

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ – ВАРНА
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО ФИЗИОЛОГИЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ
УС ПО ПАТОФИЗИОЛОГИЯ**

Д-р Дияна Аспарухова Кючукова

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ВРЪЗКАТА ЗАТЛЪСТЯВАНЕ И
КАРДИОВАСКУЛАРНИ УВРЕЖДАНИЯ
В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА МЕТАБОЛИТЕН
СИНДРОМ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен

ДОКТОР

Научен ръководител:

Доц. д-р Камелия Жечкова Братоева, д.м.

Варна, 2025

Дисертационният труд съдържа общо 170 страници, онагледен е с 74 фигури и 5 таблици. Цитирани са 445 литературни източника, от които 1 на кирилица и 444 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден, приет и насочен към защита пред научно жури от разширен Катедрен съвет при Катедра по физиология и патофизиология на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна на 02.12.2025 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на:

05. 03. 2026 в Медицински университет Варна – III аудитория от 14:00 часа на открито заседание на научно жури в състав:

Външни членове:

1. Проф. д-р Благой Иванов Маринов, д.м. – хабилитиран в професионално направление 7.1. Медицина, Медицински университет – гр. Пловдив
2. Проф. д-р Анелия Александрова Димитрова, д.м. – хабилитирана в професионално направление 7.1. Медицина, Медицински университет – гр. Плевен
3. Доц. д-р Армине Вардани Григорян, д.м. – хабилитирана в професионално направление 7.1. Медицина, Медицински университет – гр. Плевен

Вътрешни членове:

1. Проф. д-р Маргарита Стефанова Великова, д.м. – хабилитирана в професионално направление 7.1. Медицина, Медицински университет – гр. Варна
2. Доц. д-р Радко Златков Радев, д.м. - хабилитиран в професионално направление 7.1. Медицина, Медицински университет – гр. Варна

Резервен външен член:

1. Доц. д-р Красимир Гинев Костов, д.м. - хабилитиран в професионално направление 7.1. Медицина, Медицински университет – гр. Плевен

Резервен вътрешен член:

1. Проф. д-р Златислав Стоянов Димитров, д.м.н. - хабилитиран в професионално направление 7.1. Медицина, Медицински университет – гр. Варна

Материалите по защитата са публикувани на интернет-страницата на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна и са на разположение в Катедра Физиология и патофизиология /УС Патофизиология при Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

| | |
|--|-----------|
| ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ | 5 |
| I. ВЪВЕДЕНИЕ | 6 |
| II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД | 8 |
| III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ | 9 |
| 1. Основни процедури по In vivo експериментите | 9 |
| 1.1. Експериментални животни..... | 9 |
| 1.2. Използвани хранителни добавки и други субстанции..... | 9 |
| 1.3. Дизайн на експеримента | 10 |
| 2. Използвани аналитични методи | 11 |
| 2.1. Зоометрични изследвания | 11 |
| 2.2. Биохимични и клиничко-лабораторни методи | 11 |
| 2.3. Имунологични методи | 12 |
| 2.4. Морфологични методи | 12 |
| 3. Статистическа обработка на резултатите в проучването | 15 |
| IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ | 16 |
| 1. Проучване на метаболитните нарушения при високо-фруктозна диета (ВФД) и прием на S- аденозил-метионин (SAM) | 16 |
| 1.1. Промени в зоометричните показатели, телесното тегло и теглото на РПМТ..... | 16 |
| 1.1.1 Резултати | 16 |
| 1.1.2 Обсъждане | 19 |
| 1.2. Вариации в липидния и въглехидратния метаболизъм | 21 |
| 1.2.1 Резултати, получени от определянето на серумната глюкоза, серумните липиди и TyG индекс | 21 |
| 1.2.2 Обсъждане | 24 |
| 1.3. Вариации в серумните нива на пикочна киселина | 31 |
| 1.3.1 Резултати, получени от определянето на серумната пикочна киселина | 31 |
| 1.3.2 Обсъждане | 31 |
| 1.4. Вариации в серумните нива на Vitamin D3 (25 - ОН) и определяне на корелационната зависимост между витамин D3 и TyG Индекс | 33 |
| 1.4.1 Резултати | 33 |
| 1.4.2 Обсъждане | 34 |
| 2. Проучване на степента на възпаление при ВФД и прием на SAM и ролята му в развитието на ЕД, бъбречно и сърдечносъдово увреждане | 36 |
| 2.1. Резултати, получени от определянето на серумните нива на тумор некрозис фактор (TNF- α) и С-реактивен протеин (CRP) | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 2.2 Обсъждане | 38 |
| 3. Проучване на взаимодействието между ОС, нискостепенно хронично възпаление и ЕД при ВФД и прием на SAM | 39 |
| 3.1. Вариации в морфометричните показатели на лява камера и интерлобарните артерии при ВФД и промени след суплементация със SAM | 39 |
| 3.1.1 Резултати, получени от макроскопското изследване на сърце и РПМТ | 39 |
| 3.1.2 Резултати, получени от хистологичния и морфометричния анализ на лява камера | 40 |
| 3.1.3 Резултати, получени от хистологичния и морфометричния анализ на интерлобарните клонове на реналната артерия | 43 |
| 3.1.4 Обсъждане | 46 |
| 3.2. Вариации в експресията на SOD-1 при ВФД и промени след прием на SAM | 51 |
| 3.2.1 Резултати, получени от имунохистохимичния анализ на експресията на SOD-1 в кардиомиоцитите | 51 |
| 3.2.2 Резултати, получени от имунохистохимичния анализ на експресията на SOD-1 в ендотелните клетки на интерлобарните артерии | 54 |
| 3.2.3 Обсъждане | 56 |
| 3.3. Вариации в експресията на RIP3 при ВФД и промени след прием на SAM | 58 |
| 3.3.1 Резултати, получени от имунохистохимичния анализ на експресията на RIP3 в кардиомиоцитите | 58 |
| 3.3.2 Резултати, получени от имунохистохимичния анализ на експресията на RIP3 в ендотелните клетки на интерлобарните артерии | 61 |
| 3.3.3 Обсъждане | 63 |
| 3.4. Вариации в експресията на VCAM при ВФД и промени след прием на SAM | 66 |
| 3.4.1 Резултати, получени от имунохистохимичния анализ на експресията на VCAM в ендотелните клетки на коронарните артерии | 66 |
| 3.4.2 Резултати, получени от имунохистохимичния анализ на експресията на VCAM в ендотелните клетки на интерлобарните артерии | 68 |
| 3.4.3 Обсъждане | 71 |
| 3.5. Промени в експресията на NOS3 в ендотелните клетки на интерлобарната артерия при ВФД и промени след суплементация със SAM | 73 |
| 3.5.1 Резултати, получени от имунохистохимичния анализ на експресията на NOS3 в ендотелните клетки на интерлобарните артерии | 73 |
| 3.5.2 Обсъждане | 76 |
| V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 78 |
| VI. ИЗВОДИ | 79 |
| VII. ПРИНОСИ | 81 |
| VIII. ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД | 83 |
| IX. БЛАГОДАРНОСТИ | 84 |

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

| | |
|--------------|--|
| АТФ | аденозин трифосфат |
| АФК | активни форми на кислорода |
| ВМТ | висцерална мастна тъкан |
| ВФД | високо фруктозна диета |
| ЕД | ендотелна дисфункция |
| ЕТ-1 | ендотелин-1 |
| ЗД | захарен диабет |
| ИТМ | индекс на телесна маса /BMI-body mass index/ |
| МС | метаболически синдром |
| ОС | оскидативен стрес |
| ПМТ | подкожна мастна тъкан |
| AGEs | крайни продукти на гликиране |
| САТ | каталаза |
| СРТ1А | карнитин палмитоилтрансфераза 1А |
| CRP | С-реактивен протеин |
| DNL | de novo липогенеза |
| eNOS | ендотелна азотен оксид синтетаза |
| GPx | глутатион пероксидаза |
| HFCS | високофруктозен царевичен сироп |
| LDL, VLDL | липопротеини с ниска и много ниска плътност |
| МНО | „метаболично здраво затлъстяване“ |
| NADPH-OX | никотинамид аденин динуклеотид фосфат оксидаза |
| Nec-1 | некростатин-1 |
| NF-κB | нуклеарен фактор каппа бета |
| PVAT | периваскуларна мастна тъкан |
| RIP 1, RIP 3 | рецептор взаимодействаща протеин киназа |
| SAM, S-AMe | S-аденозинметионин |
| SOD | супероксид дисмутаза |
| SREBP-1c | стерол регулаторен свързващ протеин-1c |
| TNF-α | тумор некрозис фактор α |
| VCAM-1 | съдова адхезионна молекула 1 |
| VEGF | съдов ендотелен растежен фактор |
| VSMCs | васкуларни гладкомускулни клетки |

I. ВЪВЕДЕНИЕ

В днешно време глобалното затлъстяване достигна безпрецедентни нива и представлява едно от най-мощните предизвикателства, пред които се изправя общественото ни здравеопазване през 21 век (СЗО, 2022). Разпространението на това заболяване ескалира бързо през последните 60 години, като по данни на СЗО към 2022 г. 2,5 милиарда възрастни (18 и повече години) са били с наднормено тегло, а от тях 890 милиона живеят със затлъстяване, а същевременно методите за лечение в днешно време са все още недостатъчно ефективни.

Медицинската асоциация по затлъстяване (ОМА) дефинира затлъстяването като хронично, мултифакторно, рецидивиращо и невроповеденческо заболяване, при което увеличаването на телесните мазнини води до дисфункция на мастната тъкан и редица неблагоприятни последици за човешкото тяло. Затлъстяването като един комплексен здравен проблем може да бъде повлиян от различни фактори, като генетична предразположеност, начин на живот и избор на диета (Almoraie et al., 2024). Освен това, литературните данни показват, че затлъстяването допринася пряко за развитието на различни сърдечно-съдови рискови фактори, като дислипидемия, ЗД тип 2, атеросклероза, артериална хипертония, които представляват основни компоненти на метаболитния синдром, но води също и до развитие на сърдечно-съдови заболявания и смъртност, независимо от другите сърдечно-съдови рискови фактори (Powell-Wiley TM et al., 2021). Въпреки многото проучвания, точните причини за това тревожно увеличение са все още неясни. Установено е, че от особено значение за патогенезата на свързаните със затлъстяването кардиоваскуларни заболявания са ендотелната дисфункция, инсулиновата резистентност (IR), хроничното възпаление и оксидативния стрес (ОС), което налага и по задълбоченото им изследване с цел подобряване качеството на живот на пациентите.

Оксидативният стрес е важен фактор в патогенезата на сърдечно-съдовите заболявания, тъй като води до развитието на ендотелна дисфункция, липидно окисление, съдово възпаление и образуване на атеросклеротични плаки (Lugrin et al., 2014). Друг проблем от ключово значение е и влиянието на ОС върху различни аспекти от метаболитния панел сред пациентите със затлъстяване. Прекомерното натрупване на АФК в адипоцитите при затлъстяване води до развитието на адипоцитна дисфункция или т.нар. „дисфункция на мастната тъкан“, което се характеризира с променена секреция на адипокини и промени в размера и броя на адипоцитите (Polkinghorne et al., 2023). Тази дисфункция е свързана с нарушен капацитет на подкожната мастна тъкан за съхранение на енергия и повишено ектопично отлагане на мазнини в тъкани като висцералната мастна тъкан, черен дроб и скелетна мускулатура (Tan et al., 2008). Установено е, че именно висцералната мастна тъкан е тази, която увеличава значително сърдечно-съдовия риск и води до различни метаболитни нарушения сред пациентите със затлъстяване, което налага нуждата от търсене на правилна стратегия за предотвратяване или поттискане на прогресията на

оксидативния стрес, чрез съответно лечение.

Диетичните антиоксиданти привлякоха значително внимание като ефективни средства за борба със оксидативния стрес и свързаните със затлъстяването кардиометаболитни нарушения. Различни съвременни проучвания изследват задълбочено противовъзпалителните им свойства и участието им в регулацията на енергийния метаболизъм като засилват термогенезата и повишават разхода на енергия в покой. Диетичните антиоксиданти намаляват и оксидативния стрес и подобряват инсулиновата чувствителност, които са ключови фактори за поддържане на здравословно телесно тегло (Almoraie et al., 2024).

Наднорменото тегло и натрупването на интраабдоминална висцерална мастна тъкан увеличават риска от поява на редица кардиоваскуларни увреждания, чиято фенотипна изява и прогресия на фона на този метаболитен терен е по-тежка, а промените в имунната система, повишената секреция на хормони и цитокини от мастната тъкан стимулират от своя страна хронично възпаление и проканцерогенна микросреда (Blüher et al., 2019). Ето защо ранното идентифициране на възпалителни и ендотелни биомаркери може да помогне за ранната намеса при предотвратяване на прогресията и усложненията на свързаните със затлъстяването сърдечно-съдови усложнения. Въз основа на това ние си поставихме за цел в настоящата научна разработка да изследваме връзката между затлъстяването и кардиоваскуларните увреждания, както и да оценим ефекта от прилагането на антиоксиданти във фруктозо-индуциран експериментален модел. По-задълбоченото изясняване на тази връзка може да послужи за създаване на нови терапевтични стратегии и програми за превенция и борба с това заболяване, което придобива характер на пандемия, оказваща пряко и косвено влияние върху разходите за здравеопазване и продължителността на живот на засегнатите индивиди.

II ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Цел:

Да проучим връзката между затлъстяване и кардиоваскуларни увреждания, както и да оценим ефекта от прилагането на антиоксиданти във фруктозо-индуциран експериментален модел.

Задачи:

1. Да се изследват метаболитните промени и биохимичните нарушения при ВФД.
2. Да се изследват патоморфологичните промени в кардиомиоцитите, ендотелните клетки на коронарните съдове и интерлобарните клонове на реналната артерия при ВФД.
3. Да се проучи ролята на оксидативния стрес и хроничното нискостепенно възпаление в развитието на сърдечносъдовото увреждане при ВФД.
4. Да се изследва ролята на SOD-1, NOS3, VCAM и RIP3 в развитието на сърдечносъдовото увреждане при ВФД.
5. Да се направи оценка на корелационната зависимост между някои биомаркери на оксидативен стрес, метаболитни нарушения, хронично нискостепенно възпаление и патоморфологичните промени в кардиомиоцитите, ендотелните клетки на коронарните съдове и интерлобарните клонове на реналната артерия при ВФД.
6. Да се проучи кардиопротективния и съдовопротективния ефект на S-АМе.

III МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Основни процедури по *in vivo* експеримента

1.1. Експериментални животни

За осъществяване на нашия експериментален модел на затлъстяване бяха използвани 18 лабораторни мъжки бели плъхове линия *Wistar* с тегло 120 – 160 г. Опитните животни бяха предоставени и отгледани от централния вивариум на Медицински университет – Варна при стандартни лабораторни условия: 12:12 часа тъмно-светъл цикъл влажност 50-60%, температура $22 \pm 2^\circ\text{C}$ с достъп до храна и вода *ad libitum*.

Процедурите по осъществяването на експеримента и третирането на лабораторните животни се проведе при спазване на изискванията от Комисията по етично отношение към опитните животни на Българската агенция по безопасност на храните (БАБХ) с разрешително номер 272/20.07.2020 и на националните нормативни уредби за работа с експериментални животни и Директивата на Европейския парламент за защита на животните, използвани за научни и експериментални цели (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes).

Храната, приемана през периода на изследването, е стандартна, приготвена по рецепта на производителя (ХЛ-Топ Микс ООД) със следния състав: суров протеин -20.08%; сурови мазнини – 2.15%; сурови влакнини – 5.99%; сурова пепел – 5.26%; калций – 0.72%; фосфор – 0.59%; усвоим фосфор – 0.15%; натрий – 0.13%; лизин – 0.91%; метионин – 0.35%. Съставът на хранителните добавки включва: витамини, провитамини и вещества с подобен ефект: витамин А – 4.50 хил. IU/kg; витамин D – 1350.00 IU/kg; витамин Е – 13.50 IU/kg; смеси на елементи с микроконцентрация: желязо – 176.89 mg/kg; манган – 91.87 mg/kg; цинк – 94.68 mg/kg; мед – 22.87 mg/kg; йод – 0.92 mg/kg; селен – 0.47 mg/kg.

1.2. Използвани хранителни добавки и други субстанции

- *S*-аденозинметионин (*SAM*)

За период от 12 седмици на определените за третиране експериментални животни се прилага *S*-аденозинметионин (*SAM*) в течна форма, като приема на тази субстанция се осъществява *per os*.

- Глюкозо-фруктозен сироп

За предизвикване на експериментален модел на затлъстяване, на определените за третиране експериментални групи седмици се приложи свободен достъп до 20% разтвор на глюкозо-фруктозен сироп за период от 12 седмици. Този разтвор беше получен от 52%-на

фруктоза, произведена от царевичен сироп. Високофруктозния царевичен сироп е сертифициран за използване като подсладител и консервант в хранително-вкусовата промишленост, производство на завод „АМИЛУМ“ – град Разград (ISOGLUCOSE 031).

По литературни данни беше определена и ефективната доза за изпълняване на нашия експериментален модел (Meyers et al., 2017).

1.3 Дизайн на експеримента

Експерименталните животни бяха разпределени в 3 групи (n=6) в зависимост от използваните субстанции и режим на хранене:

- *Първа група* – контролна (К) – плъхове, подложени на стандартен режим с храна и вода;
- *Втора група* – група с модел на затлъстяване (ФРУ) – плъхове, подложени на високофруктозна диета
- *Трета група* – група с модел на затлъстяване (ФРУ+SAM) – плъхове, подложени на високофруктозна диета и третирани с *S-аденозинметионин*, приеман с водата в съотношение 1g/kg телесно тегло.

Експерименталните животни бяха подложени на аклиматизация за период от две седмици преди въвеждането на *S-аденозинметионин (SAM)* и *глюкозо-фруктозен сироп*. През това време определяхме телесното тегло на всеки плъх и го нанасяхме в протоколна тетрадка.

След периода на аклиматизация експерименталните животни се оставят на стандартна диета *ad libitum* през цялото денонощие. Всеки ден се осъществяваше контрол върху приема на храна, вода, воден разтвор на глюкоза и *S-аденозинметионин (SAM)* и наблюдаване на здравословното състояние на експерименталните животни. След периода на аклиматизация, във втора и трета група извършихме 12-седмично натоварване с 20% фруктозен сироп, време, което бе необходимо за развитието на нашия експериментален модел на затлъстяване (Bratоеva et al., 2013; Wali et al., 2023). За същия период от време извършихме и суплементация на експерименталните животни от трета група със *S-аденозинметионин*. За определяне на промените в биохимичните показатели на животни беше използвана венозна кръв от югуларната вена на плъховете след предварителна наркоза с *Ketamine* в доза 15-25 mg/kg i.m. (*Anaket, solution pro injectionibus, Richter Pharma AG, Austria*). Под обща анестезия с *Ketamine* се определиха зоометричните показатели, ИТМ и индекса на Lee на всяко експериментално животно.

След изтичане на експерименталния период, животните бяха евтаназирани чрез прилагане на летална доза *Ketamine* 148 mg/kg (Rebuelto et al., 2002), след което по метода на Коптяева и съавт. (2018) беше извършена аутопсия с евисцерация, макроскопско оценяване на вътрешните органи и съдовете от еластичен и мускуло-еластичен тип (*aa. coronariae, интерлобарни клонове aa. renales*) с последваща подготовка на тези тъкани за морфологичен, морфометричен и имунохистохимичен анализ. Поради това, некропсичния

материал се поставя веднага във фризера на -70°C , а другата част се фиксира в 10% неутрален буфериран формалин.

2. Използвани аналитични методи

2.1 Зоометрични изследвания

- *Телесна маса* – телесното тегло на опитните животни в периода на аклиматизация и по време на експеримента беше регистрирано веднъж седмично с дигитална везна, при което стойностите бяха отразени в протоколна тетрадка.
- *Тегло на вътрешните органи (панкреас, черен дроб, сърце, бъбреци и РПМТ)* – Теглото на вътрешните органи беше регистрирано веднъж след аутопсиране с помощта на дигитална везна, при което стойностите бяха отразени в протоколна тетрадка.
- *Обиколка на корема* - Обиколката бе установена чрез измерване в см през най-широката част на корема при поставяне на животното в положение по гръб.
- *Обиколка на гръдния кош* – Обиколката бе установена чрез измерване в см през най-широката част на гръдния кош при поставяне на животното в положение по гръб.
- *Дължина (назо-анално разстояние)* – Посредством милиметрова линия беше измерено разстоянието от носа до аналния отвор.
- *Индекс на Lee* – Промените в телесното тегло и оценката на степента на затлъстяването по време на експеримента беше оценено чрез индекса на Lee (антропометричен метод), който се изчислява като кубичен корен от телесното тегло(g)/назо-анално разстояние (cm)
- *ТуG индекс* – Изчислява се като $\text{Ln} [(\text{триглицериди на гладно (mmol/L)} \times 88.57) \times (\text{глюкоза на гладно (mmol/L)} \times 18) / 2]$

2.2 Биохимични и клинично-лабораторни методи

- **Определяне нивата на урея, креатинин, пикочна киселина, глюкоза, общ белтък, албумин, чернодробни ензими, общ холестерол, ТГ, VLDL и HDL**

Определянето на нивата на урея, креатинин, пикочна киселина, глюкоза, общ белтък, албумин, чернодробни ензими (гама-GT, АСАТ, АЛАТ), и липиден профил - ТГ, общ холестерол, VLDL и HDL в серума са извършени при спазване на стандартна процедура с автоматичен анализатор OLIMPUS; AU 640.

- **Определяне на нивата на електролитите в серума (калий, натрий, хлориди, калций, фосфор и магнезий)** – са извършени при спазване на стандартна процедура с автоматичен анализатор OLIMPUS; AU 640

2.3 Имунологични методи

- ***Определяне на нивата на TNF- α в серума***

Серумните нива на TNF- α от всички експериментални животни се определят чрез метода на Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), използвайки готов кит Rat TNF- α , Diaclone SAS, Gen-Probe с 96-ямкова плака за ELISA четец. Спазвайки протокола за употреба на фирмата производител беше извършено количествено измерване на стойностите на TNF- α .

- ***Определяне на на C-реактивен протеин (CRP) в серума***

Серумните нива на CRP от всички експериментални животни се определят чрез имунотурбометричен метод при спазване на стандартна процедура с автоматичен анализатор OLIMPUS; AU 640.

- ***Определяне на витамин D3 (25-OH) в серума***

Серумните нива на витамин D3 се определят чрез хемилуминесценция с автоматичен анализатор Alinity.

2.4. Морфологични методи

- ***Макроскопско изследване***

Сърцето, бъбрека и РПМТ на всяко едно експериментално животно се отпрепарират по метода на Коптяева et al., след което се оглеждат за налични макроскопски изменения и се претеглят посредством дигитална везна. След извършване на макроскопската оценка, материала се фиксира в неутрален 10% формалин за последващи хистологични изследвания, морфометричен и имунохистохимичен анализ.

- ***Хистологични методи***

- ***Обработка на материала***

Сърцето на всяко едно експериментално животно се отпрепарира по метода на Коптяева et al., след което се правят по три трансверзални среза на лява камера (с дебелина 4 μm) – на ниво апекс, на ниво средна част и близо до аортната клапа. След отпрепарирание на бъбрека, се направиха три трансверзални среза на бъбречния паренхим с интерлобарни клонове на реналната артерия. След фиксиране в 10% неутрален буфериран формалин, препаратите се обработиха в парафин с точка на топене 52-54°C и се изготвиха парафинови блокчета. Изработените срезове са стандартно оцветени с хематоксилин-еозин за морфологична и морфометрична оценка на хистологичните промени в сърдечната мускулатура и интерлобарните клонове на реналната артерия.

- **Морфометричен анализ на лява камера и интерлобарни клонове на ренална артерия**

За извършването на морфометричен анализ на лява камера се измерва дебелината (в μm) на три различни места – на ниво апекс, на ниво средна част и на ниво близо до аортната клапа, поради което от всяко експериментално животно бяха направени и изследвани три отделни среза от лява камера при увеличение $\times 40$. За извършването на морфометричния анализ на интерлобарните клонове на реналната артерия се измерва вътрешния диаметър (μm), външния диаметър (μm), както и съотношението дебелина на $t.\text{media}$ /вътрешен диаметър (μm). По време на изследването се правят поне три измервания от всеки срез, като стойностите се нанасят в работната тетрадка и се обработват статистически. Морфометричния анализ и направените дигитални снимки на сканираните хистологични препарати са изработени с помощта на Aperio Image Scope V12.4.6.5003.

- **Имунохистохимични методи**

За целите на нашия имунохистохимичен анализ бе използван имунопероксидазен метод за приготвяне на препарата (EnVision™FLEX, High-hat, DAKO, с каталожен номер). Процедурата на имунохистохимичното оцветяване включи използването на пероксидазен блокиращ реагент, вторично антитяло, конюгирано с ензим (HRP) и хромогенен субстрат диаминобензидин (DAB) и хематоксилин за контраоцветяване.

Установяването на експресията на SOD-1, NOS3, RIP3 и VCAM се извърши с помощта на следните поликлонални и моноклонални антители:

- SOD-1 антитяло, BioVision Inc., USA с каталожен номер 3458-100, Lot #70658, поликлонално заешко антитяло с разреждане 1:200
- NOS3 антитяло, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Germany с каталожен номер sc-376751, Lot #70658, моноклонално мише антитяло в разреждане 1:300
- RIP3 антитяло, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Germany с каталожен номер sc-374639, Lot #D1521, в разреждане 1:400
- VCAM антитяло, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Germany с каталожен номер sc-13160, Lot #A2721, в разреждане 1:400

Спесимените, които бяха използвани за имунохистохимичното изследване са различни срезове от сърдечната мускулатура и фрагменти от коронарни и ренални съдове. Така оформения материал се фиксира чрез имерсия за 48 часа при стайна температура в неутрален буфериран 10% формалин и след дехидратация с възходяща концентрация се включва в парафин.

От сърдечната мускулатура и реналния паренхим се изготвят парафинови срезове с дебелина 4 μm , които се поставят върху силанизирани предметни стъкла (Thermo Fischer

Scientific) и изсушават за едно денонощие при температура 37 °C. След изсушаване срезове се депарафинират на стайна температура в две смени ксилол за по 10 мин. и след това се рехидратират в низходящата алкохолна редица: етанол 100% за 5 минути → етанол 90% за 5 минути → етанол 80% за 5 минути → етанол 70% за 5 минути. Накрая срезове се измиват на течаща вода и се поставят в dH₂O.

Имунохистохимичен протокол за определяне на експресията на SOD-1, NOS3, RIP3 и VCAM

- Депарафиниране до dH₂O
- Антигенно възстановяване в antigen retrieval solution (DAKO) – high ph (ph-9,0) на 97°C за 20 min и после се охлажда до 65 °C в ptLink (DAKO)
- Промиване с измиващ буфер (TBS)
- Инкубация с първичното антитяло в съответното разреждане на стайна температура
- Промиване с измиващ буфер (TBS)
- Инкубация с маркиран полимер HRP (goat anti-mouse, anti-rabbit) за 30 мин. на стайна температура (1:100)
- Промиване с измиващ буфер (TBS)
- Инкубация на срезите с хромоген (в разреждане 1:20 спрямо DAB) за 2x5мин. при непрекъснато микроскопиране
- Изплакване с dH₂O
- Контраоцветяване с хематоксилин
- Изплакване на пробите с dH₂O вода
- Дехидратиране във възходяща алкохолна редица 70% етанол за 5мин. → етанол 80% за 5мин. → етанол 90% за 5мин. → етанол 100% за 5мин. Подготовка на срезите за включване
- Включване в среда чрез използване на покривно стъкло (Thermo Fischer Scientific)

С помощта на апарат Leica Aperio Scan Scope AT2 device се извърши сканиране с последващ анализ на образите посредством софтуер Aperio Image Scope V12.4.6.5003.

Интензивността на имунната реакция в кардиомиоцитите, коронарните и реналните ендотелни клетки се определя чрез индекс на наситеност. В зависимост от количеството на отложения имуноген преципитат в отделните клетките, те се разпределят в четири категории (Detre et al.,1995):

1. Липсва преципитат – коефициент 0;
2. Слаба по интензивност имунна реакция – коефициент 1;
3. Умерена по интензивност имунна реакция – коефициент 2;
4. Силна по интензивност имунна реакция – коефициент 3.

Изследването се извършва върху определен брой клетки (кардиомиоцити, коронарни и ренални ендотелни клетки). Средната интензивност на имунната реакция се определя, като

броят на клетките от всяка категория се умножи по съответния коефициент 0,1,2 или 3 и получената сума се разделя на общия брой клетки.

