деца под 2 год.
8.	Siracol syrup	Sulfagaiacol	6-14 год. 2-3 x 5 ml	деца под 6 год.
9.	Sudafed broncho honey-lemon syrup	Guaifenesin		деца под 12 год. пациенти с чернодробно и бъбречно увреждане

Проспан сироп в 1 ml съдържа 7 mg сух екстракт от листа на бръшлян. Противопоказан е за употреба при деца под 2 години. Продължителността трябва да продължи 2-3 дни след отзвучаване на симптомите [14]. Проспан разтвор за перорално приложение, съдържа в 1 ml разтвор 20 mg сух екстракт от листа на бръшлян. Прилага се при деца над 2 години, включително и като инхалационна терапия [15].

Лекарственият продукт **Хеделикс** перорален разтвор, съдържа 40 mg в 1 ml гъст екстракт от листа на бръшлян, също се прилага при деца над 2 години, поради съдържание на ментол, ментово масло и евкалиптово масло. Поради това Хеделикс перорални капки, не трябва да се използват и при пациенти с бронхиална астма и други прояви на изразена свръхчувствителност от страна на дихателните пътища. Инхалирането на ментол, ментово и евкалиптово масло, може да предизвика спазъм на бронхите [16]. Хеделикс сироп 8 mg /1 ml гъст екстракт от листа на бръшлян, според КХП може да бъде приложен, при кърмачета от 0 до 1 година по 2.5 ml сироп, един път дневно [17].

Проспан и Хеделикс сироп имат еднакъв състав, но различни указанията и ограниченията за употреба, тъй като се различават по съотношението между количеството на използваната растителна суровина и вида на екстракта.

Сиропите съдържащи сапонини, след перорален прием, възбуждат рецепторите, разположени в стомашно-чревният тракт, което рефлекторно води до вагусово стимулиране на секрецията на воднист мукус и засилване на мукоцилиарния клирънс. Експекторантите съдържащи терпени и етерични масла, стимулират отхрачването, чрез индуциране на хиперемия на бронхиалната лигавица и понижен вискозитет на секретите. Тези лекарствени продукти притежават и антисептична, бронхоспазмолитична активност, дължаща се на монотерпените - ментол, тимол, евкалиптол и миртол. Подобен ефект имат и полусинтетичните съединения терпин хидрат и сулфагваякол.

Миртол стомашно устойчиви капсули, съдържа три монотерпена. Понижава повърхностното напрежение и улеснява отделянето на секрета, втечнява мукуса и подобрява мукоцилиарния транспорт. При животни е установена, освен секретолитична активност и антимикробно действие, а при високи дози и противовъзпалителен ефект. Миртол 120 mg стомашноустойчиви капсули се прилага при симптоматично лечение на остри и хронични бронхити и синусити. Миртол е противопоказан при деца под 4 години и при пациенти страдащи от ГИ и билиарни нарушения или тежко чернодробно заболяване. Капсулите трябва да се приемат 30 минути преди хранене, с голямо количество хладна течност. Последната доза може да се приема преди лягане [18].

Хустагил сироп съдържа течен екстракт от стръкове мащерка и се прилага при деца над 1 годишна възраст. Сиропът се препоръчва да се приема неразреден между храненията [19].

Мукоплант сироп, съдържа в 1 g сироп 50 mg течен екстракт от листа на теснолист живовляк със състав, иридоидът аукубин, слюзни вещества, флавоноиди, хлорогенова и кафеена киселини. Прилага се при деца над 2 години [20].

Като експекториращо средство се използва калиевата сол на гваяколсулфоновата киселина, под форма на сироп **Сиракол**. Прилага се при деца над 6 години. Готовият продукт съдържа етанол, поради което може да представлява опасност за страдащи от чернодробни заболявания [21].

В последните години широко приложение намира гвайфенезин, представен е под търговското наименование **Судафед бронхо** мед – лимон 20mg/ml сироп. Не се препоръчва за деца под 12 години, както и при пациенти с чернодробни и бъбречни увреждания. Гвайфенезин, рефлукторно увеличава потокът на течности от лигавицата на дихателните пътища, с което понижава вискозитета на бронхиалните секрети и стимулира вагусовите нервни окончания в бронхиалните жлези [22].

Муколитиците намалят вискозитета на бронхиалния секрет като разкъсват дисулфидните мостове в молекулата на мукопротеините, което води до деполимеризиране на гликопротеините, разграждане на муциновите полимери, ДНК, фибрин или F-актин в бронхиалните секрети.

Лекарствената форма АЦЦ перорален разтвор (лекарствен продукт **ACC Kid** 20mg/ml powder for oral solution) е подходяща форма при кърмачета и малки деца на възраст под 2 години, но само при витални индикации и строго наблюдение от лекар (Таблица 2). Прилага се за втечняване на секрета и улесняване на експекторацията при остри и хронични белодробни болести, свързани с повишено образуване и затруднено отделяне на бронхиален секрет. Ацетилцистеинът се приема след хранене, има плазмен полуживот 1 час поради бърза чернодробна биотрансформация. Нарушения в чернодробната функция, водят до удължаване на плазменият полуживот до 8 часа [23].

Таблица 2. Лекарствени продукти – муколитици, разрешени за употреба при деца в България

№	Лекарствен продукт	Състав	Дозов режим при деца	Противопоказания
1.	ACC Kid 20mg/ml прах за перорален разтвор	Acetylcysteine	0-2 год. – 2-3 пъти по 2.5 ml 2-5 год. – 2-3 пъти по 5 ml 6-14 год. 2 пъти по 10 ml	деца под 2 год.
2.	Fluditec 20 mg/ml	Carbocisteine	2-5 год. 2 x 5 ml над 5 год. 3 x 5 ml	деца под 2 год.
3.	Erdomed 175 mg /5 ml	Erdosteine	10 mg/ kg телесно тегло на ден разделени на 2-3 приема	деца с ТТ под 15 kg пациенти с чернодробна недостатъчност, приемат ½ от дозата
4.	Mucosolvan 15 mg /5 ml	Ambroxol hydrochlorid	деца до 2 год. 2 x 2,5 ml 2-5 год. 3 x 2,5 ml 6- 12 год. 2-3 x 5 ml	

Флудитек сироп с активно вещество карбоцистеин съществува и като лекарствена форма за деца Флудитек 20 mg/ml. Прилага се при разстройства на бронхиалната секреция при деца над 2 годишна възраст. Курсът на лечение е 8-10 дни, без лекарска консултация. За предпочитане е да се приема между храненията [24].

Ердомед 175 mg/5 ml е перорална суспензия. В 100 g прах, се съдържат 3,5 g ердостеин. Муколитикът ердостеин втечня секретите при остри и хронични заболявания на

респираторната система. Дозира се по 10 mg на килограм телесно тегло разделени на 2-3 приема за деня. Терапевтичният ефект настъпва след 3 дни лечение. Средният период на лечение за постигане на пълен ефект е 7 дни. При хронични заболявания ердостеин, може да се използва по-дълго време. Не се използва при деца с телесно тегло под 15 kg [25].

Лекарствена форма за приложение при деца под 2 години, със секретолитично действие при остри и хронични бронхо-пулмонални заболявания е **Мукосолван** сироп, съдържащ 5 mg в 5 ml Амброксол хидрохлорид. Дозата при деца под 2 години е два пъти дневно по 2.5 ml. Мукосолван сироп трябва да се приема по време на хранене.

В клинични и фармакологични проучвания е установено, че Мукосолван подобрява продукцията на белодробният сурфактант и увеличава мукоцилиарният клирънс, а *in vitro* е установен противовъзпалителен ефект на амброксол хидрохлорид, като редуцира освобождаване на цитокини в кръвта, но и от мононуклеарни и полиморфонуклеарни клетки в тъканите. Местен анестетичен ефект, чрез блокиране на неврални натриеви канали също е доказано *in vitro* [26].

Антитусивните лекарства потискат кашлицата, като повлияват дразненето и възпалението на дихателните пътища. Физиологията на периферния нервен отговор на стимули предизвикващи кашлица, включва два подтипа сензорни влакна А delta и С влакна, чиито клетъчни тела се намират в различни вагусови ганглии в медулата. Смята се, че тези влакна завършват предимно в горните дихателни пътища, но могат да достигнат и до белодробния паренхим. А delta влакната се стимулират от частици, от подкисляване и от натрупани секрети. С влакната медиатират отговор на химическо увреждане на тъканите и така също и на възпалителни медиатори. Централната обработка не е необходима за инициране на кашличния рефлекс, но усещането за необходимост от кашлица, както и доброволното потискане на кашлицата са по-висши кортикални функции, които включват проекции към различни области. Изследването с функционален магнитен резонанс по време на стимулация на кашлицата, показват широко разпространено активиране, както на кортикалните, така и на субкортикалните области, участващи в лимбичната, автономната и соматосензорната обработка. Потискащите кашлицата лекарства са насочени към инхибиране на кашлицата в множество точки на този път. Опиатите морфин и кодеин упражняват своята антитусивна активност, действащи на централни рецептори, въпреки, че опиоидни рецептори присъстват и върху самите вагусни сензорни неврони. Не е ясно дали опиоидите потискат кашлицата и чрез периферен механизъм [2].

Таблица 3. Лекарствени продукти повлияване на суха непродуктивна кашлица, разрешени за употреба при деца в България

№	Лекарствен продукт	Състав	Дозов режим при деца	Противопоказания
1.	Demerphan syrup	Dextromethorphan hydrobromide	2-6 год. 1-1.5 ml на 4 часа 6-12 год. -1.5-3ml навсеки 4 часа	Деца под 2 год.; с повишено внимание при нарушена чернодробна функция
2.	Sintuss 0,15% syrup	Butamirate citrate	3-6 год. 3 x 5 ml 7-12 год. 3 x 10 ml 13-18 год. 4 x 15 ml	Деца под 3 год. С повишено внимание при пациенти с нарушения в чернодробна и бъбречна функция
3.	Sintuss 0,5 % sol.	Butamirate citrate	2месеца – 1 година 4 x 14 капки 1-3 год. 4 x 21 капки	при деца под 2 год.

			над 3 год. 4 x 35 капки	продуктът се прилага по лекарско предписание
4.	Sinecod 0,15 % syrup	Butamirate citrate	3-6 год. 3 x 5 ml 6-12 год. 3 x 10 ml над 12 год. 3 x 15 ml	Деца под 3 год.
5.	Sinecod 0,5% sol.	Butamirate citrate	2месеца – 1 година 4 x 10 капки 1-3 год. 4 x 15 капки над 3 год. 4 x 25 капки	Деца под 2 год. само по лекарско предписание
6.	Bulzine 0,33 mg/ml oral solution	Oxomemazine	1ml разтвор/кг т.т. за 24 часа 2-6 год. 2-3 x 5 ml 6-10 год. 2-3 x 10 ml 10-12 год. 3-4 x 10 ml	Деца под 2 год.
7.	Dimex syr 9.96 mg/5ml + 99.6 mg /5 ml	Diphenhydramine hydrochloride Ammonium chloride	6-8 год. 3-4 x 2,5 -5 ml 9-14 год. 3-4 x 5 ml	Деца под 6 год. Пациенти с тежки бъбречни и чернодробни нарушения

Декстрометорфан хидробромид е активното вещество на *Демефан* сироп, производно на леворфанол и аналог на кодеин. Въпреки, че е подобен по структура на други опиоиди, той има минимално взаимодействие с опиоидните рецептори. Прилага се за краткотрайно симптоматично лечение на суха дразнеща кашлица при остри и хронични респираторни заболявания. Декстрометорфан е агонист на серотонинергичната невротрансмисия. Действието му се проявява чрез повишаване прага на кашличния рефлекс на централно ниво и така потиска кашлицата. 1ml от сиропа съдържа 3.42 mg декстрометорфан хидробромид. Деца на възраст между 6 и 12 години, приемат на всеки 4 часа от 5 до 10 mg или 15 mg на всеки 6-8 часа. Максималната доза не трябва да превишава 60 mg за 24 часа. Деца на възраст от 2-6 години могат да приемат от 3.42mg до 5 mg на всеки 4 часа или 7 mg на всеки 8 часа. Максималната доза не трябва да надвишава 30 mg за 24 часа. При пациенти с увредена чернодробна функция, първоначалната доза е понижена наполовина, след което се повишава постепенно в зависимост от поносимостта и нуждите. Тези съображения са предвид това, че декстрометорфан хидробромид, търпи значим first-pass метаболизъм в черният дроб. Метаболизира се от CYP2D6 до дексторфан, метаболит с противокашлична активност. Останалите метаболити в нисък процент са морфинанови производни, а при нарушения в метаболизма, преобладава в кръвта и урината неметаболизиран декстрометорфан.

Демефан сироп се отпуска по лекарско предписание. Продължителността на лечението не трябва да надвишава 2-3 седмици, дори ако е предписано от лекар./КХП/ Централен протеевокашличен ефект оказва Бутамират. Прилага се под форма на сироп и разтвор за перорално приложение [27].

Ситнус сироп е показан за симптоматично лечение на суха непродуктивна кашлица с различен произход, при деца на 3 години и възрастни. Максималната продължителност на лечението, без консултация с лекар е не повече от 7 дни. Продуктът не е подходящ за приложение при деца под 3 години, освен ако изрично не е назначен от лекар[28]. Ситнус 0.5 % перорален разтвор, се дозира на капки. В 1 ml разтвор /28 капки / се съдържат 5 mg бутамиратов цитрат. При деца на възраст под 2 години, продуктът се прилага единствено по лекарско предписание [29].

Синекод 0,15 % сироп [30] и синекод 0,5 % перорални капки [33] са лекарствени продукти също с активна съставка бутамират цитрат и имат същите ограничения за приложение, както Синтус сироп и перорален разтвор.

Лекарственият продукт **Булзин** 0.33 mg/ml перорален разтвор, съдържа 0,033 грама оксомемазин в 100 ml перорални капки разтвор. Оксомемазин е фенотиазиново производно с алифатна странична верига, конкурентен антагонист на хистамина по отношение на H1 рецепторите. Притежава периферен алфа адренолитичен ефект, който може да предизвика ортостатична хипотония и антихолинергичен ефект причина за периферни нежелани ефекти. Булзин перорален разтвор се прилага за симптоматично лечение на мъчителна суха кашлица, особено проявяваща си предимно през нощта. Прилага се при възрастни и деца над 2 години. Отпуска се без лекарско предписание. Дозира се на килограм телесно тегло – 1 милилитър разтвор на килограм телесно тегло за деня. Оксомемазин трябва да бъде употребяван с повишено внимание при лица с тежка чернодробна и/или бъбречна недостатъчност, поради риск от кумулиране [32].

Димекс сироп е комбиниран лекарствен продукт за симптоматично лечение на дразнеща и спастична кашлица, при възпалителни заболявания на дихателните пътища.

Съдържа дифенхидраминол хидрохлорид, антихистамин с изразено антихолинергично и седативно действие и амониев хлорид, който е със секретолитична активност. Димекс сироп не се прилага при деца под 6 годишна възраст и при пациенти с тежки бъбречни и чернодробни нарушения [33].

Таблица 4. Лекарствени продукти без лекарско предписание, разрешени за употреба при деца при суха и влажна кашлица

№	Лекарствен продукт	Състав	Дозов режим при деца	Противопоказания
1.	Bronchostop sine 0,12g/0,83g/15ml oral sol.	Thymi herba extractum siccum Althaeae radix extractum fluidum	2-4 години 4-6 x 7,5 ml, след консултация с лекар - максимална дневна доза 45 ml 4-12 години 4-6 x 7,5 ml – максимална дневна доза 45 ml	Деца под 2 години
2.	Bronchostop 0.77g/0,66g/5ml syr	Thymi herba extractum siccum Althaeae radix extractum fluidum	4-10 години 6 x 5 ml юноши над 12 години 6 x 10 ml	Деца под 4 години

Бронхостоп перорален разтвор [34] и сироп [35] имат секретолитична, секретомоторна и бронхоспазмолитична активност, тъй като съдържат сух екстракт от мащерка, а етеричното масло е носител на антисептични свойства. Слизните вещества от корените от лечебна ружа покриват лигавицата на дихателните пътища, проявяват омекчаващо и противовъзпалително действие и облекчават суха кашлицата.

Като екстрагент при Бронхо стоп сироп се използва етанол и е противопоказан при деца до 4 годишна възраст. При Бронхо стоп сине перорален разтвор, екстрагентът е вода и се прилага над 2-годишна възраст.

Заклучение

Кашлицата е предизвикателство за лечение поради разнообразните си причини и непълното разбиране на механизмите, които я управляват. Освен това кашлицата може да се възприема по различен начин от различните пациенти. Децата и техните родители се различават в тълкуването на тежестта на кашлицата и нейните характеристики.

Необходимо е да се направят задълбочени клинични проучвания и оценка на съотношението полза/риск относно приложението на лекарства за лечение на остра кашлица при малки деца.

Неуспорима е и ролята на фармацевта при отпускане на ОТС продукти за кашлица, с точни указания за приложение и предупреждения относно лекарствени взаимодействия и нежелани реакции.

Литература

1. Ходжев Вл. Най-важни симптоми при белодробните болести, В: Николов Ф., редактор. Вътрешни болести. Пловдив; Лакс бук: 2020. стр. 17-21. ISBN: 978-619-189-145-0
2. Clark G, Dominic A Fitzgerald, Bruce K Rubin. Cough medicines for children time for a reality check. Paediatr Respir Rev.. 2023;48:30-38. doi:10.1016/j.prrv.2023.08.003.
3. Irwin RS, Madison JM. The diagnosis and treatment of cough. N Engl J Med 2000; 343:1715-21
4. Haya Alsubaie, Abdullah Al-Shamrani, Adel S Alharbi, Sami Alhaider. Cough in children: The official statement of SPPA. Int J Pediatr Adolesc Med. 2015;2(1):38-43. doi: 10.1016/j.ijpam.2015.03.001
5. Shields MD, Doherty GM. Chronic cough in children. Paediatr Respir Rev. 2013 Jun;14(2):100–105.
6. Alsubaie H, Al-Shamrani A, Alharbi AS, Alhaider S. Clinical practice guidelines: Approach to cough in children: The official statement endorsed by the Saudi Pediatric Pulmonology Association (SPPA). International Journal of Pediatrics and Adolescent Medicine. 2015 Mar 1;2(1):38-43.
7. Donnelly D, Everard ML. ‘Dry’ and ‘wet’ cough: how reliable is parental reporting?. BMJ Open Resp Res 2019;6:e000375. doi:10.1136/bmjresp-2018-000375.
8. Hay AD, Wilson A, Fahey T, Peters TJ. The duration of acute cough in pre-school children: a prospective cohort study. Fam Pract. 2003;20(6):696–705.
9. Smith SM, Schroeder K, Fahey T. Over-the-counter (OTC) medications for acute cough in children and adults in community settings. Cochrane Database of Systematic Reviews 2014, Issue 11. Art. No.: CD001831. DOI: 10.1002/14651858.CD001831.pub5.
10. Oduwale O, Udoh EE, Oyo-Ita A, Meremikwu MM. Honey for acute cough in children. Cochrane Database of Systematic Reviews 2018, Issue 4. Art. No.: CD007094. DOI: 10.1002/14651858.CD007094.pub5.
11. and-cold(<https://www.fda.gov/drugs/special-features/use-caution-when-giving-cough--products-kids>).
12. (<https://www.webmd.com/cold-and-flu/kids-cold-medicines-new-guidelines>).
13. (Recommendations by the European Academy of Pediatrics, Choosing Wisely, <https://www.eapaediatrics.eu/advisory-groups/choose-wisely/> ! December, 2023[13]
14. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2023-10-16-133011.pdf>-Prospan syr.
15. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2020-06-16-119679.pdf>-Prospan sol.
16. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2021-02-15-122113.pdf>-Hedelix syr.
17. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2021-03-01-122300.pdf>-Hedelix sol.
18. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2020-04-13-119118.pdf>-Myrtol 120mg tab.
19. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/ss6113.pdf>-Hustagil syr.
20. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2020-11-09-121086.pdf>-Mucoplant syr.
21. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2016-06-15-4801.pdf>-Siracol syr.
22. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/ss7442.pdf> - Sudafed broncho honey-lemon syrup.
23. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2019-07-29-115752.pdf>-ACC sol.
24. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2020-06-22-119763.pdf>-Fluditec syr.
25. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2019-05-28-114867.pdf>-Erdomed susp.
26. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2024-04-08-134521.pdf>-Mucosolvan syr.
27. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2021-02-22-122209.pdf>-Demephan syr.

28. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2022-10-17-129713.pdf>-Sintuss syr.
29. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2022-10-17-129713.pdf>-Sintuss sol.
30. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2024-04-29-134750.pdf>-Sinecod syr.
31. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2024-04-29-134749.pdf>-Sinecod sol.
32. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2024-04-29-134749.pdf>-Bulzine syr.
33. https://bg-database.s3.eu-west-1.amazonaws.com/custom_smpcs/DIMEX%20SYRUP.docx-Dimex syr.
34. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2022-10-24-129851.pdf>-Bronchostop sol.
35. <https://www.bda.bg/images/stories/documents/bdias/2020-08-10-1200906.pdf>-Bronchostop syr.

COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECT OF U-74389G AND PREDNISOLONE IN AMIODARONE-INDUCED PULMONARY TOXICITY

Plamen Krastev¹, Violeta Dancheva², Galya Stavreva¹

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Medical University – Pleven

²Department of Hygiene, Medical ecology, Occupational Diseases and Disaster Medicine, Medical University – Pleven

ABSTRACT

Previous *in vitro* and *in vivo* studies have proven the remarkable antioxidative and membrane-stabilizing potency of U-74389G, which is a substituted corticosteroid nucleus derivative. The effect of 21-aminosteroid U-74389G and prednisolone (PR) on amiodarone-induced pneumotoxicity in rats was studied.

Methods. The study was carried out on 72 male Wistar rats, divided into four groups: (1) – control; (2) – treated intratracheally (i.t.) with amiodarone (AM); (3) – with AM and U74389G; (4) – with AM and PR. AM was installed i.t. on days 0 and 2 (6.25 mg/kg; 3.125 mg/ml water solution). U-74389G was injected intraperitoneally at a daily dose of 15 mg/kg, PR at 10 mg/kg, from day 0 to day 2. The activity of lactate dehydrogenase (LDH), acid phosphatase (AcPh), alkaline phosphatase (AIPh), total protein content and cytological assays of bronchoalveolar lavage fluid were performed on days 3 and 7. Pulmonary fibrosis was assessed by measuring hydroxyproline (HP) content in lung homogenate (LH) on day 28.

