

Медицински университет Варна

Факултет „Медицина“

Катедра по фармакология и клинична фармакология и терапия

Силвия Ганчева Маринова

**ЕФЕКТИ НА ВИТАМИН К ПРИ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА МЕТАБОЛИТЕН
СИНДРОМ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен „ДОКТОР“
по научна специалност „Фармакология“

Научен ръководител

Доц. д-р Мария Делчева Желязкова-Савова, д.м.

Варна 2018 г.

Съдържание

I. Въведение	5
II. Цел и задачи	7
1. Цел	7
2. Задачи	7
III. Материали и методи	8
1. Материали	8
2. Биохимични изследвания	8
3. Методи за изследване на поведението	11
4. Статистически анализ	13
IV. Собствени резултати и дискусия	14
1. Експериментален модел на метаболитен синдром	14
1.1. Верифициране на модела от гледна точка на енергиен метаболизъм и промени в поведението	14
1.2. Промени в нивата на остеокалцина в модел на метаболитен синдром	20
1.3. Дискусия	23
2. Ефекти на витамин К при плъхове с експериментален модел на метаболитен синдром	32
2.1. Дизайн на експеримента	32
2.2. Ефекти на витамин К върху енергийния метаболизъм	32
2.3. Ефекти на витамин К върху поведението	35
2.4. Дискусия	37
3. Ефекти на warfarin при плъхове с експериментален модел на метаболитен синдром	43
3.1. Верифициране на модел на субклиничен дефицит на витамин К при интактни плъхове	43
3.2. Ефекти на warfarin при плъхове с метаболитен синдром	47
3.3. Дискусия	56

4. Ефекти на alendronate при плъхове с експериментален модел на метаболитен синдром	63
4.1. Дизайн на експеримента	63
4.2. Ефекти на alendronate върху нивата на некарбоксилация остеокалцин	64
4.3. Ефекти на alendronate върху въглехидратния метаболизъм	64
4.4. Ефекти на alendronate върху поведението	67
4.5. Дискусия	70
5. Обобщена дискусия	73
V. Изводи	76
VI. Приноси	77
VII. Списък на публикациите и участията, свързани с дисертационния труд	78

Използвани съкращения

ALD – Alendronate
ANOVA – Analysis of variance
ATP – Adenosine triphosphate
AUC – Area under curve; площ под кривата
BDNF – Brain-derived neurotrophic factor
cOC – Carboxylated osteocalcin; карбоксилиран остеокалцин
ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay
FST – Forced swim test; тест за принудително плуване
gas6 – Growth-arrest specific protein 6
gla – Gamma-carboxyglutamic acid; гама-карбоксиглутаматен остатък
GLP-1 – Glucagon-like peptide 1
glu – Glutamic acid; глутаматен остатък
GLUT – Glucose transporter; глюкозен транспортер
Gpr158 – G protein coupled receptor 158
Gprc6a – G protein coupled receptor 6a
GTT – Glucose tolerance test; глюкозо-толерантен тест
HDL – High density lipoprotein; липопротеин с висока плътност
HF – High-fat
HFHF – high-fat high-fructose
IDF – International diabetes federation; международна диабетна федерация
IL – Interleukin; интерлевкин
iNOS – Inducible nitric oxide synthase; индуцируема азотен оксид синтетаза
ITT – Insulin tolerance test; инсулино-толерантен тест
LDL – Low density lipoprotein; липопротеин с ниска плътност
MK-7 – Menaquinone-7; менахинон-7
MS – Metabolic syndrome; метаболитен синдром
NF- κ B – Nuclear factor κ B
OC – Osteocalcin; остеокалцин
OFT – Open field test; тест открито поле
ORT – Object recognition test; тест за разпознаване на обект
PRT – Place recognition test; тест за разпознаване на място
SEM – Standard error of mean
SIT – Social interaction test; тест за социално взаимодействие
TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances
TG – Triglycerides; триглицериди
TNF- α – Tumor necrosis factor α
ucOC – Un(der)carboxylated osteocalcin; ненапълно или некарбоксилиран остеокалцин
VLDL – Very low density lipoprotein; липопротеин с много ниска плътност
WK1 – Warfarin and vitamin K1
БАБХ – Българската агенция по безопасност на храните
КЕЖ – Комисия по етика при животните
ЦНС – Централна нервна система

I. Въведение

Витамин К е известен традиционно като витамин на коагулацията. Тази си роля той изпълнява като кофактор на ензима гама-глутамил карбоксилаза, който активира синтезираните в черния дроб фактори на кръвосъсирването. В последните години се натрупват данни, че витамин К е въввлечен в регулацията на много повече процеси в организма. Най-добре проучени са ролите му в костната тъкан (Iwamoto et al., 2009) и като инхибитор на съдовата калцификация (Cranenburg et al., 2007). Поддържането на екстрахепаталните функции на витамин К изисква по-висок диетичен внос от този необходим за обезпечаване на нуждите на коагулацията. Характерният за съвременното общество „западен“ начин на хранене обикновено не може да обезпечи нужните нива на витамин К в организма, което води до развитие на субклиничен дефицит. При това състояние не се наблюдават промени в коагулационния статус, но се нарушават редица функции извън черния дроб, което може да има отношение към патогенезата на т.нар. болести на стареенето (McCann and Ames, 2009). Наред с остеопорозата, сърдечно-съдовата патология и злокачествените заболявания, към тях могат да се отнесат и нарушенията в енергийния метаболизъм като метаболитен синдром и захарен диабет тип 2, както и тревожно-депресивните разстройства и когнитивния дефицит.

Хипотезата за потенциална роля на витамин К-недостига в патогенезата на метаболитните разстройства се подкрепя от наблюдационни клинични проучвания, показващи че високият диетичен внос на витамин К намалява риска от развитие на метаболитен синдром (Pan et al., 2009) и захарен диабет тип 2 (Beulens et al., 2010; Ibarrola-Jurado et al., 2012), а суплементирането с витамин К подобрява въглехидратния метаболизъм при здрави лица от различни възрасти, както и такива с предиабет или диабет тип 2 (Sakamoto et al., 2000; Yoshida et al., 2008; Choi et al., 2011; Manna and Kalita 2016; Li et al., 2018).

Екстрахепаталните ефекти на витамин К, включително тези свързани с енергийния метаболизъм, се реализират, поне отчасти, от витамин К-зависими протеини, различни от факторите на кръвосъсирването. Един от най-добре проучените е остеокалцинът, характерен за костната тъкан. С помощта на витамин К некарбоксилираната форма на този протеин се превръща в карбоксилирана. Съотношението между двете форми се разглежда като показател за витамин К-статуса в организма, тъй като при дефицит процесът на карбоксилиране се нарушава и се покачва нивото на некарбоксилираната форма на протеина (Iwamoto et al., 2014).

През последните години се трупат експериментални данни, че некарбоксилираният остеокалцин има хормонална роля и регулира енергийния метаболизъм. Опитни постановки върху остеокалцин-дефицитни мишки установяват, че той се секретира от остеобластите и достига с кръвния ток до панкреаса, мастната тъкан, скелетните мускули, при което стимулира инсулиновата секреция и увеличава инсулиновата чувствителност (Ferron et al., 2008). Липсата на некарбоксилиран остеокалцин в тези животни води до появата на метаболитен синдром – развиват се висцерално

затлъстяване, дислипидемия, хипергликемия и инсулинова резистентност (Lee et al., 2007). Според тези експериментални постановки само некарбоксилираният остеокалцин изпълнява хормонална роля.

Ако това е така, суплементирането с витамин К, стимулирайки процеса на карбоксилиране, би трябвало да влоши енергийния метаболизъм чрез намаляване на активната форма на остеокалцина.

Така, на пръв поглед, възниква противоречие между клиничните проучвания, подкрепящи протективния ефект на витамин К върху енергийния метаболизъм, и експерименталните резултати, установяващи подобни ефекти за некарбоксилирания остеокалцин.

Връзката витамин К – остеокалцин – енергиен метаболизъм продължава да бъде противоречива и се нуждае от допълнителни изследвания.

II. Цел и задачи

1. Цел

Целта на настоящия проект е да се хвърли светлина върху ролята на витамин К и зависимия от него протеин остеокалцин в регулацията на енергийния метаболизъм, поведението и когнитивните функции при интактни опитни животни и при модел на метаболитен синдром при плъхове.

2. Задачи

- I. Да се разработи и верифицира модел на метаболитен синдром при плъхове
 1. Да се охарактеризира модела на метаболитен синдром от гледна точка на показателите на въглехидратния и липиден метаболизъм
 2. Да се охарактеризира модела на метаболитен синдром от гледна точка на поведенчески отклонения в тестове за локомоция, тревожност, депресия и памет
 3. Да се определят нивата на некарбоксилиран и карбоксилиран остеокалцин, като маркери за витамин К статус, при плъхове с метаболитен синдром и да се потърсят корелации с биохимични показатели на енергийния метаболизъм и показатели на поведенчески и когнитивни функции
- II. Да се определят ефектите на витамин К при интактни животни и плъхове с модел на метаболитен синдром
 1. Да се изследва влиянието на витамин К върху енергийния метаболизъм
 2. Да се изследва влиянието на витамин К върху показатели на поведенчески и когнитивни функции
- III. Да се изследва влиянието на warfarin, като антагонист на витамин К, при интактни животни и плъхове с модел на метаболитен синдром
 1. Да се верифицира модел на субклиничен дефицит на витамин К при интактни плъхове с определяне концентрациите на двете форми остеокалцин
 2. Да се изследва ефекта на warfarin върху енергийния метаболизъм
 3. Да се изследва ефекта на warfarin върху показатели на поведенчески и когнитивни функции
- IV. Да се изследва влиянието на alendronate, като инхибитор на костната резорбция, при интактни животни и плъхове с модел на метаболитен синдром
 1. Да се изследва ефекта на alendronate върху некарбоксилирания остеокалцин
 2. Да се изследва ефекта на alendronate върху енергийния метаболизъм
 3. Да се изследва ефекта на alendronate върху показатели на поведенчески и когнитивни функции

III. Материали и методи

1. Материали

1.1. Опитни животни

Опитите са провеждани върху млади мъжки плъхове порода Wistar, отглеждани в пластмасови клетки в добре вентилирана стая при температура 20-25°C, 12-часов цикъл на светлина/тъмнина и при неограничен достъп до храна и питейна вода, съобразено с експерименталната диета. Всички процедури по третирането на животните и експериментите са извършвани в съответствие с националните закони и правила и в съответствие с международните изисквания, основаващи се на Европейската директива (2010/63/EU). Опитите са осъществени с разрешението на Комисията по етика при животните (КЕЖ) към Българската агенция по безопасност на храните (БАБХ) при Министерството на земеделието и храните.

1.2. Експериментални диети

В част от експериментите опитните животни са хранени с високо-калорични диети с цел индукция на метаболитен синдром. Контролната диета се състои от стандартна лабораторна гранулирана храна и чиста питейна вода. С всеки 100 g от консумираната храна животните приемат 279 kcal. Количеството на мазнини и прости захари в тази диета е съответно 3% и 4%, осигуряващи 10% и 6% от енергийния внос. Диетата, обогатена с мазнини, е означена като high-fat (HF). При нея към стандартната лабораторна храна е прибавена свинска мас в концентрация 20%. Калорийният внос е 403 kcal/100 g като свинската мас осигурява 45% от него. Диетата, обогатена с мазнини и фруктоза, е означена като high-fat high-fructose (HFHF). При нея към стандартната лабораторна храна са прибавени свинска мас и фруктоза в еднакво количество – 17%. Калорийният внос на диетата е 405 kcal/100 g. Свинската мас осигурява 38% от енергийния внос, а фруктозата – 20%. При HF и HFHF диетите животните приемат допълнително 10%-ен разтвор на фруктоза вместо питейна вода, с което получават още 40 kcal /100 ml.

1.3. Експериментални вещества

В част от експериментите опитните животни са третирани с експериментални вещества: vitamin K1 (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, UK) vitamin K2 под формата на МК-7 (Seebio Biotech, Inc., China), warfarin (Sigma-Aldrich, Germany), alendronate (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA).

2. Биохимични изследвания

2.1. Инсулино-толерантен тест (ITT)

Инсулино-толерантният тест е провеждан посредством интраперитонеално инжектиране на опитните животни с Insulin ActRapid, разреден с физиологичен разтвор в доза 0.75 UI/kg. Кръвната захар е изследвана с глюкомер ACCU-CHEK Performa и тест ленти

ACCU-CHEK Performa. Кръвните проби са вземани чрез инцизия в дисталния край на опашката по метода на Flutterm et al. (2000) непосредствено преди инжектирането с инсулин и 30, 60 и 90 минути след това.

2.2. Глюкозо-толерантен тест (GTT)

Глюкозо-толерантният тест е провеждан посредством интраперитонеално инжектиране на опитните животни с 40%-ен разтвор на глюкоза в доза 2 g/kg. Кръвната захар е изследвана с глюкомер ACCU-CHEK Performa и тест ленти ACCU-CHEK Performa. Кръвните проби са вземани чрез инцизия в дисталния край на опашката по метода на Flutterm et al. (2000) непосредствено преди инжектирането с глюкоза и 30, 60 и 90 минути след това.

2.3. Получаване на серум

След анестезиране на опитните животни с диетилов етер е вземана кръв от подезичните вени, събирана е в епруветки и е центрофугирана при 2000 x g rpm за 10 min. Отделеният серум е съхраняван при минус 20 °C до момента на анализа.

2.4. Получаване на хомогенат от черен дроб

След фино оситняване с ножичка 1 g тъкан от всяка чернодробна проба е смесвана с 10 ml ледено студен TRIS/HCL буфер (среда за отделяне) и хомогенизирана посредством хомогенизатор на Потер (тефлонов пестик) при 4000 оборота за 10 min. Полученият хомогенат е центрофугиран при 2000 оборота при $t^0=4^0\text{C}$ за 10 min за отделяне на грубата утайка, а супернатантът е използван за биохимични изследвания.

2.5. Изследване нивата на триглицериди (TG)

Нивата на триглицеридите са изследвани в кръвен серум и в хомогенат от черен дроб с индивидуални китове (BioMaxima S.A., Poland), като са спазвани инструкциите на производителя. Принцип на метода: триглицеридите се хидролизират от липопротеинлипазата до глицерол и мастни киселини. Глицеролът се фосфорилира с АТР от глицеролкиназа, при което се получава глицерол-3-фосфат и ADP. Глицерол-3-фосфатът се окислява от глицеролкиназата до дихидроксиацетонфосфат и водороден пероксид. Последният се свързва с 4-хлорофенол и 4-аминоантипирин, при което се получава оцветен комплекс. Интензивността на цвета на получения комплекс се измерва фотометрично при дължина на вълната 500 nm и е пропорционална на концентрацията на триглицеридите. Използван е спектрофотометър AURIUS 2021 (Cecil Instruments Ltd., UK).

2.6. Изследване нивата на холестерол

Нивата на холестерола са изследвани в кръвен серум с индивидуални китове (BioMaxima S.A., Poland), като са спазвани инструкциите на производителя. Принцип на метода: холестероловите естери се хидролизират от холестеролестеразата до холестерол и свободни мастни киселини. Свободният холестерол се окислява от холестеролоксидазата, при което се освобождава водороден пероксид. Той се свързва с

фенол и 4-аминоантипирин, при което се получава оцветен комплекс. Интензивността на цвета на получения комплекс се измерва фотометрично при дължина на вълната 500 nm и е пропорционална на концентрацията на холестерола. Използван е спектрофотометър AURIUS 2021 (Cecil Instruments Ltd., UK).

2.7. Изследване нивата на HDL-холестерол

Нивата на HDL-холестерола са изследвани в кръвен серум с използването на преципитиращ реагент за отделяне на фракцията на HDL-холестерола от останалите холестеролови фракции. Използван е съответстващия на кита за определяне на холестерол реагент на същия производител (BioMaxima S.A., Poland). Принципът на метода се основава на способността на фосфотунгстовата киселина и магнезиевия хлорид да преципитират хиломикроните, LDL- и VLDL-частиците. След центрофугиране в супернатанта остава само фракцията на HDL-холестерола. Концентрацията на HDL-холестерола в супернатанта се измерва фотометрично, като се използва реагента за определяне на холестерол.

2.8. Изследване на нивата на инсулин и лептин

Нивата на инсулин и лептин са изследвани в кръвен серум чрез имуноензимен метод по типа на сандвич ELISA с индивидуални китове за плъши инсулин (Shibayagi Co., Ltd., Japan) и миши/плъши лептин (BioVendor Group, Czech Republic), като са спазвани инструкциите на производителите. Принципът на имуноензимните методи на изследване се основава на реакция между изследвания протеин и специфични, насочени срещу него антитела. Пробите се инкубират в плаки с многобройни ямки, всяка от които е предварително заредена със специфичното антитяло. По време на инкубацията изследваният пептид реагира с антитялото и се получава комплекс. След това към реагиращия с антитялото антиген се прибавя ново специфично антитяло, което е конюгирано с ензим. Следващата стъпка е прибавяне на субстрата на ензима. Полученият в резултат на реакцията продукт е оцветен. Най-накрая се прибавя стоп разтвор, който спира реакцията между ензима и субстрата. Полученият краен продукт е със жълт цвят. Интензитетът на оцветяването се измерва колориметрично при използване на определена дължина на вълната и е пропорционален на съдържанието на изследвания протеин в пробата. Използван е ELISA ридер LKB 5060-006 (LKB Instruments, Australia).

2.9. Изследване на нивата на карбоксилиран и некарбоксилиран остеокалцин

Двете форми на остеокалцина са изследвани в кръвен серум чрез имуноензимен метод по типа на сандвич ELISA с индивидуални китове за плъши карбоксилиран (gla-) остеокалцин и плъши некарбоксилиран (glu-) остеокалцин (Takara Bio, Inc., Japan), като са спазвани инструкциите на производителя. Залавящите антитела се свързват към C-края на полипептидната верига на остеокалцина и са еднакви за двата кита. Детекционните антитела, използвани за определяне на некарбоксилирания остеокалцин, се свързват с некарбоксилираните глутаминови остатъци на позиции 21 и 24 от

молекулата на остеокалцина. Използван е ELISA ридер LKB 5060-006 (LKB Instruments, Australia).

2.10. *Определяне на реагиращи с тиобарбитуровата киселина субстанции в кръвен серум*

Методът измерва спектрофотометрично цвета, получен от реакцията на тиобарбитуровата киселина с липидните пероксиди (Ohkawa et al., 1979). Към серума, съдържащ реактивните производни, е добавян 0.8% разтвор на тиобарбитуровата киселина. Пробите са инкубирани за 2 часа във водна баня (95 °C), след което са охлаждадени до стайна температура. Промяната в оптичестката плътност е отчитана спектрофотометрично при дължина на вълната 532 nm. Реагиращите с тиобарбитуровата киселина субстанции (TBARS) са измервани в nmol/ml серум. Малонов диалдехид, главният реактивен алдехид, който се получава при пероксидацията на полиненаситените мастни киселини в биологичните мембрани, е използван като стандарт. Използван е спектрофотометър Aurius 2021 UV-VIS (Cecil Instruments Ltd, UK).

3. **Методи за изследване на поведението**

3.1. *Тест открито поле – open field test (OFT)*

Тестът открито поле е метод за първоначално изследване на двигателната активност и ориентировъчното поведение, създаден от Hall през 1932 г. Тестът е извършван в оградено със стени поле (100 x 100 x 40 cm), боядисано изцяло в бяло и разграфено с дебели 6 mm сини линии, които разделят пода на еднакви (20 x 20 cm) квадрати. Полето е равномерно осветено чрез източник на бяла светлина. Всяко животно е поставяно внимателно в центъра на полето и поведението му е наблюдавано в рамките на 5 минути при абсолютна тишина. След всяко животно полето е почиствано с 95% разтвор на етанол и подсушавано. Общата хоризонтална локомоторна активност е измервана чрез отчитане на броя на пресечените линии с четирите крака. Освен за оценка на двигателната активност тестът се използва и за детекция на тревожно поведение (Denenberg, 1969). Степента на тревожност е измервана чрез отчитане на времето за престой в централното поле (вътрешните 9 квадрата) и броя навлизания в централното поле (при преминаване и на четирите лапи на животното през линията), които се разглеждат като инверсни показатели за тревожност.

