



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“**

Факултет МЕДИЦИНА

Катедра по обща медицина

Д-р Николай Александров Бекяров

**ОЦЕНКА И РОЛЯ НА НЯКОИ МАРКЕРИ НА
ЕНДОТЕЛНАТА ДИСФУНКЦИЯ И
ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС ПРИ АМБУЛАТОРНИ
ЛИЦА С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „доктор“

Докторска програма: „Обща медицина“

Научен ръководител:

Проф. д-р Валентина Маджова, д.м.

Варна, 2026

Дисертационният труд е написан на 104 страници и съдържа 33 фигури и 4 таблици. Библиографската справка включва 281 заглавия, от които 281 на латиница.

Дисертацията е обсъдена и насочена за защита от разширен катедрен съвет на Катедрата по обща медицина към Медицински университет - Варна

Научно жури:

Проф. д-р Радост Спиридонова Асенова, д.м.н

Проф. д-р Цветелина Валентинова Митева, д.м.

Доц. д-р Гергана Христова Форева, д.м

Доц. д-р Жения Русева Петрова, д.м.

Доц. д-р Дарина Кирилова Георгиева-Христова, д.м

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 03.11.2026г. от 13:00 ч. в „Докторанско училище“.

Материалите по защитата са на разположение в научния отдел на МУ–Варна и са публикувани на интернет страницата на МУ-Варна (www.mu-varna.bg).

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	8
3.1. Материал.....	8
3.2. Методи	9
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	13
1. ПРОУЧВАНЕ НА ВРЪЗКАТА МЕЖДУ ADMA, MDA И МЕТАБОЛИТНИ МАРКЕРИ В ПЛАЗМАТА ПРИ ЛИЦА С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ	13
2. ВРЪЗКА МЕЖДУ ЕКСПРЕСИЯТА НА Nrf2, HO-1 И NF-kB, ADMA В ПЛАЗМАТА И ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС ПРИ ЛИЦА С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ	26
3. ПРОМЕНИ В ДЕБЕЛИНАТА НА ИНТИМА- МЕДИА КОМПЛЕКС (CIMT) И ВРЪЗКАТА С РЕДОКС БАЛАНСА И ВЪЗРАСТТА НА ЛИЦА С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ	35
V. ИЗВОДИ.....	45
VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	46
Приноси с оригинален характер.....	46
Приноси с научно-приложен характер	47
VII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	47

Списък на използваните съкращения

ADMA	Asymmetric dimethylarginine (асиметричен диметил-аргинин)
BMI	Body mass index
CRI-I	Castelli risk index I
CO	Carbon monoxide (въглероден монооксид)
CRP	C - reactive protein (C-реактивен протеин)
DDAH1	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (диметиларгинин диметиламинохидролаза 1)
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase- ендотелна NO- синтаза
ED	Endothelial dysfunction (ендотелна дисфункция)
GGT	γ -glutamin transferase (γ -глутамин трансфераза)
GPx	Glutathione peroxidase (глутатион пероксидаза)
GSH	Glutathione (глутатион)
GST	Glutathione S трансфераза (глутатион- S трансфераза)
HO-1	Heme-oxigenase-1 (хемоксигеназа-1)
iNOS	Inducible nitric oxide synthase (индуцируема NO- синтаза)
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 (междуклетъчни адхезионна молекула)
IκB	Inhibitor of NF- κ B
IL-6	Interleukin-6 (интерлевкин-6)
IL-8	Interleukin-8 (интерлевкин-8)
IL-10	Interleukin-10 (интерлевкин-10)
MDA	Malondialdehyde (малонов диалдехид)
MetS	Metabolic syndrome (метаболически синдром)
NO	Nitric oxide (азотен оксид)

NF-κB	Nuclear factor kappa B (нуклеарен фактор капа В)
Nrf2	factor (erythroid – derived-2) –like-2) (нуклеарен еритроиден фактор)
ONOO	Peroxynitrite (пероксинитрит)
OS	Oxidative stress (Оксидативен стрес)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells (мононуклеарни клетки от периферна кръв)
PRMT-I	Protein methyltransferase-1 (протеин аргинин метилтрансферази тип I)
ROS	Reactive reactive species (рактивни форми на кислорода)
ССЗ	Cardiovascular diseases (Съречно-съдови заболявания)
CIMT	Carotid intima media thickness (дебелина на интима-медия комплекс)
TNF α	Tumor necrosis factor alpha (тумор некрозисен фактор алфа)
TBA	Thiobarbituric acid (тиобарбитурова киселина)
TC	Total cholesterol (общ холестерол)
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1 (съдовоклетъчна междуклетъчна адхзионна молекула)
WC	Waist circumference (обиколка на талията)

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Метаболитният синдром (MetS) е глобален проблем, който засяга все повече хора в трудоспособна възраст. Метаболитният синдром (наричан още синдром X или синдром на инсулинова резистентност) е група от метаболитни и сърдечно-съдови нарушения, чийто общ знаменател е инсулиновата резистентност (*Arcaro G, 2002, Hill MA et al 2021*).

Усложненията на метаболитния синдром са много, но най-важните са сърдечно-съдовите и цереброваскуларните усложнения (сърдечни пристъпи и инсулти), тъй като те често водят до увреждане или смърт (*Tziomalos K, et al., 2010; Fornoni A, Raij L, 2021; Hill MA et al 2021*). Те са свързани с увеличаване на влиянието на рискови фактори: нелекувана артериална хипертония, захарен диабет с лош контрол на кръвната захар, хиперлипидемия, дислипидемия, високи нива на пикочна киселина, абдоминално затлъстяване, намалена физическа активност, нездравословна диета (*Lundman Pet al, 2003, Kanbay et al.,2013, Chan NN, Chan JC. 2002; Konukoglu D, Uzun H., 2017 Brook RD et al., 2001 Perticone F et al., 2001*)

Като основен патогенетичен фактор, свързващ MetS с влиянието на рисковите фактори, се счита развитието на ендотелна дисфункция. Компонентите на MetS и свързаният съдов риск могат да увредят съдовата ендотелна функция и структурата на съдовата стена и могат да доведат до субклинична атеросклероза и съдови заболявания (*Kim JA et al, 2006; Tziomalos K et al, 2010, Jamwal S Sharma S, 2018), Shayo SC et al, 2019 Hill MA et al 2021, Fornoni A, Raij L, 2021*). Според съвременните представи за ендотелната дисфункция като универсално и водещо звено в патогенезата на съдовите увреждания предхожда патоморфологичните промени в съдовата стена на кардиометаболитните заболявания

Затова ендотелната дисфункция се смята за отключващ патогенетичен механизъм за развитие и прогресиране на ССЗ, които са водеща причина за инвалидизирането на хиляди по целия свят. Социалната значимост на инвалидизиращи усложнения на ССЗ определя необходимостта за търсене на нови подходи за ранна превенция. Търсенето на възможности за намаляване на уврежданията на съдовата стена е едно от най-перспективните направления в профилактиката на кардио-метаболитните заболявания.

Литературните данни за ендотелната дисфункция при MetS са оскъдни и противоречиви. Маркерите за ендотелната дисфункция са все още слабо проучени. Високите стойности на общ холестерол, триглицериди и глюкоза, някои провъзпалителни маркери (С-реактивен протеин интерлевкин-6 и тумор некротизиращ фактор-алфа) не са достатъчни критерии за ендотелна дисфункция при кардиометаболитни заболявания и сърдечно-съдов риск.

Молекулярните механизми на ендотелната дисфункция не са достатъчно проучени, но се смята, че нейното развитие е тясно свързано с възпалителния отговор поради дисбаланс на оксиданти и антиоксидантни защиты в организма и развитието на оксидативен стрес при MetS (*Perticone F et al., 2001; Mertens I et al., 2006 Devaraj S et al., 2011*). Нарушаването на редокс-баланса играе ключова роля в ендотелното увреждане чрез намаляване на ендотелната-NO-зависима вазодилатация, стимулиране на съдово възпаление, активиране на клетъчни и междуклетъчни сигнални пътища, чувствителни към редокс потенциал, като по този начин патогенетично свързва оксидативния стрес, хронично възпаление и ендотелна дисфункция (*Shayo SC et al., 2019; Hill MA et al., 2021, Fornoni A, Raji L, 2021*). Това предизвиква повишен научно-изследователски интерес и провеждане на нови целенасочени проучвания, насочени към изучаване на комплексните механизми на увреждане и протекция на ендотела при MetS, но и възможности за терапевтично повлияване.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел:

Да се проучи и оцени ролята някои маркерите на ендотелната активация и оксидативния стрес при амбулаторни лица с метаболитен синдром

Задачи

1. Да се изследва плазменото ниво на асиметричния диметил аргинин (ADMA), маркер на ендотелната дисфункция.
2. Да се изследва малон диалдехида (MDA), маркер на оксидативния стрес при лица с метаболитен синдром.

3. Да се изследват показателите на липидния профил, нивото на глюкозата, на пикочната киселина и индекса на телесното тегло (BMI).
4. Да се проучи наличието на корелация на ADMA и MDA с показателите на липидния профил и атерогенните индекси.
5. Да се изследва експресията на транскрипционните фактори Nrf2 и NF-kB и HO-1 в PBMC при лица с метаболитен синдром.
6. Да се проучи връзката между ADMA, HO-1 и Nrf2, NF-kB при лица с метаболитен синдром.
7. Да се изследва и оцени промяната в дебелината на интима - медия комплекс (CIMT) с възрастта при лица с метаболитен синдром.
8. Да се оцени връзката между CIMT, ADMA, HO-1, NF-kB и Nrf2 при лица с метаболитен синдром.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

3.1. Материал

Настоящото проучване отговаря напълно на стандартите и критериите за научност и етичност и е одобрено от Комисията по Научна етика към Съвета по научно-изследователска дейност при към Медицински университет – Варна (Протокол № 86/26.09.2019 г.).

Проучването обхваща 83 души (63 жени, 20 мъже) на възраст от 30 до 64 г. Участниците в проучването бяха разделени на две групи: 1. група с амбулаторни новодиагностициран метаболитен синдром ($n = 63$) и 2. група клинично здрави индивиди (контролна група) ($n = 20$). Лицата в групата с метаболитен синдром (MetS) бяха подбрани съгласно критериите на NCEP-ATP III () (наличие на три или повече от следните обиколка на талията ≥ 102 cm (мъже), ≥ 88 cm (жени); кръвно налягане $\geq 130/85$ mm Hg или лечение на хипертония; триглицериди $\geq 1,7$ mmol/l (≥ 150 mg/dl); HDL-холестерол $< 1,03$ mmol/l (< 40 mg/dl) (мъже), $< 1,29$ mmol/l (< 50 mg/dl) (жени)

Таблица 1. Базова характеристика на изследваните групи

Groups	Control N=20	MetS N=63	P values
BMI kg/m ²	23.2±0.72	29.3± 1,27	0.0001
WC	74.6±2.53	93±1,31	0,0001
SBP mmHg	123±3.01	144±1.07	0.0001
DBP mmHg	79.5±1.89	90.1±0.99	0.0001
TG mmolL	0.70±0.071	1.72±0.122	0,0001
HDL mmolL	2.28±0.27	1.38±0.068	0.0001

Участниците в проучването бяха новодиагностицирани и индикирани като страдащи от метаболитен синдром (MetS) въз основа на гореспоменатите критерии и не бяха на лечение за състоянието.

Критериите за включване и изключване от проучването бяха следните:

Критерии за включване - лица с повишено кръвно налягане, кръвна захар, затлъстяване, дислипидемии и високи нива на триглицериди, холестерол и пикочна киселина в кръвта, както и такива, които имат роднини (майка, баща) със захарен диабет, артериална хипертония и затлъстяване.

Критерии за изключване - съдов инцидент, автоимунни, психиатрични и злокачествени заболявания..

3.2. Методи

Необходимите изследвания са проведени в Клинична лаборатория и кабинет по доплерсонография към ДКС „Света Марина“ Варна и Катедрата по биохимия, молекулна медицина и нутригеномика Медицински университет-Варна,

3.2.1 Анкетен метод

С анкетна карта, изработена за целите на проучването бе събрана информация за демографски данни (пол, възраст, местоживееене), образователно равнище, наличие на компоненти на метаболитния синдром и други сърдечно-съдови рискови фактори (артериалната хипертензия, захарен диабет тип 2 и затлъстяване), фамилна анамнеза, генетична предизпозиция за съдови заболявания, наличие на хронични ССЗ. дислипидемия, начин на живот, данни за физикална активност

3.2.2. Биохимични и клинико-лабораторни методи

На участниците се извършват следните клинични и лабораторни изследвания:

- ръст, обиколка на талия (WC), индекса на телесната маса (BMI)
- венозно измерване на кръвна захар и серумни нива на TC, (total cholesterol)- общ холестерол; *HDL-C* (High-density Lipoprotein Cholesterol)- холестерол с висока плътност; *LDL-C* (Low density Lipoprotein Cholesterol)- холестерол с ниска плътност; *TRGL* (triglycerides)- триглицериди с биохимичен анализатор ADVIA 1800
- атерогенните индекси Castelli I риск индекс (Castelli risk index I, CRI-I) = $TC/HDL\text{-холестерол}$ • Castelli II риск индекс (Castelli risk index II, CRI-II) = $LDL\text{холестерол}/HDL\text{-холестерол}$ •
- Плазмените концентрации на асиметричния диметил аргинин Asymmetric dimethylarginine (ADMA) се определят с помощта на ELISA комплект за анализ (DLD Diagnostica GMBH, Германия), след като е валидиран локално. Методът е валидиран в съответствие с международния стандарт за качество и компетентност на медицинските лаборатории (BDS/EN/ISO 15189). Измерванията бяха извършени в два екземпляра. Данните са представени в mM/L.
- Липидната пероксидация се анализира с нивото на малон диалдехида (MDA), измерена чрез нейната реактивност на тиобарбитуровата киселина (TBA) в плазмата, като се използва методът на Porter et al.1976. Данните са представени в mM/L.

