

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ ВАРНА
Факултет медицина
Катедра по физиология и патофизиология
УНС по патофизиология

Д-р Камелия Жечкова Братоева

**МЕХАНИЗЪМ НА ХЕПАТОЦИТНО
ОЦЕЛЯВАНЕ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН
МОДЕЛ НА НЕАЛКОХОЛЕН МАСТЕН ЧЕРЕН
ДРОБ И ПРИЕМ НА АНТИОКСИДАНТИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Научни ръководители

Доц. д-р Ганка Бекярова, дмн

Доц. д-р Мария Цанева, дм

Варна, 2015

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ ВАРНА
Факултет медицина
Катедра по физиология и патофизиология
УНС по патофизиология

Д-р Камелия Жечкова Братоева

**МЕХАНИЗЪМ НА ХЕПАТОЦИТНО
ОЦЕЛЯВАНЕ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН
МОДЕЛ НА НЕАЛКОХОЛЕН МАСТЕН ЧЕРЕН
ДРОБ И ПРИЕМ НА АНТИОКСИДАНТИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“

Научна специалност „Патофизиология“

Научни ръководители

Доц. д-р Ганка Бекярова, дмн

Доц. д-р Мария Цанева, дм

Официални рецензенти:

Чл. кор. проф. д-р Стефан Костянев, дмн

Проф. д-р Александър Стойнев, дмн

Варна, 2015

Дисертационният труд съдържа общо 145 страници, онагледен е с 47 фигури и 6 таблици. Книгописът включва 319 заглавия, от които 1 на кирилица и 318 на латиница.

Проучванията са осъществени в УНС-патофизиология към Катедрата по физиология и патофизиология на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна.

Докторантът работи в УНС-патофизиология към Катедрата по физиология и патофизиология на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна.

Дисертационният труд е обсъден, приет и насочен към защита пред научно жури от разширен Катедрен съвет при Катедрата по физиология и патофизиология на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна на 05. 11. 2015 г.

Защитата на дисертационния труд ще се състои нав
.....
от часа на открито заседание на научно жури.

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на Медицинския университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“-Варна на адрес:
www.mu-varna.bg

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ	7
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	10
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	11
1. Основни процедури по експерименталния модел на метаболитен синдром.....	11
1.1. Опитни животни.....	11
1.2. Дизайн на експеримента.....	12
2. Използвани аналитични методи.....	13
2.1. Имунологични методи.....	13
2.2. Имунохистохимични методи.....	13
2.3. Рутинни и хистохимични изследвания.....	14
2.4. Хроматографски методи.....	15
2.5. Биохимични и клинично-лабораторни методи.....	18
3. Статистическа обработка на резултатите в проучването.....	19
3.1. Дескриптивни методи.....	19
3.2. Аналитични методи.....	19
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	21
1. Проучване на метаболитни нарушения при високо- фруктозна диета (ВФД) и прием на S- аденозил-метионин (S-АМе) и Алопуринол.....	21
1.1. Резултати.....	21
1.2. Дискусия.....	31
2. Проучване на ролята на оксидативния стрес за чернодробното увреждане при високо- фруктозна диета и прием на S-АМе и Алопуринол.....	44
2.1. Резултати.....	44
2.2. Дискусия.....	47
3. Проучване на ролята на нискостепенното възпаление за чернодробното увреждане при високо- фруктозна диета и прием на S-АМе и Алопуринол.....	55
3.1. Резултати.....	55
3.2. Дискусия.....	56

4. Проучване на морфологичните промени в черен дроб, апоптозата и някои биохимични показатели на чернодробна дисфункция при високо-фруктозна диета и прием на S-AMe и Алопуринол.....	60
4.1. Резултати	60
4.2. Дискусия.....	74
V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	88
VI. ИЗВОДИ	91
VII. ПРИНОСИ	92
VIII. ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	94

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АТФ	- аденозинтрифосфат
АФК	- активни форми на кислорода
СМК	- свободни (неестерифицирани) мастни киселини
ОС	- оксидативен стрес
IL 1, IL 6, IL 8	- интерлевкини
ТГ	- триглицериди
LDL	- нископлътна фракция на холестерола
VLDL	- много ниско плътна фракция на холестерола
HDL	- високо плътен холестерол
MCP-1	- моноцит- хемотаксисен протеин 1
NADPH	- никотинамиддинуклеотид фосфат
TNF- α	- тумор некротизиращ фактор алфа
НМЧБ	- неалкохолна мастна чернодробна болест
МС	- метаболитен синдром
ЦНС	- централна нервна система
ДНК	- дезоксирибонуклеинова киселина
РНК	- рибонуклеинова киселина
Gpx	- глутатион пероксидаза
GSH	- редуциран глутатион
S-AMe	- S-аденозилметионин

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Неалкохолната мастна чернодробна болест (НМЧБ) е най-разпространената причина за абнормална чернодробна функция, свързвана с нарастващата честота от затлъстяване, неинсулинозависим захарен диабет, кардиометаболитни заболявания и се смята за неразделна част от метаболитния синдром (Akbar et al., 2006; Bellentani et al., 2008). Редица мащабни проучвания доказват, че пациентите с неалкохолна мастна черен дроб отговарят на критериите за метаболитен синдром (затлъстяване, хипергликемия, хиперлипидемия и хипертония) с честота повече от 50%. Важно място в комплекса от рискови фактори допринасящи за затлъстяването и метаболитните усложнения, които увреждат черния дроб, заема консумацията на високоенергийни храни и такива с високо съдържание на фруктоза (подсладител и консерванти за напитки, тестени изделия); ниската двигателна активност; нисък прием на антиоксиданти и витамини.

НМЧБ е клинично-патологичен синдром с широк спектър от увреждания на черния дроб. Уврежданията варират от стеатоза (натрупване на триглицериди) до стеатохепатит, напреднала фиброза и цироза при липса на алкохолна злоупотреба. През последното десетилетие се наблюдава тревожно нарастване на разпространението на НМЧБ в диапазона от 10% до 24% в световен мащаб (Adams et al., 2007). Особено са застрашени тази част от пациентите, при които прогресирането на чернодробната стеатоза в неалкохолна стеатохепатит е с необратими последици за здравето. Установено е, че около 20% от пациентите със стеатохепатит развиват цироза до края на живота си (Edmison, McCullough., 2007). Според СЗО през следващите десетилетия най-малко 2 млн. души ще развият цироза поради неалкохолна чернодробна стеатоза и това ще стане водещ показател за трансплантация на черен дроб. Конкретните причини и точните

механизми за тази прогресия не са достатъчно изяснени. Предполага се, че инсулиновата резистентност, повишената продукция на провъзпалителни цитокини, свободни мастни киселини и активни форми на кислорода от мастната тъкан, намалението на чернодробната антиоксидантна защита (изчерпване на глутатион) стимулира апоптозата на хепатоцитите и последващи възпаление и фиброза в стеатозния черен дроб.

Въпреки това остават много нерешени въпроси за молекулярните и клетъчни механизми, причиняващи чернодробни увреждания и тяхната прогресия при метаболитен синдром. Липсва установена корелация между степента на стеатоза и/или стеатохепатит доказани със средствата за образна диагностика (включително магнитен резонанс) и морфологичните промени от чернодробните биопсии на пациенти с неалкохолен стеатохепатит. Това прави диагностичните и съответно терапевтичните възможности ограничени. Липсата на подобна зависимост налага търсене и разработване на биомаркери, които да регистрират най-ранните алтеративни промени на хепатоцитите при липсващи макроскопски промени за чернодробни увреждания. Това би довело до ранното диагностициране на неалкохолната мастна чернодробна болест, преди да придобие необратим характер и следователно, по-ефективно терапевтично повлияване.

На базата на тези данни ние създадохме хипотезата, че чернодробната апоптоза е ключов фактор в развитието и прогресирането на неалкохолния стеатохепатит, а оксидативния стрес и възпалението в стеатозният черен дроб се очертават като основни звена в патофизиологичните механизми на клетъчните увреждания и смърт. Нашата цел бе, да изследваме експресията на про-апоптотични и анти-апоптотични фактори и данните да съпоставим с хистологичните изследвания на черния дроб, маркери на оксидативен стрес, възпаление и чернодробна дисфункция при експериментален модел на метаболитен синдром с високо фруктозно хранене и

антиоксиданти. Освен това в прегледа на литературата липсва достатъчна яснота по отношение на патогенетичните механизми за задълбочаването на стеатозния процес в черния дроб и прехода му към стеатохепатит и цироза при хронично фруктозно натоварване. Ние смятаме, че този модел съчетава по подходящ начин епигенетичните тенденции за проявата на синдрома (с хранителната намеса), а именно затлъстяване, нарушен глюкозен метаболизъм, дислипидемия, стеатоза и т.н., които са тясно свързани с приложимостта им в клинични условия. Считаме, че изследванията за проучване на връзката между стеатозата и апоптозата в черният дроб са необходими, за да се изясни значението на апоптозата като ранен маркер за диагностиката на неалкохолният стеатохепатит. А прилагането на антиоксиданти, би могло да разкрие вероятни механизми за оцеляването на хепатоцитите в условията на хронично фруктозно хранене при модел на метаболитен синдром и да улесни развитието на нови възможности за терапевтично повлияване.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Цел:

Да се проучат някои възможни механизми на оцеляване на хепатоцитите при експериментален модел на метаболитен синдром и ефекта от прилагането на антиоксиданти.

Задачи:

1. Да се изследват метаболитните промени при високо-фруктозна диета.
2. Да се изследват морфологичните (стеатоза) промени и някои биохимични показатели на чернодробна дисфункция.
3. Да се проучи ролята на оксидативния стрес и нискостепенното възпаление за чернодробното увреждане.
4. Да се изследват апоптотични (серумни и тъканни) маркери при увреждане на черния дроб.
5. Да се проучат корелационни зависимости между някои показатели на метаболитни нарушения, оксидативен стрес, възпаление и чернодробни увреждания.
6. Да се проучи хепатопротективния ефект на S-АМе и Алопуринол.

III . МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. ОСНОВНИ ПРОЦЕДУРИ ПО ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИЯ МОДЕЛ НА МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ.

1.1. ОПИТНИ ЖИВОТНИ.

Използвани са лабораторни бели плъхове линия Wistar от мъжки пол на възраст средно 50 дена и тегло 130-150 g. Животните са отглеждани в отделни клетки по групи като им се провежда предварително аклиматизация за период от две седмици, през които приемат храна и вода на воля. Храната, която приемат през целия период на изследването е стандартна, приготвена по рецепта на производителя със следното съдържание: нишесте- 50%, суров протеини- 20%, мазнини- 4,5%, целулоза- 5%, стандартни витамини, минерален микс- калций (6,71%) и фосфор(0,66%); хлориди (0,35%); лизин (0,95%); метионин и цистеин(0,74%); кръвни единици- 1,08%. (табл.1). В опита бяха използвани общо 64 животни. В продължение на 16 седмици в определените за третиране групи се дава 35% разтвор на глюкозо-фруктозен сироп, който се предлага за пиене. Използваме разтвор получен от 52 % -на фруктоза произведена от царевичен сироп. Високо- фруктозния цревичен сироп е сертифициран за използване като подсладител и консервант в хранително- вкусовата промишленост, производство на завод „АМИЛЮМ „- гр. Разград(ISOSUGAR 031, партида 2819324071).

Животните от всички изследвани групи се оставят да приемат стандартна храна и вода на воля през цялото денонощие. Ежедневно се контролира приема на храна и суплементи, общо наблюдение за появата и развитие на усложнения, а ежеседмично се отчита телесното тегло. Експериментът се провежда при спазване на изискванията на националните

нормативни документи и европейската директива за защита на животните, използвани за научни и експериментални цели. Разрешителното за използване на животни в опити е вписано в регистъра на БАБХ (към Министерство на земеделието и храните) с регистрационен №82 от 06.02.2013 г.

1.2. ДИЗАЙН НА ЕКСПЕРИМЕНТА.

Плъхове са разделени в четири групи в зависимост от използваните медикаменти за третиране и вида на проследяваните параметри.

1. Група 1- плъхове подложени на стандартна диета.
2. Група 2- плъхове подложени на високо-фруктозна диета.
3. Група 3- плъхове подложени на високо-фруктозна диета и третирани с Alloruginol разтворен във водата за пиене в доза 150 мг/L (Uday M. et al.,2005)
4. Група 4- плъхове подложени на високо-фруктозна диета и третирани с S-Adenosylmethionin приеман с водата 1g/kg телесно тегло (Bardag-Gorce et al.,2010)

След 16 седмично хранене с високо-фруктозна диета и прилагане на медикаменти, кръв за изследване се взима от югуларната вена на плъховете след предварителна наркоза с Thiopental в доза 15 mg/kg i.p. Под обща анестезия с Thiopental 30mg/kg (бързо венозно) се прави лапаротомия, след което се отделят органи (черен дроб, висцерална мастна тъкан, сърце, бъбреци) за измерване на тегло, хистологично изследване и изготвяне на тъканни хомогенати.

2. ИЗПОЛЗВАНИ АНАЛИТИЧНИ МЕТОДИ.

2.1. ИМУНОЛОГИЧНИ МЕТОДИ.

2.1.1. Определяне нивата на TNF-а в серуми.

Нивата на TNF α в серуми е определена чрез метода на Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), използвайки готов кит: Rat TNF- α ELISA Kit; Diaclone, Gen-Probe, 96 ямкова плака. Количественото определяне на TNF α беше извършено, спазвайки протокола на фирмата производител.

2.1.2. Определяне нивата на СК 18 в серуми и чернодробен хомогенат.

Нивата на СК 18 са определени с имуноблот (Western blot). Електрофоретично разделените белтъци бяха пренесени чрез електропренос върху нитроцелуозна мембрана. След блокиране с 1% BSA в TBS, мембраната беше инкубирана с птичи анти-цитокератин 18 антители, разредени 1:500 в TPBS. След това последва инкубация с кози анти-IgG-AP в TPBS. Получените комплекси бяха проявени чрез инкубация в субстратен разтвор от BCIP/NBT в AP буфер. Инкубациите бяха провеждани за един час при стайна температура с разклащане или за една нощ при 4°C. След всяка инкубация мембраната беше промивана трикратно в TPBS, като непосредствено преди инкубирането със субстратния разтвор беше проведено още едно допълнително промиване в PBS.

2.2. ИМУНОХИСТОХИМИЧНИ МЕТОДИ.

2.2.1. Определяне експресията на Вах и Vcl2 протеини в черен дроб.

Определянето на експресията на Вах и Vcl2 се извърши с поликлонални или моноклонални антители върху парафинови срези с FLEX mini KIT

high ph DAKO K8024. Срези с дебелина 4 μm бяха поставени върху силанизирано стъкло (Thermo Polysine). Използвани са следните антители:

- BCL-2 (N-19) Antibody; Santa Cruz, USA; sc-492, разреждане 1:50.
- Bax (P-19) Antibody; Santa Cruz, USA; sc-526, разреждане 1:50.

Негативни контроли: При негативните контроли вместо първичното анти тяло, срези от използваните парафинови блокчета се инкубират с нормален неимуен серум за 20 мин. на стайна температура.

Оценка на интензивността на имунната реакция в хепатоцитите.

Интензивността на имунната реакция в отделните хепатоцити се определя чрез индекс на наситеност. В зависимост от количеството на отложения имуен преципитат в отделните клетки, те са разпределят в четири категории (Цанева, 1999):

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

Морфометричното изследване е извършено върху 50 клетки от всеки материал. 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 раздели на общия брой клетки.

2.3. РУТИННИ И ХИСТОХИМИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ.

За хистологично изследване са използвани тъканни късчета с размери 2/2/05 см., които са фиксирани в 10% неутрален формалин. Обработването на материала включва рутинна обработка, включваща дехидратация с възходяща сероя от алкохоли и включване в парафин.

- Срези с дебелина 5 μm са оцветени хемалаун и еозин за оценка на хистологичните промени в черния дроб.

- Оцветяване по Судан за отчитане вида и степента на мастната дегенерация. Морфологични критерии за оценка на хистологичните промени:
- Стеатозата е градирана както следва: лека (<10% от хепатоцитите са с мастна дегенерация); умерена (от 10 до 35% от хепатоцитите са с мастна дегенерация) и тежка (> 30% от хепатоцитите са с дегенеративни промени) (Hübscher, 2006).
- Мастната дегенерация е определена като дребнокапчеста: множество малки оптически празни окръглени вакуоли и едрокапчеста: голяма оптически празна вакуола с периферно разположено притиснато ядро и размер на хепатоцита по-голям от нормалната чернодробна клетка.
- Паренхимните лезии в неалкохолното чернодробно заболяване са разделени в три категории (Hübscher, 2006): неалкохолен стеатозен черен дроб, стеатохепатит и цироза.

Морфологичните промени са оценени съгласно критериите на Ishak (Ishak et al. 1995) и Metavir (Metavir and Poynard, 1996).

2.4. ХРОМАТОГРАФСКИ МЕТОДИ.

2.4.1. Определяне нивата на МК в чернодробни хомогенати. Качествен и количествен анализ на съдържание на естерифицирани и нестерифицирани (свободни) мастни киселини в биологични проби.

Анализът на свободните и свързани мастни киселини съдържащи се в биологична проба (чернодробен хомогенат) е извършен в научната лаборатория на катедрата по химия към Медицински университет Варна.

Етапи на аналитичната процедура:

- Изготвяне на средна лабораторна проба за анализ.
- Екстракция на липидите от тъканни проби (чернодробен хомогенат).
- Хидролиза на липиди.
- Дериватизиране (метиране) на естерифицираните и неестерифици-

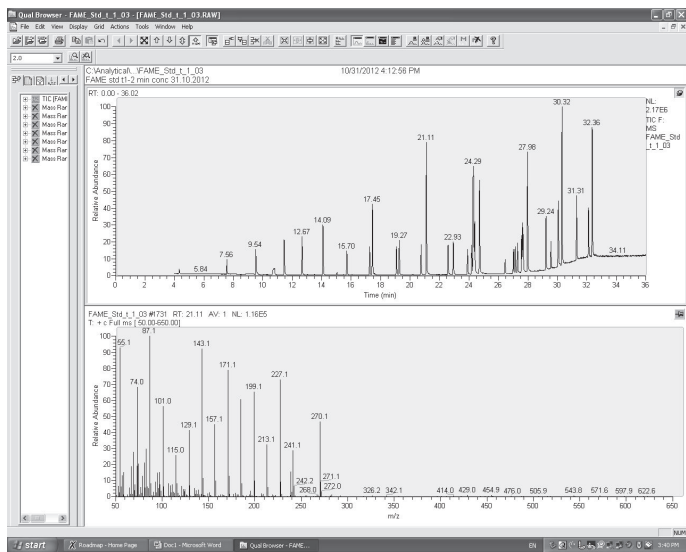
рани мастни киселини.

- Качествено и количествено определяне на мастните киселини чрез газов хроматограф с масдетектор.
- Статистическа обработка и анализ на резултатите.

За екстрахиране на липидите от биологичната проба са използвани модифицирани метод на Bligh & Dyer (1959) и Sanches-Avila et al., (2009). Последващо дериватизиране на освободените мастни киселини до метилови естери, с цел повишаване на тяхната летливост са използвани преестерификационни методи представени в БДС EN ISO 5509:2000“ Подготовка на метилови естери на мастни киселини”.

Газ- хроматографски анализ на метилови естери.

Качественото и количественото определяне на метиловите естери на МК (свободни и свързани мастни киселини) е извършено с хроматографска система на Termo Scientific, газов хроматографмодел FOCUS GC с мас детектор IonTrap Polaris Q. Хроматографското разделяне се осъществява чрез капилярна колона Termo TR-5 MS с дължина - 30 m, с вътрешен диаметър 0.25 mm и дебелина на слоя от 0.25 μ m. Като газ носител е използван хелий (чистота 99.999%) при постоянен поток от 1ml/min. Използваният инжектор AI 3000 е с автоматичен пробовземач и работи в режим split (1:10) с разделяне на потока. Хексановата фракция, съдържаща МЕМК се инжектира директно в газовия хроматограф за разделяне, идентифициране и количествено определяне на анализирани компоненти. Детекцията на пробите е извършена в режим на мас детектора Full Scan: 50 - 650. Чрез мас детектора с помощта на характеристични йони определени чрез стандарта и библиотеката на газовия хроматограф съдържаща база данни с маспектри, е потвърдена структурата и вида на интересуващите ни МК. На фиг. 1 е показана хроматограма на 37 компонентна стандартна смес от метилови естери (37 FAME Mix C4-C24) .