3.2. *Тест за социално взаимодействие – social interaction test (SIT)*

Тестът за социално взаимодействие е рутинен метод, използван за оценка на нивото на тревожност (File и Hyde, 1978). Тестът се провежда в позната на животните обстановката, защото в противен случай се повишава нивото на тревожност и времето за социално взаимодействие намалява. SIT е извършван след OFT в същото равномерно осветено поле с размери 100 x 100 x 40 cm. Всеки плъх е изследван с непознат за него партньор със сходно тегло (разлика в теглото не повече от 10%), подложен на същото третиране. Двата плъха са поставяни едновременно в двата противоположни ъгъла на полето. Поведението им е наблюдавано при пълна тишина в продължение на 5 минути. След всяка двойка полето е почиствано с 95% спиртен разтвор и подсушавано. Отчитано е

времето на социално взаимодействие на всеки плъх поотделно. За социално взаимодействие се приемат процесите на душене, почистване, следване на партньора, пълзене върху или под партньора. Пасивният контакт (стоене или лежане в контакт с партньора) не се отчита като време на социално взаимодействие. Времето на социално взаимодействие се приема за инверсен показател на степента на тревожност.

3.3. Тест за принудително плуване – *forced swim test (FST)*

Тестът за принудително плуване е въведен от Porsolt през 1979 г. и е рутинно използван за изследване на антидепресантна активност при гризачи. Всяко животно е поставяно в стъклен цилиндър (17 cm диаметър и 60 cm височина), пълен наполовина с вода, и поведението на животното е отчитано в рамките на 3 минути. Температурата на водата е 25°C, а дълбочината е 30 cm, така че животните да не могат да достигнат дъното с краката или опашките си. Плуването и неподвижността (имобилност) на животното са разглеждани като взаимно изключващи се поведенчески състояния. Плуването е определяно като движение т.е. активност на животното. Неподвижността е определяна като липса на движение и безнадежност т.е. депресивно-подобно поведение на животното. Тогава животното стои във водата почти неподвижно, като извършва единствени движения необходими за поддържане на главата над водата. Измервано е времето на имобилност на животното в секунди.

3.4. Тест за разпознаване на обект – *object recognition test (ORT)*

Тестът за разпознаване на обект е метод за оценка на разпознавателната памет (Ennaceur, 2010). Провеждан е в равномерно осветено правоъгълно поле, оградено със стени (60 x 60 x 40 cm). Провеждан е в две сесии. Първата сесия е тренировъчна. В полето са поставяни два еднакви предмета – кубове, направени от гипс, за да бъдат достатъчно тежки, така че животните да не могат да ги преместят. Двата предмета са разполагани симетрично в полето. В рамките на 3 минути е отчитано времето за изучаване на предмета – времето, прекарано в душене на обекта, катерене върху обекта или гледане към обекта от разстояние по-малко от 1 cm. След всяко животно полето и предметите са почиствани с 95% спиртен разтвор и подсушавани. Втората сесия е провеждана 4 часа след тренировъчната. Провеждана е като един от старите предмети е заменян с нов, непознат за животните обект – гипсова пирамида, направена от същия материал и със същия цвят и размер като кубовете. Поведението на всяко животно е наблюдавано в рамките отново на 3 минути. Отчитано е времето, прекарано в изучаване на новия предмет (B) и на стария предмет (A). Изчислява се дискриминационен индекс $B/(A+B)$, който се приема като мярка за разпознавателна памет.

3.5. Тест за разпознаване на място – *place recognition test (PRT)*

Тестът за разпознаване на позиция е модификация на теста за разпознаване на обект, създадена с цел оценка на пространствената памет (Vogel-Ciernia and Wood, 2014). Провеждан е в същото равномерно осветено правоъгълно поле, оградено със стени (60 x 60 x 40 cm). Провеждан е в две сесии. Първата сесия е тренировъчна. В полето са поставяни два еднакви предмета – паралелепипеди, закрепени с тясната си основа за пода

на полето, така че да не могат да бъдат премествани от животните. Двата предмета са разполагани симетрично в полето. В рамките на 3 минути е отчитано времето за изучаване на предметите – времето, прекарано в душене, катерене или гледане към предметите от разстояние по-малко от 1 cm. След всяко животно полето и предметите са почиствани с 95% спиртен разтвор и подсушавани. Втората сесия е провеждана 30 мин след тренировъчната. Единият от предметите се поставя на място различно от това в тренировъчната сесия. Поведението на всяко животно е наблюдавано отново в рамките на 3 минути и е отчитано времето за изучаване на предмета с променено местоположение (B) и на предмета със запазено местоположение (A). Изчислява се дискриминационен индекс $B/(A+B)$, който се приема за показател на пространствена памет.

4. Статистически анализ

Резултатите са представяни като средна стойност $\pm$ стандартна грешка (SEM). За статистическа обработка на резултатите са използвани еднофакторен вариационен анализ (one-way ANOVA с последващ Newman-Keuls пост тест) и двуфакторен вариационен анализ (two-way ANOVA с последващ Bonferroni пост тест). Две независими групи са сравнявани посредством Student's t-test. Използван е корелационен анализ при търсене на взаимовръзка между два показателя. Статистическа достоверност е приемана при $p < 0.05$. Използвана е статистическата програма GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

IV. Собствени резултати и дискусия

1. Експериментален модел на метаболитен синдром

1.1. Верифициране на модела от гледна точка на енергиен метаболизъм и промени в поведението

1.1.1. Дизайн на експеримента

В експерименталната постановка бяха включени 36 мъжки плъха порода Wistar, разпределени в 3 групи по 12 животни с първоначално телесно тегло между 204 и 232 g (средно 219-220 g за всяка група). Продължителността на експеримента беше 8 седмици. Групите бяха: контролна (C), получаващи стандартна лабораторна диета; high-fat (HF), получаващи диета обогатена с мазнини; high-fat high-fructose (HFHF), получаващи диета обогатена с мазнини и фруктоза.

Измервани биологични параметри: Консумацията на храна и вода беше измервана ежедневно (за 6 животни в клетка). Калорийният внос беше пресметнат. Телесното тегло беше измервано 1 път седмично. След евтаназирането на животните бяха отпрепарирани и претеглени черния дроб и мастната тъкан около десния бъбрек. Бяха пресметнати съответните органни индекси: тегло черен дроб/телесно тегло $\times 10^2$, тегло мастна тъкан/телесно тегло $\times 10^3$.

Биохимични изследвания: В края на експеримента *in vivo* беше проведен инсулино-толерантен тест (ИТТ). Бяха взети кръвни проби от подезичната вена за изследване на серумните стойности на триглицериди, холестерол, HDL-холестерол, реагиращи с тиобарбитурова киселина субстанции (TBARS) и инсулин. Бяха пресметнати атерогенните индекси холестерол/HDL-холестерол и триглицериди/HDL-холестерол. Определена беше концентрацията на триглицериди в хомогенат от черен дроб.

Поведенчески тестове: В края на експеримента бяха проведени тест открито поле, тест за социално взаимодействие, тест за принудително плуване и тест за разпознаване на обект.

Статистически анализ: Биологичните параметри, серумните биохимични показатели и резултатите от поведенческите тестове бяха сравнявани с еднофакторен вариационен анализ (one-way ANOVA с последващ Newman-Keuls пост тест). ИТТ беше оценен чрез двуфакторен вариационен анализ (two-way ANOVA с последващ Bonferroni пост тест).

1.1.2. Промени в енергийния метаболизъм

Измерваните биологични параметри са представени на таблица 1. Животните от експерименталните групи консумираха по-малко количество храна от контролните животни. ($F(2,174)=458.4$, $p<0.0001$) като тези от HFHF групата приемаха повече храна от тези в HF групата. Консумацията на течности беше по-висока в експерименталните групи ($F(2,174)=86.48$, $p<0.0001$) като най-висока беше в HFHF групата. Общият калориен внос (от приеманата храна и течности) при подложените на диетична

манипулация животни беше по-висок ($F(2,174)=31.34$, $p<0.0001$). Нямаше разлика в крайните телесни тегла на опитните животни ($F(2,33)=0.6383$, $p=0.5346$). Нямаше разлика в теглата на черния дроб ($F(2,15)=0.8542$, $p=0.4453$) и чернодробния индекс ($F(2,15)=0.4030$, $p=0.6753$) между животните от различните групи. Теглото на ретроперитонеалната мастна тъкан в експерименталните групи беше по-високо в сравнение с контролната ($F(2,15)=9.572$, $p=0.0021$), както и индексът на мастната тъкан ($F(2,15)=10.72$, $p=0.0013$).

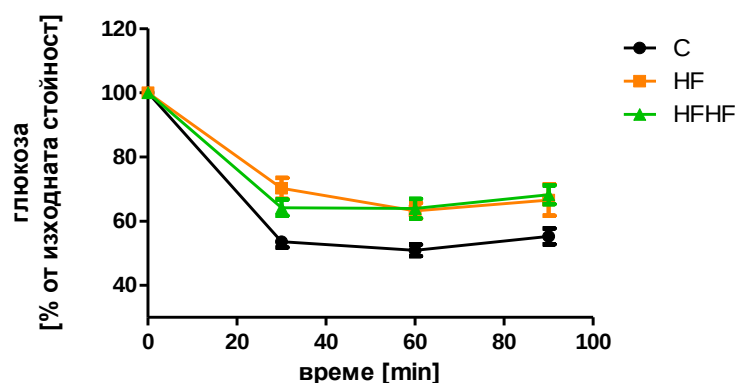
Таблица 1. Биологични параметри. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs C; # $p<0.05$, ### $p<0.001$ vs HF при използван Newman-Keuls пост тест

	C	HF	HFHF
Консумация на храна [g/ден/клетка]	149.2±1.42	89.97±1.75***	91.86±1.67***#
Консумация на течности [ml/ден/клетка]	199.3±2.38	240±3.31***	273.2±5.56***###
Калориен внос [kcal/ден/клетка]	416.9±3.92	446.4±6.97***	481.2±5.89***###
Изходно телесно тегло [g]	219.2±2.14	220±1.23	219.5±2.12
Крайно телесно тегло [g]	348.8±8.35	351.5±8.75	360.8±6.34
Тегло на черен дроб [g]	14.16±0.69	15.22±0.85	15.26±0.41
Чернодробен индекс	4.03±0.14	4.2±0.15	4.18±0.14
Тегло на мастна тъкан [g]	2.31±0.26	4.43±0.45*	5.51±0.75**
Индекс на мастна тъкан	6.61±0.75	12.18±1.04**	15±1.85**

Резултатите от ИТТ са илюстрирани на фиг. 1 и таблица 2. Кръвната захар е представена като абсолютна стойност и като процент от изходната стойност. Не се установи разлика между кръвно-захарните нива преди инжектирането на инсулин. ИТТ показва нарушен отговор към действието на инсулина при животните и от двете експериментални групи при анализ на стойностите като процент от изходната (Two-way ANOVA $F(6,75)=3.564$, $p=0.0037$; за фактор диета $F(2,75)=10.46$, $p=0.0005$). Не се установи разлики в ИТТ между HF и HFHF групата.

Таблица 2. Инсулино-толерантен тест. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs C при използван Bonferroni пост тест

	30 min		60 min		90 min	
	mmol/L	% от изходната стойност	mmol/L	% от изходната стойност	mmol/L	% от изходната стойност
C	3.64±0.12	53.56±1.76	3.46±0.11	50.89±1.81	3.74±0.15	55.22±2.48
HF	4.31±0.23	71.3±3.11***	3.77±0.17	63.22±2.41**	3.93±0.27	66.56±4.87**
HFHF	4.22±0.17	65.73±2.75*	4.18±0.15*	65.45±3.13**	4.37±0.19*	68.2±2.92**

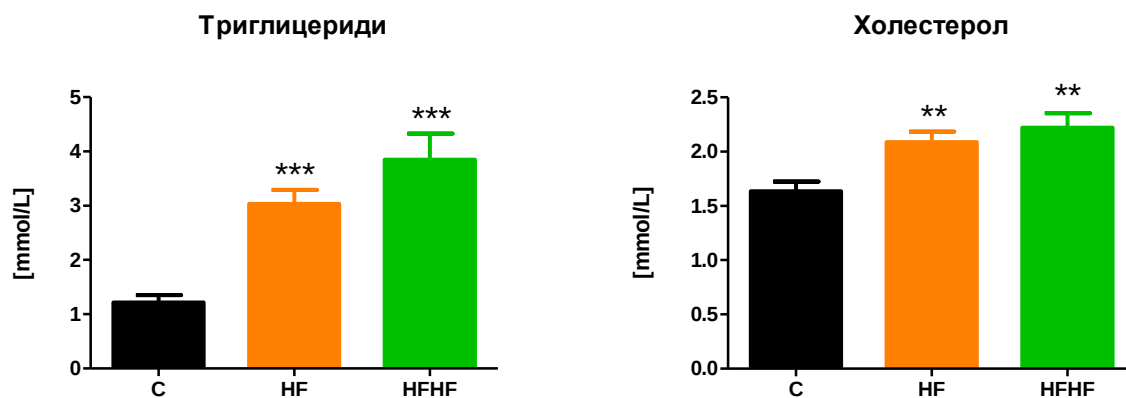


Фиг.1. Инсулино-толерантен тест

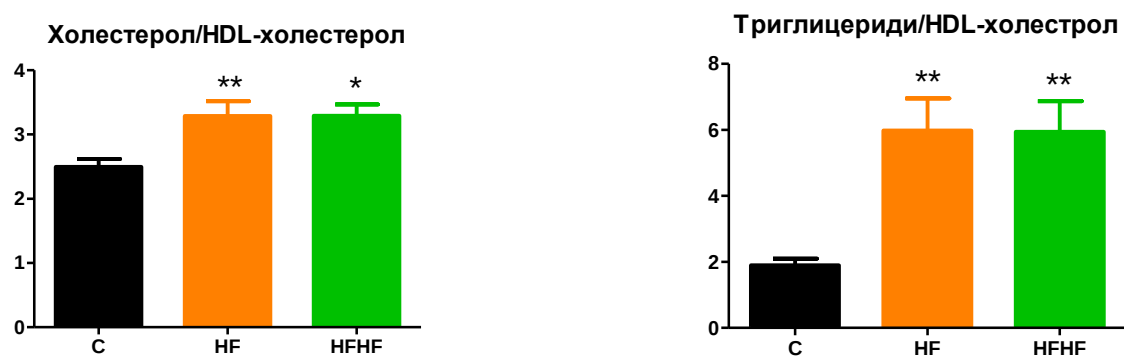
Липидният профил е показан на таблица 3 и фиг. 2. Нивата на серумните триглицериди се повишиха и в двете експериментални групи ($F(2,31)=17.38$, $p<0.0001$), както и тези на холестерола ($F(2,33)=8.082$, $p=0.0014$). Не се установиха разлики в стойностите на HDL-холестерола ($F(2,31)=0.083$, $p=0.9208$). Атерогенните индекси (таблица 3 и фиг. 3) се повишиха и в двете експериментални групи: за холестерол/HDL-холестерол $F(2,30)=6.117$, $p=0.0059$, за триглицериди/HDL-холестерол $F(2,31)=8.681$, $p=0.001$. Нивото на оксидативния стрес, определено чрез концентрацията на TBARS в серума (таблица 3 и фиг. 4), се повиши в животните подложени на диетична манипулация ($F(2,30)=15.93$, $p<0.0001$). Нивата на инсулин (таблица 3) бяха по-високи в HFHF групата ($F(2,64)=3.664$, $p=0.0312$). Черндробните триглицериди (таблица 3 и фиг. 5) се повишиха в HFHF групата, както спрямо контролната, така и спрямо другата експериментална група ($F(2,15)=12.55$, $p=0.0005$).

Таблица 3. Биохимични показатели. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs C; ## $p<0.01$ vs HF при използван Newman-Keuls пост тест

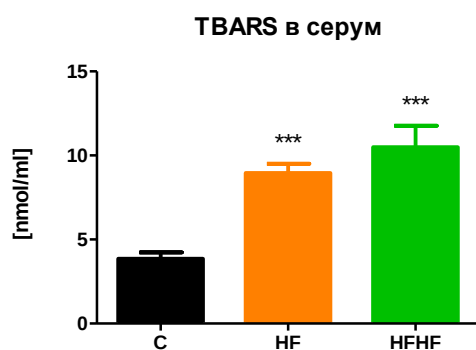
	C	HF	HFHF
Триглицериди [mmol/L]	1.22±0.13	3.03±0.26***	3.85±0.48***
Холестерол [mmol/l]	1.63±0.09	2.09±0.09**	2.22±0.13**
HDL-холестерол [mmol/l]	0.66±0.04	0.67±0.05	0.64±0.04
Холестерол/HDL-холестерол	2.50±0.12	3.29±0.23**	3.29±0.18*
Триглицериди/HDL-холестерол	1.90±0.20	5.98±0.96**	5.95±0.92**
TBARS [nmol/ml]	3.85±0.38	8.96±0.54***	10.50±1.27***
Инсулин [ng/ml]	1.96±0.17	1.93±0.17	2.81±0.38*
Черндробни триглицериди [mmol/g]	14.77±0.25	15.95±0.56	18.20±0.59***##



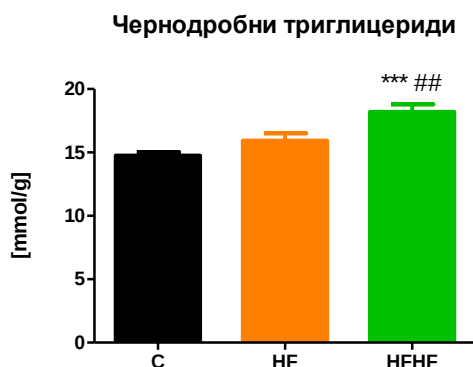
Фиг. 2. Серумни триглицериди и холестерол. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs C при използван Newman-Keuls пост тест



Фиг. 3. Атерогенни индекси. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs C при използван Newman-Keuls пост тест



Фиг. 4. Оксидативен стрес. *** $p < 0.001$ vs C при използван Newman-Keuls пост тест



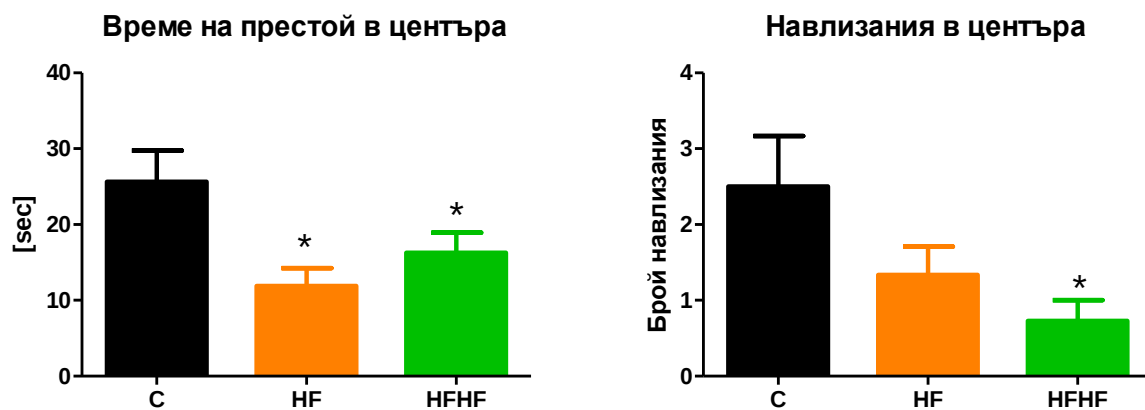
Фиг. 5. Чернодробни триглицериди. *** $p < 0.001$ vs C; ## $p < 0.01$ vs HF при използван Newman-Keuls пост тест

1.1.3. Промени в поведението

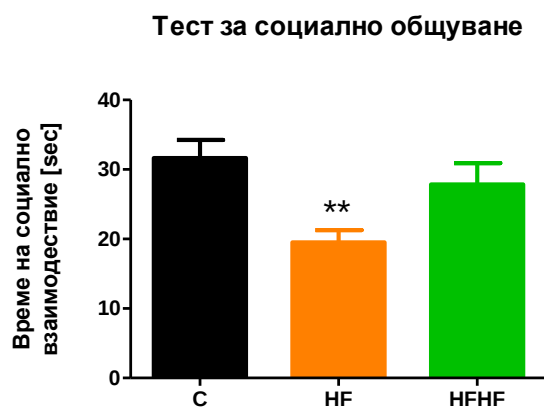
Резултатите от поведенческите тестове са представени в таблица 4. Тестът открито поле – OFT (фиг. 6) показва липса на разлика в двигателната активност между животните в експерименталните групи ($F(2,33)=0.0377$, $p=0.963$). Установи се разлика във времето прекарано в централната зона ($F(2,29)=4.855$, $p=0.0152$) и броя на навлизанията в нея ($F(2,32)=3.511$, $p=0.0418$). Тестът за социално взаимодействие – SIT (фиг. 7) установи намалено време на общуване при животните от HF групата ($F(2,33)=5.987$, $p=0.006$). Тестът за принудително плуване – FST (фиг. 8) показва повишено време на неподвижност при животните от HFHF групата ($F(2,31)=4.119$, $p=0.0259$). При провеждане на теста за разпознаване на обект (ORT) не се установи разлика в разпознавателната памет ($F(2,33)=0.6201$, $p=0.5441$).