3.2.3. Генетични методи

Събиране на моноклеарни клетки от периферна кръв (PBMC)

Бяха използвани проби от цяла кръв за събиране на моноклеарни клетки от периферна кръв (PBMC). Кръвта се събира в епруветки с литиев хепарин. Разделянето на PBMC беше извършено с помощта на Ficoll сепарационна среда с плътност 1,077 g/L и епруветки за центрофужно разделяне LeucoSep™ (от GreinerBioOne, Австрия), съдържащи пореста бариера, която позволява разделяне на клетките чрез центрофугиране с градиент на плътност и пречистване, следвайки инструкциите на производителя.

Анализ на генната експресия

РНК се екстрахира от събрания PBMC с Tri реагент (Ambion®, Life Technologies, САЩ), като се използва протоколът на производителя. Синтезът на cДНК на първа верига беше извършен с 0,1 µg обща РНК с RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, Waltham, MA, USA), използвайки (dT)18 праймер и следвайки стъпките от инструкциите на производителя. Анализът на количествена генна експресия беше извършен с помощта на двуетапна qPCR в реално време със SYBR Green qPCR 1 x Master Mix с ROX (KAPA SYBR FAST qPCR Kit, KAPA BIOSYSTEMS, САЩ).

Използваните праймерни последователности бяха както следва:

U6 Напред GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT;

Обратно CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT; HMOX1

Напред TCAGGCAGAGGGTGATAGAAG;

Обратно TTGGTGTTCATGGGTCAGC; NRF2

Напред TCCAGTCAGAAACCAGTGGAT;

Обратно GAATGTCTGCGCCAAAAGCTG; NF-κB

Напред AGAGGCTTCCGATTTTCGATATGG;

Обратно GGATAGGTCTTTTCGGCCCTTC.

Анализът беше извършен на Applied Biosystems® 7500 Real-Time qPCR инструмент (САЩ). Количеството иРНК на всеки интересен ген се нормализира според количеството иРНК, кодираща U6 като вътрешен контрол. Нивата на генна експресия бяха изчислени с помощта на 2-ΔΔCt

метод. Нивата на генна експресия на съответните гени бяха представени в относителни единици в сравнение с контролната група, където експресията се счита за равна на 1 (Livak, K.J.; Schmittgen, 2001).

3.2.4. Функционалните изследвания:

Доплерова сонография (ДСГ)

В проучването изследвахме каротидните артерии на пациенти, използвайки апарат Aloka Alpha 6 (ProSound Digital Color System) чрез B-mode ехография и линейен трансдюсер (38 mm) с честота 4–13 MHz (16 MHz BBN-Rx). Каротидна ултрасонография се проведе от невролог специалист Доц В Калевска.

Определяйки предварително дълбочина, ход на артерията и ниво на разделянето ѝ на външна и вътрешна, с доплер сонографията проследихме кръвотока и визуализирахме промените в съдовата стена.

Основният показател, който може да се изчисли при това изследване е дебелината на интима - медия комплекс (CIMT), която се счита от много автори като сурогатен маркер за наличие и прогресия на атеросклерозата.

Направихме по 3 стандартни измервания за показателя CIMT от всяка страна, респ. на 0,5, 1 и 2 см под бифуркацията на a.carotis, като приехме за достоверна средната стойност на IMT.

Измерихме дебелина на вътрешния слой (intima) на артериите и задебеляване на интимата като показател за начална атеросклероза.

Като използвахме критериите на ESC/ESH за AX определихме като:

- ✓ нормална IMT под 0,9 mm
- ✓ повишена IMT - > 0,9 и < 1,5 mm
- ✓ при IMT > 1,5 mm (ACPs), ако е по-голям от 1,5.

3.2.5. Статистически методи

За статистическата обработка на резултатите са използвани с ANOVA тест, чифтен t-тест на Student (95% доверителен интервал), корелационен анализ за определяне на коефициент на корелация (r).

Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка (Mean $\pm$ SEM).

За статистически достоверни са приети различия при ниво на значимост $p < 0.05$. Използвани са статистическите програми Excel и GraphPadPrism .5 (Graph Pad Software, Inc).

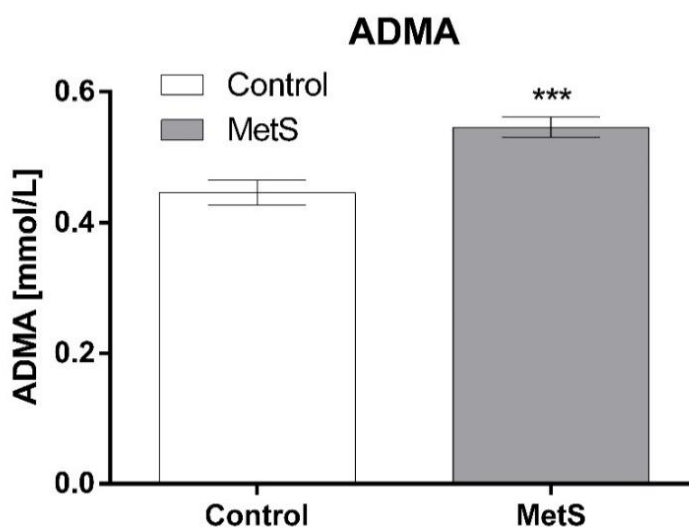
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. ПРОУЧВАНЕ НА ВРЪЗКАТА МЕЖДУ ADMA, MDA И МЕТАБОЛИТНИ МАРКЕРИ В ПЛАЗМАТА ПРИ ЛИЦА С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ

1.1. Изследване плазменото ниво на АДМА, МДА и липидния профил, глюкозата в плазмата и при лица с метаболитен синдром и контролна група и корелационната зависимост между тях

1.1.1 Сравнителен анализ на стойностите на АДМА в плазмата при лица с метаболитен синдром (MetS) и контролната група (C)

Нивото на АДМА в плазмата беше сигнификантно повишено в метаболитната група спрямо контролата с 22% (0.445 ± 0.02 to 0.54 ± 0.015) (Фиг. 7)

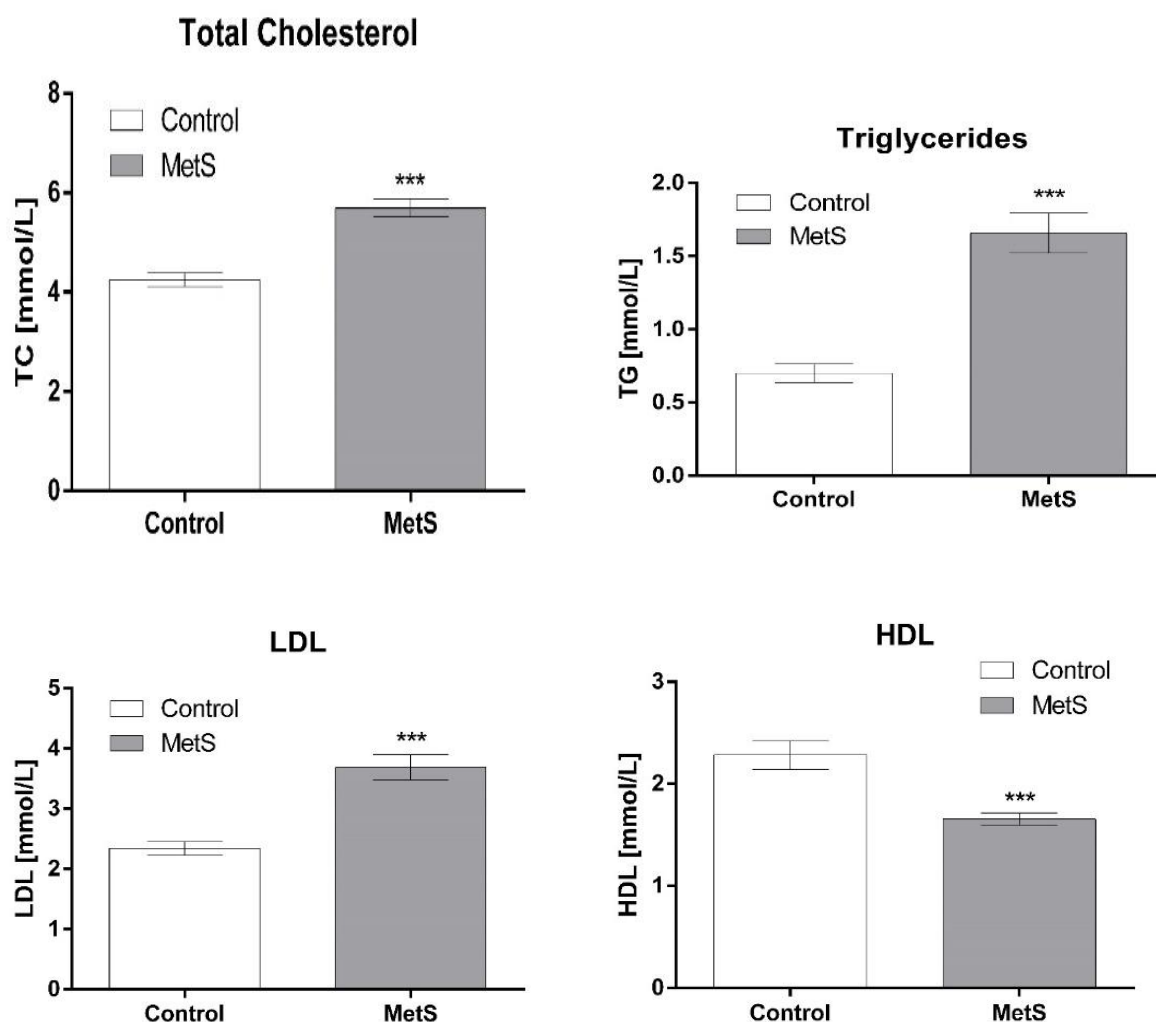


*Фигура 7 Промени в плазмените АДМА нива при лица с метаболитен синдром MetS) и контролата (C). Данните са представени като mean $\pm$ SEM статистическа значимост беше представена като $p < 0.05$), *** $p < 0.001$*

1.1.2 Сравнителен анализ на показатели от липидния профил при лица с метаболитен синдром (Mets) група и контролната група (C)

Таблица 1

Липидни Маркери	C	MetS	P - Value
TG	0.699±0.063	1.65±0.131	P=0.0001
LDL	2.34±0.113	3.28±0.21	P=0.0005
HDL	2.28± 0.140	0.65±0.060	P=0.0020
TC	4.25±0.13	5.69±0.81	P=0.0001

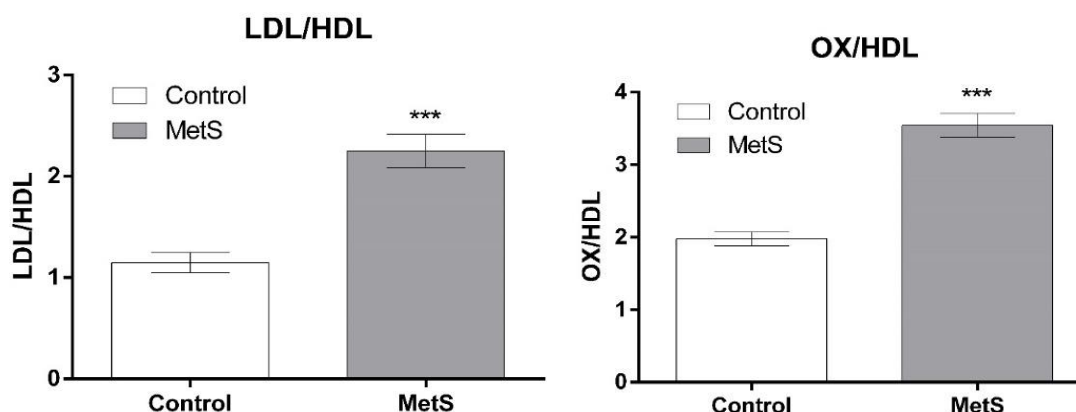


Фигура 8 Промени в стойностите на липидните маркери (TC, TG, HDL, LDL) при лица с метаболитен синдром MetS) и контролата(C). Данните са представени като mean±SEM статистическа значимост беше представена като $p<0.05$), *** $p<0.001$

1.1.3 Сравнителен анализ на някои атерогенни индекси при лица с метаболитен синдром (MetS) група и контролната група (C)

Таблица 2

Атерогенни индекси	C	MetS	P Value
TC/HDL	1.977±0.097	3.54±0.166	0.0002
LDL/HDL	1.148±0.375	2.25±0.165	0.0061



Фигура 9 Промени в атерогенните индекси (LDL/HDL and TC/HDL) при лица с метаболитен синдром MetS) и контролата(C). Данните са представени като mean±SEM статистическа значимост беше представена като $p < 0.05$), *** $p < 0.0001$

Корелационни зависимости между нивата на ADMA и показателите от липидния профил и атерогенните индекси

Таблица 3

		TG	TC	LDL	HDL
ADMA	Person correlation	.414	.084	.147	-.489
	P	0.001	0.657	0.437	0.004

		TC/HDL	LDL/HDL
ADMA	Pearson correlation	.524	.424
	p	0.0031	0.0193

При провеждане на корелационен анализ по метода на *Pearson* получихме следните резултати:

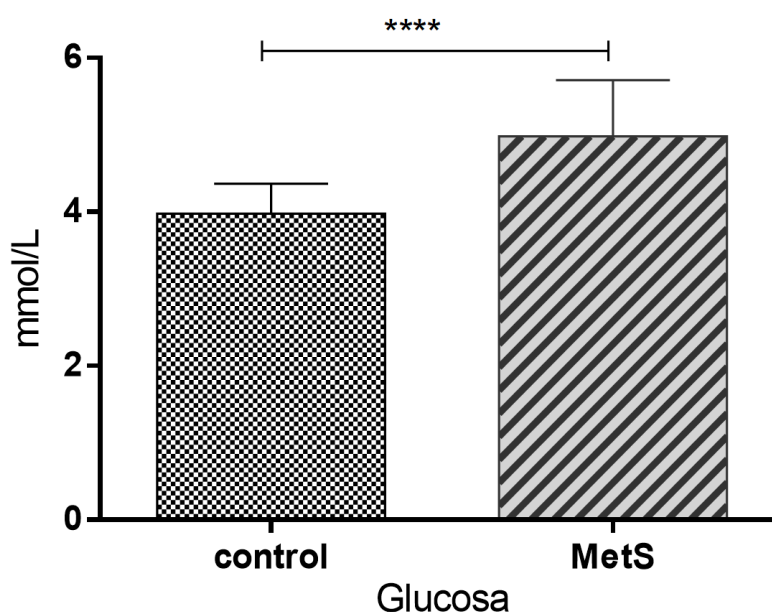
Силна положителна корелация между стойностите на ADMA и стойностите на TG ($r=0.414$, $p=0.001$), както и между ADMA и TC/HDL ($r=0.524$, $p=0.0031$)

Умерена положителна корелация между стойностите ADMA в плазмата и CRI-II (LDL/HDL) ($r=0,424$, $p=0.0193$).