3. СТАТИСТИЧЕСКА ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ В ПРОУЧВАНЕТО

За реализирането на целите и стоящите пред нашето изследване задачи бяха използвани следните методи:

• ДЕСКРИПТИВНИ МЕТОДИ

Дескриптивен анализ бе използван за описване на основните характеристики на извадката и на показателите, които бяха включени в изследването. За основа на анализа бяха използвани измерители на централните тенденции като средна аритметична стойност и непараметрични тестове като кростабулация и хи-квадрат при търсене на зависимости при категорийни стойности. Статистическа значимост при непараметричните тестове беше приемана при $p \leq 0.05$.

• АНАЛИТИЧНИ МЕТОДИ

1. Т –test бе използван за сравняване на средните величини на две групи при проследяване на ефекта на медикаментите върху третираните и здравите плъхове. Статистически значими бяха разликите между групите, при $p \leq 0.05$.
2. Вариационен анализ (ANOVA) бе използван за сравняване на разликите в лечението на трите експериментални групи с третираните плъхове. Разликите бяха приемани за достоверни при приетата за биологични експерименти стойност $p < 0.05$.
3. Корелационен анализ бе използван за изследване на зависимостите между показателите и установяване на силата на тяхното влияние върху уврежданията. Оценката на силата на зависимостта между променливите се базира на резултатите от коефициента на Пирсън (r). Степента на асоциация между променливите бе определяна като значителна при $r > 0.5 < r = 0.7$; голяма при $0.7 < r = 0.9$ и изключително голяма при $r > 0.9$ при $p \leq 0.05$.

Статистическата обработка на данните се извърши с компютърна програма SPSS v21. Графиките са построени с графична програма Graph Pad Prism 5.0.

IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Проучване на метаболитните нарушения при високо-фруктозна диета (ВФД) и прием на S- аденозил-метионин (SAM)

1.1. Промени в зоометричните показатели, телесното тегло и теглото на РПМТ

1.1.1 Резултати

- *Резултати, получени след измерване на телесната маса*

Телесното тегло на експерименталните животни от всички групи бе регистрирано ежеседмично и в продължение на 3 месеца. Наблюдението върху промените в телесното тегло установи равномерно покачване на стойностите на телесната маса и в трите групи до края на експеримента. На таблица 1 са отразени изходната телесна маса на експерименталните животни, както и промените, които се регистрират в 5-та седмица, 9-та седмица и в края на експеримента.

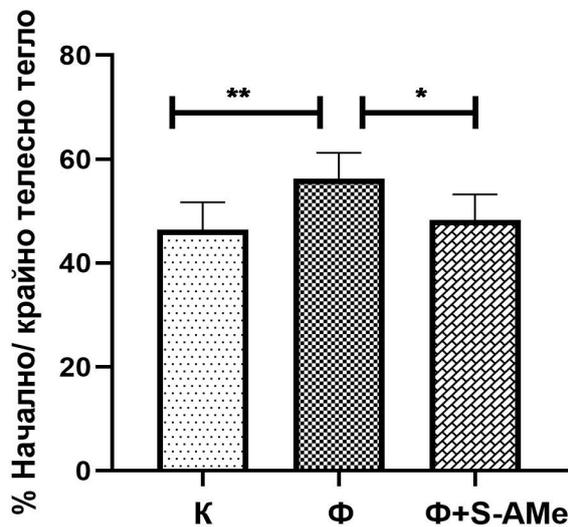
Таблица 1. Промени в телесната маса по периоди.

| Период на измерване на телесната маса | К | Ф | Ф+S-АМе |
|---------------------------------------|-------------|-------------|------------|
| Начално телесно тегло | 141,5 ± 6.8 | 136.8± 4.3 | 126.2± 3,8 |
| 5-та седмица | 177.0± 9.8 | 181.3±9,8 * | 151.8± 4.2 |
| 9-та седмица | 231.2±14.5 | 231.0±12.4* | 202.2±2.9 |
| Крайно телесно тегло/12-та седмица | 265.5±12.89 | 268.8±16.0* | 245.0±6.8 |

Легенда: Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), (N=6). К-контролна група; Ф- група на ВФД; Ф+S-АМе- група на ВФД и прием на S-аденозилметионин; . * $p < 0,05$ – статистическа значимост между Фру група и Фру+S-Аме

След края на експеримента плъховете от фруктозната група демонстрираха статистически значимо покачване на телесното тегло в сравнение с контролната група: в 5-та, 9-та и 12-та

седмица - $*p < 0,05$, докато при плъховете от групата третирана с Фру и S-аденозинметионин бе регистрирано статистически значим спад в покачването на телесното тегло спрямо фруктозната група.



Фиг.2. Промени в наддаването на телесното тегло между изследваните групи, измерено като процент от началното и крайното телесно тегло на животните в групата.

Легенда: Данните за представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($n=6$). К- контролна група; Ф-група на ВФД; Ф+S-AMe- група на ВФД и суплементирана с S-аденозилметионин; $*p < 0,05$, $**p < 0,001$, t-test.

На фигура 2 сравнихме резултатите от наддаването на телесното тегло в различните експериментални групи като процент от началното и крайното телесно тегло. Суплементирането на експерименталните животни със S-AMe доведе до статистическо значима редукция на телесното тегло спрямо плъховете от фруктозната група - $*p < 0,05$. Въпреки това в групата на ВФД бе установено статистически по - значимо покачване на телесното тегло спрямо контролната група - $**p < 0,001$ (фиг 2).

- **Резултати, получени от измерването на дължина (назо-анално разстояние), коремна обиколка и обиколка на гръдния кош**

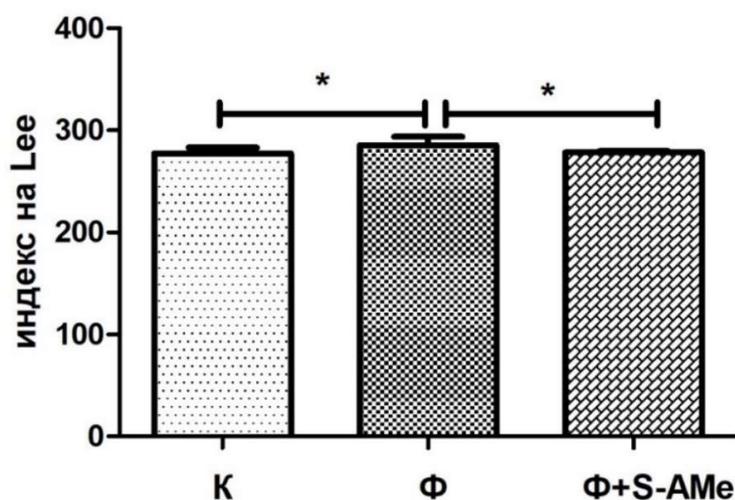
След измерване на назо-аналното разстояние (НА), коремната обиколка (КО) и гръдната обиколка (ГО) установихме статистически незначимо покачване на стойностите им в контролната и фруктозната група. Прилагането на екзогенен S-AMe при животните на ВФД демонстрира лека редукция на зоометричните показатели спрямо фруктозната група (табл. 2).

Таблица 2. Промени в зоометричните показатели на плъховете според експерименталната група.

| Зоометричен показател | К | Ф | Ф+S-АМе |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------|
| НА | 23.08 ± 0.66 | 22.42 ± 0.31 | 22.75 ± 0.34 |
| КО | 16.45 ± 0.63 | 17.08 ± 0.48 | 16.57 ± 0.36 |
| ГО | 15.00 ± 0.5 | 15.50 ± 0.4 | 14.77 ± 0.35 |

Легенда: Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), (N=6). К-контролна група; Ф- група на ВФД; Ф+ S-АМе - група на ВФД и прием на S-Аденозилметионин; НА - назо-анално разстояние; КО - коремна обиколка; ГО – гръдна обиколка .

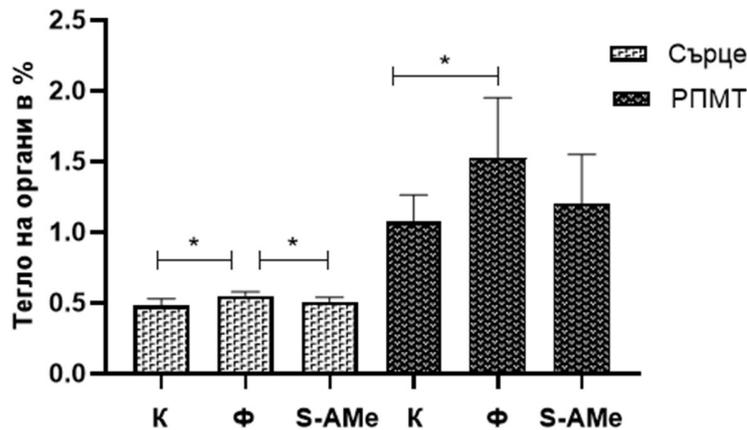
• **Резултати, получени от изчисляването на индекса на Lee**



Фиг.3 Разлики в индекса на Lee между животните в експерименталните групи. Легенда: Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), (N=6). К-контролна група; Ф- група на ВФД; Ф+ S-АМе - група на ВФД и прием на S-Аденозилметионин; * $p < 0,05$, t-test

Резултатите от нашето изследване показват тенденция към статистически значимо покачване на стойностите на индекса на Lee при животните от фруктозната група спрямо контролата - * $p < 0,05$. При плъховете на ВФД и суплементация със S-АМе се наблюдава понижаване на стойностите на индекса на Lee спрямо фруктозната групата, което е със статистическа значимост - * $p < 0,05$. След суплементация със S-АМе, стойностите на индекса на Lee се доближават до тези при контролната група (фиг.3).

- **Резултати, получени от измерване на теглото на висцерална мастна тъкан и сърце**



Фиг. 4. Тегло на ретроперитонеална мастна тъкан и сърце, изразено като % от общото телесно тегло на плъховете. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (N=6).

Легенда: K-контролна група; Ф- група на ВФД; Ф+S-AMe- група на ВФД и прием на S-аденозилметионин; * $p < 0,05$

Резултатите от анализа на покачването на теглото на висцералната мастна тъкан, измерено като процент от общото телесно тегло на експерименталните животни, демонстрират статистическа значима разлика между плъховете от фруктозната група и контролата - $*p < 0,05$; животните от Фру група демонстрират покачване на теглото на РПМТ спрямо контролата. Суплементацията с екзогенен S-AMe доведе до статистически незначима редукция на висцералната мастна тъкан спрямо експериментални животни на ВФД. При анализирането на теглото на сърцето установихме статистически значимо покачване на теглото на сърцето при фруктозната група спрямо контролата - $*p < 0,05$, докато суплементацията със SAM доведе до статистически значим спад в теглото на сърцето спрямо фруктозната група (фиг.4).

1.1.2 Обсъждане

За осъществяването на нашия експеримент подложихме лабораторни мъжки бели плъхове линия *Wistar* на ВФД. Установихме, че въпреки липсата на разлики между общия калориен прием сред експерименталните животни, в края на експеримента при плъховете, хранени с фруктоза се наблюдават промени в зоометричните показатели и покачване на телесното тегло спрямо контролните животни (табл.1). Важно е да отбележим, че прекомерният прием на фруктоза в съвременната диета представлява един от основните етиологични фактори в развитието на метаболитни нарушения, тъй като нейният прием се свързва с развитието на висцерално затлъстяване и свързаните с него кардиометаболитни

нарушения. Различни патогенетични механизми разясняват причините за развитието на фруктозо-индуцирано висцерално затлъстяване. Високата консумация на фруктоза засяга централната нервна система и въздейства върху центровете на глада и ситостта. Гризачите на ВФД демонстрират и по-високи нива на грелин и по-ниски нива на лептин, за разлика от животните на стандартна диета (Lindqvist et al., 2008), което води до хиперфагия, повишен енергиен прием и натрупване на триглицериди в адипоцитите с покачване на телесното тегло. Това се демонстрира и в нашия експериментален модел на фруктозно-индуцирано затлъстяване, в който се наблюдава статистически значимо увеличаване на РПМТ спрямо контролната група, което е особено характерно за висцералния тип затлъстяване (фиг.4). Тези резултати съответстват и с твърдението на Tan и съавт., според които триглицеридите започват да се отлагат ектопично в различни органи, като БМТ, черен дроб и скелетна мускулатура, след като капацитетът за съхранение на адипоцитите бъде надвишен (Tan et al., 2008). Доказано е също, че фруктозо-индуцираната адипогенеза се медира от повишените нива 11 β -хидроксистероид дехидрогеназа тип 1 (11 β -HSD1) в БМТ, която увеличава производството на глюкокортикоиди и оттам натрупването на мазнини в ретроперитонеалното пространство (London E. et al, 2011). От друга страна, суплементацията със S-АМе води до значително намаляване на теглото на РПМТ, което се доближава до това в контролната група.

Освен теглото на РПМТ, от значение са и получените резултати от измерването на зоометричните показатели (коремната обиколка (КО) и гръдна обиколка (ГО)) на плъховете в нашия експеримент. Беше установено статистически незначимо покачване на КО на ГО във фруктозната група спрямо контролната група и групите, суплементирани със SAM (табл.2). Тези резултати подкрепят твърдението на някои автори (Esfandiari et a., 2007), че прилагането на екзогенен SAM потиска липидогенезата и води до намаляване на КО и ГО, и намаляване на телесното тегло. Друг възможен механизъм, който свързва суплементацията със SAM с намаляване на телесното тегло и зоометричните показатели е инхибиране на лептиновата секреция, което води до намален прием на храна и стимулиране на чувството за ситост (Lu SC et al., 2012). Противоположно на нашите резултати, други автори (Martínez-Uña и съавт., 2013 и Elshorbagy AK и съавт., 2013), демонстрират, че високите серумни нива на SAM водят до висцерално затлъстяване и развитие на чернодробна стеатоза.

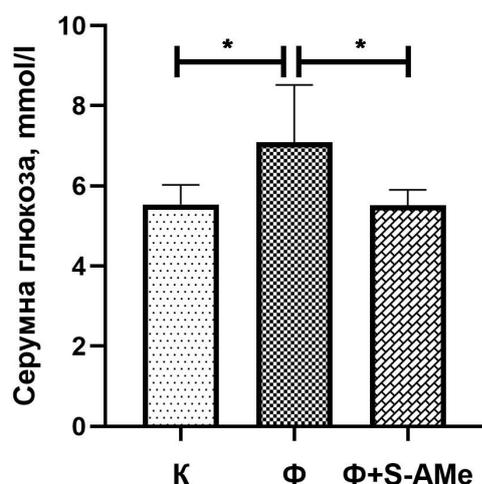
Преди няколко десетилетия Lee (1929) разработва индекс, чрез който класифицира затлъстяването при плъхове с подобен ИТМ, който впоследствие се използва за същите цели и при хора. Индексът на Lee корелира положително с теглото и процента телесни мазнини на експерименталните животни, подложени на фруктозно-индуцирано затлъстяване и по този начин представлява един надежден предиктор за наличието на затлъстяване при гризачи (MOLZ et al., 2017). Нашите резултати демонстрират увеличаване на индекса на Lee при фруктозната група, което е със статистическа значимост (фиг.19). Това подкрепя твърдението на някои автори, че стойности близки до и по-големи от 300, са широко приети като индикатор за наличието на затлъстяване при плъхове (Simson et al., 1982). От друга страна, при плъховете на ВФД и суплементация с антиоксиданта S-АМе се

наблюдава загуба на телесно тегло и намаляване на индекса на Lee до стойности близки до тези при контролната група, което потвърждава твърдението на Esfandiari и съвт. (2007), че S-АМе е ефективен за потискане на липидогенезата, намаляване на процента общи телесни мазнини и ВМТ. Други механизми, които обясняват анти-обезогенната активност на S-АМе са елиминиране на АФК, поттискане на липидната пероксидация (понижени нива на MDA) и повишаване на ендогенните антиоксиданти (Cavallaro et al., 2010).

Установено е, че висцералното затлъстяване представлява важен рисков фактор за сърдечно-съдов риск, тъй като води до съдово възпаление, ЕД, съдово ремоделиране и оксидативен стрес. Затова след приключване на нашия експеримент можем да заключим, че прилагането на антиоксиданта S-АМе значително намалява развитието на различните кардиометаболитни нарушения чрез намаляване на телесното тегло, теглото на РПМТ и стойностите на антропометричните показатели.

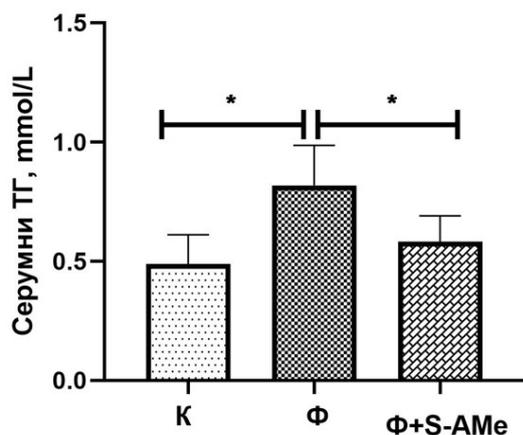
1.2. Вариации в липидния и въглехидратния метаболизъм

1.2.1 Резултати, получени от определянето на серумната глюкоза, серумните липиди и TuG индекс



Фиг. 5. Промени в серумните нива на глюкоза в експерименталните групи. Легенда: Данните за представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (n=6). К- контролна група; Ф-група на ВФД; Ф+S-АМе- група на ВФД и суплементирана с S-аденозилметионин; * $p < 0,05$, t-test.

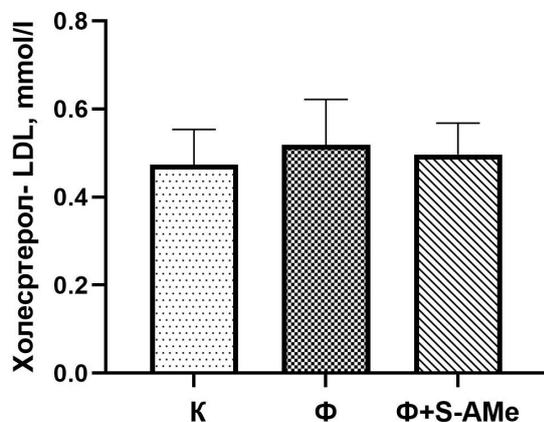
Анализирането на резултатите от биохимичното изследване на серумната глюкоза установяват статистически значими по-високи стойности във фруктозната група спрямо контролата - * $p < 0,05$. Наблюдава се и статистически значима разлика между фруктозната група и групата на ВФД и суплементация със S-АМе - * $p < 0,05$ (фиг.5).



Фиг. 6. Промени в серумните нива на ТГ в експерименталните групи.

Легенда: Данните за представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (n=6). К- контролна група; Ф-група на ВФД; Ф+S-AMe- група на ВФД и суплементирана с S-аденозилметионин; * $p < 0,05$, t-test.

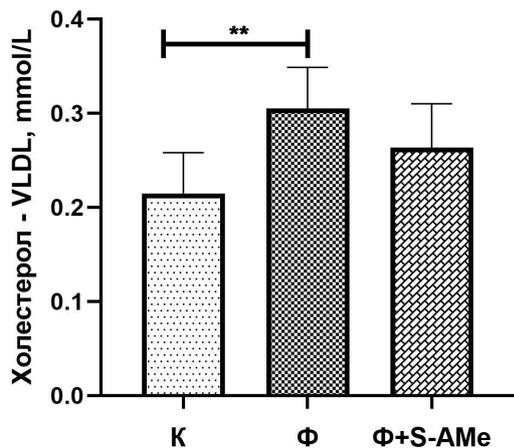
На фигура 6 наблюдаваме статистически значими по-високи стойности на серумните триглицериди (ТГ) във фруктозната група спрямо контролата - * $p < 0,05$. Прилагането на S-AMe в групата на ВФД редуцира нивата на серумните ТГ и доближава нивата им до тези на контролата, което е със статистическа значимост * $p < 0,05$.



Фиг. 7. Промени в серумните нива на LDL в експерименталните групи.

Легенда: Данните за представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (n=6). К- контролна група; Ф-група на ВФД; Ф+S-AMe- група на ВФД и суплементирана с S-аденозилметионин

Резултатите от биохимичното изследване показват тенденция към покачване на нивата на серумния LDL във фруктозната група спрямо контролната (без статистическа значимост). При експерименталните животни на ВФД и суплементация със S-AMe се наблюдава леко понижаване на нивата на LDL и доближаването им до тези на контролната група (без статистическа значимост) (фиг.7).



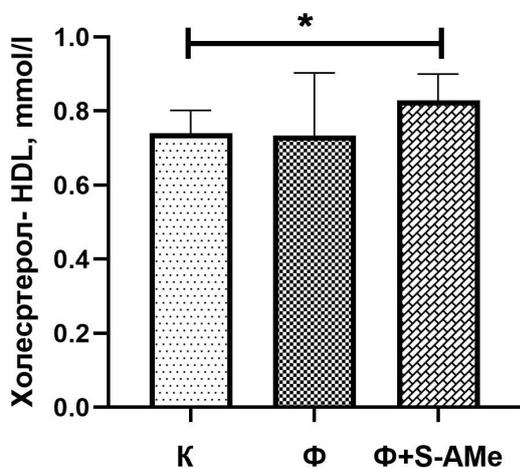
Фиг. 8. Промени в серумните нива на **VLDL** в експерименталните групи.

Легенда: Данните за представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (n=6).

К- контролна група; Ф-група на ВФД; Ф+S-АМе- група на ВФД и суплементирана с S-аденозилметионин;

** - $p < 0,01$, t-test

Резултатите ни показват статистически значими по-високи нива на VLDL във фруктозната група спрямо контролата - $**p < 0,01$. За разлика от това в групата на ВФД и суплементация със S-АМе се наблюдава спад в нивата на VLDL спрямо плъховете от фруктозната група (фиг.8).



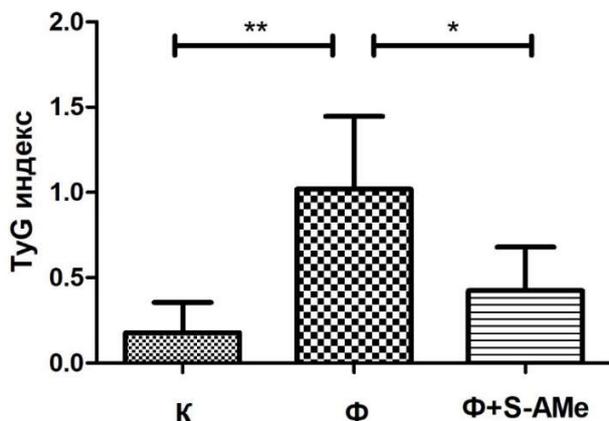
Фиг. 9. Промени в серумните нива на **HDL** в експерименталните групи.

Легенда: Данните за представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (n=6).

К- контролна група; Ф-група на ВФД; Ф+S-АМе- група на ВФД и суплементирана с S-аденозилметионин; *

$p < 0,05$, t-test

Нивата на HDL бяха значително повишени в групата, суплементирана със S-АМе спрямо контролата (със статистическа значимост $*p < 0,05$). В контролната и фруктозната група не бяха установени статистически значими различия в стойностите на HDL (фиг.9).



Фиг.10. Промени в **TuG индекс** в експерименталните групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (n=6).

К- контролна група; Ф-група на ВФД; Ф+S-AMe- група на ВФД и суплементирана с S-аденозилметионин; *- $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ t-test

Стойностите на TuG индекс (съотношението триглецириди/глюкоза) бяха значително повишени в групата на ВФД спрямо контролата (със статистическа значимост $**p < 0,01$). В групата суплементирана със S-AMe се наблюдаваха статистически значимо по-ниски стойности на TuG индекс спрямо фруктозната група, $*p < 0,05$ (фиг.10).

1.2.2 Обсъждане

Механизми на фруктозо-индуцирана хиперлипидемия

Различни проучвания потвърждават връзката между прекомерния прием на фруктоза и развитието на някои заболявания като метаболитен синдром, дислипидемия, асоциираната с метаболитна дисфункция стеатозна чернодробна болест (MASLD) и затлъстяване (Hieronimus et al., 2020; Regnault et al., 2013 и др.). Високият прием на подсладени с HFCS храни и напитки допринася значително и за ескалиращото разпространение на свързаните със затлъстяването метаболитни нарушения като хипергликемия и 3Д тип 2 (Wang M. et al, 2015; Malik V. S. et al, 2010).

Тези промени се наблюдават и сред нашите експериментални животни. В края на проучването установихме по-високи стойности на TG, VLDL и LDL при фруктозната група спрямо контролната, като увеличаването на TG и VLDL беше със статистическа значимост, а при LDL се наблюдаваше само тенденция за увеличаване. От друга страна, суплементацията със SAM действа благоприятно върху липидния метаболизъм чрез статистически значимо редуциране на стойностите на TG, което се доближава до резултатите при контролната група и понижаване на нивата на VLDL и LDL (фиг.6, фиг.7, фиг.8). Наблюдава се леко понижаване на серумните нива на HDL във Фру група спрямо контролната, докато при суплементираните животни се демонстрира статистически значимо по-високи стойности на HDL спрямо контролната група (фиг.9, фиг.11).



Фиг.11. Промени в липидните показатели и серумна глюкоза след фруктозно натоварване и прием на SAM.

Легенда: К – контрола; Фру – група на ВФД; Фру+SAM – група на ВФД и суплементация със SAM; TG – триглицериди; VLDL – липопротеини с много ниска плътност; LDL – липопротеини с ниска плътност; HDL – липопротеини с висока плътност; GLU – глюкоза

Нашите резултати потвърждават предположението и на други автори (Girard et al., 2006) за патогенетичната връзка между фруктозата и развитието на хипертриглицеридемия и хиперхолестеролемия. Различни механизми обясняват тази връзка, като повишена de novo липогенеза, увеличено производство и нарушен катаболизъм на VLDL и намаляване на TG клирънс вследствие на намалена активност на липопротеин липазата (Girard et al., 2006). Друг възможен механизъм е фруктозо-индуцирано нарушение в β -окислението, което се дължи на повишена de novo липогенеза с последващо натрупване на малонил-Коа, действащ като алостеричен инхибитор на CPT1 α , което нарушава транслокацията на МК към митохондриите и ги пренасочва към синтез на TG, LDL и VLDL. Според Aeberli и съавт. фруктозата повишава малките плътни LDL, за които е установено, че увеличават риска от развитието на атеросклероза (Aeberli I., et al., 2011). Други автори твърдят, че консумацията на HFCS, включен в еукалорична диета за 10 седмици не влияе отрицателно върху липидния профил при индивиди с наднормено тегло или затлъстяване (Lowndes J., et al., 2014). Въз основа на настоящите познания, изглежда, че приема на умерени количества фруктоза (<50g/ден) само по себе си не води до неблагоприятен липиден профил

(Sievenpiper J. L., et al., 2014).

Фруктозата, според Chong и съавт. се инкорпорира с много бърза скорост както в глицерола, така и в СМК, които представляват основни компоненти на триглицеридите (Chong et al., 2007) и по този начин се явява като двигател в прогресията на хипертриглицеридемията, повишените нива на VLDL, de novo липогенезата, а по-късно и в развитието на NAFLD. Установено е и, че фруктозата стимулира стерол-регулаторен свързващ протеин 1 (SREBP-1c) и въглехидратно регулирания свързващ протеин (ChREBP), като и двата са ключови транскрипционни регулатори на чернодробната de novo липогенеза (Hannou S.A. et al., 2018). В допълнение към ролята на ChREBP в индуцираната от фруктоза дислипидемия, Erion et al. установяват, че „нокаутването“ на ChREBP повишава периферната инсулинова чувствителност при плъхове на ВФД (Erion DM. et al., 2013) (фиг.13).

Точните механизми, чрез които SAM намалява серумните липидни нива, са все още неизяснени. Според проучване на Vergani, L. и съавт. върху плъши стеатозни хепатални клетъчни култури (steatotic FaO rat hepatoma cell lines) се наблюдава неколккратно увеличаване на експресията на СТР1 mRNA след прием на SAM, което насърчава митохондриалния приток на МК и стимулира бета-окислението (Vergani, L. et al., 2020). Освен това, суплементацията със SAM води до поттискане на активността на каталазата, основен ензим в патогенезата на ОС, който стимулира продукцията на АФК и липидната пероксидация (Vergani, L. et al., 2020). Антиоксидантната активност на SAM пряко намалява сърдечносъдовия риск чрез протективното си действие срещу дисфункционалната мастна тъкан, която се характеризира с високи циркулиращи нива на С-реактивен протеин, TNF- α , MCP-1, IL-6, прокоагуланти, АФК и др., които индуцират хронично неспецифично възпаление, ендотелна дисфункция, оксидативен стрес и инсулинова резистентност.