Таблица 4. Резултати от поведенческите тестове. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs C при използван Newman-Keuls пост тест

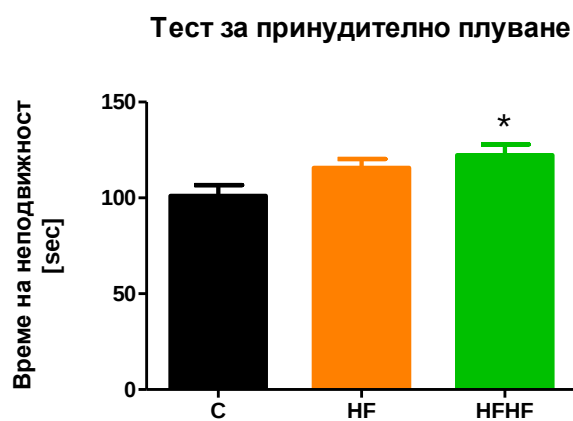
Показател	Тест	C	HF	HFHF
Хоризонтални движения	OFT	56.75±6.45	58.75±6.32	60.17±12.36
Време в центъра [sec]	OFT	25.64±4.11	11.90±2.35*	16.27±2.64*
Брой навлизания в центъра	OFT	2.50±0.67	1.33±0.38	0.73±0.27*
Време на общуване[sec]	SIT	31.67±2.59	19.50±1.78**	27.83±3.08
Време на неподвижност [sec]	FST	101.1±5.53	115.7±4.67	122.3±5.64*
Дискриминационен индекс B/(A+B)	ORT	0.38±0.054	0.37±0.052	0.46±0.076



Фиг. 6. Тест открито поле. * $p < 0.05$ vs C при използван Newman-Keuls пост тест



Фиг. 7. Тест за оценка на тревожността. ** $p < 0.01$ vs C при използван Newman-Keuls пост тест



Фиг. 8. Тест за оценка на депресивно-подобно поведение. * $p < 0.05$ vs C при използван Newman-Keuls пост тест

1.2. Промени в нивата на остеокалцина в модел на метаболитен синдром

1.2.1. Дизайн на експеримента

В експерименталната постановка бяха включени 20 животни, разделени в 2 групи по 10 с изходно телесно тегло 258 g средно за група. Едната група беше контролна (C) и получаваше стандартна лабораторна диета, а другата беше с модел на метаболитен синдром (MS) и беше третирана с HFHF диета. Продължителността на експеримента беше 10 седмици.

Телесното тегло на животните се измерваше през ден. След евтаназирането беше отпрепарирана мастната тъкан около десния бъбрек и беше пресметнат индекса на мастната тъкан. В края на експеримента се проведе ИТТ и беше взета кръв от подезичната вена за определяне серумните стойности на триглицериди, холестерол, TBARS, инсулин, лептин, некарбоксилиран (ucOC) и карбоксилиран остеокалцин (сOC). Пресметнато беше отношението ucOC/сOC.

В края на експериментна бяха проведени тест открито поле, тест за социално взаимодействие, тест за принудително плуване и тест за разпознаване на обект.

Двете групи бяха сравнени с two-tailed unpaired Student's t-test. Връзката между нивата на OC и метаболитни/поведенчески показатели беше търсена с корелационен анализ и линейна регресия.

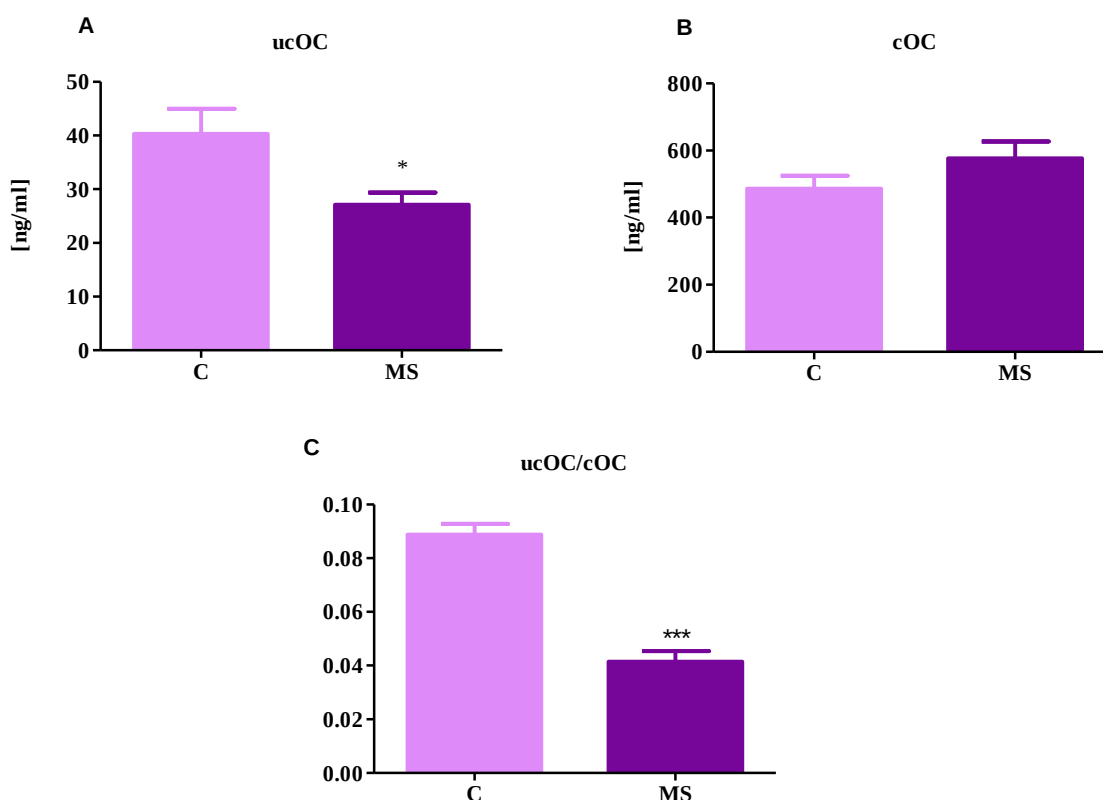
1.2.2. Резултати

Промените в показателите на енергийния метаболизъм, доказващи метаболитния синдром са показани в таблица 5. Нямаше разлика в крайните тегла на животните от двете групи ($t=1.798$, $df=18$, $p=0.0889$). Индексът на мастната тъкан беше повишен в групата с метаболитен синдром ($t=2.559$, $df=18$, $p=0.0197$), както и нивото на серумни триглицериди ($t=2.223$, $df=17$, $p=0.04$), холестерол ($t=2.336$, $df=18$, $p=0.0312$) и инсулин ($t=2.728$, $df=15$, $p=0.0156$). Лептиновото ниво беше повишено недостоверно ($t=1.770$, $df=18$, $p=0.0936$). Кръвната захар на гладно също беше по-висока при животните подложени на диетична манипулация ($t=2.795$, $df=17$, $p=0.0124$). Нарушен беше отговорът към инсулин на 90-та минута при провеждане на ИТТ ($t=2.355$, $df=14$, $p=0.0336$). Нивото на TBARS в серума се повиши ($t=3.829$, $df=17$, $p=0.0013$).

Таблица 5. Метаболитни показатели. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs C

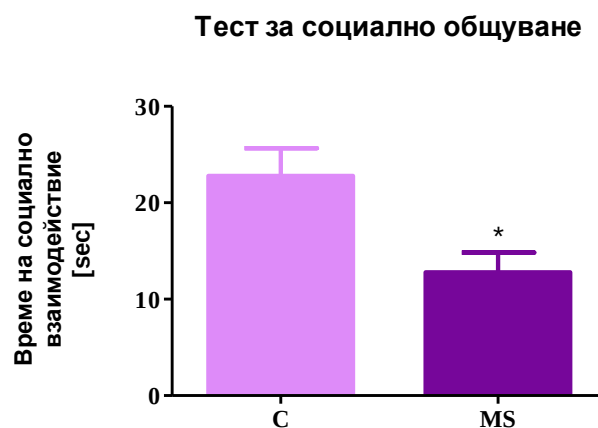
	C	MS
Крайно телесно тегло [g]	374.4±8.2	353.0±8.6
Индекс на мастната тъкан	7.94±0.77	11.71±1.25*
Триглицериди [mmol/l]	1.626±0.07	1.967±0.13*
Холестерол [mmol/l]	2.469±0.04	2.631±0.06*
Кръвна захар на гладно [mmol/l]	5.97±0.11	6.48±0.14*
ИТТ на 90-та минута [% от изходната стойност]	38.1±1.75	44.3±1.87*
Инсулин [ng/ml]	0.79±0.11	1.53±0.24*
Лептин [pg/ml]	16.5±4.86	49.8±18.16
TBARS [nmol/ml]	3.410±0.18	6.062±0.63**

Промените в нивата на двете форми на ОС са илюстрирани на фиг. 9. При животните с метаболитен синдром нивата на ucOC (фиг. 9А) бяха по-ниски: 27.12 ± 2.287 ng/ml в група MS в сравнение с 40.31 ± 4.674 ng/ml в група C ($t=2.535$, $df=16$, $p=0.0221$). Нивата на cOC (фиг. 9В) бяха недостоверно повишени: 577.2 ± 49.96 ng/ml в група MS срещу 486.1 ± 39 ng/ml в група C ($t=1.436$, $df=16$, $p=0.1702$). Отношението ucOC/cOC (фиг. 9С) беше намалено в групата с метаболитен синдром: 0.03957 ± 0.0037 срещу 0.08163 ± 0.0034 ($t=8.341$, $df=13$, $p<0.0001$).

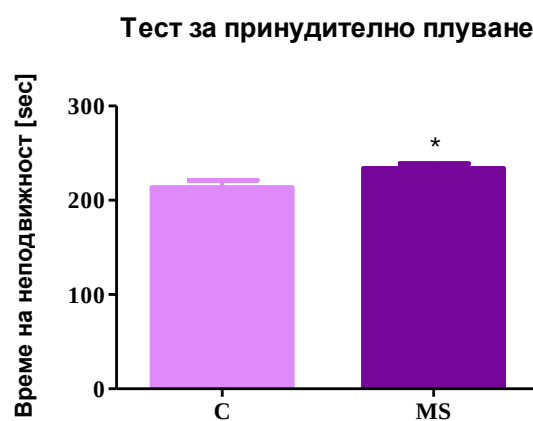


Фиг. 9. Промени в нивата на некарбоксилирания остеокалцин (ucOC) (А), карбоксилирания остеокалцин (cOC) (В) и отношението между тях (ucOC/cOC) (С) при плъхове с метаболитен синдром. * $p<0.05$, *** $p<0.001$ vs C

При оценяване на двигателната активност на животните не се установиха достоверни разлики: броят на хоризонталните движение в теста открито поле беше 64.50 ± 10.89 в MS групата и 46.70 ± 7.45 в C групата ($t=1.349$, $df=18$, $p=0.1942$). При оценка на степента на тревожност (фиг. 10) се установи по-ниско време на социално взаимодействие при животните с метаболитен синдром от контролните (12.78 ± 2.053 sec срещу 22.80 ± 2.871 sec; $t=2.782$, $df=17$, $p=0.0128$). При търсене на депресивно-подобно поведение (фиг. 11) животните подложени на високо-калорийна диета бяха с по-високо време на неподвижност в теста за принудително плуване (234.2 ± 4.793 sec срещу 213.9 ± 7.311 sec; $t=2.322$, $df=18$, $p=0.0322$). Тестът за оценка на разпознавателната памет не установи разлики между опитните животни: дискриминационният индекс $B/(A+B)$ беше 0.5570 ± 0.097 за животните от MS групата и 0.6580 ± 0.068 за животните от група C ($t=0.8533$, $df=18$, $p=0.4047$).

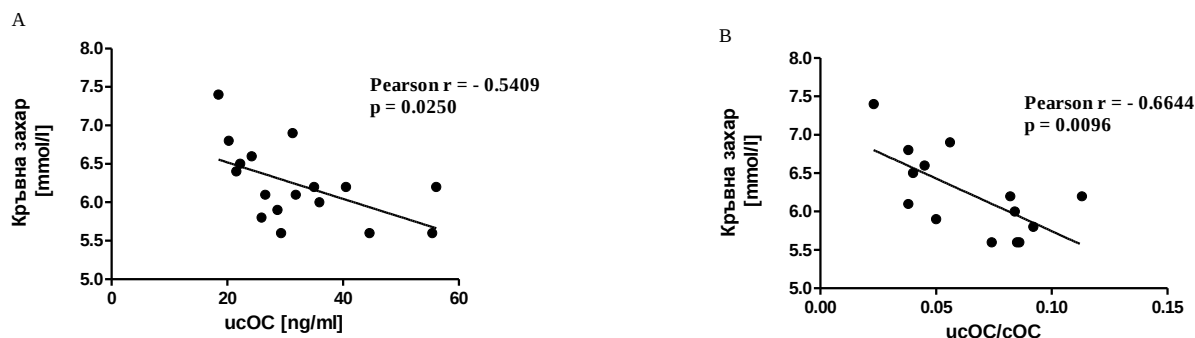


Фиг. 10. Тест за оценка на тревожността. * $p < 0.05$ vs C



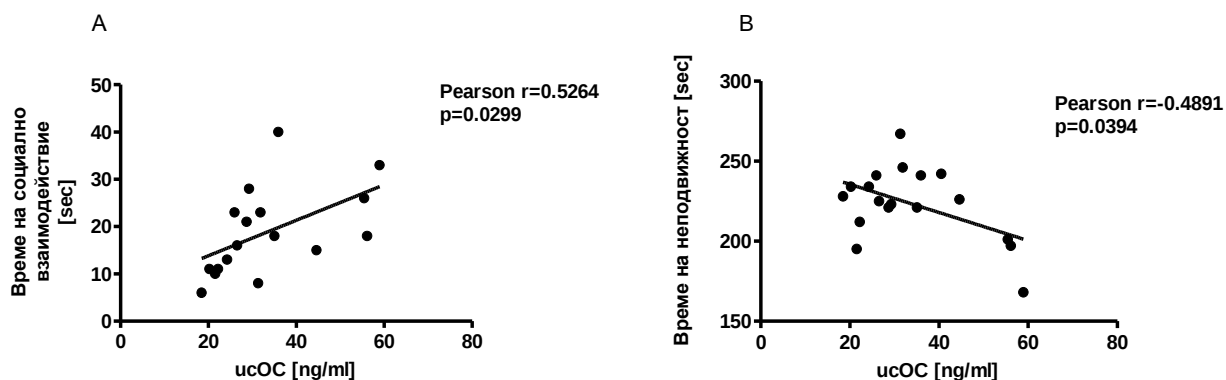
Фиг.11. Тест за оценка на депресивно-подобно поведение. * $p < 0.05$ vs C

При извършване на корелационен анализ между нвото на ucOC и показатели на енергийния метаболизъм се откри негативна корелация между него и кръвнотехарните нива. Подобна корелация се установи и за отношението ucOC/cOC (фиг. 12). Не се откри връзка между ucOC или ucOC/cOC с други показатели на енергийния метаболизъм. Не се установи наличие на връзка и между cOC и някой от изследваните биохимични параметри.



Фиг. 12. Връзка между нивото на кръвна захар на гладно със стойностите на uCOC (A) и с отношението uCOC/cOC (B)

При извършване на корелационен анализ, търсещ връзка между стойностите на uCOC и показателите от поведенческите тестове, се установи позитивна корелация с времето на социално взаимодействие, което е инверсен индекс на тревожност, и негативна връзка с времето на неподвижност в теста за принудително плуване, което е показател на депресивно-подобно поведение (фиг. 13).



Фиг. 13. Връзка между нивото на uCOC с времето на социално взаимодействие (A) и с времето на неподвижност (B)

1.3. Дискусия

1.3.1. Верифициране модела на метаболитен синдром от гледна точка на енергийния метаболизъм

Експерименталните модели на метаболитен синдром имат за цел да възпроизведат в опитни животни максимален брой от компонентите на синдрома, характерни за човека, като наднормена телесна маса, висцерално затлъстяване, дислипидемия, инсулинова резистентност, нарушен глюкозен толеранс, хипертония. Тъй като в повечето случаи патогенезата на метаболитния синдром при човека се основава на нездравословен начин на живот и нерационално хранене, предимство обикновено се дава на моделите, използващи диетична манипулация. В нашия експеримент ние избрахме две диети с повишено съдържание на фруктоза и животински мазнини с цел максимално доближаване на храненето на опитните животни до нездравословния „западен“ начин на

хранене, характерен за съвременния човек. Някои от експерименталните високо-калоричните диети, описвани в литературата съдържат много висок процент животински мазнини, така че повече от 60% от енергийния внос се осигурява от тях. Такива големи количества трудно могат да бъдат постигнати в реална човешка диета. Затова ние се спряхме на диети, в които фруктозата и свинската мас са добавени в умерени количества, така че мазнините да осигуряват не повече от 45% от общия енергиен внос. Двете диети са с близък общ калориен внос, но съдържат различни пропорции фруктоза и свинска мас, което дава възможност да се търсят потенциални различия в ефектите на диетата, обогатена предимно с мазнини, и тази, съдържаща повече фруктоза.

Наднорменото телесно тегло е една от основните характеристики на метаболитния синдром при хора. При пресъздаването на модела в опитни животни промяна в телесното тегло не винаги се постига (Masson et al., 2008; Maiztegui et al., 2009; Nakayama et al., 2010; Ohnogi et al., 2012). В нашия експеримент също не се установи разлика в крайното телесно тегло между контролните животни и животните подложени на двете диети. Възможно обяснение е по-малката консумация на храна в експерименталните групи вероятно вследствие усещането за ситост, дължащо се на високото липидно съдържание и/или засиленото освобождаване на чревни хормони (Samra, 2010). Животните от експерименталните групи приемаха повече течности от контролните заради разтворената във водата им фруктоза и бяха с по-висок общ калориен внос.

Висцералното затлъстяване според IDF е задължително условие за поставяне на диагнозата метаболитен синдром. За да е възможно обективното оценяване и сравняване на този показател, в нашия експеримент използвахме мастните депа около десния бъбрек като част от висцералната мастна тъкан. И при двете експериментални диети, както абсолютното тегло на мастната тъкан, така и отношението ѝ към телесното тегло (индекс на мастната тъкан), бяха повишени повече от два пъти в сравнение с контролните животни. Почти всички описани в литературата диетично-индуцирани модели на метаболитен синдром също постигат висцерално затлъстяване, като в различните постановки се използват мастни депа с различна локализация за оценяване на този показател – освен ретроперитонеалната мастна тъкан, може да се използва епидидималната, ингвиналната, оменталната (Couturier et al., 2007; Poudyal et al., 2010; de Castro et al., 2013).

Дислипидемията при метаболитен синдром най-често включва комбинация от хипертриглицеридемия и намалени нива на HDL-холестерола. LDL-частиците, които са с висока атерогенност, са обикновено повишени. Общият холестерол не винаги е променен.

В експерименталните модели на метаболитен синдром дислипидемията се представя най-вече с повишени нива на триглицеридите. В нашата постановка и двете диети доведоха до повишаване на серумните триглицериди (2 и 3 пъти съответно при HF и HFHF диетата в сравнение с контролната група). Достоверна разлика между двата вида диета не се установи, макар че стойностите в група HFHF бяха с повече от 20% по-високи от тези в група HF. Хипертриглицеридемията се обяснява с добре документирания липогенен ефект на фруктозата (Bray et al., 2004; Dekker et al., 2010; Panchal and Brown,

2011) и се установява почти неизменно във всички диетични модели, използващи фруктоза (Sanchez-Lozada et al., 2007; Garcia et al., 2010; Castro et al. 2011; Ohnogi et al., 2012 и др.). Промените в нивата на общия холестерол и отделните му фракции в описаните в литературата модели на метаболитен синдром не са толкова еднопосочни. В някои модели холестеролът и LDL-холестеролът са повишени (Panchal et al., 2011a; Panchal et al., 2011b; De Castro et al., 2013), в други – не (Garcia et al., 2010; Ohnogi et al., 2012). В нашия експеримент и двете диети доведоха до повишаване на холестероловите нива. Промените в нивата на HDL-частиците също варират в различни посоки в опитните постановки, като преобладават негативните резултати. De Castro et al. (2013) откриват намален HDL-холестерол само при млади плъхове (на 4-седмична възраст), докато при по-възрастни (на 12 седмици) не се установяват промени. Нашите резултати подкрепят тези наблюдения, тъй като ние също не установихме разлика в нивата на HDL-частиците, а животните ни съответстваха на по-възрастната група на De Castro et al. (2013).

