

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р П. СТОЯНОВ“ – ВАРНА
ФАКУЛТЕТ „МЕДИЦИНА“
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И КЛИНИЧНА ФАРМАКОЛОГИЯ И ТЕРАПИЯ

Клементина Мончева Монева-Маринова

Фармакологично проучване
на ефектите на плодов сок
от *Chaenomeles maulei* в
експериментален модел на
метаболитен синдром

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен

„ДОКТОР“

по докторска програма „Фармакология, вкл. фармакокинетика и химиотерапия“

Научен ръководител: Проф. д-р Стефка Василева Вълчева-Кузманова, д.м.н.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрен съвет на Катедрата по фармакология и клинична фармакология и терапия при Медицински университет – Варна, състояло се на 29.01.2024г. и е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:

- 1. Доц. д-р Силвия Ганчева Маринова, д.м.*
- 2. Проф. д-р Галя Цветанова Ставрева-Маринова, д.м.*
- 3. Проф. д-р Румен Павлов Николов, д.м.*
- 4. Доц. д-р Мария Делчева Желязкова-Савова, д.м.*
- 5. Доц. д-р Делян Пенев Делев, д.м.*

Дисертационният труд съдържа общо 123 страници, онагледен е с 30 фигури и 13 таблици. Книгописът включва 187 заглавия.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 25.04.2024г. от 10.00ч. в онлайн платформа на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Материалите по защитата са публикувани на интернет-страницата на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

Съдържание

Списък на често използвани съкращения.....	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	9
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	11
1. Материали.....	11
1.1. Експериментални животни.....	11
1.2. Плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i>	11
2. Модели и методи.....	12
2.1. Експериментален модел на метаболитен синдром.....	12
2.2. Фракциониране на тъкани и органи.....	13
2.2.1. Получаване на кръвен серум.....	13
2.2.2. Изолиране на органи за хистопатологично изследване.....	13
2.3. Биохимични изследвания.....	13
2.3.1. Определяне нивата на триглицеридите.....	13
2.3.2. Определяне нивата на общия холестерол.....	14
2.3.3. Определяне нивата на глюкозата.....	14
2.3.4. Определяне нивата на супероксид дисмутаза.....	14
2.3.5. Определяне нивата на реагиращи с тиобарбитуровата киселина субстанции.....	15
2.4. Определяне на индекси на мастната тъкан.....	15
2.5. Определяне на TyG индекс.....	15
2.6. Определяне на чернодробен индекс.....	15
2.7. Хистологични изследвания.....	16
2.8. Поведенчески методи.....	16
2.8.1. Метод за оценка на двигателната активност – Тест открито поле (Open field test, OFT).....	16
2.8.2. Методи за изследване на тревожността.....	16
2.8.2.1. Тест повдигнат кръстосан лабиринт (Elevated plus-maze test, EPM).....	16
2.8.2.2. Тест за изследване на социалното взаимодействие (Social interaction test, SIT).....	17
2.8.3. Метод за оценка на пространствената памет – Тест за местоположение на предмети (Object location test, OLT).....	17
2.8.4. Метод за оценка на депресивно поведение – Тест за принудително плуване (Forced swim test, FST).....	18
2.9. Статистически методи.....	18
IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	19
1. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху енергийния метаболизъм, общото телесно тегло и върху висцералното затлъстяване.....	19

1.1. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху енергийния метаболизъм.	19
1.2. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху общото телесно тегло.....	21
1.3. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху висцералното затлъстяване.....	22
1.4. Обсъждане.....	25
2. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху липидния профил.....	28
2.1. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху нивата на триглицеридите.....	28
2.2. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху нивата на общия холестерол.....	29
2.3. Обсъждане.....	29
3. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху глюкозната толерантност и върху инсулиновата резистентност.....	32
3.1. Глюкозо-толерантен тест.....	32
3.2. TyG индекс.....	33
3.3. Обсъждане.....	34
4. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху биохимични маркери на антиоксидантна защита и оксидативен стрес.....	37
4.1. Ефекти върху нивата на супероксид дисмутаза.....	37
4.2. Ефекти върху нивата на субстанции, реагиращи с тиобарбитуровата киселина.....	38
4.3. Обсъждане.....	39
5. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> в хистопатологично изследване на миокард и коронарни съдове.....	42
5.1. Резултати.....	42
5.2. Обсъждане.....	43
6. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> в хистопатологично изследване на черен дроб и върху чернодробния индекс.....	47
6.1. Резултати от хистопатологията.....	47
6.2. Резултати от чернодробния индекс.....	48
6.3. Обсъждане.....	50
7. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> в хистопатологично изследване на мастна тъкан.....	53
7.1. Резултати.....	53
7.2. Обсъждане.....	54
8. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху поведението.....	56
8.1. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху двигателната активност в тест открито поле.....	56
8.2. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху нивата на тревожност.....	58
8.2.1. В тест повдигнат кръстосан лабиринт.....	58
8.2.2. В тест за социално взаимодействие.....	61
8.3. Ефекти на плодов сок от <i>Chaenomeles maulei</i> върху пространствената памет в тест за разположение на предмети.....	62

8.4. Ефекти на плодов сок от Chaenomeles maulei върху депресивната симптоматика в тест с принудително плуване	64
8.5.Обсъждане.....	65
9. Обобщена дискусия.....	69
V. ИЗВОДИ.....	73
VI. ПРИНОСИ.....	76
VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА В НАУЧНИ ФОРУМИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	78
1. Списък на публикациите.....	78
2. Списък на участията в научни форуми.....	78

Списък на често използвани съкращения

AGEs – advanced glycation end products, крайни продукти на напреднало гликиране

BMI – body mass index, индекс на телесното тегло

EPM – elevated plus maze, повдигнат кръстосан лабиринт

FOXO1 – forkhead box protein O1

FST – forced swim test, тест с принудително плуване

GAE – gallic acid equivalents, еквиваленти на галова киселина

GLUT4 – glucose transporter protein type-4, глюкозен транспортен протеин тип 4

HDL – high density lipoproteins, липопротеини с висока плътност

HOMA-IR – homeostasis model assessment of insulin resistance, хомеостатичен модел за оценка на инсулиновата резистентност

IRS-1 – insulin receptor substrate-1, инсулин рецептор субстрат-1

LDL – low density lipoproteins; липопротеини с ниска плътност

LOX – lipoxygenase, липоксигеназа

MCP-1 – monocyte chemoattractant protein-1, моноцитен хемоатрактантен протеин-1

miRNAs – микроРНКи

MMP – matrix metalloproteinase, матриксна металопротеиназа

NFκB – nuclear factor kappa B, нуклеарен фактор капа би

OFT – open field test, тест открито поле

OLT – object location test, тест за разпознаване на предмети

PAMPs – pathogen-associated molecular patterns, патоген-асоциирани молекулни модели

PCSK9 – proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, пропротеин конвертаза субтилизин/кексин тип 9

PEPCK – phosphoenolpyruvate carboxykinase, фосфоенолпируват карбоксикиназа

PGC-1α - peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha

PTP1B – protein tyrosine phosphatase 1B, протеин тирозин фосфатаза 1B

RAGEs – receptors for advanced glycation end products, рецептори за крайни продукти на напреднало гликиране

SIT – social interaction test, тест за социално взаимодействие

SREBP-1c – sterol regulatory element-binding protein 1c, стерол регулаторен елемент-свързващ протеин-1c

TBARS – субстанции, реагиращи с тиобарбитуровата киселина

TIMP – tissue inhibitor of metalloproteinase, тъканен инхибитор на металопротеиназа

TLRs – toll-like receptors, toll-подобни рецептори

TNF- α - tumor necrosis factor alpha, тумор некрозис фактор алфа

VLDL – very low density lipoproteins, липопротеини с много ниска плътност

АМПК – аденозин монофосфат-активирана протеин киназа

ГТТ – глюкозо-толерантен тест

МС – метаболитен синдром

НМЧБ – неалкохолна мастна чернодробна болест

ПСХМ – плодов сок от *Chaenomeles maulei*

РААС – ренин ангиотензин алдостеронова система

СОД – супероксид дисмутаза

I. Въведение

Хилядолетия преди утвърждаването на науката такава, каквато я познаваме днес, медицинските растения са заемали основна част в превенцията и терапията на редица заболявания. Емпиричното познание за техните благоприятни свойства постепенно получава потвърждение чрез съвременните медиколабораторни и диагностични похвати. Развитието на методи като високоефективната течна хроматография и течна хроматография/мас спектрометрия значително подобрява хоризонтите на фитохимичните изследвания (Marelli, 2021). Думата за лекарство на английски език – drug – произхожда от френската дума *drogue* – буквално преведено „изсушена билка“. Въпреки напредъка на методи за синтетично създаване на лекарствени молекули, медицинските растения запазват значението си като източник на лекарства, като обикновено се ползват с по-голямо доверие от пациентите и добър профил на безопасност.

Множеството данни за благоприятния ефект на полифенолите в превенцията на социално-значими заболявания и обещаващите резултати от големи епидемиологични проучвания подчертават необходимостта от допълнителни изследвания на тяхното влияние в спектъра на метаболитния синдром.

В общество, в което очакваната продължителност на живота расте, каквато е световната тенденция през последните десетилетия, значението на хроничните заболявания нараства. Впечатляваща част от тях протичат под егидата на метаболитния синдром или се асоциират с него.

Към семейство Rosaceae принадлежат около 3000 растения с икономическа и медицинска стойност, включително ябълка, ягода, малина, круша, праскова, слива, бадем, череша (Soundararajan et al., 2019). По-малко известни представители са тези от рода *Chaenomeles*, ценени заради декоративните си качества и заради медицинското си значение. Части от растението японска дюля са използвани от хилядолетия в традиционната източна медицина с различна терапевтична цел. Малко от описаните биологични ефекти са намерили научно потвърждение. Към днешна дата обаче интересът към потенциалните ползи за човешкото здраве от приложението на този климатоустойчив и икономически изгоден растителен вид нараства стремглаво.

Позиционирането на плодовите сокове в препоръките за здравословно хранене е актуален и противоречив въпрос. Рестрикциите произхождат от факта, че плодовият сок е източник на свободни захари, които в отсъствието на фибрите, съдържащи се в целия плод, водят до бързо покачване на кръвната захар. От друга страна, регулярната консумация на плодов сок в клинични проучвания с кратка до средна продължителност, се очертава като диетична интервенция, повлияваща благоприятно съдовата функция, кръвното налягане и когнитивните способности (Ruxton et al., 2021). Систематичен обзор и мета-анализ на връзката между дневния прием на плодов сок и МС открива U-образна асоциация, подчертавайки протективната роля на умерената консумация (Ruxton et al., 2021). В проспективно кохортно проучване с 34 560 участници консумацията на плодов сок до 7 чаши седмично се асоциира със значително намален риск от сърдечносъдови заболявания, вкл. хронична сърдечна недостатъчност, а консумацията до 8 чаши седмично – с намален риск от инсулт (Sheffers et al., 2019). Храненето се смята за модифицируема детерминанта и на когнитивното здраве. Консумацията на 100% плодов сок се асоциира с 16-19% по-ниска честота на тревожност (Agarwal et al., 2022).

Настоящият труд има за цел да изследва биологичните ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в експериментален модел на метаболитен синдром и да очертае потенциала за използване на сока с превантивна и лечебна стойност.

II. Цел и задачи

Имайки предвид известните досега ефекти на растенията от рода *Chaenomeles*, както и на установените активности на полифенолите, които са основен компонент в състава им, си поставихме за **ЦЕЛ**:

Фармакологично проучване на ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в експериментален диетично-индуциран модел на метаболитен синдром при опитни животни.

За постигане на тази цел си поставихме следните **ЗАДАЧИ**:

1. Да се получи експериментален модел на метаболитен синдром при плъхове чрез използване на високомазнинна високофруктозна диета, като се регистрира наличието или отсъствието на следните критерии за метаболитен синдром:

- 1.1. Висцерално затлъстяване
- 1.2. Дислипидемия
- 1.3. Нарушен глюкозен толеранс

2. В експериментален модел на метаболитен синдром да се изследват ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху:

- 2.1. Висцерално затлъстяване
- 2.2. Биохимични маркери на енергийния метаболизъм:
 - 2.2.1. Серумни липиди
 - 2.2.2. Глюкозна регулация
- 2.3. Биохимични маркери на антиоксидантна защита и оксидативен стрес:
 - 2.3.1. Супероксид дисмутаза
 - 2.3.2. Субстанции, реагиращи с тиобарбитуровата киселина
- 2.4. Поведенчески индекси за:

2.4.1. Локомоторна активност

2.4.2. Тревожност

2.4.3. Пространствена памет

2.4.4. Депресивно състояние

2.5. Хистологични промени в:

2.5.1. Миокард и коронарни артерии

2.5.2. Черен дроб

2.5.3. Мастна тъкан

III. Материали и методи

1. Материали

1.1. Експериментални животни

В опитите са използвани мъжки плъхове от порода Wistar със средно начално тегло при започване на експеримента 270 ± 30 г. Животните са отглеждани в групи по 5 в пластмасови клетки, разположени в добре вентилирани помещения, при постоянна стайна температура от $22 \pm 1^\circ\text{C}$. Подложени са на 12-часов цикъл светлина/тъмнина и имат неограничен достъп до храна и вода.

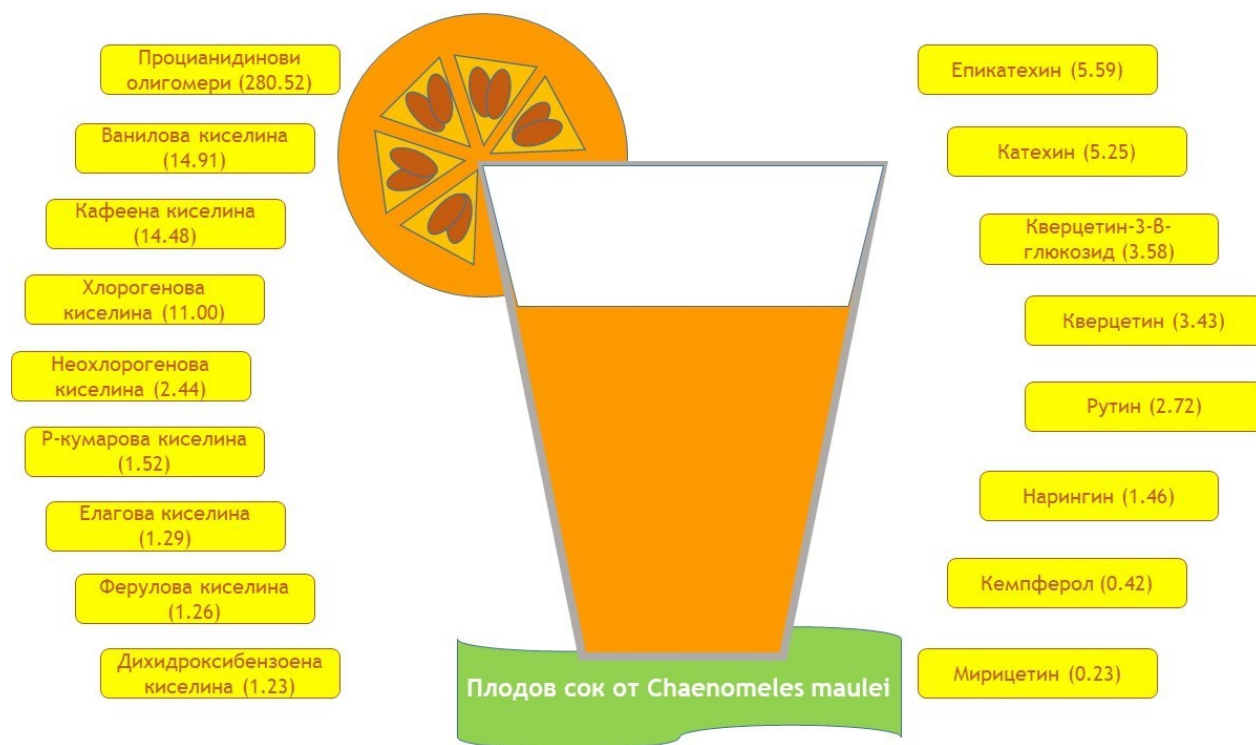
Всички процедури и манипулации, касаещи опитните животни, са проведени в съответствие с директивите на Европейския съюз и са одобрени от Българската агенция по безопасност на храните (Разрешително №177/07.07.2017г.).

1.2. Плодов сок от *Chaenomeles maulei*

За целите на проучването е използван плодов сок от *Chaenomeles maulei* (ПСХМ) в три различни дози. Той е приготвен от свежи плодове, брани на ръка, в узряло състояние, които са смлени и филтрирани. Полученият сок е консервиран с калиев сорбат (1.0 g/l) и е съхраняван при 0°C до използването му в експеримента.

Съставът на полифенолни субстанции в ПСХМ е установен от екипа на Valcheva-Kuzmanova (2018) и е представен схематично на **Фигура 1**. Общото количество полифеноли е представено като еквиваленти на галовата киселина и е определено като 890 мг/100 мл. Проантоцианидините са 253.29 мг/100 мл. Процианидиновите олигомери са установени като катехинови еквиваленти. От фенолните киселини в най-голяма концентрация се срещат ванилова, кафеена и хлорогенова киселина, последвани от неохлорогенова, п-кумарова, елагова, ферулова и 2,4-дихидроксibenзоена киселина. Сред флавоноидите преобладават епикатехин, катехин, кверцетин-3- β -глюкозид, кверцетин и рутин, а в по-малко количество се срещат нарингин, кемпферол и мирицетин. Установени са органични киселини (мг/100 мл) – ябълчена (3647.0), хибинова (1034.0), лимонена (51.0), шикимова (30.0), аскорбинова (22.0) и оксалова (17.0). Вг्लехидратите (мг/100 мл)

в сока са представени от глюкоза (1713.0), фруктоза (1237.0), галактоза (320.0), сукроза (189.0), ксилоза (35.0), рамноза (18.0), арабиноза (8.0).



Фигура 1. Полифеноли (мг/100 мл) в състава на плодovия сок от *Chaenomeles maulei*, установени от Valcheva-Kuzmanova et al. (2018).

Изследвана е и антиоксидантната активност на ПСХМ, изчислена като 18167.8 ± 938.8 микромола еквиваленти на галовата киселина на литър чрез тест за капацитет за предотвратяване на образуване на хидроксилни радикали и 84401.4 ± 1934.2 микромола тролокс еквиваленти на литър чрез тест за абсорбционен капацитет на кислородния радикал (Valcheva-Kuzmanova et al., 2018).

2. Модели и методи

2.1. Експериментален модел на метаболитен синдром

Петдесет зрели мъжки плъха, отглеждани във вивариума към Медицински университет Варна, са разделени на пет групи по десет животни: Контрола, МС, МС+ПСХМ2.5, МС+ПСХМ5 и МС+ПСХМ10. В продължение на десет седмици контролната група

получава стандартна лабораторна диета и питейна вода на свободен достъп, а другите четири групи са подложени на високомазнинна високофруктозна диета – 17% свинска мас и 17% фруктоза, добавени към стандартната диета – и 10% фруктозен разтвор вместо питейна вода с цел индуциране на метаболитен синдром. При така предоставената диета животните от контролната група получават 279 ккал/100 г храна, а тези на високомазнинна високофруктозна диета – 405 ккал/100 г храна и 40 ккал/100 мл от фруктозния разтвор. Всички животни се третират ежедневно с гъвкава орогастрална сонда. Групи Контрола и МС получават дестилирана вода, а останалите три групи – ПСХМ във възходящи концентрации (съответно 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг). Изборът на дози за приложение в модела на МС е направен въз основа на опита на Борисова-Ненова, Ефтимов и Вълчева-Кузманова (2016, 2017, 2018, 2019, 2023), където същите дози доказват своята безопасност и проявяват биологична активност при здрави плъхове. Ежедневно е измервано количеството храна и вода, което животните консумират, а теглото им е проследявано ежеседмично.

2.2. Фракциониране на тъкани и органи

2.2.1. Получаване на кръвен серум

В края на 10^{та} седмица от експеримента опитните животни са подложени на анестезия с диетилов етер, след което е взета кръв от сублингвалните вени и така получените епруветки с кръв са центрофугирани при 2000 оборота за 10 мин. Отделен е серум, който е съхраняван при температура -20 °С до момента на провеждане на биохимичните изследвания.