Фиг. 1. Хроматограма на стандартната смес от метилови естери.

Получените резултати за определяне на МК профил са изчислени чрез използване на метода на вътрешната нормализация по БДС EN ISO 5508:2004 “Анализ на метилови естери на мастните киселини чрез газова хроматография“ и софтуер Finnigan Xcalibur на апарата.

Вариационната и графична обработка на данните е направена чрез статистическа програма Graph Pad Prism 5.0. Резултатите за всички анализирани мастни киселини са получени от количествения хроматографски анализ и представляват наличните количества на анализа в 1 g анализирана тъкан, като процент от общите мастни киселини в липидната фракция (приети за 100%). Чрез статистическата програма са изчислени съответните средни стойности за количествата на индивидуалните мастните киселини, стандартните отклонения, коефициентите на вариации за всяка анализирана проба. Тези резултати са преизчислени и представени като средна стойност \pm стандартно отклонение като процент (%) от общите

мастни киселини.

2.5. БИОХИМИЧНИ И КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНИ МЕТОДИ.

2.5.1. Определяне на Глутатион-пероксидазна активност.

Глутатион-пероксидазната активност беше определяна чрез проследяване на окислението на НАДФН при 340 nm за 5 мин (25°C) в присъствие на глутатион редуктаза и редуциран глутатион (GSH). Серумите и хомогенатите от черен дроб и мастна тъкан на изследваните плъхове бяха инкубирани с 25 mM PBS; 0,5 mM EDTA, pH 7,4; 0,5 mM NaN₃; 0,3 mM НАДФН; 0,64 U глутатион редуктаза и 1mM GHS. Реакцията беше стартирана с 0,1 mM H₂O₂. Получените стойности бяха коригирани с данните за неензимно окисление на GSH и НАДФН от H₂O₂. Глутатион пероксидазната активност беше представена като окислението на 1μmol НАДФН за 1 мин.

2.5.3. Определяне на тотални тиоли.

Използван беше спектрофотометричен метод, основан на способността на реактива на Ellman (5,5 дитио-бис/2-нитробензоена киселина, DTNB) да взаимодейства с тиолатния анион. Като стандарт беше използван разтвор на редуциран глутатион (GSH).

2.5.4. Определяне нивата на малонов диалдехид.

Малоновият диалдехид (в серуми и чернодробен хомогенат) е определен спектрофотометрично по метода на Porter et al.,(1976), основаващ се на способността му да реагира с тиобарбитуровата киселина и образуване на цветно съединение (регистрирано при дължина на вълната- 532 nm). Резултатите са представени като nmol/mg протеин.

2.5.5. Определяне нивата на пикочна киселина, глюкоза, общ холестерол, ТГ, VLDL и HDL.

Нивата на пикочна киселина, глюкоза и липиди- ТГ, общ холестерол, VLDL и HDL са определени в серум при спазване на стандартна процедура с автоматичен анализатор OLIMPUS; AU 640.

3. СТАТИСТИЧЕСКА ОБРАБОТКА НА РЕЗУЛТАТИТЕ В ПРОУЧВАНЕТО.

За реализиране на целта и стоящите през изследването задачи са използвани следните методи:

3.1. ДЕСКРИПТИВНИ МЕТОДИ

Дескриптивен анализ бе използван за описание на основните характеристики на извадката и на показателите 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 $p \leq 0.05$.

3.2. 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 $p \leq 0.05$.
4. Регресионен анализ (R) бе използван за изследване на функционални зависимости между количествено определени признаци. Регресионния анализ бе тестван за установяване магнитута и тежестта на всеки един от променливите в избрания модел.

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

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. ПРОУЧВАНЕ НА МЕТАБОЛИТНИ НАРУШЕНИЯ ПРИ ВИСОКО- ФРУКТОЗНА ДИЕТА (ВФД) И ПРИЕМ НА S-АДЕНОЗИЛ-МЕТИОНИН (S-АМЕ) И АЛОПУРИНОЛ.

1.1. РЕЗУЛТАТИ

1.1.1. Измерване на телесното тегло.

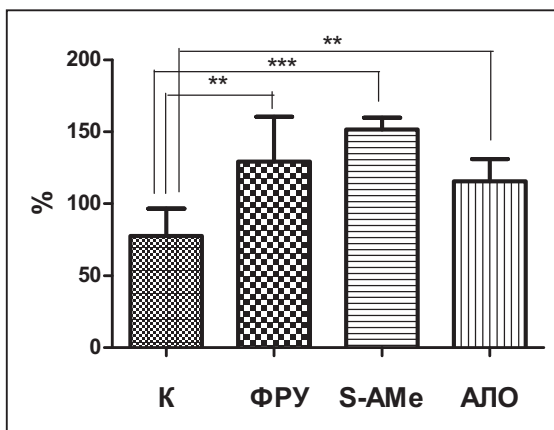
Таблица. 1. Промени в телесното тегло по периоди.

Период на измерване на телесно тегло (g)	С	ФРУ	S-Аме	АЛО
Начално тегло	143.9 ± 10.6	162.0 ± 7.1	144.1 ± 5.4	163.9 ± 4.4
6 седмица	214.0 ± 11.7	291.1 ± 13.3	295.6 ± 10.1	305.1 ± 14.1
10 седмица	244.6 ± 11.6	312.9 ± 16.2	315.7 ± 11.4	325.3 ± 15.5
Крайно тегло/ 16 седм.	250.0 ± 8.1*	366.0 ± 21.5*#	363.1 ± 15.4*#	327.8 ± 7.6*#

Легенда: Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), (N=7). К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-Аме- група на ВФД и прием на S-Аме; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. * $p < 0,0001$ – статистическа значимост на резултата между крайното и начално тегло на животните в групата; # $p < 0,01$ – статистическа значимост между третираните групи и контролата, *t*-test.

Телесното тегло на експерименталните животни бе измервано ежеседмично в продължение на 16 седмици. Беше установено равномерно нарастване на теглото и в четирите групи до края на експеримента. На табл. 1 сме представили промените в телесното тегло в началото, на 6- та седмица, на 10- та седмица и в края на експеримента. След 16 седмици и трите третиранни групи (ФРУ, S-Аме, АЛО) показаха статистически значимо по-високи стойности на телесното тегло в сравнение с контролната

група. При сравняване на телесното тегло между изследваните групи като % от началното и крайно тегло, беше установено статистически значимо увеличение на телесното тегло (с над 50%) в групата на ВФД ($p < 0,01$) спрямо контролата. В групата с прием на Алопуринол (без статистическа достоверност) се наблюдава тенденция към намаляване на телесното тегло, а приемът на S-АМе до увеличаването му спрямо ФРУ и контролата ($p < 0,001$), фиг. 2



Фиг. 2. Промени в наддаване на телесното тегло между изследваните групи, измерено като процент от началното и крайното телесно тегло на животните в групата. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($n=7$). Легенда: К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-АМе- група на ВФД и прием на S-АМе; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$, t-test.

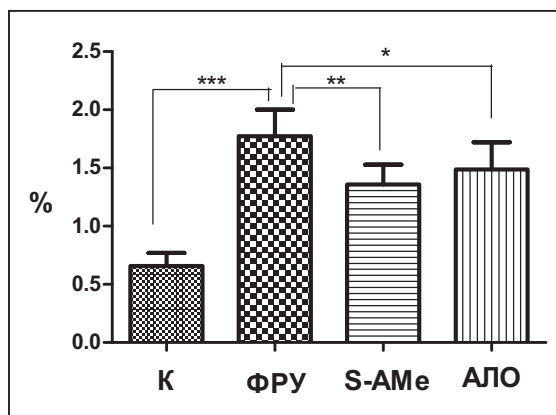
1.1.2. Измерване на теглото на висцералната мастна тъкан.

Теглото на висцералната мастна тъкан беше определено, след отпрепариране и претегляне на ретроперитонеалната мастна тъкан на експерименталните животни. Промените в теглото са представени като % от общото телесно тегло. Резултатите показват значително увеличено тегло (над 200%) на ретроперитонеалната мастна тъкан във ФРУ групата

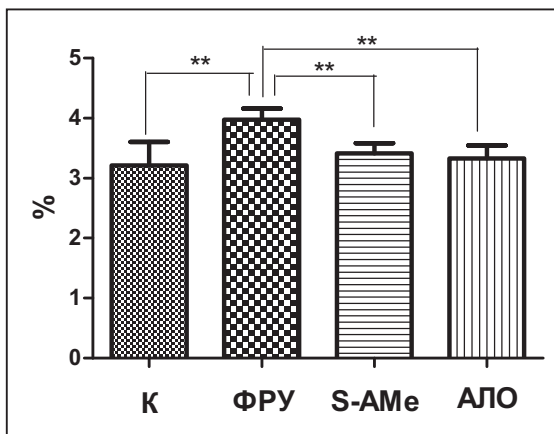
($p < 0,001$) спрямо контролата. Групата на S-АМе ($p < 0,01$) и Алопуринол ($p < 0,05$) показва значително намаление на теглото спрямо групата на ВФД без да е достигнало това на контролата (фиг.3).

1.1.3. Измерване на теглото на черния дроб.

Теглото на черния дроб е изразено като % от общото телесно тегло. Резултатите показват значително увеличено тегло на черния дроб във ФРУ групата ($p < 0,01$) спрямо контролата. Групата на S-АМе ($p < 0,01$) и Алопуринол ($p < 0,01$) показва значително намаление на чернодробното тегло спрямо групата на ВФД, което е достигнало това в контролната група (фиг.4).

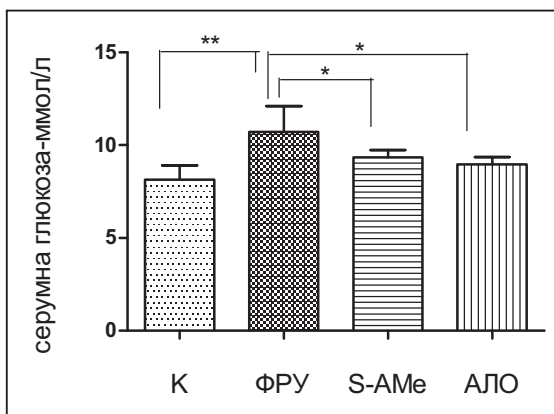


Фиг. 3. Тегло на ретроперитонеална мастна тъкан изразено като % от общото телесно тегло на плъховете. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($N=7$). Легенда: К-контролна група; ФРУ-група на ВФД; S-АМе- група на ВФД и прием на S-аденозилметионин; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. *- $p < 0,05$; **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$, t-test.



Фиг. 4. Тегло на черен дроб изразено като % от общото телесно тегло на плъховете. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (N=7). Легенда: К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-АМе- група на ВФД и прием на S-аденозилметионин; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. **- $p < 0,01$, t-test.

1.1.4. Определяне на серумните нивата на глюкоза.

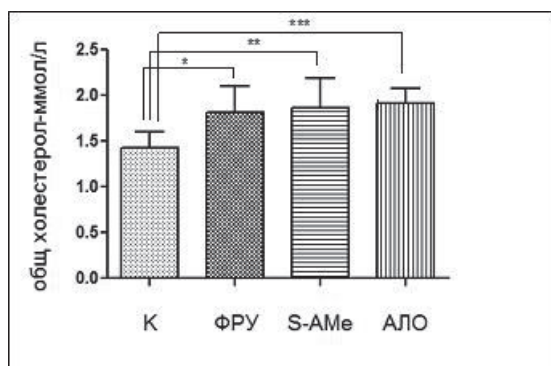


Фиг. 5. Нива на серумната глюкоза в експерименталните групи. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната(SEM), (N=7). Легенда: К- контролна; ФРУ- на ВФД; S- АМе- на ВФД и прием на S-АМе; АЛО- на ВФД и прием на Алопуринол. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, t-test.

Резултатите показват повишени нива на серумната глюкоза във ФРУ ($p < 0.005$) група спрямо контролата. В групата с прием на Алопуринол и S-АМе ($p < 0.05$) се установяват значително намалени нивата на глюкозата спрямо ФРУ групата (фиг.5).

1.1.5. Определяне на серумни липиди.

Изследвани са общ холестерол, високоплътен холестерол (HDL), много-нископлътен холестерол (VLDL) и TG. Резултатите показват повишение на общия холестерол във ФРУ ($p < 0.05$), S-АМе ($p < 0.005$) и АЛО ($p < 0,001$) спрямо контролната група (фиг.6). В групите на S-АМе и АЛО промените в нивата на общия холестерол са за сметка на по-високите нива на HDL, фиг. 7.

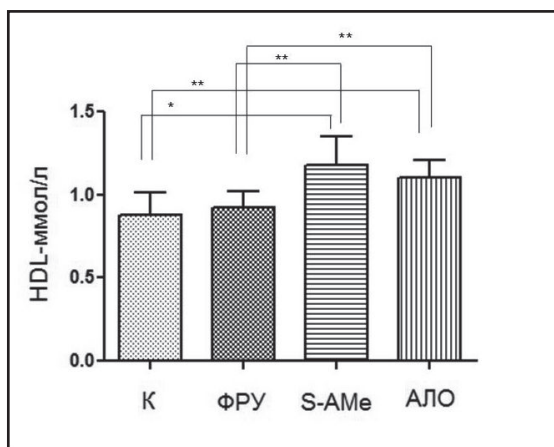


Фиг. 6. Нива на серумния общ холестерол в експерименталните групи. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($N=7$). Легенда: К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-АМе- група на ВФД и прием на S-аденозилметионин; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$, *t*-test.

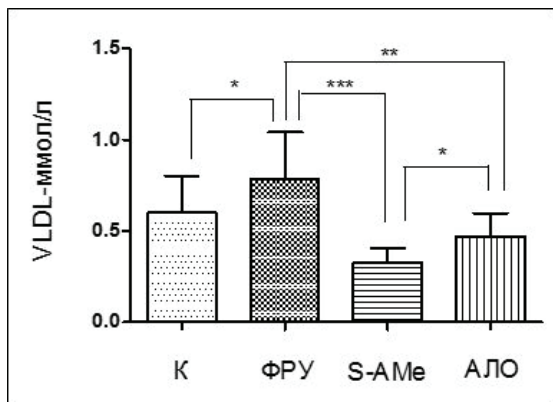
Нивата на HDL бяха значително повишени в S-АМе ($p < 0.005$) и в АЛО ($p < 0.05$) спрямо контролата и повишени в S-АМе ($p < 0.005$) и в АЛО ($p < 0.005$) спрямо групата на ВФД. Статистически незначими различия бяха установени между нивата на HDL в ФРУ и контролата (фиг.14).

Нивата на VLDL бяха значимо повишени в ФРУ ($p < 0.05$) спрямо контролата. Нивата на VLDL в S-АМе ($p < 0.001$) и АЛО (< 0.005) бяха намалени спрямо групата на ВФД и достигат нива по-ниски от тези в контролната група (фиг.8).

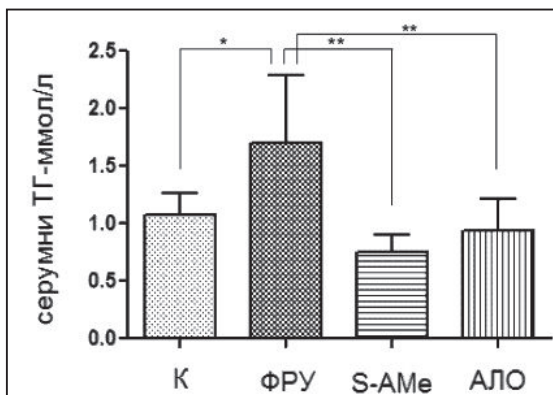
Резултатите показват, че нивата на серумните ТГ са значително повишени във ФРУ група (над 50%) спрямо контролата ($p < 0.05$), докато нивата в S-АМе ($p < 0.005$) и АЛО ($p < 0.005$) са значително понижени спрямо групата на ВФД и по-ниски от тези на контролата (фиг.9).



Фиг. 7. Нива на серумния HDL в експерименталните групи. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($N=7$): Легенда: К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-АМе- група на ВФД и прием на S-аденозилметионин; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$, t-test.



Фиг. 8. Нива на много-ниско пълтен холестерол (VLDL) в експерименталните групи. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (N=7). Легенда: К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-AMe- група на ВФД и прием на S-аденозилметионин; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$, t-test.



Фиг. 9. Нива на серумните триглицериди (ТГ) в експерименталните групи. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (N=7): Легенда: К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-AMe- група на ВФД и прием на S-аденозилметионин; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$, t-test

1.1.6. Определяне на свободни мастни киселини (СМК) в хомогенати от черен дроб.

Резултатите на всички анализирани СМК са получени от количествения хроматографски анализ и представляват наличните количества на анализа в 1 g анализирана тъкан, като процент от общите мастни киселини в липидната фракция (приети за 100%).

Таблица 2. Съдържание на свободните мастни киселини в черен дроб.

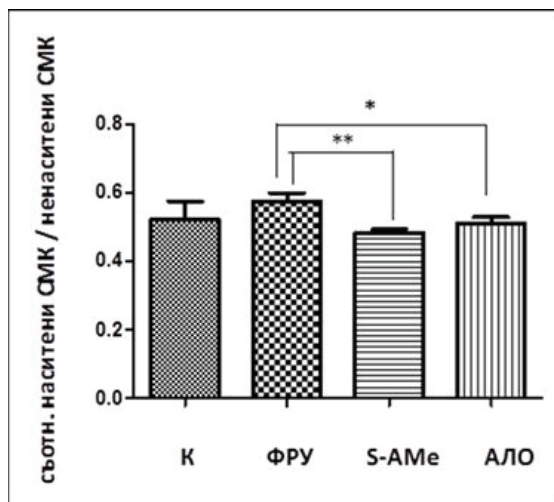
СМК	Групи	К	ФРУ	S- АМе	АЛО
Общи СМК		97,98 (5,29)	107,85(7,25)*	109,05(7,01)*	105,2 (2,87)*
Наситени СМК		32.96 (5,6)	39.45 (3,44)*	35.72# (1,56)	35.52 (1,95)§
Ненаситени СМК		65.02 (8,86)	68.40 (3,78)	73.33(2,44)* #	69.68 (4,23)

Легенда: Резултатите са преизчислени и представени като средна стойност \pm стандартно отклонение като процент (%) от общите СМК в групи (N=7). К- контролна; ФРУ- на ВФД; S- АМе- на ВФД и прием на S- аденозилметионин; АЛО- на ВФД и прием на Алопуринол. * $p < 0,05$ – статистическа значимост спрямо К; # $p < 0,05$ - статистическа значимост между ФРУ и S- АМе; § $p < 0,05$ - статистическа значимост между ФРУ и АЛО, t-test.

Резултатите от табл. 2 показват повишени нива на общи СМК в трите групи с третирания- ФРУ ($p < 0,05$), S- АМе ($p < 0,05$) и АЛО ($p < 0,05$) спрямо контролната група. По отношение на наситените СМК, се наблюдава значимо повишение в групата на ВФД (0,05), и незначимо (без статистическа достоверност) повишаване при S- АМе и АЛО спрямо контролата. Спрямо групата на ВФД се наблюдават понижени нива на наситените СМК при S- АМе ($p < 0,05$) и АЛО ($p < 0,05$) и повишени нива на ненаситените СМК при S- АМе ($p < 0,05$).

1.1.7. Определяне на съотношението на наситените спрямо ненаситени СМК в чернодробни хомогенати.