Атерогенните индекси триглицериди/HDL-холестерол и холестерол/HDL-холестерол се повишиха и в двете ни експериментални групи. Тези индекси се използват в клиничната практика за оценка на сърдечно-съдовия риск (Lemieux et al., 2001; Dobiášová и Frohlichb, 2001). В експерименталните модели могат да се разглеждат като показател на сърдечно-съдова увреда.

Инсулиновата резистентност е основна характеристика на метаболитния синдром, стояща в основата на неговата патогенеза. ITT е често използван метод за нейното оценяване (Buettner et al., 2006). Този тест разкрива намаления отговор към действието на инсулина, резултат от намалената чувствителност на инсулиновите рецептори. В нашия експеримент посредством ITT беше установено, че и двете диети водят до развитие на инсулинова резистентност, тъй като и в двете експериментални групи нивата на глюкоза спаднаха по-малко след инжектирането на инсулин в сравнение с контролната.

Друг често използван маркер на нарушена инсулинова чувствителност е хиперинсулинемията. В нашия експеримент повишено ниво на инсулин беше установено само в групата, получаваща HFHF диета. Това беше един от показателите, който определи избора ни на модел на метаболитен синдром за по-нататъшните ни опитни постановки. Известно е, че при хората нарушената инсулинова чувствителност се компенсира с повишение нивото на инсулина. При животните, получаващи храна обогатена само с мазнини, липсата на хиперинсулинемия може да се обясни с недостатъчния внос на фруктоза, за която е известно, че води до инсулинова резистентност посредством няколко различни механизма (Dekker et al., 2010).

В клиничната практика метаболитният синдром често е свързан с развитие на неалкохолна стеатоза на черния дроб (Adams et al., 2005). В много от експерименталните постановки също се откриват подобни хистологични промени (Girard et al., 2006; Castro et al., 2011; Ohnogi et al., 2012; de Castro et al., 2013). В нашия опит промени в чернодробните триглицериди се установиха в HFHF групата, като нивата им бяха по-високи, както в сравнение с контролната, така и в сравнение с другата експериментална група. Макар и чернодробната увреда да не е във фокуса на настоящия проект, наличието

на засягане на черния дроб при HFHF диетата беше още един фактор, определил я като по-подходяща за индукция на метаболитен синдром в последващите опити.

Метаболитният синдром е заболяване на енергийния метаболизъм, но много често се разглежда и като състояние на повишен оксидативен стрес (Ando and Fujita, 2009; Roberts and Sindhu, 2009). Според някои автори той се включва в характеристиките на синдрома като негов компонент (Hopps et al., 2010). Оксидативен стрес възниква, когато продукцията на реактивни кислородни частици надвиши антиоксидантния капацитет на организма. При метаболитен синдром и диабет тип 2 факторите, които увеличават продукцията на кислородни радикали, са високите нива на кръвна захар и свободни мастни киселини. Кислородните радикали стоят в основата на глюкозната токсичност, като водят до развитие на инсулинова резистентност и увреждане на бета-клетъчната функция (Eriksson, 2007). Маркерите на оксидативен стрес са увеличени в много от описаните експериментални модели на метаболитен синдром (Girard et al., 2006; Garcia et al., 2010; Castro et al., 2011; Panchal et al., 2011a; Alam et al., 2013 и др.). В нашия опит нивото на оксидативен стрес беше оценено чрез определяне нивото на плазмени TBARS, като индикатор на степента на липидната пероксидация. Повишени стойности се установиха и при двете използвани диети, което показва, че и двата изследвани модела на метаболитен синдром са в състояние да индуцират оксидативен стрес.

В заключение може да се обобщи, че и двете използвани диети – с повишено съдържание предимно на мазнини и с повишено съдържание на фруктоза и мазнини – успешно възпроизведоха в опитни животни повечето от характеристиките на метаболитния синдром при хора, като висцерално затлъстяване, дислипидемия, инсулинова резистентност. Диетата обогатена с мазнини и фруктоза показва някои предимства, като повишаването на инсулиновите нива и чернодробните триглицериди. Освен това повечето от останалите изследвани параметри при тази диета бяха по-отчетливо променени. Допълнителен фактор в полза на HFHF диетата беше, че при нея умерено са повишени и двата компонента добавени към храната, което я прави по-близка до човешкия начин на хранене от HF диетата, разчитаща на висок внос само на животински мазнини. По тези причини ние предпочетохме за провеждането на по-нататъшните експерименти да използваме именно диетата с добавена животинска мазнина и фруктоза към храната и фруктоза във водата за пиене.

1.3.2. *Метаболитен синдром и промени в поведението*

Наличието на епидемиологични данни за връзка между затлъстяването/метаболитния синдром и различни психични нарушения при хора дава основание за търсене на тревожно и депресивно-подобно поведение, както и на когнитивни нарушения при опитни животни с модел на синдрома. В литературата резултатите от подобни експериментални постановки не са еднозначни, особено по отношение на степента на тревожност – някои автори откриват, че диетичната манипулация има анксиогенен (Souza et al., 2007; Buchenauer et al., 2009; Can et al., 2012; Sivanathan et al., 2015 и др.), а други установяват анксиолитичен ефект (McNeilly et al., 2012; Lalanza et al. 2014; Warneke et al., 2014).

За оценка на тревожността ние използвахме част от показателите от OFT, а именно – времето прекарано в централната зона и броя навлизания в нея, както и SIT. И в двата теста резултатите насочиха към повишени нива на тревожност в животните от диетично-манипулираните групи, макар и не всички показатели да се промениха в еднаква степен. В OFT времето за престой в центъра беше намалено и в двете експериментални групи, докато броят на навлизанията в централната зона беше достоверно понижен само в HFHF групата. От друга страна SIT показва намаление със статистическа достоверност само в HF групата. Наблюдаваните промени в поведението бяха на фона на запазена двигателна активност на животните с метаболитен синдром, които не се отличаваха по брой хоризонтални движения от контролните.

Различните опитни постановки, които се откриват в литературата, трудно могат да се сравняват директно, както помежду си, така и с нашата, поради големите различия в използвания вид, пол и възраст на опитните животни, различните вариации на високо-калорични диети, използваните тестове за оценка на поведението. Това обяснява и разнообразните крайни резултати. Така например Buchenauer et al. (2009), които индуцират затлъстяване с диета обогатена с мазнини, откриват подобно на нас тревожно-подобно поведение, но при мъжки Fischer 344 плъхове. Методът, чрез който те установяват тревожност е тестът „Поле с дупки“. Изненадващо, при провеждане на SIT животните със затлъстяване показват по-високо време на социално взаимодействие. Авторите обясняват този на пръв поглед парадоксален резултат с прояви на агресивно поведение в подложените на високо-калорична диета животни, което се отразява на крайното им време на общуване в теста. В нашия експеримент опитните животни не демонстрираха прояви на агресия. Постановки, използващи мъжки Wistar плъхове като нас – тези на Souza et al. (2007) и Anderson et al. (2013), откриват повишени признаци на тревожност. Souza et al. (2007) използват диета обогатена със сукроза и светло-тъмния тест за тревожност. При Anderson et al. (2013) диетата е обогатена с фруктоза и мазнини, а тестът е повдигнат кръстосан лабиринт. Някои автори установяват полови различия като сравняват ефекта на високо-калорични диети при женски и мъжки плъхове от порода Sprague Dawley. Lanza et al. (2014) и Warneke et al. (2014) откриват по-ниски нива на тревожност при женските плъхове. От друга страна, женските Long Evans плъхове на Sivanathan et al. (2015) развиват прояви на тревожно поведение вследствие на диетична манипулация, а мъжките Sprague Dawley плъхове на Marwitz et al. (2015) при проведен OFT са с повишено време на престой в центъра и с повече на брой навлизания в него.

Когато се оценяват и сравняват резултатите от тези различни експериментални постановки, трябва да се взема под внимание не само калорийния внос и процента на приемани мазнини и въглехидрати, а също и характера на приеманата диета. При прием на „кафетерийна“ диета, която освен че е високо-калорична, е и по-вкусна за опитните животни, обикновено в поведенческите тестове се проявява анксиолитичен ефект (Lanza et al., 2014; Warneke et al., 2014). Рязкото отнемане на „кафетерийната“ диета води до абстинентни прояви и съответно до признаци на тревожност (Murphy and Mercer, 2013). Вероятно промените в поведението при този тип хранене се дължат на механизми, различни от чисто метаболитните промени в организма, и са свързани с въвличане на

невротрансмитери, като серотонин, допамин, опиоиди и канабиноиди, в регулацията на настроението (Kirkham, 2009; Murphy and Mercer, 2013; Yamada-Goto et al., 2013).

Анксиогенният ефект, откриван в много експериментални постановки, използващи диети, обогатени с прости захари и/или мазнини, може да се обясни с високия енергиен внос и метаболитните и биохимични промени, до които той води, като трайното повишаване нивата на глюкоза и свободни мастни киселини в плазмата, повишените нива на оксидативен стрес и възпалителни маркери.

Връзката между метаболитните разстройства и депресията е установена в много епидемиологични проучвания. Експерименталните постановки, макар и малко на брой, подкрепят тези наблюдения. При мишки (Sharma and Fulton, 2013) и плъхове (Can et al., 2012) с диетично-индуцирано затлъстяване се повишава времето на неподвижност в теста за принудително плуване. В нашия експеримент и двете диети доведоха до такива промени. Достоверни бяха разликите обаче само при HFHF диетата. Това може да се обясни с по-силно изразената инсулинова резистентност, установена в тази група. В нея, за разлика от HF групата, се повишиха нивата на инсулин в серума. Известно е, че намалената инсулинова чувствителност в периферията е резултат на висцералното затлъстяване и повишените нива на свободни мастни киселини и оксидативен стрес. В ЦНС инсулинът регулира апетита и приема на храна. Развитието на инсулинова резистентност в мозъка може да бъде причина за оформяне на порочен кръг между затлъстяването и приема на повече храна. Освен това наличието на инсулинова резистентност се свързва с повишаване на риска от депресия и тревожност. Grillo et al. (2007) създават лентивирус насочен срещу инсулиновия рецептор, който след инжектиране в третия мозъчен вентрикул на плъхове води до намалена експресия на рецепторите в хипоталамуса. Третираните животни развиват характеристиките на метаболитен синдром, показват когнитивен дефицит и нарушена синаптична пластичност в хипокампа (Grillo et al., 2011a). Животните с по-малък брой инсулинови рецептори са с прояви на депресивно- и тревожно-подобно поведение (Grillo et al. 2011b).

Друг хормон, свързващ потенциално висцералното затлъстяване и депресията, е лептинът. При диетично-индуцирано висцерално затлъстяване, както при хора, така и при опитни животни, се развива лептинова резистентност. При нея повишените нива на лептин не са в състояние нито да намалят чувството за глад и количеството приемана храна, нито да увеличат енергийния разход (Myers et al., 2008). Установено е, че лептинът в хипокампа на плъхове оказва антидепресантна активност (Lu et al., 2006). Третирането с лептин на интактни плъхове намалява времето на неподвижност в FST (Yamada et al., 2011). При изследване на плъхове с диетично-индуцирано затлъстяване обаче, не се установява подобряване на този показател от лептина. Липсата на антидепресантен ефект при затлъстелите животни се обяснява с развита резистентност на лептиновите рецептори (Yamada et al., 2011). При интактните животни приложението на лептин води до увеличаване нивата на BDNF в хипокампа, докато при животните със затлъстяване това не се установява (Yamada et al., 2011). Нивото на BDNF в хипокампа се разглежда като ключов фактор за развитието на депресия (Karege et al., 2005).

Механизмите, по които се развиват инсулиновата и лептиновата резистентност в ЦНС, са сходни и са свързани в повишеното ниво на реактивни кислородни радикали и маркери на възпалението. Оксидативният стрес и инсулиновата резистентност са пряко свързани и взаимно се потенцират – от една страна повишената продукция на реактивни кислородни частици в клетките е основна причина за пострецепторното намаляване на инсулиновия отговор в периферните тъкани; от друга страна повишените нива на инсулин, свободни мастни киселини и глюкоза вследствие на инсулиновата резистентност увеличава продукцията на кислородни радикали (Ceriello and Motz, 2004). Така се поражда порочен кръг между висцералното затлъстяване и оксидативния стрес. Оксидативният стрес, освен с метаболитните нарушения, се свързва и с патогенезата на депресивните и тревожни разстройства (Bouayed et al., 2009; Grases et al., 2014). Приложението на антидепресанти на опитни животни, освен че подобрява поведението в FST и сукрозния тест, намалява и нивото на оксидативна увреда в ЦНС (Zafir et al., 2009). Третирането на опитни животни с високо-калорична диета увеличава нивата на оксидативен стрес в церебралния кортекс (Zhang et al., 2005) и намалява хипокампалната неврогенеза (Park et al., 2010). Нашите резултати също подкрепят ролята на оксидативния стрес в развитието на тревожна и депресивна симптоматика, тъй като и в двете експериментални групи концентрацията на TBARS в серума беше повишена.

Затлъстяването/метаболитният синдром се свързват не само с развитието на депресивна и тревожна симптоматика, но и с нарушения в паметта и обучението. Редица епидемиологични, клинични и експериментални резултати подкрепят тази теза. Инсулиновата резистентност и оксидативният стрес отново са водещите механизми, свързващи периферните метаболитни нарушения с централните когнитивни смущения (Freeman et al., 2014). Структурата, която най-чувствително се уврежда при прием на високо-калорична диета е хипокампа (Marwitz et al., 2015). Смята се, че той е отговорен за формирането най-вече на пространствената памет и има по-малка роля в разпознавателната памет (Broadbent et al., 2004). Пространствената памет е и по-широко проучвана в експериментални постановки при диетично-индуцирано затлъстяване (McNay et al., 2010; Kanoski and Davidson, 2010; Kosari et al., 2012 и др.).

Проведеният в нашия експеримент ORT не показва отклонения в разпознавателната памет въпреки промените в инсулиновата чувствителност и оксидативния стрес. Това би могло да се обясни с по-ниската чувствителност на този тип памет към диетично-индуцирана увреда.

1.3.3. *Метаболитен синдром и остеокалцин*

Връзката между нивата на остеокалцина (OC) и метаболитния синдром генерира значителен интерес след създаването на OC-дефицитните мишки (Ducy et al., 1996) и откритието, че проявяват характеристики на метаболитен синдром. Много експериментални постановки, използващи тези генетично модифицирани животни, установяват хормонална роля за ucOC (Lee et al., 2007; Hinoi et al., 2008; Ferron et al. 2008; Ferron et al., 2010; Ferron et al., 2012 и др.). Хормоналната функция на остеокалцина в други животински видове остава слабо проучена.

В нашата опитна постановка използвахме модела на метаболитен синдром, основаващ се на HFHF диетата и установихме, че ОС в неговата некарбоксилирана форма (ucOC) изпълнява подобна хормонална роля и при плъхове порода Wistar. Животните от диетично-манипулираната група показаха характеристиките на метаболитен синдром (по-висок индекс на мастна тъкан, повишени нива на кръвна захар, триглицериди и холестерол в серума, по-високи стойности на инсулин и лептин, намален отговор към инсулина в ИТТ, повишени нива на оксидативен стрес). Успоредно с това установихме понижени нива на ucOC в серума. Това вероятно се дължи на намаляване чувствителността на инсулиновите рецептори в остеобластите по механизъм подобен на този в мастната тъкан, скелетните мускули и черния дроб. При мишки е установено, че повишеното навлизане на наситени мастни киселини в остеобластните клетки води до убиквитинация с последваща деградация на инсулиновите рецептори (Wei et al., 2014b). Инсулиновата сигнализация в остеобластите повишава секрецията на ucOC от костта в циркулацията по следния механизъм: активирането на инсулиновия рецептор потиска продукцията на остеопротегерин – инхибитор на остеокластната матурация; това стимулира костната резорбция; средата се подкиселява; молекулата на ОС се декарбоксилира и той се освобождава в циркулацията под формата на хормонално активния ucOC (Ferron et al., 2010). Този механизъм на положителна регулация се нарушава при наличие на инсулинова резистентност и нивата на ucOC в плазмата намаляват. При сравняване на нивото на cOC в нашата опитна постановка се откри съвсем леко недостоверно повишаване в групата, подложена на диетична манипулация. Тези резултати подкрепят идеята, че и при плъхове, както при мишки, ucOC изпълнява хормонална роля и участва в регулацията на енергийния метаболизъм, а cOC е лишен от физиологична активност.

Повишените нива на лептин също биха могли да имат отношение към понижаването на ucOC, тъй като този хормон изпълнява ролята на инхибитор на остеокалциновата секреция. Повишените лептинови нива активират индиректно симпатиковия тонус в ЦНС, което води до стимулиране на бета2-рецепторите в остеобластите с последващо потискане на освобождаването на ucOC (Hinoi et al., 2008). Доколко повишеното лептиново ниво е довело до потискане секрецията на ucOC в случая е неясно, тъй като при състояние на развит метаболитен синдром лептиновите нива се покачват без да са в състояние да изпълнят физиологичната му роля. При развита лептинова резистентност в остеобластите, каквато би могло да се очаква при плъховете с метаболитен синдром, регулацията на ucOC от лептина също би трябвало да бъде нарушена.

Наличието на негативна корелация между нивата на ucOC и кръвната захар на гладно в нашите опитни животни подкрепя теорията за хормонална активност на тази форма на протеина. Ендокринните ефекти на ucOC, установени в ОС-дефицитни мишки и мишки с диета-индуцирано затлъстяване, включват стимулиране на секрецията на адипонектин и увеличаване на инсулиновата чувствителност в мастната тъкан (Ferron et al., 2008). Изглежда, че при обременяване с високо-калорична диета, ucOC се въвлича в порочен кръг – от една страна инсулиновата резистентност води до понижаване на секрецията му в циркулиращата кръв, от друга страна понижените нива на ucOC влошават още повече инсулиновата чувствителност. Повишаването на кръвноразхарните нива, както и

негативната им корелация с ucOC са логичното следствие на тези взаимовръзки. Подобна корелация не се откри с нивата на cOC, тъй като при плъхове той явно не изпълнява хормонална функция. Връзка между нивата на ucOC и други биохимични показатели на метаболитния синдром не се установи. Това навежда на мисълта, че е възможно при плъхове метаболитната му активност да е по-слабо изразена, отколкото при мишки.

При провеждането на поведенческите тестове и в тази опитна постановка се установиха познатите закономерности от предишния експеримент: наличие на тревожно поведение в SIT, депресивно-подобно поведение във FST и липса на когнитивни промени в ORT при диетично третирани плъхове. Положителната корелация на ucOC с времето на социално взаимодействие и отрицателната му връзка с времето на неподвижност показват влияние на OC върху поведението. При изследвания при мишки е установено, че ucOC преминава през хемато-енцефалната бариера и стимулира моноаминергичната невротрансмисия в мозъчния ствол, средния мозък и хипокампа (Oury et al., 2013b). Тези централни ефекти се дължат на директно свързване на ucOC с негови специфични рецептри, Gpr158, различаващи се от рецепторите му в периферните тъкани (Khrimian et al., 2017). Активирането на Gpr158 рецепторите в хипокампа стимулира синтеза на BDNF (Khrimian et al., 2017). Дефицитът на ucOC, развиващ се при метаболитен синдром, вероятно води до нарушаване на този процес и до спадане на нивата на BDNF, което води до поява на депресивно-подобна симптоматика в опитните животни. Всички тези експериментални резултати са описани при използване само на един биологичен вид – мишки. Дали ucOC изпълнява регулаторна роля върху поведението и при други животински видове досега беше неизвестно. Резултатите от нашия експеримент показваха, че и при плъхове нивата на ucOC корелират със степента на тревожност и депресивно поведение. Това би могло да означава, че ucOC е още един потенциален кандидат за свързващо звено между метаболитните и невро-психичните нарушения наред с оксидативния стрес и хроничното възпаление.