Традиционните диагностични критерии за метаболитен синдром изискват панел от лабораторни изследвания и клинични оценки, което често ограничава широкото им приложение в скринингови програми (Grundy S.M et al., 2005), а ранното откриване на метаболитния синдром е от решаващо значение за прилагането на мерки срещу последващи затлъстяване-свързани кардиометаболитни нарушения и увреждания на сърдечно-съдовата система. Поради това съвременната клинична практика показва засилен интерес към някои определени антропометаболитни индекси, които обединяват антропометрични измервания (като телесно тегло, ръст и обиколка на талията) с основни метаболитни параметри (като серумна глюкоза и триглицериди) за идентифициране на риска от метаболитен синдром (Liu XC et al., 2021).

В нашия експериментален модел установихме значително повишение на триглицеридно-глюкозния индекс (TyG) — съотношението между серумните триглицериди и глюкозата — в групата с ВФД спрямо контролната група (фиг.10). Множество изследвания показват, че TyG индексът служи като ефективен инструмент за клинично предсказване на метаболитен синдром, тъй като оценява функцията на панкреаса и инсулиновата резистентност в тъканите (Ramdas Nayak VK et al., 2022). Инсулиновата резистентност (IR)

има съществено значение за развитието на предиабетни нарушения, като нарушен глюкозен толеранс, захарен диабет (ЗД) и ССЗ. Поради това TyG индекс представлява един надежден прогностичен показател за изхода на заболяването при тези пациенти (Hill MA et al., 2021). Някои от механизмите, които лежат в основата на връзката между ИР и ССЗ, са описани във фигура 12. Wan и съавт. твърдят, че предсказателната ефективност на индекса TyG надвишава тази на съществуващите заместителни индекси, включително Модела за оценка на хомеостазата на инсулиновата резистентност (НОМА-IR) (Wan, H., et al. 2024). Освен това, допълнителни индекси, които комбинират TyG индекса с антропометрични показатели — като обиколка на талията (TyG-WC), съотношение талия-ръст (TyG-WHtR) и индекс на телесната маса (TyG-BMI) — също показват значителна точност при оценката на кардиометаболитния риск (Zhang Q, et al., 2023).



Фиг.12. Патогенетични механизми, допринасящи за предиктивната стойност на TyG индекс за изхода от ССЗ

Легенда: PGI2 – простаглицлин; NO – азотен оксид; ВГЛК – вътресъдови гладкомускулни клетки; TXA2 – тромбоксан; ТФ – тъканен фактор

Въпреки широкото му приложение, използването на TyG индекс като маркер за прогнозиране на сърдечно-съдовия риск продължава да бъде свързано с определени

ограничения. Първоначалната концепция за въвеждането му през 2008 г. е да се демонстрира, че инсулиновата резистентност е ключов патофизиологичен фактор за повишаването на серумните нива на триглицеридите и глюкозата дори при клинично здрави индивиди (Simental-Mendía LE et al., 2008). Авторите установяват, че стойностите на TyG индекс при пациенти със сърдечно-съдови заболявания могат да бъдат повлияни от динамиката на липидния и глюкозния профил. Това подчертава необходимостта от строг контрол върху хипергликемията и хиперлипидемията, за да се гарантира валидността на TyG индекс като предиктивен биомаркер. В допълнение, някои изследвания не установяват значима асоциация между TyG индекс и наличието на сърдечно-съдови заболявания; например Cho YR et al. (2019) не откриват съществена връзка при кохорта от 996 пациенти с диабет, след корекция спрямо класическите сърдечно-съдови рискови фактори. Значимостта на TyG индекс в нашия експериментален модел се подкрепя от наблюдението, че суплементацията със SAM води до статистически значимо понижение на стойностите му в сравнение с фруктозната група (фиг.10).

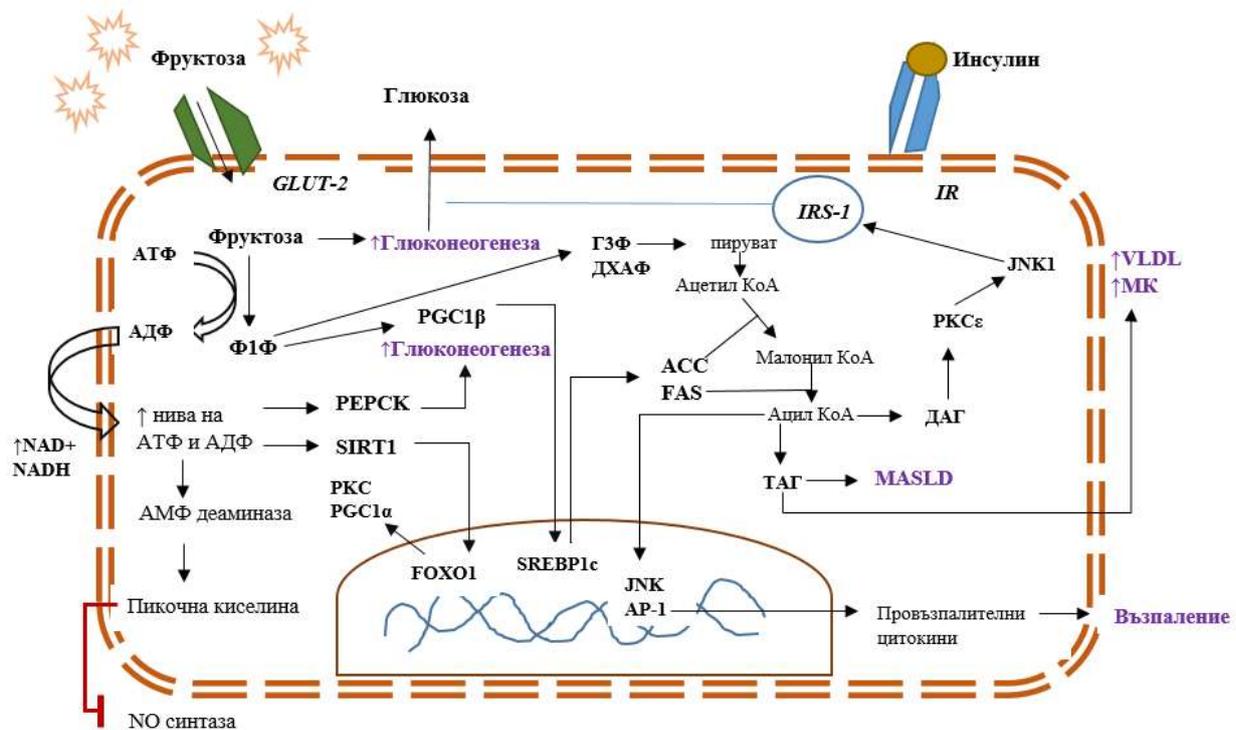
Независимо от посочените ограничения, TyG индекс, като индиректен показател за инсулинова резистентност, остава надежден инструмент за идентифициране на индивиди с повишен риск от развитие на захарен диабет. Това го прави ценен маркер както за ранно откриване и интервенция, така и за прогнозиране на изхода при сърдечно-съдови заболявания.

Механизми на фруктозо-индуцирана хипергликемия и ИР

В контекста на въглехидратния метаболизъм, фруктозата е тясно свързана с прогресиращата хипергликемия и развитието на ЗД тип 2. Това се вижда и при анализа на данните от биохимичното ни изследване, което установява статистически значимо покачване в нивата на серумната глюкоза в групата на ВФД спрямо контролната. За разлика от това, в суплементираната със SAM група се наблюдава статистически значим спад в нивата на глюкоза спрямо фруктозната група, като стойностите са по-ниски и от тези при контролните животни (фиг.5). Различни механизми обясняват развитието на фруктозо-индуцирана хипергликемия като стимулиране на глюконеогенезата и развитието на инсулинова резистентност с нарушаване на глюкозната утилизация в периферните тъкани.

Фруктозата се метаболизира основно в черния дроб до различни субстрати, като глюкоза, гликоген, лактат и МК. Първата стъпка от този процес представлява едно бързо и неконтролирано трансформиране на фруктоза във Ф1Ф от фруктокиназа, ключов, инсулинонезависим ензим, чрез който се заобикаля централния гликолитичен регулаторен контрол, медиран от фосфотруктокиназата. По този начин се осигурява един неконтролиран поток от липогенни субстрати (ацетил-КоА и глицерол-3-фосфат) за алтернативни, нерегулируеми от инсулин пътища за синтез на ТГ (Kolderup A. et al., 2015). Това от своя страна води до натрупване на липиди в черния дроб с развитие на

чернодробна инсулинова резистентност; и в панкреаса, при което се нарушава синтеза и секрецията на инсулин (Sellami E. et al. 2023). Нашите резултати подкрепят твърдението и на други автори, че чернодробното инсулиновото сигнализиране намалява при гризачи, изложени на ВФД в продължение на 28 дни (Ueno et al., 2000).



Фиг. 13. Механизми на фруктозо-индуцирана хипергликемия

Легенда: GLUT-2 – глюкозен транспортер 2; Ф1Ф – фруктозо-1-фосфат; АТФ-аденозинтрифосфат; АДФ – аденозиндифосфат; РЕРСК - фосфоенолпируват карбоксикиназа; SIRT1 – сиртуин-1; FOXO1 – ген; PGC1 – пероксизомен пролифератор–активиран рецептор гама коактиватор 1; SREBP1c – стерол регулаторен елемент свързващ протеин 1c; FAS – синтаза на МК; ACC – ацетил Коа карбоксилаза; IR – Инсулинов рецептор; ГЗФ – глицералдехид 3 фосфат; ДХАФ – дехидроацетонфосфат; JNK – c-jun-N терминална киназа 1; AP-1 – активаторен протеин 1; DAG – диацилглицерол; TAG – триацилглицерол; MASLD - асоциирана с метаболитна дисфункция стеатозна чернодробна болест;

Превръщането на фруктоза във Ф1Ф представлява високоенергиен процес, който намалява клетъчните нива на АТФ и повишава съдържанието на АДФ и АМФ, което от своя страна увеличава съотношението NAD⁺/NADH (фиг. 13). Увеличаването на NAD⁺/NADH е свързано с повишаване на активността на SIRT-1, който, чрез деацетилиране на FoxO1

стимулира експресията на PKC и PGC1 α (Caton et al., 2011; Frescas et al., 2005) и води до засилване на чернодробната глюконеогенеза и развитието на хипергликемия.

Постъпването на фруктоза в клетката активира и други енергетични пътища, които засягат въглехидратния метаболизъм. Натрупването на фруктозо-1-фосфат осигурява субстрати (глицерол-3-фосфат) за цикъла на Кребс, което води до образуването на Малонил-Коа и Ацил-Коа (фиг. 13). Част от Ацил-Коа се превръща в ДАГ, който чрез активирането на JNK1 води до фосфорилиране на серинови остатъци на IRS-1 (IRS-1Ser307) и развитието на инсулинова резистентност и хипергликемия (Hirosumi et al., 2002). В допълнение към развитието на IR, JNK активира и транскрипционния фактор AP-1, което е причина за производството на АФК, проинфламаторни цитокини (Baffy et al., 2009) и развитието на оксидативен стрес, което също уврежда инсулиновото сигнализиране и нарушава периферната утилизация на глюкоза. В подкрепа на това твърдение е, че приемът на SAM като potentен антиоксидант намалява серумните глюкозни нива сред третираните животни в нашия експериментален модел.

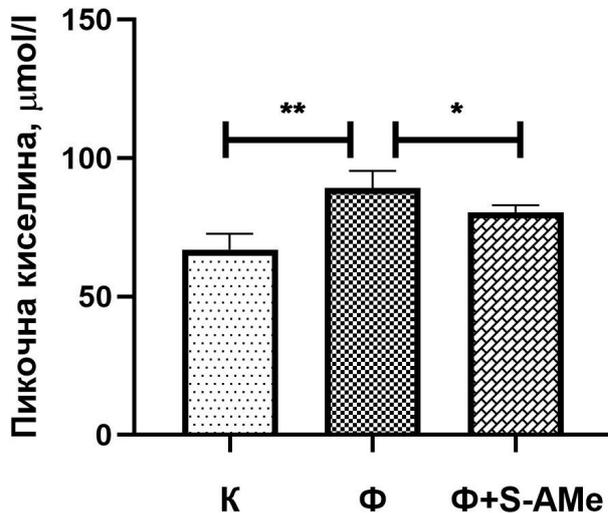
В нормални условия секрецията на инсулин е свързана с инхибиране на липолизата. За разлика от това, в условия на ИП, се наблюдава увеличено освобождаване на СМК в кръвния поток, които се отлагат в скелетната мускулатура и черния дроб, действат липотоксично и водят до развитието на инсулинова резистентност (Sellami E. et al. 2023). Натрупването на СМК в тези органи води до разрушаване на клетъчните органи с освобождаване на АФК и провъзпалителни цитокини. Това води до развитието на хронично нискостепенно възпаление, което уврежда инсулиновото сигнализиране (β -клетъчна дисфункция), нарушава глюкозната хомеостаза и води до системна дисрегулация (Ahmed et al., 2021). От друга страна, продължителната хипергликемия също проявява глюкотоксичност, която води до клетъчно изтощение, промяна на вътреклетъчния енергиен метаболизъм, ОС, митохондриална дисфункция и хронично прогресивно необратимо увреждане на β -клетките на панкреаса (Liu X et al., 2024).

ИП от своя страна променя липидния и въглехидратния метаболизъм, което води до високи нива на глюкоза, ТГ, VLDL, LDL; и ниски нива на HDL. Тези промени, заедно с ендотелната дисфункция, предизвикана от абнормалното инсулиново сигнализиране, допринасят за образуването на атеросклеротични плаки и увеличаване на сърдечно-съдов риск.

Точните механизми, чрез които приема на SAM, подобрява глюкозната хомеостаза са все още непълно изяснени. Някои от изследванията, съобщаващи за значителни подобрения в глюкозния метаболизъм, след приложение на SAM при диабетни модели, приписват тези ефекти на повишена инсулинова чувствителност и усвояване на глюкоза чрез фосфорилиране на IRS-1 и Akt (Izu H et al., 2019; Moon MK et al., 2010).

1.3. Вариации в серумните нива на пикочна киселина

1.3.1 Резултати, получени от определянето на серумната пикочна киселина



Фиг. 14. Промени в серумните нива на пикочна киселина в експерименталните групи. Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (n=6). К- контролна група; Ф-група на ВФД; Ф+S-AMe- група на ВФД и суплементирана с S-аденозилметионин; * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$, t-test

Резултатите от нашето изследване показват покачване на стойностите на пикочната киселина при експерименталните плъхове, подложени на ВФД спрямо контролната група, което е със статистическа значимост - ** $p < 0,01$. Прилагането на антиоксиданта S-AMe води до статистически значим спад в стойностите на пикочната киселина спрямо фруктозната група - * $p < 0,05$ (фиг.14).

1.3.2 Обсъждане

Различни проучвания установяват, че специфичният метаболизъм на фруктозата увеличава нивата на пикочна киселина, което рефлектира върху интензитета на липидогенезата и развитието на метаболитен синдром, ИР, MASLD, лептинова резистентност, подагра и ССЗ (Lubawy et al., 2023; Cicero et al., 2018). Нашите данни показват статистическо значимо увеличение в нивата на пикочна киселина в групата на ВФД спрямо контролата. От друга страна, прилагането на SAM води до статистически значим спад в нивата на пикочна киселина спрямо фруктозната група (фиг.14).



Фиг.15. Метаболитни промени, медирани от пикочната киселина

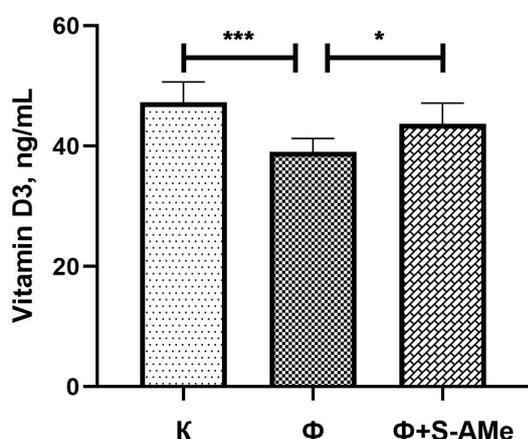
Фруктозното фосфорилиране, медирано от фруктокиназата, няма система за отрицателна обратна връзка, което води до бързо изчерпване на вътреклетъчния АТФ, активиране на АМФ деаминаза и генериране на пикочна киселина, което предизвиква клетъчно увреждане (фиг.15). Пикочната киселина навлиза в реналните тубулни клетки, съдовата мускулатура и адипоцитите, чрез специфичния транспортер URAT-1, при което активира NOX и води до производството на АФК и развитието на оксидативен стрес. В подкрепа на това твърдение са и резултатите от нашето изследване, при което приема на SAM е свързан с по-ниски нива на пикочна киселина. Според Lanaspri и съавт. (2020), пикочната киселина индуцира митохондриална дисфункция и генерира АФК, чрез активирането на NADPH оксидази и изчерпването на АТФ. По данни на Spiga и съавт. (2017) пикочната киселина, чрез активиране на възпалителния NF- κ B сигнален път, увеличава експресията на възпалителните биомаркери като CRP, фибриноген, феритин и комплемент C3 в хепателните G2 клетки, което също индуцира развитието на възпаление, оксидативен стрес (Milanesi et al., 2019) и ендотелна увреда; и следователно играе роля в развитието на инсулинова резистентност и метаболитен синдром (Yu et al., 2010). Повишените нива на пикочна киселина способстват за провъзпалителното състояние чрез увеличени синтез на MCP-1 и намаляване на нивата на адипонектин. Метаболитното влияние на пикочната киселина се доказва и в проучвания на Umano и съавт. (2019), които установяват, че понижаването ѝ води до намаляване на макрофагеалната инфилтрация и експресията на TNF- α , както и подобряване на инсулиновата чувствителност и кръвното налягане при животински модели. Всичко това потвърждава хипотезата, че серумната пикочна киселина играе ключова роля в патогенезата на затлъстяването и неговите

усложнения.

Пикочната киселина редуцира нивата на ендотелния NO, чрез мощно инхибиране на NO синтазата (Gersch et al., 2008). NO заема ключово значение за ендотелната функция поради вазодилаторното си действие. Приемът на ВФД, чрез увеличаване на нивата на пикочна киселина влияе неблагоприятно върху съдовата регулация и увеличава риска от развитие на съдово възпаление, оксидативен стрес, атеросклероза и артериална хипертония (Russo et al., 2020, Nakagawa et al., 2005).

1.4. Вариации в серумните нива на Vitamin D3 (25 - ОН) и определяне на корелационната зависимост между витамин D3 и TyG Индекс

1.4.1 Резултати

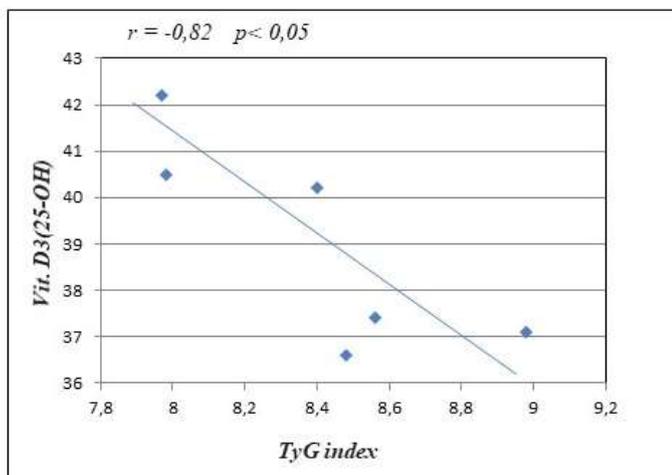


Фиг. 16. Промени в серумните нива **Vitamin D3(25 - ОН)**.

Легенда: Данните за представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (n=6). К- контролна група; Ф-група на ВФД; Ф+S-AMe- група на ВФД и суплементирана с S-аденозилметионин; *- $p < 0,05$; ***- $p < 0,001$, t-test

Нашите резултати демонстрират статистически значимо понижаване на нивата на Vitamin D3(25 - ОН) във фруктозната група спрямо контролата - *** $p < 0,001$. За разлика от това в групата с прием на антиоксиданта S-AMe се установи повишаване на нивата на Vitamin D3(25 - ОН) (със статистическа значимост - * $p < 0,05$ (фиг.16).

- **Резултати, получени от определянето на корелационната зависимост между витамин D3 и TyG Индекс**



Фиг.17. Корелационна зависимост между серумните нива на вит. D3 и TyG индекс в групата на ВФД. Легенда: Данните за представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (n=6). *- p<0,05; **-r<-0,82, t-test

Резултатите показват много висока негативна корелационна зависимост ($r = -0,82$; $p < 0,05$) между степента на намаление на серумните нива на витамин D3 и увеличението на TyG индекс в групата на ВФД (фиг.17).

1.4.2 Обсъждане

Получените от нас резултати показват, че ВФД предизвиква статистически значимо понижаване на серумни нива на Vitamin D3 (25 - OH) във Фру група спрямо контролата. За разлика от това, в групата на ВФД и суплементация със SAM се наблюдава увеличение на нивата на Vitamin D3 (25 - OH), в сравнение с Фру група, което е също със статистическа значимост (фиг.16). Ние предполагаме, че ВФД предизвиква понижаване на Vitamin D3 (25 - OH), чрез влиянието си върху развитието на затлъстяване и свързаните с него оксидативен стрес, възпаление и клетъчна увреда. Това се потвърждава и в проучване на Derbel и съавт. (2025), които установяват, че нивата на витамин D3 при хора със затлъстяване са значително по-ниски и корелират положително с ИТМ. Отчасти това може да бъде обяснено със заседналият начин на живот, който водят тези хора. Хидрофобния характер на витамин D3 му позволява да напусне кръвообращението и да се натрупа значително в мастната тъкан на хора със затлъстяване, което представлява друга потенциална причина за обратната връзка между серумните нива на витамин D3 и ИТМ (Derbel et al., 2025; Alzohily et al., 2024). Това се доказва и в проучвания на Mawer и съавт (1972), които инжектират радиоактивен витамин D на пациенти и установяват, че нивата на активност са най-високи в мастната тъкан. От друга страна, дефицитът на витамин D

може да бъде причина за развитието на затлъстяване, тъй като участва в регулирането на липогенезата и липолизата (Mai et al., 2012). Според Fan и съавт. транскрипцията на гена UCP3 се иницира от свързването на $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (калцитриол)/VDR към промотора на UCP3 на молекулярно ниво, което засилва енергийния метаболизъм и води до устойчивост срещу затлъстяване, предизвикано от диета с високо съдържание на мазнини (Fan et al., 2016), което показва наличието на един порочен кръг между затлъстяването и понижените нива на витамин D3.

Оксидативния стрес играе ключова роля за развитието на различни коморбидни заболявания сред пациентите със затлъстяване. Сред факторите, допринасящи за развитието на ОС при затлъстяване са хипергликемия, хиперлипидемия, дефицит на витамини и минерали, хронично нискостепенно възпаление, ендотелна и митохондриална дисфункция и др (Wheatcroft SB et al., 2003; Aeberli I. et al, 2011; Manna P. et al., 2015). Индуцираното от ОС свръхпроизводството на АФК и реактивни алдехидни производни води до намаляване на клетъчните нива на АТФ, NAD^+ и глутатион (GSH) с последващо увреждането на ДНК, липиди и протеини, и развитието на клетъчна смърт (Rolo AP et al., 2012). In vitro дефицитът на GSH причинява down-regulation на VDBP/VD-25-хидроксилаза/VDR и PGC-1 α /VDR/GLUT-4 в миотубулите; и up-regulation на CYP24a1 в хепатоцитите (Jain SK et al., 2018). VDBP (витамин D свързващ протеин) е необходим за ефективния транспорт, а VD-25-хидроксилазата е необходима за хидроксилирането на холекалциферол. Нашите резултати показват, че приема на SAM води до покачване на серумните нива на витамин D3 (фиг.16). Предполагаемият механизъм за този ефект е, че SAM като прекурсор на аминокиселината цистеин увеличава производството на GSH, което намалява ОС и регулира нагоре VDBP/VD-25-хидроксилаза/VDR, което води до увеличаване на бионаличността на витамин D3 и намалява възпалителния процес (Jain SK et al., 2018).

В нашето изследване наблюдавахме значимо понижаване на нивата на витамин D3 ($25(\text{OH})\text{D}$) с увеличаването на TyG индекс при експериментални животни с фруктозо-индуцирано затлъстяване, както и отрицателна корелационна връзка между TyG индекс и нивата на витамин D3 (фиг.17). Главните физиологични ефекти на витамин D са: да поддържа равновесието на костния метаболизъм чрез подпомагане на усвояването на калций и фосфор и чрез инхибиране отделянето на паратиреоиден хормон (Carlberg et al., 2023). С откриването на витамин D рецептори в множество тъкани и клетки, бяха разпознати и биологичните ефекти на витамин D, като стимулиране на производството на инсулин, подобряване на усвояването на глюкоза и upregulation на UCP3 (Abbas et al., 2017; Fan et al., 2016). Въпреки това други изследвания предполагат, че приемът на витамин D не повлиява секрецията на инсулин и развитието на ЗД тип 2 (Gulseth et al., 2017). Cojic и съавт. демонстрират, че пероралният дневен прием на витамин D подобрява нивата на HbA1c и намалява нивата на продуктите от протеинова оксидация при по-високи дози витамин D (Cojic et al., 2021). Те установяват също и, че приемът на витамин D подобрява ендотелната дисфункция при диабетни пациенти чрез намаляване производството на АФК и потискане на възпалението (Cojic et al., 2020).

В нашия експериментален модел на фруктозо-индуцирано затлъстяване установихме значима отрицателна корелационна връзка между стойностите на витамин D3 и TyG индекс, който отразява нивото на инсулиновата резистентност, което предполага, че тези два показателя се намират във функционална връзка (фиг.17).

Въпреки че множество изследвания доказват ролята на витамин D в патогенезата на инсулиновата резистентност (IR), изразена с TyG индекс, или ЗД тип 2, малко проучвания се фокусират върху ролята на инсулиновата резистентност в развитието на дефицит на витамин D (Xiang Q et al., 2024).

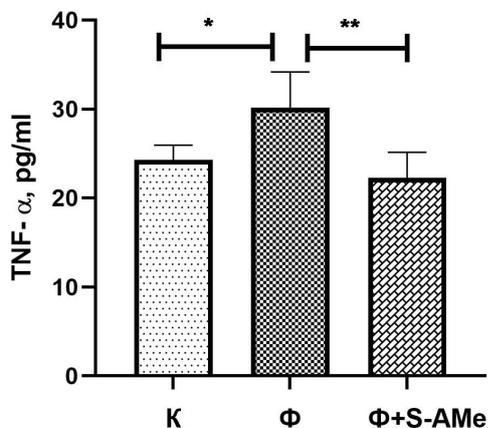
Установено е, че мастната тъкан, особено висцералната, е основното депо за циркулиращия 25(OH)D (Derbel et al., 2025; Alzohily et al., 2024). Известно е, че хората със затлъстяване и наднормено тегло имат по-ниски нива на 25(OH)D в кръвта, вероятно поради натрупването му в мастната тъкан. Механизмите, свързващи ниските нива на витамин D3 със затлъстяването и ИР са разнообразни, като нарушен метаболизъм (Wamberg et al., 2013), намалено складиране (Wortsman et al., 2000) и пониженото освобождаване на витамин D (Di Nisio et al., 2017). Няколко проучвания установяват, че високият TyG индекс е свързан с увеличен риск от дефицит на витамин D3 (Xiang Q et al., 2024; Xiang Q et al., 2023). Това се потвърждава и в нашия експериментален модел, който демонстрира, че затлъстелите плъхове, на ВФД, в най-високите стойности на TyG индекса показаха неколкостранно по-ниски нива на витамин D. Въз основа на тези данни се предполага, че високият TyG индекс, който отразява инсулиновата резистентност, може да играе роля в развитието на дефицита на витамин D при затлъстели индивиди.

В заключение, в нашия модел на фруктозо-индуцирано затлъстяване, TyG индекс е отрицателно свързан с нивата на серумен 25(OH)D, като по-високият индекс се асоциира с по-голяма честота на дефицит на витамин D. Данните предполагат, че TyG индекс, като маркер за инсулинова резистентност, може да участва в патогенезата на дефицита на витамин D, което налага бъдещи изследвания върху свързаните механизми.

2. Проучване на степента на възпаление при ВФД и прием на SAM и ролята му в развитието на ЕД, бъбречно и сърдечносъдово увреждане.