Results. AM treatment led to significant increases in various markers of pulmonary inflammation and damage. However, the treatment with U-74389G and PR effectively attenuated these markers, demonstrating their potential as protective agents. Isolated application of AM significantly increased the HP content on day 28 to 235%. U-74389G and PR significantly decreased this marker (6.82 mcg/ml LH and 7.2 mcg/ml LH, respectively) on day 28, further highlighting their potential.

Conclusion. The results obtained showed that U-74389G reduced early AM-induced lung inflammatory injury and fibrosis and this protective effect is comparable to that of prednisolone.

Key words: 21-aminosteroid U-74389G, amiodarone-induced pneumotoxicity, hydroxyprolin, prednisolone

СРАВНИТЕЛНО ИЗСЛЕДВАНЕ ЕФЕКТА НА U-74389G И ПРЕДНИЗОЛОН ПРИ ИНДУЦИРАНА ОТ АМИОДАРОН БЕЛОДРОБНА ТОКСИЧНОСТ

Пламен Кръстев¹, Виолета Данчева², Галя Ставрева¹

¹ Катедра по фармакология и токсикология, Медицински университет – Плевен

² Катедра по хигиена, медицинска екология, професионални болести и медицина на бедствията, Медицински университет – Плевен

Въведение

Амиодаронът (AM), йодсъдържащо силно липофилно производно на бензофуран, е много ефективно антиаритмично лекарство от клас III с продължително действие [1,2,3]. Има многобройни странични ефекти свързани с терапията с амиодарон, включително отлагания в роговицата, абнормни чернодробни функционални тестове, хипертиреоидизъм или хипотиреоидизъм, синкаво оцветяване на кожата и други [4,5,6]. Белодробната токсичност обаче представлява най-сериозната нежелана реакция [7]. AM-индуцирана белодробна токсичност (АИБТ) се съобщава при около 5% от пациентите [2]. АИБТ включва остър пневмонит и необратима белодробна фиброза, състояние, за което в момента няма ефективно

лечение и прогнозата е лоша [5]. Патогенезата на тази токсичност е многофакторна, но водещи са продължителност на лечението и кумулативната доза, напреднала възраст, съществуващи белодробни заболявания и съпътстващи респираторни инфекции. Поради дългият полуживот на амиодарон (изчислен на между 14 и 59 дни) белодробните промени може първоначално да се влошат или да преминат бавно дори след спиране приложението на АМ.

Белодробното засягане попада в две категории с различна степен на клинично значение: повсеместната „липоидна пневмония“, така нареченият „амиодаронов ефект“, който обикновено е асимптоматичен [54] и по-подходящо наречената „амиодаронова токсичност“. Тя включва няколко различни клинични единици, свързани с различните модели на белодробна възпалителна реакция, като еозинофилна пневмония, хронична организираща пневмония, остра фибринозна организираща пневмония, възли или масови лезии, подобна на неспецифична интерстициална пневмония и подобна на идиопатична белодробна фиброза интерстициална пневмония, десквамативна интерстициална пневмония, остро белодробно увреждане/синдром на остър респираторен дистрес и дифузен алвеоларен кръвоизлив [50]. Има доказателства, че три различни и преплетени механизма: директен токсичен ефект, имуномедиран механизъм и активиране на ангиотензин ензимната система [51, 52] участват в патогенезата на АИБТ при изследвания върху хора, както и от експерименти с животни и клетъчни култури [50].

In vivo и *in vitro* резултатите подкрепят, че АМ и неговият първичен метаболит N-дезетиламиодарон (DEA) са директно токсични за белодробните клетки [8, 9, 53]. Това може да иницира освобождаването на възпалителни медиатори, приток на възпалителни клетки, пролиферация на фибробласти и отлагане на колаген [10]. При модел на АИБТ при плъхове, цитотоксичността настъпва скоро след излагане на АМ [11], а в модел на хамстер алвеоларна клетъчна пролиферация тип II е демонстрирана в съответствие със загубата на епителни клетки [2]. От *in vitro* проучвания е доказано, че АМ е директно цитотоксичен за различни типове белодробни клетки, като алвеоларни макрофаги [13,14], алвеоларни клетки тип II [13,15], нересничести бронхиоларни епителни клетки [13], фибробласти на плъхове [10] и говежди и човешки ендотелни клетки на белодробната артерия [16,17]. Доказано е, че АМ и DEA причиняват апоптоза и некроза в култивирани алвеоларни клетки тип II [15]. Механизмът на АМ-индуцирано клетъчно увреждане може да включва едно от, или комбинация от: фосфолипидоза [18,19]; разрушаване на потенциала на митохондриалната мембрана и намаляване на клетъчните нива на АТФ в прясно изолирани белодробни клетки на хамстер [20]; повишаване на вътреклетъчния свободен калций [21]; производство на свободни радикали [22-25]. Константите за повишено освобождаване на някои възпалителни цитокини от алвеоларните макрофаги [26,27] и приток на еозинофили и лимфоцити [12,28] предполагат имунни реакции при АИБТ.

Семейство стероидни съединения - 21-аминостероиди или лазароиди, е разработено чрез модификация на структурата на метилпреднизолон. Въпреки че това семейство произлиза от глюкокортикоиди, то няма глюкокортикоидна и минералокортикоидна активност [29]. Лазароидите са мощни инхибитори на индуцирана от свободни кислородни радикали, катализирана от желязо липидна пероксидация [29,30]. Те притежават множество антиоксидантни свойства: неутрализиране на (отстраняване на) липиден пероксил; намаляване на образуването или отстраняването на хидроксилни радикали; намаляване на освобождаването на арахидонова киселина, предизвикано от липидна пероксидация; поддържане на нивото на ендогенния токоферол и стабилизиране на мембраната чрез намаляване на нейната флуидност [31,32]. Доказано е, че лазароидите имат благоприятни ефекти при животински модели на травма на централната нервна система и увреждане на невронната мембрана [32,33,34], инхибиране на индуцирана от антиген белодробна еозинофилия при животни [35] и медирано от оксидант увреждане в изолирани бели дробове на плъхове след исхемия/реперфузия или предизвикано с t-бутилхидропероксид [36].

21-аминостероидът U-74389G – 21-(4-(2,6-ди-1-пирилодинил-4-пиримидинил)-1-пиперазинил)-прегна-1,4,9(11)-триен-3,20-дион (Z)-2-бутендиоат, известен също като

дезметил тирилазад, се съобщава, че облекчава исхемично-реперфузионно увреждане в модел на трансплантация на белия дроб на плъх [37], остър некротизиращ панкреатит при плъхове [38] и индуцирана от блеомицин и паракват белодробна фиброза [39,40]. Този аминостероиден аналог може да представлява очевиден интерес при белодробни заболявания, свързани с цитотоксичност и оксидантно увреждане.

За лечение на АМ-индуцирана белодробна токсичност (след инициалното спиране приложението на амиодарон), при пациенти с дихателна недостатъчност или значително белодробно увреждане е показано прилагането на системни кортикостероиди. Преднизолон се използва в доза от 40-60 mg/ден. Поради удължения полуживот на амиодарон се препоръчва 2 месеца лечение с перорални кортикостероиди, последвано от период на намаляване на дозата, обобщаващ общия период на лечение за поне 6 месеца. Дори след прилагане на този вид лечение, белодробното възстановяване, както образно, така и функционално, не е напълно обратимо [55-57].

Целта на експериментите е изследване на потенциален защитен ефект на U-74389G, сравнен с ефекта на преднизолон, след индуцирана от АМ белодробна токсичност при плъхове, чрез оценка на редица цитологични и биохимични маркери в бронхоалвеоларен лаважен флуид (BALF) и белодробен хомогенат (LH).

Материали и методи

1. Реактиви

Амиодарон хидрохлорид ($C_{25}H_{29}I_2NO_3 \cdot HCl$; Кат. № A8423), U-74389G ($C_{37}H_{50}N_6O_2 \cdot C_4H_4O_4$; Кат. № U5882), всички други химикали и реагенти са закупени от Sigma-Aldrich Company.

2. Животни и експериментални групи.

Експериментът е извършен в съответствие с разпоредбите за хуманно отношение към животните и е одобрен от Комитета по етика на университета.

Изследването е проведено върху 72 мъжки плъха Wistar (тегло 220-250 g, възраст 4 месеца). Животните са получени от Научно-лабораторния животновъден център в Сливница (България) и са настанени в университетските помещения за животни за 1 месец при температура $22 \pm 2^\circ C$ и влажност $50 \pm 10\%$, при нормална гранулирана диета и вода ad libidum. Животните бяха разделени на четири групи. Група 1 (контролна група) получи две интратрахеални (i.t.) инстилации на стерилна дестилирана вода на ден 0 и 2 [41]. Група 2 получи две i.t. инстилации на АМ (6,25 mg/kg, в 3,125 mg/mL воден разтвор) на ден 0 и 2. Група 3 беше третирана с АМ i.t. (6,25 mg/kg, в 3,125 mg/mL воден разтвор) на ден 0 и 2 и получава U-74389G интраперитонеално (i.p.) в доза 15 mg/kg телесно тегло три пъти - от ден 0 до ден 2. Група 4 е третирана с АМ i.t. на ден 0 и 2 (6,25 mg/kg, в 3,125 mg/mL воден разтвор) и преднизолон (PR) в доза 10 mg/kg телесно тегло i.p. приложени трикратно от ден 0 до 2.

За интратрахеално приложение, АМ се разтваря в дестилирана вода при $60^\circ C$ и се оставя да се охлади до стайна температура преди интратрахеалното вливане, както е описано по-горе (Card et al., 1999). Първото вливане е извършено в ден, отбелязан като ден 0; второто приложение беше извършено на ден 2. U-74389G се разтваря в CS-4 (воден разтвор на 20 mM монохидрат на лимонена киселина, 3,2 mM натриев цитрат дехидрат, 77 mM NaCl, pH=3) при концентрация от 2 mg/mL. Преднизолонът се разтваря в DMSO (диметилсулфоксид), след това се разрежда в PBS (фосфатно буфериран физиологичен разтвор) и се прилага доза 10 mg/kg телесно тегло интраперитонеално (i.p.). След третирането животните се връщат към съответните им диети и вода ad libitum за остатъка от периода на изследването. За всички инжекции са използвани индивидуални стерилни игли.

3. Интегрални характеристики

Телесното тегло и коефициентът на белодробно тегло (теглото на органа в mg/100 g телесно тегло) се измерват във всяка точка от времето.

4. Бронхоалвеоларен лаваж

За да се получи бронхоалвеоларен лаважен флуид (BALF), шест плъха от всяка група бяха евтаназирани на дни 3 и 7 под тиопенталова анестезия (50 mg/kg) чрез обезкървяване чрез

разрязване на v. renalis. Гръдният кош се отваря и белите дробове се перфузират *in situ* през дясната сърдечна камера с физиологичен разтвор (30 mL). Извършен е трикратен лаваж на левия бял дроб през трахеята с общо 5 ml физиологичен разтвор. Обемът на възстановената течност варира от 80 до 90% от въведената течност.

4.1. Цитологични изследвания на BALF

Една част от BALF се използва за общ брой клетки $\times 10^5$ /L. След това клетките се отстраняват чрез центрофугиране при 300xg за 10 минути. Клетъчната пелета се ресуспендира в 1 mL физиологичен разтвор. Цитологичният препарат се оцветява по метода на Wright-Giemsa и се извършва диференциално преброяване на клетките. Клетъчните диференциали бяха анализирани с помощта на модификация на процедурата на Danos и Keebler [42]. Клетките се събират върху нитроцелулозни филтри с диаметър 25 mm с пори 5 μ m (SWP-025-00; Millipore Corp.) и се оцветяват с хематоксилин-еозин.

4.2. Биохимични анализи на BALF

След центрофугиране на BALF, супернатантата се използва за измерване на активността на ензими като лактат дехидрогеназа (LDH), кисела фосфатаза (AcPh), алкална фосфатаза (AlPh). Активностите са измерени по метода на Bergmeyer, 1974 [43], а общото протеиново съдържание е измерено по метода на Lowry, 1951 [44].

Измерените ензимни активности са представени в U/L, а общият протеин - в mg/mL BALF.

5. Биохимични анализи на белодробен хомогенат (LH)

Пулмонарната фиброза се оцени чрез измерване на съдържанието на хидроксипролин (HP) и колаген в белодробен хомогенат на 28 ден след приложението на AM.

6. Статистически анализ

Резултатите са статистически обработени с помощта на софтуер Statgraphics plus. Средната \pm стандартна грешка и медианата бяха изчислени. Статистическите сравнения бяха извършени чрез еднопосочен анализ на дисперсията, последван от LSD post hoc тест за повече от две групи или несдвоени t-тестове на Student за две групи. U тестът на Mann-Whitney беше използван за сравняване на медианите за двойки групи, а анализът на Kruskal-Wallis на дисперсионния тест беше използван за сравняване на медианите на множество групи. Във всички случаи статистическата значимост се определя като $p < 0,05$. Резултатите за изследваните параметри, включени във фигурите, са представени като процент от контролната стойност, зададена на 100%.

Резултати

След AM *i.t.* приложение на ден 0 и 2 се наблюдават бързо повърхностно дишане, загуба на апетит, цианоза и гъша кожа. Тези симптоми са по-слабо изразени в групите, третирани с U-74389G и преднизолон, последващи AM. Телесното тегло на плъховете в групите с интратрахеално приложение на AM намалява леко на ден 7.

Десният бял дроб беше претеглен и относителното тегло беше изчислено за всяко животно. Увеличаването на теглото на белия дроб е един от индикаторите, представляващи белодробен оток. Както е показано в таблица 1, коефициентът на белодробно тегло се увеличава приблизително два пъти спрямо контролната група на ден 3 след AM приложение и намалява постепенно след това. Индуцираният от AM повишен коефициент намалява след прилагането на U-74389G и преднизолон, по-значително в групата с приложен PR.

Таблица 1. Ефект на U-74389G и преднизолон върху коефициента на белодробно тегло и цитологичните параметри в бронхоалвеоларния лаваж след i.t. приложение на АМ

Параметър/приложение	ден 3	ден 7
	Mean±SEM	Mean±SEM
Коефициент на белодробно тегло	0.55±0.07	0.68±0.09
Контрола	1.03±0.13 (*p=0.012)	0.91±0.08
АМ	0.93±0.08	0.78±0.12
АМ + U-74389G	0.808±0.11	0.73±0.09
АМ + PR		
Протеин в BALF mg/mL		
Контрола	0.167±0.03	0.201±0.02
АМ	0.88±0.09 (*p=0.03)	0.734±0.17 09 (*p=0.036)
АМ + U-74389G	0.42±0.02 (*p=0.05; ◇p=0.043)	0.65±0.02 (*p=0.05)
АМ + PR	0.32±0,05; (◇p=0.043)	0.318±0.04 (◇p=0.043)
Общ брой клетки x10 ⁵ mL		
Контрола	7.43±2.99	7.43±2.99
АМ	31.62±2.96 (*p=0.001)	11.37±1.58
АМ + U-74389G	23.26±3.50 (*p=0.016; ◇p=0.02)	10.52±1.59
АМ + PR	18.74±1.76 (*p=0.046; ◇p=0.018)	8.81±1.16
PMNs x10 ⁹ mL/%		
Контрола	0.32±0.02/4.3%	0.405±0.02/4.3%
АМ	22.92±1.85 (*p=0.008;	4.98±0.45/28.7% (*p=0.001;
АМ + U-74389G	◇p=0.033)/71.0%	◇p=0.041)
АМ + PR	13.02±2.69 (*p=0.024)/52.1%	1.96±0.15/10.1% (*p=0.001;
	6.02±0.99 (◇p=0.006)/10.6%	◇p=0.01)
		1.15±0.02/5.3% (*p=0.05;
		◇p=0.012)

Съкращения: PMNs – полиморфонуклеарни клетки; BALF – бронхоалвеоларен лаважен флуид, *p< 0.05 към контролната група, ◇p<0.05 към групата третирана с АМ.

Съдържанието на протеин в безклетъчната BALF се измерва като индекс на пропускливостта на алвеоларно-капилярната бариера (Таблица 1). В съответствие с развитието на белодробно възпаление и увреждане на алвеоларната цялост, третирането с АМ води до значително рязко повишени нива на общо съдържание на протеин на 3-тия ден (527%). Комбинираното приложение на АМ и U-74389G повишава съдържанието на протеин, но то е значително по-ниско – двукратно намаление в сравнение с АМ на 3-ия ден след инстилациите на АМ. Най-ниско е протеиновото съдържание в групата с комбинирано приложение на АМ и преднизолон.

Прилагането на АМ беше придружено от екстремно увеличение както на общия брой клетки, така и на отделните типове клетки, изолирани от BALF на ден 3. Общият брой клетки беше значително повлиян от третирането с АМ (425%), в комбинации с U-74389G (313%) и с преднизолон (252% - най-слабо увеличение) на ден 3, в сравнение с контролите (Таблица 1).

Процентът на полиморфонуклеарните клетки (PMN) в BALF се повишава значително в групата, третирана с АМ на 3 и 7 ден, когато достига съответно 71,0%, 28,7% от общия брой клетки (Таблица 1). Той остава относително по-висок, въпреки тенденцията за намаляване на ден 7. Лечението с U-74389G и особено с преднизолон значително отслабва индуцираното от АМ повишаване на броя на полиморфонуклеарните клетки.

Резултатите от ензимните активности при BALF са показани на Таблица 2. LDH активността е общ маркер за клетъчно увреждане. След вливане на АМ, активността на LDH в BALF е значително повишена, с пиково увеличение на ден 3 (290%).

Таблица 2. Ефект на U-74389G и преднизолон върху биохимичните параметри в бронхоалвеоларен лаважен флуид след i.t. приложение на АМ

Параметър/приложение	ден 3	ден 7
	Mean±SEM	Mean±SEM
LDH U/l		
Контрола	140.7±10.04	134.27±28.67
АМ	406.55±24.36 (*p=0.008)	300.01±47.73 (*p=0.048)
АМ + U-74389G	384.05±25.76 (*p=0.009)	256.07±45.50 (*p=0.047)
АМ + PR	206.90±17.28 (∆p=0.021)	206.49±13.50 (∆p=0.009)
AcPh U/l		
Контрола	2.03±0.09	2.04±0.18
АМ	3.74±0.19 (*p=0.025)	3.18±0.32 (*p=0.018)
АМ + U-74389G	3.67±0.23 (*p=0.039)	2.84±0.92
АМ + PR	3.00±0.26	2.11±0.19
AlPh U/l		
Контрола	2.02±0.24	2.01±0.35
АМ	4.46±0.48 (*p=0.025)	4.20±0.72 (*p=0.021)
АМ + U-74389G	4.50±0.61 (*p=0.001)	4.63±0.72 (*p=0.018)
АМ + PR	2.09±0.13 (∆p=0.021)	1.39±0.24 (∆p=0.004)

Съкращения: LDH- лактат дехидрогеназа; AcPh – кисела фосфатаза; AlPh – алкална фосфатаза; BALF- бронхоалвеоларен лаважен флуид.

*p< 0.05 към контролната група, ∆p<0.05 към групата третирана с АМ.

Приложението на U-74389G и PR отслабва индуцираното от АМ повишаване на активността на LDH в BALF на ден 3 и 7. Вижда се, че влиянието на третирането с АМ върху активността на AcPh следва същата тенденция като активността на LDH. Активността на AcPh е леко намалена от U-74389G и по-сериозно намалена от PR при животни, третирани с АМ на ден 7.

Наблюдава се значително повишаване на активността на AlPh в BALF на плъхове от АМ по време на експеримента и приложението на U-74389G не води до намаляване, а повишава стойностите на AlPh на дни 3 и 7. Наблюдава се много слабо увеличение на AlPh в BALF на групата плъхове с приложени АМ и преднизолон на ден 3 и дори спад под нивата на контролата на ден 7.

Пулмонарната фиброза се оцени чрез измерване на съдържанието на хидроксипролин (HP) и колаген в белодробен хомогенат на 28 ден след приложението на АМ. Съдържание на хидроксипролин (HP) в белодробен хомогенат на ден 28 след интратрахеално приложение на АМ: контролна група – 4.56 mcg/ml LH, АМ група – 10.7 mcg/ml LH, АМ + U-74389G – 6.82 mcg/ml LH, АМ + PR – 7.2 mcg/ml LH.

Съдържание на колаген в белодробен хомогенат: контролна група – 30.07 mcg/ml LH, АМ група – 40.67 mcg/ml LH, АМ + U-74389G – 26.93 mcg/ml LH, АМ + PR – 27.3 mcg/ml LH.

Дискусия

Резултатите от нашето проучване показват, че въпреки безпорният ефект на преднизолон, U-74389G - антиоксидант с мощен мембранно-стабилизиращ ефект, също намалява ранното индуцирано от АМ белодробно възпалително увреждане. Каталитичните, така и залавящите (scavenger) антиоксиданти свойства намаляват предизвиканото от АМ белодробно възпаление и фиброза при животни, но нито една от тези молекули не е показала

ясна ефикасност при лечението на АИБТ. Ние предположихме, че U-74389G може да покаже полезна активност в този модел чрез повлияване на първоначалната възпалителна фаза. Избрахме U-74389G като производно на кортикостероидно ядро, заместено с антиоксидантна група. Както нашите експерименти с преднизолон, така и други проучвания показват, че кортикостероидите са ефективни при животински модели на АИБТ [8] и са препоръчителна, най-предписвана терапия при пациенти с АИБТ [7,9].

Интра трахеалното приложение на АМ е придружено от повишен коефициент на белодробно тегло приблизително 2 пъти спрямо контролната група на ден 3. Хистологичните промени показват остър перивазален и интерстициален оток, както и дегенеративни увреждания (до некроза) на пневмоцити тип 1 и 2. Комбинациите от АМ с U-74389G, както и АМ с преднизолон намаляват относителната тежест на увреждане на белите дробове и клетките.

Индуцираните от АМ белодробни увреждания причиняват повишена пропускливост на белодробния епител и ендотел, което води до екстравазация на плазмени протеини и натрупване на възпалителни клетки в алвеоларното пространство. АМ причинява значително увеличение (3,8 пъти) на ден 3 в съдържанието на албумин в безклетъчната BALF. U-74389G (и преднизолон) предотвратяват увреждането на пропускливостта на алвеоларно-капилярната бариера, оценено чрез нивото на протеин в BALF. Съдържанието на протеин в групите, лекувани с комбинация АМ плюс U-74389G, или комбинация АМ и PR, е сравнимо с контролната група.