Разбира се, трябва да се отбележи, че е възможно връзката между ucOC и поведенческите показатели в нашия експеримент да не се дължи само на директно повлияване на мозъчни рецептори, а да се осъществява и с посредническото участие на кръвната захар. Високите глюкозни нива, дължащи се отчасти на намаляването на ucOC и развиващата се инсулинова резистентност, водят до генериране на реактивни кислородни радикали и повишаване на оксидативния стрес. Това от своя страна, както е известно, е свързано с развитието на тревожност и депресия.

В обобщение може да се заключи, че нивата на ucOC, но не на cOC, се промениха при експериментален модел на метаболитен синдром при плъхове. Откри се връзка между ucOC и нивата на кръвна захар, което показва, че този протеин е въввлечен в енергийната регулация. Животните с метаболитен синдром проявиха признаци на тревожност и депресивно-подобно поведение, които също бяха количествено свързани с нивата на ucOC. При положение, че OC е витамин К-зависим протеин, се очаква нивата на витамин К в организма да влияят на физиологичните му роли, както като регулатор на енергийния метаболизъм, така и като регулатор на поведението. Това повдига въпроса какъв би бил ефектът на суплементация с високи дози витамин К върху метаболитните показатели на синдрома и поведенческите промени, които се развиват като негово следствие.

2. Ефекти на витамин К при плъхове с експериментален модел на метаболитен синдром

2.1. Дизайн на експеримента

Изследването беше проведено върху 40 мъжки Wistar плъха разделени на 4 групи по 10 плъха, както следва: група С (контрола), група К2 (контролни животни третирани с витамин К2), група MS (животни с диетично индуциран метаболитен синдром) и група К2+MS (животни с диетично индуциран метаболитен синдром, третирани с витамин К2). Изходното телесно тегло варираше между 220 и 296 g (средно 262 g за всички групи). Продължителността на опита беше 10 седмици. Животните от групите С и К2 получаваха стандартна лабораторна гранулирана храна и питейна вода, а тези от групи MS и К2+MS приемаха HFHF диета с цел индукция на метаболитен синдром. Групите К2 и К2+MS бяха третирани с витамин К2 (менахинон-7) в доза 35 mg/kg под формата на 1.3% разтвор в слънчогледово олио. Приемът беше перорален, третирането се извършваше чрез интрагастрална сонда 5 дена в седмицата (от понеделник до петък) в обем 0.2 ml/100 g телесно тегло в продължение на 10 седмици. Животните от групи С и MS бяха сондирани с разтворителя – слънчогледово олио в същия обем от 0.2 ml/100 g телесно тегло 5 дена в седмицата (от понеделник до петък).

Телесното тегло на животните беше проследявано 3 пъти седмично. В края на експеримента бяха измерени стойностите на кръвна захар след 4-часово отнемане на храната. Взети бяха и кръвни проби от подезичните вени на животните за определяне серумните нива на триглицериди, холестерол, HDL-холестерол и лептин. Пресметнати бяха атерогенните индекси триглицериди/HDL-холестерол и холестерол/HDL-холестерол. Нивата на LDL-холестерола бяха пресметнати, използвайки т.нар. „Иранска“ формула:

$$\text{LDL-холестерол} = \text{Холестерол}/1.19 + \text{Триглицериди}/0.81 - \text{HDL-холестерол}/1.1 - 0.98 \text{ [mmol/L]}$$

След евтаназирането беше отпрепарирана мастната тъкан около десния бъбрек и беше пресметнат индекса на мастната тъкан.

В края на експеримента бяха проведени тест за социално взаимодействие, тест за принудително плуване и тест за разпознаване на обект.

Групите бяха сравнявани по две (група С с група MS; група С с група К2; група MS с група К2+MS) с помощта на two-tailed unpaired Student's t-test. Асоциации между два показателя бяха търсени с корелационен анализ и линейна регресия.

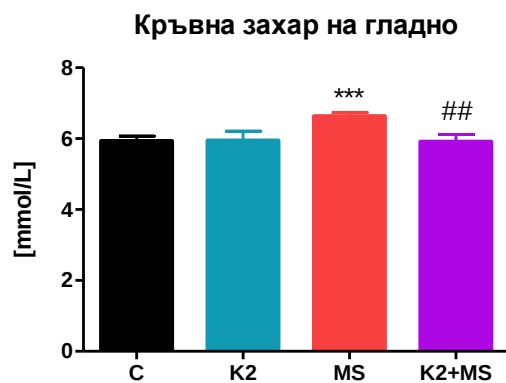
2.2. Ефекти на витамин К върху енергийния метаболизъм

Измерваните биологични параметри и биохимични показатели на енергийния метаболизъм са представени на таблица 6. В края на експеримента телесните тегла на животните от четирите групи не се различаваха: при сравняване на група С с група MS $t=0.1654$, $df=18$, $p=0.8704$; на група С с група К2 $t=0.1756$, $df=18$, $p=0.0961$; на група MS с група К2+MS $t=0.1333$, $df=18$, $p=0.1992$. Индексът на мастната тъкан беше повишен в MS групата в сравнение с контролата ($t=2.991$, $df=18$, $p=0.0078$). Приложението на

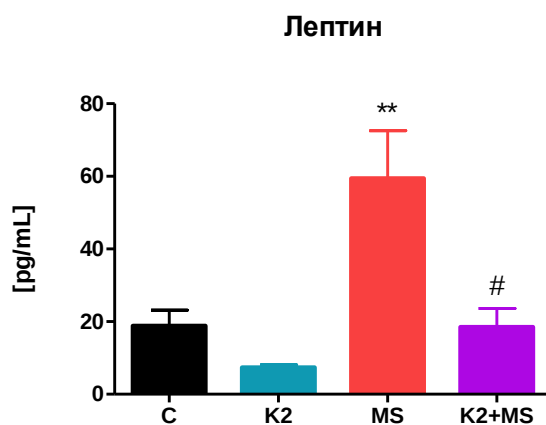
витамин K2 редуцира недостоверно обема на висцералната мастна тъкан при сравнение между групи C и K2 ($t=0.6982$, $df=18$, $p=0.4940$) и MS и K2+MS ($t=1.060$, $df=18$, $p=0.3033$) (фиг. 14). Кръвнотехарните нива на гладно бяха повишени в групата MS в сравнение с контролната група ($t=3.991$, $df=17$, $p=0.0009$). Приложението на витамин K2 на плъхове с метаболитен синдром редуцира повишените глюкозни нива ($t=3.140$, $df=16$, $p=0.0063$). Нямаше разлика в кръвнотехарните нива при интактните плъхове третирани с витамин K2 в сравнение с контролите ($t=0.033$, $df=18$, $p=0.9742$) (фиг. 15). Серумните нива на лептина бяха повишени при нетретирани с витамин K2 животни с индуциран метаболитен синдром ($t=3.078$, $df=17$, $p=0.0068$). Приложението на витамин K2 нормализира повишените лептинови нива в групата K2+MS ($t=2.915$, $df=16$, $p=0.0101$) (фиг. 16). Серумните нива на триглицеридите също бяха повишени при животните от MS групата ($t=2.256$, $df=14$, $p=0.0406$) и се редуцираха вследствие третирането с витамин K2 ($t=3.518$, $df=14$, $p=0.0034$) (фиг. 17A). Серумните нива на холестерол не показаха промени в четирите групи: при сравняване на група C с група MS $t=0.8017$, $df=17$, $p=0.4338$; на група C с група K2 $t=0.4053$, $df=17$, $p=0.6903$; на група MS с група K2+MS $t=0.1414$, $df=17$, $p=0.8892$. Достоверни разлики в нивата на HDL-холестерола липсваха, макар че имаше леко повишение при интактните плъхове, третирани с витамин K2 ($t=1.745$, $df=17$, $p=0.0991$). При сравняване по този показател на група C с група MS $t=0.6318$, $df=17$, $p=0.5359$, а на група MS с група K2+MS $t=0.7893$, $df=17$, $p=0.4408$. Нивата на LDL-холестерола се повишиха при MS групата ($t=2.195$, $df=14$, $p=0.0456$). Третирането с витамин K2 на животните от K2+MS групата понижи нивата на LDL-холестерола ($t=3.282$, $df=14$, $p=0.0055$) (фиг. 17B). Атерогенният индекс триглицериди/HDL-холестерол беше понижен в група K2 спрямо група C ($t=2.212$, $df=16$, $p=0.0418$) и в група K2+MS спрямо група MS ($t=3.444$, $df=14$, $p=0.004$). Индексът холестерол/HDL-холестерол беше понижен при интактните плъхове, третирани с витамин K2 ($t=2.525$, $df=16$, $p=0.0225$). Между останалите групи нямаше разлика: при сравняване на група C с група MS $t=0.4761$, $df=17$, $p=0.6401$; на група MS с група K2+MS $t=0.7871$, $df=17$, $p=0.4420$.



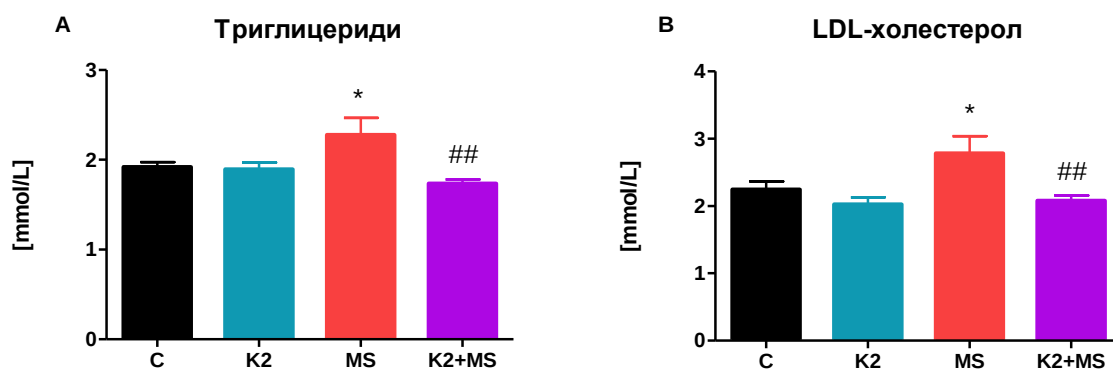
Фиг. 14. Оценка на висцералното затлъстяване. ** $p<0.01$ vs C



Фиг. 15. Гликемия на гладно. *** $p < 0.001$ vs C, ## $p < 0.01$ vs MS



Фиг. 16. Лептинова концентрация. ** $p < 0.01$ vs C, # $p < 0.05$ vs MS



Фиг.17. Серумни липиди. * $p < 0.05$ vs C, ## $p < 0.01$ vs MS.

Таблица 6. Метаболитни показатели. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs C; #p<0.05, ##p<0.01 vs MS.

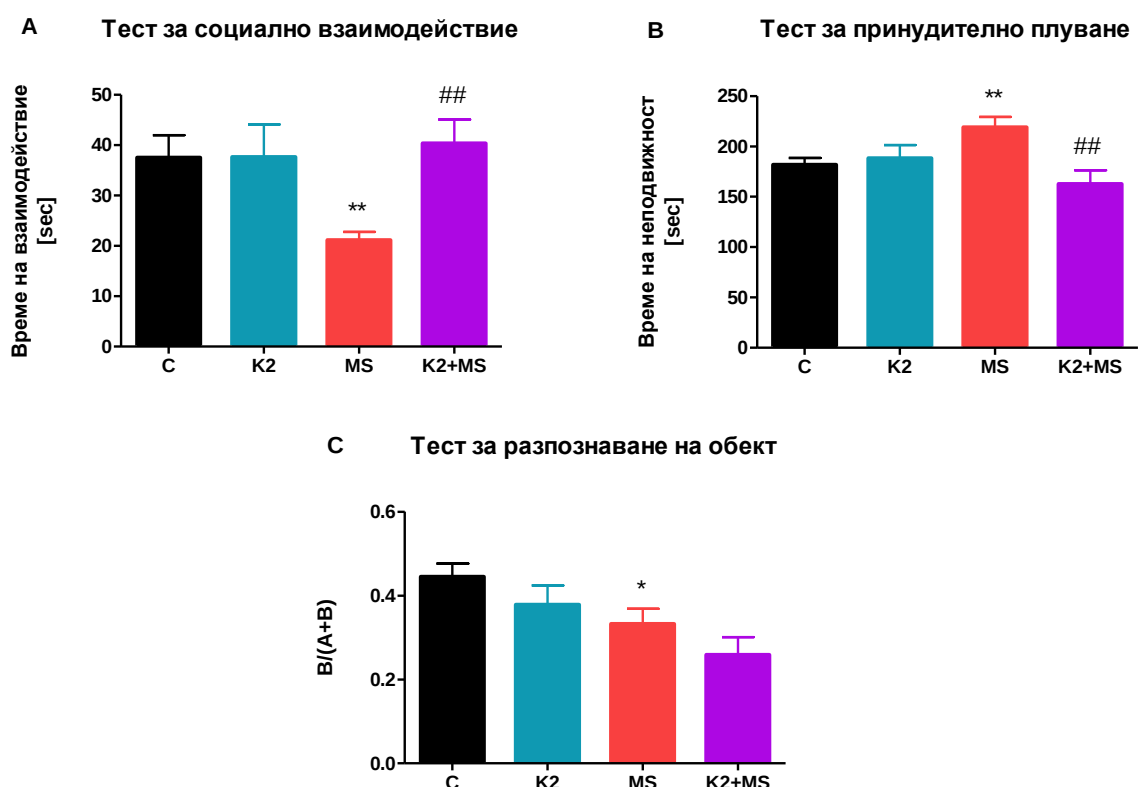
	C	K2	MS	K2+MS
Крайно телесно тегло [g]	405.8±5.71	389.2±7.53	403.6±12.01	379.4±13.62
Индекс на мастната тъкан	12.07±0.962	11.07±1.062	16.48±1.118**	14.63±1.341
Кръвна захар на гладно [mmol/l]	5.93±0.137	5.94±0.272	6.633±0.105***	5.911±0.204##
Лептин [pg/ml]	18.81±4.386	7.355±0.767	59.46±13.08**	18.5±5.131#
Триглицериди [mmol/l]	1.92±0.055	1.893±0.074	2.278±0.187*	1.735±0.047##
Холестерол [mmol/l]	2.209±0.067	2.163±0.093	2.292±0.08	2.277±0.072
HDL-холестерол [mmol/l]	1.035±0.062	1.199±0.071	1.081±0.034	1.031±0.052
LDL-холестерол [mmol/l]	2.246±0.119	2.024±0.103	2.787±0.252*	2.081±0.076##
Триглицериди/HDL-холестерол	1.93±0.151	1.535±0.063*	2.102±0.085	1.71±0.071##
Холестерол/HDL-холестерол	2.203±0.141	1.783±0.057*	2.126±0.068	2.281±0.176

2.3. Ефекти на витамин К върху поведението

Резултатите от поведенческите тестове са представени в таблица 8 и на фиг 18. При всички проведени тестове интактните плъхове третиран с витамин К не показаха промени в поведението в сравнение с контролната група: в теста за социално взаимодействие (SIT) $t=0.018$, $df=17$, $p=0.9858$, в теста за принудително плуване (FST) $t=0.4936$, $df=18$, $p=0.6276$, в теста за разпознаване на обект (ORT) $t=0.226$, $df=17$, $p=0.226$. Животните от група MS бяха с по-ниско време на социално взаимодействие в сравнение с контролните в SIT ($t=3.273$, $df=15$, $p=0.0051$) – признак на тревожно поведение (фиг. 18A). Те бяха и с по-високо време на неподвижност в FST ($t=2.981$, $df=18$, $p=0.0067$) – признак на депресивно-подобно поведение (фиг. 18B). В ORT дискриминационният индекс $B/(A+B)$ беше намален в MS групата ($t=2.378$, $df=15$, $p=0.0275$) – показател, насочващ към нарушаване на разпознавателната памет (фиг. 18C). Животните с метаболитен синдром третиран с витамин К2 от група K2+MS, сравнение с тези от група MS, бяха с по-високо време на социално взаимодействие в SIT ($t=3.511$, $df=16$, $p=0.0029$) и с по-ниско време на неподвижност във FST ($t=3.294$, $df=18$, $p=0.004$). Липсваше подобряване на когнитивния дефицит, установен в ORT ($t=1.317$, $df=16$, $p=0.2065$).

Таблица 8. Резултати от поведенческите тестове. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs C; ## $p < 0.01$ vs MS

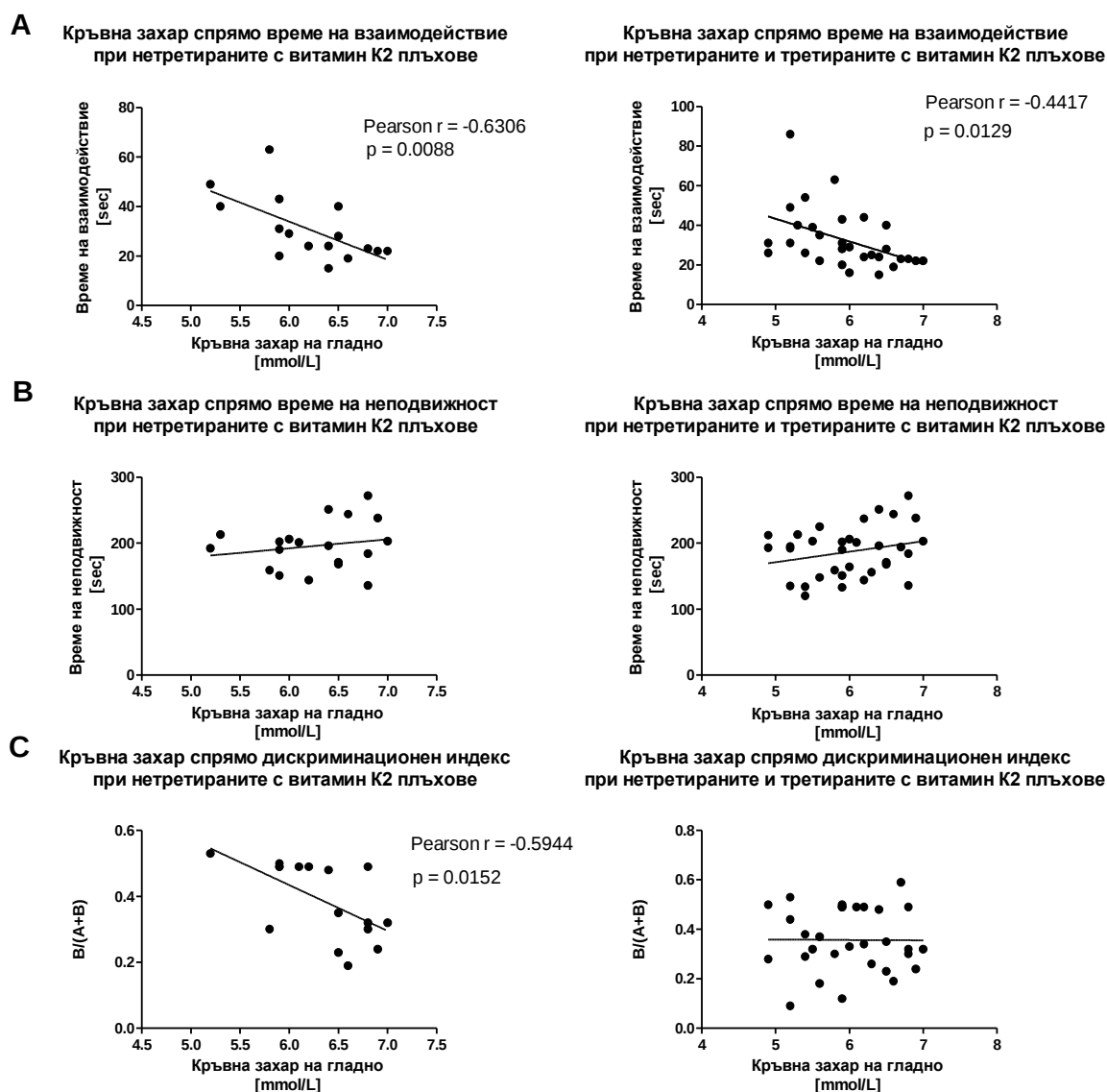
Показател/тест	C	K2	MS	K2+MS
Време на социално взаимодействие [sec]/SIT	37.56±4.482	37.7±6.427	21.13±1.663**	40.4±4.7##
Време на неподвижност [sec]/FST	181.9±6.73	188.5±12.95	219±10.2**	162.9±13.42##
Дискриминационен индекс $B/(A+B)/ORT$	0.445±0.031	0.379±0.046	0.333±0.036*	0.259±0.042



Фиг. 18. Поведенчески тестове за оценка на тревожност (A), депресивност (B) и разпознавателна памет (C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs C; ## $p < 0.01$ vs MS

При извършване на корелационен анализ се установи зависимост между показателите от поведенческите тестове и кръвнозахарните нива, която се повлиява по различен начин в резултат на третирането с витамин К. Корелационните зависимости са представени графично на фиг. 19. В SIT (фиг. 19A) се установи негативна корелация между кръвнозахарните нива и времето на социално взаимодействие при анализиране на резултатите на животните, не третирани с витамин К (от групи C и MS). Тази негативна връзка се запази при включване в анализа и на третирани с витамин К животни (от групи K2 и K2+MS). При анализиране на резултатите от FST (фиг. 19B) корелацията между времето на неподвижност и кръвнозахарните нива не се установи, както при анализиране на резултатите само на не третирани с витамин К животни, така и при включване на всички групи. В ORT (фиг. 19C) беше установена негативна връзка между

дискриминационния индекс $B/(A+B)$ и кръвната захар само при нетретираните с витамин К животни. При включване в анализа на всички групи наблюдаваната зависимост изчезва.