2.1. Резултати, получени от определянето на серумните нива на тумор некрозис фактор (TNF- α) и C-реактивен протеин (CRP)

- **Резултати, получени от определянето на серумните нива на *TNF-α***

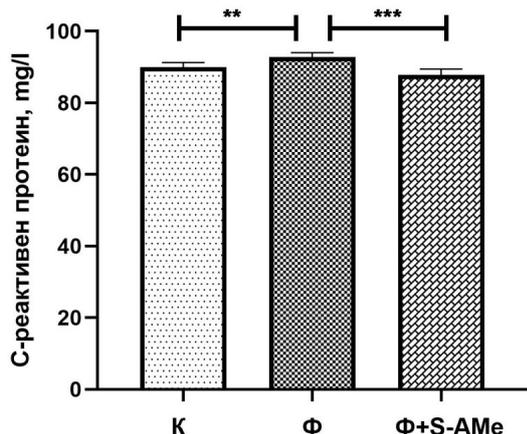


Фиг. 18. Промени в серумните нива *TNF-α*.

Легенда: Данните за представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (*SEM*), ($n=6$). К- контролна група; Φ-група на ВФД; Φ+S-AMe- група на ВФД и суплементирана с S-аденозилметионин; *- $p<0,05$; **- $p<0,01$, *t*-test

Серумните нива на *TNF-α* във фруктозната група са статистически значимо по-високи в сравнение с контролната група - * $p < 0,05$. Наблюдава се и статистически значима разлика в нивата на *TNF-α* между експерименталните животни на ВФД и тези на ВФД и суплементация със S-AMe, а именно спад на нивата на стойностите на *TNF-α* в суплементираната група (* $p < 0,01$) (фиг.18).

- **Резултати, получени от определянето на серумните нива на *CRP***



Фиг. 19. Промени в серумните нива *C-реактивен протеин*.

Легенда: Данните за представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (*SEM*), ($n=6$). К- контролна група; Φ-група на ВФД; Φ+S-AMe- група на ВФД и суплементирана с S-аденозилметионин; **- $p<0,01$; ***- $p<0,001$, *t*-test

Резултатите от нашето изследване демонстрират покачване на нивата на С-реактивен протеин във фруктозната група спрямо контролата (със статистическа значимост - $**p < 0,01$). Суплементирането с екзогенен S-АМе намали стойностите на серумното CRP спрямо фруктозната група, което също е със статистическа значимост - $***p < 0,001$ (фиг.19).

2.2 Обсъждане

Установено е, че възпалението играе основна роля в развитието на инсулинова резистентност и метаболитен синдром. Нашето проучване показва значително повишаване в нивата на TNF- α и CRP във Фру група спрямо контролата, което е със статистическа значимост. От друга страна, прилагането на екзогенен SAM води до статистически значима редукция в нивата на TNF- α и CRP спрямо групата на ВФД (фиг.18, фиг.19). Фруктозно-индуцираното покачване в нивата на тези провъзпалителни маркери, установени в нашето проучване, вероятно е следствие на специфичния фруктозен метаболизъм, оксидативния стрес и хипертрофия на висцералната мастна тъкан.

Повишените нива на TNF- α допринасят за прогресирането на чернодробното нискостепенното възпаление и апоптоза, и проявяват директен отрицателен ефект върху инсулиновата сигнализация чрез дисрегулация на фосфорилирането на сериновите и тирозиновите остатъци на IRS-1, като по този начин се индуцира инсулинова резистентност в черния дроб и периферните тъкани (Ibrahim SM et al, 2015).

TNF- α представлява главен провъзпалителен цитокин, който играе ключова роля в модулирането на възпалителния отговор, чрез стимулиране на експресията на NF- κ B, което увеличава не само секрецията на провъзпалителни цитокини (TNF- α , IL-1 и IL-6) и CRP, но и на АФК (Tilg et al., 2000). CRP представлява друг ключов биомаркер за наличие на възпаление, чийто синтез се осъществява главно в отговор на IL-6 и в по-малка степен на IL-1 и TNF- α . Основната роля на CRP се фокусира върху активирането на C1q в системата на комплемента, което води до опсонизация на патогени и клетъчно-медиацията на имунитет. Освен това, CRP, чрез активиране на Fc- γ рецептори стимулира производството на проапоптотични цитокини и възпалителни медиатори (IL-1 β , TNF- α , АФК) (Devaraj et al., 2005), което доказва наличието на друг порочен кръг между възпалителни ефекти на тези медиатори.

Поради специфичния си гликолитичен метаболизъм, фруктозата води до повишено образуване на тризахариди, които индиректно насърчават производството на крайни гликиращи продукти (AGEs), чрез реакция на гликиране (реакция на Мейлард) (Gaens et al., 2013). Свързването на AGEs със специфичните си RAGE рецептори активира множество сигнални пътища, включително MAPks, STAT3 и Akt (Hudson et al., 2018). Тези клетъчни сигнали на свой ред предизвикват активиране на ефекторите NF- κ B и EGR-1 надолу по веригата (Xie et al., 2013). Цялостното взаимодействие на AGEs с рецептора RAGE индуцира вътреклетъчен оксидативен стрес и възпалителен отговор с повишени нива на TNF- α , CRP, MCP-1 и IL-6, което води до допълнително усилване на пътищата,

участващи в генерирането на AGEs (Rai et al., 2019).

Приемът на храни, богати на фруктоза е свързан с развитието на висцерално затлъстяване, развитието на дисфункция на мастната тъкан и дисрегулация в секрецията на адипоцитокени. Според Taylor E.B. и съавт. (2021) хипертрофията на мастната тъкан след фруктозно натоварване проявява провъзпалителни качества, като повишена секреция на лептин, TNF- α , IL-6, и MCP-1; и намалена секреция на адипонектин, IL-10, и IL-4. Фруктозно-индуцираната хиперурикемия също понижава нивата на адипонектин, което лимитира неговата способност за потискане на чернодробната глюконеогенеза и възпалението в БМТ; или за увеличение на β -окислението в черния дроб и скелетната мускулатура, което допринася за поддържането на характерния фенотип при затлъстяването (Chait et al., 2020).

Високият прием на фруктоза предизвиква ОС по различни пътища, като намаляване на каталазната mRNA експресия (Cavarape et al., 2001) и Cu/Zn SOD нива (Poznyak et al., 2020), повишаване на активността на NADPH оксидаза и ксантин оксидаза (Berry et al., 2004) и увеличаване на производството на TNF- α и CRP, което води до освобождаване на АФК и клетъчна увреда (Tilg et al., 2000). От друга страна в проучване на Liao и съавт. (2020) се установява, че оксидативния стрес също може да повлияе върху нивата на TNF- α , а именно чрез AOPPs (advanced oxidation protein products). AOPPs представляват семейство от оксидирани дитиозин-съдържащи протеинови продукти, подобни на AGEs, които се образуват по време на мощното производство на АФК и се считат като един биомаркер за ОС (Witko-Sarsat et al., 1996). Liao и съавт. демонстрират, че AOPPs повишават производството на TNF- α и IL-1 β в хондроцитите чрез NADPH оксидаза 4-зависим, p38-MAPK медиран път. В друго проучване бе установено, че лечението с NADPH оксидазен инхибитор апоцинин намалява производството на АФК в мастната тъкан на ККАу мишки (Furukawa et al., 2004). Това води до повишена експресия на адипонектин и намалена експресия на TNF- α , което показва, че намаляването на оксидативния стрес в мастната тъкан може да подобри дисрегулацията на адипоцитокени *in vivo*.

Така и в нашето проучване бе установено, че приема на SAM значително намалява нивата на TNF- α и CRP, което означава че този екзогенен антиоксидант протектира периферните тъкани и черния дроб, като стопира проинфламаторните сигнални механизми и синтеза на цитокини, предизвикващи инсулинова резистентност, хронично нискостепенно възпаление, ОС и прекомерно освобождаване на СМК.

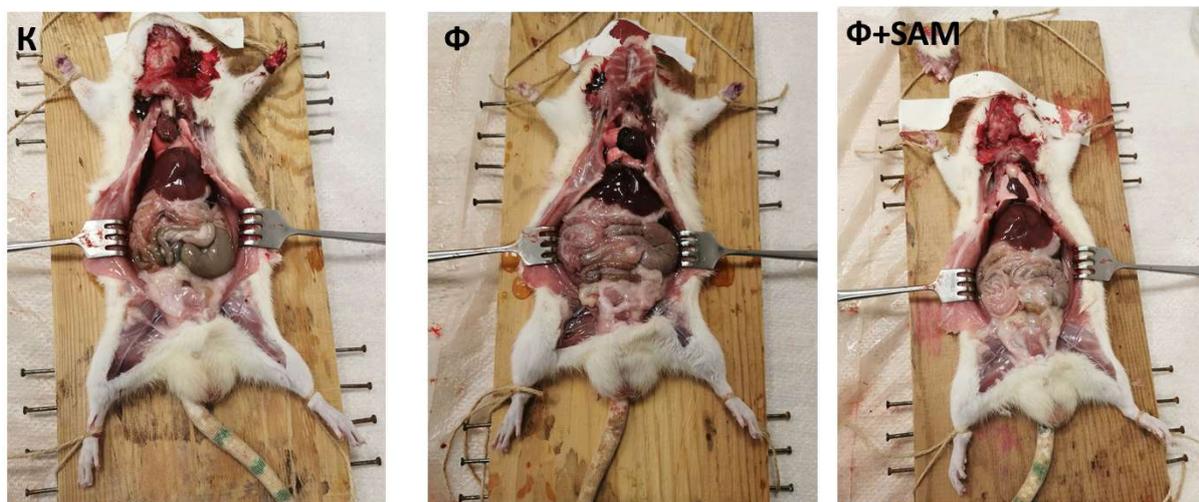
3. Проучване на взаимодействието между ОС, нискостепенно хронично възпаление и ЕД при ВФД и прием на SAM.

3.1. Вариации в морфометричните показатели на лява камера и интерлобарните артерии при ВФД и промени след суплементация със SAM

3.1.1 Резултати, получени от макроскопското изследване на сърце и РПМТ

След аутопсирането на експерименталните животни, бяха установени видими

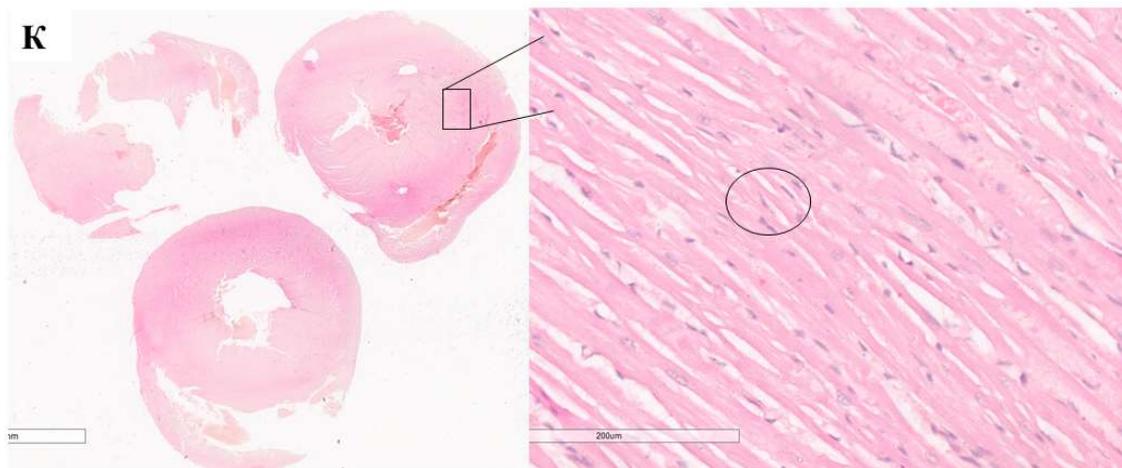
макроскопски промени в разпределението на мастна тъкан. В групата на ВФД се наблюдаваше по-голямо количество висцерална мастна тъкан спрямо животните от контролната група. Плъховете, подложени на ВФД и суплементация със S-АМе, видимо демонстрираха редукция на количеството висцерална мастна тъкан в сравнение с плъховете от фруктозната група (фиг.20). При внимателния оглед на сърцето на всяко експериментално животно бе установена изразена хипертрофия при плъховете, подложени на ВФД спрямо контролната група. При групата на ВФД и суплементация със SAM бе установена по-слаба изразена хипертрофия на сърцето (фиг.20).



Фиг.20. Макроскопски промени в разпределението на РПМТ между изследваните групи
Легенда: К – контролна група; Ф-група на ВФД; Ф+S-АМе- група на ВФД и суплементирана с S-аденозилметионин

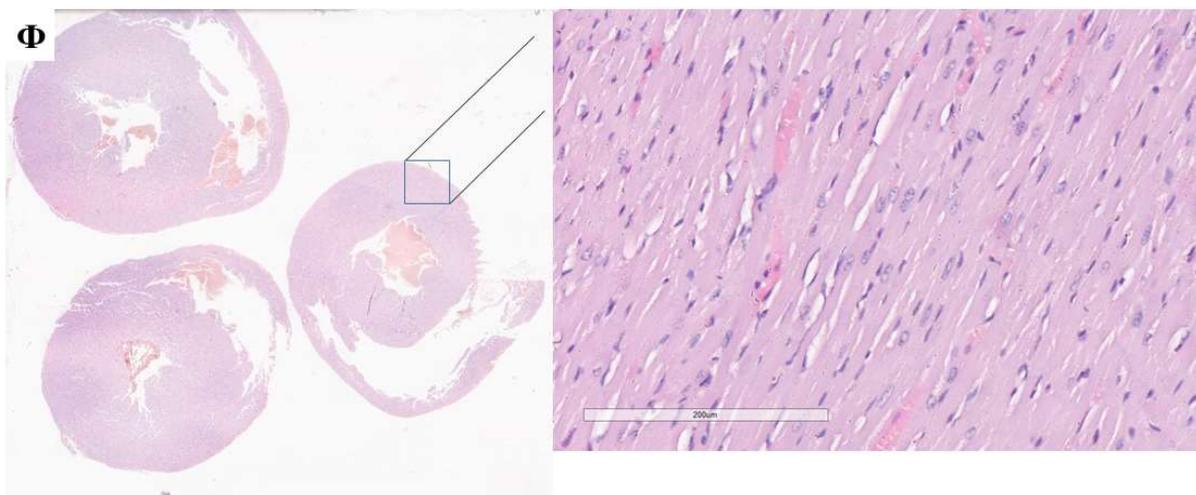
3.1.2 Резултати, получени от хистологичния и морфометричния анализ на лява камера

Резултатите, получени от рутинния хистологичен анализ на кардиомиоцитите на плъховете от контролната група демонстрира запазена архитектура на клетките и нормална морфология на ядрата (фиг.21).



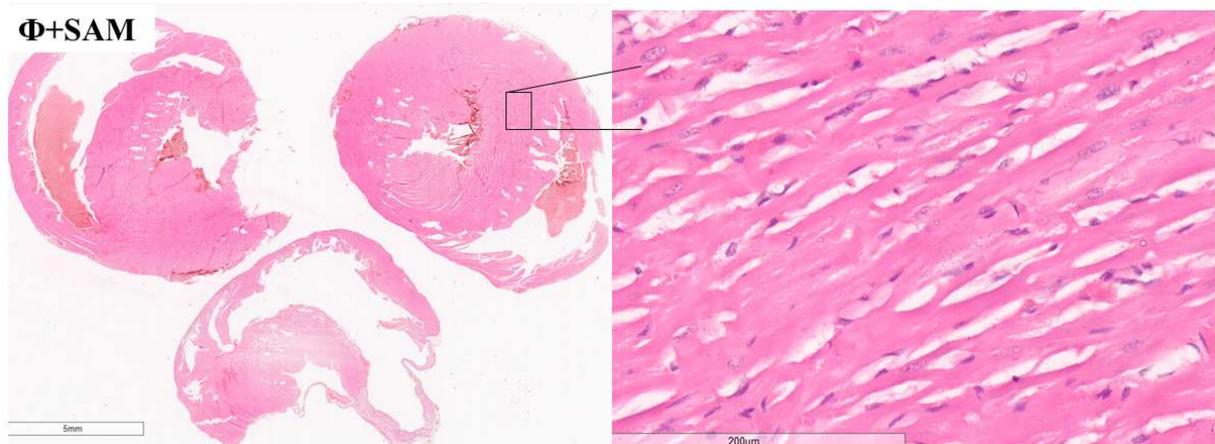
*Фиг.21. Хистологичен анализ на миокард на лява камера на плъх от контролната група. Оцветяване с хематоксилин-еозин. Увеличение x20 (Aperio Image scope – v12.3.3.5048)
 Легенда: К – контролна група*

За разлика от контролната група, в група на ВФД се демонстрират промени в архитектурата на кардиомиоцитите. Наблюдават се белези на хипертрофия – увеличаване на цитоплазмата, изразена нуклеомегалия с неравномерно диспергиран хроматин, ядрен атипизъм (боксаг ядра) и разрастване на съединителната тъкан (фиг.22).



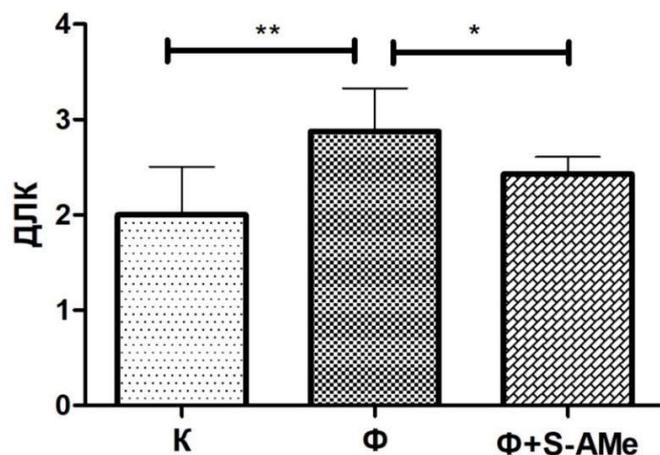
*Фиг.22. Хистологичен анализ на миокард на лява камера на плъх от групата на ВФД. Оцветяване с хематоксилин-еозин. Увеличение x20 (Aperio Image scope – v12.3.3.5048)
 Легенда: Ф – фруктозна група*

Резултатите, получени от хистологичния анализ на кардиомиоцити на плъховете, подложени на ВФД и суплементация със SAM демонстрира по-леки патоморфологични промени в миокарда на лява камера спрямо тези при фруктозната група. Все още на места се наблюдават белези на ядрен атипизъм и нуклеомегалия, но значително по-рядко в сравнение с фруктозната група (фиг.23).



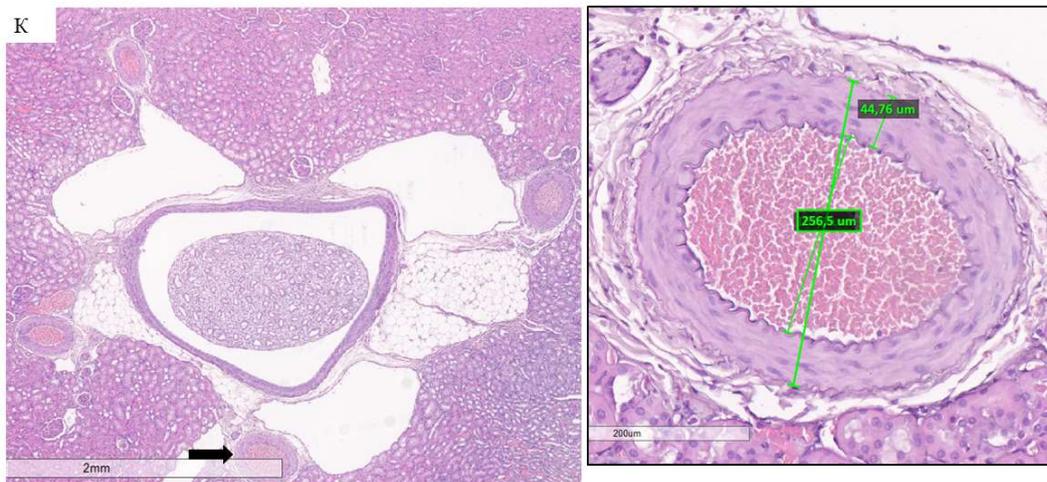
Фиг.23. Хистологичен анализ на миокард на лява камера на плъх от групата на ВФД и суплементация със SAM. Оцветяване с хематоксилин-еозин. Увеличение x20 (Aperio Image scope – v12.3.3.5048) Легенда: Φ +SAM – група на ВФД и прием на SAM

Морфометричния анализ на рутинно оцветените с хематоксилин-еозин срези на сърцето установи статистически значимо увеличаване на дебелината на лява камера при животните от фруктозната група спрямо контролната група - $**$ - $p < 0,01$. Суплементацията със S-АМе при ВФД от своя страна води до статистически значимо намаляване на дебелината на лява камера спрямо фруктозната група - $*$ - $p < 0,05$, като стойностите се доближават до тези на контролната група (фиг.24).



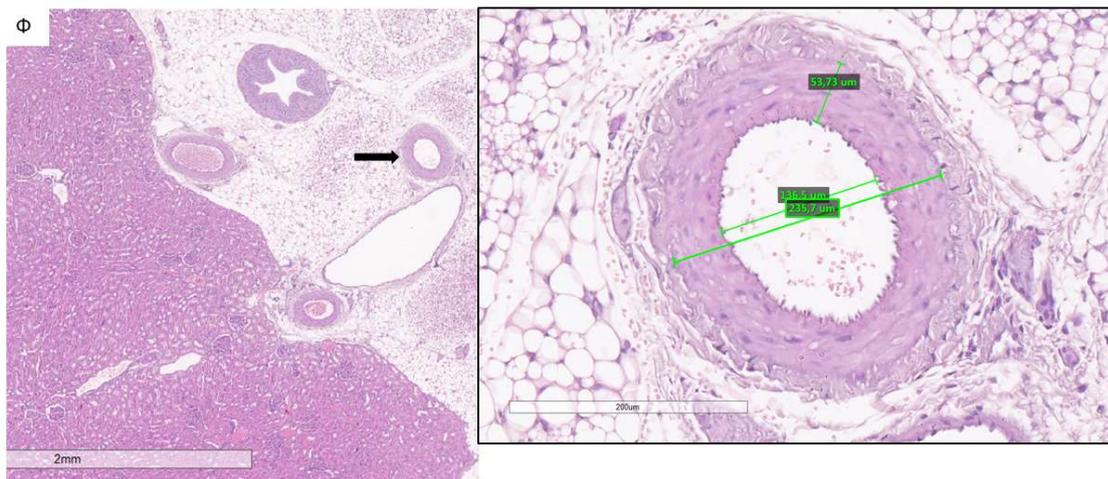
Фиг.24. Резултати от морфометричния анализ на лява камера
 Легенда: Данните за представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (n=6).
 ДЛК – дебелина лява камера; К- контролна група; Φ -група на ВФД; Φ +S-АМе- група на ВФД и суплементирана с S-аденозилметионин; $*$ - $p < 0,05$; $**$ - $p < 0,01$, t-test

3.1.3 Резултати, получени от хистологичния и морфометричния анализ на интерлобарните клонове на реналната артерия



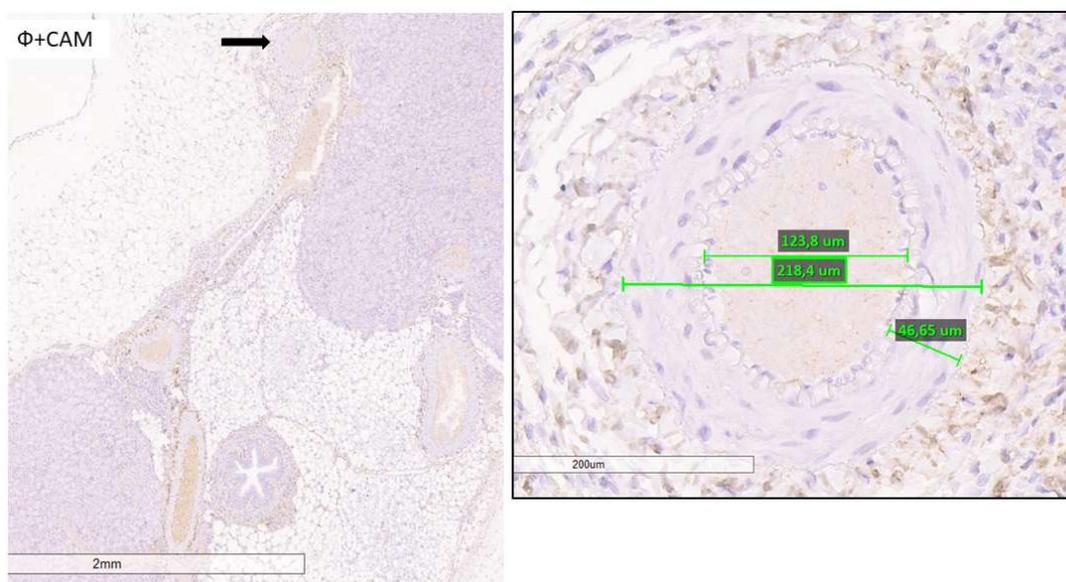
Фиг.25. Хистологичен анализ на интерлобарен клон на реналната артерия. Оцветяване с хематоксилин-еозин. Увеличение x2 и x20 (Aperio Image scope – v12.3.3.5048)
Легенда: К – контролна група

Резултатите, получени от рутинния хистологичен анализ на интерлобарната артерия при плъховете от контролната група демонстрират запазена архитектура на ендотелните клетки и съдовата стена (фиг.25).



Фиг.26. Хистологичен анализ на интерлобарен клон на реналната артерия. Оцветяване с хематоксилин-еозин. Увеличение x2 и x20 (Aperio Image scope – v12.3.3.5048)
Легенда: Ф – фруктозна група

В групата на ВФД се наблюдават промени в tunica intima, изразящи се с набъбване на субендотелното пространство и вакуолизация на ендотелните клетки. За разлика от контролната група, в група на ВФД се демонстрира хипертрофия на съдовите ГЛМК със зони на фрагментация и изглаждане на еластичните влакна, и разрастване на съединителната тъкан с ремоделиране на съдовата стена (фиг.26). Нашия хистологичен анализ обуславя морфометричните промени, които са представени в таблица 3 – задебеляване на съдовата стена и промяна в размера на вътрешния диаметър. При фруктозната група се наблюдават и гломерулна хипертрофия, гломерулна склероза с белези на интерстициална фиброза и участъци с интерстициална инфилтрация с мононуклерни клетки (фиг 26).



Фиг.27. Хистологичен анализ на интерлобарен клон на реналната артерия. Оцветяване с хематоксилин-еозин. Увеличение x2 и x20 (Aperio Image scope – v12.3.3.5048)

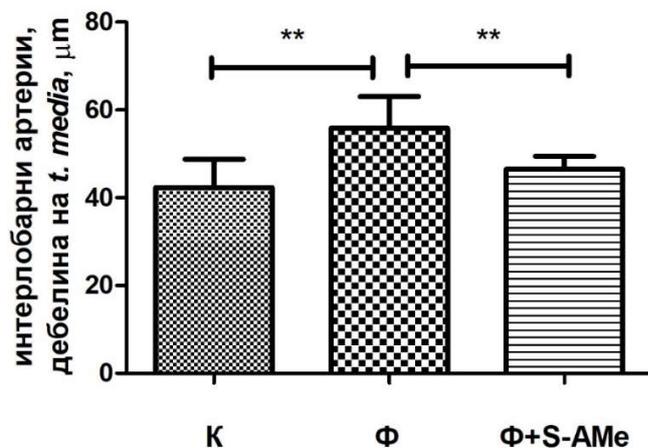
Легенда: Ф+САМ – група на ВФД и прием на САМ

Резултатите, получени от хистологичния анализ на интерлобарната артерия при плъхчетата, подложени на ВФД и суплементация със САМ демонстрират по-леки патоморфологични промени спрямо тези при фруктозната група. В tunica intima все още има набъбване на субендотелното пространство и вакуолизация на ендотелните клетки, но значително по-слабо изразено от фруктозната група. Все още на места се наблюдават белези на задебеляване на съдовата стена, интерстициална фиброза и инфилтрация с мононуклеарни клетки, но в значително по-малка степен от фруктозната група (фиг.27).

| Морфометрични показатели от интерлобарните артерии (бъбрек) | К | Ф | Ф+S-АМе |
|--|---------------|----------------|--------------|
| Външен диаметър (µm) | 201,8 ± 11.42 | 245.8± 13.58* | 224.5± 12,64 |
| Вътрешен диаметър (µm) | 104.1± 13.86 | 150.1± 10,69 * | 128.0± 16.62 |
| Съотношение дебелина на <i>t. media</i> / вътрешен диаметър (µm) | 0.74± 0.05 | 0.75± 0.05 | 0.54± 0.05 # |

Таблица 3. Резултати от морфометричните показатели, измерени в интерлобарните артерии на бъбрек. Легенда: Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), (N=6). К-контролна група; Ф- група на ВФД; Ф+S-АМе- група на ВФД и прием на S-аденозилметионин; * $p < 0,05$ – статистическа значимост между К група и Фру; # $p < 0,05$ – статистическа значимост между Фру група и Ф+S-АМе- група. Измерванията са направени с помощта на софтуер Aperio Image Scope (v12.3.3.5048), (Leica Biosystems Inc., Илинойс, Съединени американски щати).