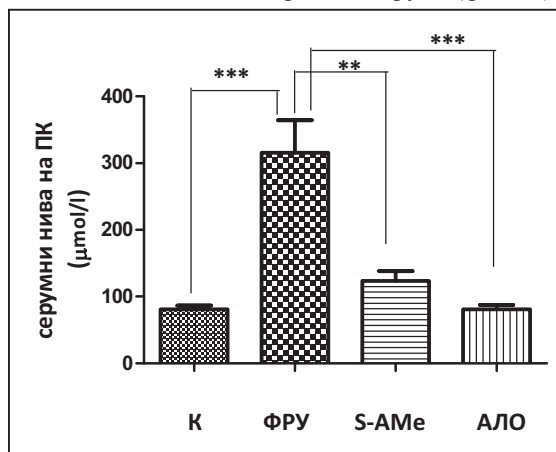
Резултатите показват, че съотношението наситени/ненаситени СМК е значимо понижено при S- АМе (0,005) и при АЛО ($p < 0,05$) спрямо ФРУ групата. Наблюдава се незначимо (без статистическа достоверност) повишение на съотношението във ФРУ спрямо контролата. Това показва, че при третираните животни със S- АМе и АЛО, съдържанието на ненаситените СМК е по- високо спрямо ФРУ групата и контролата, докато съдържанието на наситените СМК е най- високо при плъховете на ВФД. (Фиг. 10.)



Фиг. 10. Съотношение на наситените към ненаситени СМК. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($N=7$). Легенда: К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-АМе- група на ВФД и прием на S-АМе; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *t*-test.

1.1.8. Определяне на нивата на пикочна киселина (ПК) в серуми.

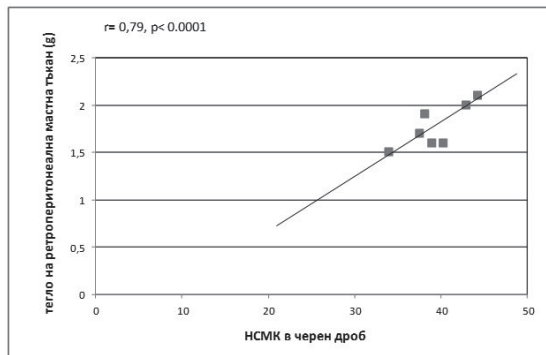
Резултатите показват значими повишени нива (над 200%) на ПК във ФРУ група спрямо контролата ($p < 0,0002$). В групата на S-АМе ($p < 0,001$) и АЛО ($p < 0,0002$) се наблюдава значително понижение на ПК спрямо групата на ВФД близки до нивата в контролната група (фиг. 11).



Фиг. 11. Промени в серумните нива на ПК. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($N=7$). Легенда: К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-АМе- група на ВФД и прием на S-АМе; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0002$, t -test.

1.1.9. Статистически значими резултати от корелационния анализ на някои показатели на метаболитни нарушения във групата на ВФД.

Резултатите показват много висока положителна корелационна зависимост ($r = 0,79$, $p < 0,0001$) между степента на увеличение на ретроперитонеалната мастна тъкан и повишеното чернодробното съдържание на наситени СМК в групата на ВФД (фиг.12).



Фиг. 12. Корелационна зависимост между наситените СМК и теглото на ретроперитонеалната тъкан при животните на ВФД.

1.2. ДИСКУСИЯ

1.2.1. Промени в телесното тегло и теглото на ретроперитонеалната мастна тъкан и черен дроб.

Получените от нас резултати показват, че прилагането на ВФД в продължение на 16 седмици води до развитие на метаболитен синдром, проявен с увеличено телесно тегло, тегло на ретроперитонеалната мастна тъкан и хепатомегалия. В края на експеримента, телесното тегло на всички животни на ВФД беше увеличено спрямо контролите с около 80%. Предполага се, че един от патогенетичните механизми на затлъстяване при консумиране на фруктоза е липсата за усещане на ситост, за разлика от глюкозата (Melanson et al., 2008). Това води до хиперфагия, увеличен прием на храна, положителен енергиен баланс и увеличено телесно тегло (Bray et al., 2004). Вероятно затова при плъховете на ВФД и прием на S-АМе и Алопуринол беше отчетено повишено телесно тегло спрямо контролите.

В нашето проучване за първи път беше изследвано влиянието на S-АМе

върху телесното тегло при ВФД. В групата на S-АМе, то беше увеличено с близо 100% спрямо контролите и с около 25% спрямо групата на ВФД. По отношение на групата на Алопуринол беше установено с около 50 % повишено телесно тегло спрямо контролите и статистически незначимо намаление спрямо групата на ВФД.

Резултатите показват, че ВФД води и до значително увеличение на теглата на ретроперитонеалната мастна тъкан и черния дроб спрямо контролната група. Повишеното тегло на висцералната мастна тъкан от ВФД, беше значително редуцирано в групите на S-АМе и Алопуринол, но не достигнаха тези на контролите. Ние установихме, че S-АМе и Алопуринол редуцират повишеното тегло на черния дроб, индуцирано от ВФД, тъй като беше значително по-ниско в тези групи и близко до това на контролите. Нашите резултати показват селективен ефект на S-АМе и Алопуринол върху различните елементи на метаболитния синдром. Лечението с S-АМе и Алопуринол не повлияват увеличеното телесно тегло индуцирано от ВФД. Вероятно терапевтичните им ефекти нямат влияние върху факторите регулиращи приема на храна и енергиен разход и затова телесното тегло на животните в тези групи не беше повлияно.

От друга страна нашите резултати потвърждават изследванията при хора и експериментални животни, че ВФД предизвиква затлъстяване (Figlewicz et al., 2009). Повишаването на телесното тегло и на ретроперитонеалната мастна тъкан се съпровожда с повишено тегло на черният дроб, установено при експериментални и клинични изследвания (Bechmann et al., 2012). Хипертрофията на висцералната мастна тъкан води до адипоцитна дисфункция с нарушена инсулинова сигнализация, при което освободените СМК, проинфламаторни цитокини и адипокини директно попадат в черния дроб чрез порталното кръвообращение и допринасят за развитието на чернодробна инсулинова резистентност, стеатоза и хепато-

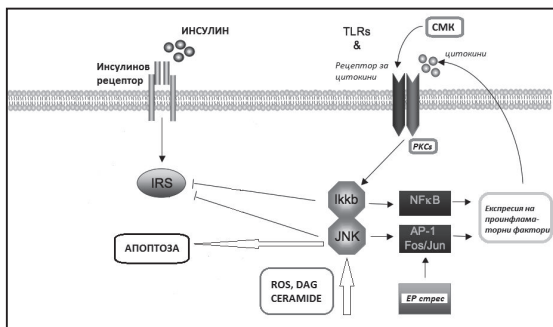
мегалия (Sabir et al., 2001). Според някои автори, натрупването на липиди в черният дроб, което води до хепатомегалия е един от най-вредните ефекти на ВФД, тъй като в условията на *de novo* липогенеза настъпва вторично ектопично отлагане на липиди с развитие на липотоксичност в други тъкани като кръвоносни съдове, скелетни мускули и др. (Tarru et al., 2010).

1.2.2. Промени в серумните нива на глюкозата.

Получените от нас резултати показват, че ВФД предизвиква хипергликемия, статистически значима в групите на ВФД спрямо контролата, която намалява в групата на S-АМе. Приема на Алопуринол понижава серумните нива на глюкозата значимо спрямо групата на ВФД до нива, близки до стойностите на контролата. Ние предполагаме, че ВФД предизвиква хипергликемия чрез директното си действие върху въглехидратната обмяна в черния дроб, чрез увреждане на инсулиновия сигнал и намаляване на глюкозната утилизация в периферните тъкани.

Постъпването на фруктоза в черния дроб (за разлика от глюкозата) и превръщането ѝ в триозо-фосфат не се регулира от инсулина и чернодробните кинази. Метаболизирането ѝ води до повишено образуване на глюкоза, независимо от енергийното състояние на клетките и серумните нива на глюкозата (Cortez-Pinto et al., 1999). Това е причина, значителен процент (около 50%) от приетата фруктоза да се метаболизира в глюкоза в чернодробните клетки и постъпвайки в плазмата да предизвика хипергликемия (Delague et al., 1993). От друга страна, ВФД води до повишено образуване на пикочна киселина, което редуцира нивата на ендотелния NO. Дефицитът от NO блокира действието на инсулина в скелетните мускули, което води до намалена утилизацията на глюкозата и хипергликемия (Li et al., 2009). Алопуринолът, като ксантиноксидазен инхибитор потиска образуването на пикочна киселина, което вероятно обяснява хипогликемичното

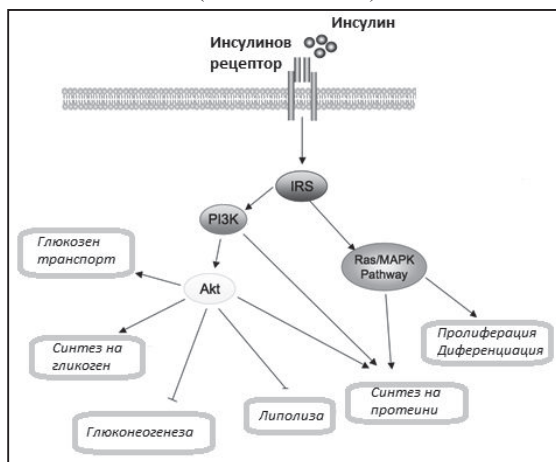
му действие в групата на ВФД. Нашите резултати подкрепят проучването на Nakagawa et al., (2006), които също са установили, че намалението на серумните нива на пикочна киселина с Алопуринол подобрява чувствителността към инсулин в модел на фруктозо-индуциран метаболитен синдром.



Фиг. 13. Потискане на инсулин-медираната сигнална трансдукция. Активирането на серин киназите- IκBκ и JNK от реактивни форми на кислорода (ROS), метаболити на затлъстяването-диацил-глицероли (ДАГ), церамид, свободни мастни киселини (СМК), проинфламаторни цитокини и др., стимулира активността на провъзпалителните сигнални пътища- NFκB и AP-1Fos/Jun. Това води до инхибиране активността на IRS и инсулинова резистентност. От друга страна активността на JNK се свързва и с индуциране на апоптоза в β-клетките на панкреаса, което допълнително уврежда секрецията на инсулин.

Фруктозо-индуцираната хипергликемия установена в настоящето проучване, вероятно се дължи и на инсулинова резистентност. Установените в нашето изследване затлъстяване и хипертрофия на висцералната мастна тъкан, вероятно са причина за адипоцитна дисфункция, при която се освобождават от мастната тъкан проинфламаторни цитокини като TNF-α, диabetогенни адипокини, метаболити: наситени СМК, диацилглицероли, церамид и АФК (виж фиг. 13). Тези продукти активират серин киназите- IκBκ или JNK, които фосфорилират IRS и инхибират активността му, индуцират инсулинова резистентност в черния дроб и периферните тъка-

ни (Hotamisligil et al. 2010; Aguirre et al. 2002; Wei et al. 2005). Доказано е, че фруктозо-1-фосфата (първият продукт от метаболизма на фруктозата в черния дроб) също увеличава серин фосфорилирането на IRS и нарушава PI3K/Akt (виж фиг.14) сигналния път на инсулина, което води до активиране на глюконеогенезата, потискане на синтеза на гликогена и повишено производство на глюкоза. (Wei et al. 2007).



Фиг. 14. Инсулин-медирана сигнална трансдукция. Инсулинът се свързва със специфичен рецептор в инсулин-рецепторен субстрат (IRS). Тирозин-фосфорилирането на IRS отключва сигналната каскада на два основни сигнални пътя. PI3K/Akt, който медира метаболитните ефекти на инсулина, включително утилизацията на глюкоза в клетката. Ras/MAPK път, който медира ефекта на инсулина върху генната експресия, но също взаимодейства с PI3K-Akt за контрол на клетъчния растеж и диференциация.

От друга страна, наситените СМК, които се отделят от мастната тъкан при инсулинова резистентност, проявяват директно силно липотоксично действие върху β -клетките на панкреаса, предизвиквайки апоптоза и нарушена инсулинова секреция. Насочването на липидни метаболити от хипертрофиралата мастна тъкан към черния дроб и скелетните мускули води до липотоксичност, която е причина за производство на АФК, раз-

витие на оксидативен стрес и активиране на проинфламаторните пътища чрез NF- κ B, които също увреждат инсулиновия сигнал. Това води до инхибиране усвояването на глюкоза в мускулите, а в черния дроб липсата на инсулинова активация увеличава производството на глюкоза и допринася за хипертриглицеридемията, което се наблюдава при пациенти и експериментални животни със затлъстяване и захарен диабет тип 2. В подкрепа на това е, че приемът на S-АМе и Алопуринол редуцира теглото на ретроперитонеалната мастна тъкан, което вероятно е причина и за понижаване на серумните нива на глюкозата.

В нашите резултати беше установена висока корелационна зависимост в групата на ВФД, между теглото на ретроперитонеалната мастна тъкан и повишените чернодробни нива на наситените СМК ($r= 0.794$, $p< 0,05$), както и повишени серумни нива на глюкозата и TNF- α и понижени нива на серумния глутатион. Взети заедно тези данни показват, че метаболитните нарушения, които се развиват при ВФД са свързани и с инсулинова резистентност, която допринася за хипергликемията и потвърждават резултати на други изследователи (Nagai, Nishio et al., 2002). Следователно, повлияването на инсулиновата сигнализация от серин киназите, нивата на наситените СМК, TNF- α и АФК са от съществено значение за фруктозо-индуцираните метаболитни нарушения, защото показват потенциалната връзка между затлъстяването и свързаните с него възпаление, оксидативен стрес и инсулиновата резистентност и дават насоки за нови таргети за терапия (Hirosumi et al. 2002). В подкрепа на това е, че прилагането на антиоксидантите S-АМе и Алопуринол редуцира серумните нива на глюкозата.

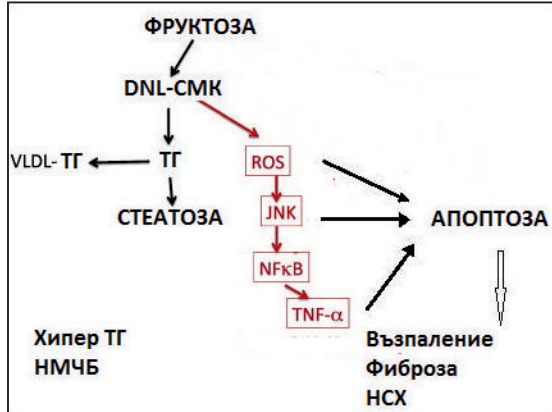
1.2.3. Промени в нивата на серумните липиди.

Важни прояви на МС са нарушенията в липидната обмяна, които се проявяват с дислипидемия следствие на инсулинова резистентност, пови-

шена продукция на ТГ, VLDL и холестерол в черният дроб, водещи до развитието и на чернодробна стеатоза. Нашите данни показват, статистически значимо увеличаване на серумните нива на ТГ, VLDL и общ холестерол спрямо контролата. Хипертриглицеридемията и липопротеинемията са редуцирани при прилагането на S-АМе и Алопуринол до нормалните стойности. Нивата на HDL остават непроменени във ФПУ групата спрямо контролата, а се повишават значимо при S-АМе и Алопуринол спрямо групата на ВФД, с около 20 % над тези на контролата и са причина за високите нива на общия холестерол в тези групи.

Механизмите за фруктозо-индуцираната дислипидемия са все още неизяснени напълно, но вероятно метаболитните нарушения при затлъстяване и инсулинова резистентност водят до аномалии в липидната обмяна, което се доказва с повишените нива на ТГ и VLDL в нашия модел. Нашите резултати потвърждават липидогенния потенциал на фруктозата, водещ до дислипидемия и при други модели на МС (Tappu, Le. 2012). Ние предполагаем, че дислипидемията при ВФД се дължи на повишен приток на СМК от мастната тъкан, нарушеното им β -окисление и *de novo* липогенеза в черния дроб.

Превръщането на фруктозата след остър или хроничен прием в мастни киселини (макар и в малки количества) чрез *de novo* липогенеза е доказана при хора (Parks et al., 2008), при плъхове *in vivo* (Bar-On H et al., 1968) и в изолирани плъши хепатоцити (Clark et al., 1974). Доказано е, че диетата с високо съдържание на фруктоза директно стимулира експресията в черния дроб на транскрипционните фактори- SREBP- 1 и ChREBP, които са основни индуктори в синтеза на холестерол, СМК и ТГ от глюкоза (Dentin et al., 2004). От друга страна, превръщането на излишната глюкоза в мастни киселини повишава количеството на малонил-СoА, който спира прехвърлянето им в митохондриите за окисление като ги ориентира към естерифициране в ТГ.



Фиг. 15. Вероятни механизми за развитието на чернодробна стеатоза и НМЧБ, индуцирани от повишен прием на фруктоза. От ляво, стимулиране на де ново липогенезата (DNL) и инхибиране на чернодробното окисление на СМК може да допринесе за интрахепатално отлагане на мазнини, и следователно за развитието на НМЧБ. В дясно, активация на пътищата на JNK и производство на реактивни кислородни видове (ROS) от фруктозния метаболизъм може да стимулира производството на възпалителни медиатори (чрез NF-κβ) или да индуцира директно апоптоза. Взети заедно, оксидативния стрес, възпалението и апоптозата са въввлечени в последващи тъканни увреждания и прогресия на болестта. TG-триглицериди; НСХ-неалкохолна стеатохепатит.

При метаболизирането си в черния дроб, фруктозата предоставя големи количества триозо-фосфат, който също се използва за синтеза на мастни киселини. Претоварването на хепатоцитите със СМК (циркулиращи и de novo синтезирани) и излишък на малонил-СоА, ориентира окислението им по алтернативни пътища в цитоплазмата, което обаче индуцира оксидативен стрес, водещ до митохондриално увреждане, дисфункция и потиснато β- окисление. Едновременно с това, фруктозата директно инхибира окислението на чернодробните липиди и по този начин насочва мастните киселини към реестерификация, синтез на ТГ и VLDL (Topping et al., 1972). Така фруктозо-индуцираната инсулинова резистентност създава порочен кръг между повишените нива на СМК и намаленото им β-

окисление в митохондриите, водещо до прекомерно образуване на липиди в черният дроб, стеатоза, оксидативен стрес и възпаление- виж фиг. 15.

Патогенетичните механизми, чрез които лечението със S-АМе и Алопуринол намаляват нивата на серумните липиди не са изяснени. Вероятно антиоксидантната им активност протектира срещу дисфункцията в мастната тъкан. Някои изследователи съобщават, че 60% от мазнините депозирани в черния дроб се генерират от източници на мастната тъкан (Donnelly et al., 2005). Доказано е, че натрупването на липиди в мастната тъкан при нарушена адипоцитна функция води до хипоксия, оксидативен стрес и хронично възпаление, с освобождаване на проинфламаторни и диabetогенни цитокини като TNF- α , IL-6 и др., които увреждат инсулиновата чувствителност в мастната тъкан, увеличават адипоцитната липолиза и съответно циркулиращите нива на СМК. Следователно потискането на ОС в мастната тъкан при затлъстяване, както от S-АМе така и от Алопуринол, блокира проинфламаторните сигнални пътища и синтеза на цитокини, предизвикващи инсулинова резистентност в адипоцитите и прекомерно освобождаване на СМК. Това води до намаляване притока на СМК към черния дроб, съответно липидогенезата и повишен синтез на холестерол, ТГ и VLDL.

В нашето проучване за първи път бе демонстрирано влиянието на S-АМе върху фруктозо- индуцираните повишени нива на серумните липиди, което е значимо по-изразено от това на Алопуринола. Доказано е, че чернодробната синтеза на S-АМе е нарушена при увреждания, индуцирани от хепатотоксични агенти като алкохол, пиразолон или богата на мазнини диета поради намалена активност на MAT (Lu et al., 2012). В резултат на това, хроничният дефицит на S-АМе в черния дроб причинява ОС с изчерпване на редуцирания глутатион, митохондриална дисфункция и повишена липидогенеза. Píkens et al. (2010) установяват, че приемането на

фруктоза от мишки хранени с метионин-холин-дефицитна диета води до прекомерно натрупване на наситени СМК в черния дроб чрез индуциране на FAS (синтаза за мастни киселини) и повишена липотоксичност. Тези данни се подкрепят и от други изследователи, които установяват силно редуцирана активност на PGC-1 α в стеатозен черен дроб на мишки хранени с метионин-холин дефицитна диета (Simon et al. 2011). Следователно подобряването на митохондриалната функция и β - окисление на СМК в нашето проучване, вероятно е друг механизъм, чрез който екзогенно внесеният S-АМе намалява чернодробната продукция на липиди.