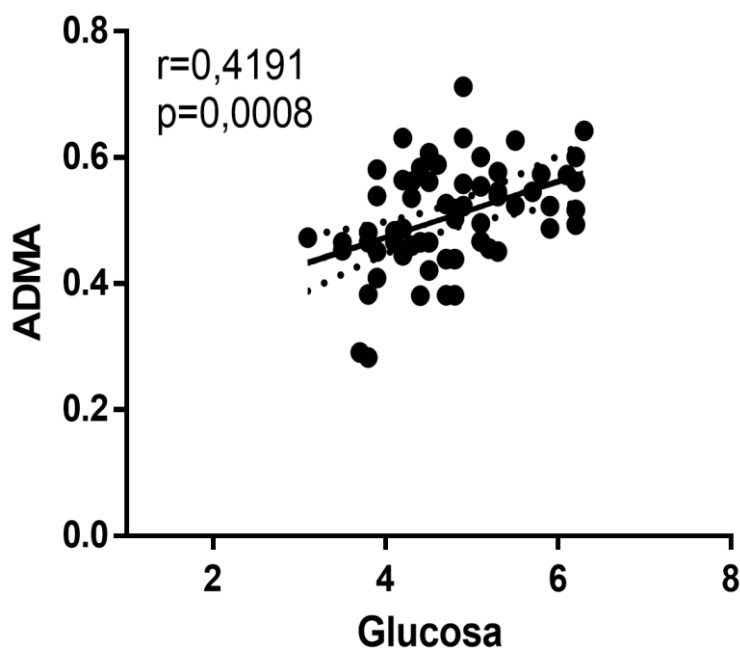
Силна отрицателна корелация между стойностите на ADMA и HDL - холестерола ($r=-0.489$, $p=0.004$)

1.1.4 Сравнителен анализ на нивото на глюкозата при лица с метаболитен синдром (MetS) група и контролната група (C)

Стойностите на глюкозата в кръвта бяха сигнификантно повишени в метаболитната група спрямо контролата с 25 % (3.98 ± 0.39 до 4.98 ± 0.73) (Фиг.10)



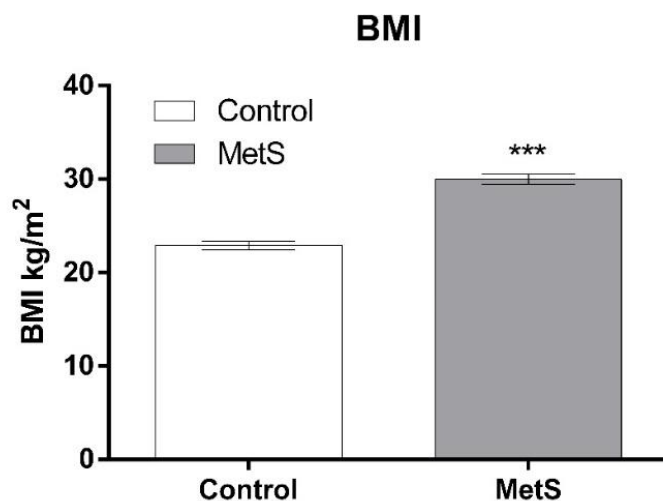
Фигура 10 Промяна на нивото на глюкозата в плазмата при лица с метаболитен синдром MetS) и контролата(C). Данните са представени като $mean \pm SEM$ статистическа значимост беше представена като $p < 0.05$), $**p < 0.0001$



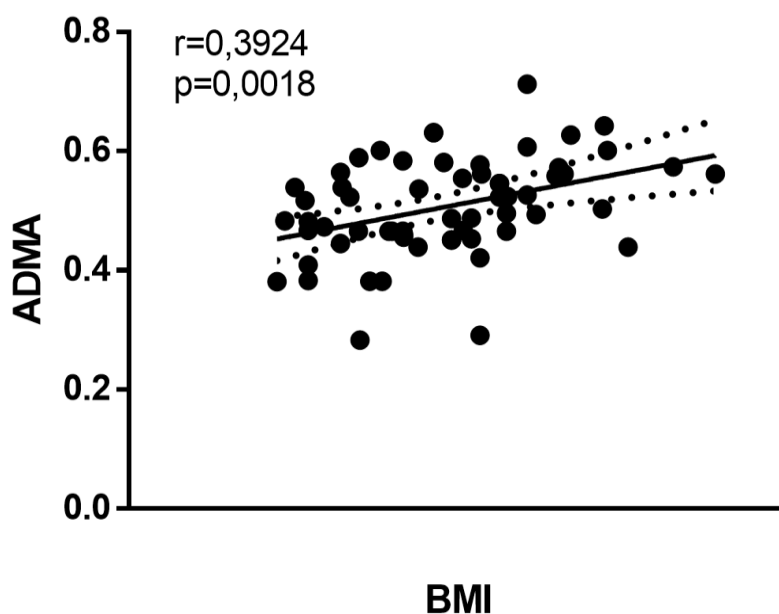
Фигура 11 Корелационна зависимост между нива на ADMA и глюкозата в плазмата при лица с метаболитен синдром

1.1.5 Сравнителен анализ на BMI при лица с метаболитен синдром (MetS) група и контролната група (C)

Стойностите на BMI бяха сигнификантно повишени в метаболитната група спрямо контролата с 30% (22.901 ± 0.477 до 29.99 ± 0.56) (Фиг.12)



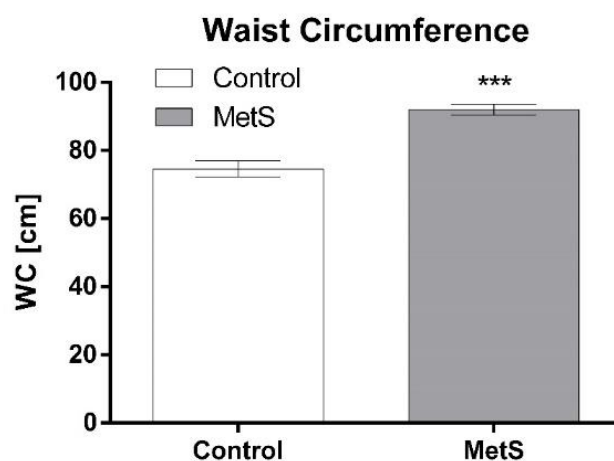
Фигура 12 Промени в BMI при лица с метаболитен синдром MetS) и контролата(C). Данните са представени като $mean \pm SEM$ статистическа значимост беше представена като $p < 0.05$), $***p < 0.001$



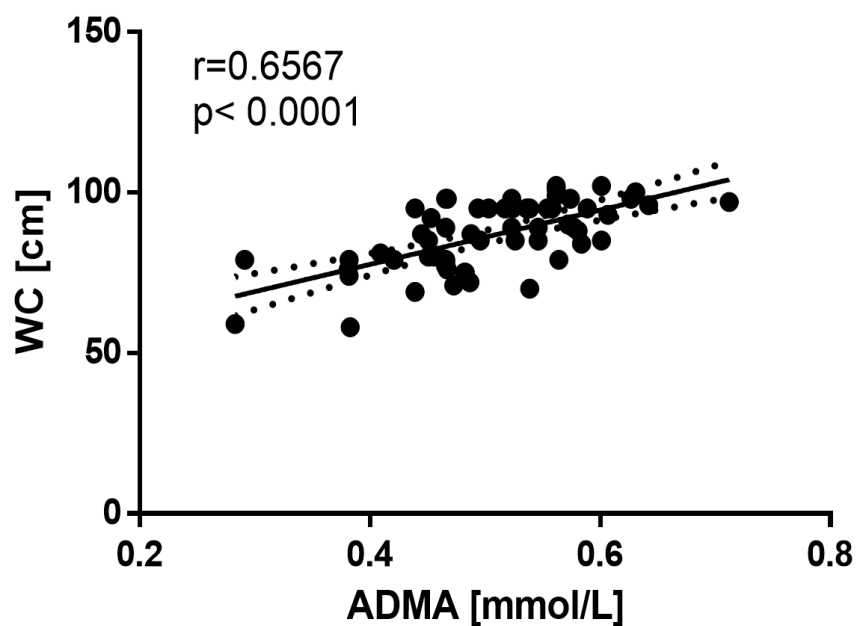
Фигура 13 Корелационна зависимост между ADMA в плазмата и BMI при лица с метаболитен синдром

1.1.6 Сравнителен анализ на стойностите на WC при лица с метаболитен синдром (MetS) група и контролната група (C)

Стойностите на WC бяха сигнификантно повишени в метаболитната група спрямо контролата с 23% (74.64 ± 7.85 до 92.034 ± 1.56) (Фигура.14)



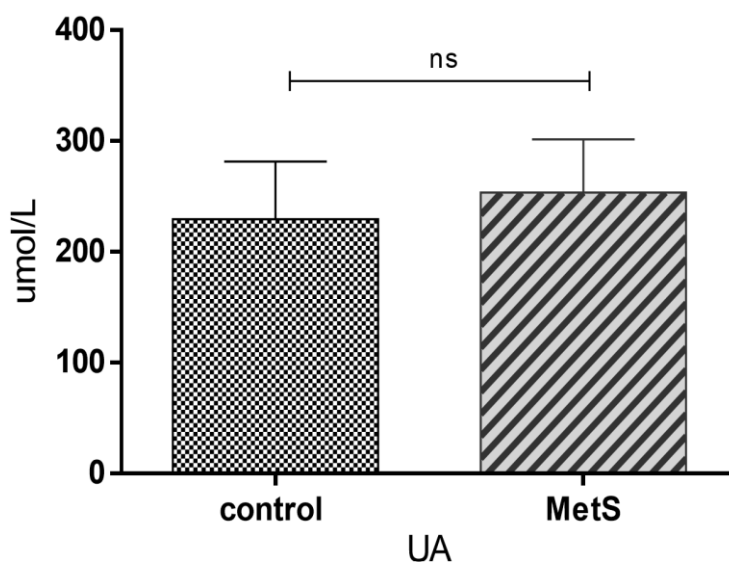
Фигура 14 Промени в WC при лица с метаболитен синдром (MetS) и контролата (C). Данните са представени като $mean \pm SEM$ статистическа значимост беше представена като $p < 0.05$, $**p < 0.001$



Фигури 15 Корелационна зависимост между ADMA ниво в плазмата и WC при лица с метаболитен синдром

1.1.7 Сравнителен анализ на стойностите на пикочната киселина (UA) при лица с метаболитен синдром (MetS) група и контролната група (C)

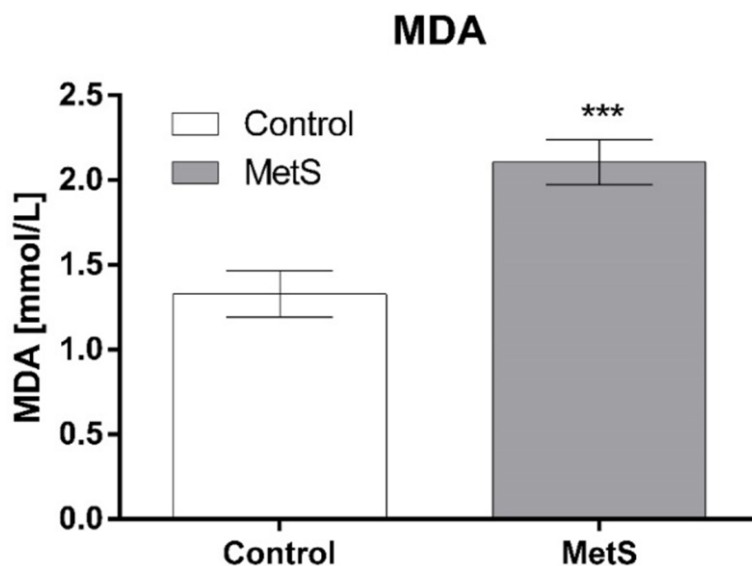
Стойностите на пикочната киселина не бяха сигнификантно повишени в метаболитната група спрямо контролата.



Фигура 16 Плазмени UA нива при лица с метаболитен синдром MetS) и контролата(C). Данните са представени като $\text{mean} \pm \text{SEM}$ статистическа значимост беше представена като $p<0.05$)

1.1.8 Сравнителен анализ на стойностите на MDA при лица от метаболитната и контролната група

Нивото на MDA в плазмата беше сигнификантно повишено при лица метаболитен синдром група спрямо контролата с 60% (1.32 ± 0.13 to 2.107 ± 0.134) (Фиг. 17).