Резултатите, получени от морфометричния анализ на интерлобарните клонове на реналната артерия на експерименталните животни установи статистически значими разлики между екперименталните групи животни. Вътрешния и външния диаметър при плъховете на ВФД са статически значимо по-големи спрямо контролната група, * $p < 0,05$, докато при животните на ВФД и суплементация със SAM се наблюдават по-стеснени диаметри от фруктозната група, но без статистическа значимост. Съотшението дебелина на *t.media*/вътрешния диаметър при фруктозната група не показва значителни отклонения спрямо контролната група, докато при суплементирана група се наблюдава статистически значимо намаляване на това съотношение спрямо фруктозна група, # $p < 0,05$ (табл.3).



Фиг. 28. Промени в дебелината на t.media на интерлобарните артерии.

Легенда: Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), (N=6). К-контролна група; Ф- група на ВФД; Ф+S-AMe- група на ВФД и прием на S-аденозилметионин; ** $p < 0,01$ – статистическа значимост между К група и Фру; и между Фру група и групата на ВФД и прием на SAM

Резултатите от анализирането на промените в дебелина на t.media на интерлобарните артерии установиха статистически значими промени между експерименталните групи. Плъховете от фруктозната група демонстрираха по-високи стойности на задебеляване на стената спрямо контролните животни, със статистическа значимост ** $p < 0,01$. При животните на ВФД и суплементация със SAM се установиха статистически значими по-ниски стойности на задебеляване спрямо фруктозната група (фиг.28).

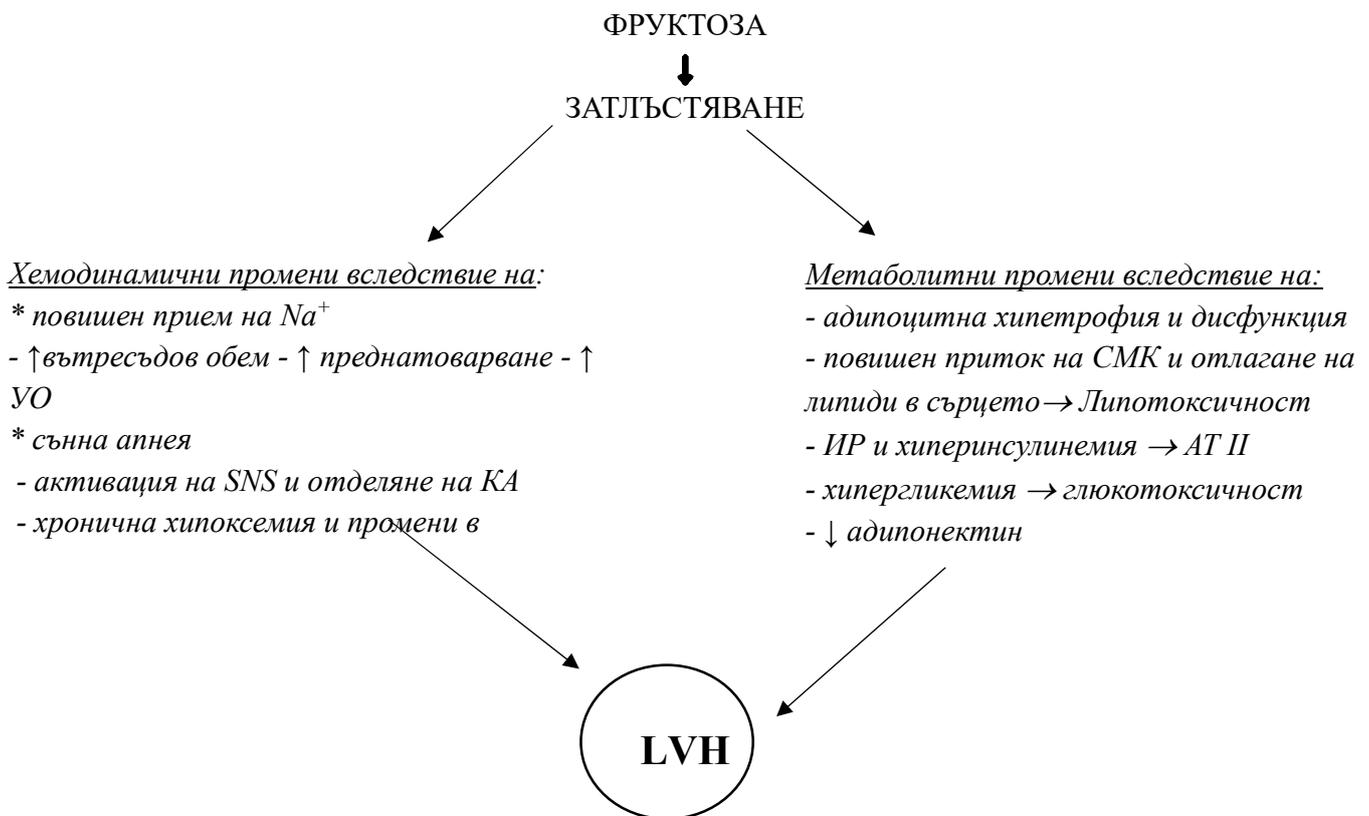
3.1.4 Обсъждане

Ние предполагаем, че фруктозно-индуцираната хипертрофия на лява камера се дължи на няколко вероятни механизма: (1) нарушено β -окисление, (2) чернодобна *de novo* липогенеза с повишен приток на СМК към сърцето или (3) повишен синтез на липиди в сърцето. В проучване на Zhang и съавт. (2024) с мишки на ВФД, се установи повишаване на малонил-Коа, карнитин-палмитоилтрансферазен инхибитор (CPT1), който директно поттиска CPT1-медираното окисление на мастни киселини в сърцето (Zhang, Y., et al. 2024). Същото проучване установи и регулация нагоре (upregulation) във фосфорилирането на 3-хидрокси-3-метилглутарил-СоА редуктаза (HMGCR) и повишаване в нивата на ендогенния АМПК активатор, 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид (AICAR). Тези находки предполагат, че прекомерния прием на фруктоза също поттиска, чрез промени в АМПК-АСС ос, което води до натрупване на липиди в сърцето, систолна дисфункция и левокамерна хипертрофия.

Въпреки изомерните сходства на фруктозата и глюкозата, усвояването и метаболизирането на фруктозата протича много по бързо и неконтролирано поради липсата на инхибиране от фосфофруктокиназата, което може да бъде основна причина за

метаболитната дисрегулация в сърцето. Двойния *in vivo* изотопен експеримент на Zhang и съавт. демонстрира, че β -окислението е инхибирано от бърза конкуренция за кислород при катаболизирането на фруктозата (Zhang, Y., et al. 2024). Освен това по време на фруктолиза се генерира по-малко АТФ, в сравнение с β -окислението, което предполага, че енергийния дефицит може да бъде основна причина за развитието на левокамерна хипертрофия, а по-късно и сърдечна недостатъчност (Zhang, Y., et al. 2024; Doenst et al., 2013).

Друга потенциална причина за възникването на хипертрофия сред експерименталните ни животни е индуцираното от фруктозата затлъстяване. Различни проучвания доказват връзката между повишеното телесно тегло и продължителното повишаване на кръвното налягане. Данните от мета-анализа на Friedemann и съавт. (2012) установяват, че децата със затлъстяване презентират по-високи нива на липиди, серумна глюкоза и инсулин в сравнение с деца и юноши с нормално тегло (Friedemann et al., 2012). Тези рискови фактори допринасят за развитието на различни сърдечно-съдови заболявания, като атеросклероза и левокамерна хипертрофия (LVH) и бъбречна съдова увреда. Хипертрофията на лява камера представлява крайна форма на увреждане и се характеризира с нарастване на масата на лява камера вследствие на увеличаване на дебелината на стената или абнормално разширяване на кухината. Тази абнормална сърдечна геометрия е свързана с развитието на вентрикуларни аритмии и сърдечна недостатъчност и четирикратно повишава риска от заболяемост и смъртност от ССЗ (de Simone et al., 1995). Множество механизми, обясняват развитието на LVH сред пациенти със затлъстяване (фиг.29). Метаболитната дисфункция играе основна роля в патогенезата на свързаното със затлъстяването ремоделиране на лява камера (Brady et al., 2016). Известно е, че с увеличаването на телесното тегло се увеличават и нуждите от съхранение на енергия, което води до адипоцитна хипертрофия. С течение на времето класически активирани макрофаги и Т-лимфоцити инфилтрират разрастващата се мастна тъкан, което води до бурен възпалителен отговор със секреция на цитокини и други медиатори, оксидативен стрес, адипоцитна некроза и ендотелна дисфункция, което допринася за крайното увреждане на органа (Brady et al., 2016).



Фиг.29. Механизми, свързани с развитието на левокамерна хипертрофия при фруктозно-индуцирано затлъстяване

Легенда: LVH – хипертрофия на лява камера; УО – ударен обем; SNS – симпатикова нервна система; КА – Катехоламини; ИР – инсулинова резистентност; АТ II – ангиотензин II;

Увеличената чернодробна *de novo* липогенеза и засиления приток на СМК оказват липотоксично действие върху β -клетките на панкреаса, което води до инсулинова резистентност и хиперинсулинемия (фиг.29). Абнормалната инсулинова регулация активира симпатиковата нервна система и повишава синтеза на ангиотензин II, кардиомиоцитен растежен фактор (Zamolodchikova et al., 2024), който води до миокардна хипертрофия, фиброза и апоптоза.

Адипокините представляват цитокини, хормони и провъзпалителни маркери, произведени от мастната тъкан. Те подлежат на *upregulation* при затлъстяване и допринасят за регулирането на екстрацелуларния матрикс на кардиомиоцитите и апоптозата, два основни аспекта на сърдечното ремоделиране (Brady et al., 2016). Установено е, че при затлъстяване мастната тъкан претърпява ускорено клетъчно и структурно ремоделиране за компенсиране на прекомерния прием на енергия (Senkus et al., 2022). Тези адаптации влияят пагубно върху активността на адипонектин, който има ключова роля в патогенезата на метаболитните промени при затлъстяване. Намалването в секрецията на този адипокин или намаляването в рецепторната му експресия води до инсулинова резистентност и допринася за развитието на левокамерна хипертрофия поради

загуба на протективните му ефекти срещу възпаление, ендотелна дисфункция и оксидативен стрес. Друг възможен механизъм за развитието на левокамерна хипертрофия е и повишеното кръвно налягане. Инсулиновата резистентност и хроничното системно възпаление при затлъстяване са свързани с ендотелна дисфункция и вазоконстрикция, което води до повишаване на кръвното налягане, увеличаване на следнатоварването и развитието на LVH (Hall et al., 2015). Друг адипокин със значителна роля в затлъстяването е лептин. От интерес е фактът, че индивидите със затлъстяване имат повишени нива на лептин, но остават резистентни към неговите протективни ефекти. Установено е, че хиперлептинемията и лептиновата резистентност водят до неблагоприятни сърдечни последици като повишени нива на АФК в сърцето, апоптоза на кардиомиоцитите и сърдечна хипертрофия (Ouchi et al., 2011).

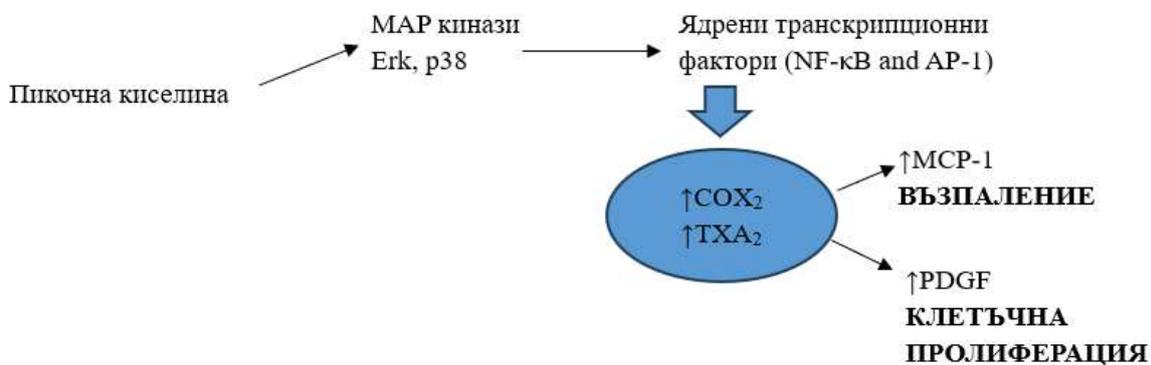
Оксидативния стрес и хроничното възпаление (повишена нива на TNF- α) заемат изключително място в патогенезата на миокардното ремоделиране (хипертрофия, фиброза, апоптоза и контрактилна дисфункция). В подкрепа на това твърдение са и резултатите от нашето изследване, в което приемът на SAM е свързан с понижаване в степента на левокамерната хипертрофия вследствие на потискане на оксидативния стрес (фиг.24). Това се потвърждава и от Jalgaonkar SV и съавт., които демонстрират, че приема SAMe намалява нивата на TNF- α и увеличава нивата на GSH, като по този начин предотвратява увреждане на кардиомиоцитите и възпалителната инфилтрация в миокарда (Jalgaonkar SV et al., 2024). Проучване на Yuanchen и съавт. (2022), проведено с цел оценка на кардиопротективния ефект на SAMe в модел миокарден инфаркт, показва намаляване на фиброзата и увеличаване на ангиогенезата в сърцето. Според тях, потискането на миокардната фиброза чрез лечение със SAMe може да се дължи на експресията на Jagged1 и Notch1 в миокарда на плъховете, което стимулира ангиогенезата (Yuanchen et al., 2022).

В настоящото проучване изследвахме и ефекта на фруктозното натоварване върху морфологията на интерлобарните клонове на реналната артерия. Резултатите от морфометричния анализ на интерлобарната артерия установи статистически значимо увеличаване на дебелината на *tunica media* при Фру група спрямо контролата. От друга страна, суплементацията със SAM доведе до намаляване на дебелината на *tunica media* спрямо Фру група, което е също със статистическа значимост (фиг.28).

Потенциална причина за задебеляването на интерлобарните артерии (прегломерулни артерии) сред експерименталните ни животни е развитието на фруктозо-индуциран метаболитен синдром. Различни епидемиологични данни показват, че метаболитният синдром може да бъде както рисков фактор за бъбречно увреждане, така и предиктор за неблагоприятен изход при пациенти с хронична бъбречна недостатъчност (Kambham N et al., 2001). Във връзка с това, установихме, че по-високия прием на фруктоза води до хипертрофични промени в бъбрека и интерлобарна артериопатия, която се изразява в задебеляване на *tunica media* и увеличаване на вътрешния и външния диаметър (табл.3, фиг.28).

Хиперурикемията се счита за един от компонентите на метаболитния синдром, който индуцира съдова увреда, характеризираща се с удебеляване на интерлобарните артерии и пролиферация на гладкомускулните клетки. Рао и съавт., установяват, че пикочната киселина стимулира експресията на PDGF-A веригата и медира клетъчното размножаване

в култивирани съдови ГЛМК (Rao GN et al., 1991). Това се потвърждава и от Kang и съвт. (2002), които демонстрират повишена *de novo* експресия на COX-2 mRNA, TXA2 и пролиферация на съдовите ГЛМК след инкубация с пикочна киселина. При навлизането си в съдовите ГЛМК, пикочната киселина, активира ядрените транскрипционни фактори (NF- κ B and AP-1), с което променя фенотипа на клетките към едно ново провъзпалително и пролиферативно състояние (фиг. 30). Прилагането на COX-2 или TXA2 рецепторен инхибитор предотвратява пролиферацията на съдовите ГЛМК, което доказва ролята на пикочната киселина като митогенен фактор.



Фиг.30 Молекулярни пътища, чрез които пикочната киселина индуцира възпаление и клетъчна пролиферация.

Легенда: MAP – митоген активиран протеин; NF- κ B – нуклеарен фактор капа B; AP-1- активаторен протеин-1; COX-2 – циклооксигеназа 2; TXA2 – тромбоксан A2; MCP-1 – моноцитен хемоатрактантен протеин-1; PDGF – тромбоцитен растежен фактор

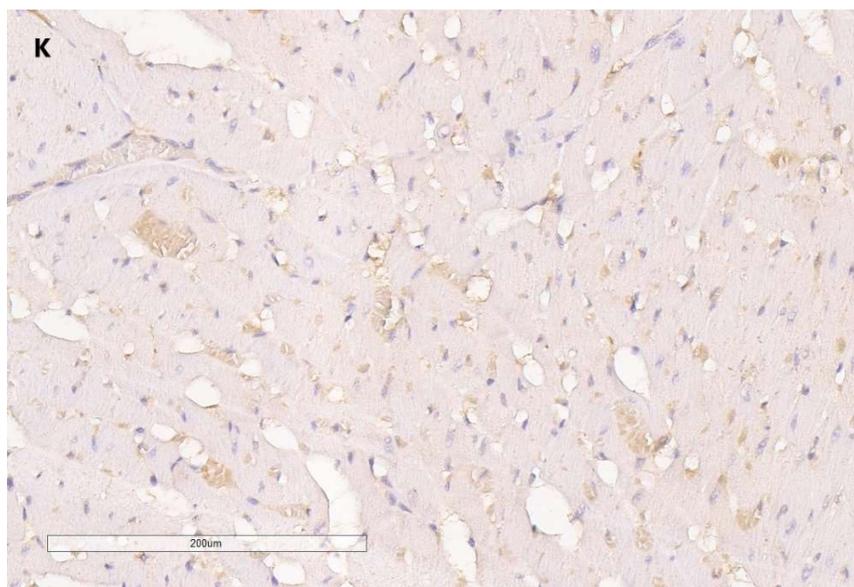
Друг възможен механизъм за артериопатията на интерлобарните артерии са повишените нива на ангиотензин II (AT II), който играе важна роля в съдовите изменения, индуцирани от високо-фруктозната диета при плъхове. Според Sánchez-Lozada LG и съвт. (2005; 2007), AT II води до развитието на хипертония, потискане на секрецията на адипонектин (Ran J et al., 2006), хипертрофия на адипоцитите (Furuhashi M et al., 2004) и индукция на оксидативен стрес (Shinozaki K et al., 2004). Това се потвърждава и от Hsieh PS (2005), който установява, че инхибирането на AT II, потиска пролиферацията на съдовите ГЛМК, възстановява активността на eNOS и подобрява инсулиновата чувствителност.

Приемът на високо-фруктозна диета увеличава нивата на пикочна киселина, а за нея е установено, че инхибира NO синтазата и редуцира нивата на ендотелния NO (Gersch et al., 2008), с което влияе неблагоприятно върху съдовата регулация и води до съдово възпаление, ендотелна дисфункция, оксидативен стрес и артериална хипертония (Russo et al., 2020, Nakagawa et al., 2005).

Задебеляването на стената на прегломерулните артерии води до повишено аферентно съдово съпротивление, което от своя страна редуцира гломерулния плазмоток и предизвиква активация на ренин–ангиотензин–алдостероновата система (РААС), резултираща в развитие на системна артериална хипертония. Самата системна хипертония представлява утвърден патогенетичен фактор за увреждане на бъбречните съдове и интерстициума. Това се осъществява чрез множество механизми, включително допълнителна активация на РААС, ендотелна дисфункция, подоцитна увреда, усилена активност на калциевите канали, повишен оксидативен стрес, свръхекспресия на хипоксия-индуцирания фактор (HIF) и други. Тези взаимосвързани процеси подчертават съществуването на порочен патофизиологичен кръг между повишените нива на пикочната киселина и хроничната бъбречна артериопатия.

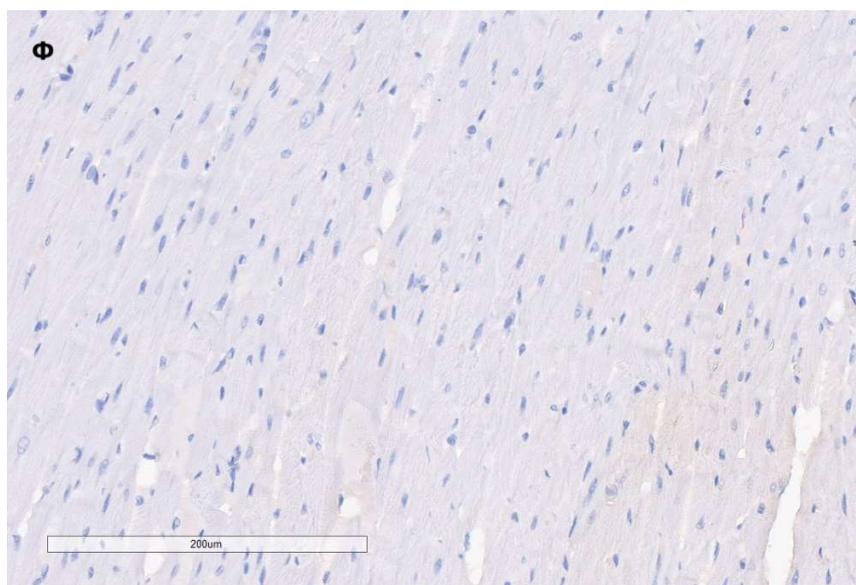
3.2. Вариации в експресията на SOD-1 при ВФД и промени след прием на SAM

3.2.1 Резултати, получени от имунохистохимичния анализ на експресията на SOD-1 в кардиомиоцитите



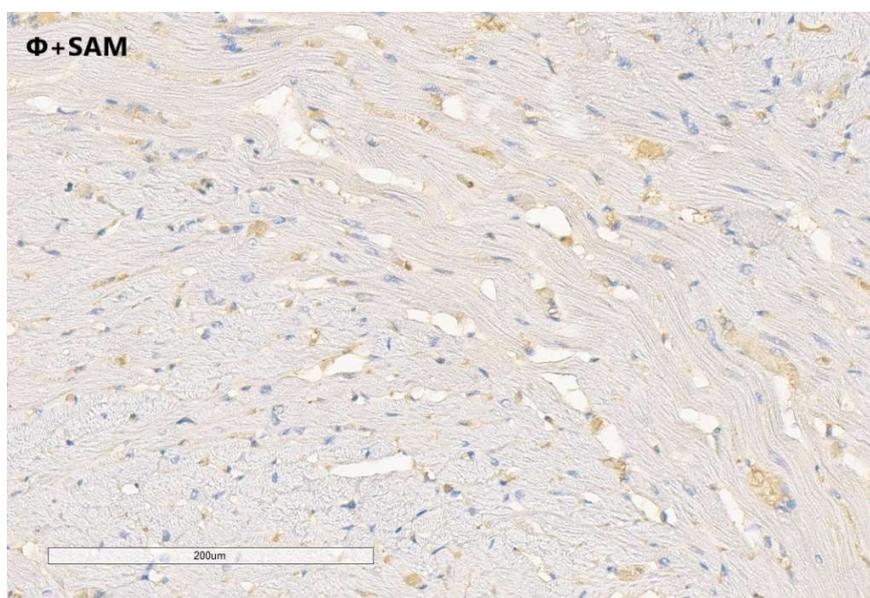
Фиг.31. Имунохистохимично изследване с анти - SOD-1 в кардиомиоцити (перинуклеарно и цитозолно) на плъхове от контролната група. Увеличение: ×20 (Aperio Image scope – v12.3.3.5048) Легенда: K- контролна група

Имунохистохимичния анализ на SOD-1 демонстрира предимно умерен интензитет на експресия в кардиомиоцитите на плъховете от контролната група. Наблюдават се и клетки с по-слаба експресия сред контролните животни (фиг.31).



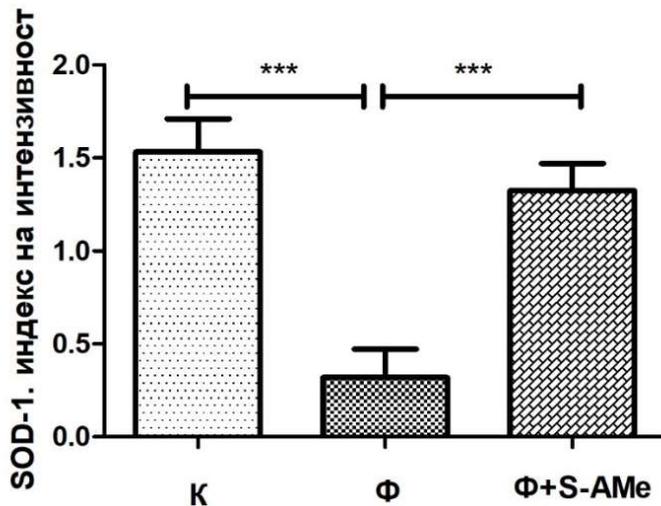
Фиг.32. Имуностохимично изследване с анти - SOD-1 в кардиомиоцити (перинуклеарно и цитозолно) на плъхове от групата на ВФД. Увеличение: $\times 20$ (Aperio Image scope – v12.3.3.5048)
 Легенда: Φ - плъхове на ВФД

Нашите резултати показват, че в сравнение с контролната група, експресията на SOD-1 в кардиомиоцитите на групата на ВФД са с предимно липсващ интензитет на експресия (фиг.32).



Фиг.33. Имуностохимично изследване с анти - SOD-1 в кардиомиоцити (перинуклеарно и цитозолно) на плъхове от групата на ВФД и прием на SAM. Увеличение: $\times 20$ (Aperio Image scope – v12.3.3.5048) Легенда: Φ +SAM - плъхове на ВФД и прием на SAM

За разлика от фруктозната група, в групата на ВФД и прием на SAM се наблюдава увеличаване на степента на експресия на SOD-1 в кардиомиоците. Наблюдават се и клетки с слаба до липсваща експресия, но тези с умерена и интензивна степен на експресия се срещат по - дифузно. Интензитета на експресия на SOD-1 в тази група се доближава до този, наблюдаван при контролните животни (фиг.33). Статистическия анализ показва значими разлики между нивата на SOD-1 експресия в изследваните групи (фиг.34).

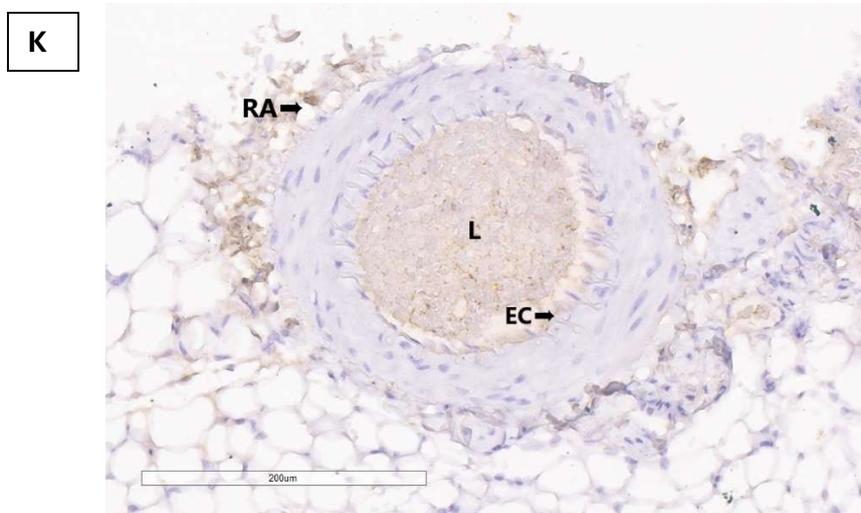


Фиг.34. Индекс на интензивност на реакцията (ИИР) на SOD-1 протеин в кардиомиоцити на плъхове от трите експериментални групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), (n=8); К – контролна група; Ф – група на фруктозна диета; Ф+S-AMe – група на фруктозна диета и суплементация със S-AMe; ; ***- $p < 0.0001$ – статистическа значимост между контролата и третираните групи, t-test

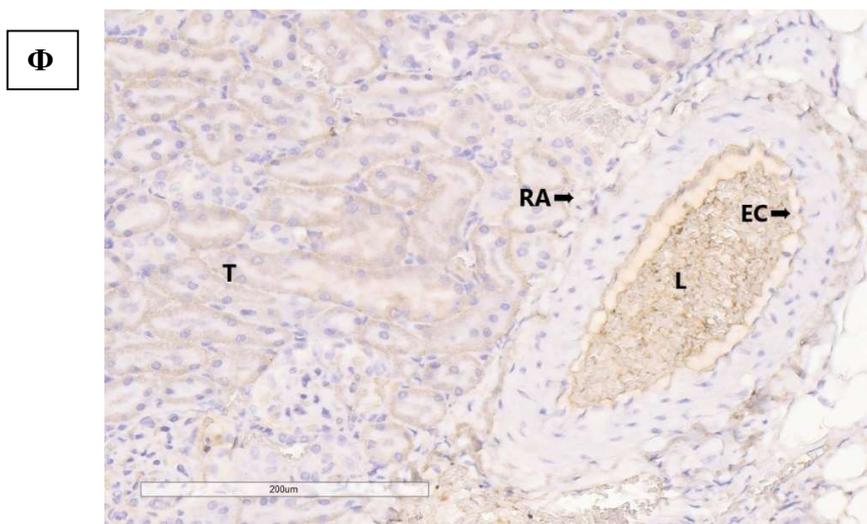
Резултатите от нашето изследване показват статистически значим по-нисък интензитет на експресия на SOD-1 при плъховете, подложени на ВФД, спрямо контролната група - $p < 0.0001$. При плъховете, подложени на ВФД и суплементация със S-AMe се наблюдава по-висока експресия на SOD-1, със статистическа значимост от $p < 0.0001$ (фиг.34).