Съществуват убедителни доказателства, че дисрегулацията на енергийния метаболизъм при НМЧБ е свързана и с епигенетични механизми на увреда, която зависи от адекватната биосинтеза на S-АМе. По този начин дисбалансът в чернодробните нива на S-АМе предизвикан от хранителни фактори води до епигенетични процеси, които регулират експресията на ключови гени от липидния и въглехидратен метаболизъм (Park et al., 2012). Например хипометилиране на ДНК промоторни области в SREBP-2, FASN и др. са открити в стеатозен черния дроб на експериментални животни със стеатохепатит, които са хранени с високо съдържание на мазнини и метионин дефицитна диети (Sun et al., 2015). Вероятно екзогенният внос на S-АМе проявява хепатопротективно действие и чрез епигенетични промени в регулацията на чернодробния липиден метаболизъм, водещи до намалена липогенезата и повишено окисление на СМК (виж фиг. 20).

Известно е, че черният дроб играе важна роля в регулирането и разпределение на липиди към други тъкани съобразно нуждите, чрез модулиране на липидния синтез, усвояването и секреция на липопротеини. (Packard et al., 1999). Фруктозо-индуцираните нарушения в липидния метаболизъм обаче предизвикват дислипидемия и с това повишават риска от развитие-

то и на атеросклероза и хипертензия.

В заключение, в нашето проучване бе установено, че лечението със S-АМе и Алопуринол значително намалява нивата на ТГ, VLDL, а повишава нивата на HDL. Това означава, че те протектират не само по-нататъшни чернодробни увреждания като стеатоза, ОС и възпаление, но и екстрахепатални усложнения свързани с увреждащото действие на холестерола.

1.2.4. Промени в чернодробното съдържание на СМК.

Чернодробна проява на метаболитния синдром е НМЧБ. Съществуват доказателства за ролята на циркулиращите СМК в развитието на чернодробната стеатоза и НМЧБ. Donnelly et al., (2005) установяват, че чернодробните и циркулиращи богати на триглицерол липопротеини произхождат от СМК, освободени от мастната тъкан. Това показва, че по-голямата част от чернодробните ТГ са получени от циркулиращите СМК, генерирани от липолизата на адипоцити, което е характерна черта на инсулиновата резистентност и МС. Освен това при фруктозо-индуцираните метаболитни нарушения, принос за повишените нивата на чернодробните СМК имат и *de novo* липогенезата и намаленото им β -окисление в митохондриите.

Резултатите от нашите изследвания показаха статистически значимо увеличение на общите СМК в групата на ВФД, на S-АМе и Алопуринол спрямо контролата. Ние установихме, че повишените нива на общите СМК в групите приемачи S-АМе и Алопуринол са за сметка на значително по-високите нива на ненаситените СМК спрямо контролата и групата на ВФД. В групата на ВФД, се наблюдава спадане в нивата на ненаситените и увеличение на наситени СМК. Ние предполагахме, че нивата на ненаситените СМК са по-ниски заради окислителното увреждане на фосфолипидите, които влизат в състава на клетъчните макромолекули, вслед-

ствие повишеното образуване на АФК, което е наблюдавано и при други модели с експериментални животни (Yang et al. 2000). Натрупването на СМК в черният дроб може да потисне β -окислението в митохондриите, при което се повишава продукцията на АФК. Това от друга страна увеличава окисляването им в пероксизоми и микросоми, което обаче води също до повишена продукция на АФК, активиращи липидна пероксидация. Ненаситените мастни киселини са изключително афинитетни към липидно пероксидиране от АФК, при което се повишава продукцията на 4-хидроксинонеал и МДА (Esterbauer et al., 1991). Тези алдехиди атакуват най-вече митохондриите, съдържащи значителни количества фосфолипиди, което е причина за тяхната дисфункция и допълнително генериране на АФК (Perez-Carreras et al. 2003).

В нашето проучване също бяха установени значително повишени нива на МДА в групата на ВФД, което предполага, че възможна причина за намалените нива на ненаситените СМК в тази група е именно липидното им перокисление. От друга страна е установено, че наситените СМК са по-токсичните липидни видове в клетките. Повишеното ниво на наситените СМК може да промени фосфолипидния състав на митохондриалните мембрани, да предизвика митохондриална дисфункция, повишено генериране на АФК и провъзпалителни цитокини, които впоследствие да предизвикат деструктиращи промени и апоптоза в хепатоцитите.

От проведени проучвания върху пациенти и експериментални животни става ясно, че нарушенията в мастно-киселинния състав на клетъчните мембрани участват в патогенезата на основни компоненти на МС като инсулинова резистентност, затлъстяване, хипертония, захарен диабет тип 2 и др. Предполага се, че фактори като ОС, които индуцират подобни промени могат да повлияят на развитието на МС. През последните години е установено, че различните класове СМК могат да контролират експе-

сията на гени, кодиращи ензими, аполипопротеини и рецептори, участващи в липидния метаболизъм (Sampath et al., 2005). Например клетъчните ненаситени СМК притежават способността да потискат експресията на липогенни гени регулирайки транскрипционни фактори като PPARs и SREBPs, отколкото добавените с храната полиненаситени n-3 и n-6 МК (Chakravarthy et al., 2009). Следователно, намаленото съдържание на ненаситени СМК при ОС, както показва настоящето изследване вероятно е от съществено значение за повишената липогенеза и акумулиране на липиди в черния дроб. Според нас, понижаването на нивата на ненаситените мастни киселини и повишаване на наситените мастни киселини е също възможен механизъм за увреждания в черния дроб при хронично фруктозно натоварване.

За първи път ние изследвахме влиянието на S-АМе и Алопуринол върху количеството и състава на чернодробните нива на СМК. След прилагането на S-АМе и Алопуринол се установи значително повишение на нивата на ненаситените СМК спрямо тези в групата на ВФД и контролата. Ние считаме, че S-АМе вероятно чрез повишаване на синтеза на GSH, а Алопуринолът, потискайки образуването на АФК (чрез инхибиране на ксантиноксидазата), подобряват антиоксидантната защита на хепатоцитите срещу фруктозо-индуцирания ОС и като резултат протектират срещу липидното пероксидиране на ненаситените СМК.

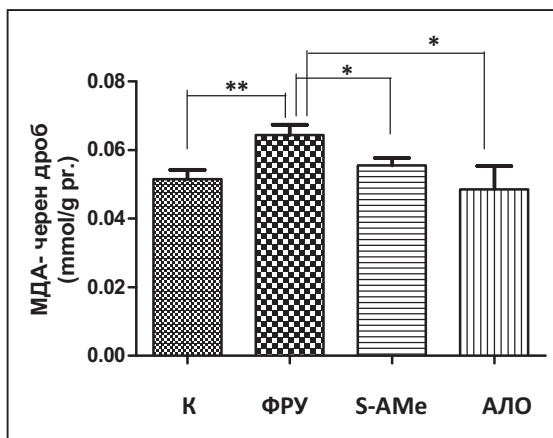
2. ПРОУЧВАНЕ НА РОЛЯТА НА ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС ЗА ЧЕРНОДРОБНОТО УВРЕЖДАНЕ ПРИ ВИСОКО- ФРУКТОЗНА ДИЕТА И ПРИЕМ НА S-АМЕ И АЛОПУРИНОЛ

2.1. РЕЗУЛТАТИ

2.1.1. Определяне на нивата на малондиалдехид (МДА) в чернодробен хомогенат.

Нивата на МДА бяха определени в грам протеин от пробата с чернодробен хомогенат.

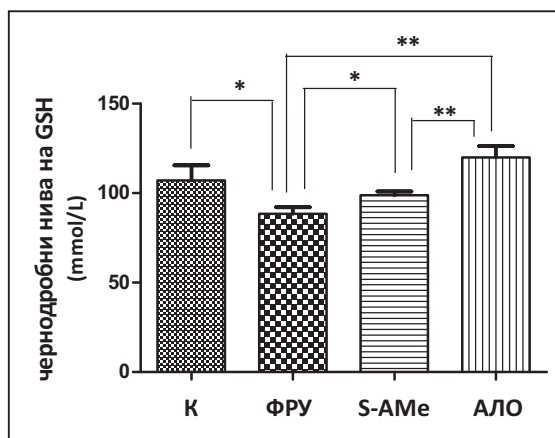
Резултатите показват значими повишени нива на МДА във ФРУ групата ($p < 0,005$) спрямо контролата. В групата на S-АМЕ ($p < 0,05$) и АЛО ($p < 0,05$) се наблюдава значително намаление на МДА спрямо групата на ВФД и близки до тези в контролната група (фиг. 16).



Фиг. 16. Промени в чернодробните нива на МДА. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($N=7$). Легенда: К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-АМЕ- група на ВФД и прием на S-АМЕ; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, t -test.

2.1.2. Определяне на нивата на глутатион (GSH) в чернодробен хомогенат.

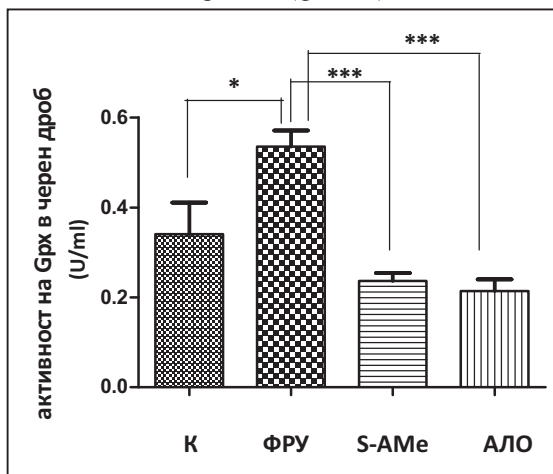
Нивата на GSH в чернодробните хомогенати бяха определени като общо количество тиоли в пробата. Резултатите показват значими понижени нива на GSH във ФРУ групата ($p < 0,05$) спрямо контролата. В групата на S-АМе ($p < 0,05$) и АЛО ($p < 0,005$) се наблюдава значително повишени нива на GSH спрямо групата на ВФД. В групата с прием на Алопуринол нивата са по-високи спрямо контролната група и значимо повишени спрямо групата на S-АМе ($p < 0,005$), (фиг. 17).



Фиг. 17. Промени в чернодробните нива на GSH. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($N=7$). Легенда: К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-АМе- група на ВФД и прием на S-АМе; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *t*-test.

2.1.3. Определяне на активността на глутатион-пероксидазата (Grx) в чернодробен хомогенат.

Резултатите показват значително повишение на Grx- активност в ФРУ групата (близо 50 %) в сравнение с контролата ($p < 0,05$), S-АМе ($p < 0,001$) и АЛО ($p < 0,001$). В групите S-АМе ($p < 0,0001$) и АЛО ($p < 0,0001$), активността на Grx намалява значително спрямо групата на ВФД и достигна нива по-ниски от тези на контролата (фиг. 18).

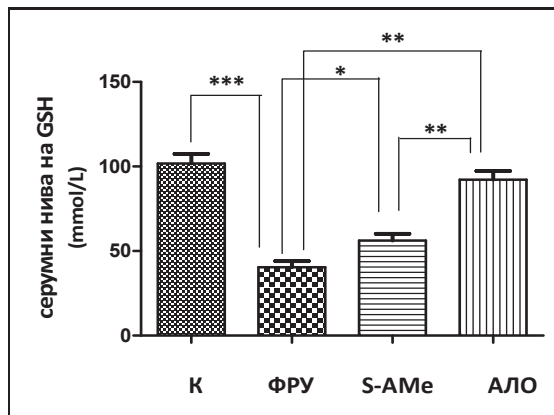


Фиг. 18. Промени в активността на Grx в черен дроб. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($N=7$). Легенда: К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-АМе- група на ВФД и прием на S-АМе; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$, *t*-test.

2.1.4. Определяне на нивата на редуцирания глутатион (GSH) в серуми.

Нивата на GSH в серумите бяха определени като общо количество сулфхидрилни групи (-SH-) в пробата. Резултатите показват значими понижени нива на GSH във ФРУ групата (над 50%) спрямо контролата ($p < 0,0004$). В групата на S-АМе ($p < 0,05$) и АЛО ($p < 0,001$) се наблюдава

значително повишение на GSH спрямо групата на ВФД, като в групата с прием на Алопуринол достигнаха нива близки до контролната група и значимо по-високи от групата на S-АМе ($p < 0,005$), (фиг. 19).



Фиг. 19. Промени в серумните нива на GSH. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($N=7$). Легенда: К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-АМе- група на ВФД и прием на S-АМе; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0004$, *t*-test.

2.2. ДИСКУСИЯ

2.2.1. Промени в нивата на липидна пероксидация и редуциран глутатион в черния дроб.

Акумулирането на липиди в черният дроб активира оксидативен стрес и възпалителни процеси, допринасящи за прогресивното увреждане на черният дроб при НМЧБ. Основни механизми свързани с генериране на АФК при високо-фруктозната диета са митохондриалната дисфункция в хепатоцитите и адипоцитната дисфункция при затлъстяване. В условията на хипоксия, в хипертрофиралата мастна тъкан се активира NADF-оксидазата от левкоцити, миелопероксидазата от моноцити и ксантиноксидазата, които са важни източници на АФК и заедно с освободените СМК

попадат в черния дроб през порталното кръвообращение, където оказват своето токсично действие върху мембранните липиди (Talior et al., 2005). Индуцираната от ВФД хипергликемия и образуване на гликирани продукти иницира серия от увреждащи черния дроб процеси, от които също генериране на АФК. От особено значение са индуцираното от пикочната киселина производство на водороден перекис в черния дроб (при метаболизирането на фруктозата), което стимулира образуването на пероксинитрили и не на последно място са екстрамитохондриалното окисление на СМК и *de novo* липогенеза, които изчерпват редуциращи еквиваленти, необходими за подържане на антиоксидантната система.

АФК образувани по време на тези реакции предизвикват активиране на липидната пероксидация, увреждане на клетъчните протеини, липиди и ДНК (Seki et al., 2002). Доказателство за активирането на липидната пероксидация в нашето изследване са високите нива на МДА в групата на ВФД спрямо контролата, които бяха редуцирани в групите третирани с S-АМе и Алопуринол и достигнаха нива близки до тези на контролата. Доказано е, че продукти от липидната пероксидацията като МДА са цитотоксични, изчерпват клетъчния GSH и по този начин усилват ефектите на ОС. В допълнение, образуваният в черния дроб МДА чрез циркулацията може да достигне в други тъкани и органи и наруши синтеза на нуклеотиди и протеини, да увеличи производството на проинфламаторни цитокини като TNF- α и предизвика функционални увреждания (Esterbauer et al., 1991).

Данните от експериментални и клинични изследвания показват връзка между ОС и степента на чернодробно увреждане (Bergamini et al., 2004). При пациенти с НМЧБ е установено намаляване на ендогенната синтеза на S-АМе, който е важен метилов донор и прекурсор на глутатиона. Наличието на ОС в нашия модел се потвърждава, както от високите нива

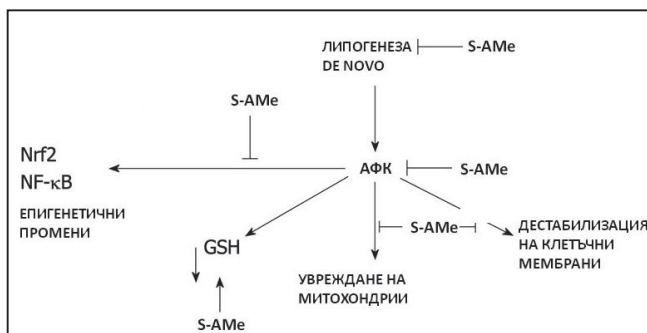
на чернодробните МДА, така и от значително понижените нива на редуциран глутатион и на ненаситени СМК (основни таргети на липидната пероксидация) във групата на ВФД. Алдехидите с по-дълъг живот като МДА, атакуват ненаситените мастни киселини в клетъчните мембрани, на което се дължи намалението им и промяна в съотношението наситени/ненаситени СМК, водещо до увреждания на хепатоцитите. Увеличените нива на МДА са причина за изчерпване на тиолите, които имат важно значение за поддържане на клетъчния редокс баланс и антиоксидантна защита. Функционална последица е изместване на редокс баланса по посока на оксидативните процеси.

Глутатионът е основният ендегенен неензимен антиоксидант и модулатор на редокс статуса в цитозола и митохондриите на клетките от тъканите в целия организъм. Поддържането на редокс статуса е жизнено важен защитен механизъм срещу АФК и оцеляването на клетките в условия на оксидативен стрес (Shelly, 2011).

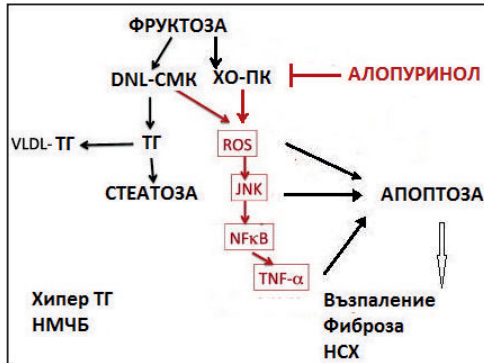
Нашите данни показват значително понижени серумни нива на редуциран глутатион във групата на ВФД и повишени в групите третирани с S-АМе и Алопуринол. Прилагането на S-АМе и Алопуринол вероятно ограничават оксидативните увреждания в черния дроб по различен механизъм: S-АМе- като повишава продукцията на глутатион, а Алопуринолът- като потиска образуването на АФК, пикочна киселина и свързаните с това пероксинитрили. Освен това, екзогенното въвеждане на S-АМЕ предотвратява чернодробно увреждане, индуцирано от редица хепатотоксини. Хроничната консумация на алкохол например, намалява чернодробните нива на S-АМе, което корелира с ДНК хипометилиране, повишена липидна пероксидация и митохондриални увреждания (Xiaodong et al., 2008), (виж фиг. 20).

Ние установихме, че в групата на лечение с Алопуринол нивата на

МДА бяха по-ниски, а нивата на редуциран глутатион по-високи спрямо групата на ВФД, контролата и тази с прием на S-АМе. Това предполага, че продуцирането на АФК при активиране на ксантинооксидазата е от съществено значение за фруктозо-индуцирания ОС (виж фиг. 21). В условията на ОС, наситените СМК действат като допълнителен увреждащ хепатоцитите фактор. Следователно, S-АМе и Алопуринол намалявайки чернодробните нива на наситените СМК и продукцията на АФК, повишават устойчивостта на хепатоцитите в оцеляването им срещу увреждащи клетките смъртоносни сигнали.



Фиг. 20. Възможни механизми на цитозащита стимулирана от приема на S-АМе срещу фруктозо-индуцираните метаболитни разстройства. Потискането на оксидативния стрес в мастната тъкан при затлъстяване от S-АМе блокира синтеза на проинфламаторни цитокини (чрез NF-κβ) предизвикващи инсулинова резистентност в адипоцитите и освобождаване на СМК. Това намалява притока на СМК, съответно липидогенеза и потисната ефективност на β-окисленето, водещи до образуване на АФК и липидни пероксиди в черния дроб. Приемът на S-АМе независимо блокира митохондриалната дисфункция и дестабилизация на клетъчните мембрани чрез възстановяването на редуцирания глутатион (GSH), поддържане на редоксбаланса и антиоксидантната защита в хепатоцитите. S-АМе проявява хепатопротективно действие и чрез епигенетична регулация на ключови гени от липидния и въглехидратен метаболизъм.



Фиг. 21. Протективно действие на Алопуринола при фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения. Алопуринола, потискайки активността на ксантиноксидазата (XO) в мастната тъкан и черния дроб блокира производството на пикочна киселина (ПК) и активни форми на кислорода (ROS) и последващи чернодробни увреждания.

2.2.2. Промени в чернодробната активност на глутатион-пероксидазата.

Данните от литературата показват, че свръхпроизводството на свободни радикали при неалкохолната чернодробна стеатоза води до промени в клетъчният редокс баланс и индуцира последващо увреждане на хепатоцитите преодолявайки антиоксидантната им защита. От особено значение за защитата от увреждащото действие на водородният пероксид и още по-токсичните органични хидропероксиди има активността на глутатион-пероксидазата. Тя катализира оксидацията на 2 молекули редуциран глутатион в окислен за сметка на образуваните прекиси (H_2O_2 и LOO). В нашите изследвания ние установихме почти двукратно повишение на активността на глутатион-пероксидазата в черния дроб в групата на ВФД спрямо контролата. Въпреки, че активността на един от най-важните ензими на антиоксидантната защита като глутатион-пероксидазата е повишена, вероятно това не е достатъчно да се предотврати окислителното увреждане на хепатоцитите и да се възстановят нивата на редуцирания глутатион. Едновременно увеличение на липидната пероксидация в черния дроб и активността на

глутатион-пероксидазата предполага, че това е компенсаторна реакция на хепатоцитите да се справят с оксидативният стрес.