2.2.2. Изолиране на органи за хистопатологично изследване

Тъканни късчета от черен дроб, миокард и мастна тъкан са фиксирани в 10 % неутрален буферизиран формалин.

2.3. Биохимични изследвания

2.3.1. Определяне нивата на триглицеридите

Нивата на триглицеридите са изследвани в кръвен серум с китове на BioMaxima S.A., Poland, като са спазвани инструкциите на производителя. Методът се базира на хидролиза

на триглицеридите до глицерол и мастни киселини от ензима липопротеинлипаза. При последващото фосфорилиране на глицерола с АТР от глицеролкиназа се получава глицерол-3-фосфат и АDP. Глицерол-3-фосфатът се окислява до дихидроксиацетонфосфат и водороден пероксид, който при свързването си с 4-хлорофенол и 4-аминоантипирин води до получаването на оцветен комплекс. Интензивността на цвета се измерва фотометрично при дължина на вълната 500 nm. За разчитане на резултатите е използван спектрофотометър AURIUS 2021 (Cecil Instruments Ltd., UK).

2.3.2. Определяне нивата на общия холестерол

Нивата на общия холестерол са изследвани в кръвен серум с китове на BioMaxima S.A., Poland, като са спазвани инструкциите на производителя. Методът се базира на хидролиза на холестероловите естери до холестерол и свободни мастни киселини от ензима холестеролестераза. При последващото окисление на свободния холестерол се освобождава водороден пероксид, който се свързва с фенол и 4-аминоантипирин, и води до получаването на оцветен комплекс. Интензивността на цвета се измерва фотометрично при дължина на вълната 500 nm. За разчитане на резултатите е използван спектрофотометър AURIUS 2021 (Cecil Instruments Ltd., UK).

2.3.3. Определяне нивата на глюкозата

За провеждане на глюкозо-толерантния тест (ГТТ) след 12-часово гладуване експерименталните животни са инжектирани интраперитонеално с 40%-ен разтвор на глюкоза в доза 2 г/кг. За измерване на кръвната захар са използвани глюкомер ACCU-CHEK Performa и тест ленти ACCU-CHEK Performa. На всяко животно е извършена инцизия в дисталния край на опашката по метода на Fluttert et al. (2000) непосредствено преди инжектирането с глюкоза и 30, 60 и 90 минути след това с цел вземане на кръвната проба.

2.3.4. Определяне активността на супероксид дисмутаза

За определяне активността на антиоксидантния ензим супероксид дисмутаза е използван ELISA кит (Boster Bio, Pleasanton, CA, USA). Методът се базира на тетразолиева сол за детекция на супероксиден радикал. Супероксид дисмутазата катализира дисмутацията на супероксиден анион до молекулен кислород и водороден пероксид. Концентрацията на

ензима, необходима за 50 % дисмутация на супероксидния радикал, се определя като една единица супероксид дисмутаза. Резултатите са разчетени посредством спектрофотометър AURIUS 2021 (Cecil Instruments Ltd., UK).

2.3.5. Определяне на реагиращи с тиобарбитуровата киселина субстанции

За определяне на реагиращи с тиобарбитурова киселина субстанции (TBARS) в серума към него е добавян 0.8 % разтвор на тиобарбитурова киселина, пробите са инкубирани за 2 часа на водна баня на 95 °C, а след това са охладени до стайна температура (Ohkawa et al., 1979). За стандарт е използван малонов диалдехид. С помощта на спектрофотометър AURIUS 2021 (Cecil Instruments Ltd., UK) е отчитана оптичестката плътност на пробите. TBARS са измервани в nmol/ ml.

2.4. Определяне на индекси на мастната тъкан

Дисекирана е ретроперитонеалната, мезентериалната, паранефралната и перигонадната мастна тъкан. Претеглено е всяко от мастните депа поотделно. За общата мастна тъкан, както и за всяко от мастните депа, е изчислен индекс по следната формула:

$$\text{Индекс на мастната тъкан} = \frac{\text{Тегло на мастната тъкан}}{\text{Общо телесно тегло}} \times 100$$

2.5. Определяне на TuG индекс

Триглицеридно глюкозният индекс е иновативен маркер за оценка на инсулиновата резистентност. Той е определен по формулата:

$$\text{TuG} = \text{Ln} \frac{\text{Триглицериди на гладно} \left(\frac{\text{МГ}}{\text{ДЛ}}\right) \times \text{Глюкоза на гладно} \left(\frac{\text{МГ}}{\text{ДЛ}}\right)}{2}$$

2.6. Определяне на чернодробен индекс

Чернодробният индекс е определен по следната формула:

$$\text{Чернодробен индекс} = \frac{\text{Тегло на черен дроб}}{\text{Телесно тегло}} \times 100$$

2.7. Хистологични изследвания

Фиксираните във формалин тъканни късчета от черен дроб, сърце и висцерална мастна тъкан са включени в парафинови блокчета. Срези с дебелина 5 микрометра са подложени на оцветяване с хематоксилин/еозин. За извършване на хистологична оценка е използвана светлинна микроскопия.

2.8. Поведенчески методи

2.8.1. Метод за оценка на двигателната активност – Тест открито поле (Open field test, OFT)

Апаратът за тест открито поле представлява дървена арена (100x100 см) със стени с височина 40 см боядисана в бяло (Hall et al., 1932). Подът на апарата е разделен чрез сини линии на 25 квадрата с еднакви размери. Всеки плъх се поставя индивидуално в центъра на арената и поведението му се наблюдава в продължение на 5 минути. Регистрират се брой хоризонтални движения (брой на квадратите, пресечени от четирите лапи на животното), брой вертикални движения (изправяне на задните лапи), времето, прекарано в централната област (вътрешните девет квадрата на арената) и броят влизания в централната област (когато и четирите лапи на животното са преминали през линията). След всяка тестова сесия арената се почиства с 95 % етанол и се оставя да изсъхне, за да се премахне миризмата на предходното животно и да се предотврати изменение на спонтанното поведение на следващото. Броят хоризонтални и вертикални движения служат като маркер за двигателната активност на гризачите, а времето, прекарано в централната област и броят влизания в нея могат да бъдат тълкувани като показател за нивото на тревожност.

2.8.2. Методи за изследване на тревожността

2.8.2.1. Тест повдигнат кръстосан лабиринт – Elevated plus-maze test (EPM)

Апаратът за тест повдигнат кръстосан лабиринт (Handley and Mithani, 1984) се състои от две отворени и две затворени рамена, свързани с централна платформа. Лабиринтът е повдигнат на 50 см височина от пода. Всеки плъх се поставя индивидуално върху централната платформа с лице към едно от отворените рамена. Поведението му се

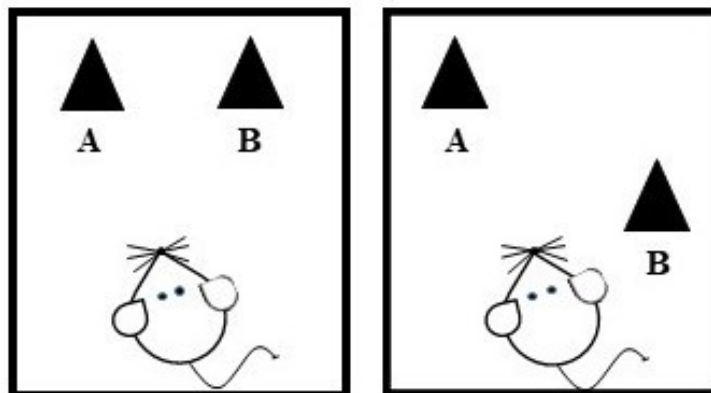
наблюдава в продължение на 5 минути. Регистрират се брой влизания в отворените рамена, време, прекарано в отворените рамена, брой влизания в затворените рамена и време, прекарано в затворените рамена. Изчисляват се съотношенията брой влизания в отворените към брой влизания във всички рамена и време, прекарано в отворените, към време, прекарано във всички рамена.

2.8.2.2. Тест за изследване на социалното взаимодействие – Social interaction test

Тестът се извършва в арената за OFT (File and Hyde, 1978). Два плъха със сходно телесно тегло и с еднакво третиране, но отглеждани в различни клетки и непознати помежду си, се поставят едновременно в противоположни ъгли на полето и се наблюдава поведението им в продължение на пет минути. Регистрира се времето на активно социално взаимодействие, което включва следене, подушване, боричкане, прескачане или минаване под другото животно. Пасивното пребиваване в близост до или допирайки се до другото животно не се регистрира. Времето, прекарано в активно социално взаимодействие, се тълкува като инверсен показател за нивото на тревожността на гризачите.

2.8.3. Метод за оценка на пространствената памет – Тест за местоположение на предмети – Object location test (OLT)

Тестът за разпознаване на местоположението на предмети се извършва в арена с размери 65x45x40 см. Експерименталната постановка е представена схематично на **Фигура 2**. Тестът се състои от две сесии с интервал от 30 минути между тях. В арената се поставят два предмета (А и В). Те са с еднаква големина, форма и цвят и са стабилно закрепени за полето, така че да не могат да бъдат премествани от животните. По време на първата сесия на плъха се позволява свободно да проучва арената и предметите в продължение на 3 минути. По време на втората сесия (също с продължителност от 3 минути) един от предметите (В) е поставен на различно място. Времето, прекарано в проучване на преместения предмет (В), и времето, прекарано в проучване на непреместения предмет (А), се регистрират. Изчислява се дискриминационният индекс $V/(A+B)$.



Фигура 2. Експериментална постановка на тест за местоположение на предмети и оценка на пространствената памет.

По-високи стойности на дискриминационния индекс се тълкуват като подобрене на пространствената памет.

2.8.4. Метод за оценка на депресивно поведение – тест за принудително плуване Forced swim test (FST)

Тестът за принудително плуване, известен още като тест на Porsolt (Porsolt et al., 1977), се извършва в стъклен цилиндър с диаметър от 17 см и височина от 50 см. Той се пълни с топла (30°C) вода до ниво 30 см – достатъчно за да не позволява на животното да се докосва до дъното със задните си лапи или с опашка и да бъде принудено да плува. Две сесии се провеждат през два последователни дни с интервал от 24 ч помежду им. Всеки плъх се поставя индивидуално в цилиндъра за период от 5 минути и се засича времето, прекарано в неподвижност. То се тълкува като показател за безнадеждност/отчаяние и свидетелства за наличие на депресивно-подобна симптоматика.

2.9. Статистически методи

Статистическият анализ е извършен чрез GraphPad Prism Software 5.00. Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната стойност (Mean \pm SEM). Използвани са еднофакторен вариационен анализ one-way ANOVA с последващ Dunnett's Multiple Comparison Post Test, както и student's t-test. Стойност на $p < 0.05$ е считана за статистически значима.

IV. Собствени резултати и обсъждане

1. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху енергийния метаболизъм, върху общото телесно тегло и върху висцералното затлъстяване

1.1. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху енергийния метаболизъм

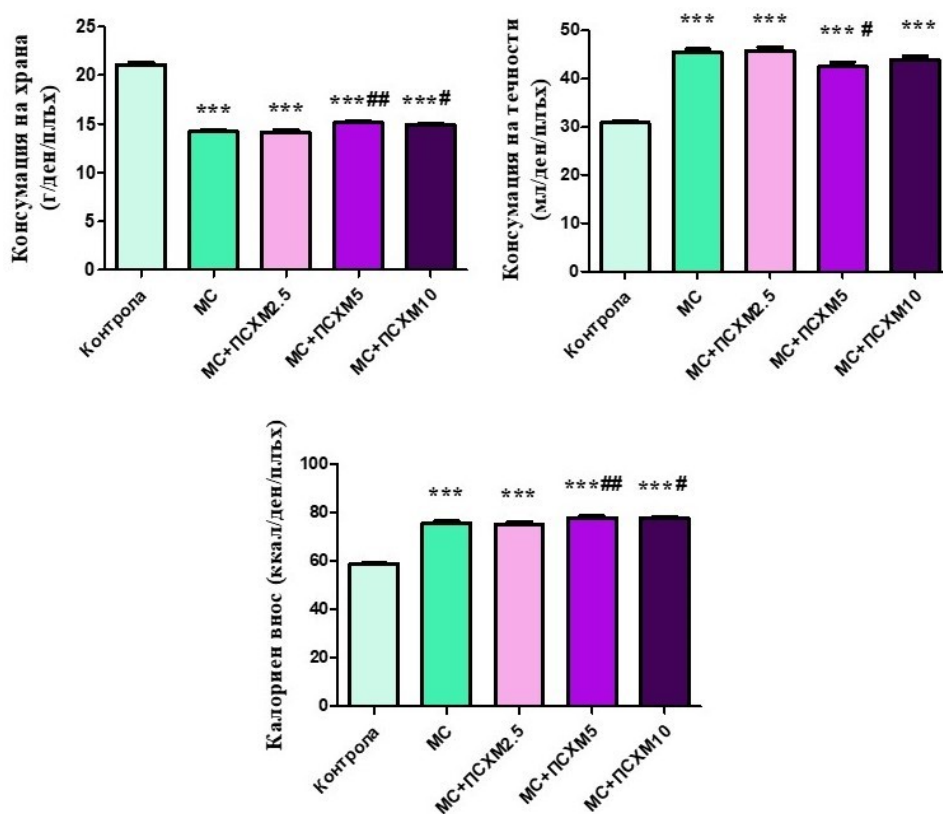
Биологичните параметри, касаещи енергийния метаболизъм, са представени на **Таблица 1** и **Фигура 3**. Животните от групите на високомазнинна високофруктозна диета консумират по-малко количество храна спрямо група Контрола ($p < 0.001$). One-way ANOVA анализът показва значима разлика между група МС и третираните групи ($p < 0.001$) като Dunnet's multiple comparison post test разкрива, че приемът на ПСХМ в дози 5 мл/кг и 10 мл/кг повишава консумацията на храна. Консумацията на течности е значително по-висока в групите на високомазнинна високофруктозна диета ($p < 0.001$) спрямо Контрола. One-way ANOVA анализът показва значима разлика между група МС и третираните групи ($p < 0.05$) като Dunnet's multiple comparison post test разкрива, че приемът на ПСХМ в доза от 5 мл/кг понижава консумацията на течности. Общият калориен прием във всички групи на високофруктозна високомазнинна диета е по-висок ($p < 0.001$) спрямо група Контрола. One-way ANOVA анализът показва значима разлика между група МС и третираните групи ($p < 0.001$) като Dunnet's multiple comparison post test разкрива, че приемът на ПСХМ в дози 5 мл/кг и 10 мл/кг повишава калорийния внос.

Таблица 1. Биологични параметри, касаещи енергийния метаболизъм, при плъхове с диетично индуциран МС, третирани с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг.

*** $p < 0.001$ спрямо група Контрола, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ спрямо група МС.

	Контрола	МС	МС+ПСХМ 2.5	МС+ПСХМ 5	МС+ПСХМ 10
Консумация на храна (г /ден/ плъх)	21.12±0.17	14.24±0.17***	14.14±0.20***	15.15±0.17***##	14.92±0.18***#

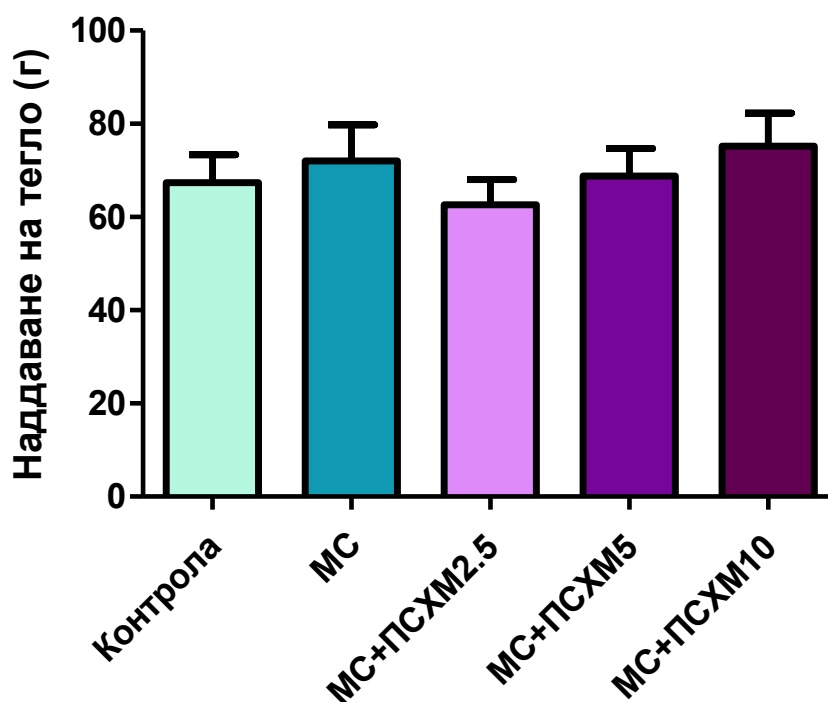
Консумация на течности (мл / ден / плъх)	30.9±0.35	45.46±0.69***	45.76±0.79***	42.51±0.91***#	43.98±0.73***
Калориен внос (ккал/ ден / плъх)	58.91±0.48	75.87±0.74***	75.45±0.85***	78.16±0.66***#	77.78±0.69***#
Изходно телесно тегло (г)	266.8±8.08	262.3±5.56	267.8±5.56	267.2±5.88	266.0±5.43
Крайно телесно тегло (г)	334.2±8.21	344.0±7.38	330.4±9.00	336.0±8.41	341.2±10.61



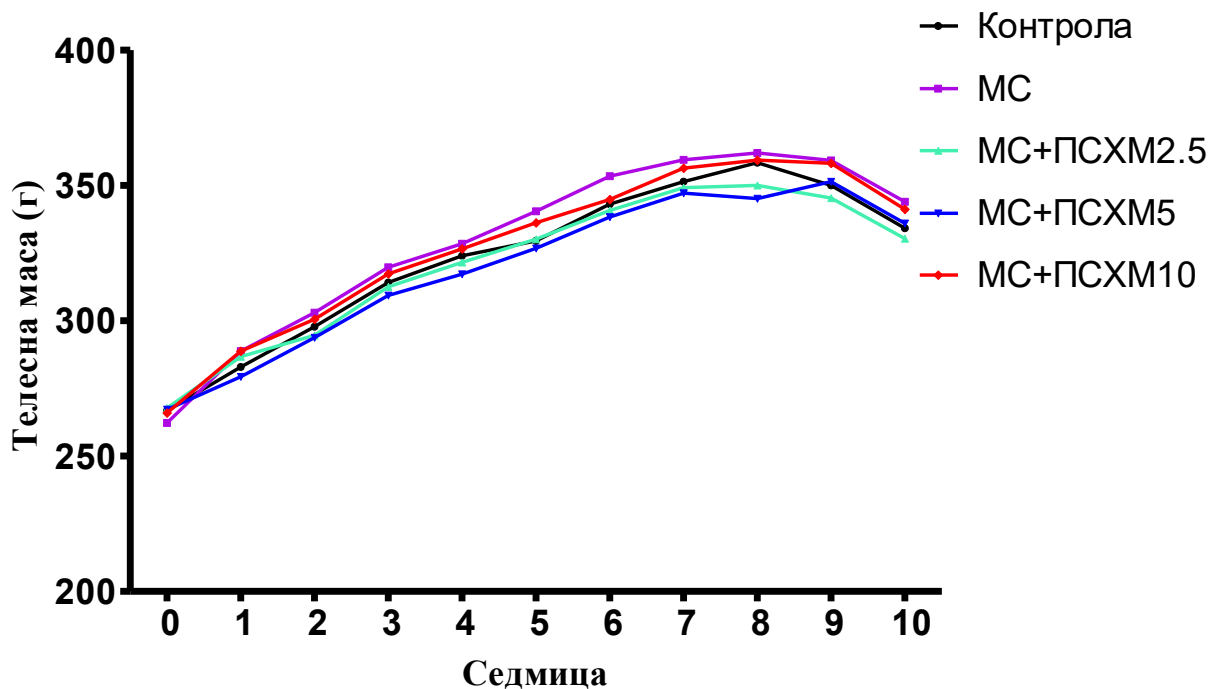
Фигура 3. Консумация на храна, на течности и калориен внос при плъхове с диетично индуциран МС, третиран с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг. *** $p < 0.001$ спрямо група Контрола, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ спрямо група МС

1.2. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху общото телесно тегло

Общото наддаване на тегло е показано на **Фигура 4**, а наддаването на тегло по седмици за всяка от експерименталните групи - на **Фигура 5**. Изходното и крайното телесно тегло на животните са отразени на **Таблица 1**. Група МС показва само леко повишение на телесно тегло спрямо контролната група. В групи МС+ПСХМ2.5 и МС+ПСХМ5 се наблюдава несигнификантно понижение на този показател спрямо група МС, а при група МС+ПСХМ10 наддаването на тегло е сравнимо с това при група МС.