3.2.2 Резултати, получени от имунохистохимичния анализ на експресията на SOD-1 в ендотелните клетки на интерлобарните артерии



Фиг.35. Имунохистохимично изследване с анти - SOD-1 в ендотелните клетки интерлобарните клонове на реналната артерия при плъхове от контролната група. Увеличение $\times 20$ (Aperio Image score – v12.3.3.5048) Легенда: К- контролна група; RA – интерлобарен клон на ренална артерия; L – лумен; EC – ендотелни клетки

Нашите резултати показват предимно слаб до липсващ интензитет в експресията на SOD-1 в ендотелните клетки на интерлобарните клонове на реналната артерия в контролната група експериментални животни (фиг.35).

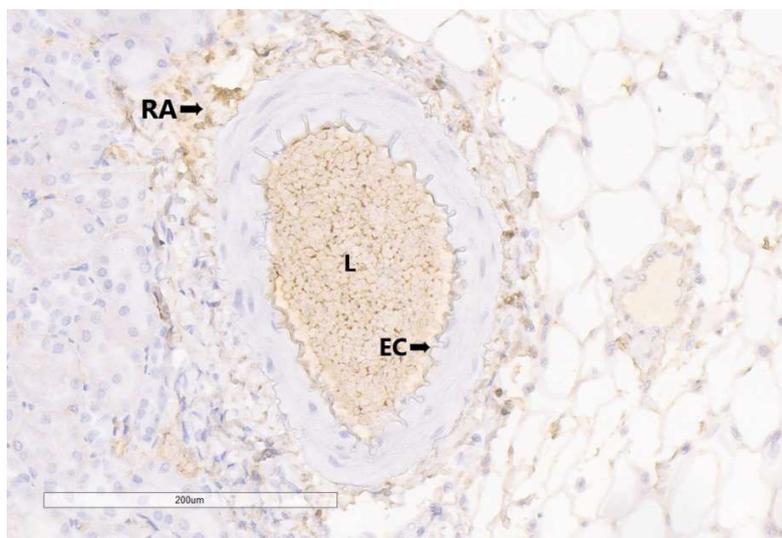


Фиг.36. Имунохистохимично изследване с анти - SOD-1 в ендотелните клетки на интерлобарните клонове на реналната артерия при плъхове от фруктозната група. Увеличение $\times 20$ (Aperio Image

score – v12.3.3.5048) Легенда: Ф- група на ВФД; Т-тубули; RA – интерлобарен клон на ренална артерия; ЕС – ендотелни клетки; L - лумен

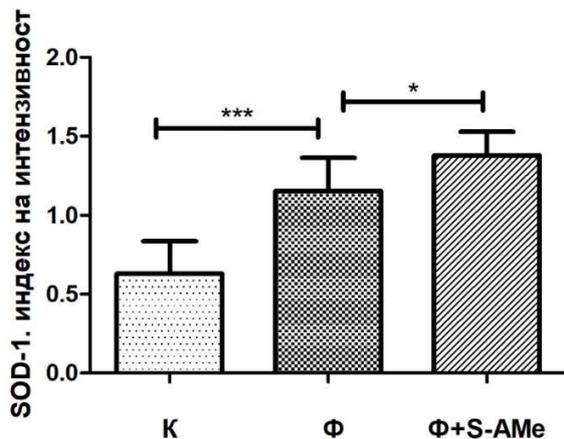
Имунохистохимичния анализ на SOD-1 в ендотелните клетки на интерлобарната артерия от фруктозната група демонстрира предимно слаб до умерен интензитет на експресия. Наблюдава се и изразена експресия на SOD-1 в проксималните и дисталните тубулни епителни клетки (фиг.36). Интензитетът на имунохистохимичната реакция е по-изразен спрямо контролната група.

Ф+ SAM



Фиг.37. Имунохистохимично изследване с анти - SOD-1 в ендотелните клетки на интерлобарните клонове на реналната артерия при плъхове от суплементираната със SAM група на ВФД. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image score – v12.3.3.5048) Легенда: Ф- група на ВФД и прием на SAM; RA– интерлобарен клон на ренална артерия; ЕС – ендотелни клетки; L – лумен

Нашите резултати показват покачване в степента на експресия на SOD-1 при суплементираната със SAM група. Наблюдават се клетки със слаба и умерена степен на SOD-1 експресия. Наблюдава се и интензивна експресия на SOD-1 в отделни клетки. Интензитетът на имунохистохимичната реакция в ендотелните клетки на тази група надвишава този, наблюдаван при контролната група (фиг.37).



Фиг.38. Индекс на интензивност на реакцията (ИИР) на SOD1 в ендотелните клетки на интерлобарните клонове на реналната артерия на плъхове от трите експериментални групи
 Легенда: Данните са представени като средна стойност ±стандартна грешка на средната (SEM), (n=8); К – контролна група; Ф – група на фруктозна диета; Ф+S-AMe – група на фруктозна диета и суплементация със S-AMe; * $p < 0,05$; ***- $p < 0,0001$ – статистическа значимост между контролата и третираните групи, t-test

Установяват се статистически значими разлики в експресията на SOD-1 сред трите групи плъхове. ИИР на SOD-1 експресия във фруктозната група е по-висока спрямо контролната група, което е със статистическа значимост от *** $p < 0,0001$. Суплементацията със S-AMe при плъхове, подложени на ВФД демонстрира статистически значима по-висока експресия на SOD-1 спрямо фруктозната група - * $p < 0,05$ (фиг.38).

3.2.3 Обсъждане

Все повече доказателства сочат, че хроничната консумация на фруктоза чрез свръхпроизводството на АФК, допринася за дисрегулацията на физиологичните процеси и е водеща причина за диабет и сърдечно-съдови заболявания. В състояние на оксидативен стрес, при което голямо количество биологични оксиданти водят до дисбаланс между окисление и антиокисление *in vivo*, клетъчните супероксидни радикали активират различни индуктори на апоптоза чрез индукцията на определени транскрипционни фактори или директно водят до липидна пероксидация, увреждане на протеини и ДНК и нарушения в ензимната експресия (Zheng M et al., 2023). От значение за патогенната роля на супероксидните радикали е и способността им посредством активация на NF-kB сигналния път да индуцират експресията на множество проинфламаторни медиатори, като IL-1, IL-6, TNF- α и iNOS. Реактивните кислородни радикали (АФК) и азотният оксид (NO), генериран от iNOS са способни да предизвикат драматична каскада от събития, поради генерирането на пероксинитрили, силно токсични метаболити, които водят до развитие на ендотелна дисфункция (Dinh et al., 2014) и атеросклероза. Взаимодействието между АФК и проинфламаторни медиатори генерира един негативен самоподдържащ се цикъл между хроничното нискостепенно възпаление и оксидативния стрес. Поради това, клетките

разполагат с вродена защитна антиоксидантна система за поддържане на АФК във физиологично нормални нива, отговорна за трансформирането на свободните радикали в стабилни и предпазване от неблагоприятните ефекти на оксидативния стрес.

CnZnSOD (SOD1) представлява ключова антиоксидантна ензимна система, която катализира дисмутацията на супероксида $O_2^{\bullet-}$ до водороден пероксид (H_2O_2) и молекулярен кислород. SOD1 е изобилен цитозолен протеин, но присъства и в митохондриалното интермембранно пространство (IMS). Според редица изследвания недостига на SOD1 води до натрупването на пероксинитрите и съдови вътреклетъчни супероксиди, поради което е пряко свързан с обостряне на миокардния оксидативен стрес, левокамерна хипертрофия, фиброза и дисфункция (Lu et al., 2008; Van et al., 2008). SOD1 съставлява 60-80% от активността на SOD в бъбреците и също така има важна роля в кръвоносните съдове, където запазва освобождаването на NO от ендотела (Mugge et al., 1991). Дефицитът на SOD1 според проучвания на Jung и съавт. (2003) се свързва с дисфункция на ендотелната релаксация и намалени базални васкуларни нива на NO *in vivo* и *in vitro* (Jung et al., 2003). Освен това, *ecSOD*^{-/-} мишки демонстрират засилен хипертензивен отговор след индукция с ангиотензин II и ренин, който се повлиява благоприятно чрез *in vivo* лечение с *ecSOD* миметик (Jung et al., 2003). Ние предполагаме, че фруктозно-индуцираното свръхпроизводство на АФК в условия на дефицит на SOD1 е най-вероятната причина за намаляването на бионаличността на NO и развитието на ендотелна дисфункция.

Резултатите от имунохистохимичния анализ на експресията на SOD1 в кардиомиоцитите показват статистически значимо понижаване в експресията на SOD1 във Фру група спрямо контролата (фиг.34). Ние предполагаме, че потенциална причина зад понижаването в нивата на SOD1 е свръхпроизводството на АФК при фруктозно натоварване, което активира антиоксидантната ензимна система и води до изчерпването на клетъчните антиоксиданти като SOD1. В проучване на Souza Cruz и съавт, се установява, че при млади възрастни плъхове Wistar (на 2 месеца), поставени на диета с 40% захароза в продължение на 6 месеца, се развива затлъстяване, IR, дислипидемии, значително увеличение на чернодробния MDA и значително понижаване на SOD и глутатион, които са характерни за ОС при затлъстяване (Souza Cruz et al., 2020). Фруктозно-индуцираната хипергликемия е от особено значение за повишената липидна пероксидация и оксидативен стрес при плъхове на ВФД. Продължителното излагане на плъховете на високи серумни глюкозни нива води до мощно натрупване на свободни радикали вследствие на автоокисляване на глюкозата, протеиново гликиране и натрупване на AGEs (Nandhini et al., 2005), което от своя страна води до изтощаване на антиоксидантната активност и намаляване на нивата на SOD1. Хипотезата, че антиоксидантните ензими могат да бъдат увредени от оксидативния стрес и/или реакции на гликиране се доказва в *in vitro* проучвания, които показват способността на фруктозата да гликира лизинови остатъци на CnZnSOD и да го инактивира (Oda et al., 1994; Yan et al., 1997; Pigeolet et al., 1990)

За разлика от кардиомиоцитите, имунохистохимичния анализ на експресията на SOD1 в ендотелните клетки на интерлобарната артерия при групата на ВФД е статистически

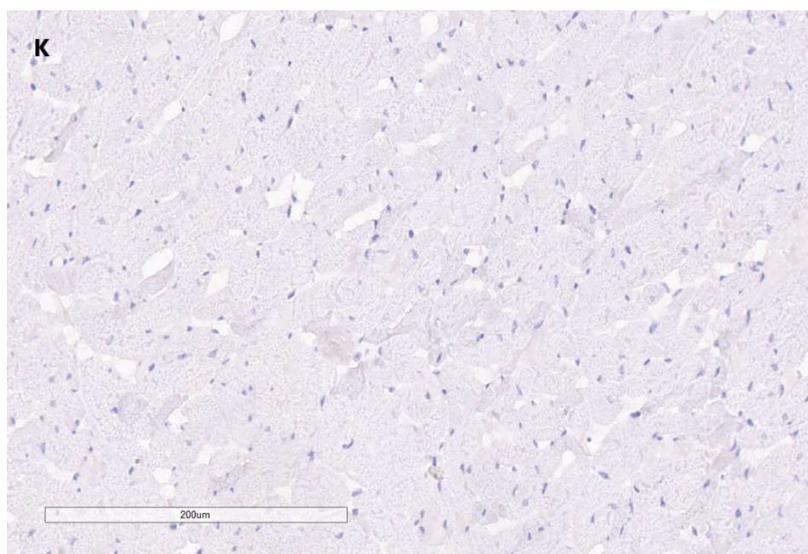
значимо по-висока в сравнение с контролата (фиг.38). Това, което наблюдавахме бе значителна експресия както в цитозола на ендотелните клетки на реналната артерия, така и в подлежащата гладкамускулатура и периваскуларна мастна тъкан. Предполагаме, че високите нива на SOD1 се дължат недвусмислено на индуцирания от фруктозното натоварване оксидативен стрес и хронично нискостепенно възпаление, което налага нуждата от SOD1 да се произвежда в по-големи количества, за да поддържа хомеостазата между прекомерни нива на АФК и антиоксидантите в тялото.

S-Аденозил-1-метионин (SAM), важен регулатор на клетъчния растеж, диференциация и функция, играе изключителна роля в протекцията срещу оксидативен стрес и възпаление. В нашия експериментален модел суплементираните със SAM плъхове демонстрираха статистически значима по-висока експресия на SOD1 както в ендотелните клетки на интерлобарната артерия, така и в кардиомиоцитите (фиг.34, фиг.38). В своето проучване Cavallaro и съавт. установяват, че суплементацията със SAM предотвратява оксидативния стрес чрез модулиране на нивата на GSH и активността на SOD при TgCRND8 мишки, хранени с диета с дефицит на витамин B (Cavallaro et al., 2010). Освен че възстановява концентрацията на митохондриалния глутатион, SAM намалява и концентрацията на TNF α и повишава експресията на интерлевкин 10 (IL-10) (Purohit et al., 2007). В друго проучване е установено, че SAM селективно индуцира апоптотичен фактор, Bcl-xS, по време- и дозозависим начин в HepG2 клетки, но не и в нормални хепатоцити, чрез увеличаване на алтернативния сплайсинг на Bcl-x, което предполага механизъм, чрез който SAM може да индуцира апоптоза на неопластични, но не и на нормални чернодробни клетки (Yang et al., 2004). В редица изследвания е доказано, че суплементацията със SAM чрез повишаване на експресията на SOD1 влияе значително върху модулирането на възпалителния отговор и инсулиновата резистентност чрез инхибиране на IKK- β /NF- κ B пътя, поттискане на експресията на TNF- α и метилирането на специфични ДНК последователности или протеини, участващи в инсулиновия сигнален път (Hosea Blewett et al., 2008; Moon et al., 2010). По този начин нашия модел демонстрира, че SAM, покачвайки експресията на SOD1 при плъхове на ВФД, предпазва не само от развитието на ендотелна дисфункция и апоптоза, но и поттиска възпалителния отговор и подобрява инсулиновото сигнализиране. В подкрепа на това са и резултатите, получени от морфометричния анализ на лява камера, който установява положителните ефекти на SAM върху структурата на лява камера при плъхове на ВФД.

В заключение можем да обобщим, че суплементацията със SAM упражнява съдовопротективно и кардиопротективно действие чрез повишаване на експресията на SOD1 и NOS3 и намаляване на експресията на VCAM и RIP3 при плъхове на ВФД.

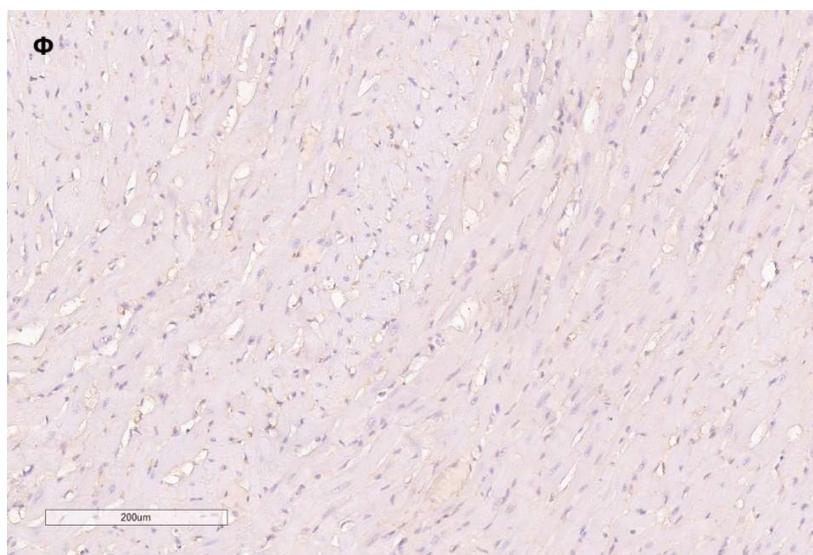
3.3. Вариации в експресията на RIP3 при ВФД и промени след прием на SAM

3.3.1 Резултати, получени от имунохистохимичния анализ на експресията на RIP3 в кардиомиоцитите



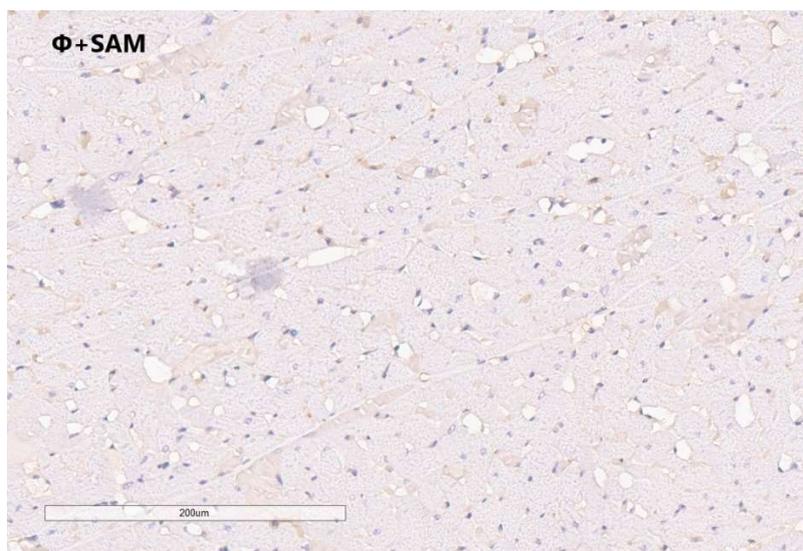
Фиг.39. Имуностохимично изследване с анти -RIP 3 в кардиомиоцити (перинуклеарно).
Увеличение $\times 0.20$ (Aperio Image score – v12.3.3.5048) Легенда: К- контролна група

Резултатите от нашето изследване показват предимно слаба до много липсваща експресия на RIP3 в кардиомиоцитите на контролната група експериментални животни (фиг.39).



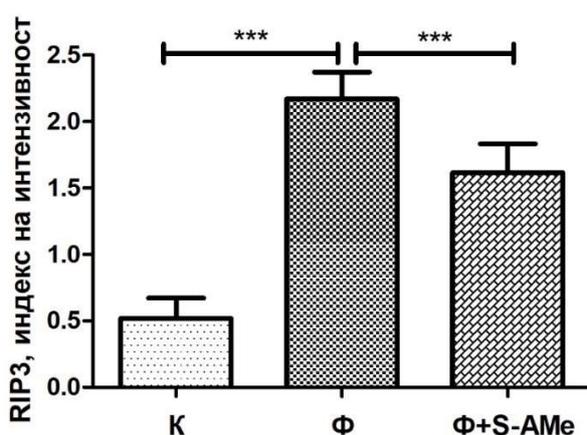
Фиг.40. Имуностохимично изследване с анти -RIP 3 в кардиомиоцити (перинуклеарно).
Увеличение $\times 0.20$ (Aperio Image score – v12.3.3.5048) Легенда: Ф- фруктозна група

За разлика от контролна група, в групата на ВФД се наблюдава предимно умерена до много интензивна експресия на RIP3 под формата на жълто-кафеникави гранули в цитоплазмата на кардиомиоцитите (фиг.40).



Фиг.41. Имунохистохимично изследване с анти -RIP 3 в кардиомиоцити (перинуклеарно).
Увеличение $\times 0.20$ (Aperio Image scope – v12.3.3.5048)
Легенда: Ф+SAM- група на ВФД и прием на SAM

Имунохистохимичния анализ демонстрира предимно слаб до умерен интензитет на експресия на RIP-3 кардиомиоцитите (перинуклеарно) при плъховете от групата на ВФД и прием на SAM, който се доближава до интензитета на експресия в контролната група. Интензитетът на имунохистохимичната реакция в кардиомиоцитите на суплементираната група се различава от този при фруктозната група поради наблюдавания спад в експресията на RIP3 след прилагане на екзогенен SAM (фиг.41). На фигура 42 се установяват статистически значими разлики в експресията на RIP3 в кардиомиоцитите от трите групи експериментални животни.

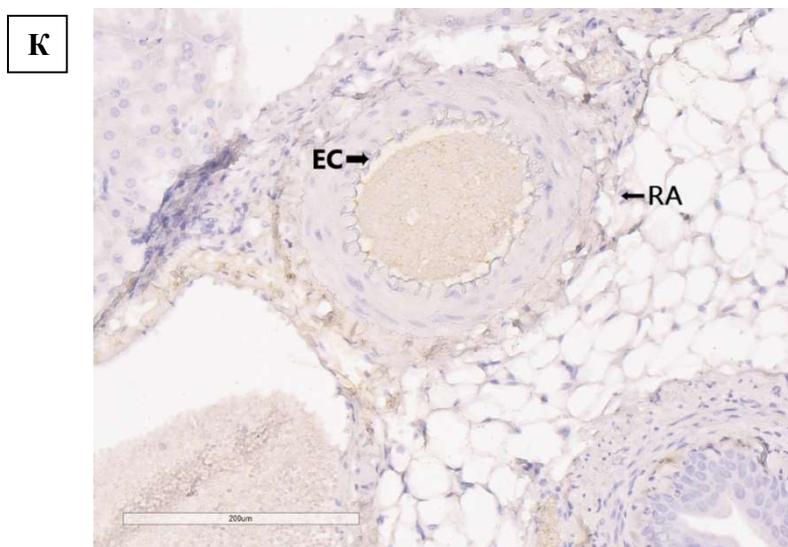


Фиг.42. Индекс на интензивност на реакцията (ИИР) на RIP3 в кардиомиоцити на плъхове от трите експериментални групи. Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (n=8); К – контролна група; Ф – група на фруктозна диета; Ф+S-AMe – група

на фруктозна диета и суплементация със S-АМе; ***- $p < 0001$ – статистическа значимост между контролата и третираните групи, *t-test*

Анализа на експресията на RIP3 в кардиомиоцитите установи статистически значими по-високи стойности във фруктозната група спрямо контролата, ***- $p < 0001$. Експресията на RIP3 в групата на ВФД и суплементация със S-АМе е по-ниска спрямо фруктозната група, със статистическа значимост от ***- $p < 0001$ (фиг.42).

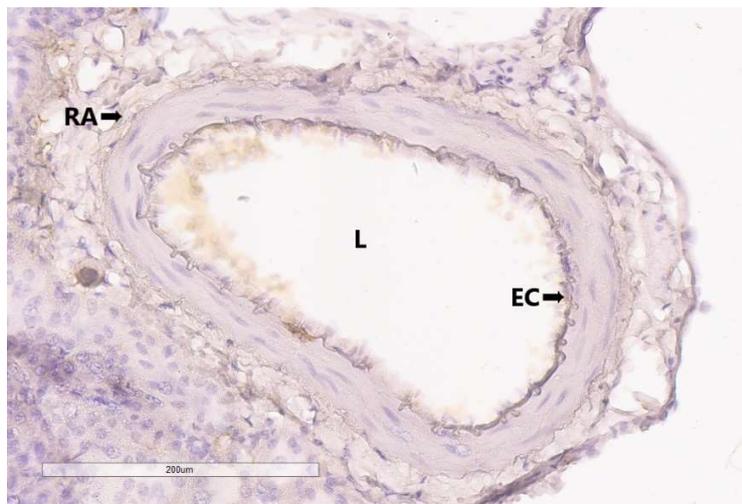
3.3.2 Резултати, получени от имунохистохимичния анализ на експресията на RIP3 в ендотелните клетки на интерлобарните артерии



Фиг.43. Имунохистохимично изследване с анти -RIP 3 в ендотелните клетки на интерлобарните клонове на реналната артерия. Увеличение $\times 0.4$; $\times 20$ (Aperio Image scope – v12.3.3.5048)
Легенда: K- контролна група; EC – ендотелни клетки; RA – интерлобарен клон на реналната артерия

Нашите резултати демонстрират предимно слаб до много липсващ интензитет на RIP-3 експресия в ендотелните клетки на интерлобарните артерии в контролната група плъхове (фиг.43).

Φ

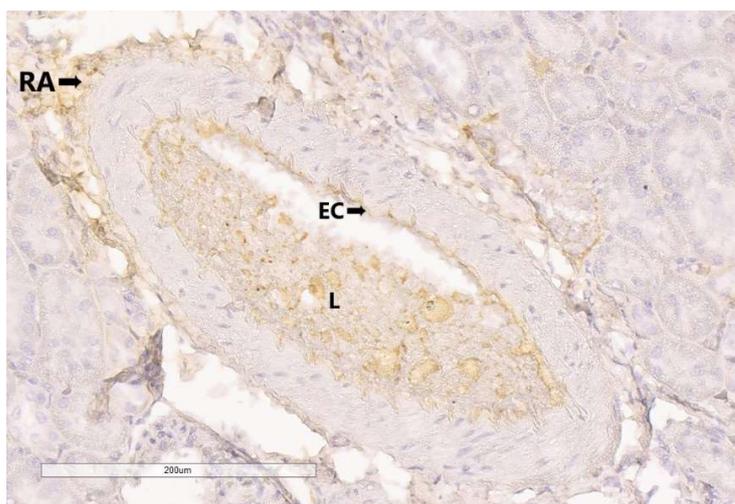


Фиг.44. Имунохистохимично изследване с анти -RIP 3 ендотелните клетки на интерлобарните клонове на реналната артерия. Увеличение $\times 0.4$ и $\times 0.20$ (Aperio Image score – v12.3.3.5048)
Легенда: Φ – група на ВФД; L – лумен; RA – интерлобарен клон на реналната артерия; EC – ендотелни клетки

Резултатите от нашето изследване демонстрират умерена до много интензивна експресия на RIP3 под формата на жълто-кафеникави гранули в цитоплазмата на ендотелните клетки на интерлобарните артерии. Лека експресия на RIP3 в групата на ВФД се наблюдава и в гломерулите, особено в проксималните и дисталните тубулни епителни клетки.

Интензитета на имунохистохимичната реакция тук се различава от тази при контролната, в която липсва експресия на RIP3 (фиг.44).

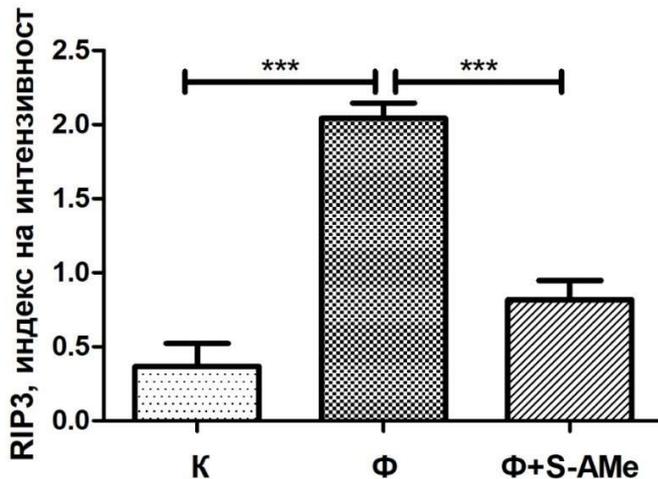
Φ+SAM



Фиг.45. Имунохистохимично изследване с анти -RIP 3 в ендотелните клетки на интерлобарните клонове на реналната артерия. Увеличение $\times 0.4$; $\times 20$ (Aperio Image score – v12.3.3.5048)
Легенда: Φ+SAM – пълхове на ВФД и суплементация със SAM; RA – интерлобарен клон на реналната

артерия; L – лумен; EC – ендотелни клетки

Резултатите от нашето изследване показват значимо намаляване в степента на експресия на RIP3 в групата на ВФД и суплементация със SAM. Наблюдават се предимно клетки със слаба до липсваща експресия на RIP3. Интензитетът на имунохистохимичната реакция в ендотелните клетки на суплементираната група се доближава до този на контролната (фиг.45).