Общите клетки и полиморфонуклеарните клетки, изолирани от белодробния лаваж, бяха изследвани на ден 3 и 7 като маркери за увреждане на алвеоларно-капилярната бариера. Нарушената цялост на бариерата между въздуха и кръвта в алвеоларната област на белите дробове води до повишен брой клетки в BALF. В нашето проучване увреждането е най-забележимо на 3-ия ден и бързо отзвучава след това. U-74389G (и PR) намалява частично общия брой клетки в BALF, свързано с приложението на АМ на ден 3. Този аминостероид значително намалява броя на PMN (полиморфонуклеарните клетки - маркер за възпаление) в лаважната течност – PMN в групата с АМ е 22.92 ± 1.85 (* $p=0.008$; $\Delta p=0.033$)/71.0%, докато в група с комбинирано лечение с АМ и U-74389G е 13.02 ± 2.69 (* $p=0.024$)/52.1%. Действайки върху ранното и преходно възпаление и увреждане на алвеоларно-капилярната бариера, U-74389G може да защити от по-нататъшното развитие на белодробно увреждане и фиброза. U-74389G има висок афинитет към съдовия ендотел и предпазва от увреда чрез своя мембранно стабилизиращ ефект. Активираните макрофаги и PMN могат да играят роля във възпалителната реакция чрез освобождаване на растежни фактори и цитокини, както и освобождаване на оксиданти като част от системата за защита на гостоприемника [45]. Цитологичните изследвания показват, че аминостероидът U-74389G и преднизолонът потискат първоначалния възпалителен отговор, включително миграция и активиране на възпалителни клетки и разпадането на алвеоларно-капилярната бариера.

Повишената активност на някои ензими в BALF отдавна се счита за маркер за токсични белодробни лезии: лактат дехидрогеназа (повишена пропускливост на мембраната и клетъчен лизис), кисела фосфатаза (повишена фагоцитна активност или унищожаване на клетки) и алкална фосфатаза (токсично увреждане или пролиферация на пневмоцити тип 2) [46]. Интра трахеалното вливане на АМ в нашето проучване повишава значително активността на LDH в промивната течност на 3-ия и 7-ия ден и тези резултати потвърждават неговия пневмотоксичен ефект в ранния етап след лечението. LDH изтича от мъртви или увредени клетки, когато целостта на мембраната е нарушена. Нашите данни са в съответствие с проучвания, които демонстрират повишени нива на ензими при плъхове третирани с амиодарон [11,26]. Активността на LDH в групата с комбинирано лечение беше по-слабо повишена на ден 3 и 7 спрямо групата само с АМ. Нивото на АсPh беше по-високо в сравнение с контролната група на дни 3 и 7, но U-74389G и преднизолон намаляват този параметър на ден 7. Активността на друг ензимен маркер - алкалната фосфатаза (АlPh) в бронхоалвеоларен лаваж беше повишена на 3-тия и 7-ия ден в групите с приложение на АМ и при комбинирано

третиране с АМ и U-74389G. Тези данни предполагат ранни токсични ефекти и пролиферация на пневмоцити тип 2 по време на периода на възстановяване. Наблюдавахме слабо увеличение на AIPh в BALF на групата плъхове с приложени АМ и преднизолон на ден 3 и дори спад под нивата на контролата на ден 7.

U-74389G има умерен ефект или не предотвратява ранното индуцирано от АМ повишаване на ензимните активности. Изненадващо, тъй като U-74389G има мощна мембранно-стабилизираща и антиоксидантна активност и би трябвало да прояви изразен защитен ефект. Известно е, че лазароидите, в това число и U-74389G, имат голям обем на разпределение в стационарно състояние (4,9 L/kg) и добро проникване в тъканите, включително белите дробове [45]. Протоколът за приложение, приет в това проучване, изисква предварително третиране с U-74389G (2 часа преди инстилация на АМ), за да се осигури достатъчна концентрация на аминостероида в белодробния паренхим. Едно възможно обяснение на нашият резултат е, че U-74389G не е достигнал оптимална белодробна концентрация за предотвратяване на ранен АМ цитотоксичен ефект. Според Taylor et al. директен токсичен ефект на АМ върху епителните клетки настъпва скоро след i.t. АМ приложение – LHD активността е значително повишена 15 минути след АМ i.t. [11]. От друга страна се съобщава, че същата доза и начин на приложение на аминостероида (преди и след това два пъти дневно след агресивния агент) ограничават увреждането на ЦНС [34] и острия некротизиращ панкреатит [38]. Но белите дробове са уникални, защото имат голяма епителна повърхност, която е изложена на риск от атака медирана от оксиданти [46]. Трахеобронхиалното дърво и алвеоларното пространство са изложени на реактивни оксидиращи видове и белите дробове се нуждаят от допълнителни антиоксидантни ресурси, за да предотвратят окислителни увреждания от въздушно-преносими нокси.

Нашите експерименти показват, че U-74389G има защитен ефект срещу ранен възпалителен отговор след интратрахеално вливане на АМ. Този лазароид инхибира индуцираното от АМ повишаване на възпалителната активност в белия дроб, което може да е свързано с неговите мембранно-стабилизиращи и антиоксидантни свойства [32]. Доказано е също, че аминостероидите предотвратяват освобождаването на метаболити на арахидоновата киселина [31,35]. Оксидативният стрес може да е отговорен за АИБТ, който се поддържа от повишено производство на супероксиден анион от стимулирани алвеоларни макрофаги, получени от плъхове, третирани с АМ [23]. Някои проучвания разкриват, че АМ се метаболизира до арилов радикал, който може да доведе до други реактивни кислородни видове [11,24]. Лазароидите неутрализират свободните кислородни радикали и са много ефективни при инхибиране на зависимата от желязо липидна пероксидация, подобно на витамин Е [30,31,48], предотвратяват ранни, но не и късни стадии на индуцирано от кислородни свободни радикали увреждане на клетките [47].

Този 21-аминостероид има мощни стабилизиращи ефекти върху клетъчните мембрани [29,48]. U-74389G има висок афинитет към липидния двоен слой поради своята липофилия и е включен в липидния двоен слой, заемайки строго определена позиция и ориентация [49]. Взаимодействието между пиперазиновите азотни и фосфатни групи на липидната мембрана повишава нейната устойчивост, ограничава движението на пероксилните радикали в мембраната и взаимодействието с мастни киселини и пероксидното увреждане [32].

Изолираното приложение на АМ (група 2) значително повишава съдържанието на HP на 28-ия ден до 235% (10.7 mcg/ml LH). U-74389G (група 3) и PR (група 4) значително намаляват този маркер (съответно 6,82 mcg/ml LH и 7,2 mcg/ml LH) на 28-ия ден. Интратрахеалната инстилация на АМ увеличава съдържанието на колаген в LH с 50% (40.67 mcg/ml LH), докато комбинираното приложение на АМ с U-74389G и АМ с преднизолон дори намалява количеството на колаген в LH (съответно АМ + U-74389G – 26.93 mcg/ml LH и АМ + PR – 27.3 mcg/ml LH).

Тези резултати доказват инхибиторния ефект на преднизолон и U-74389G върху развитието на белодробната фиброза предизвикана след интратрахеално приложение на амиодарон.

В заключение, лазоридът U-74389G, приложен преди и след АМ интратрахеална инстилация, има защитен ефект върху ранния възпалителен отговор и белодробната фиброза, оценени чрез цитологични и биохимични маркери в бронхоалвеоларна лаважна течност и белодробен хомогенат. Ефектът е сравним с терапевтичното приложение на преднизолон.

Литература

1. Mason JW. Drug therapy: Amiodarone. *N Engl J Med*. 1987;316:455-66.
2. Amiodarone Trials Meta-Analysis Investigators (1997) Effect of prophylactic amiodarone on mortality after acute myocardial infarction and in congestive heart failure: meta-analysis of individual data from 6500 patients in randomised trials. *Lancet* 350:1417–1424
3. Rotmensch HH, Belhassen B, Swanson BN, Shoshani D, Spielman SR, Greenspon AJ, et al. Steady-state serum amiodarone concentrations: relationships with antiarrhythmic efficacy and toxicity. *Ann Intern Med*. 1984;101:462-69.
4. Harris L, McKenna WJ, Rowland E, Holt DW, Storey GCA, Krikler DM. Side effects of long-term amiodarone therapy. *Circulation* 1983;67:45-51.
5. Raeder EA, Podrid PJ, Lown B. Side effects and complications of amiodarone therapy. *Am Heart J*. 1983; 109:975-83.
6. Wilson JS, Podrid PJ. Side effects from amiodarone. *Am Heart J*. 1991; 121(1 pt 1):158-71.
7. Camus P, Fanton A, Bonniaud P, Camus C, Foucher P. Interstitial lung disease induced by drugs and radiation. *Respiration*. 2004; 71:301-326.
8. Reasor MJ, Kacew S. An evaluation of possible mechanisms underlying amiodarone-induced pulmonary toxicity. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996,212:297-304.
9. Wilson BD, Lippman ML. Pulmonary accumulation of amiodarone and N-desethylamiodarone. Relationship to the development of pulmonary toxicity. *Am Rev Respir Dis*. 1990,141:1553-58.
10. Sheppard MN, Harrison NK Lung injury, inflammatory mediators, and fibroblast activation in fibrosing alveolitis. *Thorax*. 1992;47:1064-74.
11. Taylor MD, Antonini JM, Roberts JR, Leonard SS, Shi X, Gannett PM et al. Intratracheal amiodarone administration to F344 rats directly damages lung airway and parenchymal cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003, 188(2):92-103.
12. Cantor JO, Osman M, Cerreta JM, Suarez R, Mandl I, Turino GM. Amiodarone-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;262(1):127-32.
13. Bolt MW, Racz WJ, Brien JF, Bray TM Massey TE. Differential susceptibilities of isolated hamster lung cell types to amiodarone toxicity. *Can J Physiol Pharmacol*. 1998; 76:721-7.
14. Zitnik RJ, Cooper JA, Rankin JA, Sussman J. Effects of in vitro amiodarone exposure on alveolar macrophage inflammatory mediator production. *Am J Med Sci*, 1992, 304:352-356.
15. Bargout R, Jankov A, Dincer E, Wang R, Komodromos T, Ibarra-Sunga O et al. Amiodarone induced apoptosis of human and rat alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000; 278: 1039-44.
16. Kachel DL, Moyer TP, Martin WJ. Amiodarone-induced injury of human pulmonary artery endothelial cells: protection by α -tocopherol. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;254:1107-12.
17. Futamura Y. Toxicity of amiodarone on mouse pulmonary endothelial cells cultured with or without alveolar macrophages. *J Toxicol Sci*. 1996;21:253-67.
18. Heath MF, Costa-Jussa FR, Jacobs JM, Jacobson W. The induction of pulmonary phospholipidosis and the inhibition of lysosomal phospholipases by amiodarone. *Br J Exp Pathol*. 1985,66:391-7.
19. Reasor MJ, McCloud CM, DiMatteo M, Schafer R, Ima A, Lemaire I. Effects of amiodarone-induced phospholipidosis on pulmonary host defense functions in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1996,211:346-52.

20. Bolt MW, Card JW, Racz J, Brien JF, Massey TE. Disruption of mitochondrial function and cellular ATP levels by Amiodarone and *N*-Desethylamiodarone in initiation of Amiodarone-induced pulmonary cytotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;298(3):1280-89.
21. Powis G, Olsen R, Standing JE. Amiodarone-mediated increase in intracellular free calcium associated with cellular injury to human pulmonary artery endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1990;103: 156-64.
22. Wang Q, Hollinger MA, Giri SN. Attenuation of amiodarone-induced lung fibrosis and phospholipidosis in hamsters by taurine and/or niacin treatment. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;262(1):127-32.
23. Vereckei A, Blazovics A, Gyorgy I, Feher E, Toth M, Szenasi G, et al. The role of free radicals in the pathogenesis of amiodarone toxicity. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1993; 4:161-77.
24. Nicolescu AC, Comeau JL, Hill BC, Bedard LL, Takahashi T, BrienJF, et al. Aryl radical involvement in amiodarone-induced pulmonary toxicity: Investigation of protection by spin-trapping nitrones *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;220(1):60-71.
25. Nicolescu AC, Ji Y, Comeau JL, Hill BC, Takahashi T, BrienJF, et al. Direct mitochondrial dysfunction precedes reactive oxygen species production in amiodarone-induced toxicity in human peripheral lung epithelial HPL1A cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;227(3):370-79.
26. Wilson BD, Lippman ML. Amiodarone pulmonary toxicity in the rat is associated with increased lavage immunoglobulin and alveolar macrophages primed for increased interleukin - 1 secretion. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;9(3):295-9.
27. Reinhart PG, Gairola CG. Amiodarone-induced pulmonary toxicity in Fischer rats: release of tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta by pulmonary alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health*. 1997;52:353-65.
28. Pichler WJ, Schindler L, Staubli M, Stadler BM, de Weck AL. Anti-amiodarone antibodies: detection and relationship to the development of side effects. *Am J Med*. 1988; 85:197-202.
29. Jacobsen EJ, McCall JM, Ayer DE, Van Doornik FJ, Palmer JR, Belonga KL, et al. Novel 21-aminosteroids that inhibit iron-dependent lipid peroxidation and protect against central nervous system trauma. *J Med Chem*. 1990;33(4):1145-51.
30. Hall E D. Inhibition of lipid peroxidation in central nervous system trauma and ischemia. *J Neurol Sci*. 1995;134(Suppl):79-83.
31. Braughler JM, Pregonzer JF, Chase RL. A new 21-aminosteroid antioxidant lacking glucocorticoid activity stimulates ACTH secretion and blocks arachidonic release from mouse pituitary tumor (AtT-20) cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988;244:423-427.
32. Hall ED, McCall JM, Chase RL, Yonkers PA, Braughler JM. A nonglucocorticoid steroid analog of methylprednisolone duplicates its high-dose pharmacology in models of central nervous system trauma and neuronal membrane damage. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987;242:137-42.
33. Hall ED, Yonkers PA, McCall JM, Braughler JM. Effects of the 21-aminosteroid U-74006F on experimental head injury in mice. *J Neurosurg*. 1988;68:456-461.
34. Vignes JR, Hugon J. In vitro efficacy of three lazaroids in a model of acute chemical neuronal hypoxia. *Neurosci Letters*. 2006;407(2);171-5.
35. Richards IM, Shields SK, Griffin RL, Fidler SF and Dunn CJ. Novel steroid-based inhibitors of lung inflammation. *Clin Exp Allergy*, 1992;22:432-39.
36. Haynes J, Seibert A, Bass JB, Taylor AE. U-74500A inhibition of oxidant mediated lung injury. *Am J Physiol*. 1970;259:144-8.
37. Kuwaki K. Lazaroid U74389G Ameliorates ischemia-reperfusion injury in the rat lung transplant model. *Ann Thor Cardiovas Surg*.1999;5(1):11-7.
38. Alhan E, Turkyilmaz S, Ercin C, Kural BV. Effects of lazaroid U-74389G on acute necrotizing pancreatitis in rats. *Eur Surg Res*. 2006;38:70-5.
39. McLaughlin GE, Frank L. Effects of the 21-aminosteroid, U74389G, on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Crit Care Med*. 1994;22(2):313-9.
40. Shopova VL, Dancheva VY, Salovski PT, Stoyanova AM, Lukanov TH. Protective effect of U-74389G on paraquat induced pneumotoxicity in rats. *Exp Toxicol Pharmacol*, 2007;24:167-73.

41. Taylor MD, Van Dyke K, Bowman LL, Miles PR, Hubbs AF, Shannon R, Reasor MJ. A characterization of amiodarone-induced pulmonary toxicity in F344 rats and identification of surfactant protein-D as a potential biomarker for the development of the toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;167(3):182-90.
42. Saltini C, Hance AJ, Ferrans VJ, Basset F, Bitterman PB, Crystal RG. Accurate quantification of cells recovered by bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis.* 1984; 130:650-8.
43. Bergmeyer HU, Gawehn K, Grass M. Enzymes as biochemical reagents. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis.* New York: Academic Press; 1974. p. 425-522.
44. Lowry OH, Rosebrough N J., Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.
45. Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;35:655-77.
46. Comhair SAA, Erzurum Sc. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 283:246-55.
47. Huang H, Patel PB, Salahudeen AK. Lazaroid compounds prevent early but not late stages of oxygen-induced cell injury: potential explanation for the lack of efficacy of lazaroids in clinical trials. *Pharmacol Res.* 43(1):55-61.
48. Clark WM, Hazel JS, Coull BM. CNS pharmacology and current research. *Drugs.* 1995;50:971-983.
49. Raub TJ, Barsuhn CL, Williams LR, Decker DE, Sawada GA, Ho NF. Use of a biophysical-kinetic model to understand the roles of protein binding and membrane partitioning on passive diffusion of highly lipophilic molecules across cellular barriers. *J Drug Target.* 1993;1(4):269-86.
50. Papiris, S.A., Triantafillidou, C., Kolilekas, L. *et al.* Amiodarone. *Drug-Safety* 33, 539–558 (2010)
51. Nikaido A, Tada T, Nakamura K, et al. Clinical features of the effects of angiotensin system antagonists on amiodarone-induced pulmonary toxicity. *Int J Cardiol* 2010; 140: 328–35
52. Koseifi SG, Halawa A, Bailey B, et al. Reduction of amiodarone pulmonary toxicity in patients treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blocker. *Ther Adv Respir Dis* 2009; 3: 289–94
53. Adams PC, Holt DW, Storey GC, et al. Amiodarone and its desethyl metabolite: tissue distribution and morphologic changes during long-term therapy. *Circulation* 1985; 72: 1064–75
54. Spickard III A, Hirschmann JV. Exogenous lipid pneumonia. *Arch Intern Med* 1994; 154: 686–92
55. Budin, C.E.; Cocuz, I.G.; Sabău, A.H.; Niculescu, R.; Ianosi, I.R.; Ioan, V.; Cotoi, O.S. Pulmonary Fibrosis Related to Amiodarone—Is It a Standard Pathophysiological Pattern? A Case-Based Literature Review. *Diagnostics* 2022, 12, 3217
56. Charles PE, Doise JM, Quenot JP, et al. Amiodarone-related acute respiratory distress syndrome following sudden withdrawal of steroids. *Respiration* 2006; 73: 248–9
57. Fabrizio Terzo, Alberto Ricci, Michela D'Ascanio, Salvatore Raffa, Salvatore Mariotta, Amiodarone-induced pulmonary toxicity with an excellent response to treatment: A case report, *Respiratory Medicine Case Reports*, Volume 29, 2020, 100974, ISSN 2213-0071
58. Wolkove N, Baltzan M. Amiodarone pulmonary toxicity. *Can Respir J.* 2009 Mar-Apr;16(2):43-8. doi: 10.1155/2009/282540. PMID: 19399307; PMCID: PMC2687560.
59. Garg J, Agrawal N, Marballi A, Agrawal S, Rawat N, Sule S, Lehrman SG. Amiodarone induced pulmonary toxicity: An unusual response to steroids. *Am J Case Rep.* 2012;13:62-5. doi: 10.12659/AJCR.882757. Epub 2012 May 14. PMID: 23569490; PMCID: PMC3615935

INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF MANGANESE (III) TETRAKIS (4-BENZOIC ACID) PORPHYRIN IN LUNG HOMOGENATE IN AMIODARONE-INDUCED RAT TOXICITY

Plamena Panayotova, Boris Dinkov, Venka Tsankova, Evgenia Tsoleva, Nicolinka Koleva, Galya Stavreva

Dept. Pharmacology and Toxicology, Medical University – Pleven

ABSTRACT

The cell permeable SOD mimetic, manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP), possesses SOD and catalase activity and has been shown to reduce oxidative damage by suppressing both ROS and reactive nitrogen species.

Our goal was to study the effect of MnTBAP on some markers for antioxidant defense system and fibrosis in rat lung homogenate (LH) after amiodarone (AM) treatment.

Materials and Methods. The study was carried out on 72 male Wistar rats, divided into four groups: (1) – controls; (2) – treated intratracheally (i.t.) with AM; (3) – treated with AM and MnTBAP; (4) – treated with MnTBAP. AM was administered i. t. on days 0 and 2 (6.25 mg/kg). MnTBAP was injected intraperitoneally at a dose of 10 mg/kg from day 0 to day 4. The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GP), and malondialdehyde (MDA) content were investigated in LH on days 3 and 5. Pulmonary fibrosis was assessed by measuring hydroxyproline (HP) content in LH on day 28 after AM administration.

Results. The activities of SOD and CAT in group 2 decreased significantly as compared to the control group. The decrease of the same enzymes in group 3 was lower and significant as compared to group 2. Changes in the glutathione peroxidase activity showed similar dynamics. The content of HP in AM+MnTBAP (2.25±0.16 mcg/ml LH) group was decreased compared to AM alone (3.34±0.15 mcg/ml LH) on day 28 (p<0.05).

Conclusion. MnTBAP reduced the AM-induced generation of reactive oxygen species and protected from AM-induced pulmonary fibrosis.

Key words: amiodarone, antioxidant defense, lung homogenate, manganese (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin, pulmonary fibrosis

ИЗСЛЕДВАНЕ НА АНТИОКСИДАНТНА И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНА АКТИВНОСТ НА МАНГАН (III) ТЕТРАКИС (4-БЕНЗОЕНА КИСЕЛИНА) ПОРФИРИН В БЕЛОДРОБЕН ХОМОГЕНАТ ПРИ АМИОДАРОН-ИНДУЦИРАНА ТОКСИЧНОСТ ПРИ ПЛЪХОВЕ

Пламена Панайотова, Борис Динков, Венка Цанкова, Евгения Цолова, Николинка Колева, Галя Ставрева

Катедра „Фармакология и токсикология“, Медицински университет – Плевен

Увод

Идиопатичната белодробна фиброза представлява тежка форма на интерстициална белодробна болест, която прогресивно уврежда белодробната функция, доказателство за което са нарастващата заболеваемост и смъртност с възрастта (1). Характеризира се с пролиферация и увреждане на алвеоларни епителни клетки, прекомерно отлагане на екстрацелуларен матрикс, активиране и пролиферация на фибробласти (2). Въпреки провежданите проучвания, точната патогенеза на ИБФ остава неясна. Свързва се с ниска средна преживяемост от само 2.8 години след поставяне на диагнозата. Налични са клинични доказателства, че пирфенидон

и нинтеданиб притежават анти-фибротични свойства и подобряват дихателната функция при пациенти с БФ (3, 4). Тази терапия забавя прогресията на заболяването, като нежеланите лекарствени реакции включват стомашно-чревен дискомфорт, бъбречни и чернодробни нарушения (5). Високите разходи и ограничената им ефикасност, съчетани със значителни неблагоприятни ефекти, подчертават значението на ефективна, поносима и достъпна допълнителна терапия при БФ.