Фигура 4. Общо наддаване на тегло във всяка от групите за всички 10 седмици от експеримента при плъхове с диетично индуциран МС, третирани с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг.



Фигура 5. Промяна на телесната маса по седмици в хода на експеримента при плъхове с диетично индуциран МС, третирани с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг.

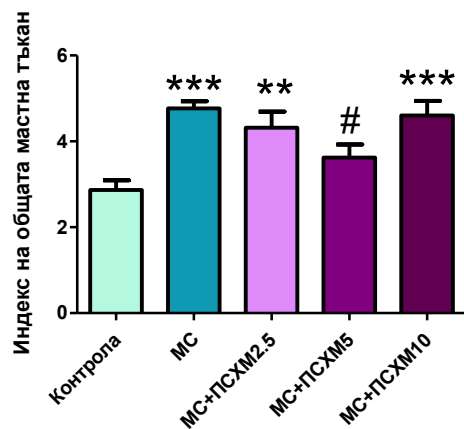
1.3. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху висцералното затлъстяване

Теглото на общата висцерална, мезентериалната, паранефралната, перигонадната и ретроперитонеалната мастна тъкан, както и съответно изчислените индекси са сигнификантно по-високи в група МС спрямо контролната група, което свидетелства за развитие на висцерално затлъстяване. Стойностите на индекса на общата висцерална мастна тъкан са сигнификантно повишени в групи МС, МС+ПСХМ2.5 и МС+ПСХМ10 спрямо Контрола, докато стойностите при МС+ПСХМ5 се запазват сходни на тези в контролната група. Dunnet's пост тест отчита статистически значимо ($p < 0.05$) понижение в индекса на общата мастна тъкан в група МС+ПСХМ5 спрямо група МС, както се вижда на **Фигура 6**. One-way ANOVA показва ефект от третирането с ПСХМ ($p = 0.0339$) с Dunnet's пост тест показващ значително понижение на индекса на мезентериалната мастна тъкан в група МС+ПСХМ5, както е показано на **Фигура 7**. Индексът на паранефралната мастна тъкан е значимо понижен в група МС+ПСХМ5 спрямо група МС. Прави впечатление, че стойностите и на другите индекси – на ретроперитонеалната и

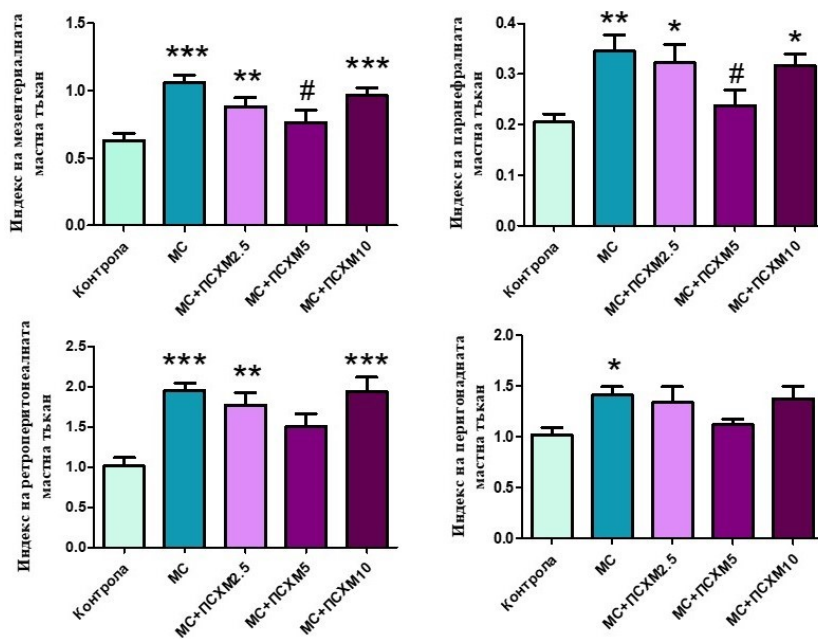
перигонадната мастна тъкан – са също понижени в група МС+ПСХМ5 спрямо МС и не се различават значимо от група Контрола.

Таблица 2. Индекси на обща, мезентериална, ретроперитонеална, паранефрална и перигонадна мастна тъкан при плъхове с диетично индуциран МС, третирани с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо група Контрола, # $p < 0.05$ спрямо група МС

Група	Контрола	МС	МС+ПСХМ 2.5	МС+ПСХМ 5	МС+ПСХМ 10
Индекс на общата мастна тъкан	2.87±0.22	4.77±0.16***	4.32±0.38**	3.62±0.30 [#]	4.60±0.34**
Индекс на мезентериалната мастна тъкан	0.63±0.05	1.06±0.06***	0.88±0.06**	0.76±0.09 [#]	0.97±0.06***
Индекс на ретроперитонеалната мастна тъкан	1.01±0.11	1.95±0.09***	1.77±0.16**	1.50±0.16	1.94±0.18***
Индекс на паранефралната мастна тъкан	0.20±0.02	0.35±0.03**	0.32±0.04*	0.24±0.03 [#]	0.32±0.02*
Индекс на перигонадната мастна тъкан	1.02±0.07	1.41±0.08*	1.34±0.15	1.12±0.06	1.38±0.12



Фигура 6. Индекс на общата мастна тъкан при плъхове с диетично индуциран МС, третирани с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо група Контрола, # $p < 0.05$ спрямо група МС



Фигура 7. Индекси на мезентериалната, паранефралната, ретроперитонеалната и перигоналната мастна тъкан при плъхове с диетично индуциран МС, третирани с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо група Контрола, # $p < 0.05$ спрямо група МС

1.4. Обсъждане

Затлъстяването при хора е естествена последица от намалената физическа активност и повишения калориен внос в комбинация с генетични фактори. Общото тегло на животните е само леко повишено от диетата, което е честа находка при диета-индуцираните експериментални модели на МС, и наподобява клиничния опит при хора – висцералното затлъстяване, а не общото количество мастна тъкан, е по-точен маркер за наличието на МС. Някои от авторите, които наблюдават в експериментални модели на МС ограничено нарастване на телесното тегло, но значително нарастване на висцералната мастна тъкан, описват също загуба на скелетна мускулна маса при опитните животни (Rodríguez-Correa et al., 2020).

Разпределението на мастната тъкан в тялото се счита за крайъгълен камък в патогенезата на МС. Лонгитудинално кохортно проучване с 1964 пациенти открива, че докато висцералната мастна тъкан се асоциира с повишен риск от МС, то подкожната мастна тъкан може би дори проявява протективен ефект (Kwon et al., 2017). Това е едно от възможните обяснения, че затлъстяването, измерено като индекс на телесната маса (ВМІ), не винаги съответства на метаболитния статус – около 30% от хората със затлъстяване са метаболитно нормални, докато 5-45% от хората с ВМІ в норма проявяват същите метаболитни нарушения, характерни за пациентите със затлъстяване (Bremer et al., 2012). В настоящото изследване както общата висцерална, така и мезентериалната мастна тъкан се повлияха в най-голяма степен от третирането с ПСХМ като средната използвана доза от 5 мл/кг значително я понижава. Установено е, че мезентериалната мастна тъкан, която се дренира в порталната циркулация, е метаболитно по-активна спрямо други депа, които не се дренират там (Liu et al., 2006). В клинично проучване дебелината на мезентериалната мастна тъкан се откроява като независима детерминанта на МС и се асоциира с повишено съотношение в дебелината на интима-медиа в каротидните съдове (Liu et al., 2006). Мезентериалната мастна тъкан се счита за възможен прогностичен фактор за неалкохолна мастна чернодробна болест и синдром на поликистозните яйчници (Perelas et al., 2012) – и двете състояния тясно обвързани с МС. Значителна корелация се наблюдава между мезентериалната мастна тъкан и атерогенните LDL ароВ частици, както и нивата на ароАІІ, като последното има отношение към ролята на мезентериалната мастна тъкан като

източник на триглицериди в състояние на гладно (Perelas et al., 2012). Потенциалът за екзогенно повлияване на мезентериалната мастна тъкан може да бъде проучен в контекста на болест на Крон, където типичното явление “creeping fat” произхожда от депата на мезентериалната мастна тъкан и е утвърдено като важен участник в чревното възпаление, вероятно двигател на прогресията на заболяването. Фармакологичното таргетиране на мезентериалната мастна тъкан се смята също и за потенциален подход към МС (Tchkonina et al., 2013).

Въпреки съществуването на фенотипа на пациенти със затлъстяване без метаболитни аномалии, трябва да се отбележи, че дори и при тях сърдечно-съдовият риск се изчислява като по-висок спрямо слаби индивиди без метаболитни рискови фактори (Aires et al., 2019). Безспорни са данните, че загубата на висцерална мастна тъкан води до редица благоприятни последици за организма. Клинично проучване със 117 пациенти с наднормено тегло или със затлъстяване потвърждава понижаване на системното възпаление след намаляване на висцералната мастна тъкан (Castro-Barquero et al., 2023). Друго клинично проучване сочи, че загубата на висцерална мастна тъкан корелира в по-голяма степен с подобряване на показатели като кръвна глюкоза на гладно, триглицериди и НОМА-индекс в сравнение със загуба на подкожна мастна тъкан (Park and Lee, 2005). Друго изследване, включващо 172 пациенти със затлъстяване в юношеска възраст, очертава редуцията на висцерална мастна тъкан като независим предиктор за намаляване на инсулиновата резистентност, хиперлептинемията и други метаболитни нарушения (Campos et al., 2019). На базата на тези данни наблюдаваната ефективност на ПСХМ за редуциране на висцералната мастна тъкан го откроява като потенциално благоприятна диетична интервенция при пациенти с МС.

В литературата са описани централни ефекти на полифенолите, повлияващи чувството за ситост и регулирайки количеството приета храна. Някои от тези ефекти вероятно са характерни за комбинацията от полифеноли в състава на ПСХМ, тъй като количеството приета храна и общият калориен внос са значимо по-високи в групи МС+ПСХМ5 и МС+ПСХМ10. Приемът на течности, в частност на фруктозен разтвор, е понижен в група МС+ПСХМ5. Понижението на висцералната мастна тъкан в група МС+ПСХМ5 се наблюдава дори на фона на повишения енергиен внос.

Антиобезните ефекти на полифенолите са добре проучени. В експериментален модел на МС при плъхове на кафетерийна диета в продължение на 16 седмици, добавянето на бисквитки, обогатени с хесперидин и нарингенин, към диетата на животните води както до намаляване на висцералната мастна тъкан, така и до понижаване на общото тегло и подобряване на показателите за кръвно налягане, инсулинова резистентност, липиден профил и оксидативен стрес (Mauneris-Perxachs et al., 2019). Един от описаните механизми е „покафеняването“ на бялата мастна тъкан. В двойно сляпо плацебо-контролирано клинично проучване със здрави жени, Nirengi et al (2016) откриват, че приемът на богата на катехини напитка в продължение на 12 седмици значително повишава кафявата мастна тъкан.

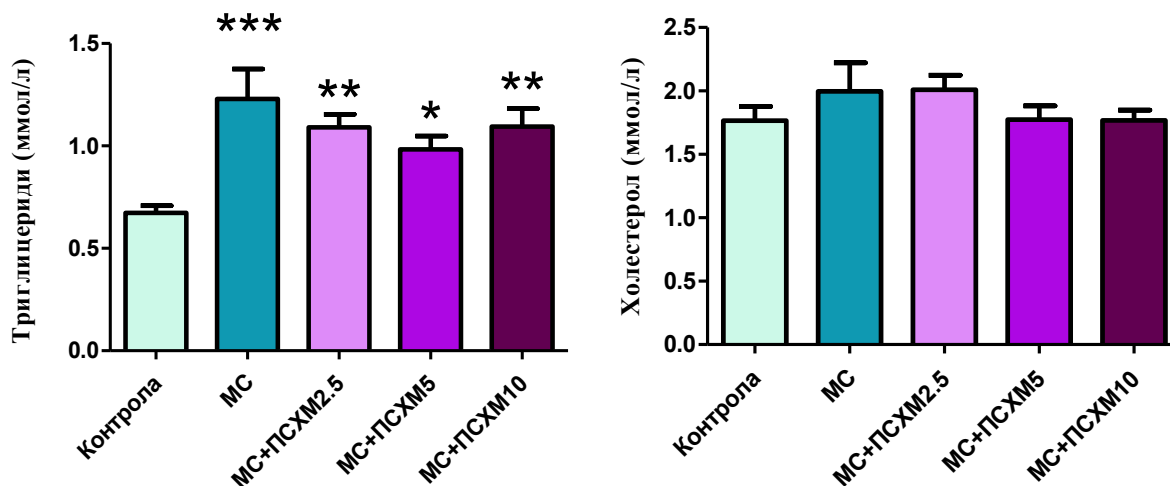
2. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху липидния профил

2.1. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху нивата на триглицеридите

One-way ANOVA анализът показва, че нивата на серумните триглицериди в група МС (1.23 ± 0.15) са значимо по-високи ($p < 0.001$) в сравнение с контролната група (0.67 ± 0.04). Подлагането на животните на високофруктозната високомазнинна диета води почти до удвояване на стойностите на триглицеридите в сравнение с плъховете на стандартна диета. Третирането с ПСХМ намалява, но не сигнификантно, нивата на триглицеридите, като промените са най-изразени в група МС+ПСХМ5 (0.98 ± 0.07 в сравнение с 1.23 ± 0.15 при група МС). Резултатите са показани на **Таблица 3** и **Фигура 8**.

Таблица 3. Нива на серумни триглицериди (ммол/л) и серумен холестерол при плъхове с диетично индуциран МС и третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо група Контрола.

Група	Триглицериди (ммол/л)	Холестерол (ммол/л)
Контрола	0.67 ± 0.04	1.77 ± 0.11
МС	$1.23 \pm 0.15^{***}$	2.00 ± 0.22
МС+ПСХМ2.5	$1.09 \pm 0.06^{**}$	2.01 ± 0.11
МС+ПСХМ5	$0.98 \pm 0.07^*$	1.77 ± 0.11
МС+ПСХМ10	$1.09 \pm 0.09^{**}$	1.77 ± 0.08



Фигура 8. Нива на серумни триглицериди (ммол/л) и холестерол (ммол/л) при плъхове с диетично индуциран МС и третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо група Контрола

2.2. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху нивата на холестерола

Както се вижда на **Таблица 3** и **Фигура 8**, нивата на общия холестерол в група МС са повишени (2.00 ± 0.22) спрямо група Контрола (1.77 ± 0.11) без достигане на статистическа значимост на резултата. ПСХМ в дози 5 и 10 мл/кг показва тенденция за предотвратяване покачването на общия холестерол (съответно 1.77 ± 0.11 и 1.77 ± 0.08) и запазване на стойностите, характерни за контролната група, докато третирането с най-ниската използвана доза ПСХМ не води до промяна на стойностите (2.01 ± 0.11) спрямо група МС.

2.3. Обсъждане

Дислипидемията е водещ компонент на МС и се свързва с множество патологични състояния. Тя представлява главен рисков фактор за развитието на атеросклеротична болест, исхемична болест на сърцето, исхемичен инсулт, периферна съдова болест, сърдечна недостатъчност и внезапна сърдечна смърт (Rygiel, 2018). Сърдечносъдовите заболявания, дължащи се на атеросклероза и тромбоза, са най-честата причина за преждевременна заболеваемост, смъртност и инвалидност в световен план (Rygiel, 2018). Повишените нива на оксидативен стрес и системното възпаление в рамките на МС са важни потенциращи фактори за развитието на дислипидемия (Khongrum et al., 2022).

Неслучайно фруктозата е често предпочитан въглехидрат за изпълнение на експериментални модели на затлъстяване и МС. Нейният метаболизъм води до получаване на нерегулирани количества липогенни субстрати, които се доставят директно до митохондриите, водят до стимулиране на де ново липогенезата в черния дроб, натрупване на липиди интрахепатално и развитие на стеатоза, както и чернодробна инсулинова резистентност (Bremer et al., 2012). Наблюдава се дълготрайна постпрандиална дислипидемия, а в същото време липсва очакваната супресия на „хормона на глада“ грелин, който има орексигенна функция (Bremer et al., 2012, Galderisi et al., 2019). Липсата на супресия върху грелина е още по-изразена при затлъстяване, отколкото при нормално телесно тегло, което подсказва, че обезогенният ефект на фруктозата е подчертан в контекста на МС (Galderisi et al., 2019). Секрецията на лептин в отговор на приема на фруктоза също е ниска, следователно той не може адекватно да потисне чувството на глад в съответствие с приетите калории (Basciano et al., 2005). Фруктозата не стимулира директно секрецията на инсулин, поради липсата на транспортерът за фруктоза GLUT-5 върху бета клетките на панкреаса (Galderisi et al., 2019). Клинични данни също потвърждават развитието на дислипидемия вследствие на прекомерна консумация на фруктоза (Faeh et al., 2005). При диетата, използвана в настоящия експеримент, значителна част от дневния енергиен внос е осигурен от фруктозата. Хипертриглицеридемията, която се демонстрира при животните от групите с индуциран МС, е обяснима с промотиращия я ефект на фруктозата. Третирането с ПСХМ намалява, но не сигнификантно, нивата на триглицеридите, като промените са най-изразени в група МС+ПСХМ5. В групата, получаваща най-високата доза ПСХМ – 10 мл/кг – има покачване на стойностите спрямо МС+ПСХМ5, макар те все пак да остават по-ниски спрямо група МС. Тенденцията за понижаване на триглицеридите вероятно се дължи на полифенолния състав на сока, а покачването в група МС+ПСХМ10 спрямо МС+ПСХМ5 може би корелира с по-голямата концентрация на фруктоза при по-високата използвана доза на сока. Нивата на общия холестерол не показват значителна промяна между експерименталните групи, макар да се наблюдава несигнификантно увеличение в групи МС и МС+ПСХМ2.5. Данните са в съответствие с преобладаващата научна литература – тъй като обикновено стойностите на LDL при МС са повишени, а тези на HDL – намалени – то общият холестерол често остава непроменен. За много от полифенолите в състава на ПСХМ са докладвани

липидопонижаващи ефекти (Cheung et al., 2023), а някои клинични проучвания, изследващи активностите на плодови сокове с подобно полифенолно съдържание, показват подобрения в липидния профил. В 8-седмично двойно сляпо плацебо-контролирано проучване с възрастни пациенти с дислипидемия, консумацията на желеобразна плодова напитка с високо съдържание на полифеноли води до значително подобрение на липидния профил, вкл. нивата на LDL-холестерол и триглицеридите (Khongrum et al., 2022). Въпреки това обаче, в настоящото изследване тенденцията за понижаване и при триглицеридите, и при общия холестерол не успява да достигне статистическа значимост. Би било интересно да се сравнят тези резултати с ефектите от консумацията на цели плодове от *Chaenomeles maulei*, където съдържанието на пектин е по-високо, а той, както вече беше обсъдено, също проявява липидопонижаващи свойства.