Фиг.46. Индекс на интензивност на реакцията (ИИР) на RIP3 в ендотелните клетки на интерлобарните клонове на реналната артерия на плъхове от трите експериментални групи
Легенда: Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), (n=8); К – контролна група; Ф – група на фруктозна диета; Ф+S-AMe – група на фруктозна диета и суплементация със S-AMe; ***- p<0001 – статистическа значимост между контролата и третираните групи, t-test

Анализа на експресията на RIP3 в ендотелните клетки на интерлобарните артерии установи статистически значими по-високи стойности във фруктозната група спрямо контролата, ***- p<0001. Експресията на RIP3 в групата на ВФД и суплементация със S-AMe е значително по-ниска спрямо фруктозната група, със статистическа значимост от *** p<0001 (фиг.46).

3.3.3 Обсъждане

Рецептор-взаимодействащата протеин киназа-3 (RIPK3 или RIP3) и смесената линия на киназия домейн-подобен протеин (MLKL) представляват ключови молекули в „програмираната“ и „регулирана“ форма на клетъчна смърт, наречена некроптоза. RIP1-RIP3-MLKL-медираната некроптоза играе основна роля в патогенезата на множество заболявания, включително в прогресирането на асоциираната с метаболитна дисфункция стеатозна чернодробна болест (MASLD) (Shojaie et al., 2020), исхемично-реперфузионен синдром (Jun et al., 2020), атеросклероза и сърдечносъдови заболявания (Guo et al., 2022). Това се доказва и в проучвания на Wu и съавт, които демонстрират, че дефицита на RIP3

киназа предотвратява увреждане на черния дроб, предизвикано от диета, богата на мазнини и фруктоза (Wu et al., 2023). Според други плазмената концентрация на RIP3 при пациенти със сърдечна недостатъчност е значително по-висока от тази на здрави индивиди и повишаването на плазмения RIP3 е предиктор за лоша прогноза при пациенти със сърдечна недостатъчност (Hu X et al., 2020).

Нашите резултати демонстрират, че ВФД води до статистически значимо повишаване на експресията на RIP3 в кардиомиоцитите и ендотелните клетки на интерлобарната артерия спрямо контролната група (фиг.42, фиг.46). Според различни изследвания кардиоваскуларната и чернодробната токсичност на ВФД се дължи на развитието на оксидативен стрес, за който е установено, че повишава експресията на RIP3 (Kanazawa et al., 2022; Jarabíková et al., 2025).

Фруктозно-индуцираното затлъстяване и развитието на дисфункция на мастната тъка, което наблюдаваме в нашия експеримент може да бъде потенциална причина за повишената експресия на RIP1-RIP3. RIP3 и pMLKL се експресират повишено във висцералната бяла мастна тъкан (БМТ) при пациенти със затлъстяване и са положително корелирани с индекса на телесна маса и нарушените метаболитни серумни маркери, като HbA1c и инсулин (Gautheron et al., 2016). От друга страна, характерно за дисфункционалната мастна тъкан е и секрецията на провъзпалителни медиатори като TNF α , IFN γ , и FasL и техните рецепторни молекули TNFR1, IFNR, TLR3/4 и Fas/TRAILR, които могат да инициират сигналната каскада, водеща до некроптоза (Pinci et al., 2022).

Доказано е, че индуцираният от фруктозата оксидативен стрес води до повишена транслокация на транскрипционния фактор Nrf-2 към ядрото, намаляване на митохондриалната ДНК и митохондриална дисфункция, намалена активност на митохондриалните респираторни комплекси, и нарушен митохондриален енергиен метаболизъм (Jaiswal et al., 2015). Една от основните роли на митохондриите след патогенна стимулация е регулацията на клетъчната съдба и индуцирането на некроптоза, чрез продуциране на множество молекули. Така и в своето проучване Hou и съавт. демонстрират, че бионаличността на RIP3 в митохондриите, взаимодейства с MQC-свързан протеин Drp1, за да регулира структурата и функцията на митохондриите и по този начин насърчава развитието на кардиомиоцитна некроптоза след исхемично/реперфузионно увреждане (Hou et al., 2018). Това се доказва и в проучвания на Luedde и съавт, които установяват, че нокаута на RIP3 потиска развитието на кардиомиоцитна некроптоза при инфаркт на миокарда (Luedde et al., 2014). Zhang и съавт. установяват също, че дефицитът на RIP3 блокира I/R (или H/R) и доксорубицин - индуцирана миокардна некроптоза чрез предотвратяване на активирането на Ca²⁺-калмодулин-зависима протеин киназа (CaMKII) (Zhang et al., 2016). Ролата на RIP3 в патогенезата на възпалението и некроптозата е добре проучена, но все още липсват достатъчно доказателства и за ролята му в развитието на сърдечно-съдови заболявания. Поради това една от задачите, които си поставихме в нашето изследване, е да проучим дали експресията на RIP3 е свързана с развитието на миокардна хипертрофия. Това, което наблюдавахме е, че експресията на RIP3 в кардиомиоцитите на плъховете с левокамерна

хипертрофия е значително по-висока в сравнение с тази при контролите. Според Хуе и съавт., сръхекспресията на RIP3 е замесена в патогенезата на миокардната хипертрофия чрез насърчаване на транслокацията на MLKL в клетъчната мембрана, което допълнително увеличава вътреклетъчния приток на калций (Хуе et al., 2022), който до голяма степен медира вредните ефекти на RIP3 в сърдечното ремоделиране чрез активиране на калциево-активираната фосфатаза калциневрин. За да потвърдят това твърдение, Хуе и съавт., прилагат лечение с калциеви блокери (LaCl₃ и 2-APB) на мишки със свръхекспресия на RIP3 (oe-RIP3 rats), при което установяват, че блокирането на притока на калций действа обратимо на RIP3-медираното сърдечно ремоделиране (Хуе et al., 2022).

RIP3-MLKL некроптотичният път е свързан и с развитието на ендотелна дисфункция и атеросклероза. В сравнение с нормалните артерии, експресията на RIP3 и MLKL иРНК е значително повишена в напреднали атеросклеротични плаки и мишки с RIP3^{-/-} са защитени от развитието на атеросклероза (Karunkaran et al., 2016). Фруктозно-индуцираната дислипидемията, в частност повишените нива на oxLDL, индуцират експресията на некроптотичните гени за RIP3 и MLKL и насърчават регулацията нагоре и фосфорилирането на протеина RIP3 – ключов момент за иницирането на некроптотичния клетъчен процес (Cho Y et al., 2009). Така и в своето проучване Karunkaran и съавт. установяват, че индуцираната от oxLDL некроптоза е независима от активирането на инфлазомата, тъй като клетките с дефицит на каспаза-1 или третирани с инхибитори на каспаза-1 претърпяват некроптотична клетъчна смърт в отговор на oxLDL в същата степен като нетретирани клетки (Karunkaran et al., 2016). В друго проучване Xu et al. демонтират, че високата концентрация на глюкоза насърчава развитието на некроптоза и апоптоза в подоцитите и повишава експресията на RIPK1 и MLKL, което се наблюдава в бъбреците на пациенти с диабет в сравнение с контролната група (Xu et al., 2019).

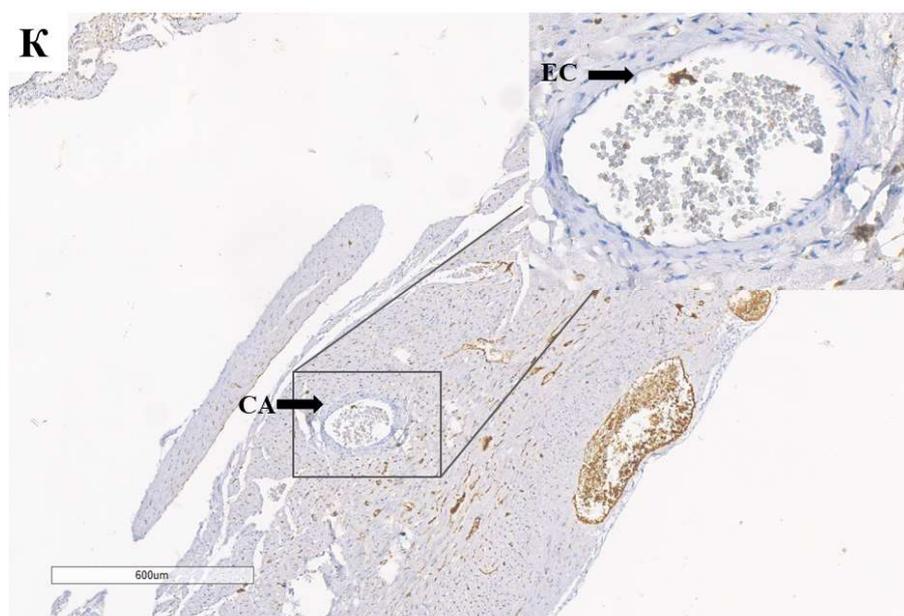
Характерно за хроничната фруктозна консумация е, че посредством различни механизми като формиране на AGEs и АФК, увеличаване на експресията на VCAM-1 и намаляване на нивата на NO може да предизвика хипоксия и дефинитивно увреждане на ендотелните клетки. Според различни проучвания, експресията на ендотелен RIP3 е естествено висока в миши ембриони на средна възраст в етапа от развитието, в който те са най-хипоксични, а именно преди установяването на фетално-плацентарната циркулация (Linask et al., 2014; Newton et al., 2014). Доказано е също, че хипоксията допринася за повишена експресия на RIPK3 в култивирани човешки хепатоцити и миши невронни клетъчни линии (Zhang H et al., 2021; Yang XS et al., 2017). Освен това, няколко миши модела на исхемични заболявания са подобрени при Ripk3^{-/-} фон, което предполага, че индуцираната от хипоксия RIPK3 експресия води до съдова патология (Zhang et al., 2016; Luedde et al., 2014). Поради това смятаме, че фруктозната консумация, чрез множеството метаболитни нарушения, които предизвиква, повишава директно и индиректно експресията на RIP3.

Добре известно е, че повишената консумация на богати на фруктоза храни и напитки е пряко свързана с развитието на оксидативен стрес, инсулинова резистентност, дислипидемия и цитотоксичност вследствие на свръхпроизводството на реактивни

кислородни радикали (АФК). Съобщава се, че митохондриалния синтез на АФК инициира некроптозата, а активираният RIP3 индуцира допълнително фосфорилиране на MLKL и производство на АФК, образувайки един порочен кръв в патогенезата на некроптозата (Zhang Y et al., 2017). Нашите резултати показват статистически значимо понижаване на експресията на RIP3 в групата с прием на SAM спрямо Фру група (фиг.42, фиг.46). Прилагането на екзогенния антиоксидант SAM в нашето проучване затвърждава ролята на ОС в патогенезата на некроптозата.

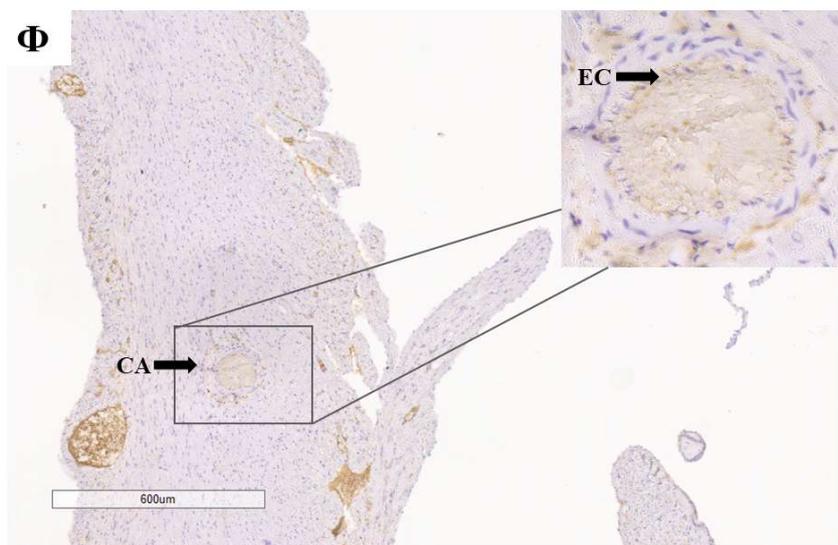
3.4. Вариации в експресията на VCAM при ВФД и промени след прием на SAM

3.4.1 Резултати, получени от имунохистохимичния анализ на експресията на VCAM в ендотелните клетки на коронарните артерии



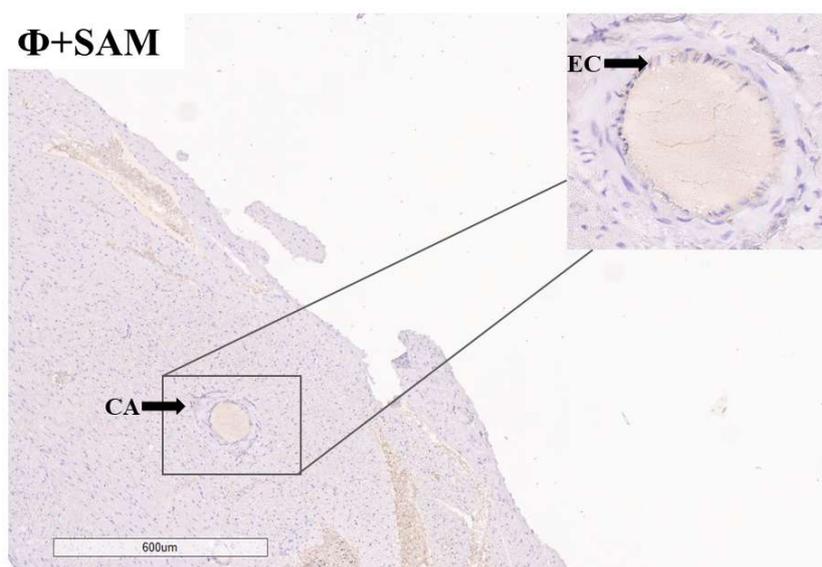
Фиг.47. Имунохистохимично изследване с анти – VCAM в ендотелните клетки на коронарните съдове на плъхове от контролната група. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope – v12.3.3.5048)
Легенда: К- контролна група; СА – коронарна артерия; ЕС – ендотелни клетки

Нашите резултати демонстрират предимно слаба до липсваща експресия на VCAM в ендотелните клетки на коронарните съдове при плъховете от контролната група (фиг.47).



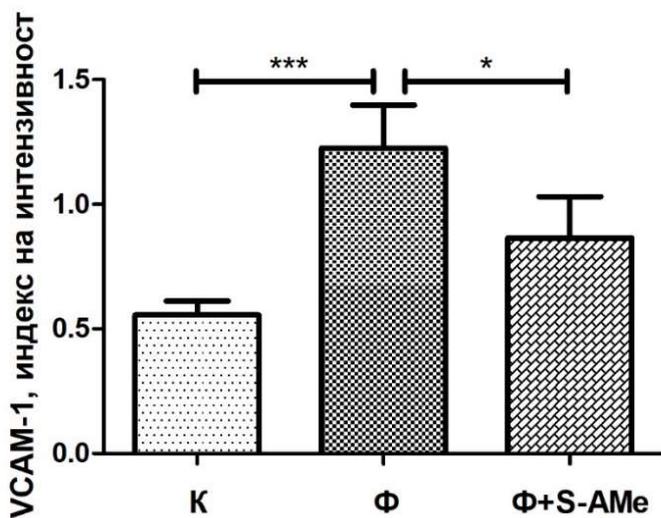
Фиг.48. Имунохистохимично изследване с анти – VCAM в ендотелните клетки на коронарните съдове на плъхове от групата на ВФД. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image score – v12.3.3.5048) Легенда: Φ - група на ВФД; CA – коронарна артерия; EC – ендотелни клетки

Имунохистохимичния анализ на VCAM показва предимно умерена до силно интензивна степен на експресия в ендотелните клетки на коронарните съдове в групата на ВФД в сравнение с контролата (фиг.48).



Фиг.49. Имунохистохимично изследване с анти – VCAM в ендотелните клетки на коронарните съдове на плъхове от групата на ВФД и прием на SAM. Увеличение $\times 8$ (Aperio Image score – v12.3.3.5048) Легенда: Φ +SAM- група на ВФД и прием на SAM; CA – коронарна артерия; EC – ендотелни клетки

Резултатите от нашето изследване демонстрират спад в степента на експресия на VCAM в групата на ВФД и прием на антиоксиданта SAM. За разлика от фруктозната група, в суплементираната със SAM група се наблюдават основно клетки със слаба степен и по-малко с умерена степен на експресия на VCAM. Експресията на VCAM в тази група се доближава до тази в контролната (фиг.49). При статистически анализ бяха установени значими разлики в експерименталните групи животни (фиг.50).



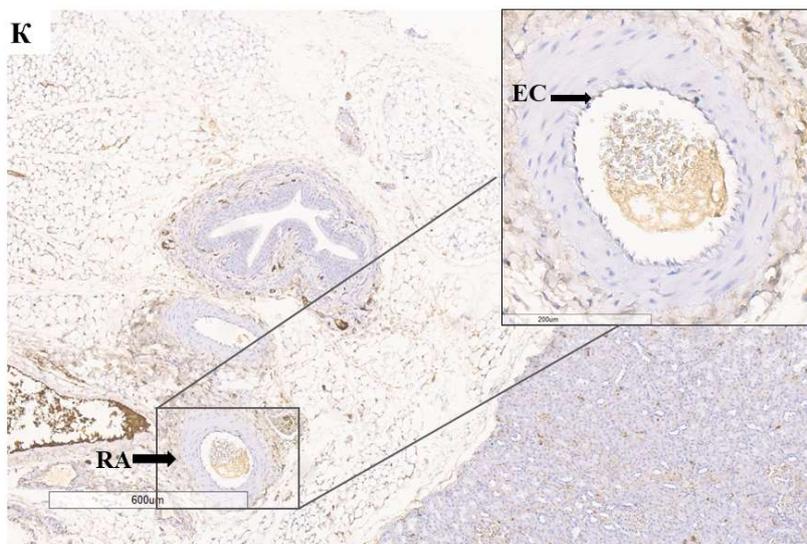
Фиг.50. Индекс на интензивност на реакцията (ИИР) на VCAM в ендотелни клетки на коронарни съдове на плъхове от трите експериментални групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (n=8); К – контролна група; Ф – група на фруктозна диета; Ф+S-AMe – група на фруктозна диета и суплементация със S-AMe; *- $p < 0,05$; ***- $p < 0001$ – статистическа значимост между контролата и третираните групи, t-test

Ендотелната експресия на VCAM е по-засилена при плъховете от фруктозната група, спрямо контролната група, със статистическа значимост от ***- $p < 0001$.

Суплементираните със S-AMe плъхове на ВФД демонстрират статистически значимо редуциране на експресията спрямо фруктозната група - *- $p < 0,05$ (фиг.50).

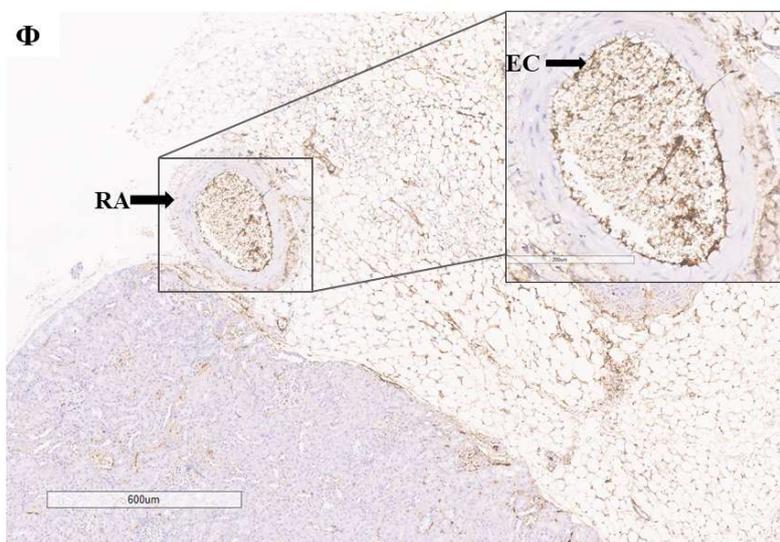
3.4.2 Резултати, получени от имунохистохимичния анализ на експресията на VCAM в ендотелните клетки на интерлобарните артерии



Фиг.51. Имунохистохимично изследване с анти-VCAM-1 в ендотелните клетки на интерлобарен клон на *a.renalis*. Увеличение $\times 4$; $\times 20$ (Aperio Image scope – v12.3.3.5048)

Легенда: К- контролна група; RA – интерлобарен клон на ренална артерия; EC – ендотелни клетки

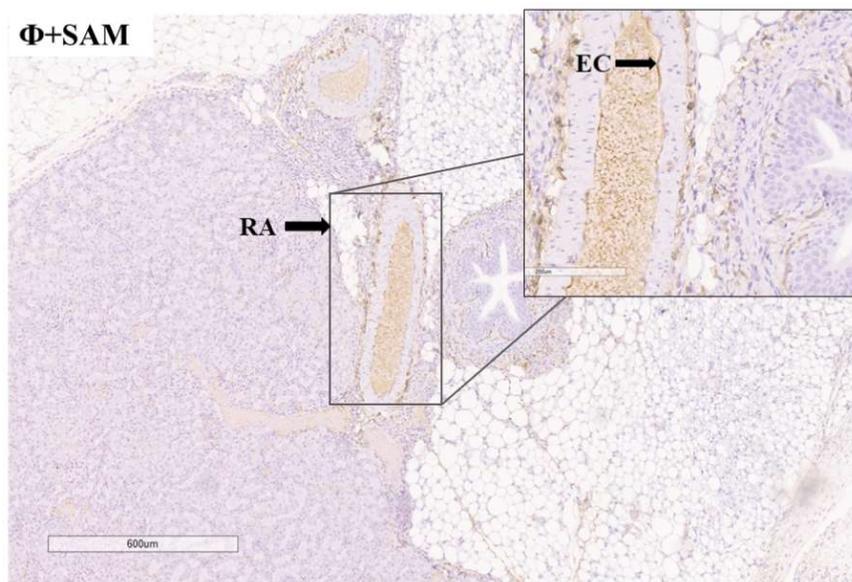
Нашите резултати демонстрират предимно слаб интензитет на експресия на VCAM в ендотелните клетки на реналната артерия при плъховете от контролната група. Наблюдават се и клетки с липсваща и умерена експресия, но в по-малка концентрация спрямо тези със слаба експресия (фиг.51).



Фиг.52. Имунохистохимично изследване с анти-VCAM-1 в ендотелните клетки на интерлобарен клон на *a.renalis*. Увеличение $\times 4$; $\times 20$ (Aperio Image scope – v12.3.3.5048)

Легенда: Ф- плъхове на ВФД; RA – интерлобарен клон на ренална артерия; EC – ендотелни клетки

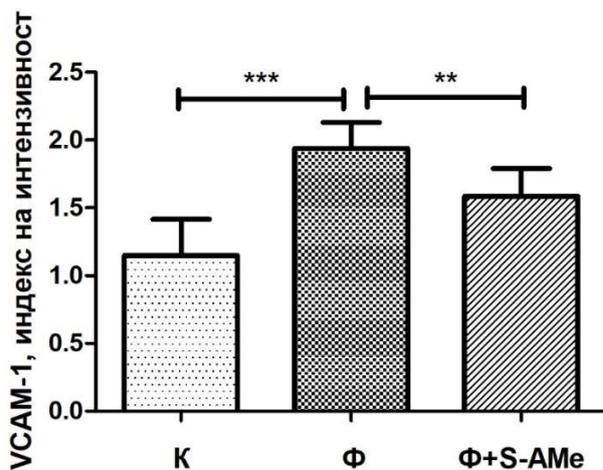
Имунохистохимичния анализ на VCAM показва предимно умерена до силно интензивна степен на експресия в ендотелните клетки на интерлобарната артерия в групата на ВФД спрямо контролата (фиг.52).



Фиг.53. Имунохистохимично изследване с анти-VCAM-1 в ендотелните клетки на интерлобарен клон на *a.renalis*. Увеличение $\times 20$ (Aperio Image scope – v12.3.3.5048)

Легенда: Φ+SAM- плъхове на ВФД и прием на SAM; RA – интерлобарен клон на ренална артерия; EC – ендотелни клетки

Резултатите от нашето изследване демонстрират понижаване в степента на експресия на VCAM в групата на ВФД и прием на антиоксиданта SAM спрямо фруктозната група. Наблюдават се основно клетки със слаба степен и по-малко с умерена степен на експресия на VCAM, като интензитета на експресия се доближава до този в контролната група (фиг.53).



Фиг. 54. Индекс на интензивност на реакцията (ИИР) на VCAM в ендотелните клетки на интерлобарните клонове на реналната артерия на плъхове от трите експериментални групи
 Легенда: Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), (n=8); К – контролна група; Ф – група на фруктозна диета; Ф+S-AMe – група на фруктозна диета и суплементация със S-AMe; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,0001$ – статистическа значимост между контролата и третираните групи, t-test

Резултатите от имунохистохимичното изследване установяват статистически значима разлика между нивата на ендотелна експресия на VCAM в ендотелните клетки на интерлобарната артерия при третираните групи. Наблюдават се по-високи стойности на VCAM експресия във фруктозната група, в сравнение с контролната, със статистическа значимост от ***- $p < 0,0001$. Експресията на VCAM от своя страна е по-ниска при плъхове, подложени на ВФД и суплементация със S-AMe, спрямо групата на изолирана ВФД, със статистическа значимост от ** - $p < 0,01$ (фиг.54).

3.4.3 Обсъждане

Възпалението играе централна роля в развитието на атеросклероза и ССЗ, като е установено, че инхибирането на експресията на адхезионните молекули намалява обема на плаката при животински модели, вероятно чрез намаляване на набирането на моноцити от кръвта (Nageh et al., 1998).

Съдовата адхезионна молекула-1 (VCAM-1) е член на суперсемейството на имуноглобулините и е идентифицирана за първи път като адхезионен трансмембранен гликопротеин, експресиран върху повърхността на цитокин-активирани ендотелни клетки (Osborn et al., 1989). Установено е, че различни провъзпалителни цитокини (TNF- α , IL-1 β и др.), реактивни кислородни видове (АФК), хипергликемия, агонисти на toll-подобния рецептор и модифицирани LDL индуцират експресията на VCAM-1 (Cook-Mills et al., 2011). Свързването на VCAM-1 с неговия интегринов рецептор (VLA-4) медира клетъчни взаимодействия, като набирането на мононуклеарни левкоцити към съдовите

лезии, наблюдавани при ранна атеросклероза (Lavie et al., 1999), поради което VCAM се счита за биомаркер за ендотелна дисфункция. По време на възпалителния процес, VCAM-1 активира ендотелните клетки, стимулира калциевия приток и Rac1, като по този начин допълнително активира NADPH оксидаза 2, което води до генериране на АФК и развитие на оксидативен стрес (Marchese et al., 2012).

Свръхконсумацията на добавена фруктоза, под формата на HFCS, индуцира различни метаболитни промени, които водят до нискостепенно хронично възпаление, ОС, инсулинова резистентност и затлъстяване (Basciano et al., 2005). В нашето проучване беше изследвана експресията на VCAM с цел да се установи зависимост между адипоцитната дисфункция, оксидативния стрес, маркерите за ендотелна дисфункция и хроничното нискостепенно възпаление при експериментален модел на затлъстяване. Резултатите след обременяване на плъхове с ВФД установи статистически значимо повишаване в експресията на VCAM спрямо контролата. За разлика от това в групата, суплементирана със SAM беше установено статистически значимо понижаване в нивата на VCAM спрямо контролната група (фиг.50, фиг.54). Тези промени бяха наблюдавани в ендотелните клетки на коронарните съдове и интерлобарната артерия. Ние предполагаме, че повишаването на нивата на VCAM се дължи най-вече на хронично нискостепенно възпаление и оксидативен стрес. Резултатите от нашето проучване се потвърждават и в различни проучвания, които демонстрират, че прекомерната консумация на фруктоза води до бурен възпалителен отговор чрез секреция на провъзпалителни цитокини като TNF- α , IL-1 β и др. Според Kim и съавт. TNF- α -активирана c-Src киназа и NF- κ B увеличават експресията на VCAM-1 (Kim SH et al., 2010), MCP-1 и освобождаването на разтворим ICAM-1 от остеобластоподобни MC3T3-E1 клетки (Tsai et al., 2014). Повишената експресия на тези цитокини от своя страна увеличава макрофагеалната инфилтрация в адипоцитите (Glushakova et al., 2008; Cook-Mills et al., 2011) и допълнително утежнява развилия се вече възпалителен процес.