Фигура 17 Промяна в стойностите на MDA в плазмата при лица с метаболитен синдром MetS) и контролата(C). Данните са представени като mean $\pm$ SEM статистическа значимост беше представена като $p < 0.05$), *** $p < 0.001$

1.2. Корелационни зависимости между нивата на MDA и показателите от липидния профил и липидните индекси

Таблица4

		TG	TC	LDL	HDL
MDA	Pearson correlation	.467	163	.303	.270
	p	0.018	0.386	0.020	0.113

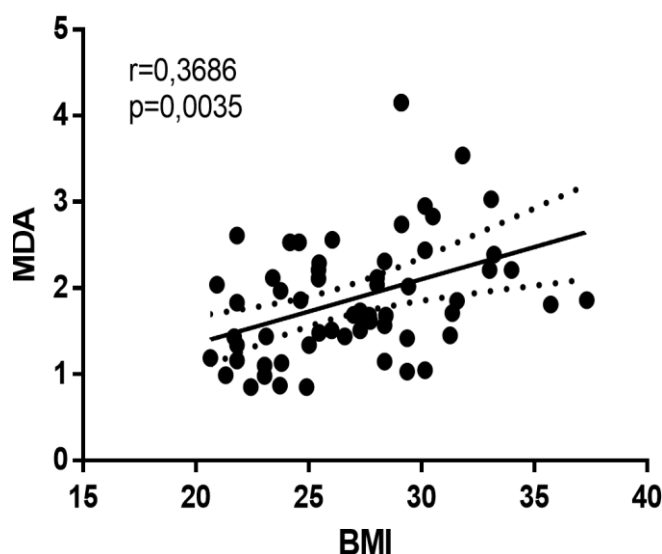
		TC/HDL	LDL/HDL
MDA	Pearson correlation	284	.364
	p	0.128	0.048

При провеждане на корелационен анализ по метода на *Pearson* получихме следните резултати

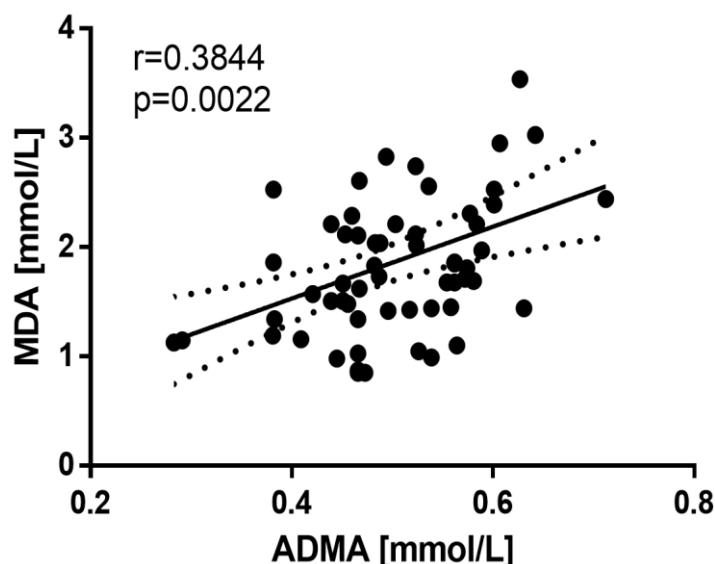
Умерена положителна корелация между стойностите на MDA в плазмата и CRI-I1 (LDL/HDL) ($r=0,364$, $p=0.048$), между MDA в плазмата и LDL холестерола ($r=0,303$, $p=0.020$)

Умерена положителна корелация между стойностите на MDA в плазмата и и на TG ($r=0,467$, $p=0.018$)

Липса на значима корелация между стойностите на стойностите на MDA в плазмата и HDL-холестерола ($r=0.270$, $p=0.113$) между стойностите MDA в плазмата и общия холестерол ($r=0.163$, $p=0.386$)



Фигура 18 Корелационна зависимост между нивата на MDA в плазмата и BMI при лица с метаболитен синдром



Фигура 19 Корелационна зависимост между нивата на MDA и АДМА в плазмата при лица с метаболитен синдром

1.3. Обсъждане

Ендотелната дисфункция, характеризираща се с намалена бионаличност на азотен оксид (NO) е един от основните фактори в патогенезата на MetS (*Fornoni A, Raji L, 2002; Tziomalos K et al 2010; Palomo I et al 2011*). През последните години значително нараства интересът към асиметричен диметил-аргинин (ADMA), явяващ се физиологичен регулатор на биосинтезата на NO (*Palomo J et al., 2011*).

Произлизащият от ендотела NO, който се синтезира от L-аргинина с помощта на NO-синтетаза (eNOS), представлява важен регулатор на съдовата хомеостаза. Освен че е силен вазодилатор, NO играе ролята и на инхибитор за адхезията на редица инфламаторни клетки към съдовата стена. Той потиска процесите на агрегация на тромбоцитите и на пролиферация на гладкомускулните клетки. Инактивирането и/или нарушената синтеза на NO се среща често при пациенти с налични рискови фактори за сърдечно-съдови заболявания (ССЗ) и може да доведе до развитие на ендотелна дисфункция, хипертония, тромбоза и атерогенеза (*Desjardins F, Balligand JL, 2006*).

ADMA е инхибитор на eNOS и се смята за един от ключовите фактори за ендотелната дисфункция (*Tan B et al., 2007*). Счита се, че повишените серумни нива на ADMA и намалената синтеза на NO водят до развитието на ендотелна дисфункция и ССЗ, инициращ фактор в развитието на атеросклероза (*Kawashima S, 2004*).

Резултатите от нашите изследвания показват сигнификантно повишени плазмени нива на ADMA при лица с MetS спрямо контролната група (Фигура 7). Повишени плазмени нива на ADMA са доказани при пациенти със захарен диабет тип 2 (*Abbasi, 2001*), хиперхолестеролемия (*Bode-Boëger SM et al., 1996, Boëger RH et al., 2003*), хипертриглицеридемия (*Lundman P et al., 2001*) артериална хипертония и затлъстяване (*Perticone F et al, 2010*), като компоненти на метаболитния синдром.

Установено бе повишаване плазмените нива на глюкозата, проатерогенни липиди като TG, OX, LDL, докато на HDL са намалени в метаболитната група (Фиг. 8,9, 10). Повишени са също WC и BMI в метаболитната група (фиг. 12 и 14). Освен това, нашите данни показват положителна корелация на ADMA с TG, ADMA и TG/HDL и ADMA и LDL/HDL, ADMA и WC, ADMA и BMI (Фиг.11,13,15 и таблица 4)

Данните за връзка на хиперхолестеролемията, както и на други рискови фактори като затлъстяването, хиперурикемията и ендотелната дисфункция са противоречиви. Редица проучвания съобщават за значителна връзка между повишените нива на ADMA, хиперхолестеролемията и ендотелната дисфункция при лица с MetS (*Dayal S, 2005; Ferlazzo N a, 2021; Jamwal S, Sharma S., 2018; Kwiecien S et al.2012*).

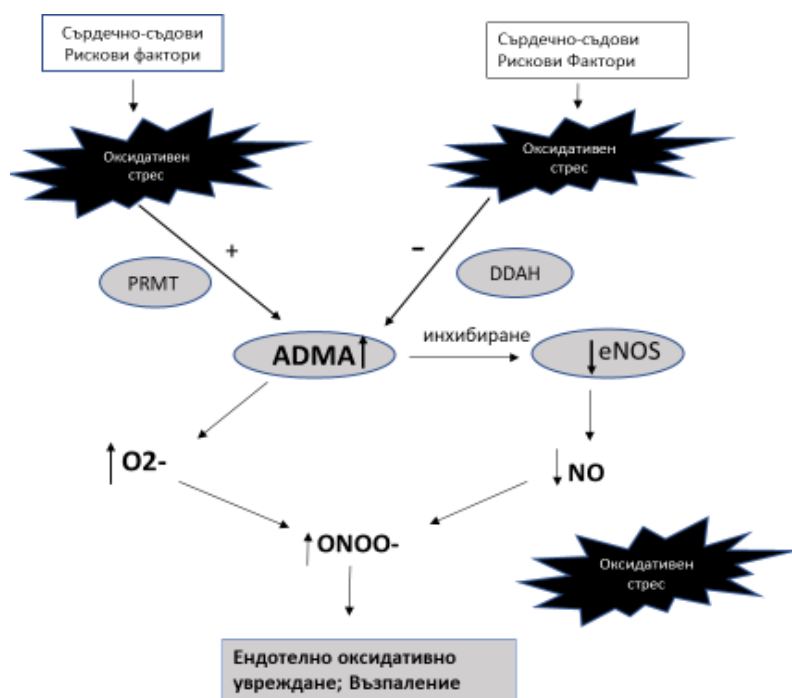
Известно е, че ADMA се метаболизира от диметиларгинин диметиламинохидролази (DDAH1) до диметиламин и цитрулин (*Leiper J et al 2007, Pope AJ et al 2009*). От друга страна, ADMA се произвежда чрез разграждане на метилирани протеини под действието на ензими, наречени протеин аргинин метилтрансферази тип I (PRMT-I) (*Vallance N et al., 2004, Ferlazzo N et al., 2021, Leiper J et al., 2007*). Експресията на PRMT-I в ендотелната клетка се регулира от присъствието на естествен или окислен LDL холестерол, като и двата са повишени при тези пациенти с MetS (*Pope AJ et al., 2009*).

Доказано е, че хиперхолестеролемията може да наруши функцията или регулирането на DDAH1 и да доведе до вътреклетъчно натрупване на ADMA и повишен оксидативен стрес (*Bode-Bo`ger, 1996*). Повишена генна експресия на PRMT- I е друг механизъм, чрез който ADMA се повишава при хиперхолестеролемия (*Böger RH et al., 2000*).

Рисковите фактори като хиперхолестеролемията и хипергликемия стимулират продукцията на свободни радикали при метаболитен синдром (*Bekyarova, 2007*). Резултатите от настоящото изследване показват повишаване нивото на MDA в плазмата ключов фактор на липидната пероксидация и оксидативния стрес при лицата с MetS (Фиг. 17). Установихме и корелационна връзка между MDA и липидните маркери както и между MDA и BMI в метаболитната група (фиг. 18).

В настоящото проучване открихме значителна положителна връзка между ADMA като маркер за ендотелна дисфункция и MDA в плазмата, маркер на осидативния стрес и оксидативното увреждане (Фиг. 19)

Известно е, че оксидативният стрес намалява активността на DDAH1 разграждащ АДМА и повишава неговата синтеза, активирайки PRMT, което води до повишаване нивото на ADMA в плазмата, инхибиране на eNOS и намаляване на бионаличността на NO (*Ito Aet al.,, 1999*) *Pope AJ et al., 2009; Böger RH et al., 2000, Jamwal S, Sharma S, 2018*) (Фиг. 20)



Фигура 20 Схема, изобразяваща механизмите, лежащи в основата на увеличаването на образуването на асиметричен диметиларгинин (ADMA). Оксидативният стрес поради увеличаване на сърдечно-съдови рискови фактори като диабет хиперхолестеролемия, хипергликемия, хипертония, може да стимулира производството на ADMA и/или да инхибира разграждането на ADMA, което води до намаляване на инхибирането на eNOS и намаляване на наличността на NO. Освен това бионаличността на NO може да бъде намалена от ADMA поради индуцирано от супероксид разграждане на NO, образуване на пероксинитрит (Pope AJ et al., 2009)

Хроничното приложение на ADMA намалява активността на супероксид дисмутазата (SOD), глутатион пероксидазата и каталазата и повишава ОС и ендотелната дисфункция (Kwiecien S, 2012). Това е придружено с повишени циркулиращи нива на MDA, маркер на липидната пероксидация и ОС (Leiva E et al., 2003; Kwiecien S et al., 2012).

ADMA може директно да инхибира eNOS, което води до генериране на по-малко NO и повече супероксид (O_2^-), повишаване нивото на липидната пероксидация и директно увреждане на ендотелните клетки (Ito A et al., 1999). Освен това, O_2^- могат да инактивират NO като пероксинитрит ($ONOO^-$), който не притежава протекторните свойства на NO, но има и увреждащо действие върху ендотелните клетки и задълбочава ендотелната дисфункция (Förstermann U & Li H, 2011). Освен това супероксидните радикали предизвикват оксидиране на LDL които

имат важна роля в атерогенезата. (Förstermann & LI, 2011). Възможен механизъм за намаляване на активността на eNOS и бионаличността на NO е също така и инхибиторният ефект на свободните радикали и провъзпалителните цитокини върху експресията на този ензим в съдовия ендотел (Pope AJ et al., 2009).

Възможно е да се спекулира, че хиперхолестеролемията, повишената концентрация на ADMA и ОС предизвикват намаляване на NO в ендотела (Leiper J et al, 2007). Намалената бионаличност на NO поради намалена eNOS активност и/или разграждане на NO води до нарушена ендотел-зависима вазодилатация, склонност към образуване на тромби и ремоделиране на съдовата стена (Chan JP et al., 2000).

Освен това ОС също чрез стимулиране на възпалителен отговор може да увеличи експресията на провъзпалителни цитокини, адхезионни молекули и да допринесе за прогресивното развитие ендотелна дисфункция при MC (Sydow K, Münzel T, 2003)

Установено е, че хиперхолестеролемията и повишените нива на ADMA и MDA водят до ендотелна дисфункция, ключов фактор в развитието на проатерогенни промени на ендотелните клетки и съдови събития, включително мозъчен инсулт и инфаркт на миокарда (Vladimirova-Kitova LG et al., 2008; Petrova JJ et al., 2015).

Следователно, ОС представлява важна биохимична връзка между рисковите фактори стимулиращи ED и ранните проатерогенни промени в ендотела. Връзката между ADMA и ОС в патогенезата на ендотелната дисфункция при MetS е слабо проучена.

Разкъсването на този порочен кръг е от важно значение за ограничаване развитието на ендотелната дисфункция. Има данни, че прилагането на антиоксиданти възстановява активността на DDANH1 и намалява вътреклетъчните нива на ADMA. Мелатонинът намалява плазмените нива на ADMA, като предотвратява индуцираното от оксидативен стрес намаляване на активността на DDANH при фруктоза-индуциран модел на метаболитен синдром при плъхове (Tain, 2010). Ресвератролът, известен като уловител на OH/O₂⁻ и пероксидни радикали, е в състояние да индуцира антиоксидантни защитни механизми и да ограничи липидната пероксидация и да възстанови активността на DDANH1, ензим, който разгражда ADMA в ендотелните клетки при висок глюкозно-медиран ОС (Bonnefont-Rousselot, 2016). Все още няма публикувани

данни за ефектите на антиоксидант върху параметрите на ADMA-MDA-NO в кръвта при хора (Maas , 2005).