Каталитичните антиоксиданти металопорфирини имат протективен ефект при възпалителни състояния, като инхибират възпалителната генна експресия в отговор на генериране на реактивни кислородни видове като супероксид, пероксид, пероксинитрит и липидни пероксидни радикали (6). Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP), нов SOD миметик, притежава ефекти, подобни на SOD и каталаза, които са двата основни антиоксидантни ензима, локализирани в митохондриите (7), а също така улавя окислителя пероксинитрит (8). Междувременно той е мощен инхибитор на мембранната липидна пероксидация (9). MnTBAP се прилага в проучвания при заболявания, в които участват митохондриалната дисфункция и оксидативен стрес, като възпалителни заболявания (10), гръбначно увреждане (11), фиброзни заболявания (12), диабет и затлъстяване (13) и др.

Експериментално индуцираната с амиодарон (АМ) белодробна токсичност при плъхове предизвиква последователност от оток, възпалителни реакции и тежък дисбаланс между производството на ROS и антиоксидантни защити (оксидативен стрес), завършващи в крайна сметка с тежка белодробна токсичност. Тези промени водят до белодробна фиброза и смятаме, този модел е подходящ за изучаване на ефекта на лекарства, вкл. антиоксиданти при БФ (14).

Целта на проучването беше да проучим ефекта на MnTBAP върху някои маркери за антиоксидантна защитна система и фиброза в белодробен хомогенат (LH) на плъх след третиране с амиодарон.

Материали и методи

Експериментът е извършен в съответствие с разпоредбите за хуманно отношение към животните и е одобрен от БАБХ.

Субстанции

Amiodarone hydrochloride ($C_{25}H_{29}I_2NO_3 \cdot HCl$; Кат. № А8423), Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin ($C_{48}H_{28}ClMnN_4O_8$; Кат. № 55266-18-7) и всички други химикали и реагенти са закупени от Sigma-Aldrich Company.

Животни и експериментален протокол

Изследването е проведено върху 72 мъжки плъха Wistar (тегло 220-250 g, възраст 4 месеца). Животните са получени от Научно-лабораторния животновъден център в Сливница (България) и са отглеждани в университетския вивариум за 1 месец при температура $22 \pm 2^\circ C$ и влажност $50 \pm 10\%$, при нормална гранулирана диета и вода *ad libitum*. Животните бяха разделени на четири групи. Група 1 (контролна група) получи две интратрахеални (i.t.) инстилации на стерилна дестилирана вода на ден 0 и 2 (Taylor, et al., 2000). Група 2 получи две i.t. инстилации на АМ (6.25 mg/kg, в 3.125 mg/mL воден разтвор) на ден 0 и 2. Група 3 беше третирана с АМ i.t. на ден 0 и 2; MnTBAP (разтворен във физиологиче разтвор) i.p. в доза от 10 mg/kg от ден 0 до ден 4 и група 4 – с MnTBAP в същата доза и начин.

За интратрахеално приложение АМ се разтваря в дестилирана вода при $60^\circ C$ и се оставя да се охлади на стайна температура преди интратрахеална инстилация, както е описано от Volt et al., 2001 (15).

Интегрални характеристики

Телесното тегло и коефициентът на белодробно тегло (теглото на органа в mg/100 g телесно тегло) се измерват на ден 3, 5 и 28.

Биохимични анализи на белодробен хомогенат

Под тиопенталова анестезия (50 mg/kg) шест плъха от всяка група бяха евтаназирани на дни 3, 5 и 28 под тиопенталова анестезия (50 mg/kg) и обезкървявани чрез прерязване на v.

renalis. Гръдният кош се отваря и белите дробове се перфузират *in situ* през дясната сърдечна камера с физиологичен разтвор (30 mL).

Десният бял дроб беше отстранен и хомогенизиран с ледено студена 0,25 M захароза в Tris-HCl, pH 7.4 (в съотношение 1:10). Хомогенатът е центрофугиран при 9000 g (30 минути) и супернатантата съхраняван върху лед. За измерването на съдържание на малондиалдехид (MDA), белодробна тъкан е хомогенизирана с KCl в съотношение 1:10. Активността на супероксид дисмутаза (SOD) беше измерена по метода на Maral et al. (16); каталазната (CAT) активност – по метода на Koroljuk et al. (17); ктивността на глутатион пероксидазата (GP) по Bergmeier et al. (18) и съдържанието на MDA по метода на Ohkawa et al. (19). Съдържанието на хидроксипролин в $\mu\text{g/mL}$ е определено по Bergman and Loxley (20).

Статистически анализ

Резултатите са обработени статистически с помощта на софтуер Statgraphics centurion xvi. Средната \pm стандартна грешка и медианата бяха изчислени. Статистическите сравнения бяха извършени чрез еднопосочен анализ на дисперсията, последван от LSD post hoc тест за повече от две групи или несдвоени t-тестове на Student за две групи. U тестът на Mann-Whitney беше използван за сравняване на медианите за двойки групи, а анализът на Kruskal-Wallis на дисперсионния тест беше използван за сравняване на медианите на множество групи. Във всички случаи статистическата значимост се определя като $p < 0.05$.

Резултати

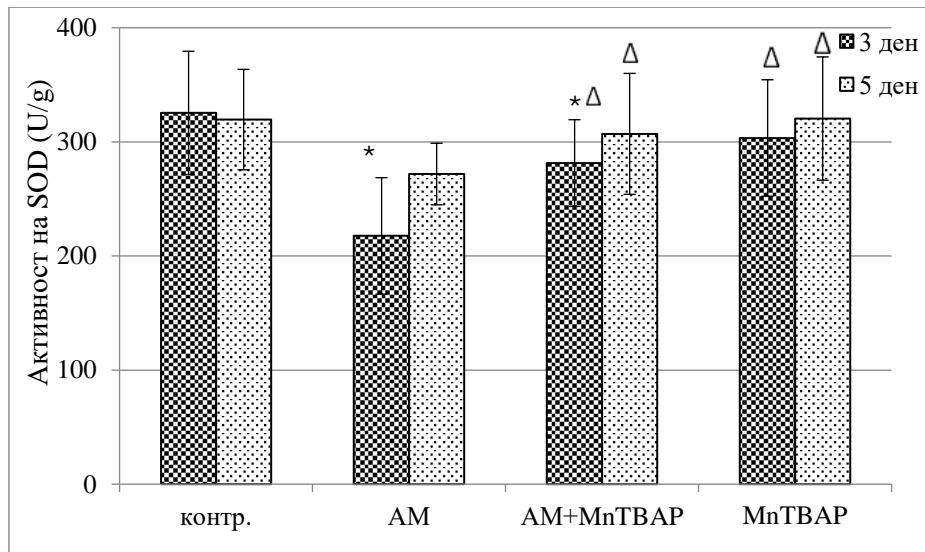
След интратрахеалното приложение на AM се наблюдават бързо повърхностно дишане, цианоза и гъша кожа. Тези симптоми са по-слабо изразени в групата, лекувана с AM и MnTBAP. Телесното тегло на плъховете в AM групата и в групата, лекувана с AM и MnTBAP, намалява леко на ден 5 (данните не са показани). Десният бял дроб беше претеглен и относителното тегло беше изчислено за всяко животно. Увеличаването на тегло на белия дроб е един от индикаторите за белодробен оток. Коефициентът тегло на белия дроб към телесно тегло се увеличава приблизително два пъти спрямо контролната група на ден 3 (1.03 ± 0.13 и 0.55 ± 0.07 ; $p < 0.05$) след AM приложение и намалява постепенно след това. Индуцираният от AM повишен коефициент намалява при прилагането на MnTBAP (93 ± 0.08 на ден 3; $p = 0.09$).

Амиодаронът понижава достоверно активността на ензимите SOD (табл. 1; фиг. 1) и GP (табл. 1; фиг. 3) на трети и пети ден спрямо контролната група, докато активността на CAT се понижава значимо на 5 ден (табл. фиг. 2). Активността на СОД остава трайно понижена в останалите изследвани пунктове (15 и 28 ден, данните не са предствени). AM повишава достоверно съдържанието на MDA (фиг. 4) в сравнение с контролната, статистически достоверна на ден 3.

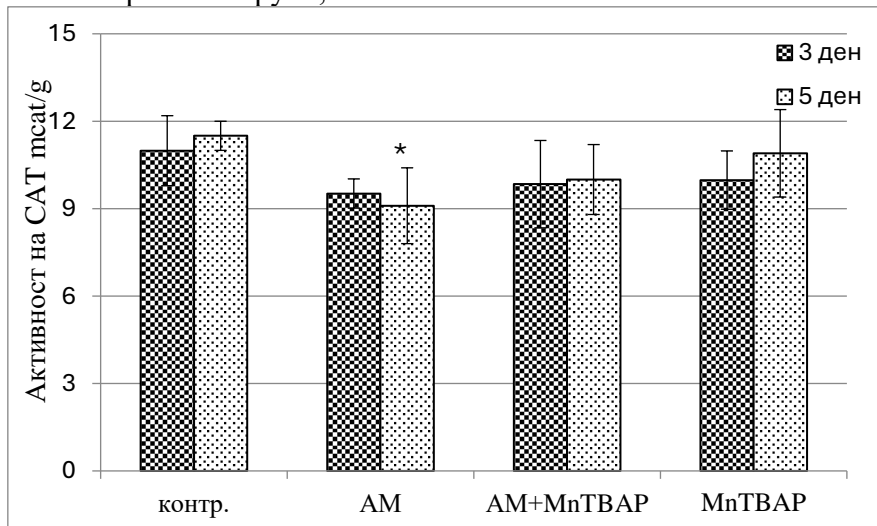
Таблица 1. Активност на ензимите супероксиддизмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и съдържание на малондиалдехид в белодробен хомогенат, измерени на 3 и 5 ден

Групи	SOD U/g mean \pm SEM		CAT mcat/g mean \pm SEM		GP U/g mean \pm SEM		MDA (nmol/g) mean \pm SEM	
	3 ден	5 ден	3 ден	5 ден	3 ден	5 ден	3 ден	5 ден
Група 1 (контролна)	325.42 ± 54.18	319.50 ± 44.12	10.99 ± 1.2	11.49 ± 0.5	60.12 ± 5.03	62.16 ± 7.30	0.26 ± 0.02	0.17 ± 0.03
Група 2 (AM)	217.60 $\pm 51.39^*$	271.81 $\pm 26.79^*$	9.52 ± 0.47	9.10 $\pm 1.3^*$	43.23 $\pm 7.78^*$	30.08 $\pm 6.33^*$	0.49 $\pm 0.05^*$	0.36 ± 0.03
Група 3 (AM+ MnTBAP)	281.43 $\pm 38.44^{\Delta}$	307.23 ± 53.34	9.84 ± 1.5	10.08 ± 1.2	49.39 $\pm 4.55^*$	38.84 ± 2.03	0.39 $\pm 0.023^{\Delta}$	0.24 ± 0.018
Група 4 (MnTBAP)	303.42 ± 50.86	320.44 ± 53.83	9.98 ± 0.93	10.94 ± 1.5	64.56 ± 6.55	59.03 ± 5.56	0.22 ± 0.011	0.26 ± 0.012

Резултатите са представени като $\text{mean} \pm \text{SEM}$ от 6 животни; * означава статистическа значимост спрямо контролната група; Δ означава статистическа значимост спрямо АМ група.

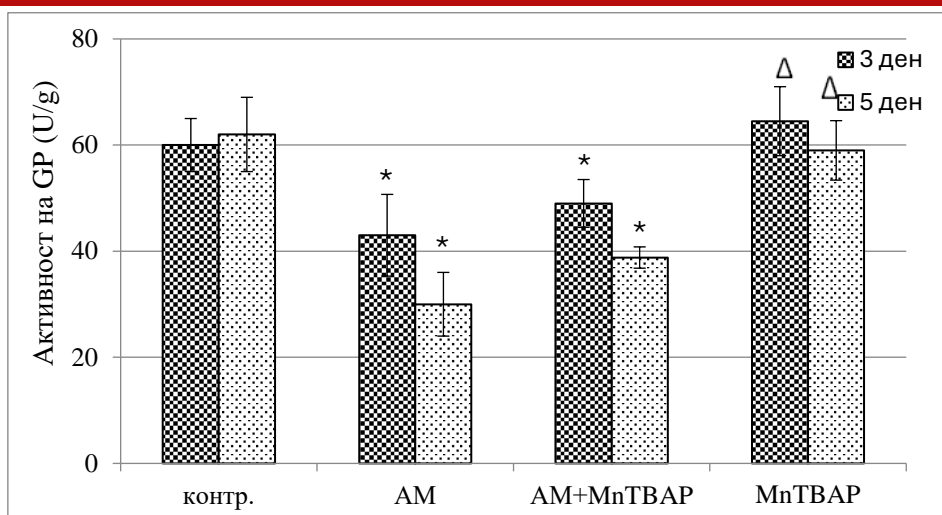


Фигура 1. Активност на ензима супероксиддизмутаза в белодробен хомогенат, измерена на 3 и 5 ден. Резултатите са представени като $\text{mean} \pm \text{SEM}$ от 6 животни; * означава статистическа значимост спрямо контролната група; Δ означава статистическа значимост спрямо АМ група

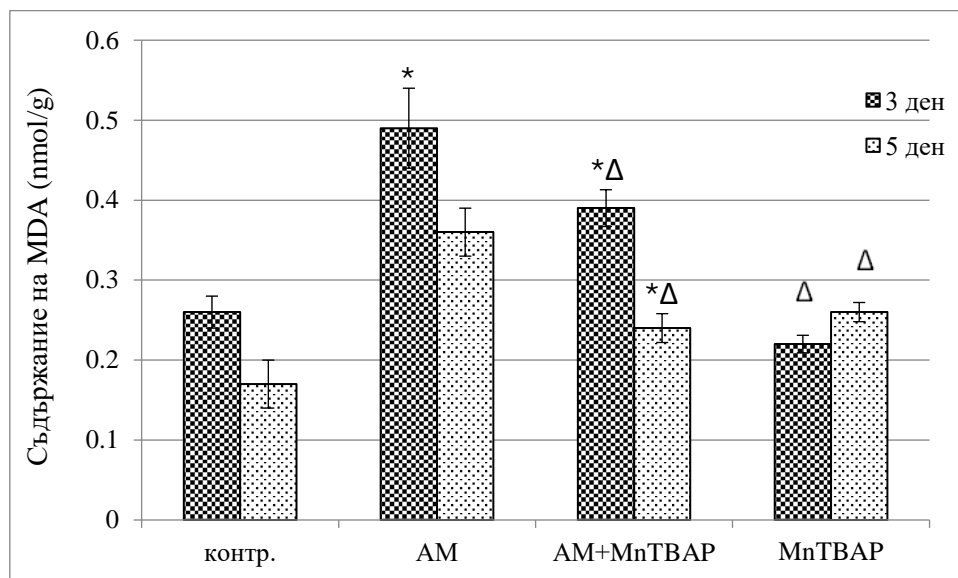


Фигура 2. Активност на ензима каталаза, измерена на 3 и 5 ден. Резултатите са представени като $\text{mean} \pm \text{SEM}$ от 6 животни; * означава статистическа значимост спрямо контролната група

В групата с комбинирано третиране с АМ+MnTBAP, активността на SOD е повишена спрямо тази, третирана с АМ, докато повишената активност на ензимите CAT и GP не показва статистическа достоверност спрямо АМ група. В същата група съдържанието на MDA е понижено достоверно на 3 ден при комбинираното третиране и остава понижено до края на изследвания период спрямо АМ група.



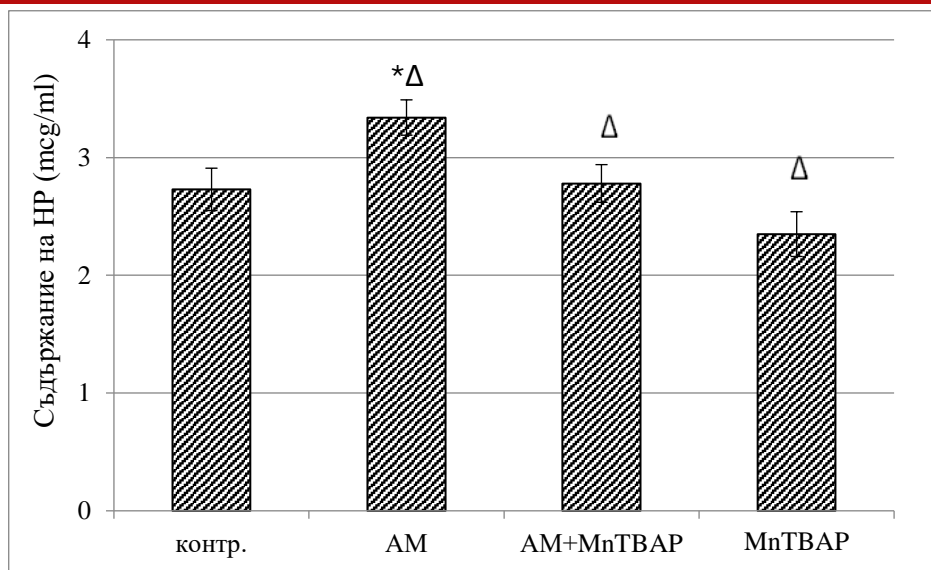
Фигура 3. Активност на ензима глутатионпероксидаза в белодробен хомогенат, измерена на 3 и 5 ден. Резултатите са представени като mean±SEM от 6 животни; * означава статистическа значимост спрямо контролната група; Δ означава статистическа значимост спрямо AM група



Фигура 4. Съдържание на малондиалдехид в белодробен хомогенат, измерено на 3 и 5 ден.

Резултатите са представени като mean±SEM от 6 животни; * означава статистическа значимост спрямо контролната група; Δ означава статистическа значимост спрямо AM група

Белодробната фиброза беше оценена биохимично с измерване на съдържанието на хидроксипролин в БХ на 28 ден. Третираните с AM плъхове имат значително повишени стойности на хидроксипролин (3.34 ± 0.15 mcg/ml LH) в сравнение с контролните плъхове (2.73 ± 0.18) и животните, третирани с AM плюс MnTBAP (2.25 ± 0.16 mcg/ml LH; $p < 0.05$) (фигура 5). Контролните и третирани с MnTBAP плъхове имат сходни стойности на хидроксипролин на 28 ден.



Фигура 5. Съдържание на хидроксипролин в белодробен хомогенат, измерено на 28 ден.

Резултатите са представени като mean±SEM от 6 животни; * означава статистическа значимост спрямо контролната група; Δ означава статистическа значимост спрямо AM група

Обсъждане

Експерименталните данни от нашето изследване показаха че интратрахеалното приложение на 6.25 mg/kg йод-съдържащ амиодарон на ден 0 и 2 е причинява токсично белодробно увреждане. Резултатите от проучването ни дадоха основание да приемете, че AM може да повлияе антиоксидантната защитна система в белите дробове. Изследванията на белодробен хомогенат показа, че активността на ключов антиоксидантен ензим, SOD, намалява значително на ден 3, след прилагането на AM. В същото време активността на SOD след комбинирано прилагане на AM и MnTBAP е повишена. САТ активност се потиска по-късно, на 5 ден, като при групата с AM + MnTBAP стойностите са съпоставими с тези на контролата. Активността на друг ключов антиоксидантен ензим глутатион-пероксидазата намалява значително на дни 3 и 5 в сравнение с контролите, като при групата с MnTBAP стойността се повишава незначително. Съдържанието на MDA в AM група показва повишаване на липидната пероксидация. и предизвикано от оксидант увреждане в белите дробове в този момент.

Резултатите ни дават основание да обобщим, че MnTBAP, антиоксидант с мощен ефект, повличва благоприятно ключови звена в ендгенната антиоксидантна система и намалява индуцираните от AM фибротични белодробни промени. Макар че е доказано, че както каталитичните, така и залавящите (scavenger) антиоксиданти намаляват предизвиканото от AM белодробно възпаление и фиброза при животни, нито една от тези молекули не е показала ясна ефикасност при лечението на амиодарон-индуцираната белодробна токсичност (АИБТ). Ние предположихме, че MnTBAP може да покаже полезна активност в този експериментален модел чрез повлияване на възпалителните промени и защитните антиоксидантни механизми.

Действайки върху ранното и преходно възпаление и увреждане на алвеоларно-капилярната бариера, MnTBAP може да защити по-нататъшното развитие на белодробно увреждане и фиброза. Активиранияте макрофаги и PMN могат да играят роля във възпалителната реакция чрез освобождаване на растежни фактори и цитокини, както и освобождаване на оксиданти като част от системата за защита на гостоприемника.

Оксидативният стрес може да е отговорен за АИБТ, който се поддържа от повишено производство на супероксиден анион от стимулирани алвеоларни макрофаги, получени от плъхове, третирани с AM (21, 22). Някои проучвания разкриват, че AM се метаболизира до арилов радикал, който може да доведе до други реактивни кислородни видове (22, 23). Белите дробове са уникални, защото имат голяма епителна повърхност, която е изложена на риск от

атака медирана от оксиданти. Трахеобронхиалното дърво и алвеоларното пространство са изложени на реактивни оксидиращи видове и белите дробове се нуждаят от допълнителни антиоксидантни ресурси, за да предотвратят окислителни увреждания от въздушно-преносими нокси.

MnTBAP е синтетичен нискомолекулен металопорфирин, за който е доказано, че пречиства ROS, включително вътреклетъчен супероксиден анион и вредния пероксинитрат (8, 24). Междувременно той е мощен инхибитор на мембранната липидна пероксидация (9). MnTBAP не само превръща супероксидния анион в H_2O_2 , но също така катализира дисоциацията на H_2O_2 до вода, което е функция на каталазата. Това блокира пътя на Haber-Weiss за производство на хидроксилни радикали, като по този начин блокира увреждането на ROS. MnTBAP е приложен в проучвания на заболявания, в които участват митохондриална аномалия и оксидативен стрес, като възпалителни заболявания (25, 26), гръбначно увреждане (27), фибротични заболявания (28), диабет и затлъстяване (29). Основният механизъм на ефектите, упражнявани от MnTBAP, се характеризира с инхибиране на образуването на пероксинитрит чрез елиминиране на супероксидни аниони, преди те да реагират с азотен оксид, което пречи на оксидантите да управляват своите ефекти по множество пътища като Wnt, p38, NF- κ B сигнални пътища (26, 30). Нещо повече, доказателства показват, че MnTBAP може да протектира цитотоксичност и дисфункция, причинени от оксидативен стрес, чрез намаляване на митохондриалния оксидативен стрес (30). От друга страна, митохондриалният оксидативен стрес неизбежно предизвиква митохондриална дисфункция, което се описва и при АИБТ (15, 22). Митохондриалната дисфункция винаги включва процесите на митофагия, апоптоза и увреждане на митохондриалната ДНК.

В заключение, интратрахеалното приложение на AM предизвиква тежки токсични увреждания на белодробния паренхим при плъхове, оценени чрез антиоксидантни и биохимични маркери в белодробен хомогенат. AM повлиява антиоксидантната защитна система в белите дробове, насърчава липидната пероксидация и причинява белодробна фиброза. MnTBAP, приложен преди и след интратрахеалното въвеждане на AM, има защитен ефект върху антиоксидантната защитна система, значително инхибира липидната пероксидация и смекчава фиброзните промени в белите дробове на плъхове, провокирани от амиодарон.