Съдовите ендотелни клетки са постоянно подложени на влиянието на хемодинамични фактори, като (shear) стрес, наложен от кръвния поток (Kunsch et al., 1999). Различни проучвания изследват влиянието на флуидния (shear) стрес върху ендотелната функция и генната експресията, като някои от тях установяват, че флуидния стрес променя адхезивната активност на левкоците чрез увеличаване на експресията на ICAM-1 и VCAM-1 (Chiu et al., 1998). Други проучвания демонстрират, че увеличеният кръвен поток и флуидния стрес променят редокс състоянието на ендотелни клетки и редокс-чувствителната генна експресия. Според Chui и съавт. индуцираното от (shear) стрес повишаване на вътреклетъчни нива на супероксиди, ICAM-1 и РНК и промоторните активности могат да бъдат блокирани от n-ацетил цистеин (NAC) и супероксид дисмутаза (SOD) (Chiu et al., 1997), което намалява ОС и хроничното нискостепенно възпаление, наблюдавани в нашия експериментален модел на фруктозно-индуцирано затлъстяване.

Постоянната хипергликемия представлява важен рисков фактор, който модулира васкуларната генна експресия. Множество автори констатираат, че високите концентрации на глюкоза стимулират генерирането на супероксидни аниони и засилват клетъчно-медираната LDL пероксидация в ендотелните клетки (Kunsch et al., 1999 и др.). В

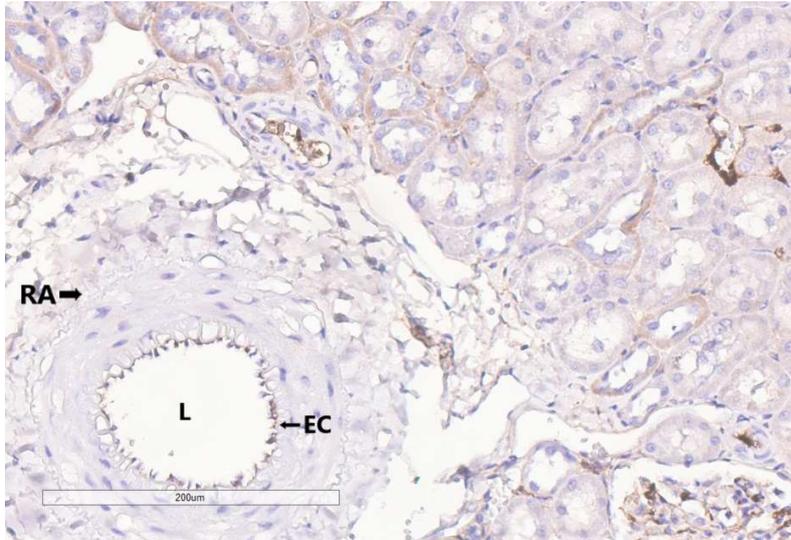
допълнение, инкубацията на ендотелни клетки с високи концентрации на глюкоза води до повишено активиране на NF-κB сигналния път (Pieper et al., 1997), който увеличава експресията на адхезионни молекули (ICAM-1, VCAM-1). NF-κB е редокс-чувствителен транскрипционен фактор с ключово значение за съдовото възпаление, който се активира от различни възпалителни медиатори, атерогенни липопротеини, хипергликемия и АФК (Zhang WJ et al., 2001). Този сигнален път е с ключово значение за съдовото възпаление, тъй като неговата активация при фруктозно наговарване увеличава генната експресия на VCAM-1 и подпомага нарастването на атеросклеротичната плака.

От друга страна възпалителните медиатори като TNF-α, IL-1β, ангиотензин II (Ang II) и интерферон-γ активират мембранно свързаната NADPH оксидаза и увеличават производството на АФК в ендотелните клетки (Matsubara et al., 1986). Това се доказва и в проучване на Tummala и съавт., които демонстрират, че прилагането на дифенилен йодониум, инхибитор на NADPH оксидазата, потиска TNF-индуцираното производство на супероксид в ендотелните клетки (Tummala et al., 1996). Твърдението, че АФК могат да функционират като сигнални молекули за модулиране на експресията на васкуларни гени се подкрепя от наблюдението, че инхибиторите на NADPH оксидаза блокират индуцираната от цитокини експресия на VCAM-1 и ICAM-1 в човешки аортни ендотелни клетки и отслабват Ang II-медираното активиране на VCAM-1 и MCP-1 в ГЛМК (Chen XL et al., 1997; Tummala et al., 1996).

Значението на ОС за промените в експресията на VCAM се доказва и в нашия експериментален модел. Прилагането на антиоксиданта SAM намали значително експресията на VCAM, което подчертава патогенетичната връзка оксидативен стрес – нискостепенно възпаление (фиг.50, фиг.54). Прилагането на SAM вероятно чрез потискане на активността на редокс-чувствителния транскрипционен фактор NF-κB, намалява нивото на провъзпалителните медиатори като TNF-α, CRP и VCAM в нашите изследвания, което допринася за подобряване на ендотелната функция при фруктозно натоварване.

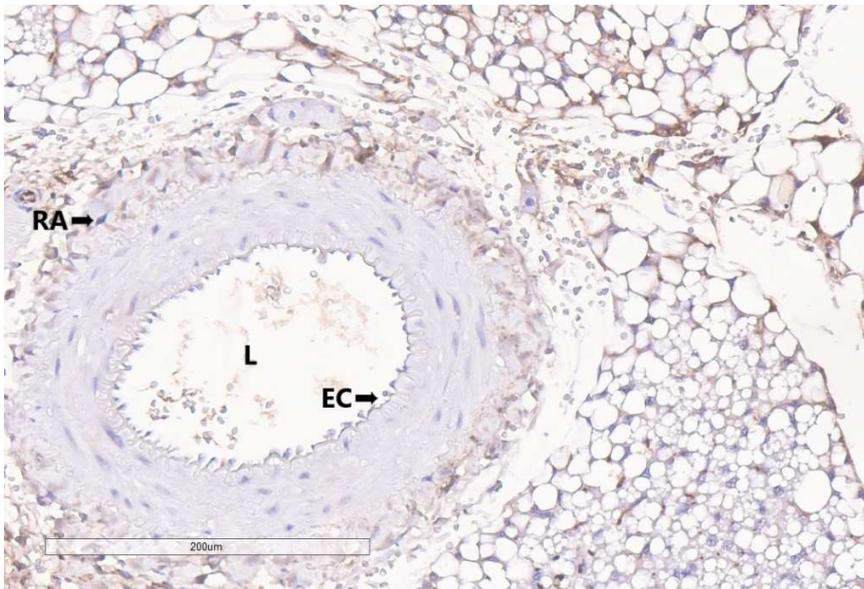
3.5. Промени в експресията на NOS3 в ендотелните клетки на интерлобарната артерия при ВФД и промени след суплементация със SAM

3.5.1 Резултати, получени от имунохистохимичния анализ на експресията на NOS3 в ендотелните клетки на интерлобарните артерии

К

Фиг.55. Имунохистохимично изследване с анти – NOS3 в ендотелните клетки на интерлобарните клонове на реналната артерия при плъхове от контролната група .Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image score – v12.3.3.5048) Легенда: К – контролна група; RA – интерлобарен клон на ренална артерия; EC – ендотелни клетки; L - лумен

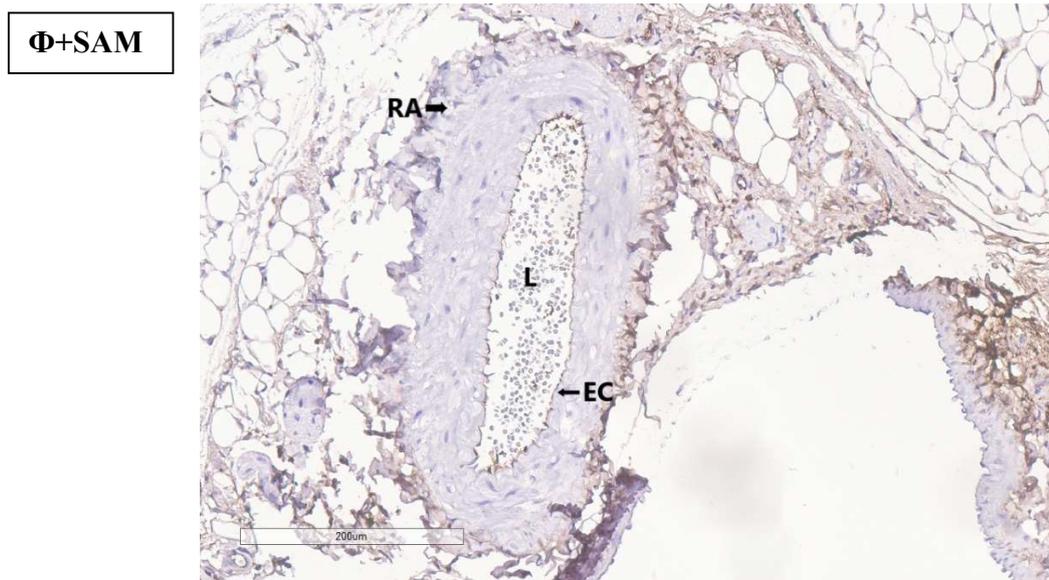
Имунохистохимичния анализ на NOS3 в контролната група демонстрира предимно умерен до много силен интензитет на експресия в ендотелните клетки на интерлобарната артерия. Наблюдава се и изразена дифузна експресия на NOS3 в тубуларните епителни клетки (фиг.55).

Ф

Фиг.56. Имунохистохимично изследване с анти – NOS3 в ендотелните клетки на интерлобарните клонове на реналната артерия при плъхове от фруктозната група. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio

Image score – v12.3.3.5048) Легенда: Ф- група на ВФД; ЕС – ендотелни клетки; L – лумен; RA – интерлобарен клон на ренална артерия

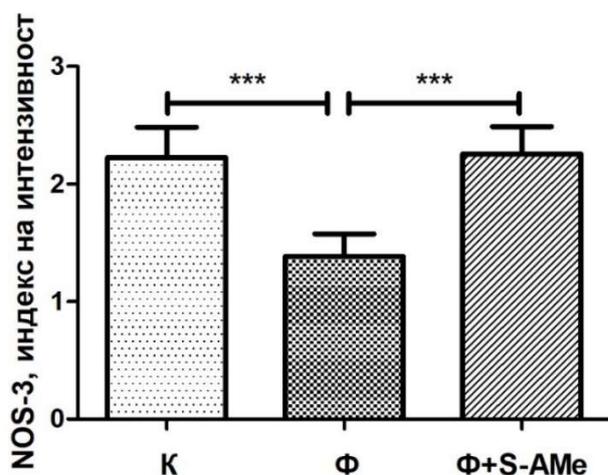
Нашите резултати показват промени в интензитета спрямо контролната група. В групата на ВФД са характерни клетки със силно слаб до липсващ интензитет на експресия на NOS3. Наблюдава се и слабо изразена експресия на NOS3 в тубулните епителни клетки и заобикалящата мастна тъкан (фиг.56).



Фиг.57. Имунохистохимично изследване с анти – NOS3 в ендотелните клетки на интерлобарен клон на реналната артерия при плъхове от суплементираната със SAM група на ВФД. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope – v12.3.3.5048)

Легенда: Ф+SAM – група на ВФД и суплементация със SAM; ЕС – ендотелни клетки; RA – интерлобарен клон на реналната артерия; L - лумен

В сравнение с фруктозната група, експресията на NOS3 в ендотелните клетки на интерлобарната артерия в групата на ВФД и прием на SAM е с умерена до силно интензивна степен на експресия. Наблюдава се и умеренена до слаба степен на експресия на NOS3 в периваскуларната мастна тъкан (фиг.57). Интензитета на имунохистохимичната реакция в суплементираната група се доближава до този в контролната група. На фигура 58 се наблюдават статистически значими разлики между нивата на експресия на NOS3 при експерименталните групи.



Фиг.58. Индекс на интензивност на реакцията (ИИР) на NOS3 в ендотелните клетки на интерлобарния клон на реналната артерия на плъхове от трите експериментални групи
 Легенда: Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), (n=8); К – контролна група; Φ – група на фруктозна диета; Φ+S-AMe – група на фруктозна диета и суплементация със S-AMe; ***- $p < 0,0001$ – статистическа значимост между контролата и третираните групи, t-test

Резултатите от изследването на ИИР на NOS3 експресия установи по-ниски стойности на експресия на NOS3 във фруктозната група спрямо контролата, със статистическа значимост - ***- $p < 0,0001$. Суплементираният със S-AMe плъхове демонстрират статистически значими по-високи стойности на NOS3 експресия, в сравнение с фруктозната група - ***- $p < 0,0001$ (фиг.58).

3.5.2 Обсъждане

Отличителна черта на ендотелните клетки представлява производството и секрецията на множество сигнални молекули, които оркестрират съдовата физиология, пропускливост, възпаление и ангиогенеза. Сред тези молекули, ендотелната синтаза на азотен оксид (eNOS, NOS3) и азотния оксид (NO) се открояват като ключови, тъй като участват в поддържането на съдовата хомеостаза чрез локалното регулиране на съдовия тонус, антитромботични и антиоксидантни свойства.

Ендотелната дисфункция (ЕД), проявяваща се с намален синтез на NO и намалена чувствителност към NO, играе централна роля в дисрегулацията на съдовия баланс и води до развитието на едно провъзпалително, протромботично и оксидативно състояние, което представлява важен компонент от патогенезата на атеросклерозата, хипертонията и ССЗ. При физиологични условия NOS3 отговаря за производството на повечето от NO и поради това се счита, че този ензим е важен модулатор за правилното функциониране на сърдечносъдовата система. Това се доказва в различни проучвания, като едно от тях демонстрира, че мишки с нокаут на NOS3 гена развиват артериална хипертония и имат повишен риск за инсулт и други сърдечносъдови промени (Li H. et al., 2002). Въпреки че

NOS3 е конститутивно експресиран, множество стимули регулират NOS3 на транскрипционно, посттранскрипционно и посттранслационно ниво (Rafikov et al., 2011).

В нашия експеримент установихме, че експресията на NOS3 в ендотелните клетки на реналната артерия във Фру група е статистически значимо по-ниска спрямо контролата. Суплементацията със SAM от друга страна повишава значително експресията на NOS3, което е също със статистическа значимост (фиг.64). Ние предполагахме, че понижаването в експресията на NOS3 се дължи на мощния възпалителен отговор, хипергликемията и развитието на оксидативен стрес при фруктозно-индуцирано затлъстяване.

Различни механизми биха могли да обяснят намалената експресия на eNOS. Установено е, че дисфункцията на системата eNOS – NO се дължи на окислителните промени и производството на АФК при фруктозно натоварване (Shinozaki et al., 1999; Glushakova et al., 2008). Добре известно е, че NOS изисква димеризация в присъствието на хем и тетрахидробиоптерин (BH4) за ефективно движение на електрони към l-аргинин. При нарушаване на тази стъпка настъпва разединяване на eNOS, при което той функционира като слаба NADPH оксидаза, произвеждаща O₂•⁻ вместо NO (Cug et al., 2020), който чрез силното си окислително действие нарушава ендотелната релаксация. Освен разединяването на eNOS, намаляването на експресията на eNOS също играе ключова роля за намалена бионаличност на NO и развитието на ЕД, атеросклероза и други ССЗ. В изследванията си Hu и съвт. демонстрират корелация между провъзпалителния статус, ендотелната дисфункция и намалената бионаличност на eNOS (Hu G et al., 2023). Счита се, че CRP, IL-1βLPS и TNF-α, ключови маркери на възпалението, намаляват експресията на eNOS (посредством дестабилизация на eNOS mRNA) заедно с неговите биоактивни функции в човешки аортни ендотелни клетки (Venugopal et al., 2002), което допълнително подкрепя тяхната роля в атерогенезата и съдовото ремоделиране.

Според Srinivasan и съвт. хипергликемията също играе съществена роля като води до намаляване на експресията на eNOS чрез увеличаване на митохондриалния синтез на АФК, което активира различни сигнални пътища, като проинфлматорния NF-κB и транскрипционен протеин AP-1 (Srinivasan et al., 2004). Все по-нови изследвания демонстрират, че AGEs, в човешките коронарни и бъбречни ендотелни клетки индуцират оксидативен стрес и ЕД чрез активиране на p38 и ERK1/2 пътища и намаляване на експресията на eNOS (Ren et al., 2017; Hu G et al., 2023). От това можем да съдим, че хипергликемията, наблюдавана при фруктозно натоварване, влияе върху експресията на eNOS чрез активиране на ОС и директно чрез увреждане на съдовия ендотел. От друга страна, Cosentino и съвт. съобщават за повишена експресия на eNOS след излагане на човешки ендотелни клетки на 22 mmol/l глюкоза в продължение на 5 дни (Cosentino et al., 1997). За да потвърдим, че индуцирания от AGEs ОС участва в намаляването на eNOS mRNA, в нашето проучване бе използван антиоксидант SAM, при което наблюдавахме статистически значимо покачване в експресията на eNOS спрямо Фру група. Тези резултати доказват, че терапията с антиоксиданти е ефективно средство за лечение на индуцираната от фруктоза съдова дисфункция.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Във връзка с поставените цели и задачи настоящата разработка проучи основните патофизиологични механизми на съдово и кардиомиоцитно увреждане при хронично фруктозно натоваарване.

В този контекст бе създаден експериментален модел на фруктозно-индуцирано затлъстяване, който доказва, че високият прием на фруктоза значително увеличава риска от развитието на различни метаболитни промени, като хипергликемия, дислипидемия, хронично нискостепенно възпаление, оксидативен стрес и инсулинова резистентност. Нашите резултати показват убедителни доказателства, че именно тези промени допринасят за развитието на ранните морфологични промени в ендотелните клетки и кардиомиоцитите и ограничаването на функционалната съдова и сърдечна активност. Данните от нашия експериментален модел показват още убедителни доказателства, че при фруктозо-индуциран метаболитен синдром, оксидативният стрес и нискостепенното системно възпаление са вероятно във функционална връзка с активираната некроптоза, което затвърждава необходимостта от разработване и търсене на биомаркери за неинвазивно изследване на активността на некроптозата и мониторирането ѝ още в най-ранни етапи на съдова и кардиомиоцитна увреда.

Данните от нашето проучване, показват, че приема на S-АМе е в състояние ефективно да предотврати различните промени, свързани с развитието на метаболитен синдром, предизвикан от диета с високо съдържание на фруктоза при плъхове. Суплементацията със S-АМе, не само намалява телесното тегло, но също така подобрява инсулиновата резистентност, дислипидемията, хипергликемията и понижава нивата на възпалителните медиатори. В допълнение, приема на S-АМе е в състояние да намали системния оксидативен стрес и да подобри мастната дисфункция, като по този начин намалява риска от развитието на ендотелна дисфункция и различни сърдечно-съдови нарушения. На базата на тези обещаващи резултати, можем да спекулираме, че суплементацията със S-АМе може да подобри и/или да предотврати някои от метаболитните нарушения, свързани с метаболитния синдром. Въпреки това, има нужда от повече клинични изпитвания в бъдеще, за да валидират нашите открития и да изследват потенциалните ползи от приема на S-АМе за човешкото здраве.

VI. ИЗВОДИ

1. Прилагането на високофруктозна диета при плъхове предизвиква промени в зоометричните, биохимичните, клинично-лабораторните и хистологичните показатели, които отговарят на основните критерии за диагностика на метаболитен синдром при хора:

1.1 Повишено телесно тегло, тегло на сърце и тегло на РПМТ;

1.2 Дислипидемия;

1.3 Хипергликемия и инсулинова резистентност, установени, чрез измерване на нивата на серумна глюкоза и TuG индекс;

1.4 Хронично нискостепенно възпаление, установено, чрез измерване на нивата на TNF- α и CRP.

2. Прилагането на високофруктозна диета при плъхове води до понижаване на нивата на витамин D3.

3. Намалените серумни нива на витамин D3 са във функционална връзка с TuG индекс, който отразява инсулиновата резистентност и нарушена липидогенеза при ВФД.

4. Високофруктозната диета при плъхове предизвиква появата на морфологични и морфометрични промени в ендотелните клетки на интерлобарните и коронарните артерии, което отговаря на основните критерии за диагностика на ендотелна дисфункция.

5. Високофруктозната диета при плъхове предизвиква появата на морфологични и морфометрични промени в кардиомиоцитите, с данни за левокамерна хипертрофия.

6. Високофруктозната диета при плъхове води до промени във възпалителния и антиоксидантния статус в ендотелните клетки на коронарните артерии и кардиомиоцитите, установени, чрез покачване на експресията на VCAM-1 и намаляване на експресията на SOD1.

7. Високофруктозната диета при плъхове води до промени в редокс-хомеостазата и възпалителния и антиоксидантния статус, чрез покачване на експресията на VCAM-1 и SOD-1 и намаляване на NOS3 експресията в ендотелните клетки на интерлобарната артерия.

8. Високофруктозна диета при плъхове води до активиране на некроптозата и повишаване на експресията на RIP3 в ендотелните клетки на интерлобарната артерия и кардиомиоцитите.
9. Суплементацията с екзогенен S-АМе при плъхове на ВФД води до подобряване на зоометричните показатели, намаляване на теглото на РПМТ и понижаване на нивата на провъзпалителните маркери и повишаване на витамин D3, като по този начин протектира от развитието на метаболитни нарушения, асоциирани с фруктозно-индуцираното висцерално затлъстяване.
10. Суплементацията с екзогенен S-АМе при плъхове на ВФД подобрява редокс-хомеостазата и потиска развитието на оксидативни промени чрез увеличаване на експресията на SOD-1.
11. Суплементацията с екзогенен S-АМе при плъхове на ВФД потиска прогресията на активираната некроптоза чрез намаляване на експресията на RIP3 и по този начин предотвратява окислителното увреждане на ендотелните клетки и кардиомиоцитите в условията на фруктозно-индуцираните съдови и тъканни увреждания.
12. Суплементацията с екзогенен S-АМе при плъхове на ВФД предотвратява развитието на ендотелна дисфункция чрез повишаване на експресията на NOS3 и понижаване на експресията на провъзпалителната молекула VCAM-1.

VII. ПРИНОСИ

1. Приноси с оригинален характер

1.1. Направено е комплексно проучване за промените в експресията на SOD-1, VCAM-1, NOS3 и RIP3, и връзката им с патоморфологичните промени в ендотелните клетки на коронарните съдове, интерлобарните артерии и кардиомиоцитите при експериментални животни подложени на ВФД.

1.2. Направено е комплексно проучване на ефектите от суплементацията със SAM върху морфометричните и морфологичните показатели, и върху нивата на експресия на SOD-1, VCAM-1 и NOS3 и в коронарните съдове, прегломерулните артерии и кардиомиоцитите при експериментални животни подложени на ВФД.

1.3. Въз основа на морфологичните резултати, морфометричния анализ и имунохистохимичния анализ се демонстрира, че приема на SAM, понижавайки експресията на RIP3 в кардиомиоцитите и ендотелните клетки на интерлобарните артерии при плъхове на ВФД, предпазва от развитието на некроптотична клетъчна смърт и ендотелна дисфункция.

1.4. Въз основа на клиничко-лабораторните изследвания се демонстрира, че приема на SAM понижава стойностите на TuG индекс при фруктозо-индуцирано затлъстяване.

1.5. Установена е функционална връзка между степента на намаление на серумните нива на витамин D3 и увеличението на TuG индекса в групата на ВФД.

2. Приноси с потвърдителен характер

2.1. Приема на ВФД води до промени в зоометричните показатели - покачване на телесното тегло, теглото на ретроперитонеалната мастна тъкан и индекса на Lee.

2.2. Приема на ВФД е свързан с развитието на оксидативен стрес, хронично нискостепенно възпаление и ендотелна дисфункция.

2.3. Приема на ВФД води до морфометрични и патоморфологични промени в стената на лява камера, които се изразяват в задебеляване на стената на лява камера.

2.4. Приема на ВФД води до морфометрични и патоморфологични промени в стената на интерлобарните клонове на реналната артерия, които се изразяват в задебеляване и

ремоделиране на стената.

3. Приноси с приложен характер

3.1. Асоциираните с ВФД метаболитни нарушения като затлъстяване, дислипидемия, хипергликемия и инсулинова резистентност съответстват на критериите за диагностика на метаболитен синдром при хора, което прави нашия експериментален модел полезен за изследване на патогенетичните механизми на метаболитния синдром, както и за разработване на ефективни терапевтични методи за профилактика, диагностика и лечение на тази все по нарастваща глобална пандемия.

3.2. Суплементацията с екзогенен S-АМе при ВФД намалява стойностите на зоометричните показатели, като телесното тегло, теглото на РПМТ, индекса на Lee и TyG индекс, с което се явява потенциално средство за лечение на затлъстяване и инсулинова резистентност.

3.3 Проявените антиоксидантни ефекти на екзогенния S-АМе върху фруктозно-индуцираните морфологични и морфометрични промени в ендотелните клетки и кардиомиоцитите, както и промените в нивата на експресия NOS3, VCAM-1, RIP3 и SOD-1 демонстрират неговия потенциал като ефективно средство за лечение на ендотелна дисфункция, оксидативни увреждания, възпалителни и некроптотични промени, свързани с фруктозно-индуцираното затлъстяване.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Публикации

1.1 Effects of melatonin supplementation on body mass index in diet-induced obesity rat model, Chivchibashi-Pavlova D., Kyuchukova D., Bekyarova G., Bratoeva K., Varna Medical Forum, 2022

1.2 New experimental models in research of the pathophysiology of cardiovascular system, Kalvachev N., Kyuchukova D., Leonidovna D., Bratoeva K., Varna Medical Forum, 2022

1.3 The involvement of necroptosis in the development of cardiovascular diseases K Bratoeva, D Kyuchukova - Varna Medical Forum, 2025

2. Участия в научни форуми

2.1 Участие в международни научни форуми

2.1.1 Changes in hepatic fatty acid composition in experimental nonalcoholic fatty liver and S – adenosylmethionine intake. Panayotova V., Lyutfi E., Kyuchukova D., Merdzhanova A., Bratoeva K. 9-12 May 2019, 29th Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria (IMAB), Golden Sands, Bulgaria

2.1.2 Aortic wall changes in fructose-induced obesity rat model. Chivchibashi-Pavlova Dariya, Kyuchukova Diyana, Bratoeva Kamelia. 1st International Conference of Nutritional Sciences and Dietetics – 27-29 May 2022, Thessaloniki, Greece

2.1.3 Vascular damage in fructose-induced obesity in rat model. Kyuchukova D Bratoeva K, Chivchibashi D. 30th European congress on Obesity. 17-20 May 2023 Dublin, Ireland

2.1.4 The preglomerular vasculature damage and renal dysfunction in conditions of cardio-metabolic disorders. Kameliya Bratoeva, Diyana Kyuchukova, Hristo Papanchev, Viktor V Velyanov, Nikola R Lazarov, Dariya Chivchibashi-Pavlova. FEPS&SECF Conference Granada 2024.

2.2. Участие в национални научни форуми

2.2.1. Aortic wall and periaortic adipose tissue changes in obese rats supplemented with melatonin, Chivchibashi-Pavlova Dariya, Kyuchukova Diyana, Stoyanov Georgi, Bratoeva Kameliya, Национален конгрес по физиология с международно участие. Старозагорски минерални бани, Спа-хотел Армира 30.10 – 01.11.2022

IX. БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам сърдечна благодарност на:

- Научния си ръководител доц. д-р Камелия Братоева, д.м. за изключително ценните професионални насоки, проявеното търпение, отзивчивост и оказаната безрезервна подкрепа по време на разработването на дисертационния труд.
- Колегите ми от УС „Патофизиология“ за тяхната подкрепа.
- Лаборант Велина Кеновска от катедра по „Анатомия и клетъчна биология“, лаборант Гинка Вангелова и лаборант Зорница Георгиева от катедра Физиология и патофизиология/УС Патофизиология за безценната оказана помощ и ценните съвети при изработването на хистологични и имунохистохимични препарати.
- Д-р Дария Леонидовна Чивчибаши-Павлова от катедра Катедра по обща и клинична патология, съдебна медицина и деонтология за ценните професионални насоки за извършването на имунохистохимичните изследвания, както и за съдействието и полезните съвети, оказани по време на разработването на дисертационния труд.
- Изказвам своята искрена благодарност към моето семейство за безусловната подкрепа, търпението, разбирането и моралната опора през целия период на обучение и разработване на дисертационния труд.