Настоящото проучване показва, че нивата на ADMA, ключов фактор за ендотелна дисфункция и MDA, маркер за ОС и липидна пероксидация и проатерогенни липиди са повишени при лицата с метаболитен диндром. Възможно е и други фактори, освен хиперлипидемията, да доведат до повишаване на нивата на ADMA и MDA в плазмата.

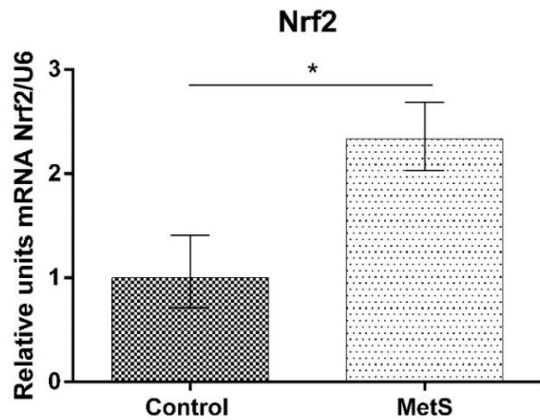
Въз основа на настоящите изследвания констатации, ние предполагахме възможната роля на ADMA и MDA като предсказващи биомаркери за ендотелна дисфункция и кардио-метаболитен риск. ADMA и MDA могат да бъдат полезни диагностични маркери за откриване на ранни промени при сърдечно-съдови увреждания, когато традиционните скринингови тестове са все още нормални.

По-нататъшните ни проучвания ще бъдат насочени към клетъчно-молекулярните механизми на промените в ADMA и MDA с акцент върху транскрипционните фактори Nrf2 и HO-1 маркери на антиоксидантната защита на клетките .

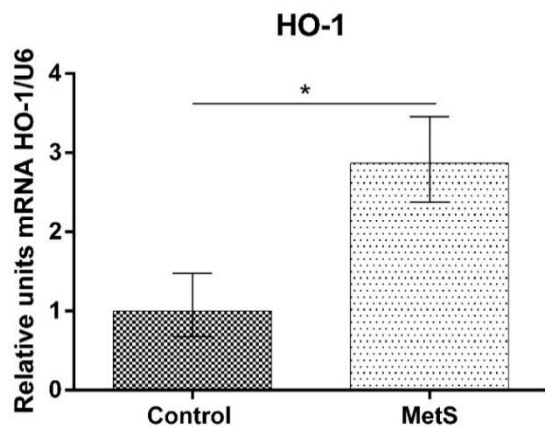
2. ВРЪЗКА МЕЖДУ ЕКСПРЕСИЯТА НА Nrf2, HO-1 И NF-kB, ADMA В ПЛАЗМАТА И ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС ПРИ ЛИЦА С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ

2.1 Експресията на Nrf2, NF kB и HO-1 в мононуклеарни клетки от периферна кръв (PBMС) при лица с метаболитен синдром

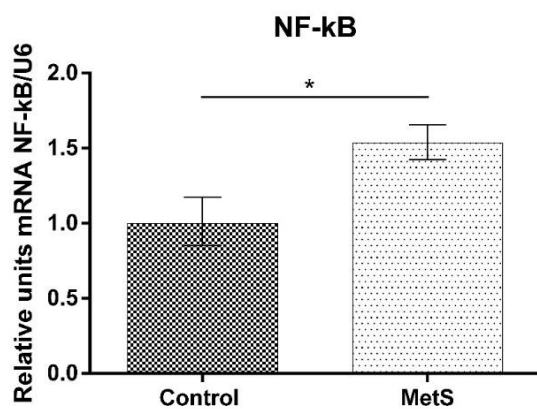
Нашите изследвания показват че NF-KB mRNA (над 53%), Nrf2 mRNA (над 130%), and HO-1 mRNA expression (над 185%) периферни мононуклеарни клетки (PBMС) в метаболитната група бяха повишени сигнификантно в сравнение с контролните лица.



Фигура 21 *Nrf2* експресия в РВМС при лица с метаболитен синдром *MetS*) и контролата(С). Данните са представени като $\text{mean} \pm \text{SEM}$ статистическа значимост беше представена като $p < 0.05$), * $p < 0.05$



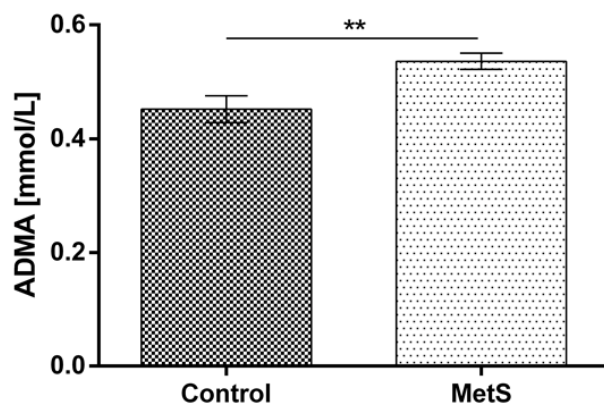
Фигура 22 Експресия на *HO-1* в РВМС при лица с метаболитен синдром *MetS*) и контролата (С). Данните са представени като $\text{mean} \pm \text{SEM}$ статистическа значимост беше представена като $p < 0.05$), * $p < 0.05$



Фигура 23 Генна експресия на *NF-kB* в РВМС при лица с метаболитен синдром *MetS*) и контролата (С). Данните са представени като $\text{mean} \pm \text{SEM}$ статистическа значимост беше представена като $p < 0.05$), * $p < 0.05$

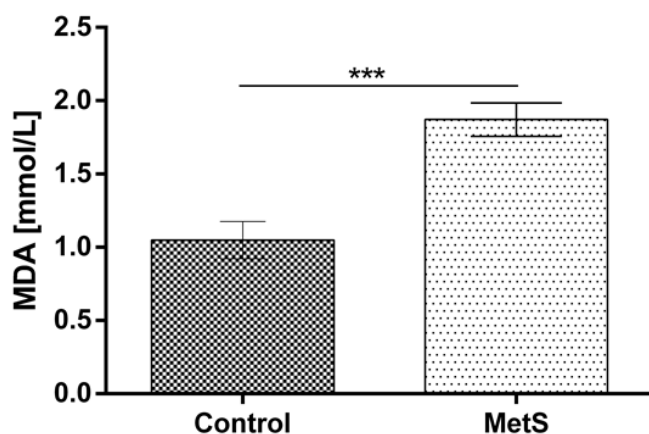
2.2 Изследване на промяната в плазмените нива на ADMA и MDA при лица с метаболитен синдром

Нивото на ADMA в плазмата е сигнификантно повишено в метаболитната група спрямо контролата с 20% (0.42 ± 0.02 to 0.52 ± 0.01) (Фиг.24)



Фигура 24 Плазмени ADMA нива при лица с метаболитен синдром MetS) и контролата(С). Данните са представени като $mean \pm SD$ статистическа значимост беше представена като $p < 0.05$), $**p < 0.01$

Нивото на MDA в плазмата беше сигнификантно повишено при лица метаболитен синдром група спрямо контролата с 78% (1.05 ± 0.13 to 1.87 ± 0.11) (Фиг. 25).



Фигура 25 Плазмени MDA нива при лица с метаболитен синдром MetS) и контролата(С). Данните са представени като $mean \pm SEM$ статистическа значимост беше представена като $p < 0.05$), $***p < 0.001$

2.3 Обсъждане

В настоящото проучване ние изследвахме експресията на NF- κ B, транскрипционен фактор, медиращ възпалителния отговор и Nrf2 като критичен регулатор на защитата срещу оксидативен стрес, HO-1, ендотелен протектор и антиоксидант и връзката между тях и плазмената ADMA при хора с MetS.

Нашите данни показват, че плазменото ниво на ADMA, като маркер за ендотелна дисфункция и MDA, като маркер за оксидативен стрес и липидна пероксидация, се увеличават при MetS (Фиг. 24,25). Някои проучвания съобщават за значителна връзка между повишените нива на ADMA в плазмата, хиперхолестеролемията и ендотелната дисфункция при хора с метаболитен синдром (*Palomo I. et al., 2011; Dayal S, Lentz SR, 2005; Ferlazzo N et al, 2021*). Установено е, че хиперхолестеролемията и повишените нива на ADMA и MDA в плазмата предизвиква ендотелна дисфункция, ключов фактор в развитието на проатерогенни промени в ендотелните клетки и съдовите инциденти като мозъчен инсулт и инфаркт на миокарда. Хиперхолестеролемията може да наруши функцията или регулирането на диметиламино-хидролазата, като по този начин води до вътреклетъчно натрупване на ADMA и повишен оксидативен стрес (*Ito A, et al., 1999*).

В нашето проучване установихме значителна положителна връзка между плазмения MDA, маркер на оксидативен стрес и плазмения ADMA като маркер на ендотелна дисфункция (Фиг. 19). Известно е, че ADMA се метаболизира от диметиларгинин диметиламино хидролази (DDAH1) до диметиламин и цитрулин (*Leiper J et al. 2007; Pope AJ et al. 2009*). Оксидативният стрес, TNF- α , хомоцистеинът и нитрозативният стрес са показали, че намаляват активността на DDAH.

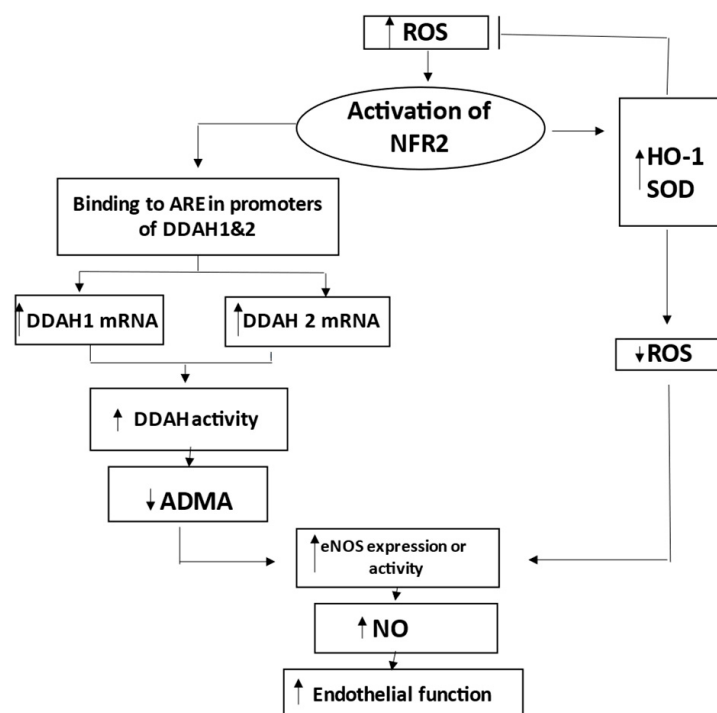
Установено е, че повишените плазмени концентрации на ADMA повишават продукцията на супероксид (O_2^-) от NADPH оксидазата и по този начин повишават оксидативния стрес и намаляват бионаличността на NO (*Sydow K, Munzel, 2003*). ROS и продуктите на липидна пероксидация са решаващ фактор за активиране на транскрипционните фактори Nrf2 и NF- κ B (*Kensler TW et al. 2007; Chen ZH, Niki E 2006*).

Експресията на ядрения фактор Nrf2 се повишава в PBMC (Фиг. 21). Nrf2 се намира в цитоплазмата и неговата транслокация към ядрото се управлява от различни стимули, които имат потенциал да нарушат редокс

баланса (Chen B et al, 2015; Zhang M et al, 2013; Zhou Set al. 2014). Следователно, при стресова среда, като окислителни/възпалителни инсулти, Nrf2 се придвижва към ядрото и се свързва с неговите ARE места, за да предизвика транскрипция на ензими, за да уравни ефекта от повишеното генериране на ROS (Фиг. 21).

Установено е, че Nrf2 може да активира DDAH-1, който метаболизира ADMA, ендогенен инхибитор на синтазата на азотен оксид eNOS (Pope AJ et al , 2009). Повишаването на DDAH1 води до понижаване нива на ADMA в плазмата, което би подобрило ендотелната функция чрез адекватно производство на NO (Nair N, Gongora E, 2017). Следователно, Nrf2 може да подобри ендотелното генериране на NO и ендотелната функция чрез регулиране на пътя DDAH/ADMA/eNOS (Фиг. 26)

HO-1 е Nrf2-зависим ген, който упражнява благоприятни ефекти чрез защита срещу оксидативно увреждане (Kim YM et al, 2011). HO-1 играе важна роля за намаляване продукцията на реактивни кислородни видове (ROS) чрез способността му да разгражда хема и да произвежда въглероден оксид, биливердин/билирубин и освобождаване на свободно желязо като последното се складира като феритин (Abraham N, Kappas A. 2005, Farombi EO & Surh YJ, 2006, Peterson SJ et al, 2019). Доказано е че при клинични изследвания дефицит на HO-1 при хора причинява оксидативен стрес и увреждане на ендотелните клетки (Yachie A et al, 1999). Обратно, повишената продукция на HO-1 протеин представлява опит за минимизиране на клетъчното увреждане (Schipper HM 2004). Ензимът хем-оксигеназа-1 е първата линия на защита на клетките срещу оксидантна атака. Доказано, че HO-1 участва в регулирането на много физиологични, както и патофизиологични процеси. HO-1 се експресира при ниски нива в ендотелните клетки и левкоцитите при физиологични условия, но той е силно индуцируем в отговор на различни патофизиологични стресове/стимули. (Kim YM et al.,2011) Активиране на цитозащитния Keap1-Nrf2 сигнален път, регулира голям брой гени на ензими, повишаващи антиоксидантния капацитет на клетките като хем-оксигеназа (HO-1), супероксид дизмутаза (SOD), глутатион-пероксидазата, глутатион редуктаза и др. (Osburn WO et al. 2006). По този начин индукцията на фактори за антиоксидантна защита повишава устойчивостта към последващи по-тежки за клетките атаки на АФК (Jaiswal AK, 2004).