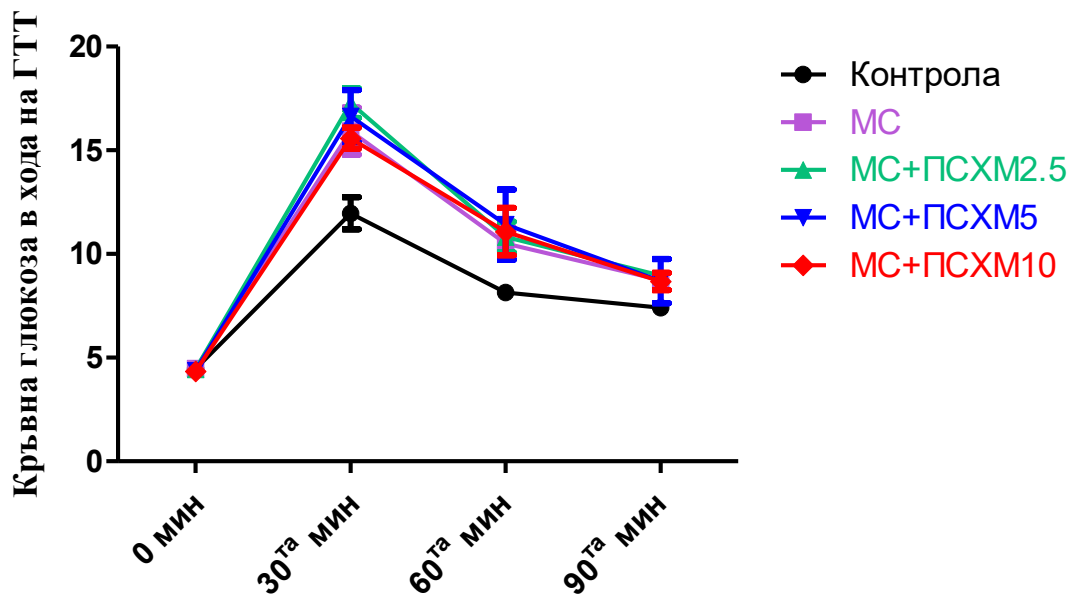
3. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху глюкозната толерантност и върху инсулиновата резистентност

3.1. Тест за глюкозна толерантност (ГТТ)

Резултатите от ГТТ са представени на Таблица 4 и Фигура 9. Кръвно-захарните нива на гладно не се различават значимо между експерименталните групи (4.46±0.09 за Контрола, 4.48±0.14 за МС, 4.44±0.09 за МС+ПСХМ2.5, 4.38±0.15 за МС+ПСХМ5 и 4.34±0.15 за МС+ПСХМ10). One way ANOVA на стойностите на 30^{та} мин след глюкозното обременяване показва значимост на резултата (p=0.0020), като Dunnet's Multiple Comparison Test отчита статистически значима разлика между група Контрола и група МС. One way ANOVA на стойностите на 60^{та} мин от ГТТ показва значимост (p=0.0260) на разликата между група Контрола и група МС. Student's t-test показва значително увеличение в абсолютните стойности на глюкозата в група МС в сравнение с контролната група на 30^{та} (p=0.0109), 60^{та} (p=0.0066) и 90^{та} минута (p=0.0031) след глюкозното обременяване, както и в стойностите представени като процент от първоначалните стойности (p<0.05). Третирането с плодов сок от *Chaenomeles maulei* не променя сигнификантно глюкозната толерантност в използваните концентрации спрямо група МС.

Таблица 4. Плазмени нива на глюкозата при глюкозотолерантен тест, представени като абсолютни стойности (ммол/л) и като процент (%) от изходните стойности на 30та, 60та и 90та минута след глюкозното обременяване при плъхове с диетично индуциран МС, третиран с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг. *p<0.05 спрямо Контрола съгласно one-way ANOVA, **p<0.01 спрямо Контрола съгласно one-way ANOVA, &p<0.05 спрямо Контрола съгласно student's t-test анализ, &&p<0.01 спрямо Контрола съгласно student's t-test анализ.

		Контрола	МС	МС+ПСХМ2.5	МС+ПСХМ5	МС+ПСХМ10
0 мин (mmol/l)		4.46±0.09	4.48±0.14	4.44±0.09	4.38±0.15	4.34±0.15
30 ^{та} минута	(mmol/l)	11.97±0.78	15.92±1.14**	17.27±0.72***	16.64±1.26**	15.58±0.51*
	(%)	169±17.3	257±27.95**	289±15.62***	280.4±26.77**	261.1±14.34*
60 ^{та} минута	(mmol/l)	8.13±0.26	9.93±0.53&&	10.82±0.74	9.83±0.63	10.05±0.56
	(%)	83.25±7.341	136±16.5&&	145±18.46	163±38.68	157.4±27.43
90 ^{та} минута	mmol/l	7.41±0.25	8.73±0.28&	8.95±0.35	8.69±1.07	8.34±0.28
	(%)	66.82±6.5	96.23±7.68&	102.6±9.78	100.3±24.67	102±12.56



Фигура 9. Плазмени нива на глюкозата при глюкозотолерантен тест, представени като абсолютни стойности (ммол/л) при плъхове с диетично индуциран МС, третиран с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг

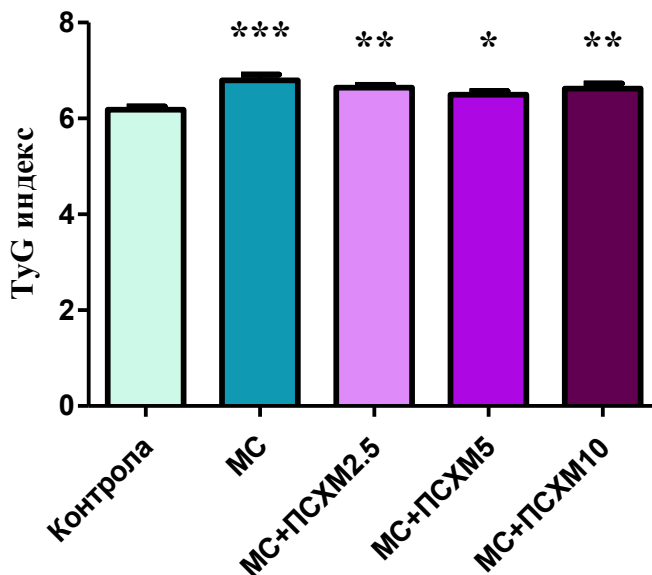
3.2. Измерване на TuG индекс като показател за инсулинова резистентност

Триглицерид/глюкозният индекс (TuG) е значително повишен в група МС в сравнение с контролната група ($p=0.0002$), което предполага развитието на инсулинова резистентност в група МС. Третирането с ПСХМ в използваните концентрации не повлиява сигнификантно TuG индекса, макар да се наблюдава леко понижение на стойностите в сравнение с група МС. Посочените резултати са представени на **Таблица 5** и **Фигура 10**.

Таблица 5. TuG индекс при плъхове с диетично индуциран МС, третиран с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ спрямо Контрола.

Група	TuG индекс
Контрола	6.18±0.07
МС	6.80±0.12***

МС+ПСХМ2.5	6.65±0.06**
МС+ПСХМ5	6.50±0.07*
МС+ПСХМ10	6.62±0.11**



Фигура 10. TuG индекс при плъхове с диетично индуциран МС, третирани с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо Контрола

3.3. Обсъждане

В настоящото изследване стойностите на кръвната глюкоза на гладно са сравними във всички експериментални групи, докато в група МС са значително повишени на 30^{та}, 60^{та} и 90^{та} минута от ГТТ, което е показател за развитие на нарушен глюкозен толеранс вследствие на високовъглехидратната високомазнинна диета. Заедно с наблюдаваната инсулинова резистентност в група МС, тези промени съответстват на състоянието предиабет. Нарушенията в глюкозната обмяна при предиабет се считат за обратими (Tuso, 2014), което подчертава значението на своевременно откриване и приложение на подходящи интервенции, намаляващи риска от прогресиране на състоянието до

манифестен диабет тип 2. Установено е, че в отсъствие на такава намеса, 37% от пациентите с предиабет достигат до диабет тип 2 за 4-годишен период (Tuso, 2014).

Докато инсулиновата резистентност заема централно място в патогенезата на МС, то нейното директно определяне и проследяване се оказва не особено лесно осъществимо. За тази цел са разработени индиректни маркери, които се утвърждават широко в клиничната практика. Един от най-често използваните е НОМА-IR, но търсенето продължава и води до откриването на нови маркери като TyG индекса. Той е иновативен сурогатен маркер за оценка на нивото на инсулинова резистентност (Lopez-Jaramillo et al., 2023). В настоящото изследване той е значително повишен в отговор на високофруктозна високомазнинната диета, свидетелствайки за развитие на инсулинова резистентност.

Основен двигател на инсулиновата резистентност са свободните мастни киселини в кръвта, които понижават транслокацията на GLUT-4 до повърхността на мускулните клетки, промотират глюконеогенезата и липогенезата в черния дроб, проявяват липотоксичен ефект спрямо множество органи и тъкани, вкл. и панкреатичните бета клетки (Fahed et al., 2022).

Макар че демонстрираната инсулинова резистентност несъмнено играе роля в развитието на намалената глюкозна толерантност при ГТТ, редица проучвания сочат, че нарушената чувствителност на бета клетките на панкреаса към глюкоза е водещият фактор в патогенезата на това нарушение (Ferrannini et al., 2003; Mari et al., 2010). На базата на получените резултати, има основание да се смята, че високомазнинната високофруктозна диета, използвана в сегашното изследване, компрометира чувствителността на панкреатичните бета клетки към глюкоза. Тя зависи до голяма степен от глюкозния транспортер GLUT-2 и ензимът глюकोкиназа, като и двата биват потиснати под влиянието на високомазнинна диета (Cerf, 2007).

Клинични данни потвърждават, че високото съдържание на фруктоза в диетата опосредства чернодробна и мастнотъканна инсулинова резистентност (Faeh et al., 2005).

Третирането на опитните животни с ПСХМ не успява да предотврати развитието на нарушена глюкозна толерантност и инсулинова резистентност в използваните дози. Мета-анализ на 18 рандомизирани клинични проучвания сочи, че консумацията на 100% плод

сок не води до промяна в нивата на глюкоза и на инсулинова резистентност като разгледаните проучвания включват употребата на сок от ябълка, нар, грейпфрут, червена боровинка и др. (Murphy et al., 2017). Друго проучване показва, че директният ефект на цитрусови сокове върху постпрандиалния гликемичен отговор е ограничен, но съществува голямо интериндивидуално различие, което авторите отдават до голяма степен на различията в чревната микробиота (Visvanathan and Williamson, 2021).

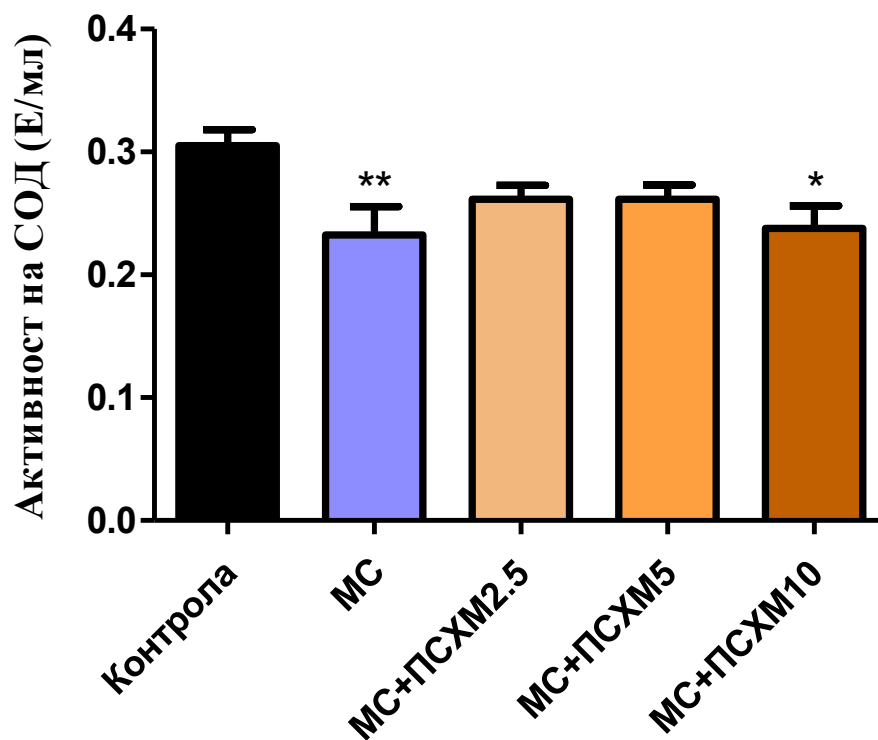
4. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху биохимични маркери на антиоксидантна защита и оксидативен стрес

4.1. Ефекти върху серумните нива на супероксид дисмутаза

Резултатите от серумната активност на антиоксидантния ензим супероксид дисмутаза (СОД) са представени на **Таблица 6** и **Фигура 11**. One-way ANOVA отчита статистически значима разлика между групите ($p=0.0173$), а Dunnet's multiple comparison post test показва значимо по-ниска активност на ензима в група МС, както и в групата, третирана с най-високата доза ПСХМ – МС+ПСХМ10 – в сравнение с група Контрола. Третирането с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг и 5 мл/кг предотвратява индуцираното от високомазнинната високофруктозна диета понижение на активността на ензима, за което свидетелства фактът, че между група Контрола и групи МС+ПСХМ2.5 и МС+ПСХМ5 не се открива статистически значима разлика. Активността на СОД в експерименталната група, третирана с най-високата доза ПСХМ, е понижена в степен, сравнима с група МС.

Таблица 6. Активност на ензима супероксид дисмутаза (СОД) в серум на плъхове с МС и третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг. * $p<0.05$ спрямо Контрола, ** $p<0.01$ спрямо Контрола.

Група	Активност на супероксид дисмутаза (Е/мл)
Контрола	0.305±0.013
МС	0.233±0.023**
МС+ПСХМ2.5	0.262±0.011
МС+ПСХМ5	0.262±0.012
МС+ПСХМ10	0.238±0.018*



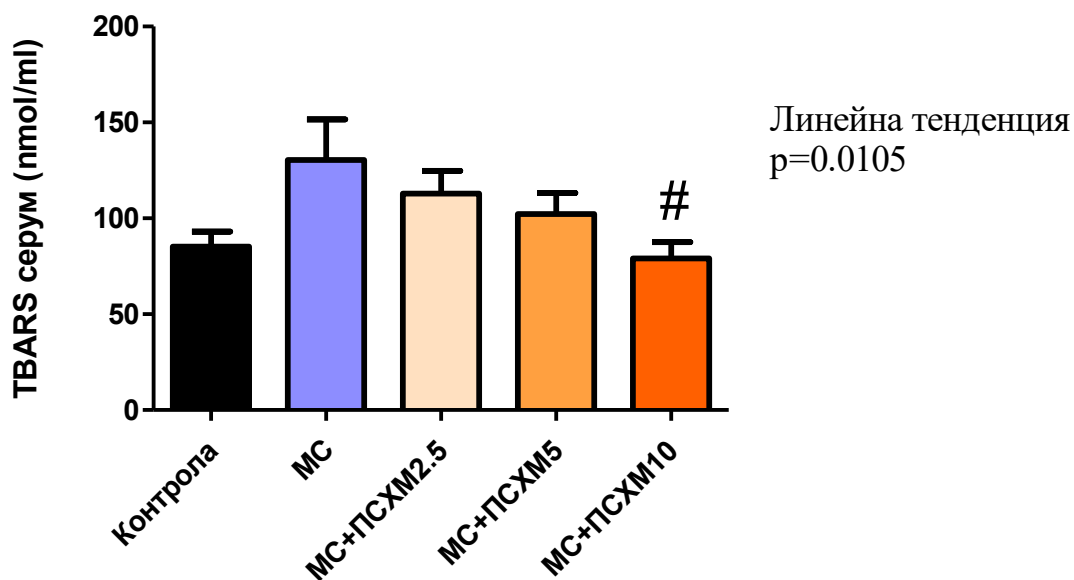
Фигура 11. Активност на ензима супероксид дисмутаза (СОД) в серум на плъхове с диетично индуциран МС и третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг. * $p < 0.05$ спрямо Контрола, ** $p < 0.01$ спрямо Контрола

4.2. Ефекти върху серумните нива на реагиращи с тиобарбитуровата киселина субстанции

Стойностите на реагиращите с тиобарбитуровата киселина субстанции (TBARS) в серума на животните от група МС са по-високи спрямо Контролата (130.5 ± 21.09 спрямо 85.32 ± 7.73), но без достигане на статистическа значимост на резултата. Вследствие на третирането с ПСХМ се наблюдава линейна тенденция ($p = 0.0105$) в посока понижаване нивата на TBARS в серума, като в групата, получаваща най-високата доза на сока - МС+ПСХМ10 - те са сигнификантно понижени ($p < 0.05$) спрямо тези на група МС и са сравними със стойностите в група Контрола. Резултатите са показани на **Таблица 7** и **Фигура 12**.

Таблица 7. Стойности на TBARS (nmol/ml) в серум на плъхове с диетично индуциран МС и третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг. #p<0.05 спрямо група МС.

Група	TBARS серум (nmol/ml)
Контрола	85.32±7.73
МС	130.5±21.09
МС+ПСХМ2.5	113±11.76
МС+ПСХМ5	102.2±11.04
МС+ПСХМ10	79.07±8.55 [#]



Фигура 12. Стойности на TBARS (nmol/ml) в серум на плъхове с диетично индуциран МС и третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг. #p<0.05 спрямо група МС

4.3. Обсъждане

Не само повишеният оксидативен стрес, но и намалените ендогенни способности на организма за антиоксидантно действие са ключов фактор в патогенезата на МС и свързващо звено с много от свързаните с него състояния. Супероксид дисмутазите са

фамилия металоензими, отговорни за обезвреждането на супероксидни свободни радикали. Настоящото проучване показва статистически значимо понижаване в активността на серумната СОД при плъхове с диетично индуциран МС, което е в синхрон с преобладаващата научна литература. Понижената активност на СОД в серума е отличителна черта на пациенти със затлъстяване и с МС (Catalán et al., 2018). МС понижава естествените антиоксидантни възможности на организма, което е предпоставка за задълбочаване на индуцираните от синдрома органни увреди. В клинично проучване с 3234 човека е наблюдавана отрицателна корелация между серумните нива на СОД и ВМІ, систолно и диастолно кръвно налягане, серумните нива на триглицеридите и серумните нива на глюкоза, както и с дебелината интима-медия на каротидната артерия (Isogawa et al., 2009).

В настоящото проучване третирането на експерименталните животни с ПСХМ в дози 2.5 и 5 мл/кг успява да предотврати индуцираното от високомазнинната високофруктозна диета понижаване на активността на антиоксидантния ензим супероксид дисмутаза. Повишаване на активността на СОД, каталаза и глутатион е наблюдавано и след перорално третиране с *Chaenomeles sinensis* на плъхове с потиснати антиоксидантни системи вследствие индуциране на диабет тип 2 (Watychowicz et al., 2017). Антиоксидантни свойства са описани и при друг представител на рода *Chaenomeles* – *Chaenomeles speciosa* – който подобрява активността на ензима глутатион пероксидаза в ин виво изследване (Watychowicz et al., 2017). Подобни резултати са описани и за други богати на полифеноли плодови сокове. В 9-седмично плацебо-контролирано клинично проучване при здрави доброволци активността на СОД е значимо повишена след приема на плодов сок, богат на антоцианини (Bakuradze et al., 2019).

Най-високата доза на ПСХМ – 10 мл/кг – не успява да предотврати понижението на активността на антиоксидантния ензим, индуцирано от високомазнинната високофруктозна диета. Интересно е, че при настоящия експеримент резултатите от ефекта на ПСХМ върху активността на СОД тясно корелират с резултатите от ефекта му върху висцералното затлъстяване – и при двата показателя се наблюдава ефект при ниската и средна използвани дози (при висцералната мастна тъкан сигнификантен само в средната), докато при най-високата доза стойностите са сравними с тези при група МС.

Данните са обясними с изявената взаимовръзка между затлъстяването и оксидативния стрес. Възможна причина за липсата на ефект в група МС+ПСХМ10 е потенциалното про-оксидантно действие на полифенолите във високи дози.