Фиг. 19. Връзка между нивата на кръвна захар и показателите от теста за социално взаимодействие (А), теста за принудително плуване (В) и теста за разпознаване на обект (С) при анализиране на резултатите на нетретираните с витамин К плъхове (лява колона) и на всички плъхове (дясна колона).

2.4. Дискусия

За изследване на ефектите на витамин К върху енергийния метаболизъм и поведението ние избрахме да използваме МК-7. Това е формата на витамин К2 със седем изопреноидни остатъка към нафтохиноновото ядро, която се съдържа във високи концентрации в японската храна натто (Kaneki et al., 2001). Основният довод за този избор са по-добрите фармакокинетични характеристики на МК-7 – при перорално приложение той осигурява по-висока пикова плазмена концентрация и се задържа по-

дълго време в циркулацията. Поради дългия си плазмен полуживот при продължителна суплементация се наблюдава акумулация в организма (Schurgers et al., 2007a). Токсични ефекти при хронично приложение на МК-7, както и на другите природни форми на витамин К, не са описвани в нито едно експериментално или клинично изследване.

2.4.1. *Витамин К и енергиен метаболизъм*

Въпреки многото налични проучвания връзката между нивата на витамин К и развитието на метаболитен синдром и захарен диабет остава слабо проучена. Ефектът на витамин К върху серумни метаболитни показатели при интактни женски Sprague-Dawley плъхове е изследван от Sogabe et al. (2011), чийто интерес е насочен основно към промените в костната система. Авторите установяват, наред с другите ефекти на МК-4 и филохинон, прилагани в продължение на 3 месеца, редукция на мастната тъкан и на нивото на триглицеридите. Витамин К е изследван в модел на диабет тип 1 при плъхове чрез индукция със стрептозотоцин. Seyama et al. (2000) наблюдават благоприятни ефекти на витамин К2 върху кръвната захар и инсулиновото ниво, като ги отдават на способността му да залавя свободни радикали. Iwamoto et al. (2011) изследват ефекта на витамин К2 върху костните промени при диабет тип 1 и установяват предотвратяване на хипергликемията и намаляването на феморалното тегло. Антидиабетният ефект на витамин К1 е изпитван и в проучването на Sai Varsha et al. (2014), където е установено, че отслабването на стрептозотоциновото действие вероятно се дължи на намалена продукция на свободни радикали и намалена експресия на NF-κB и iNOS в панкреаса. В бъбреците витамин К1 също оказва нефропротективен ефект чрез намаляване на оксидативния стрес и потискане на възпалението (Sai Varsha et al., 2015).

Витамерите К (менатетренон и филохинон) са прилагани и на мишки с диета-индуцирано затлъстяване, но фокусът отново е в загубата на костно вещество и метаболитни показатели не са изследвани (Kim et al., 2013).

Може да се счита, че нашето проучване с витамин К върху плъхове с индуциран метаболитен синдром е първото по своята същност.

За индукция на метаболитен синдром беше използвана вече утвърдената за целта диета с повишено съдържание на свинска мас и фруктоза. Крайното телесно тегло и в тази опитна постановка беше еднакво в различните експериментални групи. Въпреки това животните от групата с метаболитен синдром развиха висцерално затлъстяване, което ние приемаме за важен и необходим компонент на модела. Индексът на мастната тъкан беше повишен с повече от 25% в група MS в сравнение с контролните животни. При третираните с витамин К2 плъхове, получаващи същата диета за индукция на метаболитен синдром, висцералното затлъстяване беше по-слабо изразено – липсваше достоверна разлика в сравнение с контролните животни.

Дислипидемията е друга основна характеристика на метаболитния синдром. В настоящия експеримент животните с модел на метаболитен синдром демонстрираха повишени нива на триглицериди и (изчислен) LDL-холестерол при непроменени нива на холестерол и HDL-холестерол. Третирането на плъховете с витамин К2 възпрепятства

развитието на дислипидемия. Групата, подложена на висококалорична диета, но получаваща и витамин K2, беше със значително по-ниски нива на триглицеридите и LDL-холестерола в сравнение с групата с индуциран метаболитен синдром, нетретирана с витамин K2. На практика липидният профил на третираните с витамин K2 плъхове беше неразличим от този на контролните животни въпреки диетичното обременяване. Може да се приеме, че приложението на витамин K2 оказва протективен ефект върху липидната обмяна. Този ефект на витамин K, освен при плъхове (Sogabe et al., 2011), е установен още и при хора в епидемиологично проучване (Pan et al., 2009). Според авторите индивидите с метаболитен синдром или с някой от неговите компоненти консумират по-малко витамин K. Индивидите с най-висок диетичен прием на витамин K са с по-нисък риск от развитие на хипертриглицеридемия и намаляване на HDL-холестерола. Повишаване на нивата на HDL-холестерола се установи, макар и слабо проявено, и в нашето изследване. Групата интактни плъхове, третирани с витамин K2, бяха с 20% по-високи нива на HDL-холестерола в сравнение с нетретираните животни. Този ефект, обаче, не се откри при плъховете с метаболитен синдром третирани с витамин K2.

Атерогенните индекси триглицериди/HDL-холестерол и холестерол/HDL-холестерол се използват за оценка на сърдечно-съдовия риск. И двата индекса се понижиха при интактните плъхове, третирани с витамин K, а индексът триглицериди/HDL-холестерол се понижи и в двете експериментални групи, получаващи витамин K. Тези резултати показаха, че приемът на витамин K2 може да има протективен ефект по отношение развитието на сърдечно-съдови заболявания. Голямото Ротердамско епидемиологично проучване подкрепя тази хипотеза като установява, че високият диетичен прием на витамин K2 намалява дългосрочния риск от развитие на коронарна атеросклероза и аортна калцификация (Geleijnse et al., 2004).

Нарушената гликемия на гладно е друга основна характеристика на метаболитния синдром при хора. Тя е критерий за поставяне на диагнозата предиабет и се асоциира с наличието на инсулинова резистентност. Животните, подложени на висококалорична диета бяха с повишени кръвнозахарни нива в сравнение с интактните плъхове. Третирането с витамин K2 на плъховете от групата K2+MS предотврати развитието на инсулинова резистентност и нарушена гликемия на гладно. Ефектите на витамин K2 върху глюкозния толеранс и инсулиновата чувствителност са установени и при здрави доброволци (Sakamoto et al., 2000; Choi et al., 2011). Епидемиологични проучвания показват, че високият диетичен внос на витамин K намалява риска от развитие на захарен диабет тип 2 (Beulens et al., 2010; Ibarrola-Jurado et al., 2012).

Хиперлептинемията често съпътства метаболитния синдром и е свързана с развитието на лептинова резистентност. Тя, за разлика от инсулиновата, се дължи не само на нарушаване на пострецепторната сигнализация на вътреклетъчно ниво, но и на потиснато преминаване през хемато-енцефалната бариера вследствие на хипертриглицеридемията (Banks et al., 2001; Myers et al., 2008). Резултатите от нашето изследване очаквано показаха асоциация на метаболитния синдром с хиперлептинемия. Третирането с витамин K2 предотврати повишаването на лептина при плъховете от групата K2+MS, които са с ниски лептинови концентрации, съизмерими с тези на

интактните животни. Този ефект на витамин К2 би могъл да се дължи отчасти и на намалените триглицериди.

Механизмите на действие на витамин К са много и е трудно да се определи как точно се постигат неговите ефекти върху енергийния метаболизъм. Остеокалцинът е витамин К-зависимият протеин, който най-често се свързва с регулацията на енергийната обмяна. Експерименталните постановки, изследващи ролята на ОС, включително проведените от нас, показват, че при мишки и плъхове хормонално активна е некарбоксилираната форма на протеина – ucOC. Третирането с витамин К стимулира процеса на карбоксилиране и по принцип води до намаляване на нивата на ucOC (Binkley et al., 2000). Това води до заключението, че витамин К, повлиявайки ucOC, би трябвало да влошава, а не да подобрява енергийния метаболизъм.

Все пак в нашата постановка витамин К2 оказва протективен ефект и предпази третираните с него животни от развитие на метаболитен синдром. Този положителен ефект върху енергийния метаболизъм може да се обясни с другите му механизми на действие, които не са свързани с карбоксилиране на gla-протеини. Витамин К2 има изразени антиоксидантни и противовъзпалителни ефекти, а връзката между оксидативния стрес и метаболитния синдром е добре известна. Продукцията на реактивните кислородни частици се увеличава при повишени нива на свободни мастни киселини и глюкоза. Оксидативният стрес нарушава пострецепторния отговор към действието на инсулина и се развива инсулинова резистентност. Антиоксидантният ефект на витамин К2 е добре проучен най-вече в невронални и олигодендроцитни култури (Li et al., 2003; Li et al., 2009; Sakaue et al., 2011). Витамин К2 действа на вътреклетъчно ниво, в митохондриите, като подпомага преноса на електрони и увеличава ефективността на продукцията на АТР (Vos et al., 2012). Можем да предположим, че в нашата експериментална постановка витамин К2 е оказал благоприятните си ефекти върху показателите на метаболитния синдром, поне отчасти, посредством намаляване на оксидативния стрес, предизвикан от консумация на висококалорична диета.

Друг възможен механизъм, чрез който витамин К2 може да подобри състоянието на енергийния метаболизъм е противовъзпалителният му ефект. При наличие на висцерално затлъстяване се повишават нивата на възпалителни маркери като IL-6 и TNF- α . Това нарушава функционирането на мастната тъкан, намалява се отделянето на адипонектин, увеличава се продукцията на лептин, развива се инсулинова резистентност – най-напред в мастната тъкан, а впоследствие и в черния дроб и скелетните мускули (Lumeng et al., 2011). Така на практика се развива метаболитен синдром. Витамин К2 намалява нивата на IL-6 при възпаление най-вероятно посредством инхибиране на NF-kB сигналния път (Ohsaki et al., 2006; Ohsaki et al., 2010). Освен в *in vitro* изследвания, противовъзпалителният му ефект е установен и при експерименти с опитни животни – плъхове, получаващи дефицитна на витамин К диета са с повишена чернодробна експресия на гени въввлечени в острата възпалителна реакция (Ohsaki et al., 2006). Антиоксидантното и противовъзпалителното действие на витамин К2 вероятно са свързани, тъй като оксидативния стрес е един от факторите, активиращ NF-kB. Връзка между витамин К статуса и нивата на възпалителни маркери в серума е установена и при

хора – Фрамингамското кохортно проучване показва, че добрият витамин К статус се асоциира с ниски нива на възпаление (Shea et al., 2008).

2.4.2. Витамин К и поведение

Описаната експериментална постановка е първата, която установява благоприятни ефекти на витамин К2 при състояние на тревожност и депресивно-подобно поведение в опитни животни с метаболитен синдром.

Животните, получаващи HFHF диета, нетретираните с витамин К развиха тревожност – ефект, който е установен и в предходните ни опитни постановки. Допълнително в този експеримент се откри корелация между степента на тревожност и нивото на кръвна захар, което показва, че именно метаболитните промени, индуцирани от висококалоричната диета са вероятно отговорни за появата на тревожно поведение. Подобна директна връзка между състоянието на тревожност и глюкозните нива не се открива в литературата, но според мета-анализ на Anderson et al. (2002) появата на тревожност е зависима от степента на хипергликемия при пациенти с диабет тип 1 и тип 2. Третирането на животните с витамин К2 предотврати, както повишаването на кръвноразхарните нива, така и индуцираното от HFHF диетата състояние на тревожност в опитните животни. При обработката на резултатите включването на третираните с витамин К2 плъхове не промени асоциацията на тревожността с кръвната захар. Това може да означава, че анксиолитичният ефект на витамин К2 вероятно е индиректен и се медира от понижаването на глюкозните нива. При животните на нормална диета третирането с витамин К не доведе до поведенчески промени, защото при тях няма индуцирани метаболитни отклонения, които биха могли да бъдат повлияни от него.

В теста за принудително плуване животните, получаващи висококалорична диета показаха удължено време на неподвижност, индикатор за депресивно-подобно поведение. Третирането с витамин К2 предотврати развитието на депресивна симптоматика. За разлика от степента на тревожност, корелация между времето на неподвижност и нивата на кръвна захар не се откри. Това налага извода, че антидепресантният ефект на витамин К в случая не е свързан с метаболитните му свойства, а вероятно се дължи на други механизми като антиоксидантното и/или противовъзпалителното му действие. Това изглежда логично предвид важната роля на оксидативния стрес и хроничното възпаление в патогенезата на депресията (Bouayed et al., 2009; Yamada-Goto et al., 2013; Grases et al., 2014).

В настоящия експеримент, за разлика от предходните ни опитни постановки, животните с метаболитен синдром развиха и когнитивни нарушения. В ORT плъховете, подложени на висококалорична диета бяха с по-малък дискриминационен индекс, което е показател на намалена разпознавателна памет. Разпознавателната памет е проучвана рядко в модели на диетично-индуцирано затлъстяване и метаболитен синдром, повечето изследвания търсят промени в пространствената памет, която е зависима основно от хипокампа и се приема за по-чувствителна към диетично-индуцирана увреда (Marwitz et al., 2015; Broadbent et al., 2004). Разпознаването на обекти е под контрола на перириналната кора, но в хипокампа се обработват сигналите като получената

информация се координира със зрителни, обонятелни и соматосетивни стимули. Всички тези допълнителни фактори имат своята роля при определяне поведението на животните в ORT (Antunes and Biala, 2012). Следователно нарушения в областта на хипокампа вследствие на възпалителни и оксидативни промени, каквито се наблюдават при диетично обременяване, могат да доведат до влошено представяне в този тест на опитните животни. Възможно е за позитивиране на резултатите да е необходим по-дълъг период на третиране с високо-калорична диета (Kanoski and Davidson, 2010). В нашето изследване, освен нарушени когнитивни функции, се установи и негативна корелация между дискриминационния индекс и нивата на кръвна захар. Подобна корелация се открива и в изследването на Jurdak and Kanarek (2009), които също използват ORT и откриват нарушена памет при млади плъхове със сукроза-индуцирано затлъстяване.

В проведения от нас експеримент третирането на животните подложени на диетична манипулация с витамин К2 не доведе до подобряване на представянето в ORT, въпреки че третираните животни бяха с по-добри метаболитни показатели. Тази липса на ефект беше изненадваща и е трудно обяснима, тъй като антиоксидантните и противовъзпалителните свойства на витамин К2 са добре известни. Освен това в ЦНС витамин К2 изпълнява важна роля в сфинголипидния метаболизъм и е необходим за активирането на *gas6* и зависимите от него антиапоптотични сигнални пътища. Данните от проспективни и клинични проучвания подкрепят ролята на витамин К за паметта и обучението: дефицитът на витамин К и по-ниската консумация на филохинон са свързани с по-висок риск от развитие на болест на Алцхаймер (Allison, 2001; Presse et al., 2008), а приемът на зелени листни зеленчуци се асоциира с по-бавно намаляване на когнитивните способности (Morris et al., 2017). Възможно обяснение за негативните резултати е, че самият ORT не е достатъчно чувствителен за установяване на промени в областта на хипокампа.

В заключение може да се обобщи, че проведеният експеримент показва за първи път, че третирането с витамин К2 има протективен ефект, както върху въглехидратния и липидния метаболизъм, така и върху централната нервна система. Витамин К2 предпази плъховете, подложени на висококалорична диета от развитието на метаболитен синдром и свързаните с него тревожност и депресивно-подобно поведение. Възможно е анксиолитичните свойства на витамин К2 да се дължат на ефекта му върху кръвната захар, а антидепресантната му активност да се осъществява по механизми независими от метаболитния ефект.

3. Ефекти на warfarin при плъхове с експериментален модел на метаболитен синдром

3.1. *Верифициране на модел на субклиничен дефицит на витамин К при интактни плъхове*

3.1.1. *Дизайн на експериментите*

Верифицирането на модела на субклиничен дефицит на витамин К се осъществи чрез провеждане на два последователни експеримента. Всеки един от тях включваше 20 на брой здрави мъжки плъхове порода Wistar, разделени на 2 групи по 10 животни – контролна (С) и експериментална (WK1). И двата експеримента бяха с продължителност 4 седмици. Плъховете от група WK1 получаваха warfarin, разтворен във физиологичен разтвор чрез подкожно инжектиране и витамин К1, разтворен в слънчогледово олио перорално с интрагастрална сонда. Плъховете от група С получаваха разтворителите – физиологичен разтвор и слънчогледово олио чрез съответните пътища на приложение. Приемът на витамин К1 беше ежедневен, еднократно дневно и започна 48 часа преди първата доза warfarin с цел насищане на чернодробните депа и предотвратяване на кървене. Дозата в началото на първия експеримент беше 15 mg/kg (както е по литературни данни). В края на първата седмица дозата беше увеличена на 22.5 mg/kg и тази доза беше запазена до края на експеримента. Дозата на warfarin в началото на експеримента беше 150 mg/kg на 12 часа (както е по оригиналния модел на Price et al. (1998)). В края на първата седмица поради отчитане на 4 смъртни случая в група WK1, дозата беше намалена на 150 mg/kg еднократно дневно. По тази схема беше довършен първият експеримент и беше проведен вторият.

Телесното тегло на животните беше проследявано ежедневно. В края на всеки един от експериментите бяха измерени стойностите на кръвна захар след 4-часово отнемане на храната и беше проведен инсулино-толерантен тест (ITT). Взети бяха и кръвни проби от подезичните вени на животните за определяне серумните нива на триглицериди, холестерол и HDL-холестерол. Пресметнати бяха атерогенните индекси триглицериди/HDL-холестерол и холестерол/HDL-холестерол. Нивата на ucOC и cOC се определиха в серума при първия проведен експеримент.

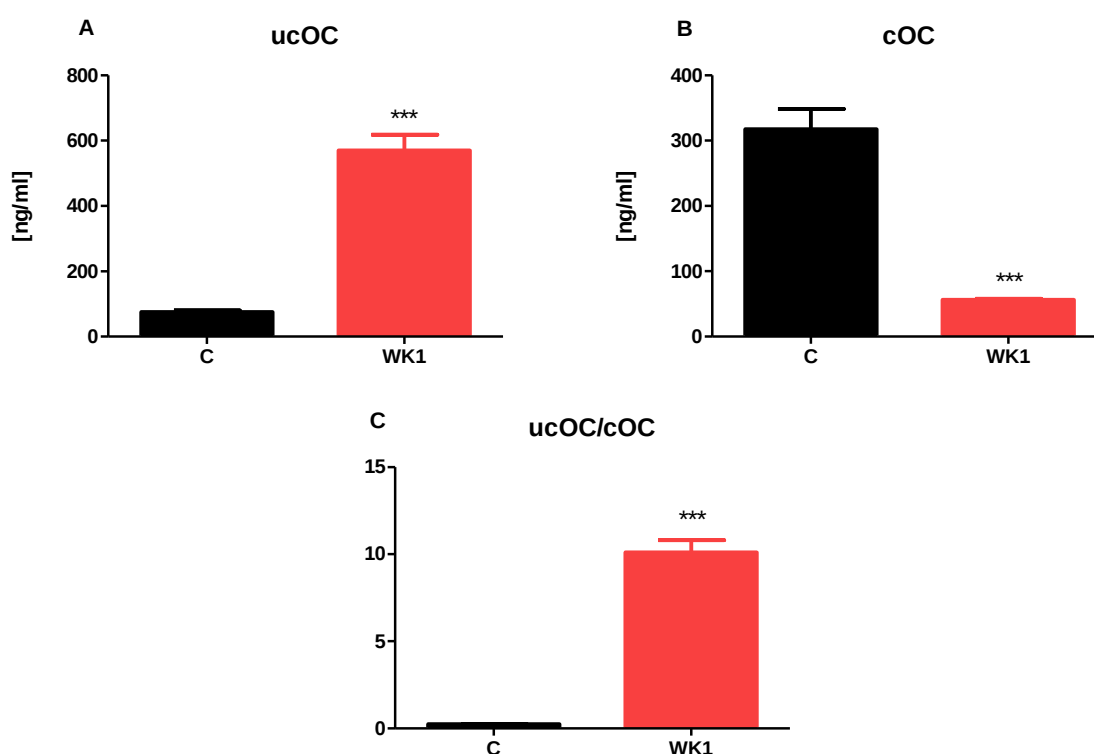
След евтаназирането беше отпрепарирана мастната тъкан около десния бъбрек и беше пресметнат индекса на мастната тъкан.