Според някои автори хроничният субтоксичен ОС, може да доведе до предварителна подготовка на антиоксидантната защита за по-висока резистентност към последващо окислително увреждане на тъканите. Това на практика се осъществява чрез активиране на цитозащитния Keap1-Nrf2 сигнален път, който регулира голям брой гени на ензими, повишаващи антиоксидантния капацитет на клетките като SOD, HO-1, глутатион-пероксидазата, глутатион редуктаза и др. (Schauer et al., 2003). По този начин индукцията на фактори за антиоксидантна защита, повишава устойчивостта към последващи по-тежки за клетките атаки на АФК (Kensler et al., 2007). Следователно повишената активност на глутатион-пероксидазата в групата на ВФД вероятно се дължи и на този механизъм, тъй като в групите с прием на S-АМе и Алопуринол активността ѝ беше намалена значително спрямо останалите групи вкл. и контролната. Вероятно S-АМе и Алопуринолът чрез потискане на ОС и стимулиране на антиоксидантната защита (синтез на GSH), осъществяват хепатопротективния си ефект и предотвратяват по-нататъшната прогресията на чернодробните увреждания.

Независимо от повишената активност на глутатион-пероксидазата в групата на ВФД, нивата на редуцирания глутатион остават ниски, което показва смущения в системите за възстановяване на редуцирания глутатион. Редукцията на GSSG в 2 молекули GSH се реализира от глутатион редуктазата, която използва NADPH като донор на H-атоми. Някои автори предполагат, че повишената фруктозо-индуцирана липогенеза консумира повече NADPH, което е недостатъчно за възстановяването на окисления глутатион (Shelly, 2013). Това ребалансира редокс състоянието в клетките, води до митохондриална дисфункция, редокс промяна в ензимната активност, промяна в метаболизма на хепатоцитите и активиране отново на *de novo* липидогенезата. Т. е. изчерпването на редуциращи еквиваленти (като NADPH) е свързано както

с повишената липидогенеза, така и с повишен ОС и липидна пероксидация, което е потвърдено и от нашето проучване с увеличените серумни нива на ТГ, чернодробни нива на СМК и МДА. Това предполага че промяната в липидната хомеостаза може да зависи до голяма степен и от състоянието на антиоксидантната защита на клетките. От друга страна тези процеси показват тясна връзка между антиоксидантната сигнализация и липидния метаболизъм (Argese et al., 2010). Доказано е, че някои транскрипционни фактори като PPARs, SREBP-1, PGC-1 и др. действат като редокс сензори и проявяват редокс-зависима модулация на липидния метаболизъм, което при намалена антиоксидантна защита може да доведе до чернодробна стеатоза и инсулинова резистентност (Abdelmegeed et al., 2009); Lin et al., 2005). Вероятно, прилагането на антиоксиданти като S-АМе и Алопуринол, които потискат образуването на АФК, променят липидния метаболизъм в черния дроб и проявяват антилипидогенен и антистеатозен ефект.

2.2.3. Промени в серумните нива на редуцирания глутатион.

Резултатите от настоящото проучване показват, значително понижени серумни нива на редуцирания глутатион в групата на ВФД спрямо контролата, а прилагането на S-АМе и Алопуринол ги повишава. Установената от нас значителна загуба на серумен GSH доказва, че ВФД индуцира метаболитни нарушения, които увеличават АФК и поддържат прооксидантно състояние в целия организъм, каквото се наблюдава при пациенти със затлъстяване, хипергликемия, дислипидемия и НМЧБ.

Понижените серумни нива на редуцирания глутатион предполага, че чернодробните увреждания впоследствие водят до екстрахепатални усложнения свързани с ОС в други тъкани и органи. Тъй като черният дроб е основният източник на редуциран глутатион, при увреждане на хепатоцитите от стеатоза, ОС и възпаление се нарушава нормалната му секреция и хомеостаза в целия организъм. Особено чувствителни в това отношение са мастната тъкан, скелетни мускули и панкреас, при които системният ОС може

да доведе до тежки увреждания на инсулиновата чувствителност. ОС и неговите продукти, чрез активирането на транскрипционния фактор NF- κ B повишават експресията на провъзпалителни медиатори като IL 6, С-реактивен протеин и др., които създават условия за поддържането на системно проинфламаторно състояние. От друга страна в съдовата система, ОС води до активиране на проинфламаторни и протромбогенни фактори, които нарушават регулацията на съдовия тонус, хиперкоагулABILитет и в съчетание с дислипидемия предизвикват развитието на атеросклероза, хипертензия и висок риск от ИБС, мозъчно-съдова болест и други кардио- метаболитни заболявания характерни за МС.

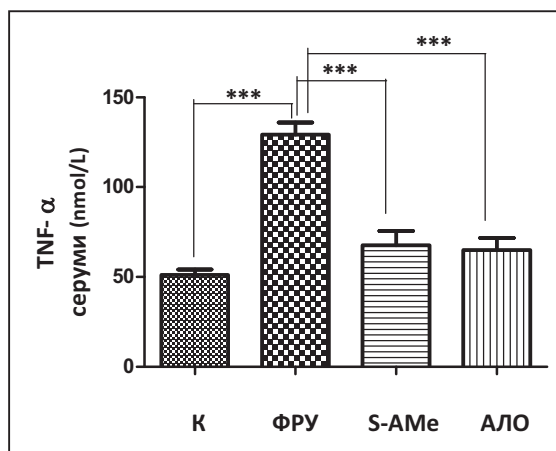
Проучванията, проведени от Schattenberga и др.(2005) доказват, че хепатоцитите изложени на хроничен оксидативен стрес имат повишена чувствителност към вредни стимули като проинфламаторния TNF- α , наситени СМК и др. Чернодробните увреждания предизвикани от фруктозо-индуцирани метаболитни нарушения намаляват концентрацията на S-АМе чрез инхибиране на синтеза му или чрез свръхконсумация в отговор на повишен ОС и загуба на редуциран глутатион. Това означава, че от съществено значение за елиминиране на екстрахепаталните увреждания е възстановяването и поддържане на оптимални чернодробни нива на S-АМе. Ние установихме че, екзогенното прилагане на S-АМе води до редукция на чернодробната стеатоза и МДА, значително повишава чернодробните и серумни нива на GSH, намалява серумните нива глюкозата, ТГ и VLDL и повишава на HDL (виж фиг. 44).

Наблюдаването от нас протективно действие на Алопуринола, е в съответствие с резултатите получени от други изследователи. Според Nakagawa et al.(2005) прообладаващото количество на АФК образувани в мастната тъкан и черния дроб при ВФД са в резултат от повишената активност на ксантиноксидазата, която е причина за продукцията на високи количества водороден пероксид и ПК. За това, прилагането на Алопуринол в нашия модел потиска образуването на АФК, запазва серумните нивата на редуцирания глутатион и по този начин защитава организма от оксидативните увреждания на ВФД.

3. ПРОУЧВАНЕ НА РОЛЯТА НА НИСКОСТЕПЕННОТО ВЪЗПАЛЕНИЕ ЗА ЧЕРНОДРОБНОТО УВРЕЖДАНЕ ПРИ ВИСОКО- ФРУКТОЗНА ДИЕТА И ПРИЕМ НА S-AMe И АЛОПУРИНОЛ.

3.1. РЕЗУЛТАТИ

3.1.1. Определяне на нивата на TNF- α в серуми.

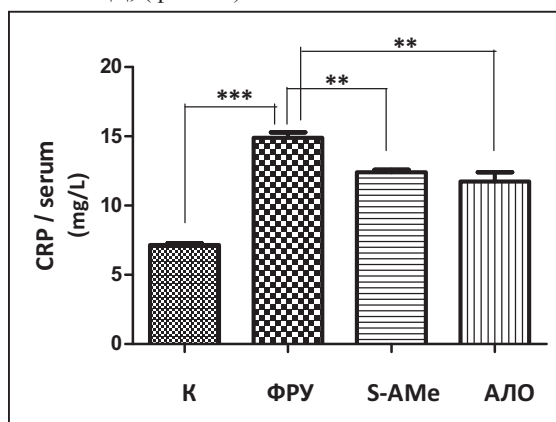


Фиг. 22. Промени в серумните нива на TNF- α . Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (N=7). Легенда: К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-AMe- група на ВФД и прием на S-AMe; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. *** $p < 0,001$, *t*-test.

Резултатите показват значителни повишени нива на TNF- α във ФРУ групата (над 150%) спрямо контролата ($p < 0,0001$). В групата на S-AMe ($p < 0,007$) и АЛО ($p < 0,003$) се наблюдава значително понижение на TNF- α спрямо групата на ВФД и близки до тези на контролната група (фиг. 22).

3.1.2. Определяне на нивата на С-реактивен протеин (CRP) в серуми.

Резултатите показват значителни повишени нива на CRP във ФРУ групата (над 200%) спрямо контролата ($p < 0,0001$). В групата на S-АМе ($p < 0,001$) и АЛО ($p < 0,006$) се наблюдава значително понижаване на CRP спрямо групата на ВФД, (фиг. 23).



Фиг. 23. Промени в серумните нива на CRP. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($N=7$). Легенда: К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-АМе- група на ВФД и прием на S-АМе; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, t-test.

3.2. ДИСКУСИЯ

3.2.1. Промени в нивата на TNF- α и С-реактивен протеин в серуми.

Затлъстяването при хронично фруктозно натоварване индуцира инсулинова резистентност, стеатоза в черния дроб и нискостепенно хронично възпаление. Съществуват убедителни доказателства за важната роля на TNF- α и други провъзпалителни медиатори (IL6) в развитието на стеатозата и прогресивното увреждане на черния дроб при неалкохолна болест, важен компонент на метаболитния синдром.

TNF- α се синтезира в адипоцитите, хепатоцитите, Купферовите клетки

(макрофагите в черния дроб) и ендотелните клетки (Schwabe et al., 2006). При фруктозно натоварване се увеличава обема на висцералната мастна тъкан и повишава продукцията на провъзпалителните цитокини като TNF, IL-6 и CRP (Weisberg et al., 2003). TNF- α инхибира инсулиновата сигнализация чрез медираното от JNK серин фосфорилиране на IRS в околните адипоцити, задейства освобождаването на провъзпалителните JNK (Plomgaard et al., 2005) и ядреният транскрипционен фактор NF- κ B, които активират про-възпалителни гени водещи до самозахранващ се цикъл на повишено освобождаване на про-възпалителните цитокини в мастната тъкан (Arkan et al., 2005). Така дисфункцията и инсулиновата резистентност в мастната тъкан (Strissel et al., 2007) предизвикват нарушения в регулацията на липидния метаболизъм, водещо до повишен експорт на СМК към черния дроб, развитие на стеатоза и повишена секреция на атерогенни триглицериди и VLDL. Освен това повишеното ниво на циркулиращите TNF- α , IL-6 и CRP стимулират хепаталната и системна инсулиновата резистентност (Dela-Peña et al., 2005). При пациенти с наднормено тегло и инсулинова резистентност серумните нива на TNF- α се увеличават пропорционално, като забележителна разлика между пациенти с неалкохолна стеатохепатит и тези с обикновена стеатоза са именно повишените серумни нива на TNF- α (Dieh et al., 2004).

TNF- α е от първата линия провъзпалителни цитокини, играещи важна роля в отключването и провеждането на възпалителния отговор чрез активиране на експресията на транскрипционния фактор NF- κ B и по този начин повишава продукцията не само на провъзпалителни цитокини (TNF, IL-6, IL-1) и CRP, но и на АФК в черния дроб (Schwabe et al., 2006). Освен това TNF- α може да активира индуцируемата NOS и да повиши продукцията на NO/ пероксинитрит, който има доказано прооксидантно, цитотоксично и проапоптоично действие върху черния дроб (Schwabe et al., 2006).

От друга страна, повишената продукция на АФК и МДА (маркер на липидната пероксидация) в стеатозния черен дроб може да активира транскрипционния фактор NF- κ B и вероятно също допринася за повишената продукция на провъзпалителни медиатори TNF- α и CRP (Day, 2006). Следователно АФК предизвикват не само клетъчна деструкция чрез активиране на мембранната липидна пероксидация, но и чрез повишаване продукцията на провъзпалителните медиатори и създават условия за поддържане на проинфламаторно състояние в черния дроб (Crespo et al., 2001). Вероятно по този път се формира порочен кръг стеатоза- оксидативен стрес – възпаление, което допринася за прогресивно увреждане на черния дроб във фруктозната група.

Резултатите от настоящото изследване показват повишено серумно ниво на TNF- α , CRP, триглицериди, VLDL, MDA в черния дроб и хистологични данни за микровезикуларна стеатоза, които са значително редуцирани в групите на лечение с S-AMe и Алопуринол. Хепатопротективният ефект на S-AMe най-вероятно се дължи на повишеният синтез на глутатион, ограничаване на оксидативните и възпалителните процеси в стеатозния черен дроб, отговорни за прогресивното увреждане на черния дроб при хроничното фруктозно натоварване (Thirunavukkarasu et al., 2004). Алопуринолът (като ксантиноксидазен инхибитор) намалява продукцията на АФК и пикочна киселина, които имат доказано провъзпалителни, прооксидантни и липидогенни ефекти (Vuorinen-Markkola et al., 1994; Nakagawa et al., 2006).

Взети заедно тези данни показват, че активирането на оксидативния стрес и ниско-степенното възпаление в стеатозния черен дроб вероятно имат важна роля в прогресирането на неалкохолната чернодробна болест като компонент на метаболитния синдром. Приложените S-AMe и Алопуринол редуцират оксидативния стрес, повишават антиоксидантната защи-

та, намаляват нивото на провъзпалителните медиатори и стеатоза и по този начин най-вероятно допринасят за оцеляването на хепатоцитите при хронично фруктозно натоваарване.

Освен това, TNF- α , IL-6 и CRP играят важна роля при съдовото възпаление и коагулация чрез многобройните си ефекти (Uysal et al., 1998). TNF- α повишава експресията на PAI-1 и потиска експресията на тромбомодулин и на протеин С в ендотела, индуциращи прокоагулантно състояние. TNF- α и IL-6 индуцират експресията на тъканния фактор върху повърхността на ендотелните клетки и моноцитите и стимулират процесите на коагулация и микротромбообразуване (Tarantino et al., 2010). TNF- α инхибира eNOS, намалява продукцията на NO, а повишавайки продукцията на активни форми на кислорода води до неговото инактивиране (Schwabe et al., 2006). IL-6 повишава активността на тромбоцитите, продукцията на фибриноген и риска от тромбообразуване в съдовете на микроциркулацията. Освен това, IL-6 е отговорен и за синтеза на CRP, който е медиатор и един от маркерите на ендотелната дисфункция (Guzik et al., 2006). CRP се свързва директно с неутрофилите, макрофагите и стимулира продукцията на провъзпалителни цитокини, а вероятно и на други медиатори. Този остро-фазен медиатор повишава експресията на тъканния фактор, осъществяващ връзката между възпаление и коагулация. Това предполага, че оксидативният стрес и акумулирането на липопероксиди в черния дроб при фруктозно натоваарване индуцира инфламаторен отговор, който повишавайки агрегацията на левкоцитите и тромбоцитите предизвиква и ендотелна дисфункция. (Goossens et al., 1995).

В допълнение може да се направи извода, че оксидативният стрес, нискостепенното възпаление и дислипидемията при хронично фруктозно натоваарване допринасят не само за прогресирането на неалкохолната мастна чернодробна болест, но и повишават риска от сърдечно-съдови и

други кардиометаболитни заболявания. Приложените S-Аме и Алопури-
нол ограничават развитието на НМЧБ и намаляват кардиометаболитния
риск при високо фруктозна диета.

4. ПРОУЧВАНЕ НА МОРФОЛОГИЧНИТЕ ПРОМЕНИ В ЧЕРЕН ДРОБ, АПОПТОЗАТА И НЯКОИ БИОХИМИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ НА ЧЕРНОДРОБНА ДИСФУНКЦИЯ ПРИ ВИСОКО- ФРУКТОЗНА ДИЕТА И ПРИЕМ НА S-АМЕ И АЛОПУРИНОЛ.

4.1. РЕЗУЛТАТИ

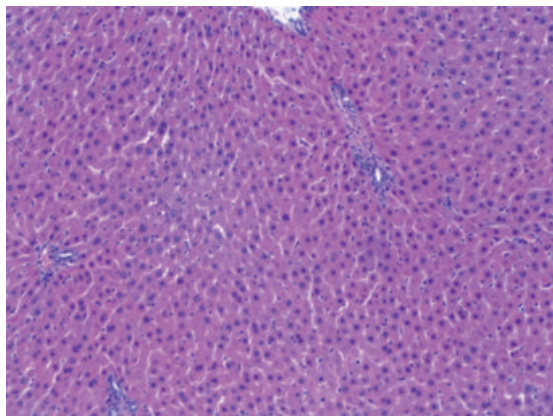
4.1.1. Резултати от изследване на контролната група плъхове.

Макроскопска находка:

Черният дроб е кафявочервен на цвят, с нормална форма и плътност.
Капсулата е гладка и опъната. Срезната повърхност е със запазен дел-
чест строеж. Средното тегло е 3.2 % от средното телесно тегло за групата
(+ 0.14).

Хистологично изследване:

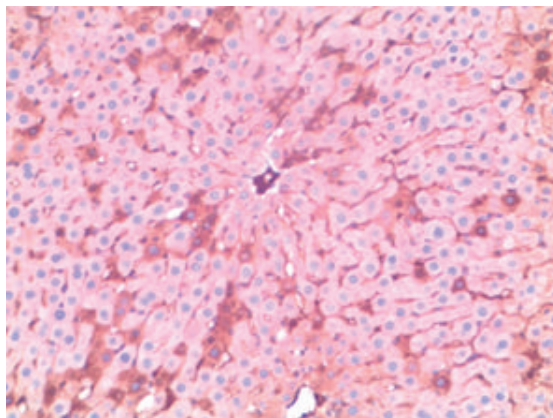
Чернодробните клетки са с полигонална форма, еозинofilна цитоп-
лазма и централно разположени везикуларни ядра с нуклеоли (фиг. 24).
Те образуват трабекули, между които са разположени централните вени,
а по периферията- порталните пространства, които са представени от ос-
къдно количество съединителна тъкан, малко на брой лимфоидни клетки,
клонче на v. porte, клонче на v. hepatica и едно или две жлъчни каналчета.



Фиг. 24. Черен дроб на плъх при контролната група. Оцветяване с хемалаун-еозин (x 100).

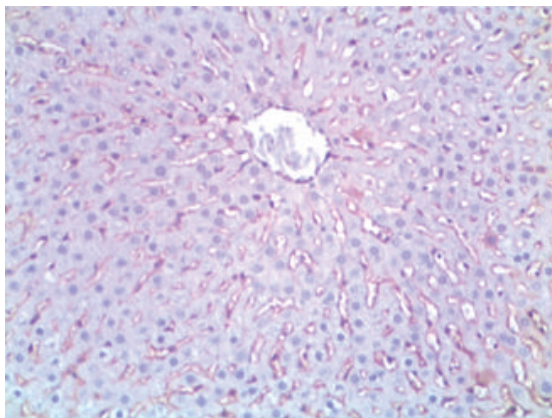
Имунохистохимично изследване:

В контролната група, Вах протеина се експресира предимно в синусоидалните клетки и в по-ниска степен в чернодробните клетки. Преобладават клетките със умерена степен на интензивност на реакцията, локализирана в цитоплазмата (фиг. 25).



Фиг. 25. Имунохистохимично изследване на Вах протеина в черен дроб на плъх-контролна група.

В контролната група Bcl 2 протеина се експресира в синусоидалните клетки. Преобладават клетките с умерена до ниска степен на интензивност на реакцията, локализирана главно в цитоплазмата на синусоидалните клетки (фиг. 26).



Фиг. 26. Имунохистохимично изследване на Bcl2 протеина в черен дроб на плъх-контролна група.