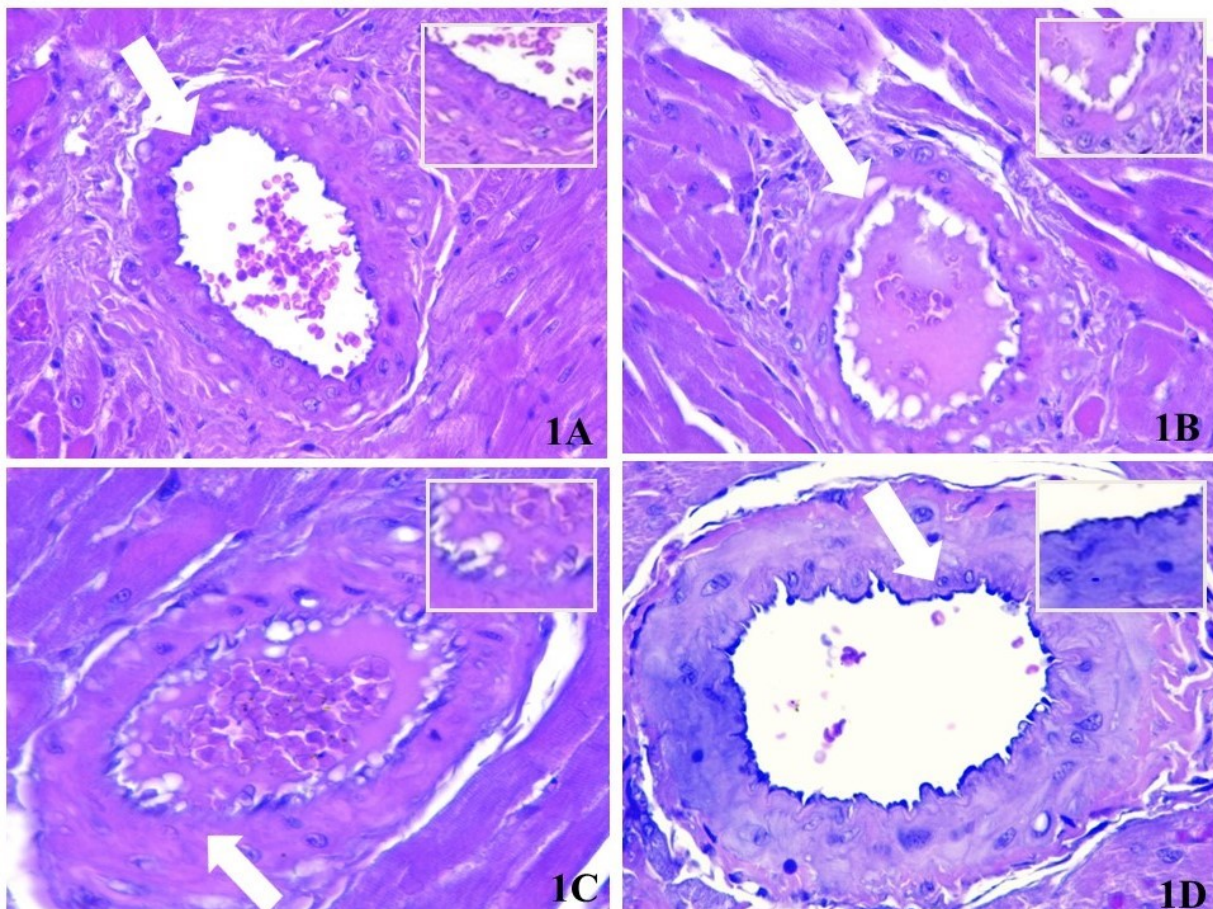
Тъй като реактивните кислородни видове (ROS) са с изключително кратък полуживот, което прави директното им измерване трудно и скъпо, са разработени по-практични методи за изследване на оксидативния стрес, отчитащи крайни продукти от метаболизма им или други биомаркери (Catalán et al., 2018). Изследването на реагиращите субстанции на тиобарбитуровата киселина в серума (TBARS) на плъховете в настоящото изследване като маркер за липидна пероксидация показва завишени стойности в група МС в сравнение с контролната група. Третирането с ПСХМ доза-зависимо предотвратява липидната пероксидация като нивата в групата, третирана с най-високата доза на сока – МС+ПСХМ10 – са сравними с тези при група Контрола.

Повишени плазмени нива на TBARS са описани при лептин-дефицитни мишки със затлъстяване, както и при хора със затлъстяване и с МС (Catalán et al., 2018). В проспективно изследване с 1945 човека, Tanaka et al. (2011) установяват, че серумните нива на TBARS са силен и независим предиктор на коронарна болест, подкрепяйки хипотезата, че липидната пероксидация е значим рисков фактор за развитието на коронарната болест. Серумните нива на TBARS се свързват също с честотата на съдови събития, вкл. фатален и нефатален инфаркт и инсулт, и необходимостта от съдови интервенции при пациенти със стабилна коронарна болест (Walter et al., 2004).

5. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в хистопатологично изследване на миокард и коронарни артерии

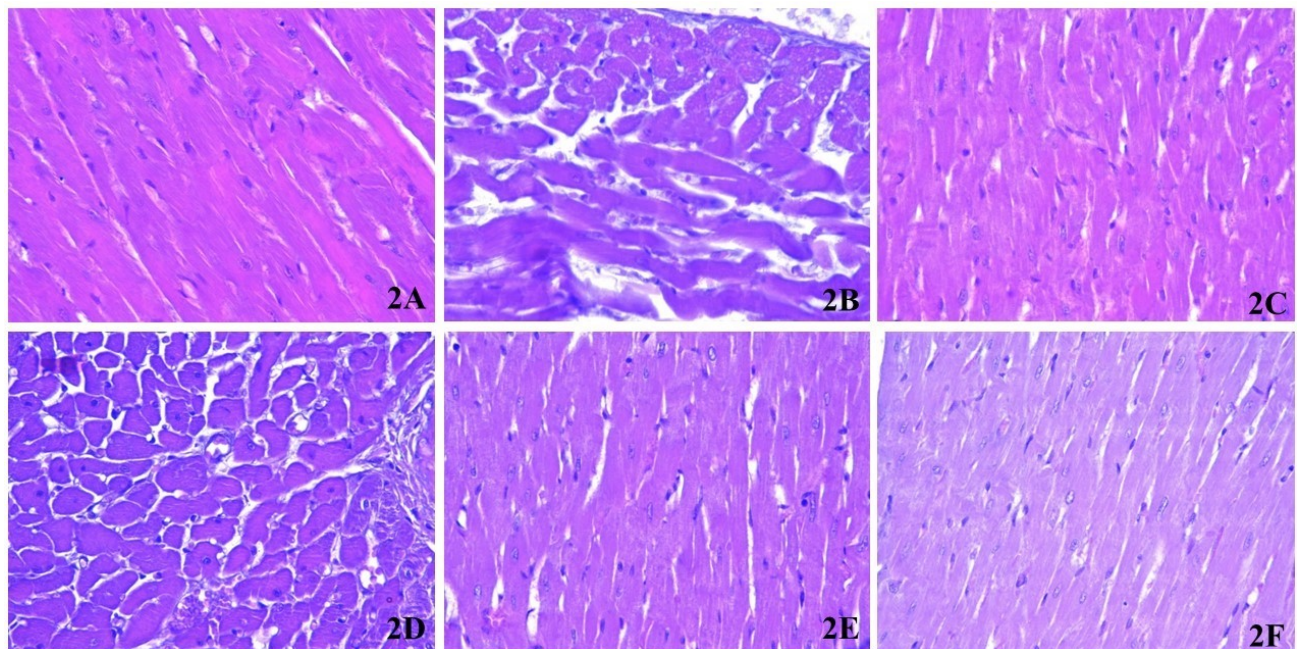
5.1. Резултати

В коронарния съд на експерименталните животни от контролната група се наблюдава непрекъснат ендотелен слой на съдовата стена. В група МС се открива фокална липса на ендотел, ендотелните клетки са некротични и базалната мембрана е оголена. При плъховете от група МС+ПСХМ2.5 също се демонстрира фокална липса на ендотел, както и активирани ендотелни клетки. В групи МС+ПСХМ5 и МС+ПСХМ10 ендотелната тапицировка на коронарните артерии е възстановена. Хистологичните резултати са показани на **Фигура 13**.



Фигура 13. Микроскопски вид на коронарни съдове от групи: Контрола (панел 1А), МС (панел 1В), МС+ПСХМ2.5 (панел 1С) и МС+ПСХМ10 (панел 1D); оцветяване с хематоксилин-еозин, увеличение x 400

Резултатите от хистологичното изследване на миокард са представени на **Фигура 14**. При животните от контролната група се наблюдава нормална структура на миокарда. В група МС се развиват дегенеративни промени и кардиомиоцитите са раздалечени едни от други. При МС+ПСХМ2.5 увреждането е частично предотвратено – има зони с нормална архитектура и зони с дегенеративни промени и раздалечени кардиомиоцити. В групи МС+ПСХМ5 и МС+ПСХМ10 третирането предотвратява настъпването на индуцираните от високомазнинната високофруктозна диета промени и миокардът не показва хистологични отклонения.



Фигура 14. Микроскопски вид на миокард от групи: Контрола (панел 2А), МС (панел 2В), МС+ПСХМ2.5 (панели 2С и 2D), МС+ПСХМ5 (панел 2Е), МС+ПСХМ10 (панел 2F); оцветяване с хематоксилин-еозин, увеличение x 200

5.2. Обсъждане

Високомазнинната високофруктозна диета в настоящия експеримент води до увреждане на ендотела. Освен самата диетична манипулация, наблюдаваните последствия като висцерално затлъстяване, инсулинова резистентност и повишен оксидативен стрес също са важни медиатори на ендотелната увреда. Установено е, че ендотелната дисфункция е ранен маркер на съдова увреда, стои в основата на нарушената регулация на съдовата

резистентност, тъканната перфузия и в инициацията и прогресията на съдовата атерогенеза, които се разгръщат в по-нататъшния ход на МС (Tune et al., 2017). Ендотелната дисфункция води до нарушение на ендотел-зависимата вазодилатация, което допринася за комплексната патогенеза на синдрома. Двупосочната връзка между ендотелната активация и ендотелната дисфункция инициира също пролиферация на гладкомускулни клетки, проинфламаторно състояние с левкоцитна адхезия, тромбоцитна агрегация, липидно окисление и активация на матриксни металопротеинази (Hayden, 2023). В настоящия експеримент при кардиомиоцитите също се откриват дегенеративни промени вследствие на диетата. Тези данни са в съответствие със съществуващата литература, свързана с експерименти, проведени със сходни хранителни интервенции (Prassarthong et al., 2022).

Третирането с ПСХМ доведе до доза-зависим кардио- и вазопротективен ефект. Хистологичната находка, демонстрирана при настоящото изследване, корелира с нивата на TBARS, установени в серума на опитните животни – понижаването на липидната пероксидация вероятно има значение за кардио- и вазопротективното действие на сока. Антиатерогенни и кардиопротективни ефекти са описани и при други плодови сокове – от арония (Daskalova et al., 2015), от нар (Basu et al., 2009), от грозде (Svezia et al., 2020), от портокал (Martinez et al., 2021) и др. Отдавна е известно, че консумацията на растителни храни корелира с по-нисък риск от сърдечно-съдови заболявания (Daskalova et al., 2015; Basu A et al., 2009). Значителен принос за това имат полифенолите. ПСХМ е богат източник на полифеноли. Те оказват влияние върху компонентите на метаболитния синдром и последващите го сърдечно-съдови нарушения по различни механизми. Полифенолите подобряват гликемичния контрол вероятно чрез инхибиция на α -амилаза и α -глюкозидаза (намалявайки по този начин постпрандиалните глюкозни спайкове), натрий-зависимия глюкозен транспортер 1, както и чрез стимулация на инсулиновата секреция и намаляване на чернодробната секреция на глюкоза (Kim et al., 2016). Има данни, че кверцетин проявява антиоксидантни и противовъзпалителни свойства, стимулира поемането на глюкоза в мускулните клетки и в адипоцитите и индуцира автофагия в условията на МС и асоциираните с него състояния (Gasmi et al., 2022). Основен феномен при метаболитния синдром е хроничното нискостепенно възпаление. Инхибиция на циклооксигеназата, липоксигеназата, индуцируемата синтаза на азотен

оксид, нуклеарен фактор капа би (NFκB), активиращ протеин-1, както и активация на МАПК, протеин-киназа С и нуклеарен фактор еритроид 2-свързан фактор (Nrf2), са някои от молекулните механизми, по които полифенолите водят до редукция на възпалението (Hussain et al., 2016). Противовъзпалителните свойства на полифенолите се медиат отчасти от епигенетични модификации (Ramos-Lopez et al., 2021). Друг централен момент в патогенезата на МС е митохондриалната дисфункция. Правилното функциониране на клетъчните митохондрии зависи от избирателното разграждане на увредените такива чрез автофагия – процес, наречен митофагия. Нарушения в митофагията са важна част от генезата и прогресията на метаболитен синдром и неговите прилежащи състояния, включително сърдечно-съдови усложнения (Miao et al., 2023). Полифенол-медираната митофагия представлява възможност за модулация на митохондриалното здраве чрез диетична манипулация (Tan et al., 2017). Полифенолите повлияват също и митохондриалната биогенеза. Те се разглеждат и като миметици на калорийната рестрикция, активиращи някои от молекулните механизми, които се стимулират при ограничаване на калорийния внос – една от най-ефективните до момента екзогенни интервенции за подобряване на митохондриалния статус (Davinelli et al., 2020). Известно е, че полифенолите модулират чревната микробиота, включително действайки като пребиотици (Kim et al., 2016). Друг, обикновено по-малко дискутиран механизъм, въввлечен в патогенезата на МС, е циркадната дисритмия. Полифенолите взаимодействат с циркадните ритми, модулирайки транскрипцията и експресията на т.нар. „часовникови гени“ (Man et al., 2020). Има данни, че toll-подобните рецептори, в частност TLR4, които са експресирани в миокарда в по-голяма степен спрямо останалите членове на TLR семейството, медиат някои от неблагоприятните ефекти на високомазнинната диета върху сърдечно-съдовата система, вкл. хипертрофия и фиброза (Tian et al., 2023). Полифенолите оказват влияние върху TLR4 сигналните пътища (Rahimifard et al., 2017), следователно това е един от възможните таргети на ПСХМ.

Сред полифенолите, установени в състава на ПСХМ, кардио- и/или вазопротективни свойства са описани за олигомерните проантоцианидини (Rathinavel et al., 2018), за ваниловата (Yalameha B et al., 2023), кафеената, хлорогеновата (Agunloye et al., 2019), р-кумаровата (Fuentes et al., 2014) и елагова (Sharifi-Rad et al., 2022) фенолни киселини, както и за флавоноидите епикатехин, катехин, кверцетин, рутин, нарингин, кемпферол и

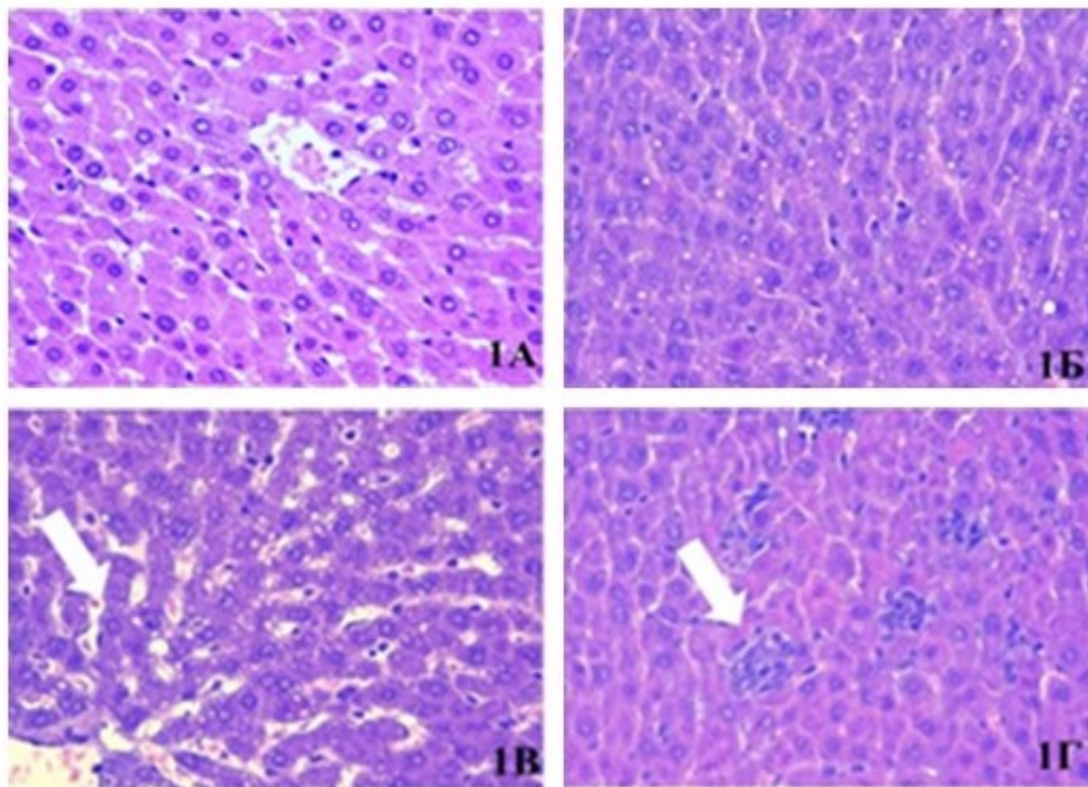
мирицетин (Ciumărnean et al., 2020). Голямо проспективно кохортно проучване, включващо почти 100 000 души показва, че консумацията на флавоноиди се свързва с по-нисък риск от смъртност от сърдечно-съдови заболявания (McCullough et al., 2012).

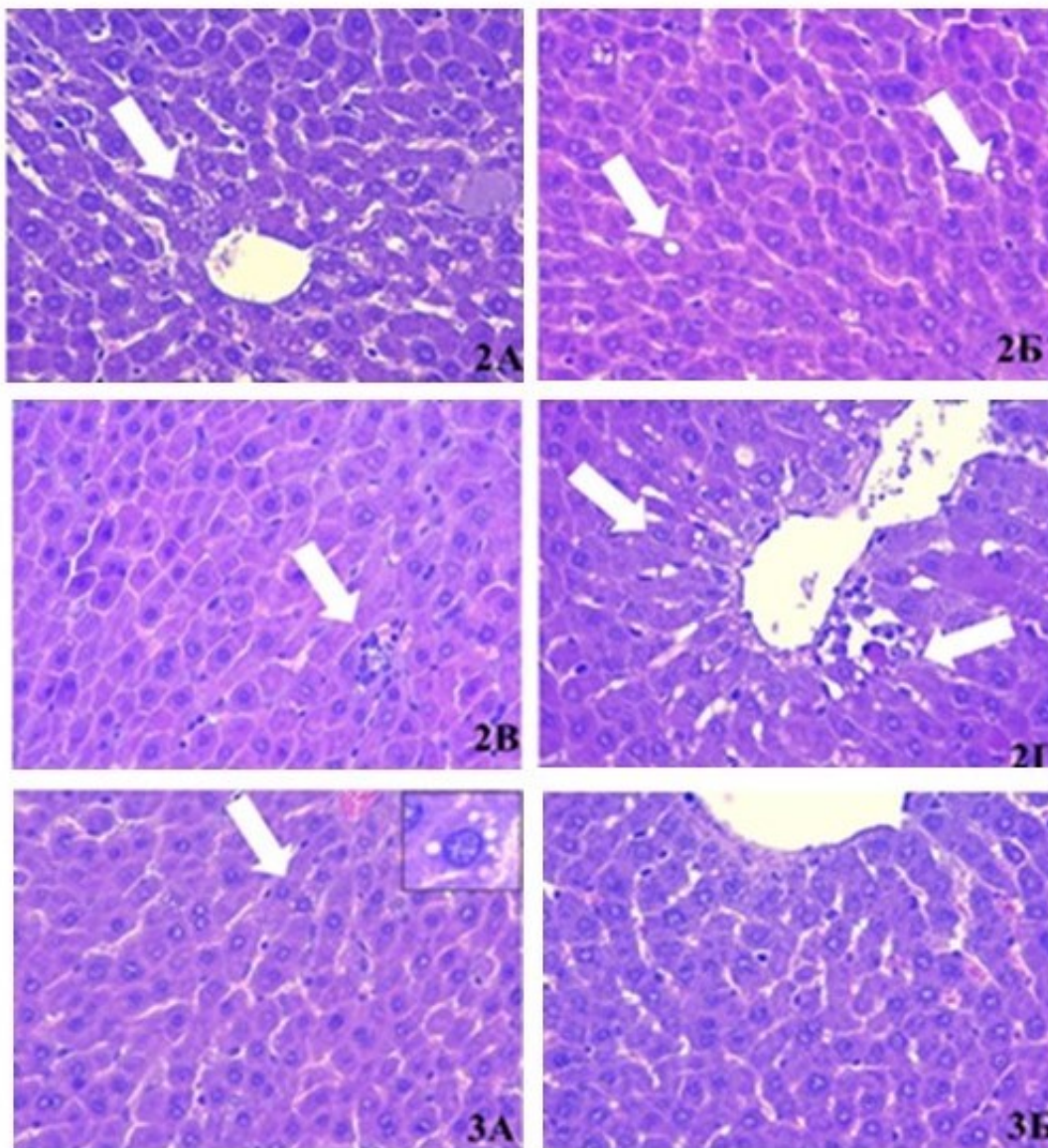
Съществуват експериментални данни за други плодови сокове с богат полифенолен състав и изразени антиоксидантни свойства, които намаляват серумните нива на лептин и повишават тези на адипонектин при животни на високомазнинна диета (Wu et al., 2013). Нарушения в лептиновата сигнализация водят до метаболитно превключване на основния енергиен източник на сърдечния мускул от глюкоза към мастни киселини и стимулират липидно натрупване в кардиомиоцитите, липотоксичност, митохондриална дисфункция и повишена генеза на свободни кислородни радикали (Senesi et al., 2020). Предотвратяване на лептиновата дисфункция изглежда като един от потенциалните механизми, по които ПСХМ оказва своите кардиопротективни ефекти.

6. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в хистопатологично изследване на черен дроб и върху чернодробния индекс

6.1. Резултати от хистопатологията

Резултатите от хистопатологичното изследване на черен дроб са показани на **Фигура 15**. В контролната група се наблюдава нормална чернодробна структура. При животните от група МС се открива дребнокапчеста стеатоза, чернодробна некроза и неспецифични грануломи. В група МС+ПСХМ2.5 дребнокапчестата стеатоза засяга по-малко на брой хепатоцити. В групи МС+ПСХМ5 и МС+ПСХМ10 се наблюдават единични неспецифични грануломи и единични хепатоцити с мастна дегенерация. Третирането с ПСХМ води до доза-зависима редукция на индуцираната от високомазнинната високофруктозна диета чернодробна увреда, без да успее напълно да предотврати развитието на дегенеративни промени.





Фигура 15. Микроскопски вид на черен дроб от групи Контрола (панел 1А), МС (панел 1Б, 1В и 1Г), МС+ПСХМ2.5 (панел 2А и 2Б), МС+ПСХМ5 (панел 2В и 2Г) и МС+ПСХМ10 (панел 3А и 3Б); оцветяване с хематоксилин-еозин, увеличение x 200

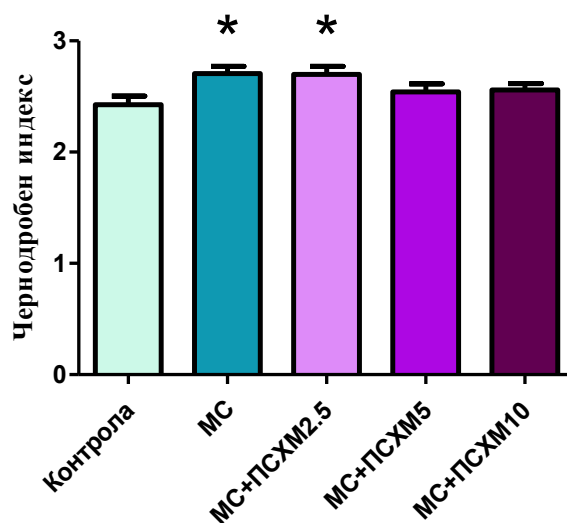
6.2. Резултати от чернодробния индекс

Резултатите от чернодробния индекс са представени на **Таблица 8** и **Фигура 16**. Вследствие на високомазнинната високофруктозна диета стойностите на индекса са сигнификантно повишени в група МС и МС+ПСХМ2.5, както показва One-way ANOVA анализът ($p=0.0343$). Стойностите, наблюдавани в групи МС+ПСХМ5 и МС+ПСХМ10 са

сравними с тези при контролната група – средната и високата доза на сока възпрепятстват развитието на промените, индуцирани от високофруктозната високомазнинна диета, в чернодробния индекс.

Таблица 8. Чернодробен индекс, отразяващ съотношението тегло на черен дроб/телесно тегло на съответното животно $\times 10^2$ при плъхове с диетично индуциран МС и третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг. * $p < 0.05$ спрямо група Контрола.

Група	Чернодробен индекс
Контрола	2.427 \pm 0.076
МС	2.707 \pm 0.064*
МС+ПСХМ2.5	2.758 \pm 0.087*
МС+ПСХМ5	2.540 \pm 0.075
МС+ПСХМ10	2.560 \pm 0.056



Фигура 16. Чернодробен индекс, отразяващ съотношението тегло на черен дроб/телесно тегло на съответното животно $\times 10^2$ при плъхове с МС и третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг. * $p < 0.05$ спрямо група Контрола

6.3. Обсъждане

Неалкохолната мастна чернодробна болест (НМЧБ) се смята за чернодробна манифестация на МС. Тя представлява спектър от патологични състояния вариращи от стеатоза до стеатохепатит, цироза и дори хепатоцелуларен карцином. В световен мащаб тя засяга средно около 25.24 % от населението, като заболяемостта е най-висока в Близкия изток (31.79 %) и в Южна Америка (30.45 %)(Yuan et al., 2022). В Европа честотата е 23.71 % (Yuan et al., 2022). НМЧБ е главен рисков фактор за развитието на диабет тип 2, както и за повишаване на сърдечно-съдовата заболяемост и смъртност (Lozano et al., 2016). Класическата хипотеза за патофизиологията на НМЧБ обяснява генезата на състоянието с два последователни "удара" – първо натрупването на липиди в черния дроб, а след това пагубното влияние на оксидативния стрес и възпалението. Тази хипотеза е понастоящем заменена от хипотеза за множество "удари". Става ясно, че инсулиновата резистентност, оксидативният стрес, генетични и епигенетични фактори, чревната микробиота са само някои от отговорниците за появата и задълбочаването на това патологично състояние (Abenavoli et al., 2021).

При инсулинова резистентност се активират процеси, улесняващи интрахепаталната липидна акумулация. Повишената липолиза води до по-висока серумна концентрация на свободни мастни киселини; хипергликемията стимулира синтеза на мастни киселини в черния дроб; хиперинсулинемията и хипергликемията потискат бета-окислението на мастните киселини и потенцират липогенезата в черния дроб (Kucera and Cervinkova, 2014). НМЧБ и неалкохолният стеатохепатит са разглеждани още като митохондриални болести. Убедителни данни сочат, че митохондриалната дисфункция предшества развитието на инсулинова резистентност и на НМЧБ (Dornas and Schuppan, 2020). Увредите на митохондриално ниво могат да компрометират окислението на мастните киселини, да генерират извънредни количества свободни кислородни радикали, както и токсични липидни междинни продукти (Dornas and Schuppan, 2020).

Следващият механизъм на субклетъчно ниво на чернодробна увреда при стеатоза, както и двигател за прогресията ѝ до неалкохолен стеатохепатит, е увеличеният стрес на ендоплазмения ретикулум. Извънредното количество свободни кислородни радикали, първоначално генерирани от хранителното свръхнатоварване и впоследствие

мултиплицирани от множеството патологични пътища, действащи при МС, не могат да бъдат овладяни от пероксизомите и се разпростират до ендоплазмения ретикулум, където променят нормалната среда, необходима за протеиновото нагъване. Хроничният стрес на ендоплазмения ретикулум се асоциира с липотоксичност, инсулинова резистентност (не само в черния дроб, но и в мастната тъкан) и възпаление (Zhang et al., 2014). С оглед на това хепатопротективният ефект на ПСХМ, манифестиран в настоящото изследване, вероятно се дължи поне отчасти на силните антиоксидантни свойства на сока.

За полифенолите в състава на ПСХМ са докладвани хепатопротективни свойства. Вследствие на противовъзпалителното, антиоксидантното, антиангиогенно и антиметастатично действие, ваниловата киселина оказва протективни ефекти спрямо черния дроб като може да таргетира почти всички метаболитни аномалии при неалкохолна мастна чернодробна болест като чернодробна стеатоза, възпаление и чернодробна увреда (Shekari et al., 2021). Активацията на аденозин-монофосфат активирания протеин киназа (АМПК) се спряга за един от основните механизми на тези ефекти (Shekari et al., 2021). АМПК е главен регулатор на енергийната хомеостаза в организма и се смята за възможен терапевтичен таргет при хронични заболявания, вкл. при МС. Същият механизъм на действие се споделя и от други полифеноли в състава на ПСХМ като особено много данни има за кверцетин (Kim et al., 2016). Нарингин модулира сигнални пътища, участващи в метаболизма на мастните киселини като засилва тяхното окисление, предотвратява липидната акумулация в черния дроб и очувствява хепатоцитите към действието на инсулина (Salehi et al., 2019).

За по-голямата част от полифенолите в състава на ПСХМ съществуват сведения, че увеличават експресията на PPAR α в черния дроб (Domínguez-Avila et al., 2016) – транскрипционен фактор, който модулира енергийния метаболизъм в черния дроб и е очертан като възможен таргет за повлияване на НМЧБ, неалкохолен стеатохепатит, МС, невродегенеративни и сърдечно-съдови заболявания (Todisco et al., 2022; Lin et al., 2022). Нивата на адипокините също имат отношение към развитието, прогресията и тежестта на НМЧБ. Повишаването на серумните стойности на адипонектин например е очертано като възможна интервенция, подобряваща хода на състоянието (Shabalala et al., 2020). Някои полифеноли повлияват адипонектин чрез повишаване на експресията му или тази на

рецепторите AdipoR1 и AdipoR2 – такива предклинични данни има за хлорогеновата киселина и за кверцетина (Shabalala et al., 2020).

Благоприятното влияние на ПСХМ върху чернодробните прояви на МС би могло да се дължи също на съдържащите се в него каротеноиди. Те проявяват изявено противовъзпалително и антиоксидантно действие, модулирайки редица вътреклетъчни сигнални пътища. В експеримент с мишки на високохолестеролова високомазнинна диета приложението на бета криптоксантин води до потискане на стеатозата чрез промяна на генната експресия на гени, въввлечени във възпалителни процеси, инфилтрация и активация на макрофаги и други левкоцити, регулация количеството на Т-клетки и улавяне на свободни радикали (Yilmaz et al., 2015).

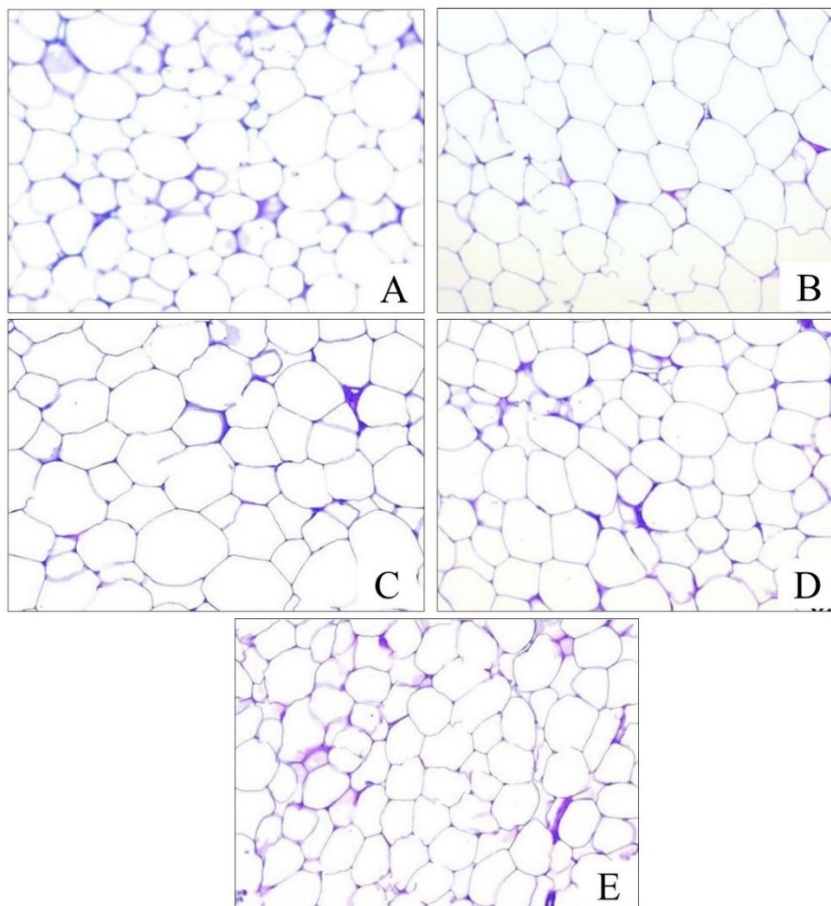
В кохортно проучване с 2017 участници, проследени за период от 4 години, се открива лонгитудинална асоциация на обема на висцералната мастна тъкан с честотата на НМЧБ (Kim et al., 2016). Описаният в настоящото изследване ефект на ПСХМ в посока редуциране на висцералното затлъстяване вследствие на високофруктозната високомазнинна диета вероятно е един от механизмите, въввлечени в хепатопротективното действие на сока.

Фруктозата, която е основен компонент на използвания модел на МС, е един от четирите хранителни субстрата, неподлежащи на инсулинова регулация, наред с транс мазнините, аминокиселините с разклонена верига и етанола (Bremer et al., 2012). Така неограничени количества междинни метаболити биват отведени до чернодробните митохондрии, стимулирайки ектопичното натрупване на липиди в черния дроб (Bremer et al., 2012). Затова се натрупват все повече данни, че именно тези са хранителните фактори опосредстващи генезата и прогресията на НМЧБ и МС.

7. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в хистопатологично изследване на мастна тъкан

7.1. Резултати

Резултатите от хистологичното изследване на мастна тъкан са представени на **Фигура 17**. В контролната група се наблюдава нормална структура на мастната тъкан и нормална големина на адипоцитите. При плъховете от група МС се откриват адипоцити с увеличени размери спрямо група Контрола. Третирането с ПСХМ във всички използвани дози води до предотвратяване настъпването на индуцираните от високофруктозната високомазнинна диета промени и в най-високата доза запазва нормалната големина на адипоцитите, каквато се наблюдава в група Контрола.



Фигура 17. Микроскопски вид на мастна тъкан от групи Контрола (панел А), МС (панел В), МС+ПСХМ2.5 (панел С), МС+ПСХМ5 (панел D) и МС+ПСХМ10 (панел Е); оцветяване с хематоксилин-еозин, увеличение x 200.

7.2. Обсъждане

Затлъстяването се дефинира като индекс на телесната маса ≥ 30 кг/м², докато за наднормено тегло се говори при стойност на индекса между 25 и 29.9 кг/м². В днешно време затлъстяването се откроява като едно от най-сериозните здравни предизвикателства в глобален план. То заема своето място като тригер и двигател на МС, неговите компоненти и свързаните с него заболявания, вкл. увеличен риск за определени неопластични заболявания като чернодробен, панкреасен, бъбречен, колоректален рак, рак на гърдата и ендометриума и др. За всеки 5 единици увеличение над 25 кг/м² в ВМІ общата смъртност се увеличава с 29 %, сърдечно-съдовата смъртност – с 41 %, а тази, свързана с диабет – с 210 % (Arovián, 2016). Адипоцитната хипертрофия, наблюдавана при затлъстяване, е последвана от локално натрупване на имунни клетки в мастната тъкан, които са основен двигател на метавъзпалението (Catalán et al., 2018). Последното в комбинация с повишения оксидативен стрес и хипоксията на мастните клетки, отдалечени от кръвоносните съдове, оказват пагубен ефект върху метаболитното здраве (Catalán et al., 2018). Намалването на телесното тегло е основна стратегия в борбата с МС и значително подобрява прогнозата на пациенти, засегнати от синдрома. Затлъстяването води след себе си нарушения в глюкозния и липидния метаболизъм, оксидативен стрес и възпаление. В настоящото изследване ПСХМ проявява антиобезно действие, като предотвратява индуцираното от високомазнинната високофруктозна диета уголемяване на адипоцитите, както се вижда от хистологичното изследване, което е в синхрон с вече обсъдената редукция на индексите на висцералната, мезентериалната и паранефралната мастна тъкан. Антиобезните ефекти на полифенолите включват механизми като ензимна инхибиция, потискане на неврохормони свързани с приема на храна и чувството за ситост и индукция на митохондриалната биогенеза (Aloo et al., 2023). Те понижават липогенезата, ускоряват липолизата, повлияват енергийния прием, енергийния разход и диференциацията и пролиферацията на преадипоцити (Siddiqui et al., 2023). Ин виво експеримент с мишки на високофруктозна високомазнинна диета показва, че ваниловата киселина допринася за подобрен глюкозен толеранс и намалена инсулинова резистентност, като промотира термогенезата в кафявата мастна тъкан (Han et al., 2018). В 9-седмично плацебо-контролирано клинично проучване при здрави мъже приемът на плодов сок, богат на антоцианини, води до редукция на мастната тъкан и увеличаване на телесната маса,

свободна от мазнини (Bakuradze et al., 2019). Както вече бе споменато един от множеството механизми, въввлечени в патогенезата на затлъстяването, е нарушението на централната енергийна регулация в хипоталамуса. Високофруктозната високомазнинна диета е директен източник на AGEs, както и предпоставка за повишената им ендогенна продукция. Установено е, че полифенолите водят до понижаване нивата на AGEs, следователно предотвратяване на AGEs-стимулираното възпаление в хипоталамуса би могъл да бъде един от възможните механизми на антиобезогенните им ефекти (Xie and Chen, 2013; Sergi et al., 2020).

Все по-често в научната литература става въпрос за „затлъстяване, индуцирано от чревната микробиота“ (Liu et al., 2021). Абнормната чревна микробиота може да има обезогенен ефект поради регулиращите си ефекти върху калорийния прием, чувството за апетит, циркадните ритми и хроничното възпаление (Liu et al., 2021). При затлъстяване най-често се наблюдава повишено съотношение между родовете *Firmicutes/ Bacteroidetes*. Нарушения в състава на чревната микробиота компрометират и чревната бариерна функция, което води до навлизане в кръвта на бактериални фрагменти, провокиращи възпаление и превръщащи се в предпоставка за развитие на затлъстяване и инсулинова резистентност (Patterson et al., 2016). Както вече бе обсъдено, модулирането на чревната микробиота е един от механизмите, по които полифенолите постигат своите биологични ефекти. Предвид лимитираната резорбция на полифенолите в тънките черва и тяхното акумулиране в дебелите черва, където се метаболизират от чревната микробиота, не е учудващо, че съставът на микробиотата също е определящ за осъществяване ефектите на полифенолите и връзката е двупосочна. Установено е, че проантоцианидините стимулират развитието на *Akkermansia muciniphila*, която предизвиква противовъзпалителни ефекти и благоприятни свойства при затлъстяване и диабет (Redondo-Castillejo et al., 2023). Те подпомагат и развитието на редица бутират-продуциращи бактерии (Redondo-Castillejo et al., 2023). Бутиратът е късоверижна мастна киселина с доказани свойства при МС, дължащи се на рецепторно действие и на епигенетична модулация (Bridgeman et al., 2020). В 6-седмичен експеримент с мишки приложението на хлорогенова киселина редуцира дисбиозата вследствие на високомазнинна диета, телесното тегло, плазмените липиди и повлиява mRNA експресията на гени, свързани с липогенезата и липолизата (Wang et al., 2019).

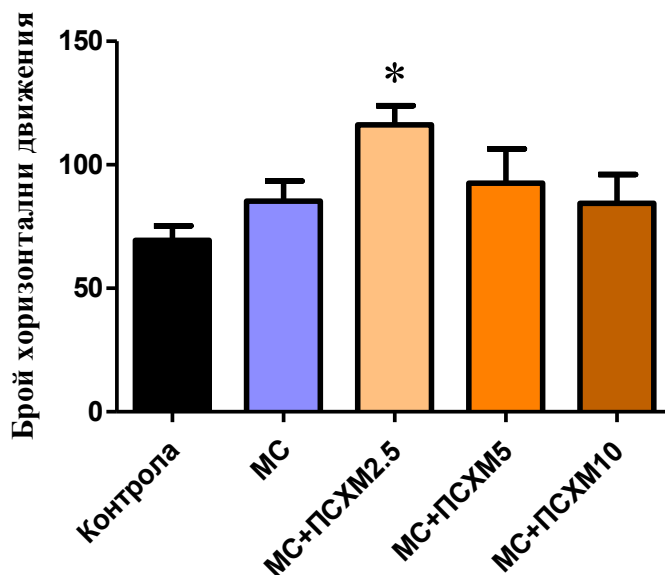
8. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху поведението на плъхове с диетично-индуциран метаболитен синдром

8.1. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест открито поле

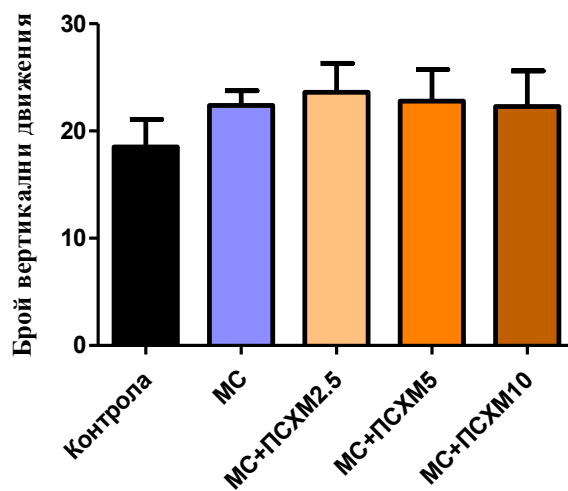
Чрез тест открито поле се изследва локомоторната активност на опитните животни. Резултатите от проведения тест са представени на **Таблица 9** и **Фигури 18** и **19**. Те показват, че броят хоризонтални движения е леко повишен както в група МС, така и в трите групи, третирани с ПСХМ, като при група МС+ПСХМ2.5 резултатът е статистически значим спрямо група Контрола ($p=0.0361$). Не се отчита промяна в локомоторната активност на животните, приемащи ПСХМ, спрямо група МС. Броят вертикални движения остава неповлиян от третирането с ПСХМ. Времето, прекарано в централната област, и броят влизания в централната област не се различават сигнификантно в експерименталните групи.