В края на всеки един от експериментите бяха проведени тест открито поле, тест за социално взаимодействие, тест за принудително плуване и тест за разпознаване на обект.

Двата експеримента бяха статистически обработвани поотделно като всяка група третирана с warfarin беше сравнявана със съответна контролна група. Използван беше two-tailed unpaired Student's t-test. Асоциации между два показателя бяха търсени с корелационен анализ и линейна регресия.

3.1.2. Ефекти на warfarin върху нивата на остеокалцина при интактни плъхове

Промените в нивата на двете форми на ОС са илюстрирани на фиг 20. При животните третираните с warfarin нивата на ucOC (фиг.20А) бяха значително по-високи: 570.3 ± 47.93 ng/ml в група WK1 в сравнение с 75.60 ± 4.997 ng/ml в група C ($t=11.97$, $df=12$, $p<0.0001$). Нивата на cOC (фиг. 20В) бяха съответно понижени: 56.28 ± 1.473 ng/ml в група WK1 срещу 317.4 ± 31 ng/ml в група C ($t=7.216$, $df=12$, $p<0.0001$). Отношението ucOC/cOC (фиг. 20С) беше увеличено в експерименталната група: 10.10 ± 0.703 срещу 0.2438 ± 0.0094 ($t=16.41$, $df=12$, $p<0.0001$).



Фиг. 20. Промени в нивата на некарбоксилирания остеокалцин (ucOC) (А), карбоксилирания остеокалцин (cOC) (В) и отношението между тях (ucOC/cOC) (С) при интактни плъхове третираните с warfarin. *** $p<0.001$ vs C

3.1.3. Ефекти на warfarin върху енергийния метаболизъм при интактни плъхове

Измерваните биологични параметри и биохимични показатели на енергийния метаболизъм, както и калкулираните атерогенни индекси са представени в таблица 9. Не се установиха разлики в повечето измервани показатели между контролната и третираната с warfarin група и в двата експеримента. Установена беше промяна в крайното телесно тегло при приключване на втория експеримент: плъховете в група WK1 бяха с по-ниско тегло от тези в група C ($t=2.16$, $df=16$, $p=0.0463$). При първия експеримент не беше установена такава разлика в теглата ($t=1.116$, $df=12$, $p=0.2859$). Липсваше разлика в теглото на мастната тъкан: в първия опит $t=1.945$, $df=12$, $p=0.0756$, във втория $t=1.267$, $df=16$, $p=0.2233$. Индексът на мастната тъкан в третираната с warfarin

група беше намален в първия експеримент ($t=2.231$, $df=12$, $p=0.0455$), докато във втория разликата беше недостоверна ($t=1.049$, $df=16$, $p=0.3098$). Не се установиха разлики в липидния профил: в триглицеридите (в първия опит $t=1.34$, $df=12$, $p=0.2052$ и във втория $t=1.007$, $df=16$, $p=0.3289$), холестерола ($t=0.788$, $df=12$, $p=0.4455$ и $t=0.2246$, $df=16$, $p=0.8251$), HDL-холестерола ($t=1.279$, $df=8$, $p=0.2367$ и $t=0.8391$, $df=16$, $p=0.4138$). Изчислените индекси холестерол/HDL-холестерол и триглицериди/HDL-холестерол също не показаха различия: съответно $t=1.406$, $df=8$, $p=0.1974$ и $t=1.243$, $df=8$, $p=0.2491$ в първия и $t=0.7826$, $df=16$, $p=0.4453$ и $t=0.5816$, $df=16$, $p=0.5689$ във втория експеримент. Не се установи достоверна разлика и в стойностите на кръвната захар на гладно ($t=1.563$, $df=12$, $p=0.1441$ в първия опит и $t=1.901$, $df=16$, $p=0.0754$ във втория). При провеждане на ИТТ стойностите на кръвна захар в групата третирана с warfarin на 60-тата минута бяха по-ниски от тези на контролната група ($t=2.54$, $df=13$, $p=0.0247$), но само във втория проведен опит. В първия експеримент липсваше разлика в този показател ($t=1.059$, $df=11$, $p=0.3124$).

Таблица 9. Метаболитни показатели. * $p<0.05$ vs C

	Експеримент 1		Експеримент 2	
	C	WK1	C	WK1
Начално телесно тегло [g]	231.5±6.522	231.7±8.709	233.6±5.239	233±4.259
Крайно телесно тегло [g]	285.8±7.181	267.3±12.71	343.6±9.788	316±7.3*
Тегло на мастна тъкан [g]	1.788±0.077	1.383±0.22	2.66±0.404	2.013±0.264
Индекс на мастна тъкан	6.483±0.229	5.187±0.604*	7.929±0.963	6.601±0.738
Триглицериди [mmol/l]	0.916±0.069	1.14±0.171	0.68±0.084	0.812±0.103
Холестерол [mmol/l]	1.95±0.123	2.085±0.11	1.873±0.114	1.906±0.083
HDL-холестерол [mmol/l]	1.518±0.138	1.324±0.063	1.303±0.073	1.386±0.063
Холестерол/ HDL-холестерол	1.396±0.068	1.59±0.12	1.438±0.047	1.382±0.053
Триглицериди/ HDL-холестерол	0.618±0.094	0.866±0.176	0.53±0.069	0.588±0.072
Кръвна захар на гладно [mmol/l]	4.688±0.162	5.067±0.178	6.99±0.168	6.55±0.15
ИТТ на 60-тата минута [% от изходната стойност]	47.13±3.276	52.20±2.973	59.67±3.296	47±3.568*

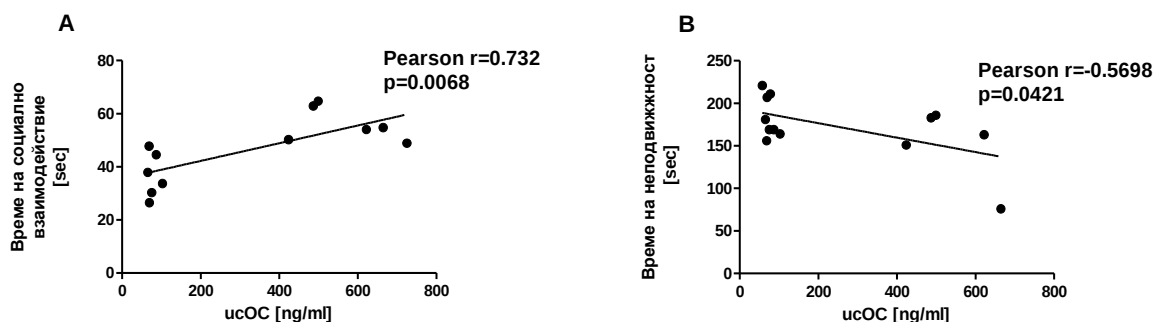
3.1.4. Ефекти на *warfarin* върху поведението на интактни плъхове

Резултатите от поведенческите тестове са представени в таблица 10. Тестът открито поле – OFT показва липса на разлика в двигателната активност между животните в експерименталните групи, както по отношение на хоризонталната ($t=1.053$, $df=12$, $p=0.3131$ в първия опит и $t=1.786$, $df=16$, $p=0.0931$ във втория), така и на вертикалната активност ($t=0.3558$, $df=12$, $p=0.7282$ и $t=1.246$, $df=16$, $p=0.2308$). Не се установи разлика във времето прекарано в централната зона ($t=0.1885$, $df=12$, $p=0.8537$ и $t=1.820$, $df=16$, $p=0.0875$) и броя на навлизанията в нея ($t=1.213$, $df=11$, $p=0.2506$ и $t=0.7382$, $df=16$, $p=0.4711$), макар и да имаше тенденция към повишаване на показателите в група WK1. Тестът за социално взаимодействие – SIT установи увеличено време на общуване при животните от WK1 групата – достоверно в първия ($t=4.45$, $df=10$, $p=0.0012$) и недостоверно във втория експеримент ($t=1.332$, $df=16$, $p=0.2017$). Тестът за принудително плуване – FST не показва разлики между групите ($t=1.73$, $df=11$, $p=0.1116$ и $t=0.6296$, $df=16$, $p=0.5379$). При провеждане на теста за разпознаване на обект (ORT) не се установи разлика в разпознавателната памет ($t=0.5009$, $df=10$, $p=0.1116$ и $t=0.8301$, $df=14$, $p=0.6273$).

Таблица 10. Резултати от поведенческите тестове. ** $p<0.01$ vs C

Показател/тест	Експеримент 1		Експеримент 2	
	C	WK1	C	WK1
Хоризонтални движения/OFT	88.38±9.645	107.2±16.22	77.9±7.405	100.±10.31
Вертикални движения/OFT	26.13±3.292	28±4.227	26.60±2.104	21.88±3.34
Време в центъра [sec]/OFT	16.26±2.591	16.95±2.393	18.30±2.314	29±5.94
Брой навлизания в центъра/OFT	1.714±0.522	2.833±0.792	2.5±0.806	3.5±1.134
Време на социално взаимодействие [sec]/SIT	36.80±3.371	55.92±2.663**	30.49±3.047	36.84±3.733
Време на неподвижност [sec]/FST	184.8±8.728	151.8±20.02	192.5±8.127	199.6±7.517
Дискриминационен индекс B/(A+B)/(ORT)	0.44±0.045	0.4767±0.057	0.4450±0.048	0.5088±0.06

При извършване на корелационен анализ, търсещ връзка между стойностите на $ucOC$ и показателите от поведенческите тестове (фиг. 21), се установи позитивна корелация с времето на социално взаимодействие (фиг. 21А) и негативна връзка с времето на неподвижност в теста за принудително плуване (фиг. 21В).



Фиг. 21. Връзка между нивото на ucOC с времето на социално взаимодействие (А) и с времето на неподвижност (В)

3.2. Ефекти на *warfarin* при плъхове с метаболитен синдром

3.2.1. Дизайн на експеримента

В експерименталната постановка бяха включени 50 мъжки Wistar плъха с изходно телесно тегло между 200 и 240 g, които бяха разпределени в 4 групи: група С (контрола), група WK1 (интактни плъхове третирани с *warfarin*), група MS (животни с диетично индуциран метаболитен синдром) и група WK1+MS (животни с диетично индуциран метаболитен синдром третирани с *warfarin*). Групи С и MS включваха по 12 плъха, а групи WK1 и WK1+MS – по 13 плъха. Преди началото на експеримента, след разпределението на животните по групи и гладуване в продължение на 6 часа, беше измерена кръвната захар с цел определяне на изходните ѝ нива. След това беше започната диетичната манипулация: групи С и WK1 получаваха стандартна лабораторна гранулирана храна и питейна вода, а тези от групи MS и WK1+MS приемаха HFHF диета с цел индукция на метаболитен синдром. След 5 седмици на диетична манипулация беше измерена контролна кръвна захар на гладно. Един ден по-късно беше поставено началото на модела на субклиничен дефицит на витамин К с интрагастрално приложение на витамин К1, разтворен в слънчогледово олио на животните от групи WK1 и WK1+MS с цел насищане на чернодробните депа и осигуряване на нуждите на кръвосъсирването. Дозата на прилагания витамин К1 беше 22 mg/kg, приложени в обем от 0.2 ml/100 g телесно тегло. Животните от групи С и MS получаваха същия обем от разтворителя – олио по същия път на приложение и в същото време, като животните от групи WK1 и WK1+MS. Третирането с витамин К1 беше ежедневно. 48 часа след началото на третирането с витамин К1 започна третирането с *warfarin* на животните от групи WK1 и WK1+MS. *Warfarin* беше прилаган, разтворен във физиологичен разтвор, в доза 150 mg/kg и обем от 0.2 ml/100 g телесно тегло. Приложението на *warfarin* беше интрагастрално след приложението на витамин К1. Животните от групи С и MS получаваха по същия път на приложение в същия обем и по същото време разтворителя – физиологичен разтвор. Общата продължителност на експеримента беше 11 седмици.

Измервани биологични параметри: Консумацията на храна и течности беше отчитана ежедневно и беше пресметната като средна консумация за ден на плъх. Беше изчислен калорийният внос. Телесното тегло беше проследявано 1 път седмично по време на

първата част на експеримента (първите 5 седмици) и 3 пъти седмично през останалия период от опита. След евтаназирането на животните беше отпрепарирана и претеглена мастната тъкан около десния бъбрек. Пресметнат беше индексът на мастната тъкан.

Биохимични изследвания: Кръвната захар на гладно беше измервана 3 пъти – изходна стойност в началото на експеримента, контролна стойност след 5 седмици диетична манипулация и в края на експеримента. Тогава беше проведен и глюкозо-толерантен тест (GTT). Пресметната беше площта под кривата (AUC). При приключването на експеримента бяха взети кръвни проби от подезичната вена за изследване на серумните стойности на триглицериди, холестерол, HDL-холестерол. Пресметнати бяха атерогенните индекси холестерол/HDL-холестерол и триглицериди/HDL-холестерол.

Поведенчески тестове: В края на експеримента бяха проведени поведенчески тестове: за оценка на двигателната активност беше използван тест открито поле (OFT), за оценка на тревожно-подобно поведение беше проведен тест за социално взаимодействие (SIT), на депресивно-подобно поведение – тест за принудително плуване (FST), за оценка на пространствената памет беше използван тест за разпознаване на място (PRT).

Статистически анализ: Групите бяха сравнявани по две (група С с група MS; група С с група WK1; група MS с група WK1+MS) с помощта на two-tailed unpaired Student's t-test. GTT беше анализиран чрез двуфакторен вариационен анализ (two-way ANOVA с последващ Bonferroni пост тест). Асоциации между два показателя бяха търсени с корелационен анализ и линейна регресия.

3.2.2. Ефекти на warfarin върху енергийния метаболизъм

Групите подложени на диетична манипулация консумираха значително по-малко количество храна дневно: средната дневна консумация на плъх в група С беше 22.1 ± 0.2 g, а в група MS – 13.98 ± 0.247 g ($t=15.05$, $df=164$, $p<0.0001$); в група WK1 консумацията на храна беше 21.86 ± 0.231 g, а в група WK1+MS – 13.83 ± 0.209 g ($t=25.76$, $df=164$, $p<0.0001$). Третирането с warfarin не се отрази на консумацията на храна – липсваше разлика, както между групи С и WK1 ($t=0.8013$, $df=164$, $p=0.4241$), така и между групи MS и WK1+MS ($t=0.4782$, $df=164$, $p=0.6332$). Консумацията на течности беше по-висока в групите подложени на диетична манипулация: средната дневна консумация на плъх в група С беше 33.11 ± 0.309 ml, а в група MS – 42.85 ± 0.569 ml ($t=25.55$, $df=164$, $p<0.0001$); в група WK1 консумацията на течности беше 31.35 ± 0.183 ml, а в група WK1+MS – 38.45 ± 0.479 ml ($t=13.86$, $df=164$, $p<0.0001$). Групите третирани с warfarin приемаха по-малко количество течности в сравнение със съответстващите им нетретирани с warfarin групи (при сравняване на групи С и WK1 $t=4.902$, $df=164$, $p<0.0001$, а на MS и WK1+MS $t=5.917$, $df=164$, $p<0.0001$). Групите, получаващи HFHF диета, приемаха повече калории ежедневно в сравнение с групите на стандартна лабораторна диета: средният калориен внос на плъх в група С беше 61.66 ± 0.558 kcal, а в група MS – 73.77 ± 1.041 kcal ($t=10.26$, $df=164$, $p<0.0001$); в група WK1 калорийният внос беше 60.98 ± 0.643 kcal, а в група WK1+MS – 71.39 ± 0.827 kcal ($t=9.932$, $df=164$, $p<0.0001$). Третирането с warfarin не се отрази достоверно на общия калориен внос на животните въпреки намалението на обема

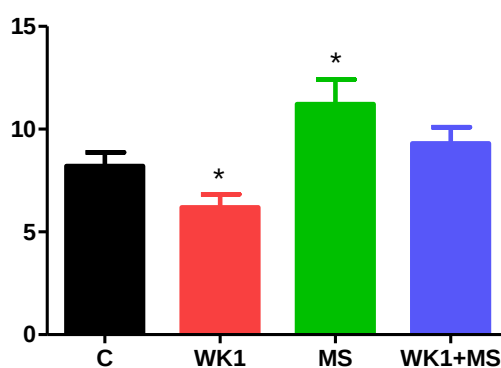
на консумираните течности в тези групи (при сравняване на групи С и WK1 $t=0.8013$, $df=164$, $p=0.4241$, а на групи MS и WK1+MS $t=1.795$, $df=164$, $p=0.0745$).

Проследяваните биологични параметри са представени на таблица 11. Не се установи разлика в крайните телесни тегла на опитните животни: при сравняване на групи С и MS $t=1.69$, $df=21$, $p=0.1057$, за групи С и WK1 $t=1.889$, $df=22$, $p=0.0721$, за групи MS и WK1+MS $t=0.5538$, $df=23$, $p=0.5851$. Теглото на висцералната мастна тъкан, както и индексът на мастната тъкан, бяха понижени при животните от група WK1 в сравнение с контролните (съответно $t=2.204$, $df=22$, $p=0.0383$ за абсолютната стойност и $t=2.192$, $df=22$, $p=0.0393$ за индекса). При животните с модел на метаболтен синдром висцералната мастна тъкан беше повишена – достоверно при сравняване на индекса ($t=2.15$, $df=21$, $p=0.0434$) и недостоверно при сравняване на абсолютните стойности ($t=1.456$, $df=21$, $p=0.1602$). Третирането с warfarin на плъховете с метаболитен синдром намали недостоверно висцералната мастна тъкан ($t=1.342$, $df=23$, $p=0.1928$ за абсолютните стойности и $t=1.355$, $df=23$, $p=0.1886$ за индекса). Индексът на мастната тъкан е показан графично на фиг. 22.