Литература

1. Raghu, G., Rochwerg, B., Zhang, Y., Garcia, C. A., Azuma, A., Behr, J., et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT clinical practice guideline: treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. An update of the 2011 clinical practice guideline. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015; 192 (2): e3–e19. doi:10.1164/rccm.201506-1063ST
2. Sgalla, G., Iovene, B., Calvello, M., Ori, M., Varone, F., Richeldi, L. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management. *Respir. Res.* 2018; 19 (1): 32. doi:10.1186/s12931-018-0730-2
3. Flaherty, K. R., Wells, A. U., Cottin, V., Devaraj, A., Walsh, S. L. F., Inoue, Y., et al. Nintedanib in progressive fibrosing interstitial lung diseases. *N. Engl. J. Med.* 2019; 381 (18), 1718–1727. doi:10.1056/NEJMoa1908681
4. King, T. E., Bradford, W. Z., Castro-Bernardini, S., Fagan, E. A., Glaspole, I., Glassberg, M. K., et al. A phase 3 trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370 (22), 2083–2092. doi:10.1056/NEJMoa1402582
5. Maher, T. M., Corte, T. J., Fischer, A., Kreuter, M., Lederer, D. J., Molina-Molina, M., et al. Pirfenidone in patients with unclassifiable progressive fibrosing interstitial lung disease: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Respir. Med.* 2020; 8 (2), 147–157. doi:10.1016/S2213-2600(19)30341-8
6. Dancheva, V., Stavreva, G. Biologichni efekti na katalitichni antioksidanti i oksidativen stres. *Balgarski meditsinski zhurnal*, 2023, 17(2), 21-29. Bulgarian

7. Tang, X., Luo, Y. X., Chen, H. Z., Liu, D. P. (2014). Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Frontiers in physiology*, 5, 175.
8. Day BJ, Fridovich I, Crapo JD (1997) Manganic porphyrins possess catalase activity and protect endothelial cells against hydrogen peroxide-mediated injury. *Arch Biochem Biophys* 347:256–262
9. Day, B. J., Batinic-Haberle, I., Crapo, J. D. (1999). Metalloporphyrins are potent inhibitors of lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(5-6), 730-736.
10. Suresh, M. V., Yu, B., Lakshminrusimha, S., Machado-Aranda, D., Talarico, N., Zeng, L., Raghavendran, K. (2013). The protective role of MnTBAP in oxidant-mediated injury and inflammation in a rat model of lung contusion. *Surgery*, 154(5), 980-990.
11. Hachmeister, J. E., Valluru, L., Bao, F., & Liu, D. (2006). Mn (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin administered into the intrathecal space reduces oxidative damage and neuron death after spinal cord injury: a comparison with methylprednisolone. *Journal of neurotrauma*, 23(12), 1766-1778.
12. Venkatadri, R., Iyer, A. K. V., Ramesh, V., Wright, C., Castro, C. A., Yakisich, J. S., Azad, N. (2017). MnTBAP inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating VEGF and Wnt signaling. *Journal of cellular physiology*, 232(3), 506-516.
13. Pires, K. M., Ilkun, O., Valente, M., & Boudina, S. (2014). Treatment with a SOD mimetic reduces visceral adiposity, adipocyte death, and adipose tissue inflammation in high fat-fed mice. *Obesity*, 22(1), 178-187.
14. Al-Shammari B, Khalifa M, Bakheet SA, Yasser M. A Mechanistic Study on the Amiodarone-Induced Pulmonary Toxicity. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016(1):6265853.
15. Bolt MW, Card JW, Racz WJ, Brien JF, Massey TE. Disruption of mitochondrial function and cellular ATP levels by amiodarone and N-desethylamiodarone in inhalation of amiodarone-induced pulmonary cytotoxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;298(3): 1280-1289
16. Maral I, Puget K, Michelson H. Comparative study of SOD, catalase and GSH-Px levels in erythrocytes of different animals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1977;77(4): 1532-1535.
17. Koroljuk MA, Ivanova LI, Maiorova IG, Tokarev VE. A method of determining catalase activity. *Laboratornoe delo* 1988;1: 16-19 [Russian].
18. Bergmeyer HU, Gawehn K, Grass M. Enzymes as biochemical reagents, in: *Methods of Enzymatic Analysis*, HU Bergmeyer (ed). New York, Academic Press, 1974, 425-522.
19. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 1979;95(2): 351-358.
20. Bergman I, Loxley R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Analytical Chemistry*. 1963;35(12): 1961-1965.
21. Vereckei A, Blazovics A, Gyorgy I, Feher E, Toth M, Szenasi G, et al. The role of free radicals in the pathogenesis of amiodarone toxicity. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 199;34:161-77.
22. Nicolescu AC, Ji Y, Comeau JL, Hill BC, Takahashi T, BrienJF, et al. Direct mitochondrial dysfunction precedes reactive oxygen species production in amiodarone-induced toxicity in human peripheral lung epithelial HPL1A cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;227(3):370-79.
23. Taylor, M. D., Antonini, J. M., Roberts, J. R., Leonard, S. S., Shi, X., Gannett, P. M., et al. Intratracheal amiodarone administration to F344 rats directly damages lung airway and parenchymal cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 2003;188(2): 92-103.
24. Tang, X., Luo, Y. X., Chen, H. Z., Liu, D. P. Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Frontiers in physiology*, 2014;5:175.
25. Batinić-Haberle, I., Cuzzocrea, S., Rebouças, J. S., Ferrer-Sueta, G., Mazzon, E., Di Paola, R., et al. Pure MnTBAP selectively scavenges peroxynitrite over superoxide: comparison of pure and commercial MnTBAP samples to MnTE-2-PyP in two different models of oxidative stress injuries, SOD-specific *E. coli* model and carrageenan-induced pleurisy. *Free radical biology medicine*, 2009;46(2): 192.

26. Suresh, M. V., Yu, B., Lakshminrusimha, S., Machado-Aranda, D., Talarico, N., Zeng, L., et al. The protective role of MnTBAP in oxidant-mediated injury and inflammation in a rat model of lung contusion. *Surgery*. 2013;154(5): 980-990.
27. Liu, D., Shan, Y., Valluru, L., Bao, F. Mn (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin scavenges reactive species, reduces oxidative stress, and improves functional recovery after experimental spinal cord injury in rats: comparison with methylprednisolone. *BMC neuroscience*, 2013;14: 1-18.
28. Venkatadri, R., Iyer, A. K. V., Ramesh, V., Wright, C., Castro, C. A., Yakisich, J. S., Azad, N. MnTBAP inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis by regulating VEGF and Wnt signaling. *Journal of cellular physiology*. 2017;232(3): 506-516.
29. Pires, K. M., Ilkun, O., Valente, M., & Boudina, S. Treatment with a SOD mimetic reduces visceral adiposity, adipocyte death, and adipose tissue inflammation in high fat-fed mice. *Obesity*. 2014;22(1): 178-187.
30. Cao, X., Luo, D., Li, T., Huang, Z., Zou, W., Wang, L., et al. MnTBAP inhibits bone loss in ovariectomized rats by reducing mitochondrial oxidative stress in osteoblasts. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2020;38: 27-37.

IMMUNOTHERAPY IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER – THE NEW THERAPEUTIC APPROACH

Simeon Ivanov ^{1,2}, Jelyazko Arabadziev ², Eliz Tazimova ², Georgeta Bocheva ¹

¹Department of Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty, Medical University Sofia

²Department of Medical oncology, UMBAL „Tokuda“

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer (TNBC) is challenging from a therapeutic point of view due to the lack of expression of hormone receptors (endocrine therapy cannot be applied (ER-, PR-)) as well as the lack of expression of HER2 receptors (impossibility to be applied targeted therapy (HER2-)).

For a long time, the only option for systemic treatment of this histological variant was conventional chemotherapy. In the last decade, immuno-oncology has experienced a significant development, as evidenced by the increasing number of indications for antitumor immunotherapy and its addition to numerous therapeutic protocols. Immunotherapy is a relatively new indication in the context of the treatment of TNBC. Treatment with immune checkpoint inhibitors in this setting shows good potential, supported by several phase III clinical trials. This report is showing the first year-experience of the Department of Medical Oncology at ACC UMBAL Tokuda - presentation of clinical practice results and specifics related to treatment of triple-negative breast cancer.

Key words: immunotherapy, triple-negative breast cancer, immuno-oncology

Имуноterapia при тройно-негативен карцином на гърда – новият терапевтичен подход

Симеон Иванов ^{1,2}, Желязко Арабаджиев ², Елиз Тазимова ², Жоржета Бочева ¹

¹Катедра по фармакология и токсикология, Медицински факултет, Медицински университет София

²Клиника по медицинска онкология, АСК УМБАЛ „Токуда“

Въведение

Тройно-негативният карцином на гърдата (TNBC) представлява хетерогенна група злокачествени тумори, състояща се от различни по своята патохистологична същност неоплазми, но обединени от липсата на експресия на естрогенен (ER-) и прогестеронов (PR-) рецептори, както и липса на експресията на рецептори за човешкия епидермален растежен фактор (HER)2. TNBC съставлява около 15% от всички злокачествени новообразувания на млечните жлези [1].

При определяне прогнозата и терапевтичния режим, детерминирането на рецепторния статус е изключително съществен елемент. При тройно-негативния карцином, ендокринна терапия не може да бъде проведена поради липсата на експресия на хормонални рецептори. Същевременно, таргетно насочено лечение с Trastuzumab и Pertuzumab също няма как да бъде проведено, поради липса или слаба експресия на HER2 рецептора. Поради това, дълги години пациентките с този имунохистохимичен вариант имаха единствена възможност за лечение чрез химиотерапия [2]. През последните години беше въведена употребата на имунни чекпойнт инхибитори (имуноterapia) като Pembrolizumab. Препаратът получава положителна оценка през 2022 година от Европейската агенция по лекарствата за употреба при тройно-негативен карцином на гърда, влиза в препоръките на Европейското дружество по медицинска онкология (ESMO) [3], а в България се използва по това показание и реимбурсира от НЗОК от 2023 година.

Pembrolizumab представлява хуманизирано моноклонално антитяло с афинитет към PD-1 рецептора, разположен по повърхността на лимфоцитите. Лиганди за този рецептор са

PD-L1 и PD-L2, нормално експресирани по повърхността на здрави клетки. Тяхна основна роля е предпазването от клетъчно-медиран автоимунитет. Множество ракови клетки имат способността да образуват такъв тип протеини по тяхната клетъчна повърхност и по този начин да се предпазят от клетъчно-медираната цитотоксичност [4,5]. Pembrolizumab се свързва с PD-1 рецептора по повърхността на лимфоцитите и блокира този инхибиращ по своята същност сигнален път, позволявайки на лимфоцитите да осъществят ефекта на противотуморния имунитет. Това обаче е и пряко свързано с нежеланите лекарствени реакции на този тип лечение, които се проявяват под формата на различни имуномедираны събития (като например имуномедиран тиреоидит) [6].

Проучването Keynote-522 дава доказателствената основа за ползите от добавянето на имунотерапията към стандартния химиотерапевтичен режим [7]. По своето същество това е трета фаза клинично проучване, сравняващо две кохорти пациенти – пациентки с тройно-негативен карцином на гърдата, на които е прилагана стандартната химиотерапевтична схема на лечение и втора група, при които към химиотерапията е добавена и имунотерапия под формата на Pembrolizumab (Таблица 1).

Таблица 1: Имуноterapia при TNBC

	Терапевтични схеми при ранен TNBC	Продължителност
Неoadювантен режим	Carboplatin + Paclitaxel + Pembrolizumab	4 курса
	Epirubicin + Cyclophosphamide + Pembrolizumab	4 курса
Адювантно лечение с Pembrolizumab	лечение с PARP инхибитори се обсъжда при BRCA мутации	

Keynote-522 показва значително по-висок пълен патологичен отговор в групата на включен Pembrolizumab към химиотерапията, в сравнение с плацебо и химиотерапия, а нежелани лекарствени реакции категоризирани като трета или по-висока степен са 78% и 73%, респективно (Таблица 2).

Таблица 2: Патологичен отговор и НЛР от включване на имунотерапия при TNBC

	Pembrolizumab + химиотерапия	Плацебо + химиотерапия
Пълен патологичен отговор	64.8 %	51.2 %
Нежелани лекарствени реакции	78 %	73 %

Pembrolizumab се прилага посредством венозна инфузия. Обемът му на разпределение е 2.88–3.48 l, като той може да бъде повлиян от телесната маса и пола на пациентката, нивото на серумен албумин, както и предшестващо лечение с Ipilimumab, но нито един от тези фактори няма клинична значимост. Времето на полуживот на медикамента е между 14–27.3 дни [8].

Резултати от прилагането на Pembrolizumab при TNBC в УМБАЛ „Токуда“

В клиниката по медицинска онкология на УМБАЛ „Токуда“ от старта на въвеждане на имунотерапията в терапевтичните схеми при тройно-негативен карцином на гърда от 2023 година до момента преминават осем пациентки, показани за този тип лечение. От тях една прекъсва лечението си без да завърши пълния курс. От останалите седем пациентки пълен патологичен отговор се наблюдава при 57,14% (или при четири от общо седем). При две от пациентките се установи метакронен яйчников злокачествен тумор, като и при двете жени не

се наблюдаваха мутации в BRCA1&2 гените (NGS секвениране). При 28,5% от пациентките (две от седем жени) се разви имуномедиран тиреоидит като имуно-обусловен тип нежелани лекарствени реакции И двете пациентки са включени на субституираща терапия с L-тироксин.

Обсъждане

Населението в Европа и в частност България продължава да застарява. С увеличаване на средната възраст, броят на онкологично болните пациенти ще нараства с всяка година. Все повече се разширяват показанията за имунотерапия, като допълнение към основния химиотерапевтичен курс или самостоятелно при редица солидни тумори. Това от своя страна ще доведе до ръст на имуномедираните реакции и имуномедирана токсичност. Повишено внимание трябва да бъде обръщано на пациенти с анамнеза за предхождащо или настоящо лечение с имунни чекпойнт инхибитори. При тях винаги трябва да се обсъжда възможността за развитието на автоимунен процес.

Литература

1. Dass SA, Tan KL, Selva Rajan R, Mokhtar, NF, Mohd Adzmi, ER, Wan Abdul Rahman, W F., et al. Triple Negative Breast Cancer: A Review of Present and Future Diagnostic Modalities. *Medicina* (Kaunas, Lithuania), 2021;57 (1), 62.
2. Marra A, Curigliano G. Adjuvant and Neoadjuvant Treatment of Triple-Negative Breast Cancer with Chemotherapy. *Cancer J.* 2021;27(1):41-49.
3. Shah M, Osgood CL, Amatya AK, Fiero MH, Pierce WF, Nair A, Herz J, Robertson KJ, Mixter BD, Tang S, Pazdur R, Beaver JA, Amiri-Kordestani L. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for Neoadjuvant and Adjuvant Treatment of Patients with High-Risk Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2022;28(24):5249-5253.
4. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev.* 2009;229(1):114-125.
5. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2010;236:219-242.
6. Buqué A, Bloy N, Aranda F, et al. Trial Watch: Immunomodulatory monoclonal antibodies for oncological indications. *Oncoimmunology.* 2015;4(4):e1008814. Published 2015 Mar 2.
7. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 2020;382(9):810-821.
8. Centanni M, Moes DJAR, Trocóniz IF et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 2019 (58):835–857

COMPARATIVE ANALYSIS BETWEEN PHARMACOVIGILANCE AND COSMETOVIGILANCE

Stefka Stoyanova¹, Emanuil Yordanov¹, Nikolay Nachev¹, Emil Hristov¹, Iva Parvova²

¹Faculty of chemistry and pharmacy, Sofia University “St. Kliment Ohridski”

²Department of rheumatology, Medical University – Sofia, Bulgaria

ABSTRACT

Introduction: Prior to being placed on the market, products related to population health should first and foremost be safe for human health. Despite the existence of explicit regulatory prerequisites, adverse effects may occur with the use of medicinal products, cosmetic products, food supplements, biocides, etc. Adverse effect reporting, analysis and corrective action should follow standardised formats and internationally accepted standards.

Aim: To comparatively evaluate the different methods of post-authorisation monitoring of the safety of medicinal products (pharmacovigilance) and the safety of cosmetic products (cosmetovigilance).

Materials and methods: We conducted a content analysis, comparative analysis and documentary analysis of European legislation on medicinal products and cosmetic products (directives and regulations).

Results and discussion: Pharmacovigilance and cosmetovigilance require methodological approaches to collect, document, establish causality, and manage adverse effects caused after the use of medicinal and cosmetic products, respectively. We found similarities in the two procedures regarding the requirements under which reported adverse effect information is recorded as a valid individual safety report – there should be an identifiable patient/consumer, an identifiable reporter, a description of the clinical manifestation and the specific medicinal/cosmetic product that led to the adverse effect. However, there is a difference in the regulatory timeframe for reporting the adverse effect – the adverse drug reaction report must be circulated to EU Member States within 15 days, whereas for cosmetic products it is up to 20 days. The similarities between pharmacovigilance and cosmetovigilance facilitate the adverse reaction reporting processes but also ensure that public health and safety are improved.

Key words: medicinal product, cosmetic product, pharmacovigilance, cosmetovigilance, adverse effect

СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ МЕЖДУ PHARMACOVIGILANCE И COSMETOVIGILANCE

Стефка Стоянова¹, Емануил Йорданов¹, Николай Начев¹, Емил Христов¹, Ива Първова²

¹Факултет по химия и фармация, Софийски университет „Св. Климент Охридски“

²Клиника по ревматология, Медицински университет, София, България

Въведение

Преди да бъдат пуснати на пазара продуктите, свързани със здравето на населението, трябва преди всичко да бъдат безопасни за здравето на човека.

Всеки промишлено произведен лекарствен продукт, който е предназначен за приложение при хора с цел лечение или профилактика на заболяване, или поставяне на медицинска диагноза, може да бъде пуснат на пазара, едва след като получи разрешение за употреба [1,2]. В хода на процедурата по издаване на разрешение за употреба всеки заявител трябва да предостави убедителни доказателства, че неговият лекарствен продукт отговаря на общоприетите в европейското регулаторно право изисквания, а именно – качество, безопасност и ефикасност.

По време на предрегистрационния период от жизнения цикъл на един лекарствен продукт се провеждат редица неклинични и клинични изпитвания с цел да се определят фармакологичният и токсикологичен профил на лекарствения продукт, както и да се открият нежелани реакции, до които може да доведе неговия прием. Това е задължително и необходимо условие, за да се докаже, че ползите от този лекарствен продукт ще надвишават рисковете и не биха понижали качеството на живот на пациентите, както и не биха застрашили човешки живот.

Козметичните продукти, от друга страна, са вещества, които са предназначени да влизат в съприкосновение с която и да е външна част на човешкото тяло – епидермис и окосмени части, нокти, устни и външни полови органи, или със зъбите и лигавицата на устната кухина, като претендиращият от тях ефект при употреба трябва да бъде преди всичко почистване, парфюмиране, промяна във външен вид или коригиране на телесна миризма. Всички козметични продукти, които се пускат на пазара трябва да бъдат безопасни за човешкото здраве, когато се използват при нормални или разумно предвидими условия, като се има предвид тяхното представяне, етикетиране, инструкции за употреба и унищожаване след употреба, както и всички допълнителни указания, предоставени от лицето, отговорно за пускането им на пазара. Преди да бъде пуснат на пазара козметичният продукт, трябва да се предостави информация за него през т.нар. Нотификационен портал (Cosmetic products notification portal) и да се докаже, че продуктът е преминал през оценка на безопасността и са известни възможните нежелани ефекти, които биха могли да се наблюдават при употребата му, както и тяхната честота [3].

Въпреки наличието на изрични регулаторни предиспозиции, е възможно да се появят нежелани ефекти при употребата на лекарства, козметични продукти, хранителни добавки, биоциди и други. Докладването на нежеланите ефекти, тяхното анализиране и корективни действия трябва да следват типизирани формати и общоприети международни стандарти. Данните от реалната практика показват, че участие в тясно профилираните дейности по фармакологична бдителност могат да вземат не само лекари и фармацевти, но и лица с немедицинско образование. В противовес, съгласно Регламент (ЕО) № 1223/2009 относно козметичните продукти, оценка на безопасността на козметичен продукт може да извършва единствено лице с диплома за придобита професионална квалификация в областта на медицината, фармацевцията и токсикологията [3].

Цел

Да оценим в сравнителен аспект различните способности за пострегистрационното проследяване на безопасността на лекарствените продукти (pharmacovigilance) и безопасността на козметичните (cosmetovigilance).

Материали и методи

България като страна-членка на Европейския съюз напълно е синхронизирала националното законодателство с европейското – както в областта на лекарствената регулация, така и по отношение на изискванията за козметичните продукти. Поради тази причина проведохме анализ на съдържанието, сравнителен анализ и документален анализ на европейското законодателство в областта на лекарствата и козметичните продукти (директиви и регламенти) – съответно Регламент (ЕС) № 1235/2010, Регламент (ЕО) № 520/2012, Директива 2001/83/ЕО, Директива 2010/84/ЕС и Регламент (ЕО) № 1223/2009 относно козметичните продукти. Обект на анализ бе и разработеното от Европейската агенция по лекарства Ръководство за добри практики за проследяване на лекарствената безопасност.

Резултати и обсъждане

Една от основните причини, които пораждат необходимостта от изграждане на система от дейности по проследяване и предотвратяване на нежелани ефекти, е стремежът към подобряване на грижите и безопасността на хората. Подозирането на причинно-следствена

връзка между приложението на лекарствен или козметичен продукт и произтичаща от това неблагоприятна изява и липсата на разумна и навременна намеса на медицинските специалисти е престъпване на правилата и нормите на професионалната етика. От друга страна, нежеланите ефекти водят до увеличаване на разходите, както за пациента/крайния потребител, така и за обществото – в повечето случаи разходите за овладяване на страничните ефекти надхвърлят в пъти стойността на лекарствената терапия или стойността на прилагания козметичен продукт.