Таблица 9. Брой хоризонтални и вертикални движения, време, прекарано в централната област, и брой влизания в централната област в тест открито поле при плъхове с диетично индуциран МС след третиране с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг. * $p<0.05$ спрямо Контрола.

Групи животни	Хоризонтални движения	Вертикални движения	Време в централната област	Брой влизания в централната област
Контрола	69.4±5.916	18.5±2.592	21.3±4.088	2.8±0.6289
МС	85.3±8.099	22.4±1.368	16.79±3.006	2.2±0.5735
МС+ПСХМ2.5	116.2±7.724*	23.6±2.713	13.23±1.708	3.7±1.033
МС+ПСХМ5	92.6±13.85	22.8±2.936	14.4±1.812	2.4±0.5812
МС+ПСХМ10	84.4±11.66	22.3±3.303	12.7±1.836	2.4±0.6700



Фигура 18. Брой хоризонтални движения в тест открито поле на плъхове с диетично индуциран МС и третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг. * $p < 0.05$ спрямо Контрола



Фигура 19. Брой вертикални движения в тест открито поле на плъхове с диетично индуциран МС и третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг

8.2. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху нивата на тревожност

8.2.1. Ефекти в тест повдигнат кръстосан лабиринт

Резултатите от теста повдигнат кръстосан лабиринт са представени на **Таблица 10**. Третирането с ПСХМ води до повишаване на времето, прекарано в отворените рамена на апарата. One-way ANOVA с пост тест за линейна тенденция показва положителна линейна тенденция ($p=0.0354$), както се вижда на **Фигура 20**. В броя влизания в отворените рамена не се открива статистически значима разлика между експерименталните групи, както показва **Фигура 21**.

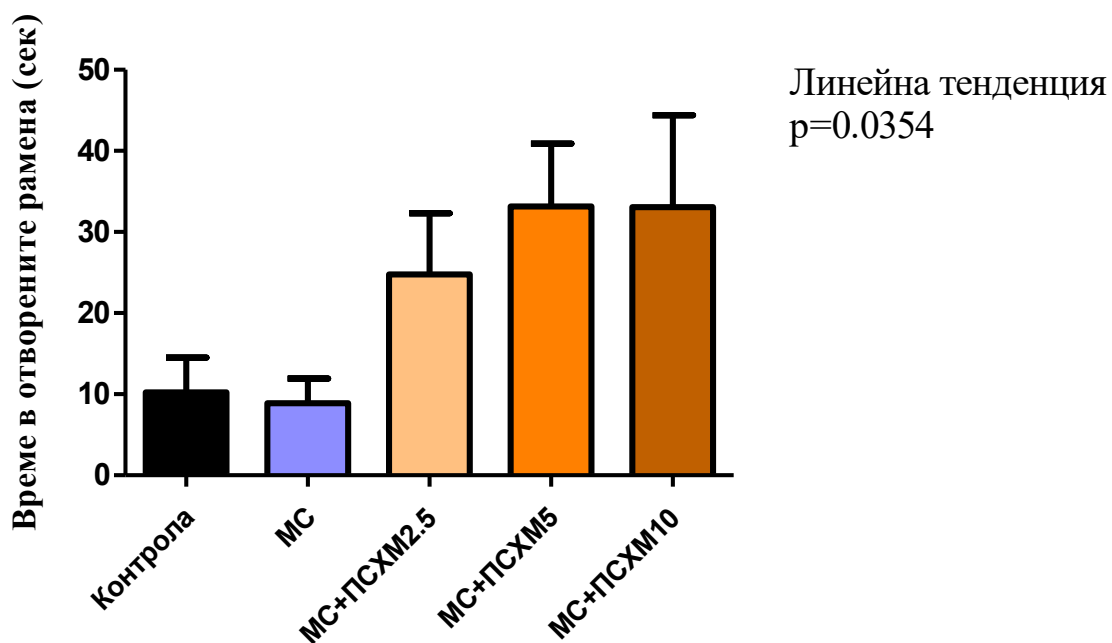
Съотношението между време, прекарано в отворените рамена, и общо време, прекарано във всички рамена, се повишава от третирането с ПСХМ. Пост тестът за линейна тенденция на това съотношение показва положителна линейна тенденция ($p=0.0335$), както се вижда на **Фигура 22**.

Съотношението брой влизания в отворените рамена спрямо брой влизания в което и да е от рамената показва тенденция към повишаване, но без достигане на статистическа значимост на резултата. Данните са представени на **Фигура 23**.

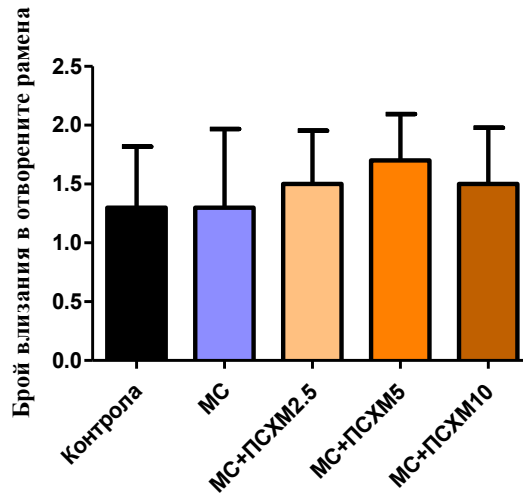
Двигателната активност, измерена като общ брой влизания в което и да е от рамената, не се различава значимо между групите.

Таблица 10. Време, прекарано в отворените рамена, брой влизания в отворените рамена, съотношение време в отворените към общо време във всички рамена, съотношение брой влизания в отворените към общ брой влизания във всички рамена и двигателна активност, представена като общ брой влизания в отворените и в затворените рамена, при тест с повдигнат кръстосан лабиринт на плъхове с диетично индуциран МС и третиране с ПСХМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг.

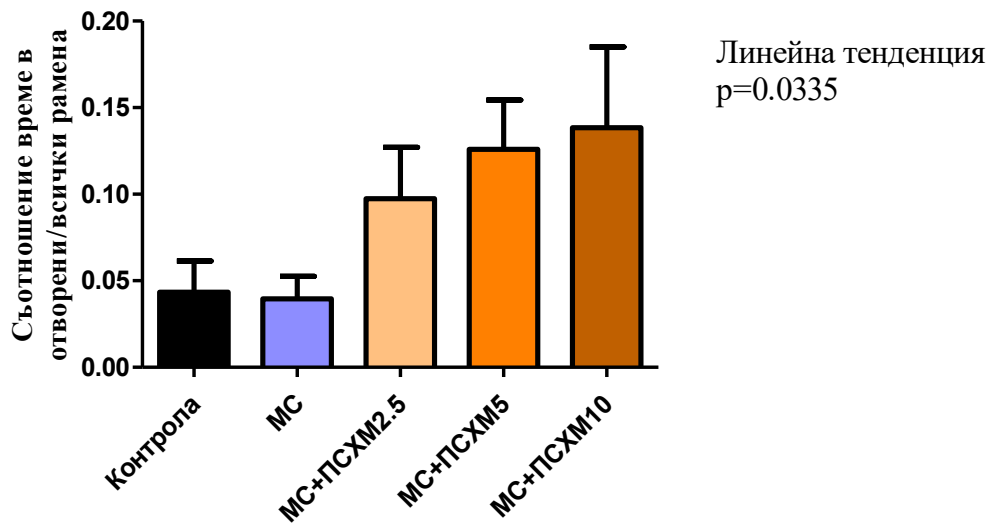
Групи животни	Време в отворените рамена	Брой влизания в отворените рамена	Съотношение брой влизания в отворените/общ брой влизания във всички рамена	Съотношение време в отворените рамена/общо време	Двигателна активност
Контрола	10.21±4.297	1.3±0.518	0.067±0.023	0.044±0.018	11.90±0.888
МС	8.89±3.054	1.3±0.668	0.068±0.025	0.040±0.013	11.60±1.392
МС+ПСХМ2.5	24.77±7.543	1.5±0.453	0.116±0.039	0.097±0.030	9.444±1.529
МС+ПСХМ5	33.14±7.771	1.7±0.396	0.148±0.039	0.126±0.028	9.200±1.298
МС+ПСХМ10	33.06±11.32	1.5±0.477	0.140±0.041	0.139±0.047	10.30±1.407



Фигура 20. Време, прекарано в отворените рамена при тест повдигнат кръстосан лабиринт при плъхове с диетично индуциран МС, третирани с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг. Положителна линейна тенденция: p<0.04.

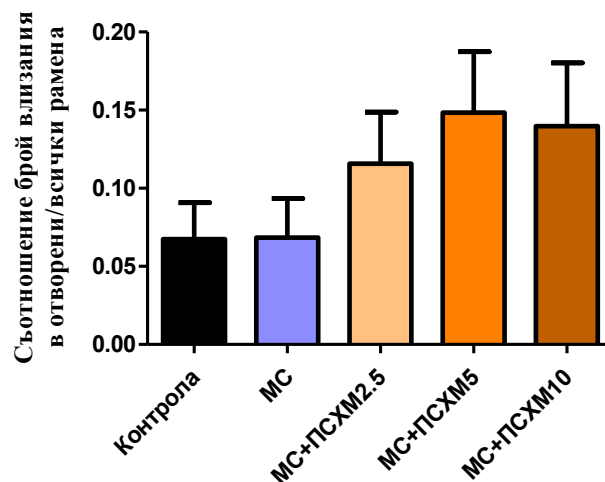


Фигура 21. Брой влизания в отворените рамена на тест повдигнат кръстосан лабиринт при плъхове с диетично индуциран МС, третиран с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг



Фигура 22. Съотношение време, прекарано в отворените рамена, към общо време прекарано във всички рамена на тест повдигнат кръстосан лабиринт при плъхове с диетично индуциран МС, третиран с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг.

Положителна линейна тенденция: $p < 0.04$



Фигура 23. Съотношение брой влизания в отворените рамена към общ брой влизания във всички рамена на тест повдигнат кръстосан лабиринт при плъхове с диетично индуциран МС, третирани с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг

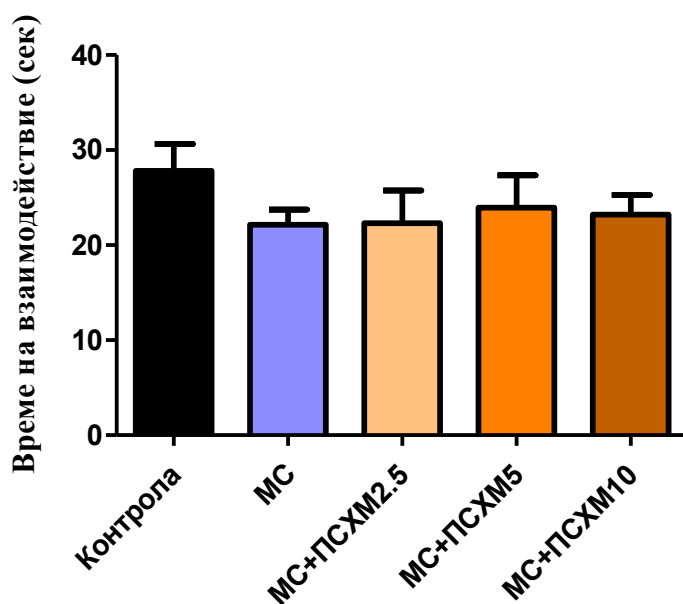
8.2.2. Ефекти в тест за социално взаимодействие

Чрез тест за социално взаимодействие се измерва времето на социален контакт между опитните животни, като удължаването му се интерпретира като намаляване на тревожността. Резултатите от теста са представени на **Таблица 11** и **Фигура 24** и показват, че стойностите в група МС са понижени спрямо контролната група (22.16 ± 1.596 спрямо 27.83 ± 2.818), но без достигане на статистическа значимост. Времето на социално взаимодействие при животните, третирани с ПСХМ, не се различава значимо от това на животните в група МС.

Таблица 11. Време на социално взаимодействие при плъхове с диетично индуциран МС след третиране с 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг плодов сок от *Chaenomeles maulei*.

Групи животни	Време на социално взаимодействие (сек)
Контрола	27.83 ± 2.818
МС	22.16 ± 1.596

МС+ПСХМ2.5	22.33±3.415
МС+ПСХМ5	23.94±3.413
МС+ПСХМ10	23.23±2.048



Фигура 24. Ефект на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг върху времето на социално взаимодействие при плъхове с МС

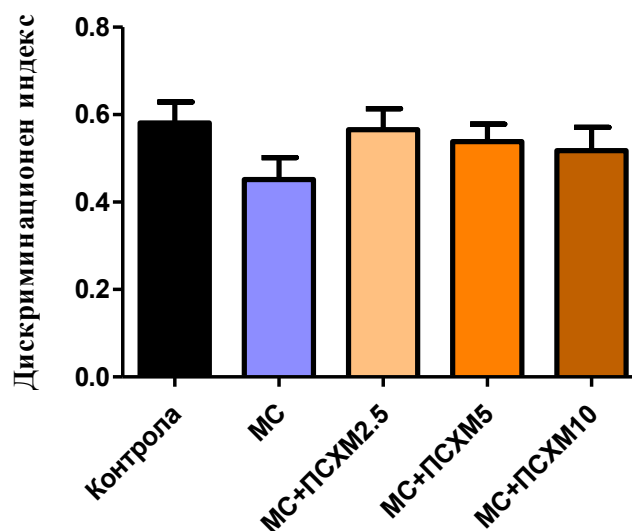
8.3. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху пространствената памет в тест за местоположение на предмети

Чрез тест за разпознаване на местоположение на предмети се изследва пространствената памет на опитните животни. По-високи стойности на дискриминационния индекс ($B/(A+B)$) се интерпретират като подобряване на пространствената памет. Резултатите от проведения тест са представени на **Таблица 12** и **Фигура 25**. Те сочат, че дискриминационният индекс при животните от група МС има по-ниски стойности спрямо контролната група, макар че разликата не достига статистическа значимост. Третирането с ПСХМ предотвратява това понижение като и при трите групи - МС+ПСХМ2.5,

МС+ПСХМ5 и МС+ПСХМ10 – стойностите на индекса са сравними с тези при група Контрола.

Таблица 12. Дискриминационен индекс $B/(A+B)$ при тест за разпознаване на местоположение на предмети при плъхове с диетично индуциран МС и третиране с 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг ПСХМ.

Групи животни	Дискриминационен индекс $B/(A+B)$
Контрола	0.581±0.048
МС	0.452±0.050
МС+ПСХМ2.5	0.566±0.048
МС+ПСХМ5	0.538±0.040
МС+ПСХМ10	0.518±0.053



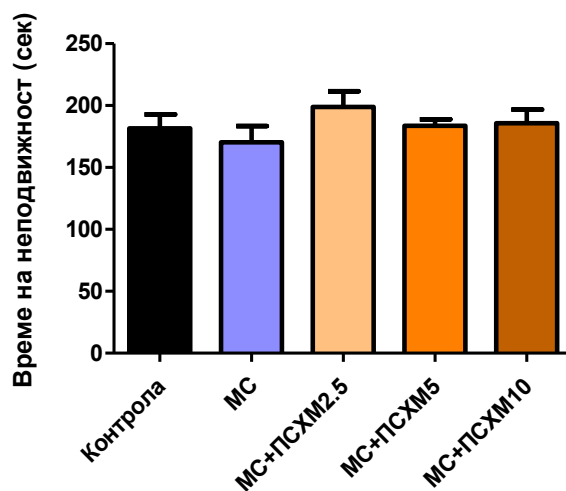
Фигура 25. Дискриминационен индекс $B/(A+B)$ при тест за разпознаване на местоположение на предмети при плъхове с диетично индуциран МС и третиране с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг

8.4. Ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху депресивната симптоматика в тест с принудително плуване

Резултатите от теста с принудително плуване са показани на Таблица 13 и Фигура 26. Статистическият анализ не разкрива значима разлика във времето на неподвижност в изследваните групи животни. В група Контрола времето, прекарано в неподвижност, е 181.6 ± 11.23 сек. В група МС се наблюдава незначимо понижаване на времето (170.2 ± 13.21) спрямо контролната група. В групите, третирани с ПСХМ, се отчита незначимо повишаване на времето на неподвижност спрямо група МС.

Таблица 13. Време на неподвижност в тест с принудително плуване при плъхове с диетично индуциран МС, третирани с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг.

Групи животни	Време на неподвижност (сек)
Контрола	181.6 ± 11.23
МС	170.2 ± 13.21
МС+ПСХМ2.5	198.8 ± 12.70
МС+ПСХМ5	183.6 ± 5.237
МС+ПСХМ10	185.8 ± 11.06



Фигура 26. Време на неподвижност в тест с принудително плуване при плъхове с диетично индуциран МС, третирани с ПСХМ в дози 2.5 мл/кг, 5 мл/кг и 10 мл/кг

8.5. Обсъждане

Поведенческите тестове са важна част от експерименталните изследвания на когнитивните ефекти на физиологични и патологични промени в организма и позволяват оценка на невронната функция на определени области на мозъка чрез анализиране на поведението в контролирана среда (Denninger et al., 2018). Обработването, съхранението и експресията на поведения, свързани със страх и тревожност, се медиатират от няколко мозъчни области, включително амигдалата и нейните връзки с таламуса, средния префронтален кортекс, хипокампуса, хипоталамуса, bed nucleus of stria terminalis, мозъчния ствол и периакведукталното сиво вещество (Sartori et al., 2019). МС често се свързва с тревожност (Ji et al., 2023), депресия и други когнитивни и невропсихични разстройства, като последните от своя страна също могат да станат предпоставка за развитие на МС, повлиявайки хранителните и спортните навици на индивида, както и склонността му да се придържа към определен терапевтичен режим. Множество аспекти на когнитивната функция могат да бъдат компрометирани вследствие на МС – скорост на обработка на информацията, памет, семантични умения, визуално-пространствени способности, възможност за задържане на вниманието и езекутивни функции (Guicciardi et al., 2019).

Резултатите от теста открито поле не показват значително влияние на ПСХМ върху локомоторната активност на животните. Въпреки че в групата, получаваща най-ниската доза на сока се открива известно повишение на броя хоризонтални движения спрямо група Контрола, то спрямо група МС ефектът няма статистическа значимост. Липсата на промяна в локомоторната активност се потвърждава и от резултатите от тест повдигнат кръстосан лабиринт.

Повдигнатият кръстосан лабиринт е добре утвърден тест за измерване нивото на тревожност при гризачи. Основава се на естественото избягващо поведение на плъховете спрямо нови открити пространства, както и страх от балансиране върху тясна, повдигната платформа, като в същото време се наблюдава и спонтанно проучвателно поведение от страна на плъховете. Настоящото проучване показва, че хроничното третиране на плъхове в модел на МС с ПСХМ води до доза-зависимо увеличаване на времето, прекарано в отворените рамена на апарата, което свидетелства за анксиолитичен ефект. Тези резултати

съответстват на наблюдавания анксиолитичен ефект от приложението на ПСХМ при здрави животни (Borisova et al., 2018), както и при плъхове, подложени на мек стрес индуциран чрез нарушаване на циркадианния ритъм (Borisova et al., 2023). И в двата споменати експеримента е използвано субхронично приложение, при което не се отчита доза-зависимост на ефекта, докато при настоящото проучване с хронично приложение се откроява доза-зависимият характер.