Фигура 26 Схематично представяне на ролята на фактор 2, свързан с ядрения фактор еритроид 2 (Nrf2), за запазване на ендотелната функция по време на активиране от реактивни кислородни видове (ROS). Nrf2 увеличава експресията на HO-1 и други гени, за да намали ROS. Nrf2 също така увеличава DDAH-1 и DDAH-2, което води до разграждане и намаляване на ADMA, който е инхибитор на eNOS. Намалените нива на ADMA водят до подобро производство на NO и свързана с него ендотелна функция. По този начин, Nrf2 координира HO-1/DDAH/eNOS пътища, които усилват ендотелното генериране на NO и ендотелната функция. ADMA означава асиметричен диметиларгинин; ARE, елемент на антиоксидантен отговор; DDAH, диметиларгинин диметиламинохидролаза; eNOS, ендотелна азотен оксид синтаза; HO-1, хемооксигеназа-1; и SOD, супероксид дисмутаза (Bekyarova G et al .2023)

Настоящото проучване показва повишена експресия на HO-1 в PBMC (Фигура.22). Активирането на HO-1 известен още като HSP32 се счита за адаптивен и протективен отговор срещу оксидативен стрес, индуциран от различни стресори като окислени липопротеини, цитокини, хемодинамични промени, ангиотензин II и азотен оксид (NO) в съдовата стена. (Abraham NG, Kappas A, 2008. Naito Y et al 2014

Протекторният механизъм на HO-1 е свързан се свързва с генерирането на хем-метаболити - CO, билирубин и феритин (Paine A et al, 2010 ; Wunder C & Potter RF, 2003, Kawashima S, Yokoyama M. 2004)) Установено е, че биливердинът и CO медиат повечето

противовъзпалителни, антиоксидантни и антиапоптотични ефекти на HO-1. Билирубинът улавя пероксилните радикали, едни от най-мощните стимулатори на липидната пероксидация (Yesilkaya AR et al., 2000). CO освен антиоксидантно има и антивъзпалително действие и подпомага цитопротективните ефекти на билирубин. CO подобно на NO има вазодилатиращо действие (Durante W 2002). CO освен антиоксидантно има и антивъзпалително действие (Otterbein L E, Choi AMK, 2000) и антипролиферативно действие (Song R et al, 2003). Антиапоптотичното действие на HO-1 се медира от CO (Brouard S et al, 2000).

Ензимът HO-1 като Nrf2-зависим ген, упражнява благоприятни ефекти чрез ендотелната защита срещу оксидативно увреждане (Yachie A et al, 1999). Индукцията на ензима HO-1 има цитопротективен ефект при диабет (AbrahamVG, Kappas A, 2008), хипертония, исхемия/реперфузия (Yet SF et al.,2001). атеросклероза (Juan SH et al 2001). Обратно инхибирането на HO-1, например, при диабетични мишки, засилва ОС, причинява увреждане на ендотелните клетки и и ускорява образуване на атеросклеротични лезии, кое показва протективната роля на HO-1 срещу развитието на атеросклерозата (Kishimoto Y et al, 2019). HO-1, чрез своята антиоксидантна активност, може да противодейства на вредния ефект на ROS при затлъстяване, хипертония и диабет, метаболитен синдром и ССЗ (AbrahamVG, Kappas A, 2008). Активирането на HO-1 инхибира производството на ROS, поддържа на ендотелно-зависима релаксация и генериране на NO в допълнение към подобряването на инсулиновата чувствителност и предотвратяване на съдовите усложнения при експериментален модел на MetS (El-Bassossy HM et al., 2014).

Пациентите с по-високо ниво на HO-1 имат по-високи стойности на атерогенни липиди, глюкоза и др рискови фактори и в сравнение с другите пациенти. Установено е, че индукцията на HO-1 намалява липидната пероксидация в плазмата и артериалната стена (Ishikawa K, 2003). Обратно, оксидативният стрес при дефицит на HO-1 причинява засилено увреждане на ендотелните клетки (Yachie A et al., 2021).

Счита се, че повишена експресия на HO-1 е компенсаторен отговор за предпазване от оксидативен стрес, предизвикан от високо ниво на глюкоза при захарен диабет(Bao W et al., 2010). Morsi WG et al. (2006) съобщават за повишена експресия и активност на HO-1 в ендотелните

клетки при атеросклероза. Експресията на HO-1 е фактор, който стимулира стабилизирането на атеросклеротичните плаки.

В настоящото проучване установихме, че плазмените нива на ADMA (ендогенен eNOS инхибитор) и MDA са повишени при хора с и между тях е налице функционална връзка (фиг 19). Индукцията на HO-1 може да възстанови намалената активност на eNOS и да компенсира загубата на бионаличност на NO не само чрез инхибиране на генерирането на активността на NADPH оксидаза и на супероксидни радикали, но и чрез увеличаване на SOD и каталазния и антиоксидантен капацитет на ЕС при Mets (Pae, HO et al 2010; El-Bassossy, HM et al, 2014). CO, притежаващ антиоксидантни свойства, е възможно да предотврати декуплирането на eNOS.

Според Pae HO et al. (2010) съществуват три възможни сценария за запазване на съдовия NO чрез HO-1 и продукти на разграждане на хема (1) модулиране на експресията и активността на eNOS, (2) предотвратяване на инактивиране на съдов NO, и (3) компенсиране загубата на съдовия NO.

Доказано е, че при клинични изследвания дефицит на HO-1 при хора причинява оксидативен стрес и увреждане на ендотелните клетки (Yachie A et al, 1999). Обратно, повишената продукция на HO-1 протеин представлява опит за минимизиране на клетъчното увреждане (Schipper HM 2004).

Активирането на транскрипционния фактор Nrf2, повишавайки експресията на HO-1, може да инхибира оксидативния стрес и да увеличи активността на eNOS и производството на NO (Pae HO et al, 2010). HO-1, чрез модулиране на експресията на Nrf2, предизвиква адаптивно препрограмиране и подобрява антиоксидантната защита (Biswas C et al., 2014). Съобщава се, че повишената експресия на HO-1 и продуктите на разграждане на хема могат да подобрят съдовата функция, поне отчасти, чрез компенсиране на загубата на NO (Pae HO et al., 2010).

Според редица автори изследването на HO-1 дава възможност за оценка на адаптационните механизми на организма в условията на оксидативен стрес и възможностите за терапевтично въздействие (Biswas C et al., 2014). Изследването на връзката между ADMA, HO-1 и оксидативния стрес би допринесло за изясняване на сложните патофизиологични механизми на ендотелна дисфункция при MetS и това е важно за превенцията, ранната диагностика и стратегията за лечение на MetS.

Увеличавайки експресията на HO-1 и други антиоксидантни гени. Nrf2 може да намали ROS, DDAH-1 и DDAH-2 и ADMA в плазмата и да увеличи активността на eNOS и NO бионаличност (*Pope AJ et al, 2009*). Следователно, Nrf2 координирайки HO-1/DDAH/eNOS пътища, може да подобри ендотелното генериране на NO и ендотелната функция.

Данни от предишно проучване показва, че ADMA може в зависимост от концентрацията да увеличи производството на ROS, които действат като вторични посредници и активират NF-κB в ендотелните клетки (*Abraham NG, Kappas A, 2008*). Данните от настоящото проучване показват повишена експресия на NF-κB в PBMC (Фигура 23.), което съответства на по-високи плазмени нива на MDA и ADMA при MetS.

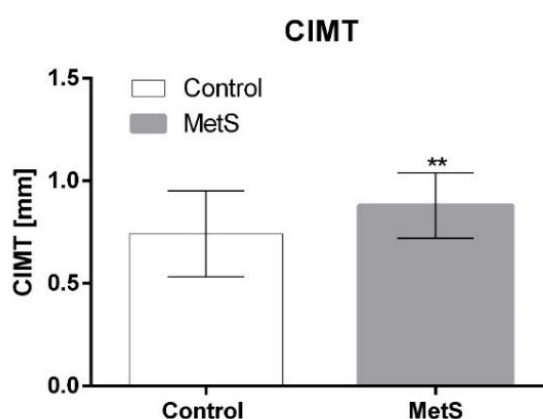
ADMA може да активира NF-κB и експресията на цитокини и експресията на разтворими ICAM-1 и VCAM-1 и адхезивността на моноцитите и може да медира техните провъзпалителни действия в ендотела (*Mangoni AA et al, 2021*). Доказано е, че намалената активност на eNOS/NO при натрупване на АДМА активира транскрипционния фактор NF-κB, отговорен за експресията на ендотелин-1 и други провъзпалителни медиатори, включително TNFα, IL-6, свободни радикали, хемокини и адхезивни молекули (ICAM-1, ELAM-1), както и iNOS, допринасящ за ендотелна дисфункция.

В заключение, резултатите от настоящото проучване показват значението на транскрипционния фактор Nrf2, играещ важна роля в защитата на ендотела и на NF-κB, транскрипционен фактор, медиращ възпалителния отговор в патогенезата на ендотелната дисфункция при MetS. Изследването на връзката между ADMA, HO-1 и транскрипционните фактори Nrf2 и NF-κB би допринесло за изясняване на сложните патофизиологични механизми на ендотелно увреждане при MetS и това е важно за превенцията, ранната диагностика и стратегията за лечение на ССЗ. Познаването на сложни клетъчно-молекулярни механизми би позволило използването на биомаркери като HO-1, ADMA и Nrf2 и NF-κB за оценка на ЕД в клиничната практика.

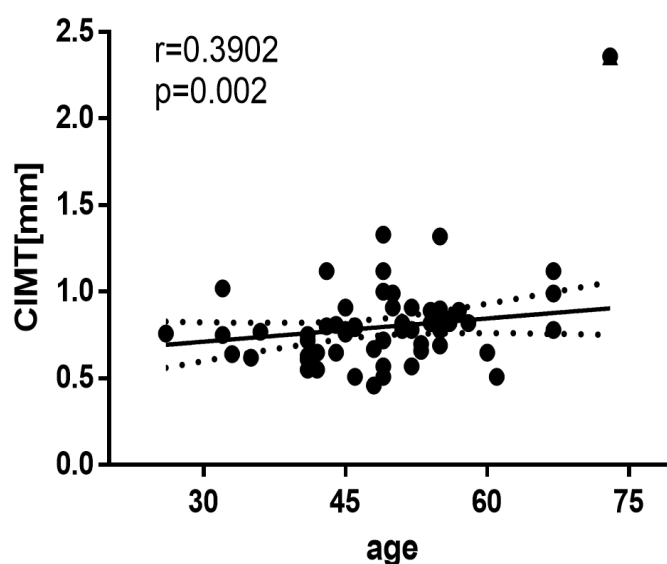
3. ПРОМЕНИ В ДЕБЕЛИНАТА НА ИНТИМА- МЕДИА КОМПЛЕКС (СІМТ) И ВРЪЗКАТА С РЕДОКС БАЛАНСА И ВЪЗРАСТТА НА ЛИЦА С МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ

3.1 Сравнителен анализ на стойностите на СІМТ при лица с метаболитен синдром и контролната група

Стойностите на СІМТ бяха сигнификантно повишени в метаболитната група спрямо контролата с 20% (0.703 ± 0.021 to 0.922 ± 0.061) (Фиг 27)



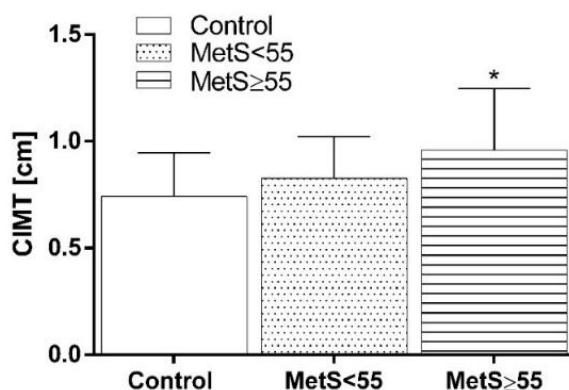
Фигура 27 СІМТ при лица с метаболитен синдром (MetS) и контролата (C). Данните са представени като средна стойност $\text{mean} \pm \text{SEM}$ (статистическа значимост е посочена при $p < 0,05$). ** $p < 0,01$



Фигура 28 Корелационна зависимост СІМТ и възрастта на лица с метаболитен синдром (MetS) и контролата (C)

3.2 Сравнителен анализ на стойностите на СІМТ според възрастта на лица с MetS

Стойностите на СІМТ бяха повишени недостоверно в MetS < 55 група с спрямо контролата и с 7 % (0.703 ± 0.021 to 0.755 ± 0.051) и в MetS < 55 група с 31 % (0.703 ± 0.021 to 0.922 ± 0.061) (Фиг.29)

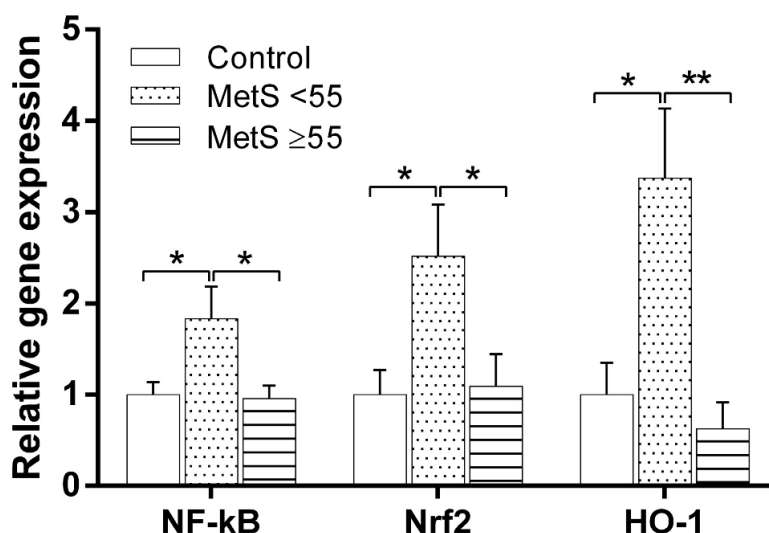


Фигура 29 Промени в СІМТ според възрастта на лица с MetS. Данните са представени като средна стойност ± SEM. Контролна група: СІМТ < 0,9 mm, възраст < 55. Групата с MetS е разделена на две подгрупи MetS с възраст < 55 и MetS с възраст ≥ 55.