4.1.2. Резултати от изследване на групата плъхове хранени с ВФД.

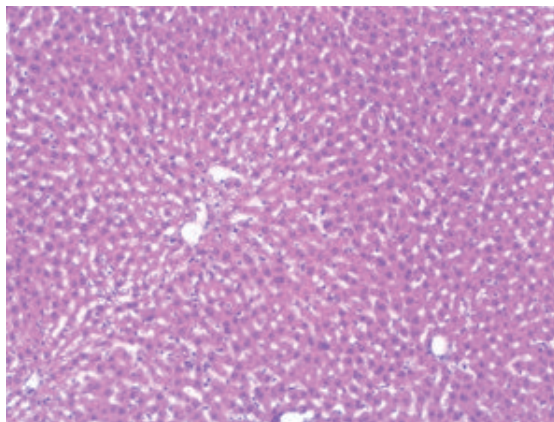
Макроскопска находка:

Черният дроб е жълтокафеникав на цвят, с нормална форма и намалена плътност. Капсулата е гладка и опъната. Срезната повърхност е с неясен делчест строеж. Средното тегло е 3.97 % от средното телесно тегло за групата (+ 0.07)

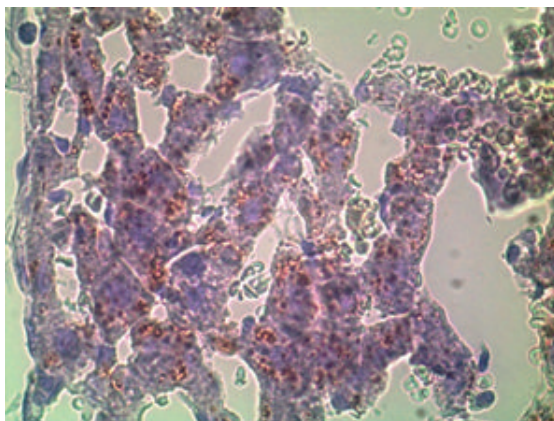
Хистологично изследване:

В цитоплазмата на хепатоцитите, около централната вена се откриват множество малки оптически празни вакуоли с данни за дребнокапчестта мастна дегенерация, която обхваща повече от 10% от хепатоцитите. Хепатоцитите са с леко увеличени размери. Липсват възпалителни клетки в чернодробния паренхим и порталните пространства. Не се откриват апоп-

тотични хепатоцити, фиг. 27А. При оцветяване със Судан III в цитоплазмата на хепатоцитите се откриват оранжеви капки, фиг. 27Б.



Фиг. 27А. Черен дроб на плъх при групата на ВФД. Оцветяване с хемалаун-еозин (x 100).

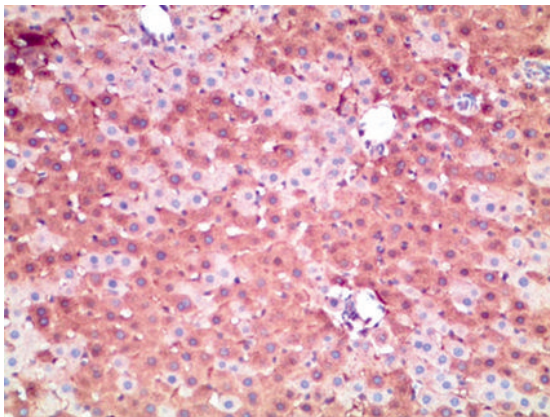


Фиг. 27Б. Черен дроб на плъх при групата на ВФД. Оцветяване с Судан III (x 400).

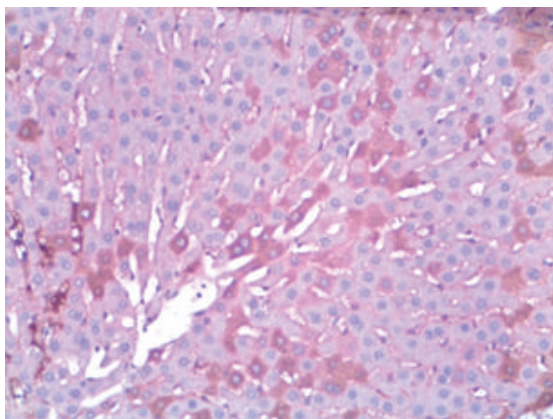
Имунохистохимично изследване:

В групата на ВФД, Вах протеина се експресира предимно в хепатоцитите и по-слабо в синусоидалните клетки. Преобладават клетките със

висока степен на интензивност на реакцията (ИИР с 190% повече) спрямо контролата (фиг. 36), която е локализирана в цитоплазмата на хепатоцитите разположени основно в перипорталните пространства (фиг. 28).



Фиг. 28. Имунохистохимично изследване на Vax протеина в черен дроб на плъх-ВФД.



Фиг. 29. Имунохистохимично изследване на Vcl2 протеина в черен дроб на плъх-ВФД

В групата на ВФД, Vcl 2 протеина се експресира основно в синусоидалните клетки и в по- малка степен в хепатоцитите. Интензивността на

имунната реакция варира от слаба (в синусоидални клетки) до умерено изразена в хепатоцитите - ИИР с 25% по-ниска спрямо контролата (фиг. 37). Експресията на протеина е основно в цитоплазмата на единични хепатоцити, разпределена равномерно и в трите зони (фиг. 29).

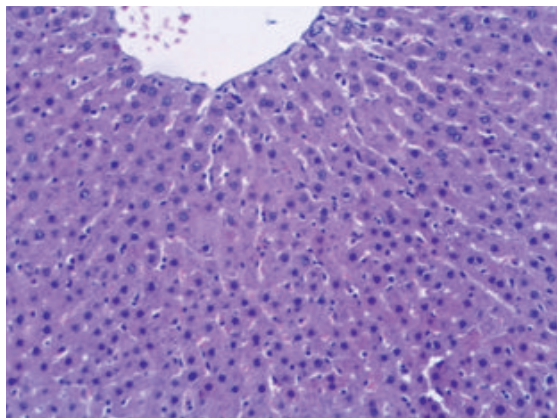
4.1.3. Резултати от изследване на групата плъхове хранени с ВФД и прием на S-АМе.

Макроскопска находка:

Черният дроб е кафявочервен на цвят, с нормална форма и плътност. Капсулата е гладка и опъната. Срезната повърхност е със запазен делчест строеж. Средното тегло е 3.4 % от средното телесно тегло за групата(+ 0.14).

Хистологично изследване:

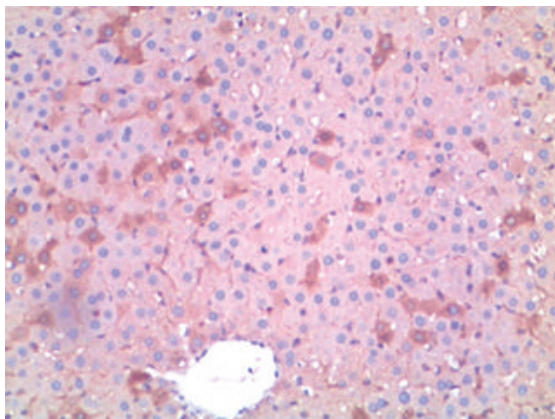
Чернодробните клетки са с полигонална форма, еозинофилна цитоплазма и централно разположени везикуларни ядра с нуклеоли (фиг.30). Липсват възпалителни клетки в чернодробния паренхим и порталните пространства, както и данни за мастна дегенерация. Не се откриват апоптотични хепатоцити.



Фиг. 30. Черен дроб на плъх при групата на ВФД и S-АМе. Оцветяване с хемалаун-еозин (x 200).

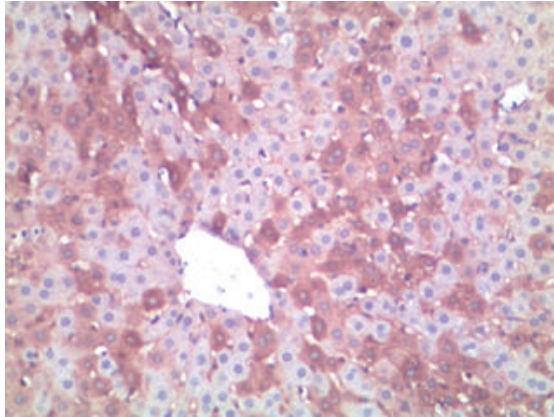
Имунохистохимично изследване:

В групата на ВФД и S-AMe, Вах протеина се експресира предимно в единични хепатоцити и в по-малка степен в синусоидалните клетки. Преобладават клетките със слаба до умерена степен на интензивност на реакцията- ИИР с 54% по-нисък спрямо групата на ВФД (фиг. 36), локализирана основно в цитоплазмата на хепатоцитите и разпределена равномерно и в трите зони (фиг. 31).



Фиг. 31. Имунохистохимично изследване на Вах протеина в черен дроб на плъх-група на ВФД и S-AMe.

В групата на ВФД и S-AMe, Vcl 2 протеина се експресира в синусоидалните клетки и хепатоцити. Преобладават клетките с умерена (в синусоидални клетки) до висока (в хепатоцити) степен на интензивност на реакцията- ИИР с 52% по-висока спрямо групата на ВФД (фиг. 37), локализирана главно в цитоплазмата на чернодробните клетки (фиг. 32).



Фиг. 32. Имунохистохимично изследване на Bcl2 протеина в черен дроб на плъх-група на ВФД и S-АМе.

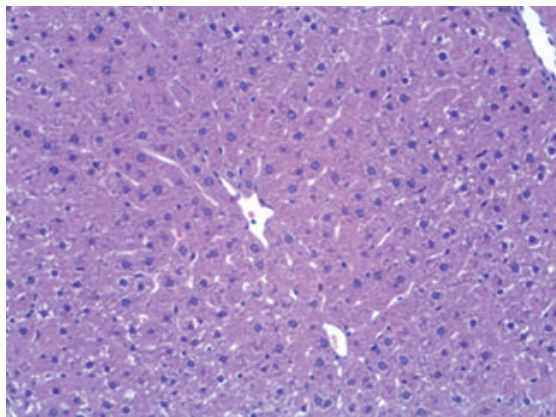
4.1.4. Резултати от изследване на групата плъхове хранени с ВФД и прием на Алопуринол.

Макроскопска находка:

Черният дроб е кафявочервен на цвят, с нормална форма и плътност. Капсулата е гладка и опъната. Срезната повърхност е със запазен делчест строеж. Средното тегло е 3.32 % от средното телесно тегло за групата (+ 0.08).

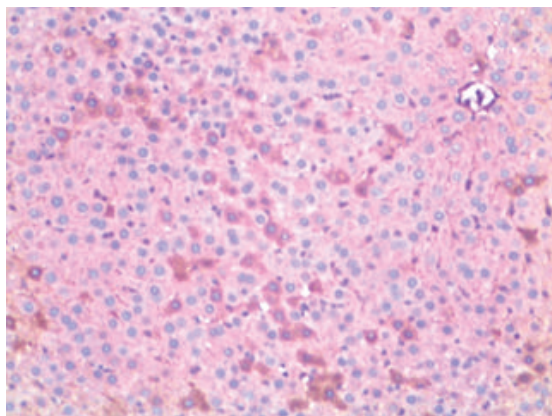
Хистологично изследване:

Чернодробните клетки са с полигонална форма, еозинофилна цитоплазма и централно разположени везикуларни ядра с нуклеоли. (фиг.33). Липсват възпалителни клетки в чернодробния паренхим и порталните пространства, както и данни за мастна дегенерация. Не се откриват апоптотични хепатоцити.



Фиг. 33. Черен дроб на плъх при групата на ВФД и Алопуринол. Оцветяване с хемалаун-еозин (x 200).

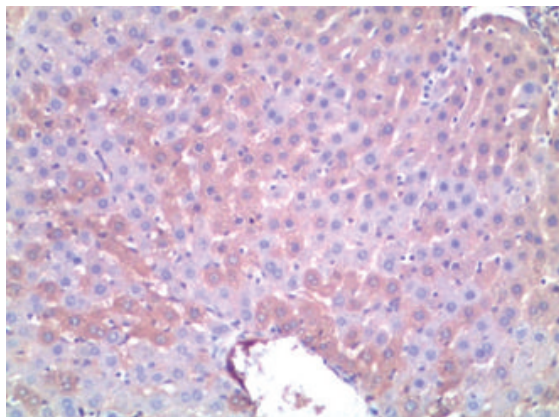
Имунохистохимично изследване:



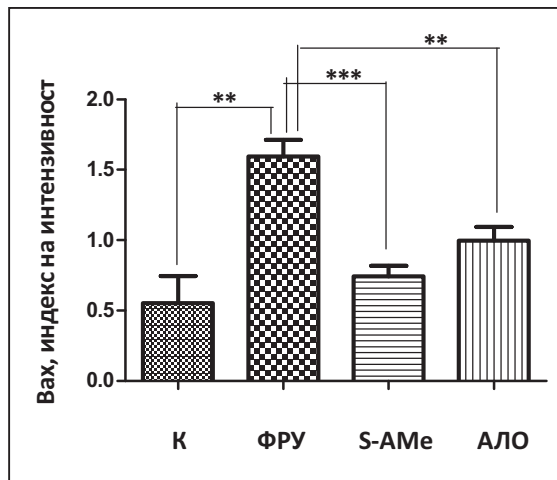
Фиг. 34. Имунохистохимично изследване на Вах протеина в черен дроб на плъх-група на ВФД и Алопуринол.

В групата на ВФД и Алопуринол, Вах протеина се експресираща предимно в синусоидалните клетки и единични хепатоцити. В хепатоцитите преобладава умерена степен на интензивност на реакцията- ИИР с 38% по-ниска спрямо групата на ВФД (фиг. 36), локализирана основно в ци-

топлазмата на хепатоцитите в междинната зона (фиг. 34).



Фиг. 35. Имунохистохимично изследване на Bcl2 протеина в черен дроб на плъх-група на ВФД и Алопуринол.

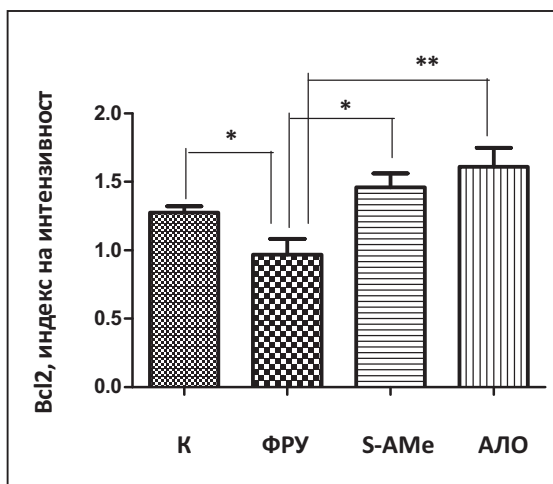


Фиг. 36. Индекс на интензивност на реакцията (ИИР) на про- апоптотичният Вах протеин в експерименталните групи (\pm SEM; $n=7$): К- контролна; ФРУ- на ВФД; S-AMe- на ВФД и прием на S- аденозилметионин; АЛО- на ВФД и прием на Алопуринол.

В групата на ВФД и Алопуринол, Bcl 2 протеина се експресираща основ-

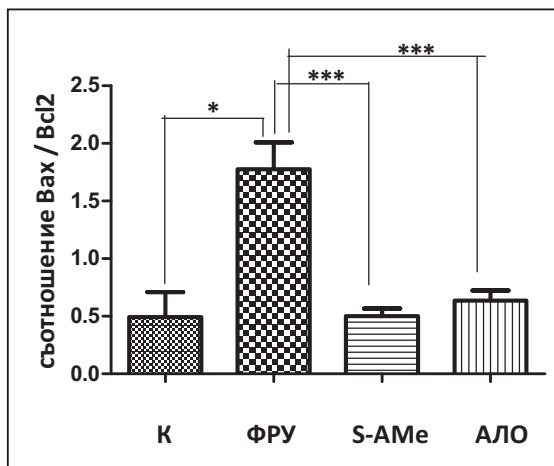
но в хепатоцитите. Преобладават клетките с умерена степен на интензивност на реакцията- ИИР с 67% по- висока спрямо групата на ВФД (фиг. 37), локализирана главно в цитоплазмата на чернодробните клетки от всички зони (фиг. 35).

Резултатите показват най- висок ИИР на Вах протеин в групата на ВФД- с 190% по- висока от контролната група. В групите на лечение със S-АМе и Алопуринол се наблюдава намален ИИР- съответно с 54% и 38% по- нисък спрямо групата на ВФД и близък до тези на контролата, (фиг. 36).



Фиг. 37. Индекс на интензивност на реакцията (ИИР) на анти- апоптотичният Bcl 2 протеин в експерименталните групи (\pm SEM; n=7): К- контролна; ФРУ- на ВФД; S-АМе- на ВФД и прием на S- аденозилметионин; АЛО- на ВФД и прием на Алопуринол.

Резултатите показват най- висок ИИР на Bcl 2 протеина в групата на Алопуринол- с 67% по- висок спрямо групата на ВФД и с 30% спрямо контролата. В групата на лечение със S-АМе се наблюдава по-висок ИИР- съответно с 52% спрямо групата на ВФД и близък до този на контролата. В гупата на ВФД, ИИР е с 25% по- нисък от този на контролата, (фиг. 37).

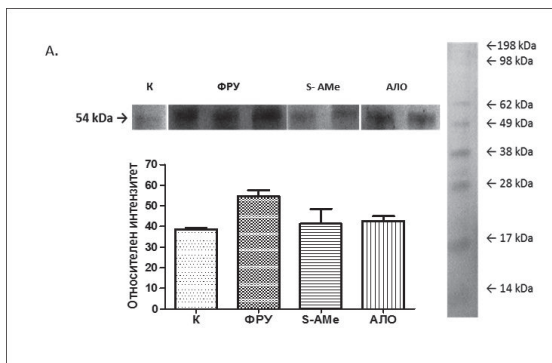


Фиг. 38. Промени в съотношението на експресията на Вах/Vсl2 протеините в експерименталните групи (\pm SEM; n=7): К- контролна; ФРУ- на ВФД; S-АМе- на ВФД и прием на S- аденозилметионин; АЛО- на ВФД и прием на Алопуринол.

Резултатите показват значително повишено съотношение Вах/Vсl2 в ФРУ групата ($p < 0,01$) спрямо контролата. Докато в групите на S-АМе ($p < 0,001$) и АЛО ($p < 0,001$), съотношението Вах/Vсl2 е значимо по-ниско спрямо групата на ВФД и със стойности близки до изходните на контролата (фиг. 38).

4.1.5. Определяне на нивата на СК 18 в хомогети от черен дроб.

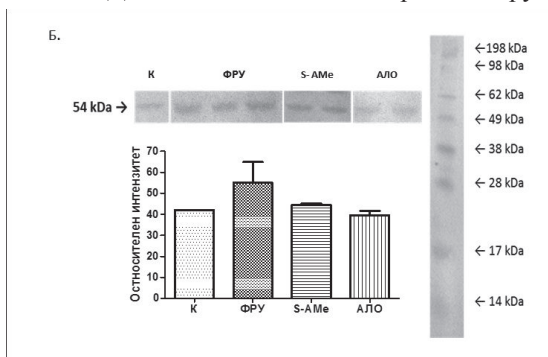
Резултатите показват значително повишени нива на чернодробния СК18 в ФРУ ($p < 0,01$) спрямо контролата. В групите третирани със S-АМе ($p < 0,01$) и Алопуринол ($p < 0,01$) се наблюдава значително намаление на СК18 спрямо групата на ВФД, които достигат нивата на контролната група (фиг. 39).



Фиг. 39. Имуноблот (Western blot) за определяне на наличие на СК 18 в хомогенат от черен дроб- А. (N=7); К- контролна; ФРУ- на ВФД; S-АМе- на ВФД и прием на S-АМе; АЛО- на ВФД и прием на Алопуринол.

4.1.6. Определяне на нивата на СК 18 в серуми.

Резултатите показват значително повишени серумни нива на СК18 в ФРУ ($p < 0,01$) спрямо контролата. В групите третирани със S-АМе ($p < 0,01$) и Алопуринол ($p < 0,01$), се наблюдава значително намаление на СК18 спрямо групата на ВФД до нива близки на контролната група (фиг.40).