Много от субстанциите, съдържащи се в ПСХМ оказват значително невропсихиатрично въздействие. Анксиолитичен ефект е описан за ванилова (Vestegani et al., 2022), кафеена (Monteiro et al., 2020), хлорогенова (Chen et al., 2021) и р-кумарова киселина (Sheepens et al., 2014). Възможните механизми включват взаимодействие с GABA-A рецепторите. Някои от флаванолите, откривани в сока, като кверцетин например, вероятно споделят този механизъм (Islam et al., 2022), докато за други като кемпферол е описана ин витро инхибиция на fatty acid amide hydrolase – ензим, който е част от ендоканабиноидната система (Silva Dos Santos et al., 2021). Кверцетинът показва обратима инхибиторна активност спрямо моноаминоксидазата – ензим, участващ в разграждането на серотонина (Grabska-Kobyłeczka et al., 2023).

Важна характеристика, обединяваща актуалните в момента фармакологични (например селективните серотонинови реърптейк инхибитори - SSRIs) и нефармакологични (когнитивно-поведенческа терапия) подходи към тревожността, е тяхната способност да повлияват синаптичната пластичност (Sartori et al., 2019). Проучванията показват, че флавоноидите имат способност да повишават експресията на гени и протеини, касаещи синаптичната пластичност. Неврогенезата в хипокампа на възрастния човек е поне отчасти отговорна за ползотворните ефекти на полифенолите при тревожност и депресия (Dias et al., 2012). Кверцетин увеличава неврогенезата и синаптогенезата (Tchantchou et al., 2009). Активирането на мозъчния невротрофичен фактор - BDNF - е един от посочените механизми на благоприятно неврокогнитивно влияние на някои полифеноли (Grabska-Kobyłeczka et al., 2023).

Смята се, че едно от свързващите звена между тревожността и МС е възпалението. При пациенти с тревожност са измервани по-високи нива на проинфламаторни цитокини (Kumar et al., 2023). Тъй като при хора е трудно да се получат директни данни за

невровъзпалението, често се измерват периферни възпалителни и коагулационни маркери. Големи кохортни проучвания показват позитивна корелация между тревожността и С-реактивен протеин, интерлевкин-6, хомоцистеин, фибриноген, TNF- α и броят на белите кръвни клетки (Pitsavos et al., 2006; Vogelzangs et al., 2013). Полифенолите осъществяват противовъзпалителните си ефекти чрез множество механизми, включително модулация на популациите на имунни клетки, продукцията на цитокини и експресията на инфламаторни гени (Yahfoufi et al., 2018).

Чрез тест за социално взаимодействие се измерва времето на социален контакт между опитните животни, като удължаването му се интерпретира като намаляване на тревожността. В настоящия експеримент времето на социално взаимодействие при животните, консумиращи високофруктозна високомазнинна диета, показва по-ниски стойности спрямо плъховете от група Контрола без достигане на статистическа значимост. Това би могло да се дължи на повишаване нивото на тревожност при животните с МС. Времето на социално взаимодействие при третираниите с ПСХМ групи не се различава значимо от това на животните в група МС. Следователно при това изследване не се наблюдава анксиолитичен ефект вследствие на третирането с ПСХМ в използваните дози.

Тестът за местоположение на предмети предлага начин за оценка на пространствената памет, като основната мозъчна структура, въввлечена в изследваните при теста процеси, е хипокампусът (Denninger et al., 2018). Тестът разчита на естественото предпочитание на плъховете към новостите и се базира на това, че ако животното помни разположението на предметите при първоначалната си експозиция, то прекарва повече време в проучване на преместения предмет (Denninger et al., 2018). В настоящото изследване експерименталните животни от група МС прекарват по-малко време в изучаване на преместения предмет, както се демонстрира от стойностите на дискриминационния индекс, което говори за нарушение на пространствената памет – компонент, често засегнат при развитието на МС. ПСХМ предотвратява това патологично влияние на диетичната манипулация, като и в трите използвани дози води до стойности на дискриминационния индекс сравними с тези при група Контрола.

Тестът за принудително плуване е често използван в експерименталната фармакология за изучаване на депресивно-подобно поведение при гризачите. Той се базира на естествените

първоначални опити на плъха да избяга от контейнера с вода, които биват последвани от състояние на неподвижност. Последното би могло да се тълкува като белег за отчаяние. Тестът се използва за оценка на влиянието на фармакологично активни вещества върху депресивно-подобната симптоматика. В настоящото изследване в теста с принудително плуване не се наблюдава антидепресантно действие вследствие третиране на животните с ПСХМ. Тези данни наподобяват находката при здрави мъжки плъхове, третирани с ПСХМ (Borisova et al., 2019). От друга страна Borisova-Nenova et al. (2023) наблюдават понижено време, прекарано в неподвижност, при тест с принудително плуване на плъхове, получаващи ПСХМ и подложени на нарушен циркадианен ритъм. Тези данни вероятно свидетелстват, че полифенолният състав на ПСХМ допринася за възпрепятстване развитието на депресивната симптоматика вследствие на изолирана циркадна дисритмия, но не повлиява сигнификантно патогенетичните механизми с депресогенно действие в контекста на МС.

9. Обобщена дискусия

Диетичната манипулация е основен инструмент за създаването на експериментални модели на МС при гризачи. Настоящото изследване потвърждава удачността на високофруктозната високомазнинна диета за пресъздаване на висцерално затлъстяване, инсулинова резистентност, нарушен глюкозен толеранс, хипертриглицеридемия, понижаване на естествените антиоксидантни защитни механизми и органна увреда в миокард, кръвоносни съдове и черен дроб в рамките на МС. При проучване на НМЧБ – основната манифестация на МС в черния дроб – експерименталните модели при животни имат още по-голямо значение, тъй като златен стандарт в диагностиката и проследяване на прогресията на заболяването е чернодробната биопсия – изследване с ограничена приложимост в клинични условия поради инвазивния си характер. Както беше отбелязано, има значително припокриване между експерименталните модели на МС и на НМЧБ. Сред моделите на НМЧБ обаче не винаги хистологичните данни са в комбинация с развитие на всички компоненти, движещи патогенезата на заболяването при хора, т.е. точността и релевантността на модела е субмаксимална. Предвид факта, че хистологичната находка в черен дроб при настоящия експеримент се наблюдава в комбинация с инсулинова резистентност, висцерално затлъстяване, дислипидемия и нарушен глюкозен толеранс при опитните животни, има основания да се смята, че моделът може да бъде използван като успешен такъв не само за пресъздаване на МС, но и на НМЧБ.

Приносът на небалансираното хранене за генезата на МС е отдавна известен, а прекомерното количество наситени мазнини е широко познат рисков фактор не само сред специалисти в областта, а и сред обществото. Това намира отражение в състава на храните и хранителните препоръки през последните десетилетия и консумацията на наситени мазнини не бележи подем през този период. В същото време обаче честотата на МС расте, като това привидно несъответствие може да се отдаде на главоломно нарастващия прием на преработени въглехидрати, особено на фруктоза. В този ред на мисли използваната в експеримента диета отразява актуалните тенденции, стоящи зад повишената заболеваемост от МС.

Основен принос за благоприятните ефекти на ПСХМ, демонстрирани в експерименталния модел на МС, вероятно има богатото полифенолно съдържание на сока. Действието на

полифенолите е актуален и дискуссионен въпрос с някои персистиращи противоречия между ин витро, ин vivo и клиничните данни за техните ефекти. Прави впечатление, че метаболитната мрежа от адипокини, миокини и кардиокини, заемаща ключова позиция в патогенезата на МС, бива значително повлияна както от храненето, така и от физическата активност. Това може би е една от биологичните особености, обуславящи някои от споменатите различията в резултатите от приложението на полифенолите в експериментални и в клинични проучвания – докато при гризачи възможностите за физическо движение са относително стандартизирани, поради еднаквите условия, при които се отглеждат, то индивидуалните вариации при хора са достатъчно значими да наклонят везните в една или в друга посока. Друго несъответствие произхожда от бионаличността на полифенолите. Въпреки че тя е вариабилна и по-често ниска за повечето полифеноли, нарастващи данни сочат, че всъщност бионаличността е доста по-висока, когато се вземат предвид метаболитите, получени под въздействието на чревната микробиота.

Оксидативният стрес и хроничното възпаление водят до митохондриална дисфункция и клетъчна увреда. И двата патологични процеса подлежат на модулация от приема на полифеноли. Нарастват данните за благоприятното въздействие на полифенолите върху баланса на адипокините. И докато адипокините са широко коментирана тема в научната литература през последните години, мястото на миокините в контекста на метаболитните нарушения тепърва започва да се очертава. Освен че се секретират от мускулните клетки при физическа дейност и са едни от факторите, медиращи неоспоримите здравословни ефекти на спорта, те могат да бъдат повлияни от различни хранителни интервенции, сред които обещаващ изглежда приемът на полифеноли. Това е една от посоките, в които биха могли да бъдат насочени по-нататъшни изследвания за охарактеризиране на връзката между МС и полифеноли.

През последните десетилетия затлъстяването придобива епидемичен характер. Сравнително разочароващия исторически опит с лекарства против затлъстяване, било то заради ограничена ефективност или нетолерируеми странични ефекти, задържа обектива на внимание върху естествени подходи в превенцията и терапията му. Приемът на функционални храни провокира голям интерес сред обществото поради своята удачност и

достъпност. Като функционална храна може да се разглежда и плодовият сок от *Chaenomeles maulei*, който в настоящия експеримент демонстрира антиобезни свойства. Предотвратяването на натрупване на мастна тъкан както във висцералните депа, така и ектопично – например в черния дроб – е ефект оползотворим в контекста на нарастващия здравен, икономически и социален товар на диета-индуцираните хронични заболявания. В комбинация с кардиопротективното действие и антиоксидантните свойства, приемът на ПСХМ се очертава като уместна интервенция за ограничаване на пагубните ефекти на небалансираното хранене върху метаболитното здраве.

Когато става въпрос за благоприятното влияние на полифенолите върху нервната система, заздравяването на кръвно-мозъчната бариера, подобряването на мозъчния кръвоток, подобряването на когнитивните възможности и регулацията на настроението са някои от описваните в литературата ефекти. Те могат да бъдат осъществени директно – от тези представители, които ефективно преминават през кръвно-мозъчната бариера – или индиректно, повлиявайки чревната микробиота и вторично адресирайки процеси в централната нервна система. Комбинацията от полифеноли в състава на ПСХМ потвърждава потенциала на тези фитонутриенти да регулират настроението, като показва анксиолитично-подобен ефект при животните в настоящия експеримент с диетично-индуциран МС. Интересно е, че хипокампалната неврогенеза във възрастния организъм, която е въввлечена в медиране ползотворните ефекти на полифенолите при разстройства на настроението и когницията, зависи не само от състава на храната, но и от нейната текстура, като според някои от хипотезите самият процес на дъвчене има отношение към регулацията на хипокампалната неврогенеза (Stangl and Thuret., 2009). Освен това съществува изобилие от данни, че бионаличността и биологичната активност на полифенолите са тясно свързани с хранителния матрикс, с който се приемат. В този ред на мисли при пренасяне на настоящото изследване на клинично ниво би било интригуващо да се сравнят поведенческите ефекти на сока от *Chaenomeles maulei* с тези при консумация на целите плодове с еквивалентен макро- и микронутриентен и полифенолен състав.

Въпреки сравнително безопасния профил на действие на полифенолите, някои съображения във връзка с техни възможни токсични ефекти се срещат в литературата, като те най-често засягат изолирани полифеноли под формата на екстракт, отделени от

хранителния матрикс. В този ред на мисли плодовият сок, богат на полифеноли, се очертава като по-благоприятна от гледна точка на съотношението полза-риск форма за набавяне на здравословно количество от тези биоактивни фитонутриенти. Съвместното съществуване на няколко или множество полифеноли в естествен продукт като плодов сок вероятно предлага не само по-безопасен профил на действие, но и възможни адитивни и/или супраадитивни ефекти що се отнася до потенциални здравословни ползи, част от които са демонстрирани в настоящото изследване.

V. Изводи

1. Приложението на високомазнинна високофруктозна диета в продължение на 10 седмици при мъжки плъхове от порода Wistar води до развитието на метаболитен синдром.

1.1. Развива се висцерално затлъстяване.

1.2. Откриват се биохимични нарушения, типични за метаболитния синдром – повишени стойности на кръвната глюкоза в хода на глюкозо-толерантен тест и хипертриглицеридемия.

1.3. Наблюдава се инсулинова резистентност, демонстрирана от повишените стойности на TyG индекса.

1.4. Потиснати са ендогенните механизми на антиоксидантна защита, което се демонстрира от понижената активност на супероксид дисмутаза в серума.

1.5. Има повишена липидна пероксидация, която е установена чрез покачване на стойностите на субстанции, реагиращи с тиобарбитуровата киселина, в серума.

1.6. Наблюдава се тенденция за нарушаване на пространствената памет.

1.7. Хистопатологично:

1.7.1. В мастната тъкан се наблюдава хипертрофия на адипоцитите;

1.7.2. В черния дроб се наблюдават дегенеративни промени, включващи дребнокапчеста стеатоза, чернодробна некроза и неспецифични грануломи;

1.7.3. В миокарда миоцитите са раздалечени и с дегенеративни промени;

1.7.4. В коронарните съдове се открива фокална липса на ендотел, ендотелните клетки са некротични и базалната мембрана е оголена.

2. Пероралното приложение на плодов сок от *Chaenomeles maulei* при плъхове в хода на индукцията на метаболитен синдром:

2.1. Повишава консумацията на храна в дози 5 мл/кг и 10 мл/кг.

2.2. Понижава консумацията на фруктозен разтвор в доза 5 мл/кг.

2.3. Повишава калорийния внос в дози 5 мл/кг и 10 мл/кг.

3. Пероралното приложение на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в три различни дози (2.5 мл/кг, 5.0 мл/кг и 10 мл/кг) при плъхове в хода на индукцията на метаболитен синдром предотвратява голяма част от морфометричните, биохимичните, хистопатологичните и поведенчески нарушения:

3.1. Понижава индексите на общата, мезентериалната и паранефралната мастна тъкан в доза от 5 мл/кг.

3.2. Предизвиква слаба тенденция в посока понижаване на стойностите на триглицеридите и общия холестерол.

3.3. Не повлиява глюкозната толерантност.

3.4. Предизвиква слаба тенденция в посока понижаване на TyG индекса и респективно на инсулиновата резистентност.

3.5. Подобрява антиоксидантните защитни сили на организма като противодейства на индуцираното от високомазнинната високофруктозна диета понижение в серумните стойности на супероксид дисмутаза, най-изразено в дози 2.5 и 5 мл/кг.

3.6. Доза-зависимо намалява липидната пероксидация в серума на животните като понижава стойностите на реагиращите с тиобарбитуровата киселина субстанции, най-изразено в доза 10 мл/кг.

3.7. При всички използвани дози намаляват хистологичните промени, характерни за метаболитния синдром, като в групата, получаваща най-високата доза плодов сок от *Chaenomeles maulei*:

3.7.1. Се предотвратява структурната увреда на кардиомиоцитите в миокарда;

3.7.2. Се запазват целостта на ендотела и базалната мембрана в коронарните съдове;

3.7.3. Са редуцирани дегенеративните и стеатозните изменения в черния дроб;

3.7.4. Липсва адипоцитна хипертрофия и размерът на мастните клетки остава сходен с този при контролните животни.

3.8. Не повлиява двигателната активност на животните в сравнение с тези на високомазнинна високофруктозна диета, които не получават плодов сок.

3.9. Доза-зависимо намалява нивата на тревожност при експерименталните животни на високомазнинна високофруктозна диета, за което свидетелства увеличеното време, прекарано в отворените рамена, и повишеното съотношение на време, прекарано в отворените рамена, към общо време във всички рамена при тест повдигнат кръстосан лабиринт.

3.10. Предотвратява тенденцията за нарушаване на пространствената памет, предизвикана от високомазнинната високофруктозна диета.

3.11. Не повлиява депресивната симптоматика в тест с принудително плуване.

VI. Приноси

1. За първи път са изследвани ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в експериментален модел на метаболитен синдром.
2. За първи път са изследвани ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху енергийния метаболизъм при плъхове в модел на диета-индуциран метаболитен синдром, като е установено, че той:
 - 2.1. Повишава консумацията на храна;
 - 2.2. Понижава консумацията на фруктозен разтвор;
 - 2.3. Повишава калорийния внос.
3. За първи път са изследвани ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху висцералното затлъстяване при плъхове в модел на диета-индуциран метаболитен синдром, като е установено, че той:
 - 3.1. Намалява висцералната мастна тъкан, дори и на фона на повишен калориен внос;
 - 3.2. Намалява мезентериалната мастна тъкан;
 - 3.3. Намалява паранефралната мастна тъкан.
4. За първи път са получени данни за стимулиране на антиоксидантните защитни сили на организма и намаляване на липидната пероксидация от плодов сок от *Chaenomeles maulei* при плъхове в модел на диета-индуциран метаболитен синдром.
5. За пръв път са изследвани ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху хистологията на миокард, коронарни съдове, черен дроб и мастна тъкан при плъхове в модел на диета-индуциран метаболитен синдром, като е установено, че той:
 - 5.1. Проявява доза-зависим кардио- и вазопротективен ефект;
 - 5.2. Предотвратява индуцираните от високомазнинната високофруктозна диета промени в мастната тъкан и запазва нормалната големина на адипоцитите във всички използвани дози;
 - 5.3. Води до доза-зависимо възпрепятстване на индуцираната от високомазнинната високофруктозна диета чернодробна увреда.

6. За първи път са изследвани ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху поведението на плъхове в модел на диета-индуциран метаболитен синдром, като е установено, че той:

- 6.1. Не повлиява двигателната активност;
- 6.2. Проявява доза-зависим анксиолитичен ефект;
- 6.3. Показва тенденция за подобряване на пространствената памет;
- 6.4. Не повлиява депресивната симптоматика.

7. Направените проучвания с плодов сок от *Chaenomeles maulei* допринасят за по-пълното разбиране на ефектите на сока и съдържащите се в него полифеноли в контекста на метаболитен синдром.

VII. Списък на публикациите и участията в научни форуми, свързани с дисертационния труд

1. Списък на публикациите, свързани с дисертационния труд

1.1. Moneva K, Gancheva S, Valcheva-Kuzmanova S. Chemical composition and biologic activities of different preparations of Japanese quince (*Chaenomeles japonica*). ASN 2023; 10(2): 39-54. DOI: 10.2478/asn-2023-0013.

1.2. Moneva-Marinova K, Valcheva-Kuzmanova S. Caloric restriction mimetics as a therapeutic approach to metabolic syndrome. VMF 2023.

1.3. Moneva-Marinova K, Tzaneva M, Gasanzadeeva E, Abtulov M, Salbashyan M, Eftimov M, Marinova S, Zhelyazkova-Savova M, Valcheva-Kuzmanova S. Japanese quince fruit extract exerts a cardioprotective effect in a model of diet-induced metabolic syndrome in rats. JBCR 2023; 16(2): 118-123.

1.4. Moneva-Marinova K, Rafailova E, Reyzov M, Todorova M, Eftimov M, Gancheva S, Zhelyazkova-Savova M, Valcheva-Kuzmanova S. Behavioral effects of chronic Japanese quince fruit juice administration to rats with diet-induced metabolic syndrome. Acta Medica Bulgarica 2024 (IF 2023: 0.12) [под печат]

2. Списък на участията в научни форуми, свързани с дисертационния труд

2.1. K. Moneva-Marinova, M. Tsaneva, M. Todorova, S. Gancheva, M. Eftimov, M. Reyzov, E. Rafailova, M. Zhelyazkova-Savova, S. Valcheva-Kuzmanova. Histopathological evaluation of the effects of *Chaenomeles maulei* fruit juice on the liver in rats with diet-induced metabolic syndrome. 8th Congress of Pharmacy with International Participation, 27-30 April, Borovets, Bulgaria; p.201.

2.2. Moneva-Marinova K, Eftimov M, Todorova M, Gancheva S, Reyzov M, Rafailova E, Zhelyazkova-Savova M, Valcheva-Kuzmanova S. Evaluation of the effects of *Chaenomeles*

maulei fruit juice on spatial memory and social behavior in rats with metabolic syndrome. 36th
ECNP Congress, 7-10 October 2023, Barcelona, Spain; p.2014.