3.3 Експресия на NF-kB, Nrf2 и HO-1 в РВМС според възрастта

Както е показано на Фигура 30, беше открита значително повишена експресия на трите изследвани гена в MetS група, възраст < 55. Тук величината на увеличените нива на mRNA е както следва: 83% за NF-kb ($p < 0.05$); 251% за Nrf2 ($p < 0.05$) и 337% за HO-1 ($p < 0.05$).

Установена е значително повишена експресия на трите изследвани гена в подгрупата MetS на възраст < 55 години (Фигура 2). Увеличението на нивата на mRNA е както следва: 83% за NF-kb ($p < 0.05$), 251% за Nrf2 ($p < 0.05$) и 337% за HO-1 ($p < 0.05$). Очевидно е, че нивото на експресия на тези гени в РВМС е повишено при пациенти под 55-годишна възраст, и HO-1 изглежда е най-засегнатият сред изследваните гени. За разлика от това, в подгрупата MetS с индивиди над 55-годишна възраст, гените са били недостатъчно регулирани, достигайки нивата на контролната група, което води до статистически значима разлика между подгрупите MetS на възраст < 55 и възраст ≥ 55 (Фигура 30)

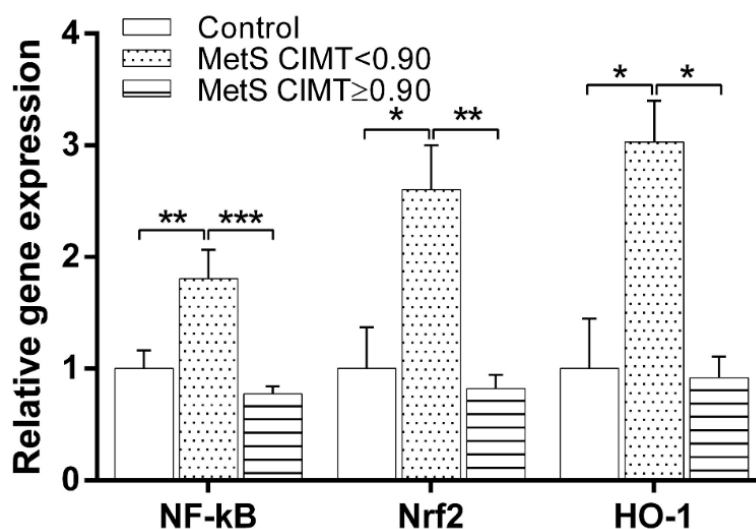


Фигура 30 Експресия на NF-kB, Nrf2 и HO-1 в PBMC, в зависимост от възрастта при MetS. Контролна група: възраст < 55. Групата с MetS е разделена на две подгрупи: MetS с възраст < 55 и MetS с възраст ≥ 55. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$,

3.4. Експресия на NF-kB, Nrf2 и HO-1 в PBMC според CIMT

Експресията на NF-kB, NRF2 и HO-1, в зависимост от CIMT, следваше същия модел като зависимостта от възрастта. Групата с MetS беше разделена според стойностите на техния CIMT: MetS с CIMT < 0,90 mm и MetS с CIMT ≥ 0,90 mm. CIMT от 0,90 mm се считаше за гранична стойност.

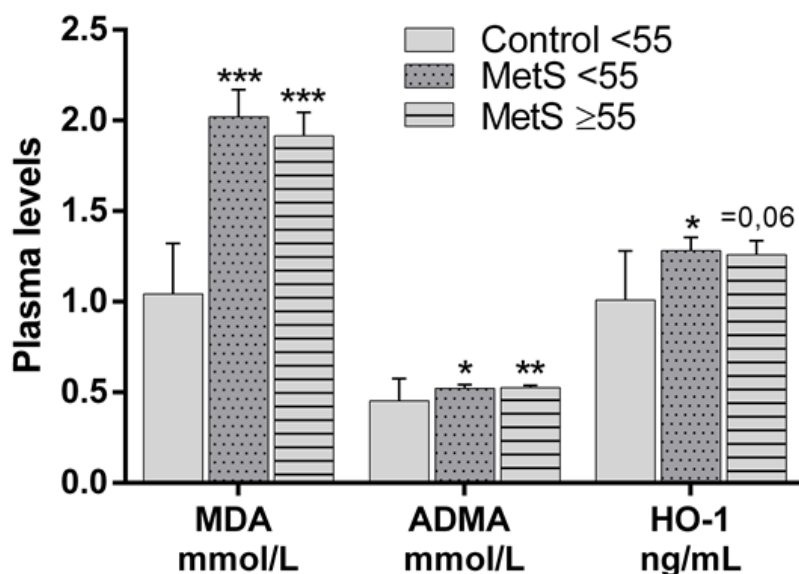
Значително повишена експресия на трите изследвани гена в MetS групата с CIMT < 0.90 mm беше установена, както следва: 80% за NF-kB ($p < 0.01$); 260% за Nrf2 ($p < 0.05$) и 303% за HO-1 ($p < 0.05$). Отново се наблюдава тенденция с нива на експресия на NF-kB, Nrf2 и HO-1 в PBMC, променящи се с възрастта, като HO-1 е най-засегнат сред трите изследвани гена. Подобно на резултатите за зависимостта на експресията на NF-kB, Nrf2 и HO-1 от възрастта, тук данните показват, че в MetS подгрупата с индивидис CIMT ≥ 0.90 mm, тези гени са били недостатъчно регулирани, достигайки нивата на контролната група или дори по-ниски, като е установена статистически значима разлика между MetS подгрупите с различен CIMT.



Фиг 31 Относителни нива на експресия на *NF-kB*, *Nrf2* и *HO-1* в *PBMC*, в зависимост от *CIMT*. Контролна група: *IMT* < 0,90 mm. Групата с *MetS* беше разделена на две подгрупи: *MetS* с *CIMT* < 0,90 mm и *MetS* с *CIMT* ≥ 0,90 mm. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.5 Нива на MDA, ADMA и HO-1 в плазмата според възрастта

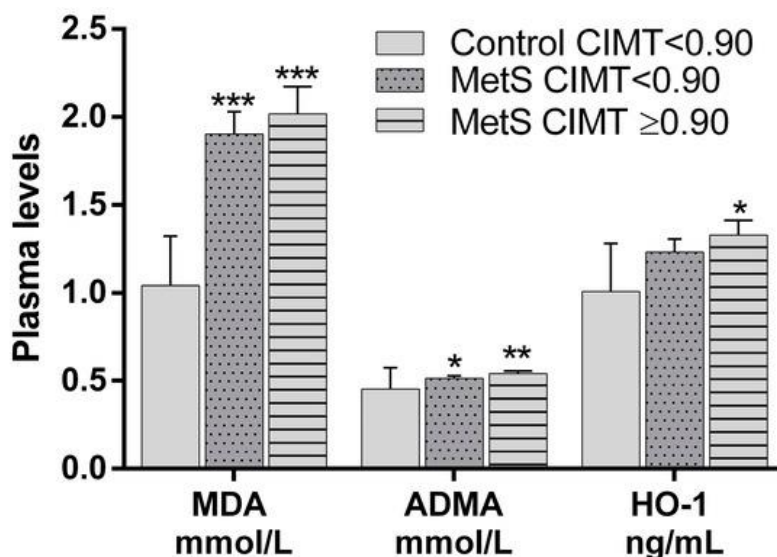
Плазмените нива на MDA, ADMA и HO-1 ензима се променят с възрастта. Данните показват значително по-високи плазмени нива за MDA и ADMA и в двете подгрупи *MetS* < 55 и *MetS* ≥ 55. HO-1 е по-висок само в подгрупата *MetS* < 55. Разликата между подгрупите на *MetS* не е значима (Фиг. 32)



Фигура 32 Плазмени нива на MDA, ADMA и HO-1 в изследваните субекти, според възрастта. Контролната група беше съставена от индивиди на възраст < 55, докато *MetS* групата беше разделена на две части: *MetS* с възраст < 55 и *MetS* с възраст ≥ 55.

3.6. Плазмени нива на MDA, ADMA и HO-1 според CIMT

Данните за плазмените нива на MDA, ADMA и HO-1, базирани на CIMT (mm), са показани на Фиг.33. Имаше значително по-високи плазмени нива на изследваните параметри и в двете подгрупи с MetS, базирани на CIMT, в сравнение с контролната група. Разлика между двете подгрупи с MetS според CIMT не беше установена.



Фигура 33. Плазмени нива на MDA, ADMA и HO-1 в изследваните субекти въз основа на CIMT. Контролна група: CIMT < 0,90 mm. Групата с MetS е разделена на две подгрупи: MetS с CIMT < 0,90 mm и MetS с CIMT ≥ 0,90 mm. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.7 Обсъждане

Метаболитният синдром се определя от СЗО като патологично състояние, характеризиращо се с абдоминално затлъстяване, инсулинова резистентност, хипертония и хиперлипидемия (Saklayen MG, 2018). Компонентите на MetS и свързаният сърдечно-съдов риск могат да нарушат съдовата ендотелна функция и структурата на съдовата стена и могат да доведат до атеросклероза и съдови заболявания (Mathieu P et al, 2006).

CIMT е широко използван маркер на ендотелната дисфункция и повишен риск от ССЗ и атеросклероза (Kawada T et al., 2016, Jung JM et al, 2014. Scuteri A et al., 2004). CIMT се използва като структурен маркер на субклинична атеросклероза и е свързан с ED и възрастта (Pezzano A et al., 2006). CIMT е маркер за оценка на субклиничните прояви на сърдечно-

съдови и метаболитни заболявания и е силен предиктор за бъдещи церебрални и сърдечно-съдови събития (Aydin M et al., 2013).

Данните от нашето изследване показват нарастване на СИМТ при лицата с MetS (Фигура 28). И други автори съобщават за повишаване на СИМТ при захарен диабет, хипертония, затлъстяване, компоненти на MetS (Rubio-Guerra AF et al, 2010; Ungvari Z

et al., 2011; Dawson JD et al., 2009. Увеличаването на СИМТ, измерен чрез ултрасонография, е пряко свързано с повишен риск от миокарден инфаркт и инсулт дори при по-възрастни хора без анамнеза за сърдечно-съдови заболявания (Robertson CM et al., 2012).

Ние установихме положителна корелационна зависимост между СИМТ и възрастта (фиг. 28). Нашите данни показват постепенно увеличаване на СИМТ с възрастта (Фиг. 29). Въпреки това, статистически значим по-висок среден СИМТ е установен само в подгрупата MetS >55 в сравнение с контролната група ($0,96 \pm 0,29$ спрямо $0,74 \pm 0,21$, $p < 0,05$).

Има данни, че наличието и тежестта на MetS, свързано с СИМТ в различни популации е феномен, концептуализиран като ранно съдово стареене (Koç AS et al, 2019). Механизмите на тези промени не са напълно изяснени , но се смята че оксидативният стрес и възпалението имат много важна роля. Доказано е, че последиците от оксидативния стрес и нискостепенното възпаление, причиняващи ED и увреждане на ендотела, се изострят с напредване на възрастта (Jia G et al., 2019). Има сериозни доказателства, които предполагат, че Nrf2 предпазва от индуциране на клетъчно стареене. Съдовият оксидативен стрес при стареене е свързан с дисфункция на Nrf-2 (Kloska D et al. 2019).

Nrf2, редокс-чувствителен транскрипционен фактор, повишава експресията на хемоксигеназа 1 (HO-1) и други гени (Ungvari Z et al., 2011) и играе важна роля в ендотелната защита срещу оксидативен стрес и в регулиране на клетъчния редокс баланс (Chen B et al., 2015). Реактивните кислородни видове (ROS) и продуктите на липидна пероксидация и нискостепенно възпаление са решаващи фактори за активирането на транскрипционните фактори Nrf2 и NF-kB (Motohashi, H, Yamamoto, M. 2004). Връзката между СИМТ и биомаркерите за ендотелна функция, свързани с оксидативния стрес и възпалението при хора с MetS не е изяснена. В литературата не открихме данни за промените в СИМТ и свързаните с възрастта и редокс- баланса при MetS.

Проучихме как нивата на експресия на NF-kB, Nrf2 и HO-1 в PBMC на лица с MetS варират в зависимост от възрастта и СИМТ. Контролната група беше проектирана да съдържа здрави лица на възраст < 55 години. Групата с MetS включваше лица както под, така и над 55 години. Както е показано на Фигура 30, беше открита значително повишена експресия на трите изследвани гена в подгрупата с MetS на възраст < 55 години. Увеличението на нивата на mRNA в подгрупата с MetS на възраст < 50 години беше следното: 83% за NF-kB ($p < 0,05$), 251% за Nrf2 ($p < 0,05$) и 337% за HO-1 ($p < 0,05$). Очевидно е, че нивото на експресия на тези гени в PBMC се променя с възрастта и че HO-1 изглежда е най-засегнатият сред изследваните гени. За разлика от това, в подгрупата MetS с индивиди на възраст над 55 години е видимо, че тези гени са недостатъчно регулирани, достигайки нивата на контролната група. По този начин, разликата между подгрупите MetS на възраст < 55 и на възраст ≥ 55 беше определена като статистически значима (Фигура 30).