Фиг. 40. Имуноблот (Western blot) за определяне на наличие на СК18 в серуми (Б.) (N=7); К- контролна; ФРУ- на ВФД; S-АМе- на ВФД и прием на S-АМе; АЛО- на ВФД и прием на Алопуринол

4.1.7. Изследване на някои биохимични показатели на чернодробна дисфункция при високо- фруктозна диета и прием на S-AMe и Алопуринол.

Изследвани бяха серумните аланин-аминотрансфераза (АЛАТ), аспарат-аминотрансфераза (АСАТ) и гама-глутамил-транспептидаза (ГГТП). Резултатите показват статистически незначителни промени на АСАТ, АЛАТ и ГГТП в четирите изследвани групи, табл. 3.

Таблица 3. Биохимични показатели на чернодробна функция.

Групи Ензими	К	ФРУ	S- AMe	АЛО
АСАТ	130,3 (10,5)	128,1 (7,9)	133,2 (5,3)	126,4 (2,87)
АЛАТ	70,7 (4,9)	57,04 (5,7)	55,62 (2,5)	52,5 (4,5)
ГГТП	0,32 (0,2)	0,23 (0,01)	0,1 (0,07)	0,2 (0,02)

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (N=7). К-контролна група; ФРУ- група на ВФД; S-AMe- група на ВФД и прием на SAM; АЛО- група на ВФД и прием на Алопуринол.

4.1.8. Регресионен модел за изследване на функционални зависимости между маркери на апоптоза, оксидативен стрес и възпаление в групата на ВФД.

В регресионния модел предикторите (факторите) обуславящи нивата на СК18 в черния дроб на групата на ВФД са серумните нива на TNF α и чернодробните нива на GSH (А). В следствие на установените асоциационни (корелационни) връзки между предикторните променливи и СК18, регресионният анализ бе тестван, за да установи магнитута и тежестта на всеки един фактор от модела върху СК18 (Б). Анализа показва, че променливите в модела имат силно комплексно влияние върху чернодробните нива на СК18. Предиктивността на модела е висока $R = 0.9.$, т.е 90% от повишените нива на СК18 в черния дроб се обяснява с действието на факторите (TNF α и GSH) в модела. По-голямо влияние върху нивата на СК18 имат

серумните нива на TNF α (0.92) от чернодробните нива на GSH (0,659).

Таблица 4. Регресионен анализ на изследвани маркери на апоптоза, оксидативен стрес и възпаление в групата на ВФД.

A.

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	4058.139	2	2029.070	13.797	.031 ^b
	Residual	441.194	3	147.065		
	Total	4499.333	5			

a. Dependent Variable: CK18_liv

b. Predictors: (Constant), TNF α , GSH, B

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.988 ^a	.975	.938	7.46557

a. Predictors: (Constant), TNF α , GSH, B

Б.

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-47.169	16.063		-2.936	.061
	GSH	.538	.155	.659	3.462	.041
	TNF α	.409	.085	.920	4.835	.017

a. Dependent Variable: CK18_liv

Легенда: CK18_liv-нива на апоптотичния маркер CK18 в черен дроб; TNF α провъзпалителен маркер; GSH-маркер на оксидативен стрес.

4.2. ДИСКУСИЯ

4.2.1. Оценка на степента на стеатоза.

Една от проявите на висцералното затлъстяване е натрупването на ТГ в черният дроб и развитието на чернодробна стеатоза (Abdelmalek, Diehl, 2007). Стеатозният черен дроб е ранен етап в НМЧБ, който може да прогресира до стеатохепатит и чернодробна цироза. (Samuel et al., 2004). Нашите данни показват умерена степен на дребнокапчестта стеатоза в

групата на ВФД в сравнение с контролата. Точните механизми отговорни за прекомерното натрупване на ТГ в неадипозни тъкани все още не са изяснени. Акумулирането на липиди в хепатоцитите може да се реализира чрез един или повече от следните механизми: повишено натрупване на СМК, повишен синтез на ТГ, намалено β - окисление, или намаляване на чернодробният експорт на триглицериди като VLDL.

През последните години обект на изследване е връзката между висцералната мастна тъкан и мастна дегенерация в черния дроб. Стеатозата на черният дроб е свързана не само с повишеното освобождаване на СМК, но и с възпалителни цитокини и намалена продукция на адипонектин от мастната тъкан. Отдавна е известно, че адипонектина чрез потискане на продукцията на провъзпалителни медиатори и засилване на β - окисление на СМК, играе протективна роля срещу стеатозата. ВФД обаче предизвиква ОС в адипоцитите чрез повишено образуване на АФК и пикочна киселина, за която е доказано, че понижава секрецията на адипонектин (Xu A, et al., 2003). Следователно при ВФД намалената продукция на адипонектин стимулира освобождаването на провъзпалителни медиатори, инсулинова резистентност и повишено натрупване на ТГ в черния дроб.

От друга страна, в черния дроб хиперинсулинемията активира експресията на SREBP-1, водещо до транскрипционно активиране на всички липогенни гени за превръщането на излишната глюкоза в СМК. Последница от повишеният синтез на СМК е увеличеното производство на малонил-CoA, който потиска транспорта на СМК в митохондриите, съответно тяхното окисление и по този начин ги пренасочва към синтез на ТГ. Nagai, Nishio et al., (2002) установяват, че при плъхове на ВФД е потисната експресията на транскрипционния фактор PPAR α . Активирането на PPAR α индуцира пероксизмалното и митохондриално β -окисление, следователно намалената му активност може да доведе до намаляване на липидното окисление и също

натрупване на липиди в клетките (Dreyer et al., 1992). Взети заедно, тези процеси в условията на понижен чернодробен експорт на триглицериди, водят до повишено им отлагане в хепатоцитите, което вероятно е причина за развитието на стеатоза в групата на ВФД (Zou et al., 2006).

Друг механизъм за интрахепатално акумулиране на ТГ е нарушеният транспорт на липиди, който зависи от оптималните съотношения в хепатоцитите на наситени/ненаситени СМК и фосфатидилхолин/фосфатидилетаноламин (ФХ/ФЕ). В групата на ВФД ние установихме подобно и на други автори, значително повишаване на съотношението наситени/ненаситени СМК спрямо контролата (Walker et al., 2011). Вероятната причина за това е както загубата на ненаситените, така и увеличеното натрупване на наситени мастни киселини. Нивата на ненаситените мастни киселини намалява поради активиране на липидното им перокисление, за което говорят установените от нас високи нива на МДА в тази група спрямо контролата.

Известно е, че пероксидацията на ненаситените мастни киселини засилва ЕР стрес, нарушава нормалната секреция на ApoB (необходим за секрецията на VLDL), съответно екскреция на VLDL, което вероятно също допринася за натрупването на ТГ в черният дроб на групата на ВФД (Pan et al. 2004).

От друга страна, увредената чернодробна VLDL секреция може да се дължи и на загуба на източници за синтезата на метионин и холин, които са прекурсори на фосфатидилхолина. Известно е, че нормалното съотношение на ФХ/ФЕ е ключов регулатор в интегритета на клетъчната мембрана и изчерпването на ФХ може да промени трафика на протеини и натрупването на липиди. Това се потвърждава от клиничните изследвания на пациенти с неалкохолен стеатохепатит, които също са били с понижено съотношение ФХ/ФЕ в сравнение със здрави индивиди (Li et al., 2006). Мишки, хранени с холин-дефицитна (CD) диета развиват за кратко време

стеатохепатит и чернодробна недостатъчност (Vance et al., 2007). Установено е, че намалената биосинтеза на ФХ в миши черен дроб засилва SREBR-1 протеолитичното отцепване, активира генната експресия за биосинтеза на холестерол, липиди и образуване на липидни капчици, когато клетъчният капацитет за метилиране на фосфатидилетаноламин и синтеза на фосфолипиди е ограничен (Walker et al., 2011).

Нивата на ФХ и синтезата на фосфолипиди се понижават под действието на хепатотоксини като алкохол, вируси, богата на мазнини или фруктоза диета и др., при които се развива ОС със загуба на GSH, увреждане на някои метилтрансферази, водещи до хроничен дефицит на метионин и S-АМе (Vance et al., 2007). В настоящото изследване за първи път е доказан про-тективният ефект на S-АМе върху фруктозо-индуцираното акумулиране на липиди в черния дроб. Антистеатозното му действие вероятно е свързано както с екстрахепаталните му ефекти върху липогенезата (описани в предходните части), така и с възстановеното образуване на ФХ, при което се подобрява секрецията на липопротеини, VLDL и тяхната екскреция.

Според Nakagawa et al. (2006), Алопуринолът намалява отлагането на липиди в хепатоцитите като потиска продукцията на АФК и ПК, инсулинова резистентност и повишена липогенеза. Следователно S-АМе и Алопуринол ограничават стеатозата и по-нататъшното увреждане на черния дроб от ОС и нискостепенно възпаление.

За разлика от третирането с S-АМе и Алопуринол, при групата на ВФД бяха отчетени високи стойности на серумните ТГ и VLDL на фона на микровезикуларна стеатоза в черният дроб. Fabbrini et al. (2008) установяват, че секрецията на VLDL е два пъти по-висока при пациенти със стеатоза. Скоростта на тази секреция е изцяло зависима от приноса на СМК и следователно интрахепаталното съдържание на липиди се явява най-значимия независим предиктор за повишената VLDL-ТГ секреция и инсу-

линова резистентност (Fabbrini et al., 2009). В настоящето проучване ние установихме значително по-високо ниво на серумните VLDL в групата на ВФД, както и високи нива на чернодробните СМК паралелно с наличието на стеатоза. Поради това е възможно, прекомерното отлагане на липиди в черния дроб при фруктозо-индуцираната стеатоза, да не е само маркер за метаболитна дисфункция, но също така да допринася за увеличената VLDL-ТГ секреция и повишените нива на ТГ в плазмата, която се наблюдава при пациентите с НМЧБ и метаболитен синдром.

4.2.2. Апоптотични маркери при фруктозо-индуциран метаболитен синдром и хепатопротективния ефект на S-AMe и Алопуринол.

Промени в експресията на про-апоптотичния Вах и анти-апоптотичния Bcl-2 протеини в черен дроб.

Данни от литературата показват, че апоптозата се очертава като основен вид клетъчна смърт, която стимулира прогресията на чернодробните увреждания при НМЧБ, но механизмите индуциращи апоптотичния процес са все още неизяснени (Ferreira et al., 2011). Предполага се, че основни характеристики на метаболитния синдром като затлъстяване и инсулинова резистентност, които повишавайки продукцията на провъзпалителни цитокини, СМК и АФК, предизвикват митохондриална дисфункция и апоптоза в стеатозния черен дроб. (Browning, Horton. 2004). В подкрепа на това е, че част от пациентите с неалкохолна чернодробна стеатоза и метаболитни аномалии развиват прогресивно стеатохепатит, при които активността на заболяването корелира с активиране на апоптоза в чернодробните клетки (Chalasani et al., 2004).

В нашето проучване беше изследвана експресията на апоптотичните маркери от Bcl2 семейство протеини (проапоптотичен Вах и антиапоптотичен Bcl2) с цел да се установи зависимост между активираните апоп-

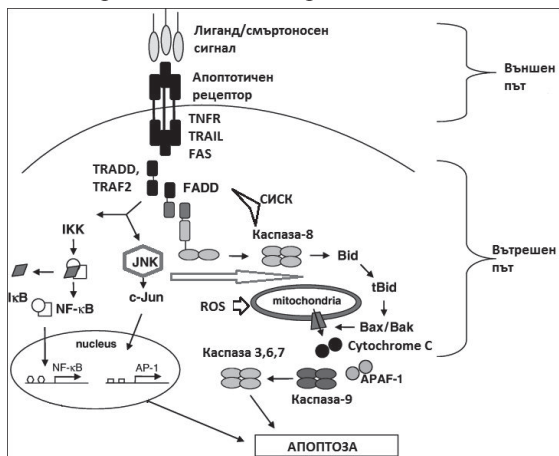
тотични процеси, степента на морфологичните промени в черния дроб, маркерите на оксидативен стрес, възпаление и чернодробна дисфункция при експериментален модел на метаболитен синдром. Резултатите след 16-седмично обременяване на плъхове с ВФД показаха промени в степента на хепатоцитната експресия на Bcl2 семейство протеини, както и промени в съотношението между тях (Bax/ Bcl2 протеини) спрямо контролната група и групите третирани с S-АМе и Алопуринол, като интензивността на имунохистохимичната реакция не показва специфична зоналност по отношение на чернодробното делче.

Активирането на апоптозата може да настъпи по два основни сигнални пътя: рецептор-зависим (външен) и независим (вътрешен) тип и двата от които се обединяват от митохондриалната дисфункция. Семейството Bcl-2 протеини, състоящо се от проапоптотични и антиапоптотични членове са важни медиатори и на двата процеса и като такива определят оцеляването или смъртта на клетките (Richard et al., 2009). Инициаторите на клетъчна смърт водят до потискане активността на антиапоптотичният протеин Bcl-2, който удължава клетъчното оцеляване като блокира апоптозата, а увеличават активността на проапоптотичния Bax протеин (Guicciardi and Gores, 2005). Това води до промени в съотношението на Bax/ Bcl2 протеините, транслокация на Bax протеина от цитозола към външната митохондриална мембрана, митохондриална дисфункция, повишаване пропускливостта на митохондриалната мембрана и освобождаване на фактори като цитохром P450, които активират апоптотични пътища на загиване на клетките. В нашият модел на метаболитен синдром ние установихме, че експресията на про-апоптотичния Bax протеин е повишена в хепатоцитите едновременно с увеличено съотношение в експресията на Bax/ Bcl2 протеините спрямо контролната група, което е показателно за дисбаланс между протеините в семейството на Bcl-2 и активиране на апоптотични

процеси на клетъчна смърт. Нашите резултати потвърждават проучвания на други изследователи, които демонстрират висока степен на хепатоцитна апоптоза, дължаща се на промените в съотношението на Bax/ Bcl2 в полза на проапоптотичния Bax протеин (Ehrmann et al., 2000). Данните от литературата показват, че причина за повишената експресия на Bax протеина е активиране както на външният рецептор- зависим апоптотичен сигнален път- чрез Fas, TNFR1 и TRALL рецептори, така и от вътрешният- чрез активиране на JNK или директно на проапоптотичните Bcl-2 протеини (Bim, Bax и др.). Причина за това са най-често смъртоносни сигнали индуцирани от нарушения в клетъчния редокс баланс, провъзпалителни медиатори, наситени СМК и т.н. (фиг.41).

Schattenberg JM et al. (2006) установяват, че АФК и наситените СМК повишават експресията на проапоптотичния Bax чрез активиране на JNK. Нашите резултати показват също повишени нива на МДА, наситени СМК и ниски нива на редуциран глутатион в черния дроб на плъховете на ВФД, което е показателно за това, че апоптозата се активира по вътрешният рецептор-независим път. Увреждането на митохондриите от липидните пероксиди води до тежка недостатъчност от митохондриален редуциран глутатион, което в условията на хроничен оксидативен стрес прави невъзможно възстановяването му. Повишените окислителни процеси нарушават митохондриалният редокс-баланс, което е причина за увреждане на протеини, липиди и ДНК, водещи до митохондриална дисфункция. Проявата на синергичен ефект върху активацията на JNK сигналният път от изчерпването на митохондриалния редуциран глутатион и повишените пероксиди като МДА е установен в стеатозния черен дроб при експериментални животни и пациенти с НМЧБ (Czaja, 2007). Следователно, липидните пероксиди генерирани при ВФД не са просто пасивен маркер на оксидативния стрес в черния дроб, но и действителен медиатор на клетъчни увреждания, който понижавайки нивата на редуцира-

ния глутатион, активират апоптотични процеси.



Фиг. 41. Сигнални пътища на активиране на апоптоза. Свързването на съответния лиганд и рецептор под действието на инфламаторни цитокини, СМК, АФК и др. предизвиква активиране на протеини, които формират СИСК- смърт-индуциращ сигнален комплекс. Активираната каспаза-8 разцепва Bid протеина, а той от своя страна активира проапоптотичните членове на Bcl-2 семейство- Bax/Bak. Активирането на IKKs и фосфорилиране на IκB води до освобождаване на NF-κB и активиране синтеза на TNF-α. Активирането на JNK/C-Jun/AP-1 задейства два сигнални пътя: на синтез на проинфламаторни фактори и активиране на апоптозата. JNK активира апоптозата директно (по външния път) или паралелно със АФК (ROS) се включва като инициатор на вътрешния сигнален апоптотичен път чрез Bax протеина.

Индукцията на апоптоза от повишените наситени СМК е също ключова характеристика на НМЧБ и корелира с прогресивно възпаление и фиброза. Данните от изследване на Malhi et al.(2006) показват, че наситените мастни киселини също индуцират JNK-зависима хепатоцитна апоптоза чрез активиране на проапоптотични Bid-Bax протеини от вътрешния сигнален път (Malhi et al., 2006)). Следователно в нашето изследване, на товарването с фруктоза активира рецептор-независимия сигнален път на хепатоцитна апоптоза чрез повишаване нивата на циркулиращите наситени и de novo синтезирани СМК, липидните пероксиди, понижени нива на

GSH в черният дроб и повишено акумулиране на липиди в хепатоцитите.

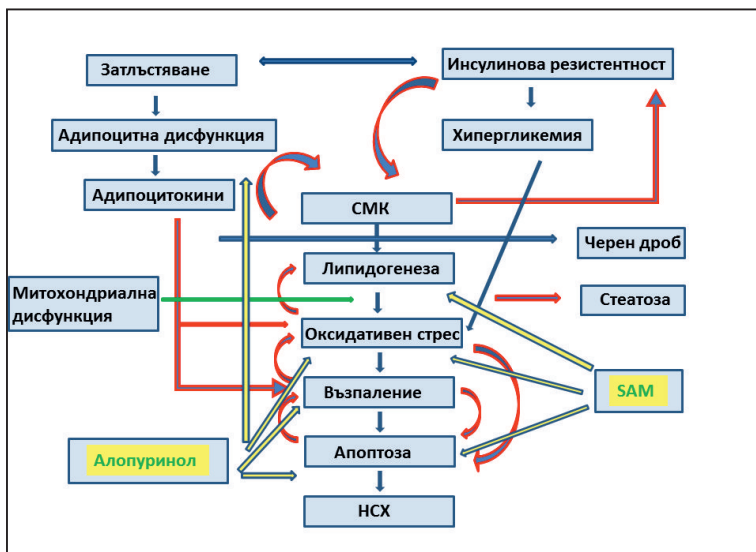
От друга страна, апоптозата може да бъде активирана и по външния рецептор-зависим път чрез Fas лиганда, TNFR1 и TRALL рецептори (виж фиг. 41). Доказано е, че повишени серумни нива на TNF- α (Zhang et al., 2010) и наситените СМК, могат да индуцират апоптоза чрез свързване със съответните мембранни рецептори в „смърт индуциращ сигнален комплекс“, активиращ каталитичната активност на ефекторни каспази (Schwabe et al., 2004). Повишена експресия и на трите вида рецептори са открити в чернодробни проби от пациенти със стеатохепатит, които положително корелират със серумните нива наситените СМК и TNF- α (Malhi et al., 2007; Bechmann et al., 2013). В нашето проучване също установихме увеличени нива на TNF- α и наситени СМК. Следователно стеатозните хепатоцити в условията на оксидативен стрес проявяват рецептор-зависима и независима клетъчна смърт, които се обединяват от митохондриалната дисфункция и вероятно един от механизмите доминира в определен етап от развитието на тъканната увреда при метаболитния синдром.

В прогресията към стеатохепатит се смята, че хроничният оксидативен стрес играе ключова роля (Kurose et al., 1997). В това отношение, допълнителното повишаване на телесното тегло и дисфункцията на висцералната мастна тъкан вероятно се превръщат в основен патологичен фактор, който стимулира чернодробната инсулинова резистентност, *de novo* липогенезата и интрахепатално отлагане на липиди. От една страна това е свързано с изчерпването на редуциращи еквиваленти необходими за възстановяването на антиоксидантните ензими (Ribeiro et al., 2004). От друга страна, директното действие на наситените СМК, предизвикващи липидна пероксидация променят клетъчния редокс-баланс и метаболизъм в хепатоцитите, които водят до клетъчна дисфункция и смърт.