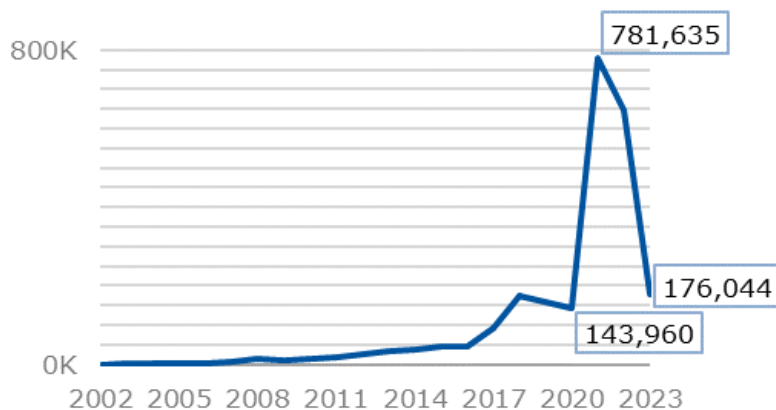
Проследяването на лекарствената безопасност е наука и дейности, свързани с откриването, оценката, разбирането и предотвратяването на неблагоприятните ефекти от приложението и използването на ЛП за лечение, профилактика и диагностика, както и на други проблеми, свързани с лекарството.

В исторически план събитието, което преобръща представите на медицинската общност и регулаторните органи относно безопасността на лекарствените продукти е т.нар. талидомидова криза. В края на 50-те и началото на 60-те години на миналия век по статистически данни около 10 000 деца се раждат с вродени дефекти, които са причинени от употребата на талидомид от техните майки по време на бременност – този лекарствен продукт им е предписван с цел подобряване качеството и количеството на съня и намаляване на епизодите на гадене [4]. Този мрачен период от развитието на фармацевтичната индустрия посочва необходимостта от международен мониторинг на лекарствената употреба – дейности за по-добро тълкуване на безопасността и ефективността при приложение на лекарствата в реалната клинична практика, рисковете, които крият, тяхната тежест и честота. Затова през 1968 година Световната здравна организация стартира програма за международен мониторинг – колаборативен център в Упсала, Швеция, който има за цел да идентифицира рано сигналите за нежелани лекарствени реакции (НЛР), да прецени риска и да предприеме и наложи подходящи корективни действия за създаване на по-безопасни и ефективни лекарства [5]. С подписването на Договор за функционирането на Европейския съюз и произтичащите от него други нормативни документи в областта на лекарствената регулация, включително Регламент (ЕО) № 726/2004 относно разрешаване и контрол на лекарствени продукти за хуманна и ветеринарна употреба и за създаване на Европейска агенция по лекарствата, се поставя началото на проследяване на лекарствената безопасност по единен общоевропейски стандарт.

Въпреки че лекарственият продукт се пуска на пазара при доказано положително съотношение полза/риск, притежателят на разрешението за употреба (ПРУ) е длъжен да конституира в рамките на организацията си позицията квалифицирано лице, отговорно за проследяване на лекарствената безопасност (qualified person for pharmacovigilance – QPPV) [6]. Именно QPPV изпълнява всички дейности по събирането и анализирането на информацията относно нежелани лекарствени реакции, както и предприемането на подходящи корективни действия с цел предотвратяване на тяхната повторна поява. Източниците на информация за клинична изява към приет лекарствен продукт, която е вредна или неблагоприятна, и която се проявява при дози, които нормално се използват при хора с цел профилактика, диагностика или лечение на заболяване, са разнородни – докладване от самия пациент или негов роднина, медицински специалисти, фармацевтични компании, регулаторни органи и литературни публикации в реферирани и нереферирани научни списания с доказан авторитет. Според общоприетите норми за уведомяване на компетентните органи – Изпълнителна агенция по лекарствата и Европейска агенция по лекарствата (ЕМА), един докладван случай се счита за обстоятелствен и валиден при условие, че разполагаме с данни най-малко за:

1. пациента, при когото се е появила нежеланата лекарствена реакция – инициали, пол, възраст;
2. подозиран лекарствен продукт – търговско наименование, активно вещество, партиден номер, срок на годност на партидата;
3. описание на клиничната изява – по начина, по който информацията е предадена на QPPV;
4. лицето, което съобщава информацията.

При установена причинно-следствена връзка между оплакването и приемания лекарствен продукт, докладът за постъпило оплакване от НЛР трябва да бъде сведен до знанието на Компетентния орган възможно най-бързо, но не по-късно от 15 календарни дни, за сериозни НЛР, и 90 календарни дни за всички останали. Това отброяване на времето започва от момента, в който QPPV или друг служител в рамките на същата организация за първи път е узнал за НЛР (initial data receipt – IDR=0). Информацията за постъпилите НЛР се публикува и в създадената от ЕМА база данни EudraVigilance, която служи за електронен обмен на индивидуални доклади за безопасност (individual case safety report – ICSR) между ЕМА, националните компетентни органи, притежателите на разрешение за употреба и спонсорите на клинични изпитвания в Европейското икономическо пространство (ЕИП) [7,8]. Към месец декември 2023 година в EudraVigilance се съхранява информация за над 27,4 млн. ICSRs, отнасящи се към 15,9 млн. докладвани случаи за предполагаеми НЛР [9]. Всяко едно от тези съобщения за подозирана НЛР, независимо от източника на информация, допринася за мониторинга на лекарствената употреба, а използването на единна европейска платформа улеснява статистическите анализи и позволява по-бързото идентифициране на свързаните с безопасността проблеми и респективно тяхното своевременно решаване. Затова и регулаторните органи непрекъснато апелират към активно участие на всички заинтересовани страни в процеса по проследяване на лекарствената безопасност. Схващането, че докладването на подозирани НЛР в EudraVigilance е в основата на функционирането на системата на ЕС за фармакологична бдителност, е все по-широко застъпено и това става ясно и в последния годишен доклад на ЕМА:



Фиг. 1 Тенденция на съобщенията за НЛР в ЕИП, докладвани в EudraVigilance от националните компетентни органи и ПРУ [9]

За разлика от pharmacovigilance, концепцията за cosmetovigilance се утвърждава години по-късно. В периода 1989-1994 година в Швеция се провежда проучване относно ползата от въвеждането на система от дейности по проследяване на безопасността на козметичните продукти, но тъй като докладваните случаи на нежелани ефекти в този времеви интервал са малко на брой, необходимостта от cosmetovigilance се квалифицира като неоправдана [6]. За първи път терминът cosmetovigilance се споменава през 1997 г. в научна публикация във Франция, но той не е индексирен в световен мащаб. По-късно усилията на френските здравни власти са насочени към провеждането на 4-месечен пилотен проект за докладване на нежелани ефекти, който завършва с разписване на отделна глава в The Public Health Law, която е посветена на проследяването на безопасността на козметичните продукти [10,11].

С влизането в сила на Регламент (ЕО) № 1223/2009 на Европейския Парламент и на Съвета от 30 ноември 2009 г. относно козметичните продукти се създава единен подход за управление на сериозните нежелани ефекти (serious undesirable effects – SUEs), дължащи се на приложението на козметични продукти.

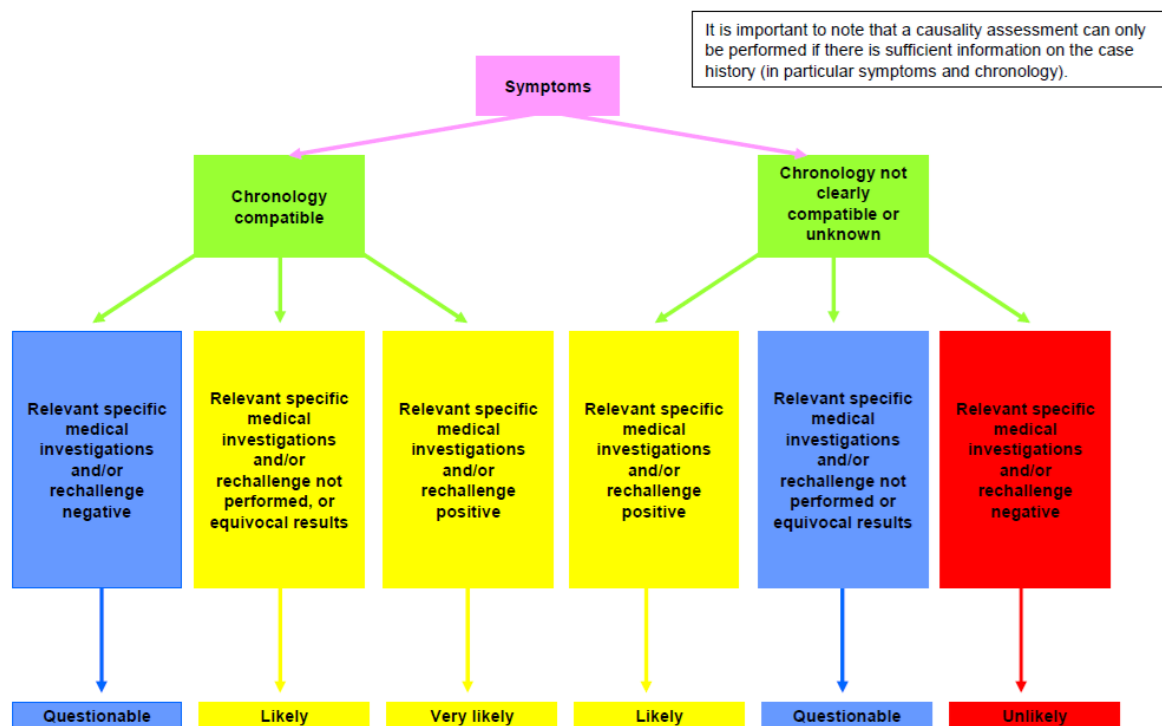
Cosmetovigilance е система от дейности, свързани с откриването, оценката, разбирането и предотвратяването на нежелани ефекти, които са се появили по време на или след

приложението на козметични продукти в съответствие с тяхната нормална или разумнопредвидима употреба.

Съгласно Регламент (ЕО) № 1223/2009 на пазара могат да се пускат единствено козметични продукти, за които в рамките на Общността дадено физическо или юридическо лице е определено като отговорно лице. Отговорното лице изпълнява редица задължения, включително незабавно нотифициране на Компетентния орган в случай на появил се сериозен нежелан ефект. По подобие със системата за проследяване на лекарствената безопасност, съществуват разнородни източници на информация относно клиничната изява на ефекта, предизвикан от употребата на козметичен продукт – потребител, компетентен орган, научна литература. За да се определи подадения доклад като валиден, на първо място трябва да бъдат спазени минималните изисквания:

1. идентифициран потребител – инициали, пол, възраст, данни за контакт;
2. идентифициран съобщител – име, данни за контакт;
3. идентифициран козметичен продукт – търговско наименование, партиден номер, срок на годност, предназначение;
4. описание на нежелания ефект.

В сходство с фармакологичната бдителност и при козметичните продукти трябва да се оцени причинно-следствената връзка между нежелания ефект и прилагания козметичен продукт. Този процес се основава на шест критерия, разделени в две групи, които позволяват хронологична и семиологична оценка.



Symptoms : if the symptoms are not evocative (i.e. not suggestive of the product effect) the final level of causal relationship is decreased by one degree (very likely to likely, likely to questionable ,questionable to unlikely)

Compatible chronology : A time sequence between product use and the occurrence of symptoms as well as between stopping product use and clearing up of the symptoms which is plausible from a medical viewpoint and can be reasonably anticipated for this kind of product use and undesirable event. If the chronology is not compatible the causal relationship is **excluded**.

Rechallenge : Controlled re-exposure to the product, considering the exposure conditions of the time when the event occurred.

Фиг. 2 Метод за оценка на причинно-следствената връзка [7]

Анализ на причинно-следствената връзка се извършва за всеки отделен случай в опит да се определи вероятността добре познат продукт, използван от потребител, да е отговорен за действително нежелано събитие. Следователно оценката на причинно-следствената връзка е строго индивидуална и се отнася до ефекта върху различните потребители – не се изготвя

обобщена оценка на риска от даден продукт за цялата човешка популация [12]. След като бъде доказана каузалност Компетентният орган, в България – Министерство на здравеопазването, трябва да бъде незабавно уведомен, но не по-късно от 20 календарни дни от датата, на която отговорното лице или друг служител в същата организация е узнал за нежелания ефект (IDR=0). Информацията, която се обменя между националните компетентни органи на страните-членки на ЕС относно SUEs се съхранява в платформа с ограничен достъп – Information and Communication System for Market Surveillance (ICSMS). Проследяването на безопасността на козметичните продукти след като бъдат пуснати на пазара се налага с цел опазване на общественото здраве. При необходимост компетентните органи могат да наложат строг контрол и да изискат предприемане на пропорционални на тежестта и честотата на SUEs последващи мерки за управление на риска – например промяна в инструкциите за употреба, промени в състава, включително изтегляне на продукта от пазара.

Системите за проследяване на лекарствената и козметичната безопасност налагат методологични подходи за събирането, документирането, установяването на причинно-следствена връзка и управлението на нежелани ефекти, причинени след употребата съответно на лекарствени и козметични продукти. Схематично сходствата и разликите между двете системи са представени таблица 1.

Таблица 1 Сравнителен анализ между pharmacovigilance и cosmetovigilance

	Минимум данни				Срок на докладване	Компетентен орган	База данни
	Пациент Потребител	Докладващ	Кл. изява	Подозиран продукт			
ЛП	√ пациент	√	√	√	15 дни* 90 дни	ИАЛ/ЕМА	EudraVigilance
КП	√ потребител	√	√	√	20 дни	МЗ**	ICSMS

*При сериозни нежелани лекарствени реакции

**МЗ – Министерство на здравеопазването

Като резултат от нашето проучване открихме сходство в двете процедури относно изискванията, при които докладваната информация за нежелан ефект се регистрира като валиден индивидуален доклад за безопасност, но се наблюдава разлика в регламентирания срок за съобщаване на нежелания ефект, отговорния регулаторен орган и системата за съхранение на докладваните случаи.

Заклучение

Лекарствените и козметичните продукти могат да окажат негативно влияние върху състоянието на физическо, психическо и социално благополучие на хората. Ето защо в ЕС са разработени функциониращи регулаторни системи, които изискват непрекъснат контрол на безопасността на лекарствените и козметични продукти след като бъдат пуснати на пазара и се прилагат по предназначение. Подходите за провеждане на фармакологична бдителност и проследяване на безопасността на козметичните продукти позволяват откриването, анализирането и предотвратяването на неблагоприятните ефекти от приложението на лекарствените и козметичните продукти.

Наличието на прилики между pharmacovigilance и cosmetovigilance улеснява процесите на докладване на нежеланите ефекти, но и гарантира подобряването на общественото здраве и безопасност.

Дефинитивно обусловеното право на лекари и фармацевти да оценяват безопасността на лекарствени и козметични продукти, провокира разсъждения относно необходимостта от въвеждането на по-задълбочена подготовка в курса на обучение по специализирани предмети като фармакология, клинична фармакология и токсикология, подготовка, която ще изгради аналитично и критично мислене у бъдещите оценители.

Литература

1. Eur-lex.europa.eu (2001) Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 november 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. In force since 18.12.2001 (Cited 2024 November 11)
2. Eur-lex.europa.eu (2010) Directive 2010/84/EU of the European Parliament and of the Council amending, as regards pharmacovigilance, Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use. In force since 21.07.2012 (Cited 2024 November 11)
3. Eur-lex.europa.eu (2009) Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. In force since 11.07.2013 (Cited 2024 November 11)
4. Uppsala Monitoring Centre (2018) Making medicines safer – Uppsala Monitoring Centre – 40 years of pioneering pharmacovigilance. https://who-umc.org/media/164267/umc_making_medicines_safer_web.pdf (Cited 2024 November 11)
5. Jeetu G, Anusha G. Pharmacovigilance: A Worldwide Master Key for Drug Safety Monitoring. J Young Pharm. 2010 Jul-Sep;2(3):315–320. doi: 10.4103/0975-1483.66802 (Cited 2024 November 11)
6. Eur-lex.europa.eu (2010) Regulation (EU) No 1235/2010 of the European Parliament and of the Council amending, as regards pharmacovigilance of medicinal products for human use, Regulation (EC) No 726/2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency, and Regulation (EC) No 1394/2007 on advanced therapy medicinal products. In force since 02.07.2012 (Cited 2024 November 11)
7. Eur-lex.europa.eu (2012) Commission implementing Regulation (EU) No 520/2012 on the performance of pharmacovigilance activities provided for in Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council and Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council. In force since 10.07.2012 (Cited 2024 November 11)
8. EMA. European medicines agency. EudraVigilance. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/research-development/pharmacovigilance-research-development/eudravigilance> (Cited 2024 November 11)
9. EMA (2024). European medicines agency. 2023 Annual Report on EudraVigilance for the European Parliament, the Council and the Commission. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/research-development/pharmacovigilance-research-development/eudravigilance#annual-reports-10799> (Cited 2024 November 11)
10. Berne B, Boström A, Grahnén AF, Tammela M. Adverse effects of cosmetics and toiletries reported to the Swedish Medical Products Agency 1989-1994. Contact Dermatitis. 1996 May;34(5):359-62. doi: 10.1111/j.1600-0536.1996.tb02223.x. PMID: 8807231. (Cited 2024 November 11)
11. Vigan M, Castelain F. Cosmetovigilance: definition, regulation and use „in practice“. European journal of dermatology: EJD 24(6):643-9, doi:10.1684/ejd.2014.2493 (Cited 2024 November 11)
12. Cosmetics Europe (2005). Guidelines on the management of undesirable event reports. https://commission.europa.eu/index_en (Cited 2024 November 11)

PHARMACOLOGICAL MODULATION OF MITOCHONDRIAL FUNCTIONS IN DIABETES

Hashim Hashimov¹, Antoan Rangelov¹

¹„Sofia University "St. Kliment Ohridski", Faculty of Chemistry and Pharmacy, Sofia

ABSTRACT

Mitochondria contribute to much of basic human metabolism, including oxidative phosphorylation, the Krebs cycle, fatty acid oxidation, iron-sulfur center biosynthesis, heme, and amino acid metabolism. Mitochondria are also central to apoptotic cell death and modulate calcium fluxes throughout the cell.

Diabetes is a chronic metabolic disease caused by inadequate insulin production and secretion and, in the case of type 2 diabetes (T2D), by the inability of tissues to respond adequately to insulin. These changes lead to a high concentration of glucose in the blood, which over time leads to various complications. Mitochondrial dysfunctions have long been associated with diabetes as a potential cause of insulin resistance and cellular dysfunction, and more recently in the context of secondary complications of diabetes. There are numerous hypotheses explaining the association of various aspects of impaired mitochondrial function with diabetes, ranging from reduced mitochondrial content and impaired mitochondrial biogenesis to impaired mitochondrial function leading to intracellular accumulation of lipid products and increased production of reactive oxygen species (ROS), which further impair insulin sensitivity and energy metabolism. Mitochondrial functions have been extensively studied in diabetes, especially in skeletal muscle. As a highly metabolically active tissue comprising the largest percentage of total body mass, skeletal muscle, together with the liver, is a key player in the regulation of glucose homeostasis and is severely affected by metabolic disorders such as insulin resistance and metabolic syndrome.

New therapeutic agents targeting mitochondria that have been developed have the potential for a more integrative therapeutic approach to improve energy balance and mitochondrial function in diabetes.

ФАРМАКОЛОГИЧНА МОДУЛАЦИЯ НА МИТОХОНДРИАЛНИТЕ ФУНКЦИИ ПРИ ДИАБЕТ

Хашим Хашимов¹, Антоан Рангелов¹

¹Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Факултет по химия и фармация

Роля на митохондриите в диабета [1]

Някои митохондриални нарушения - наследствени заболявания, причинени от мутации в митохондриалния геном - които причиняват фенотип на диабет, например MELAS (митохондриална енцефалопатия, лактатна ацидоза и епизоди, подобни на инсулт) и MIDD (наследствен диабет и глухота по майчина линия), представляват интересен пример за изследване на връзката между митохондриалната дисфункция и диабета. Клиничните характеристики, които пораждат съмнение за митохондриален диабет, включват многоорганно засягане, повишени серумни нива на лактат, по-бързо преминаване към инсулинова терапия и по-ранна поява на усложнения, свързани с диабета, в сравнение с лицата с T2D. Неспособността на дисфункционалните митохондрии да произведат достатъчно АТФ води до многоорганни дефекти и засяга предимно органи с високи енергийни изисквания, като централната нервна система, мускулите, ретината, бъбреците и панкреаса.

Скелетни мускули

Изследванията на мускулната митохондриална функция при диабет, измерват активността на окислителните и гликолитичните ензими в скелетната мускулна тъкан. Заключение от тези анализи е, че при диабета гликолизата е благоприятна, а окислителното

фосфорилиране е понижено, като адаптивен механизъм за повишена наличност на субстрати. Нарушаването на нормалната митохондриална динамика е един от най-често предлаганите механизми, стоящи зад митохондриалната дисфункция при диабета. Многобройни проучвания показват намалена експресия на **пероксизомно-пролиферативния транскрипционен фактор-активиран рецептор гама коактиватор 1** (PGC-1 α), но също така и на **ядрен респираторен фактор-1** (NRF-1), отговарящи на гени, които кодират оксидоредуктазни ензими. По-късни проучвания, които измерват директно митохондриалната функция, *in vivo* или *ex vivo*, показват намаляване на митохондриалното дишане, но много повече показват, че когато се нормализира спрямо митохондриалното съдържание (цитрат синтазната активност или брой копия на митохондриална ДНК), дишането не се различава между лицата с диабет и здравите лица и че митохондриалната дисфункция в диабетните мускули е следствие от по-ниско митохондриално съдържание, а не от по-ниска вътрешна митохондриална функция.

Като цяло, може да се заключи, че съществува неоспорима връзка между ДТ2 и ИР, от една страна, и митохондриалната дисфункция, от друга. Причина за това се предлагат различни основни механизми, като най-често срещаният е нарушаване на липидния метаболизъм в митохондриите и последващо вътремускулно натрупване на мазнини и натрупване на липидни продукти като диацилглицерол и церамиди, за които е доказано, че потискат инсулиновата сигнализация чрез активиране на нови протеин кинази С (PKCs) (като PKC δ). Друга хипотеза е, че нарушеното снабдяване на скелетните мускули с кислород, а не вътрешно присъщото увреждане на митохондриалната окислителна функция, е причина за субоптималната мускулна митохондриална функция. Както и в други тъкани, **в диабетния мускул е налице повишено производство на ROS**, което потенциално е следствие от нарушената митохондриална функция, но допълнително разпространява и нарушението във функцията.

Черен дроб

Черният дроб играе основна роля в регулирането на глюкозната хомеостаза, като освобождава глюкоза по време на гладуване и я съхранява под формата на гликоген след хранене. В инсулинорезистентния черен дроб инсулинът не успява да потисне ендогенното производство на глюкоза, когато глюкозата е в изобилие, и вместо да я съхранява, продължава да я освобождава в кръвообращението. Установена е и силна връзка между натрупването на мазнини в черния дроб и серумния инсулин на гладно, което може да се дължи отчасти на намаляване на чернодробния инсулинов клирънс. Повишаването на съдържанието на хепатоцелуларни липиди, наричано още неалкохолен мастен черен дроб, предшества проявата на ДТ2. Неалкохолният мастен черен дроб заедно с възпалителните процеси в черния дроб често прогресира до неалкохолен стеатохепатит и неалкохолна мастна чернодробна болест. Всички тези чернодробни патологии са свързани с митохондриални аномалии.