Както е показано на Фигура 31, е установена значително повишена експресия на трите изследвани гена в групата MetS с IMT < 0,9 mm. Увеличението на нивата на mRNA в подгрупата MetS с СИМТ < 0,90 mm е следното: 80% за NF-kB ($p < 0,01$), 260% за Nrf2 ($p < 0,05$) и 303% за HO-1 ($p < 0,05$). Отново беше открита тенденция с променящи се с възрастта нива на експресия на NF-kB, Nrf2 и HO-1 в PBMC, като HO-1 е най-засегнатият сред изследваните гени. Подобно на резултатите за зависимостта на експресията на NF-kB, Nrf2 и HO-1 от възрастта, тук данните показват, че в подгрупата MetS с индивиди с IMT ≥ 0.90 mm, тези гени са били недостатъчно регулирани, достигайки нивата на контролната група или дори по-ниски, което води до установяване на статистическа значимост между подгрупите MetS с различна СИМТ (Фиг.31).

Можем да спекулираме, че защитните механизми, включващи Nrf2 и HO-1, намаляват с възрастта. Това може да е причина за влошаване на ендотелната функция и за ускоряване на ендотелното увреждане на съдовете, регистрирано чрез повишаване на СИМТ и риск от сърдечно-съдови усложнения и инциденти.

Нашите резултати показват че експресия на тези гени в PBMC се променя с възрастта и HO-1 изглежда е засегнат най-много от изследваните гени (Фиг 30). Nrf2, редокс-чувствителен транскрипционен фактор, повишава експресията на хем оксигеназа 1 (HO-1) и други гени

(Ungvari Z et al, 2011) и играе важна роля в ендотелната защита срещу оксидативен стрес и регулира клетъчния редокс баланс. NO-1 се експресира на ниски нива в ендотелните клетки и белите кръвни клетки при физиологични условия, той е силно индуцируем в отговор на стрес (Abraham, NG, Kappas A 2005). NO-1 е описан като ключов регулатор на адаптивните клетъчни реакции към оксидативен стрес и нискостепенно възпаление и играе роля в клетъчната хомеостаза чрез силна антиоксидантна активност на билирубина и противовъзпалителен ефект на въглеродния оксид (Ferrándiz ML, Devesa I. 2008). Повишената експресия на Nrf2 и NO-1 при индивидите с MetS представлява опит за минимизиране на ендотелното увреждане (Abraham NG, Kappas A 2008).

Данните от нашите изследвания показват, експресията на Nrf2 и NO-1 и NF-kB е най-значима в метаболитната група на индивиди на възраст под 55 години (Фиг.30). За разлика от това, в подгрупата на MetS с индивиди на възраст над 55 години, се вижда, че експресията на тези гени е по-ниска, достигайки нивата на контролната група и по този начин разликата между MetS <55 и MetS ≥55 е статистически значима)

Намалената а експресия на Nrf2 при индивиди с MetS≥55 може да увеличи уязвимостта към рискови фактори и да ускори ендотелното увреждане, свързано с метаболитни нарушения и други патофизиологични състояния при стареене. Предполагаме, че на тези промени в експресията на тези Nrf2 и на NO-1 се дължат и по-високите стойности на CIMT при MetS≥55 (Фиг. 30).

В настоящото проучване ние изследвахме връзката на плазмените нива на ADMA, ендогенен инхибитор на азотен оксид синтаза е маркер за ендотелна дисфункция и MDA и NO-1 като маркери за липидна пероксидация и оксидативен стрес и CIMT като маркер за ендотелно увреждане, независим предиктор на сърдечно-съдовия риск при хората с MetS.

Установихме, че параметрите на редокс баланса, напр. MDA, ADMA и плазмените нива на NO-1 се различават според възрастта (фиг.32). Данните показват значително по-високи плазмени нива за MDA и ADMA и в двете подгрупи MetS <55 и MetS ≥ 55. NO-1 е с по-високи плазмени нива само в подгрупата MetS <55. Разликата между подгрупите на MetS не е значителна, което показва, че тези параметри не са свързани с възрастта.

По подобен начин, плазмените нива на MDA, ADMA и HO-1 са били значително по-високи в подгрупите с MetS въз основа на IMT в сравнение с контролите и не са се различавали между двете подгрупи с MetS, разделени според тяхната CIMT (Фиг. 33).

Доказано е, че повишените нива на MDA като маркер за оксидативен стрес и липидна пероксидация и ADMA като ендогенен конкурентен инхибитор на азотен оксид синтаза може да доведе до намалена активност на eNOS и нива на NO, което допринася за ED при захарен диабет (Said, M.A.2022) .

ADMA може да активира NF-κB, който е отговорен за експресията на ендотелин-1 и други провъзпалителни медиатори, като TNF-α, интерлевкин-6 (IL-6), свободни радикали, хемокини и адхезивни молекули, както и индуцируема NO синтаза (iNOS), допринасяйки за ендотелното увреждане (Mangoni AA et al, 2021). Установихме, че повишената експресия на NF-κB съответства на повишени плазмени нива на ADMA и MDA. Освен това, беше установено, че повишените плазмени концентрации на ADMA причиняват повишаване на производството на супероксид (O_2^-). Супероксидът може да се комбинира с NO, за да образува пероксинитрит, радикал ($ONOO^-$) с потенциално вредни ефекти върху съдовата стена, което допълнително допринася за обостряне на ендотелното увреждане и увеличаване на IMT (Cooke JP, 2005; Zsuga J et al.,2007)

Активирането на Nrf2/HO-1 сигналния път играе критична роля в антиоксидантната защита на ендотелните клетки в отговор на различни възпалителни и окислителни стимули [Peterson SJ, 2019]. Повишените плазмени нива на HO-1 могат да инхибират оксидативния стрес и нискостепенно възпаление, като по този начин подобрява ендотелната функция чрез повишаване на нивата на NO (Pae HO, 2019).

Нашите данни, показващи повишени плазмени нива на ADMA, MDA, маркери на оксидативен стрес и CIMT при лица с MetS са в съответствие с други изследвания (Scuteri, A et al., 2004; Jung, JM et al., 2014.; Kawada, T et al., 2016; Nair N. Gongora E, 2017). Нашите данни показват, че плазмените HO-1 и CIMT са повишени при хора с MetS, което съответства на констатациите на други автори (Idriss NK et al., 2010). Според Pae et al (2010) активирането на HO-1 може да подобри

ендотелната функция, поне отчасти, чрез компенсиране загубата на NO бионаличност при повишени плазмени нива на ADMA.

Редокс дисбалансът с напредване на възраст вероятно е причина за по-ранното развитие на морфологичните промени в ендотела, регистрирани чрез повишаване на CIMT и риска от късни клинични усложнения и инциденти (*Kishimoto, Y et al., 2019*).

Nrf2 потиска оксидативния стрес чрез регулиране на експресията на HO-1 и други антиоксидантни гени, докато ADMA, MDA и NF-kB увеличават оксидативния стрес и нискостепенно възпаление, като допринасят за ендотелната дисфункция, инхибирайки пътя на eNOS) (*Poredos P et al., 2004*).

Ендотелната дисфункция, причинена от рискови фактори за атеросклероза, възниква рано преди измеримите промени в съдовата стена, като CIMT (*Aydin M et al 2013*). Тъй като зависимите от възрастта CIMT и редокс баланс са взаимосвързани, показателни за различни аспекти на атеросклеротичния процес, тяхното ранно изследване може да бъде важно за сърдечно-съдовата профилактика.

Въз основа на настоящите и предишни открития, ние предлагаме измерването на нивата на ADMA, заедно с маркери за оксидативен стрес (MDA, HO-1 и Nrf2), може да бъде обещаваща стъпка в разработването на ефективен модел за проследяване на тежестта на CIMT и ранното съдово увреждане при лица с MetS. CIMT е важен инструмент за ранен скрининг за оценка на субклиничните прояви на сърдечно-съдови и метаболитни заболявания и силен предиктор за бъдещи церебрални и сърдечно-съдови усложнения (*Aydin M et al, 2013*).

В заключение, нашето проучване изследва връзката между биохимичните маркери на ендотелната дисфункция и маркерите, отразяващи морфологичните промени в съдовете, като се взема предвид ролята на баланса между факторите на ендотелно увреждане и факторите на ендотелната защита. Индивиди с небалансирано производство на ROS и/или увредена антиоксидантна защитна система и с зависимия от възрастта редокс дисбаланс са изложени на висок риск от повишаване на CIMT и сърдечно-съдов риск.

V. ИЗВОДИ

1. При лица с метаболитен синдром стойностите на ADMA, ключов фактор на ендотелна дисфункция и MDA, маркер за оксидативния стрес са достоверно повишени в плазмата и между тях е налице позитивна корелация .
2. Сравнени с здравите контроли при лицата с MetS стойностите на плазмените липиди и атерогенните индекси , глюкозата в плазмата, BMI и WC са достоверно повишени.
3. ADMA и MDA могат да бъдат полезни диагностични маркери за откриване на ранни промени при сърдечно-съдови увреждания, когато традиционните скринингови тестове са все още нормални.
4. Установена е повишена експресия на транскрипционните фактори в мононуклеарни кленки от периферна кръв (PBMC): Nrf2, играещ важна роля в ендотелната защита срещу оксидативен стрес и NF-kB регулиращ възпалителния отговор в при лица с MetS.
5. Nrf2, редокс-чувствителен транскрипционен фактор, повишава експресията на HO-1, регулира клетъчния редокс баланс и играе важна роля в ендотелната защита срещу оксидативен стрес.
6. Сравнени със здрави контроли, лицата с метаболитен синдром, демонстрират достоверно по-високи стойности на CIMT с напредване на възрастта.
7. Анализирана е връзката между повишените стойности на CIMT и възрастовите промени в антиоксидантната защита Nrf2 и HO-1 и редокс -дисбаланса (ADMA и MDA) при лица с метаболитен синдром.
8. Индивиди с намалена антиоксидантна защита при оксидативен стрес и/или с зависимия от възрастта редокс дисбаланс са изложени на висок риск от повишаване CIMT и сърдечно-съдов риск.

VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален характер

1. За пръв път в България се изследва връзката между ADMA и HO-1, антиоксидант и маркер на оксидативния при лица с MetS. Изследването на HO-1 дава възможност за оценка на адаптационните механизми на организма в условията на оксидативен стрес и възможностите за терапевтично въздействие.
2. За пръв път в България се изследва връзката между ADMA, HO-1 и транскрипционните фактори Nrf2 и NF-kB, което би допринесло за изясняване на сложните механизми на ендотелно увреждане и това има практическо значение за превенцията, ранната диагностика и стратегията за лечение на лица с MetS.
3. Очертани са връзки между показатели като ADMA с маркери за оксидативен стрес (MDA, HO-1 и Nrf2) и липидния профил, глюкозата, BMI и WC, което има практическо значение за проследяване и превенция на лица с сърдечно съдовите усложнения
4. Подчертано е значението на комплексната оценка, включваща ADMA маркер на ендотелната дисфункция, заедно с маркери за оксидативния стрес (MDA, HO-1 и Nrf2) и на CIMT като маркер на субклиничната атеросклероза и на сърдечно- съдовия риск.
5. Комплексното изследване на ADMA, маркер на ендотелната активация и маркери за оксидативен стрес (MDA, HO-1 и Nrf2), може да бъде обещаваща стъпка в разработването на ефективен модел за проследяване на CIMT и ранно откриване на съдова увреда при лица с MetS
6. За първи път в България се изследва връзката между биохимичните маркери на ендотелната активация и CIMT показател, отразяващи структурните промени в съдовете като се взема предвид ролята на баланса между факторите на ендотелно увреждане и на ендотелната защита.

Приноси с научно-приложен характер

1. Изследването на транскрипционните фактори Nrf2 и NF-kB дава достоверна и глобална представа за механизмите на увреждане на ендотела, в сравнение с изследване само на отделни маркери на оксидативния стрес и възпалението
2. Настоящото проучване посочва пътя на бъдещите терапевтични подходи, насочени към въздействие, основно върху транскрипционните фактори Nrf2 и NF-kB, които регулират експресията на гените на увреждащи и защитни фактори на съдовете при лица с MetS
3. Комплексът от представените в проучването методи може да бъде ефективно приложен като иновативен в клиничната практика при диагностициране на ендотелното увреждане при лица с MetS.

VII. ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Bekyarova GY, **Bekyarov NA**, Madjova VH, Madjova CR, Kalevska ED. Age-Associated Changes in Carotid Intima–Media Thickness in Relation to Redox Balance Indices in Metabolic Syndrome *Appl.Sci* 2024 14 (16), 7218 doi.org/10.3390/app14167218, IF= 2.5
2. Bekyarova GY, Vankova DG, Madjova VH, **Bekyarov NA**, Salim AS, Ivanova DG, Stoeva SM, Gerova DI, Kiselova-Kaneva YD. Association between Nrf2, HO-1, NF-kB Expression, Plasma ADMA, and Oxidative Stress in Metabolic Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2023 Dec 2;24(23):17067. [doi: 10.3390/ijms242317067](https://doi.org/10.3390/ijms242317067), IF= 4.9
3. Bekyarova G, Kiselova-Kaneva Y, Madjova V, Gerova D, **Bekyarov N**, Todorova M, Stoeva S. The predictable role of ADMA and oxidative stress in endothelial dysfunction - a pilot study. *Journal of IMAB, Annual Proceeding (Scientific Papers) Suppl* 12; 2022; vol. 28, 37-40.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам сърдечни благодарности на:

Научния си ръководител проф. д-р Валентина Маджова, д.м., за ценните професионални напътствия, и безрезервната подкрепа по време на разработването на дисертационния труд.

Проф. биол. Йоана Киселова, от катедра „Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика” за оказаната подкрепа и професионалните насоки за извършването на генетичните изследвания.

Искрено благодаря на семейството си за тяхната безусловна подкрепа, търпение, разбиране и морална насърчителна подкрепа по време на следването ми и подготовката на тази дисертация.