Крайният изход от развитието на заболяването зависи от баланса меж-

ду апоптотичните и антиапоптотични възможности на хепатоцитите, което предполага, че антиоксидантната терапия в това отношение би имала хепатопротективно действие- виж фиг. 42.

Анализът от нашите резултати показва, че в механизма на развитие на хепатоцитната апоптоза при ВФД, най- важните предиктори са серумните нива на TNF-а и чернодробните нива на GSH. Това допълнително се подкрепя и от факта, че приложението на антиоксиданти в нашия модел, инхибира апоптозата и по този начин протектира оцеляването на хепатоцитите. Експресията на Вах протеина беше значително намалена от приемът на S-АМе и Алопуринол, а на Bcl-2 повишена, като съотношението Вах/Bcl2 беше понижено в полза на антиапоптотичния Bcl-2 протеин в сравнение с групата на ВФД и контролната група животни, паралелно с намаленото тегло на ретроперитонеалната мастна тъкан и нива на наситените СМК, TNF- α и МДА и повишени нива на редуцирания глутатион. Известно е, че свръхекспресията на антиапоптотичните протеини може да позволи на увредените клетки да оцелеят в условията на различни хепатотоксични въздействия (Levine et al., 2008). Освен това те служат като сензори за интегриране на смърт или сигнали за оцеляване на нивото на митохондриите и балансът между про- и антиапоптотичните протеини, както и техните взаимодействия, определят дали митохондриите са пермеабилizирани (Guicciardi, Gores, 2005). Това означава, че защитата от екзогенно внесените S-АМе и Алопуринол включват подобряване на митохондриалната функция, чрез повишаване нивата на редуцирания глутатион и намаляване на липидните пероксиди и АФК, нивата на наситените СМК и TNF α .



Фиг. 42. Механизми на хепатопротекция свързани с въздействието на S-Аме (SAM) и Алопуринол върху фруктозо-индуцираните метаболитни разстройства. Адицитната дисфункция при затлъстяване е водещ патологичен фактор, който стимулира чернодробната инсулинова резистентност, de novo липидогенезата и интрахепатално отлагане на липиди. Активирането на оксидативен стрес и нискостепенно възпаление в стеатозния черен дроб провокира прогресията на НМЧБ чрез индуциране на апоптоза в хепатоцитите. Приемът на S-Аме и Алопуринол редуцира оксидативния стрес, повишава антиоксидантната защита, намалява нивото на провъзпалителните медиатори и стеатоза и по този начин допринася за оцеляването на хепатоцитите в условията на хронично фруктозно натоварване. СМК-свободни мастни киселини; НСХ-неалкохолен стеатохепатит.

Независимо, че нашите изследвания представят за първи път влиянието на S-Аме и Алопуринола върху фруктозо-индуцираната чернодробна апоптоза, тези данни са сравними с получени при други модели. При алкохол-индуцирана хепатотоксичност на мишки, Wang et al.(2008), установяват че прилагането на S-Аме протектира срещу оксидативния и нитрозативен стрес като намалява повишените нива на TNF- α и индуцируемата NO синтаза, както и потискане на JAK- активирана клетъчна смърт (Wang

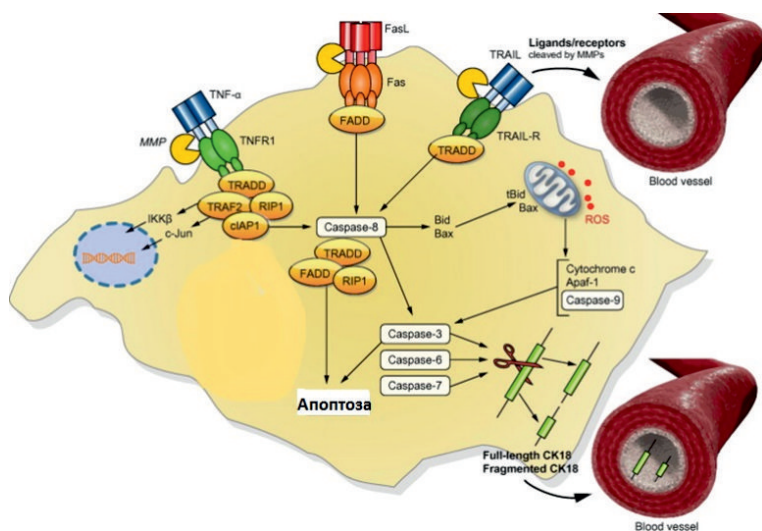
et al., 2008). Това обяснява и антиапоптотичното и хепатопротективно действие на Алопуринола установено в нашето проучване. Освен, че потиска образуването на АФК индуцирани от ксантинооксидазата, намалението на продукцията на пикочна киселина също допринася за инхибиране на нитрозативния стрес, който е водещ в окислителните увреждания на митохондриалните мембрани.

Промени в нивата на СК-18 протеина в черен дроб и серуми.

Идентифицирането на апоптозата като критичен посредник в прогресията на обикновената стеатоза в стеатохепатит при НМЧБ е важно, тъй като позволява разработването на неинвазивни биомаркери и лекарствена терапия, както и възможност за предотвратяване на заболяването в обратим стадий. Установено е, че СК18- протеина е повишен при различни форми на остри и хронични чернодробни увреждания (Yilmaz. 2009) виж фиг. 43. Плазмените нива на СК18 проявяват чувствителност в 78% и специфичност в 87% от случаите, което ги прави надежни биомаркери на клетъчна смърт (Miyasato et al., 2014).

Резултатите от нашето проучване показват значително повишение на СК-18 в черния дроб на животните на ВФД спрямо контролната група и корелират положително със серумните му нива. Данните подкрепят други проучвания, които показват, че степента на хепатоцитна апоптоза може да се оценява от серумните измервания нивата на СК-18, защото са значително повишени при пациенти с неалкохолен стеатохепатит в сравнение с пациенти с обикновена стеатоза или здрави контроли. Освен това, Feldstein et al.(2009) показват, че плазмените нива на СК-18 са значително по- високи при пациенти с доказан неалкохолен стеатохепатит от чернодробни биопсии и корелират с тежестта на заболяването. Нашето проучването показва, че въпреки липсата на промени във функционалните пока-

затели на чернодробно увреждане (АСАТ, АЛАТ, ГГТП) в етапа на развитие на мастна дегенерация в черния дроб на животните хранени с ВФД, експресията на Вах протеина е значително увеличена и тясно свързана с повишението на СК-18 в чернодробните хомогенати и серума. От друга страна, повишените серумни нива на СК-18 протеина във група на ВФД и съответствието им с хистологичните и биохимични промени в черния дроб, доказват ключовата роля на апоптозата в патогенезата на индуцираното от ВФД увреждане на черния дроб при плъхове.



Фиг. 6. Основни пътища на активиране на апоптозата в неалкохолния стеатозен черен дроб свързани с освобождаването на СК18. Смъртоносните сигнали посредством TNFR1, Fas и TRAIL рецептори по клетъчната повърхност отключват каскада от реакции за синтез на протеини, които самостоятелно (чрез иницираща каспаза 8) или чрез Вах протеина (Bid/Bax вътрешен сигнален път) активират ефекторните каспази-3,6 и 7, които реализират клетъчната смърт. Клетъчното освобождаване на СК 18 фрагменти в извънклетъчното пространство възниква като следствие от каспаза-разграждане по време на междинен етап на апоптозата и по този начин могат да служат като маркери за клетъчната смърт.

В настоящото изследване, експресията на Вах протеина беше значително намалена, от приемът на S-АМе и Алопуринол, което съвпада и с чернодробните и серумни нива на СК-18 в тези групи. Това предполага факта, че серумните нива на СК18 може да се използват не само като биомаркер за неинвазивна оценка на чернодробните увреждания и тяхната прогресия при метаболитен синдром, но и за ефекта от приложената терапия.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящата разработка за първи път са проучени основни патофизиологични механизми на чернодробни увреждания свързани със затлъстяването, оксидативния стрес, възпалението и апоптоза при високо-фруктозна диета на плъхове и прием на S-АМе и Алопуринол.

Създаден е експериментален модел с ВФД, който моделира метаболитни нарушения като затлъстяване, хипергликемия, дислипидемия и хиперурикемия, съответстващи на критериите за диагностика на метаболитния синдром при хора. Това от една страна определя съществената роля на високо-фруктозната диета за спонтанната проява на синдрома (за разлика от генетичните модели) и характеризира значението на хранителните фактори за развитието на затлъстяване и инсулинова резистентност, както и последващи метаболитни аномалии-дислипидемии, оксидативен стрес, нискостепенно възпаление, мастна дегенерация на черния дроб и апоптоза. От друга страна, резултатите подсказват установената от други автори роля на храненето за епигенетичните промени включени в регулацията на чернодробният глюкозен и липиден метаболизъм, някои от които са замесени в развитието и прогресирането на НМЧБ. Това прави експерименталният модел с ВФД иновативен по отношение на епигенетичните механизми и предлага нови перспективи за изследване на патогенезата на чернодробните увреждания, откриване на диагностични биомаркери и терапевтични стратегии за НМЧБ.

Резултатите от нашето проучване показват убедителни доказателства, че при фруктозо-индуциран метаболитен синдром оксидативният стрес и нискостепенното системно възпаление са във функционална връзка с активираните апоптотични процеси в стеатозния черния дроб, което предполага, че апоптозата е доминиращ механизъм на клетъчна смърт при

неалкохолен мастен черен дроб. Тези данни представят убедителни доказателства за необходимостта от разработване и търсене на биомаркери за неинвазивно изследване на активността на апоптозата и мониторирането ѝ още в най-ранни етапи на чернодробна увреда.

Нашите данни показват, че затлъстяването и дисфункцията на висцералната мастна тъкан са основен патологичен фактор за интрахепатално отлагане на липиди и оксидативен стрес. Увеличената висцерална мастна тъкан е основен източник на повишена продукция на TNF α и експорт на СМК към черния дроб, които стимулирайки чернодробната инсулинова резистентност, de novo липогенеза и изчерпване на антиоксидантния капацитет на хепатоцитите предизвикват тъканни увреждания.

В нашето проучване за първи път се установи въздействието на S-АМе и Алопуринол върху цитозащитата на хепатоцитите в условията на фруктозо-индуцираните метаболитни разстройства. Резултатите показват селективно действие на S-АМе и Алопуринол върху оксидативния стрес и производството на липиди, което протектира чернодробните клетки срещу клетъчна смърт и последващи увреждания.

За разлика от други известни антиоксиданти, нашите данни показват, че S-АМе проявява антиоксидантно, антистеатозно и антиапоптотично действие, като благоприятното влияние върху липидния метаболизъм в черния дроб е значимо по-изразено от това на Алопуринола. Все повече доказателства сочат, че дисрегулацията на енергийния метаболизъм при НМЧБ е свързана и с епигенетични механизми на увреда, зависещи от адекватната биосинтеза на S-АМе, която е потисната при чернодробни увреждания. Следователно, екзогенния внос на S-АМе в нашият експеримент вероятно проявява хепатопротективно действие и чрез епигенетични промени в регулацията на чернодробния липиден метаболизъм. Тези данни представляват съществен интерес за нас и са предмет на нашите

бъдещи проучвания.

Резултатите от настоящото проучване показват, че защитният ефект на Алопуринола срещу продукцията на пикочна киселина и ксантинооксидаза-зависимото производство на АФК го прави конкурентен по отношение на антиоксидантната активност на S-АМе (а вероятно и спрямо други антиоксиданти). В групата на лечение с Алопуринол са установени по-ниски нива на МДА и по-високи нива на GSH спрямо групата приемаща S-АМе. Това предполага, че продуцирането на АФК от ксантинооксидазата е от съществено значение за фруктозо-индуцирания оксидативен стрес и нивата на пикочната киселина са значимо свързани с неалкохолния мастен черен дроб.

На базата на представените резултати може да се направи заключение, че апоптозата е съществен фактор в развитието и прогресирането на неалкохолния мастен черен дроб при ВФД, а оксидативния стрес и системното възпаление се очертават като основни звена в патофизиологичните механизми на клетъчни увреждания и смърт. Доказаният антиоксидантен, антилипидемичен, антистеатозен и хепатопротективен ефект на S-АМе и Алопуринол, разкрива нови възможности за терапевтично повлияване на свързаните със затлъстяването и инсулинова резистентност метаболитни нарушения.

VI. ИЗВОДИ

1. Високо-фруктозната диета приложена на плъхове предизвиква метаболитни нарушения, които отговаря на основните критерии за диагностика на МС при хора.
2. Промените в чернодробното съдържание на СМК са важен показател за адипоцитна дисфункция, инсулинова резистентност, повишена липидогенеза и оксидативен стрес при ВФД.
3. Апоптозата е доминиращ механизъм на клетъчна смърт при системно нискостепенно възпаление, оксидативни увреждания и мастна дегенерация на черния дроб индуцирани от ВФД.
4. Установена е функционална връзка между оксидативният стрес и нискостепенното системно възпаление и активираните апоптотични процеси в стеатозния черния дроб.
5. Прилагането на S-АМе и Алопуринол предотвратява фруктозо-индуцираните метаболитни нарушения при плъхове, потиска системният възпалителен отговор, ограничава оксидативните процеси и мастна дегенерация в черния дроб.
6. Приложението на S-АМе и Алопуринол при ВФД проявява селективен ефект: влиянието на S-АМе върху липидният метаболизъм е значимо по-изразено от Алопуринола, докато ефектите на Алопуринола върху оксидативния стрес са значимо по-изразени от тези на S-АМе.
7. Приложението на S-АМе и Алопуринол инхибира активираните апоптотични процеси и по този начин протектира оцеляването на хепатоцитите в условията на фруктозо-индуцираните оксидативни и метаболитни тъканни увреждания.

VII. ПРИНОСИ

1. С ТЕОРЕТИЧЕН ХАРАКТЕР.

1. За първи път у нас се проучва връзката между стеатоза и апоптоза в черния дроб на експериментални животни подложени на високо-фруктозната диета и лечение с S-АМе и Алопуринол.
2. За първи път се установява функционална връзка между активираните апоптотични процеси в стеатозния черен дроб и нивата на проинфламаторният серумен TNF- α и чернодробните нива на редуцираният глутатион при фруктозо-индуциран модел на метаболитен синдром.

2. С ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР

1. Индуцираните от високо-фруктозната диета метаболитни нарушения при плъхове- затлъстяване, хипергликемия, дислипидемия и хиперурикемия съответстват на критериите за оценка и диагностика на метаболитния синдром при хора, което прави експерименталния модел приложим за изследване на различните аспекти от метаболитния синдром, както и разработването на терапевтични средства за лечение и профилактика.
2. За първи път е установен хепатопротективен ефект от прилагането S-АМе върху фруктозо-индуцираните увреждания в черния дроб, чрез редуциране на оксидативния стрес, липидогенеза, екстрахепаталното отлагане на липиди и потискане на апоптотичните процеси което го прави приложим при пациенти със различна степен на чернодробни увреждания.

3. Проявените антиоксидантни ефекти на Алопуринола върху фруктозо-индуцираните повишено телесно тегло, оксидативен стрес в черния дроб и серум, системно възпаление и апоптоза показват неговият потенциал като средство за лечение не само на хиперурикемия, но и на други компоненти на метаболитния синдром като затлъстяване, дислипидемии и НМЧБ.
4. Съответствието на нивата на СК-18 с хистологичните и биохимични промени в черния дроб на експерименталните животни го определят като подходящ биомаркер за неинвазивна оценка на степента на чернодробните увреждания, тяхната прогресия и ефекта от прилагането на терапии при НМЧБ в експериментални и клинични условия.
5. Съвместно с научната лаборатория на катедрата по химия (МУ- Варна) е разработен метод за качествено и количествено определяне на мастни киселини (от С:10 до С:22) в биологична проба (чернодробен хомогенат и серум) чрез газов хроматограф с масдетектор. Методът е високо-чувствителен и подходящ за изследване на неестерифицирани и естерифицирани мастни киселини на триглицеридни и фосфолипидни фракции, което го прави приложим в експерименталната и клинична практика.
6. Разработена е и модифицирана методика за определяне на глутатион-пероксидазна и редуктазна активност и общ редуциран глутатион в биологични проби (чернодробен хомогенат и серум).
7. За първи път у нас е разработен имунологичен метод (Western blot) за неинвазивно изследване на активността на апоптотичните процеси в черен дроб чрез серумните нива на СК-18.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. ПУБЛИКАЦИИ

1. Bratoeva K, Bekyarova G, Kiselova Y, Radanova M, Ivanova D. Metabolic changes in experimental model of metabolic syndrome-induced by high- fructose diet in rats. Scripta Scientifica Medica, 2010;42 (4), 233-235.
2. Bratoeva K, Bekyarova G. Effect of extract of selected Bulgarian herbs (HA-1) on high fructose diet- induced hepatic injury in rats. Archives of the Balkan Medical Union,2011; 46 (4), 107-111.
3. Камелия Братоева, Иван Щерев, Мария Цанева, Ганка Бекярова. Оксидативен стрес и механизъм на хепатоцитно оцеляване при фруктозо-индуцирана чернодробна стеатоза. Наука и младост- сборник научни съобщения от конкурсна сесия 2013 г.,1: 199-203.
4. Bekyarova G, Bratoeva K, Bekyarov N. Uric acid and vascular disorders in metabolic syndrome. Cardiovascular Diseases 2013,44(1), 40-44.

2. УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Uric Acid as Biomarker of Metabolic syndrome. K. Bratoeva, G. Bekyarova, Y. Kiselova, M. Radanova, D. Ivanova. 9- ти Международен симпозиум по затлъстяване и съпътстващи заболявания, май 2011год., Албена, България.
2. Inflammatory response and oxidative stress in development of nonalcoholic fatty liver disease. Bratoeva K., Bekyarova G., Tsaneva M., Radanova M. 10- ти Национален конгрес по физиологични науки, Варна, 6-9 октомври 2011.

3. The role of s-adenosylmethionine and allopurinol as protectors of fructose- induced metabolic abnormalities. Bratoeva K, Shterev I, Bekyarova G, Tsaneva M. 32nd Balkan Medical Week, 21-23. September 2012. Nis, Serbia.
4. Оксидативен стрес и механизъм на хепатоцитно оцеляване при фруктозо-индуцирана чернодробна стеатоза. Камелия Братоева, Иван Щерев, Мария Цанева, Ганка Бекярова. Конкурс „Наука и младост“ 18-20 април 2013 г. МНД „Асклепий“ МУ- Пловдив.
5. Influence of S- adenosylmethionine in fructose-induced hepatic injuries. Bratoeva K, Bekyarova G, Tsaneva M. ECO 2014, 21st European Congress on Obesity, May 28-31, Sofia, Bulgaria. Obesity Facts 2014;7(1), 173.
6. Protection against nonalcoholic liver injury, induced by high fructose diet by attenuating oxidative stress, inflammatory response and apoptosis. Bekyarova G, Bratoeva K, Tzaneva M, Atanassova M. 34 Balkan Medical Week, September 2014. Bucuresti, Romania.
7. Apoptotic biomarkers in nonalcoholic fatty liver disease, induced by high-fructose diet. Kameliya Bratoeva, Mariya Radanova, Ganka Bekyarova, Mariya Tsaneva. Юбилейна научна конференция „ Наука за здраве“, 20-25 май 2015г. МУ-Пловдив. Folia Medica 2015; 57; (1), 35.

БЛАГОДАРЯ

на всички, които допринесоха този труд да се осъществи:

- научните ръководители доц. д-р Ганка Бежарова и доц. д-р Мария Цанева за изключителната и непрекъсната подкрепа, както и високия професионализъм, с които ми съдействаха през всички етапи от работния процес;

- проф. Мона Станчева за предоставената възможност за обучение и работа в ръководената от нея научна лаборатория по хроматографски анализ към катедрата по химия на МУ Варна;

- гл. асистент Албена Мерджанова за съдействието, помощта и ценните съвети по отношение на работата свързана с хроматографския анализ;

- гл. асистент Мария Раданова от Катедра по биохимия, молекулярна медицина и нутригеномика, МУ- Варна за съдействието, помощта и ценните съвети по отношение на изработването на имунологичните и биохимични анализи;

- колегите от УНС-патофизиология, МУ-Варна към Катедра Физиология и патофизиология,

както и на

МОЕТО СЕМЕЙСТВО ЗА ПОДКРЕПАТА И ОБИЧТА!