Пациентите с метаболитно добре контролиран ДТ2 показват намалени концентрации на чернодробен АТФ, които са свързани с чернодробната инсулинова резистентност, независимо от съдържанието на чернодробни липиди, което предполага, че нарушеният чернодробен енергиен метаболизъм и чернодробната инсулинова резистентност могат да предшества развитието на стеатоза при пациенти с ДТ2. В черния дроб на пациенти с диабет е установено по-ниско производство на АТФ и по-нисък разход на АТФ в сравнение с индивиди без диабет на сравнима възраст и с подобна телесна маса. Диетата с високо съдържание на мазнини при млади мъже е предизвикала чернодробна инсулинова резистентност, докато периферните тъкани, отразени главно в мускулите, не са станали инсулиново резистентни, като по този начин се предполага, че повишената чернодробна липидна инфилтрация вероятно се появява в началото на патогенезата.

За дешифриране на точните молекулярни механизми са използвани клетъчни модели за изследване на преките ефекти на свободните мастни киселини (СМК) върху хепатоцитите. Доказано е, че палмитатът инхибира стимулираното от инсулина **сериново фосфорилиране на Akt (протеин киназа B)**. Освен това, е доказано, че реактивните кислородни видове (ROS) играят причинно-следствена връзка в индуцираното от палмитата активиране на **c-Jun NH₂**

терминалната киназа (JNK). Освен това, инхибирането на **карнитин палмитоил трансфераза-1 (CPT-1)**, която е скоростопределяща реакция в β -оxygenието, намалява индуцираното от палмитат производство на ROS. Освен това, за разлика от мускулите, PGC-1 α (пероксизомно-пролиферативния рецепторен фактор-1-алфа) се регулира в инсулинорезистентния черен дроб и заедно с глюкокортикоидния рецептор и чернодробния ядрен фактор-4a (HNF-4a) активира транскрипцията на глюконеогенните ензими и допринася за увеличаване на отделянето на глюкоза. Други важни регулатори на транскрипцията на гените за глюконеогенеза са членовете на семейството FoxO (транскрипционните фактори Forkhead), които интегрират инсулиновата сигнализация с митохондриалната функция в черния дроб.

Кръвни клетки

Налице са по-малки, по-сферични митохондрии и намалена обща митохондриална маса при пациенти с ДТ2, заедно с увеличаване на митохондриалната продукция на супероксид и митохондриалния мембранен потенциал в мононуклеарни клетки от периферна кръв на пациенти с диабет. Оценени са тромбоцитните митохондрии от пациенти с диабет и е установена понижена кислородна консумация, по-нисък кислороднозависим синтез на АТФ, индукция на митохондриалните антиоксидантни ензими (**супероксид дисмутаза 2** и **тиоредоксин-зависима пероксидредуктаза 3**) и регулиране на оксидативния стрес, което се вижда като повишено карбонилиране на протеините. Базовата, несвързаната и максималната кислородна консумация са по-високи в мононуклеарни клетки от периферна кръв от пациенти с диабет, което съответства на по-високото производство на ROS.

Свободни радикали и антиоксиданти [2]

Радикалите, получени от кислород (ROS) и азот (RNS: получени от азотен оксид: NO), са най-големият клас радикални видове, генерирани в живите системи. ROS и RNS са продукти на нормалния клетъчен метаболизъм и имат благотворно или вредно въздействие в зависимост от концентрацията, достигната в тъканите.

Тези несдвоени електрони придават значителна степен на реактивност на свободния радикал. ROS се образуват като междинни продукти в редукционно-окислителните (редокс) реакции, водещи от O₂ до H₂O. Ендотелът е разположен на стратегическо анатомично място в стената на кръвоносните съдове и по този начин представлява бариера между кръвта и всички тъкани. Този метаболитно активен еднослоен орган е изложен на различни биомеханични и биохимични стимули, на които реагира, като запазва целостта и хомеостазата на съдовата функция. От ROS, генерирани в ендотелните клетки, основните източници на супероксидни аниони включват никотинамид динуклеотид фосфат (NADPH) оксидази, ксантин оксидази, циклооксигенази (COXs), митохондрии и, при определени условия, ендотелни NO синтази (NOS).

Митохондриите са основният източник на ROS в клетката, а повишените им нива вероятно са виновни за различни патофизиологични състояния, включително диабет тип 2. Неотдавна беше открит друг път за регулиране на митохондриалния ROS, включващ протеина p66Shc (p66). P66 е протеин, кодиран от гена ShcA, който се експресира като три изоформи от около 46, 52 и 66 kDa при бозайниците. Проучванията показват, че p66Shc е много важен за регулирането на вътреклетъчния редокс баланс и оксидативния стрес. Изглежда, че нивата на p66Shc намаляват експресията на ензимите, елиминиращи ROS, чрез инхибиране на транскрипционните фактори FOXO, което води до намаляване на експресията на ензимите, отстраняващи ROS. P66Shc е протеин, действащ специфично в митохондриите като редокс ензим, който генерира H₂O₂. H₂O₂, генериран от p66Shc, представлява ~30 % от общото количество на вътреклетъчния H₂O₂ и е от биологично значение. При нормални клетъчни условия p66ShcA е секвестриран от **пероксидредоксин 1 (Prx1)** в неактивна форма.

Значението на p66Shc в клиничната среда на диабета се подкрепя от факта, че генната експресия на p66Shc е повишена в мононуклеарните клетки, получени от пациенти с диабет тип 2, и корелира с нивата на 8-изопропан в плазмата - in vivo маркер за оксидативен стрес.

Накрая, р66Shc се явява решаващ медиатор на устойчивия съдов хипергликемичен стрес при диабет и предоставя молекулярни прозрения за разбиране на прогресията на диабетните съдови усложнения въпреки оптималния гликемичен контрол.

Основният RNS е азотният оксид, получен от ендотела, или -NO. Той е мощен газов медиатор, който се приема като ключов фактор за ендотелната функция, произвеждан от ендотелната азотнооксидна синтаза (eNOS). NO има мощни вазодилаторни, противовъзпалителни и антитромботични свойства. При физиологични условия, в присъствието на субстрат (L-аргинин) и кофактори (тетрахидробиоптерин: BH₄) eNOS произвежда *NO. В условия на ниска бионаличност на BH₄ спрямо NOS активирането на кислорода се „откъсва“ от окислението на L-аргинина и NOS произвежда супероксид вместо NO. От друга страна, синтезът на NO може да бъде блокиран чрез инхибиране на активното място на ензима от гуанидино-заместени аналози на L-аргинина, като асиметричен диметиларгинин (ADMA) - естествено срещаща се аминокиселина, открита в плазмата и различни тъкани.

ADMA и аргининовото метилиране на органните протеини се променят по време на диабетогенезата. По този начин плазмените нива на ADMA са повишени при пациенти с диабет тип 1 или тип 2. Повишеното производство на ADMA вероятно е свързано с развитието на затлъстяване и диабет, а аргининовото метилиране играе роля в сърдечносъдовите и метаболитните патологии. Повишените нива на ADMA може отчасти да са вторични за ранното развитие на оксидативен стрес. Повишеното серумно ниво на ADMA е един от най-ранните признаци на съдова дисфункция и ИР при диабет тип 2.

Защитните механизми срещу оксидативния стрес, предизвикан от свободните радикали, включват: 1) превантивни механизми, 2) механизми за възстановяване и 2) антиоксидантна защита. Ензимната антиоксидантна защита включва **супероксиддисмутази (SOD), глутатион пероксидази (GPx), каталази (CAT)** и други ензими като **Prx** или **металотионеини (MTs)** или **тиоредоксин**. Неензимните антиоксиданти са представени от витамини [**аскорбинова киселина (витамин С), токоферол (витамин Е)**] и **тиолосъдържащи съединения (GSH, липоева киселина),** и **индиректни (хелатиращи редокс метали, фармакологични лекарства) антиоксиданти**. В организма излишъкът или недостигът на метални йони може потенциално да потисне функцията на протеините, да попречи на правилното им сгъване или, в случая с желязото или медта, да насърчи оксидативния стрес. Металотионеините могат да играят ключова роля в защитата на органите срещу предизвиканите от високите концентрации глюкоза ROS и последващото възпаление при диабетна патология.

При нормални условия съществува баланс между генерирането на ROS и активността/вътреклетъчните нива на антиоксидантните защитни механизми. Оксидативният стрес често се определя като дисбаланс между прооксиданти и антиоксиданти. Самият процес на стареене се регулира от такъв дисбаланс на оксидативния стрес, съчетан с нарушаване на тиол-редокс схемите, което води до аберантни клетъчни сигнали и дисфункционален редокс контрол. В кръвта, оксидативният стрес е резултат от дисбаланса между прооксиданти и антиоксиданти, който може да се определи количествено като редокс състояние на плазмения глутатион/глутатион редуциран: GSH/GSSG.

Липидите са особено уязвими на окисление, тъй като мембраните на някои клетки са богати на полиненаситени мастни киселини и поради наличието на кислород в липидния бислой. Ненаситените фосфолипиди, гликолипидите и холестеролът в клетъчните мембрани и други организирани системи са видни мишени на атаката от оксиданти. Това може да доведе до **липидна пероксидация** - дегенеративен процес, който нарушава структурата/функцията на целевата система. Липидните хидроперокси (LOOHs), получени от ненаситени фосфолипиди, гликолипиди и холестерол, са видни междинни продукти на пероксидативните реакции, предизвикани от реактивни видове като хидроксилен радикал, пероксилни радикали, синглетен кислород и пероксинитрит. Вътрешната митохондриална мембрана съдържа **кардиолипин**, който е ненаситен фосфолипид, специфично локализиран в това отделение.

Нивата на кардиолипина намаляват, когато липидната пероксидация е значителна, както се наблюдава при стареене и диабет.

Повишеният оксидативен стрес, свързан с липидната пероксидация в ендотелните клетки, е една от основните причини за диабетните усложнения, предизвикани от хипергликемията. Ендотелната дисфункция се характеризира с повишена прооксидантна активност и небалансирано производство/освобождение на медиатори. В патогенезата на диабета метаболитните фактори, оксидативният стрес и възпалението се сливат и стимулират адхезията на моноцитите към ендотелните клетки. В плазмата, индексът на оксидативния стрес е повишен при пациенти с диабет тип 1 и тип 2. При пациентите с диабет се наблюдава намалена NO-зависима вазодилатация.

В митохондриите електроните от редуцираните субстрати се придвижват от комплекси I и II на електронно-транспортната верига през комплекси III и IV към кислорода, като образуват вода и предизвикват изтласкване на протони през вътрешната мембрана на митохондриите. Електронотранспортната система е организирана така, че нивото на АТФ да може да се регулира прецизно. Индуцираното от хипергликемията свръхпроизводство на супероксидни аниони от митохондриалната електронно-транспортна верига предизвиква неадаптивен отговор, като засяга няколко метаболитни и сигнални пътища, участващи в диабетните усложнения.

Захарният диабет се характеризира с редица метаболитни аномалии, по-специално инсулинова резистентност и хипергликемия, но също така и с хиперлипидемия, повишени свободни мастни киселини (FFA), повишени количества крайни продукти на напредналото гликиране (AGEs) и повишено производство на супероксидни аниони. Всички тези метаболитни аномалии могат да активират пътища, които променят функцията и структурата на кръвоносните съдове и тъканите. Повишеното производство на супероксидни аниони се свързва с активирането на основни пътища, участващи в патогенезата на диабетните усложнения: **1) поток на полиоловия път, 2) повишено образуване на AGEs (продукти на крайното гликиране), 3) активиране на изоформите на протеин киназа C и 4) свръхактивност на хексозаминовия път.** Ускореният поток на сорбитол през полиоловия път е замесен в патогенезата на вторичните диабетни усложнения: катарактогенеза, ретинопатия, невропатия, нефропатия и сърдечно-съдови заболявания. Освен това съдържанието на свободен карнитин и мио-инозитол в опасните нерви намалява с натрупването на полиол при диабетни плъхове. Тези действия са съпроводени с инактивиране на ензими като eNOS (ендотелна NO синтаза).

Що се отнася до полиоловия път, **алдозоредуктазата**, която принадлежи към оксидоредуктазите, катализира първата и скоростоопределяща реакция от този път за метаболизма на глюкозата. Повишеният поток през полиоловия път може да промени съотношението NADPH/NADP и да отслаби системата на **глутатион редуктазата (GR)** и **глутатион пероксидазата (GPx)**, като по този начин намали съотношението редуциран глутатион/окислен глутатион (GSH/GSSG), което ще доведе до оксидативен стрес.

Механизмите, които са свързани с повишеното генериране на ROS, включват: **NAD(P)H оксидази, крайни продукти на напредналото гликиране (AGE), дефекти в полиоловия път, несвързана NOS** и митохондриалната дихателна верига чрез окислително фосфорилиране. Прекомерните количества ROS и RNS модулират активирането на **протеин киназа C, митоген-активирани протеин кинази** и различни **citoкени** и **транскрипционни фактори** като FOXO, Nrf2, AP-1, NF-κB, PPARs и Bach 1.

Инсулинът упражнява важни редокс-регулирущи действия в различни целеви органи, което предполага антиоксидантна роля на хормона. Генерирането на ROS от митохондриалното окислително фосфорилиране се отслабва от инсулина чрез регулиране на експресията на развързващия протеин (UCP). Освен това експресията на NADPH оксидазите (NOX) се потиска от инсулина.

NOX4 се регулира както от NADPH, генериран по пентозофосфатния път, така и от транслокацията на NOX4 в липидните салове, което води до експресия на моноцитни

хемотактични фактори. В съдовите клетки експресията на мРНК на Nox1 е ниска при физиологични условия, но се индуцира при наличието на фактори, повишени при захарен диабет и други патологични състояния като атеросклероза и хипертония. Едно скорошно проучване показва, че Nox1 има важна роля за ROS, получени от Nox1, при атеросклерозата, свързана със захарен диабет.

Транскрипционните фактори Forkhead boxO (FOXO) включват FOXO1, FOXO3 и FOXO4. Те са критични медиатори на оксидативния стрес и се активират от различни клетъчни стресови стимули. FOXO протеините модулират нормалната клетъчна функция, но също така допринасят за патологични процеси. Оксидативният стрес регулира активността на FOXO чрез различни **посттранслационни модификации**, включително фосфорилиране, ацетилиране и убиквитиниране. Протеините FOXO играят важна роля в защитата на клетките от оксидативен стрес. Всъщност, клетките активират транскрипционните фактори FOXO, за да намалят нивото на оксидативния стрес, като индуцират ензими, които разграждат ROS, като MnSOD и каталаза. Индуцираният от хипергликемия оксидативен стрес насърчава възпалението. Възпалението е основен рисков фактор при диабета и е свързано с прогресията на диабетните усложнения. Протеините FOXO участват в метаболизма на въглехидратите и мастните киселини. По-специално, FOXO1 играе важна роля в регулирането на енергийния метаболизъм на цялото тяло. При диабета генната експресия, зависима от FOXO1, насърчава някои от нежеланите реакции, свързани с тази патология.

Оксидативният стрес често се разглежда като дисбаланс, който е резултат от **променена генна експресия**. Транскрипционният фактор, наречен **ядрен фактор (еритроиден 2)-подобен 2, или Nrf2**, се нарича „главен регулатор“ на антиоксидантния отговор. Той модулира експресията на стотици гени, включително не само тези, които контролират антиоксидантните ензими, но и гени, които контролират имунните и възпалителните реакции. Фармакологичното манипулиране на Nrf2 може да бъде от полза при лечението на метаболитни нарушения като диабет, и по-специално активаторите на Nrf-2 могат потенциално да защитят периферните нерви от хипергликемичен стрес. Витамин Е, един от най-широко изпитаните антиоксиданти за лечение на диабетна невропатия, влияе върху антиоксидантните и детоксикиращите ензими, регулирани от Nrf2.

Семейството на транскрипционните фактори AP-1 се състои от онкопротеини от семейството Jun, които хомо- или хетеродимеризират с други членове на семействата на протеините Jun или Fos. Индуцираната генна експресия чрез AP-1 участва в разнообразни клетъчни реакции, включително антиоксидантна активност. Активирането на AP-1 е свързано с активирането на NF-κB.

Семейството на транскрипционните фактори AP-1 се състои от онкопротеини от семейството Jun, които хомо- или хетеродимеризират с други членове на семействата на протеините Jun или Fos. Индуцираната генна експресия чрез AP-1 участва в разнообразни клетъчни реакции, включително антиоксидантна активност. Активирането на AP-1 е свързано с активирането на NF-κB. Съществува потенциална връзка между възпалението и тези сложни регулаторни вериги. Повишените нива на ROS по време на хипергликемията, пероксидативният стрес и производството на цитокини предизвикват възпалителен отговор в тъканите чрез регулиране на няколко чувствителни към редокс транскрипционни фактори, като например AP-1.

Семейството на транскрипционните фактори ядрен фактор-κB (NF-κB) играе ключова роля във възпалението, имунитета, клетъчната пролиферация, развитието, оцеляването и апоптозата. Хипергликемията и последващото генериране на крайни продукти на напредналото гликиране (AGEs) и разграждането на мастните киселини са основните източници на ROS в клетките и NF-κB се активира от тези стимули.

Пероксизомните пролифератор-активирани рецептори (PPAR) са лиганд-зависими транскрипционни фактори. При хората са идентифицирани три различни изоформи на PPAR. Поради това, PPAR са важни цели при лечението на метаболитни нарушения. Те са ключови регулатори на метаболизма на мастните киселини и липопротеините, хомеостазата на

глюкозата, клетъчната пролиферация/диференциация и имунния отговор. PPAR γ играе ключова роля в глюкозната хомеостаза и участва в регулирането на липидния метаболизъм и диференциацията и функцията на адипоцитите. PPAR γ се експресира в значителна степен в мастната тъкан, в скелетните мускули, локално във васкулатурата, включително ендотелните клетки, гладкомускулните клетки и макрофагите, където изоформите на PPAR упражняват голяма част от метаболитното си действие.

Транскрипционният фактор Bach1 (BTV and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1) инхибира индуцираните от оксидативен стрес гени и е ключов негативен регулатор на индуцираното от оксидативен стрес клетъчно стареене. Епоксигеназната активност и синтезът на **епоксиеткозатриенови киселини (EET)** са важни модулатори на затлъстяването и диабета. Мезенхимните стволови клетки експресират значителни нива на EETs, а инхибирането на разтворимата епоксид хидролаза увеличава нивото на EETs и намалява адипогенезата. Приложението с агонисти на EET увеличава експресията на HO-1 (епоксидна хидролаза-1) чрез инхибиране на Bach-1, отрицателен регулатор на експресията на HO-1.

Хипоксия-индуцируемият фактор (HIF) е друг важен транскрипционен фактор. Активирането на системата HIF представлява основна адаптация при исхемични и метаболитни нарушения. Стабилността и функцията на HIF-1 α се нарушават при високи концентрации на глюкоза. Диабетът се свързва с хипоксия и нарушава индуцираната от исхемия неоваскуларизация, свързана с други форми на адаптивни клетъчни и тъканни реакции към ниските нива на кислород. Изглежда, че хипергликемията е движещата сила на тази дисрегулация. Дестабилизацията на хипоксия-индуцируемия HIF-1 най-вероятно е събитието, което трансдуцира хипергликемията в загуба на клетъчния отговор към хипоксията при повечето диабетни усложнения.

Клетъчните сигнални механизми, регулирани от **сфинголипидите**, се смятат за критични участници в метаболитните заболявания. Контролът на синтеза на сфинголипиди от клетките се регулира от наличието на субстрат, както и от други механизми, свързани с липидния състав и мембранната хомеостаза. Обширна мрежа от ензими метаболизира сфинголипидите в биоактивни липидни медиатори. **Сфингомиелиназата** образува церамид чрез хидролитична реакция. Церамидът се превръща допълнително в сфингозин от **церамидази**. Сфингозинът, след като се фосфорилира в сфингозин 1-фосфат (S1P), образуван в ендотелните и хематопоеичните клетки, се отделя в извънклетъчното пространство чрез транспортери. Поради амфипатичния си характер по-голямата част от S1P се свързва с белтъци преносители в кръвта. В човешката плазма повече от половината от S1P се намира в HDL фракцията, около 36 % в албуминовата фракция и 8 % в LDL фракцията. Способността на HDL да предизвиква вазодилатация, ендотелна защита и кардиопротекция зависи от S1P.

Метаболизмът на сфинголипидите е променен при диабетни състояния. Досега обаче проучванията в тази област са били съсредоточени върху церамида и само няколко проучвания са изследвали участието на S1P. Необходима е индуцирана от мастни киселини (палмитат) стимулация на синтеза на de novo церамид. Освен това е доказано, че инхибирането на синтеза на сфинголипиди повишава инсулиновата чувствителност.

Таргети за лекарствена терапия [2]

Антиоксидантни витамини

Витамин С. Витамин С (аскорбинова киселина) е основен кофактор за α -кетоглутарат-зависимите диоксигенази, като например пролил хидроксилазите, които играят роля в биосинтезата на колаген и в понижаването на хипоксия-индуцируемия фактор (HIF)-1, транскрипционен фактор, който регулира много гени, отговорни за туморния растеж, енергийния метаболизъм, функцията на неутрофилите и апоптозата. Витамин С има важна роля в имунната функция и различните оксидативни/възпалителни процеси, като например извличането на ROS и RNS, предотвратява започването на верижни реакции и предпазва клетъчните мембрани от липидна пероксидация. Окислените продукти на витамин С, аскорбиловият радикал и дехидроаскорбиновата киселина, лесно се превръщат обратно в

аскорбинова киселина чрез глутатион, NADH или NADPH. Аскорбатът може да рециклира витамин Е и глутатиона обратно от окислените им форми. Витамин С може да се използва като терапевтично средство срещу оксидативния стрес при пациенти със захарен диабет.

Витамин Е. Витамин Е се отнася до група съединения, които включват токофероли и токотриеноли. Алфа-токоферолът е най-разпространеният и биологично активен. Що се отнася до неговия механизъм на действие, витамин Е е мощен липофилен антиоксидант. Той е в състояние да неутрализира свободните радикали, образувани по време на нормалния клетъчен метаболизъм, като по този начин защитава клетъчните мембрани и липопротеините. Взаимодействието на витамините Е и С е довело до идеята за „рециклиране на витамин Е“, при което антиоксидантната функция на окисления витамин Е се възстановява непрекъснато от други антиоксиданти. Тази „антиоксидантна мрежа“ зависи от снабдяването с водни антиоксиданти и от метаболитната активност на клетките. Ниските нива на витамин Е са свързани с повишената честота на диабета, което предполага, че пациентите с диабет имат намалени нива на антиоксиданти. Освен това пациентите с диабет може да имат и по-големи нужди от антиоксиданти поради повишеното производство на свободни радикали, свързано с хипергликемията. Подобряването на гликемичния контрол намалява маркерите на оксидативния стрес, както и приемът на витамин Е.

Фолиева киселина. Фолиевата киселина (витамин В9) се използва широко за понижаване на концентрацията на хомоцистеин и за предотвратяване на неблагоприятни сърдечносъдови последици. Въпреки това ефектът на фолиевата киселина върху сърдечносъдовите събития не е ясен. Изследвано е и влиянието на фолиевата киселина върху диабета. Съобщава се, че добавянето на фолиева киселина намалява плазмените концентрации на хомоцистеина и подобрява гликемичния контрол, инсулиновата резистентност и нивата на фолиева киселина и В12 при пациенти с диабет тип 2, лекувани с високи дози метформин.

Освен това допълнителното приемане на високи дози фолиева киселина може да увеличи риска от растеж на ракови клетки и да влоши бъбречната функция. Важно е да се отбележи, че фолиевата киселина и витамините от група В са водоразтворими и се екскретират от бъбреците. Поради това токсичността на терапията може да бъде от голямо значение при пациенти с нарушена бъбречна функция.

Невитаминни антиоксиданти

N-ацетилцистеин. Сред хроничните заболявания захарният диабет е най-честата причина за периферна невропатия (ПН). Пероралното приложение на N-ацетилцистеин (NAC), биосинтетичен прекурсор на GSH, води до предотвратяване на предизвиканите от диабета дефицити като периферна невропатия. Установено е, че скоростта на провеждане на моторните нерви е значително намалена от диабета. NAC инхибира атрофията на миелинизираните влакна. Друг вреден ефект на диабета е хиперагрегабилността на тромбоцитите. Хиперагрегабилността на тромбоцитите е протромботична характеристика на диабет тип 2, свързана с ниски нива на антиоксиданта глутатион (GSH). Клиничното приложение на NAC може да помогне за компенсиране на недостига на GSH в тромбоцитите, като по този начин намали тромботичния риск при пациенти с диабет тип 2.

Липоева киселина. Алфа-липоевата киселина (ALA) е хранителна добавка и терапевтично средство. Тя модулира окислително-редукционния потенциал поради способността си да се уравновесява между различните субклетъчни компартменти, както и екстрацелуларно. Както окислената (дисулфид), така и редуцираната (ди-тиол: дихидро-липоева киселина, DHLA) форма на ALA проявяват антиоксидантни свойства. Има способността директно да потиска ROS в биологичните системи. ALA като мощен хелатор на двувалентни метални йони също оказва антиоксидантно действие, като действа върху хелацията на преходните метали. Редокс двойката ALA/DHLA повишава както антиоксидантната защита, така и функцията на ендотелните клетки, като по този начин запазва зависимата от азотния оксид съдова релаксация при хора. Взаимодействието между LA и регулаторните компоненти на инсулиновата сигнална каскада се оказва функционално

полезно за усвояването на глюкоза от скелетните мускули, толерантността към глюкоза на цялото тяло и полезно срещу инсулинова резистентност.

Коензим Q₁₀. CoQ₁₀ или убихинонът е липидоразтворим бензохинон със странична верига от 10 изопреноидни единици, който се синтезира ендогенно в организма от фенилаланин и мевалонова киселина. Фундаменталната роля на CoQ₁₀ в митохондриалната биоенергетика и добре познатите му антиоксидантни свойства са в основата на клиничните му приложения. Ензимните му процеси улесняват преноса на електрони при генерирането на аденозинтрифосфат (АТФ). Малко увеличение на концентрацията на коензим Q₁₀ в митохондриалните мембрани може да доведе до увеличаване на митохондриалното дишане. При диабета разпрягането на окислителното фосфорилиране може да настъпи като последица от хипергликемията и повишените мастни киселини (разпрягащи агенти). Добавянето на CoQ може също да действа синергично с антиатерогенни средства за подобряване на функцията на ендотела при диабет. CoQ може също така да подобри ендотелната дисфункция чрез „повторно свързване“ на eNOS.

Терапевтични подходи с нови средства

Едаравон (3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-он) е мощен уловител на свободни радикали и инхибитор на липидната пероксидация.

Бенфотиамин. Един нов клас потенциални терапевтични средства са активаторите на транскетолазата (пренася хидроксиалдехид към алдозен акцептор). При диабета концентрацията на гликолитичните междинни продукти е висока, а транскетолазата може да намали тяхната концентрация. Този ензим изисква витамин тиамин като кофактор. Тиаминовият дериват бенфотиамин активира тази транскетолаза в ендотелните клетки. Оксидативното увреждане на ДНК, индуцирано от ангиотензин II, е напълно предотвратено от бенфотиамин. Лечението с високи дози тиамин намалява албуминурията при пациенти с диабет тип 2.

Инхибитори на поли-ADP рибоза полимеразата. PARP-1 регулира експресията на различни протеини, като индуцируема синтаза на азотния оксид (iNOS), вътреклетъчна адхезионна молекула-1 (iCAM-1) и COX-2, на ниво транскрипция и е свързан с развитието на възпалително увреждане на клетките. Оксидативният стрес генерира прекъсвания на ДНК веригата, които от своя страна активират PARP. Активирането на PARP потенцира активирането на NF-κB и експресията на AP-1, което води до по-голяма експресия на AP-1 и NF-κB-зависими гени като iNOS и iCAM-1. Свързактивирането на PARP модулира важни възпалителни пътища, а активността на PARP-1 може да се модулира и от няколко ендогенни фактора, като кинази, полиамини и хормони (естроген). Фармакологичното инхибиране на PARP осигурява значителни ползи при животински модели на сърдечносъдови нарушения, а нови инхибитори на PARP са влезли в клинична разработка за различни сърдечносъдови заболявания. Използването на инхибитори на PARP обаче показва, че този ензим е замесен в развитието на диабета и разрушаването на бета-клетките. В тази област много от използваните инхибитори са показали, че имат допълнителни действия освен инхибирането на PARP. Те включват активности за отстраняване на хидроксилни радикали и водороден пероксид заедно с инхибиране на експресията и активността на iNOS. Като се има предвид, че хроничната невропатна болка може да се появи при пациенти с диабет, лечението включва тежки фармакологични подходи. Фармакологичните терапевтични възможности включват лекарства, които могат да бъдат обещаващи, като инхибитори на поли (аденозин дифосфат-рибоза) полимеразата. Последните открития потвърждават важната роля на активирането на PARP в диабетната периферна невропатия и бъбречната хипертрофия, свързани с диабета, и дават основание за разработване и по-нататъшни проучвания на инхибитори на PARP за превенция и лечение на тези усложнения.

Рецептори, активирани от пероксизомни пролифератори. PPAR вече се считат за привлекателна терапевтична цел за лечение на метаболитни нарушения. Доказано е, че агонистите на PPAR γ ефективно отслабват оксидативния стрес, възпалението и апоптозата.

PPARs играят ключова роля в регулирането на хомеостазата на глюкозата в целия организъм и инсулиновата чувствителност. Въпреки че тези рецептори се експресират най-силно в мастните тъкани, те присъстват и в по-ниски нива в много тъкани. **Цитозолният мастнокиселинен свързващ протеин 4 (FABP4)** осигурява разтворимостта и вътреклетъчния транспорт на дълговерижните мастни киселини и други хидрофобни лиганди. FABP4 се експресира в адипоцитите, макрофагите, които инфилтрират тъканните легла, и тъканите на скелетната мускулатура. Той се регулира от агонисти на пероксизомния пролифератор-активиран рецептор- γ (PPAR- γ), инсулин и мастни киселини. Активаторите на PPAR α (фибрати) и PPAR γ (тиазолидиндиони или глитазони) антагонизират ефектите на ангиотензин II *in vivo* и *in vitro* и имат сърдечносъдови антиоксидантни и противовъзпалителни действия.

Освен това, влошената съдова реактивност при диабетичите е свързана с повишени нива на VCAM-1. Още повече, PPAR имат и отрицателен ефект върху функцията на макрофагите, като потискат производството на възпалителните цитокини TNF- α , IL1- β и IL-6, а е докладвано, че нивата на TNF- α и IL-6 са повишени при диабет.

Тиазолидиндионите (ТЗД), основен клас инсулиносенсибилизиращи лекарства, са синтетични лиганди на PPAR γ , които стимулират транскрипционната активност на този ядрен рецептор. ТЗД повишават инсулиновата чувствителност и имат антиоксидантен ефект. PPAR γ има широк спектър от функции, но по отношение на инсулиновата чувствителност е известно, че насърчава липогенезата и диференциацията на адипоцитите и намалява нивото на циркулиращите свободни мастни киселини. ТЗД предпазват бета-клетките на панкреаса от оксидативен стрес, като този ефект зависи до голяма степен от PPAR γ .

Пиоглитазонът подобрява артериалната ригидност и нивата на CRP при диабет, независимо от промените в гликемичния контрол. Антиоксидантното равновесие в третираните с пиоглитазон сърца е значително подсилено от намалената активност на (NADPH) оксидазата (Nox1 и p22(phox) субединици и запазването на активността на мангановата супероксид дисмутаза. Агонистите на PPAR- α се използват като допълнителна терапия при лечението на диабет. Фибратите действат върху PPAR- α , за да намалят нивото на хипертриглицеридемията. Агонистите на PPAR- α се използват при лечението на диабет тип 2, както и при лечението на ретинопатия, свързана с диабет тип 1, поради способността им да подобряват липидния профил.

FGF21 (Фибробластен растежен фактор 21). Много е важно да се разработят нови съединения, които са насочени към ключови съдови ензими, произвеждащи ROS, и имитират ендогенни антиоксиданти. Тази стратегия може да се окаже от клинично значение за предотвратяване на развитието и/или забавяне на прогресията на съдовите усложнения, свързани с диабета. Като регулатори на липидния и глюкозния метаболизъм, PPARs, като например фибробластен растежен фактор 21 (FGF21), представляват голям интерес. Експресията на FGF21 се индуцира в бялата мастна тъкан от PPAR γ .

Инхибитори на епоксидната хидролаза. Разтворимите инхибитори на епоксидната хидролаза (sEH, EPHX2) ефективно повишават нивата на епоксиейкозатриеновите киселини (EET) и намаляват нивата на дихидрокси ейкозатриеновите киселини, което може да се превърне в терапевтичен потенциал при много болестни индикации, като например диабет. **Халконите** (1,3-диарил-2-пропен-1-они) и техните хетероциклени аналози принадлежат към семейството на флавоноидите. Известно е, че тези съединения, които се срещат естествено в растенията или са от синтетичен произход, проявяват редица биологични активности. Изолираните от растения халкони имат инсулиноподобни активности и подобряват усвояването на глюкоза в адипоцитите. Халконите стимулират усвояването на глюкоза и потенцират инсулин-стимулираното усвояване на глюкоза в адипоцитите. Хидроксихалконите (2',5'-дихидроксихалкон: 2',5'-DHC) са природни съединения с терапевтичен интерес поради техните противовъзпалителни и антиангиогенни свойства. Те инхибират синтеза на индуцируемата NO-синтаза и индуцират експресията на хемооксигеназа-1 (HO-1). Съществува пряка връзка между sEH и глюкозната хомеостаза. Прекъсването на работата на

гена *Erxh2* или инхибирането на неговата епоксихидролазна активност води до подобряване на системната инсулинова чувствителност и повишаване на глюкозния толеранс.

Инкретинови миметици и инхибитори на техния метаболизъм. Два чревни пептида, глюкозозависимият инсулинотропен полипептид (GIP: стомашен инхибиторен полипептид) и глюкагоноподобният пептид-1 (GLP-1), са широко известни с ролята си на инкретини и медиатират увеличаването на инсулиновата секреция. Ензимът дипептидил пептидаза-4 (DPP-4) бързо разгражда GLP-1 и GIP до техните неактивни метаболити. Конкуrentното инхибиране на DPP-4 увеличава полуживота и бионаличността на активните инкретинови хормони, като засилва биологичния им ефект. Изчислено е, че инкретиновият ефект отговаря за 50-70% от общата постпрандиална инсулинова секреция, която се счита за предимно за отговор на пероралната глюкоза. Разработването на нови антидиабетни лекарства, които засилват ендогенната секреция на инкретини, изглежда привлекателна терапевтична стратегия. Както GLP-1, така и GIP рецепторите се експресират върху алфа- и бета-клетките на панкреаса. Освен това е установено, че плазмените нива на GLP-1 са по-ниски при пациенти с диабет тип 2, отколкото при хора без имат диабет тип 2. Базираните на инкретин терапии за захарен диабет включват GLP-1 рецепторни агонисти (които са устойчиви на разграждане от DPP-4) и DPP-4 инхибитори. Механизмите на действие и на двата включват потенциране на ендогенните ефекти на GLP-1. DPP-4 инхибиторите включват ситаглиптин, саксаглиптин, линаглиптин, вилдаглиптин и алоглиптин. В клиничната практика за лечение на диабет тип 2 са одобрени GLP-1 рецепторни агонисти/аналози, като екзенатид, екзендин-4 и лираглутид. Неотдавна бяха демонстрирани защитните свойства на GLP-1 и лираглутид в ендотелните клетки.

Инхибитори на синтеза на церамид или активатори на разграждането на церамид и модулатори на сфингозина. Инхибиторите на синтеза на церамид или активаторите на разграждането на церамид могат да предоставят нови терапевтични възможности за лечение на диабета. Сфингозин киназите (SKs: SK1 и SK2) са обещаващи нови терапевтични цели, тъй като те регулират баланса между проапоптотичните церамиди и митогенния сфингозин-1-фосфат. Финголимоде е първи в класа си, перорално активен модулатор на сфингозин-1-фосфат (S1P) - рецептор със структура, тясно свързана със сфингозина. Съединението е открито чрез химическа модификация на естествен продукт - мириоцин. Фосфорилираната форма на финголимоде действа като функционален антагонист на S1P рецептор тип 1, инхибира излизането на лимфоцити от вторичните лимфоидни органи и показва имуномодулиращи ефекти. Важно е да се отбележи, че инхибирането на *de novo* синтеза на церамид с мириоцин има ефект върху енергийния метаболизъм на цялото тяло и е достатъчно, за да обърне индуцираната от затлъстяването непоносимост към глюкоза в цялото тяло и инсулиновата резистентност.

R66Shc/RAGE сигнализация: Ключов ефектор и положителен таргет. Запазването на хипергликемичния стрес въпреки нормализирането на глюкозата се определя като „хипергликемична памет“. Постулирано е, че ROS може да са критично замесени в персистирането на хипергликемичния стрес в ендотелните клетки и експерименталния диабет. През последните няколко години няколко проучвания идентифицираха критични молекулярни детерминанти на съдовата хипергликемична памет. Интересно е, че последните резултати сочат, че r66Shc контролира нивата на метилглиоксал и съществува връзка между r66Shc и пътя метилглиоксал/AGEs; метилглиоксалът, дикарбонилен метаболит, е основен прекурсор на AGEs. Тези данни, заедно с по-ранни открития, посочват клетъчни събития, които свързват r66Shc с реакциите по пътя на AGE и представляват терапевтични цели. Установено е, че блокирането или генетичното заличаване на RAGE потиска ускоряването на съдовите заболявания и възпаленията. Метформинът може да предпазва от увреждане на тубулните клетки при диабетна нефропатия чрез блокиране на оста AGEs-RAGE-ROS.

Антиоксидантна мрежа, показваща връзката между цикъла на витамин Е, витамин С и тиоловия цикъл [3]

ROO* - пероксиден радикал, RO* - алкоксилен радикал, ROOH - алкилпероксид, ROH – алкохол, O₂⁻ - супероксиден анион.

1. Образуване на прооксиданти чрез UVA, UVB, озон, атакуващи полиненаситени мастни киселини.
2. Получаване на пероксиден и алкоксилен радикал, които взимат водороден радикал, като атакуват алфа-токоферол. Образуват се съответно органичен пероксид, алкохол и токоферилов радикал.
3. Рециклиране на алфа-токоферола чрез получаването на водороден радикал от аскорбат. В тази реакция, се възстановява алфа-токоферола, но се получава междинна полуредуцирана форма на аскорбат, която след това се превръща в дехидроаскорбат.
4. За редуцирането на дехидроаскорбат са необходими тиоредоксин редуктаза (флавопротеин), дихидролипоиламид (простетична група в алфа-кетокиселините дехидрогенази – пируват дехидрогеназа, алфа-кетоглутарат дехидрогеназа, алфа-кетобутират дехидрогеназа, дехидрогеназа на разклонените алфа-кетокиселини) и глутатион.
6. След редуцирането на дехидроаскорбат с два протона и два електрона до аскорбат, тиоредоксинът става в окислена форма, дихидролипоатът в окислена (дисулфидният мост образува хетероцикъл – 1,2-дитиоланов пръстен) и глутатионът в окислената си форма чрез дисулфидни мостове.
7. Разрушаването на дисулфидните мостове в тиоредоксин редуктазата (окислена форма), липоиламид и глутатион окислен, протича с помощта на NADPH зависими редуктази.

Фолатен и метионинов цикъл [4]

Метаболизъм на метионина и свързани с него метаболитни процеси. Незаменимата аминокиселина метионин е критичен компонент на едновъглеродната метаболитна мрежа, която допринася за безброй метаболитни процеси, включително синтеза на полиамини и нуклеотиди (пурины и пиримидини), както и производството на глутатион. Метионинът се метаболизира от **метионин аденозилтрансфераза 2A (MAT2A)**, като се получава универсалният метилов донор **S-аденозилметионин (SAM)**. Метилтрансферазите (MT) използват SAM като източник на метилни групи, като по този начин произвеждат **S-аденозилхомоцистеин (SAH)**, който може да действа като отрицателен регулатор на SAM-зависимите процеси. В тясно свързаният фолатен цикъл, SAH се превръща от **аденозилхомоцистеиназа (АНСУ)** в хомоцистеин, който след това може или да допринесе за транссулфурирането за синтеза на глутатион, или да се превърне обратно в метионин от метионинсинтаза (MS), като по този начин завършва метионовия цикъл. Метионинът може допълнително да се рециклира от страничния продукт на полиаминовата биосинтеза метиоаденозин (MTA) по пътя на спасяването на метионина. Метионинът също така допринася за биосинтезата на полиамини, като служи като източник на SAM. Полиаминът **путресцин** се генерира от аргинин-производната молекула орнитин чрез ензима **орнитин декарбоксилаза (ODC)**, след което може да се превърне в полиамин **спермидин** чрез **аденозилметиониндекарбоксилаза 1 (AMD1)** в реакция, зависима от SAM. След това, спермидинът може да се превърне в крайния полиамин, спермин, в допълнителен процес, зависим от SAM.

Коензим Q₁₀ функции [5]

Най-известната роля на CoQ е функцията му на основен електронен преносител в митохондриалната дихателна верига (MRC). CoQ предава електрони между комплекс I (**NADH-убихинон оксидоредуктаза**) или комплекс II (**сукцинат-убихинон оксидоредуктаза**) и комплекс III (**сукцинат цитохром с оксидоредуктаза**). По този начин CoQ може да бъде открит, както в окислена (CoQ или убихинон), така и в редуцирана форма (CoQH₂ или убихинол), а преобразуването между тези окислено-редуцирани състояния му позволява да действа като кофактор на ензимни реакции, прехвърлящи електрони към субстрати. Поддържането на съотношението между убихинон и убихинол се осъществява чрез Q-цикъла.

Този окислително-редукционен цикъл може да се осъществи чрез двустепенен трансфер на електрони, при който се получава междинен продукт семихинон (полуредуцирана форма) (CoQH^{*}). В митохондриите CoQ също така приема електрони от **сулфидхинон оксидоредуктазата (SQOR)** по време на детоксикацията на сулфида, **пролин дехидрогеназа 1 (PDH)** ензим, необходим за метаболизма на пролина и аргинина, **холин дехидрогеназа (CHDH)**, необходима за метаболизма на глицина, **митохондриална глицерол-3-фосфат дехидрогеназа (G3PDH)**, която свързва окислителното фосфорилиране, метаболизма на мастните киселини и гликолизата, **дихидрооротат дехидрогеназа (DHON)** ензим, участващ в биосинтезата на пиримидини, **флавопротеин дехидрогеназа за пренос на електрони (ETFDH)**, ключов ензим, участващ в β -окислението на мастните киселини и **хидроксилпролин дехидрогеназа**, участваща в метаболизма на глиоксилатите. Всички тези процеси генерират CoQH₂, който се реоксидира от комплекс III. Следователно, CoQ е отличен редокс носител, участващ в различни клетъчни процеси, тъй като има способността да поддържа непрекъснати окислително-редукционни цикли.

Химични и биологични функции на Коензим Q₁₀ [6]

В митохондриите CoQ поддържа и/или регулира пората на митохондриалния преход на пропускливост (PTP), митохондриалните несвързващи протеини, биосинтезата на уридин, окислението на мастни киселини и OxPhos. В по-широк смисъл CoQ изпълнява функциите на салипофилен антиоксидант и стабилизатор на самите мембрани.

Литература

1. Krako Jakovljevic, N., Pavlovic, K., Jotic, A., Lalic, K., Stoiljkovic, M., Lukic, L., Milicic, T., Macesic, M., Stanarcic Gajovic, J., & Lalic, N. M. (2021). Targeting Mitochondria in Diabetes. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6642.
2. Rochette, L., Zeller, M., Cottin, Y., & Vergely, C. (2014). Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et biophysica acta*, 1840(9), 2709–2729.
3. Rimbach, G.; Moehring, J.; Huebbe, P.; Lodge, J.K. Gene-Regulatory Activity of α -Tocopherol. *Molecules* 2010, 15, 1746-1761.
4. Sanderson, S.M., Gao, X., Dai, Z. et al. Methionine metabolism in health and cancer: a nexus of diet and precision medicine. *Nat Rev Cancer* 19, 625–637 (2019).
5. Díaz-Casado, M.E.; Quiles, J.L.; Barriocanal-Casado, E.; González-García, P.; Battino, M.; López, L.C.; Varela-López, A. The Paradox of Coenzyme Q10 in Aging. *Nutrients* 2019, 11, 2221..
6. Stefely JA, Pagliarini DJ. Biochemistry of Mitochondrial Coenzyme Q Biosynthesis. *Trends Biochem Sci*. 2017 Oct;42(10):824-843. doi: 10.1016/j.tibs.2017.06.008. Epub 2017 Sep 17.