Таблица 11. Биологични показатели. * $p<0.05$ vs C

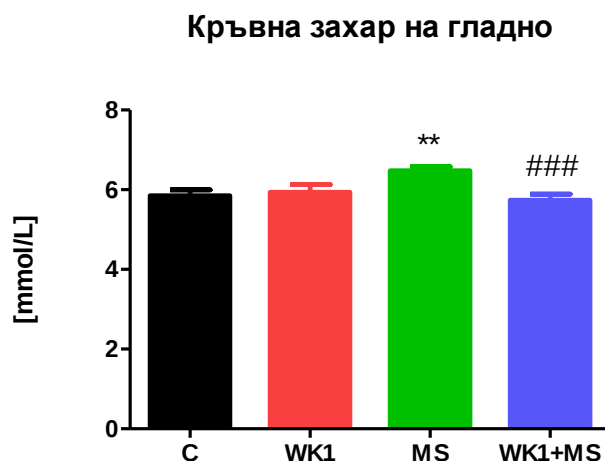
	C	WK1	MS	WK1+MS
Изходно телесно тегло [g]	222.2±4.108	222.6±2.903	221.7±4.347	222.2±2.805
Крайно телесно тегло [g]	350.7±9.126	329.2±7.077	329.5±8.634	323.4±7.007
Тегло на мастна тъкан [g]	2.918±0.304	2.069±0.244*	3.808±0.514	3.031±0.292
Индекс на мастна тъкан	8.207±0.656	6.199±0.634*	11.22±1.2*	9.304±0.793

Индекс на мастната тъкан



Фиг. 22. Оценка на висцералното затлъстяване. $p<0.05$ vs C

Изходната кръвна захар на гладно беше в диапазона от 4.8 до 6.4 mmol/l като средните стойности за група C бяха 5.492 ± 0.153 mmol/l, за група WK1 бяха 5.208 ± 0.127 mmol/l, за група MS бяха 5.508 ± 0.136 mmol/l и за група WK1+MS бяха 5.262 ± 0.155 mmol/l. При сравнителния анализ на групи C и WK1 $t=1.435$, $df=23$, $p=0.1647$, на групи C и MS $t=0.0822$, $df=22$, $p=0.936$, на групи MS и WK1+MS $t=1.185$, $df=23$, $p=0.2479$. След 5 седмици диетична манипулация, преди началото на третирането с warfarin, беше измерена контролна кръвна захар на гладно. Животните, получаващи стандартна лабораторна диета (от групи C и WK1) бяха със средни стойности на кръвна глюкоза 5.708 ± 0.105 mmol/l. Животните третирани с висококалорична диета (от групи MS и WK1+MS) бяха с повишени стойности на кръвната захар: 6.404 ± 0.125 mmol/l. Разликата в кръвната захар, индуцирана от диетичната манипулация беше с много висока достоверност: $t=4.254$, $df=47$, $p<0.0001$. При определяне на стойностите на кръвна захар на гладно в края на експеримента (фиг. 23) животните с метаболитен синдром, неполучаващи warfarin, продължаваха да са с по-високи кръвнозахарни нива – 6.475 ± 0.104 mmol/l в сравнение с контролните животни от група C, при които плазмената глюкоза беше 5.850 ± 0.145 mmol/l ($t=3.579$, $df=20$, $p=0.0019$). Третирането на животните с метаболитен синдром с warfarin беше довело до намаляване на кръвнозахарните нива до стойности като на контролните животни: в група WK1+MS кръвната захар беше 5.738 ± 0.148 mmol/l, при сравнение с група MS $t=4.005$, $df=23$, $p=0.0006$. Интактните животни третирани с warfarin от група WK1 бяха с кръвна захар 5.938 ± 0.193 mmol/l, като разлика с група C не се установи ($t=0.347$, $df=21$, $p=0.7321$).



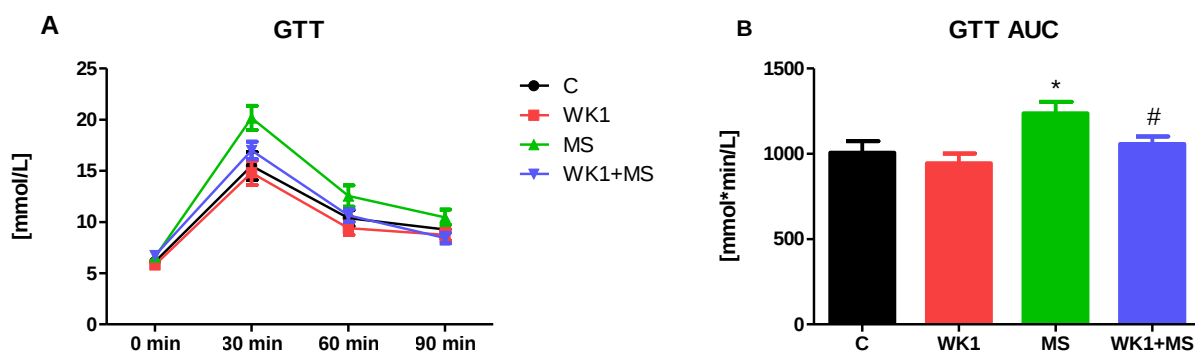
Фиг. 23. Стойности на кръвната захар на гладно в края на опитната постановка. ** $p<0.01$ vs C; ### $p<0.001$ vs MS.

Резултатите от проведения GTT са представени на таблица 12 и фиг. 24A. Нарушен отговор при глюкозно обременяване се откри на 30-тата минута след инжектирането на глюкоза при животните с метаболитен синдром, нетретирани с warfarin. Третирането с warfarin доведе до възстановяване на глюкозния толеранс до нормалните му нива (Two-way ANOVA $F(9,105)=2.369$, $p=0.0176$; за фактор третиране $F(3,105)=4.815$, $p=0.0066$). AUC от GTT (фиг. 24B) беше повишена при животните от група MS в сравнение с тези

от група C (1238 ± 67.69 mmol*min/l срещу 1007 ± 66.77 mmol*min/l; $t=2.206$, $df=15$, $p=0.0434$). Животните от група WK1+MS бяха с намалени стойности на AUC в сравнение с тези от група MS и бяха неотличими от контролните: AUC в група WK1+MS беше 1058 ± 44.76 mmol*min/l ($t=2.288$, $df=22$, $p=0.0321$ при сравняване на групи MS и WK1+MS). Интактните плъхове третиран с warfarin не се различаваха и по този показател от чистите контроли – AUC в група WK1 беше 945.7 ± 56.39 mmol*min/l ($t=0.6995$, $df=13$, $p=0.4966$ при сравняване на групи C и WK1).

Таблица 12. Глюкозо-толерантен тест. *** $p < 0.001$ vs C; ## $p < 0.01$ vs MS при използван Bonferroni пост тест

	0 min [mmol/l]	30 min [mmol/l]	60 min [mmol/l]	90 min [mmol/l]
C	6.133 ± 0.193	15.48 ± 1.362	10.38 ± 0.774	9.283 ± 0.253
WK1	5.822 ± 0.174	14.82 ± 1.177	9.411 ± 0.647	8.756 ± 0.554
MS	6.6 ± 0.224	$20.17 \pm 1.193^{***}$	12.55 ± 1.042	10.47 ± 0.737
WK1+MS	6.738 ± 0.462	$17.02 \pm 0.84^{##}$	10.65 ± 0.636	8.438 ± 0.507



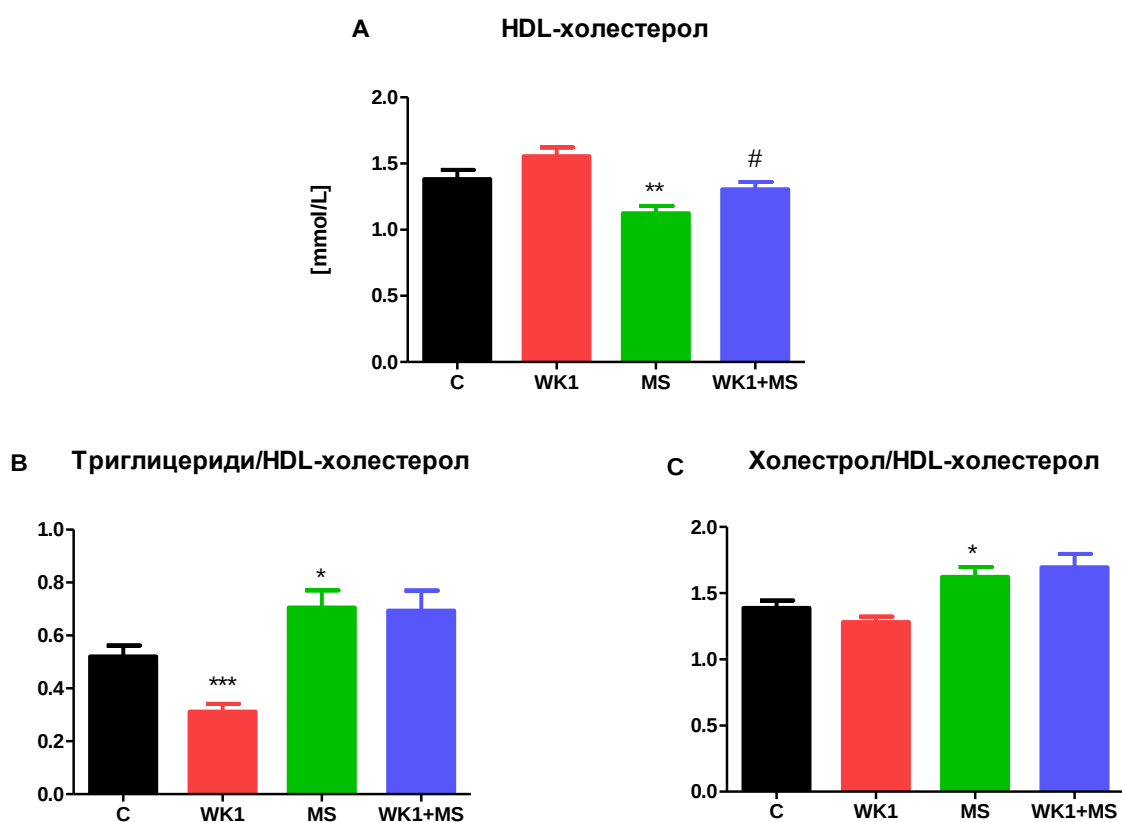
Фиг. 24. Глюкозо-толерантен тест (A) и площ под кривата (B). * $p < 0.05$ vs C; # $p < 0.05$ vs MS

Показателите на липидния метаболизъм са представени в таблица 13. Серумните триглицериди бяха намалени при интактните плъхове третиран с warfarin в сравнение с чистите контроли ($t=3.426$, $df=22$, $p=0.0024$). Между групи C и MS, както и между групи MS и WK1+MS не се откриха разлики (съответно $t=0.8923$, $df=21$, $p=0.3823$ и $t=1.577$, $df=22$, $p=0.129$). Липсваха разлики между плазмените нива на холестерола: при сравняване на групи C и WK1 $t=0.8636$, $df=22$, $p=0.3971$, на групи C и MS $t=0.7973$, $df=21$, $p=0.4342$, на групи MS и WK1+MS $t=1.999$, $df=23$, $p=0.0576$. Серумните нива на HDL-холестерол в група MS бяха по-ниски в сравнение с контролната група ($t=2.921$, $df=21$, $p=0.0082$). Третирането с warfarin на животните с метаболитен синдром доведе до повишаване на HDL-холестерола в група WK1+MS в сравнение с MS ($t=2.306$, $df=22$, $p=0.0309$). При интактните плъхове третиран с warfarin стойностите на HDL-холестерола (фиг. 25A) бяха недостовърно повишени в сравнение с контролните животни от група C ($t=1.804$, $df=22$, $p=0.0849$). Атерогенните индекси (фиг. 25B и C) в група MS бяха по-високи отколкото в група C: за индекса холестерол/HDL-холестерол $t=2.526$, $df=21$, $p=0.0196$, за триглицериди/HDL-холестерол $t=2.396$, $df=21$, $p=0.026$. Третирането с warfarin на плъховете с метаболитен синдром не доведе до промяна в тези показатели

– при сравнение на групи MS и WK1+MS на отношението холестерол/HDL-холестерол $t=0.5941$, $df=23$, $p=0.5882$, а на триглицериди/HDL-холестерол $t=0.1272$, $df=21$, $p=0.9$. Третирането на интактни животни с warfarin намали атерогенния индекс триглицериди/HDL-холестерол ($t=4.286$, $df=22$, $p=0.0003$ при сравняване на групи C и WK1) и не се отрази на отношението холестерол/HDL-холестерол ($t=1.599$, $df=21$, $p=0.1246$).

Таблица 13. Показатели на липидния метаболизъм. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs C; # $p<0.05$ vs MS.

	C	WK1	MS	WK1+MS
Триглицериди [mmol/L]	0.707±0.049	0.481±0.044**	0.767±0.046	0.892±0.064
Холестерол [mmol/l]	1.914±0.111	2.048±0.107	1.803±0.086	2.052±0.09
HDL-холестерол [mmol/l]	1.383±0.07	1.556±0.066	1.123±0.056**	1.305±0.056#
Холестерол/HDL-холестерол	1.389±0.055	1.283±0.039	1.625±0.073*	1.695±0.103
Триглицериди/HDL-холестерол	0.5212±0.041	0.3118±0.029***	0.7067±0.064*	0.6941±0.076



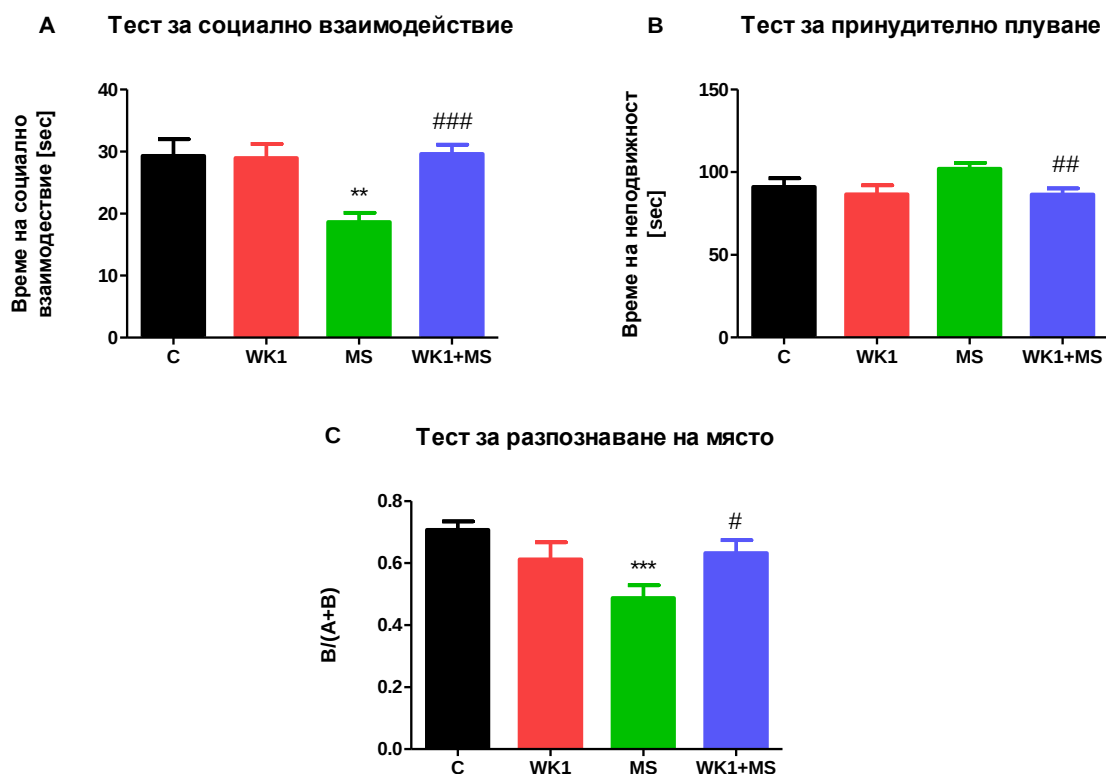
Фиг. 25. Показатели на липидния метаболизъм: серумен HDL-холестерол (A) и атерогенни индекси (B и C). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs C; # $p<0.05$ vs MS.

3.2.3. Ефекти на warfarin върху поведението

Резултатите от поведенческите тестове са представени в таблица 14. OFT показва еднаква двигателната активност на животните от четирите експерименталните групи: липсваха разлики в броя на хоризонталните движения (при сравняване на групи С и WK1 $t=1.219$, $df=22$, $p=0.2357$; на групи С и MS $t=0.4885$, $df=20$, $p=0.6305$; на групи MS и WK1+MS $t=1.058$, $df=20$, $p=0.3027$) и на вертикалните движения (при сравняване на групи С и WK1 $t=0.1424$, $df=22$, $p=0.888$; на групи С и MS $t=0.6295$, $df=21$, $p=0.5358$; на групи MS и WK1+MS $t=0.2714$, $df=23$, $p=0.7885$). Не се установи разлика във времето прекарано в централната зона (при сравняване на групи С и WK1 $t=0.3366$, $df=21$, $p=0.7398$; на групи С и MS $t=1.163$, $df=20$, $p=0.2587$; на групи MS и WK1+MS $t=0.5572$, $df=22$, $p=0.583$) и броя на навлизанията в нея (при сравняване на групи С и WK1 $t=0.6268$, $df=22$, $p=0.5372$; на групи С и MS $t=0.4486$, $df=21$, $p=0.6583$; на групи MS и WK1+MS $t=0.6656$, $df=23$, $p=0.5123$). В останалите поведенчески тестове (фиг. 26) животните с индуциран метаболитен синдром показаха отклонения в съответните показатели: сравнени с контролните те бяха с понижено време на социално взаимодействие в SIT ($t=3.608$, $df=21$, $p=0.0017$), повишено с гранична достоверност време на неподвижност в FST ($t=1.727$, $df=20$, $p=0.0996$) и намален дискриминационен индекс в PRT ($t=4.338$, $df=21$, $p=0.0003$). Третирането с warfarin подобри показателите във всички тестове: животните от група WK1+MS сравнени с тези от група MS бяха с удължено време на социално взаимодействие ($t=5.356$, $df=23$, $p<0.0001$), по-кратко време на неподвижност ($t=2.99$, $df=21$, $p=0.07$) и по-висок дискриминационен индекс ($t=2.491$, $df=23$, $p=0.0204$). Между животните, получаващи стандартна диета (групи С и WK1), не се установиха различия в поведението (в SIT $t=0.09654$, $df=22$, $p=0.924$; в FST $t=0.6101$, $df=21$, $p=0.5483$; в PRT $t=1.496$, $df=21$, $p=0.1496$).

Таблица 14. Резултати от поведенческите тестове. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs C; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$ vs MS

Показател/тест	C	WK1	MS	WK1+MS
Хоризонтални движения/OFT	53.91±8.207	65.08±4.799	59.82±8.885	71.64±6.771
Вертикални движения/OFT	20.82±3.107	21.31±1.766	23.08±1.944	22.08±3.075
Време в центъра [sec]/OFT	9.3±1.024	8.808±1.011	7.892±0.705	8.408±0.602
Брой навлизания в центъра/OFT	0.9091±0.211	0.6923±0.263	0.75±0.279	1±0.253
Време на социално взаимодействие [sec]/SIT	29.33±2.649	28.99±2.273	18.67±1.458**	29.66±1.442###
Време на неподвижност [sec]/FST	91.18±5.068	86.67±5.348	102.0±3.683	86.50±3.638##
Дискриминационен индекс B/(A+B)/PRT	0.7076±0.028	0.6125±0.055	0.4876±0.041***	0.6332±0.041#

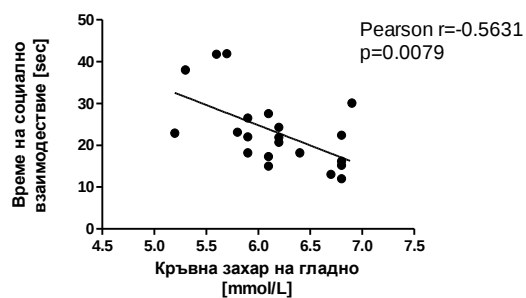


Фиг. 26. Поведенчески тестове за оценка на тревожност (A), депресивност (B) и пространствена памет (C). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs C; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs MS

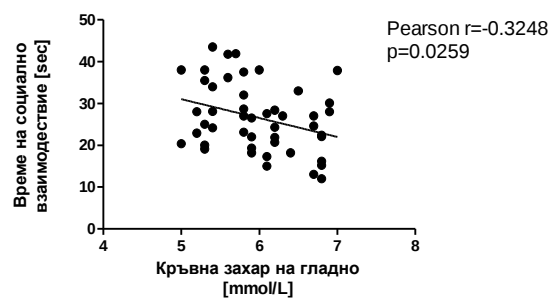
При нетретираните с warfarin животни корелационният анализ показва зависимости между поведенческите показатели и кръвнозахарните нива, които се повлияха по различен начин от третирането с warfarin. Установените корелации са представени графично на фиг 27. В SIT (фиг. 27A) се установи негативна корелация между кръвнозахарните нива и времето на социално взаимодействие в групите C и MS. Тази негативна връзка се запази при включване в анализа и на третираните с warfarin животни (от групи WK1 и WK1+MS). При FST (фиг. 27B) корелация между времето на неподвижност и кръвнозахарните нива не беше намерена независимо от третирането с warfarin. В PRT (фиг. 27C) се установи негативна връзка между дискриминационния индекс $B/(A+B)$ и кръвната захар само при нетретираните с warfarin животни. При включване в анализа на всички групи корелацията се изгуби.

A

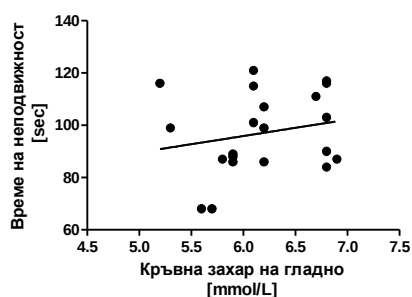
Кръвна захар спрямо време на взаимодействие
при нетретираните с warfarin плъхове



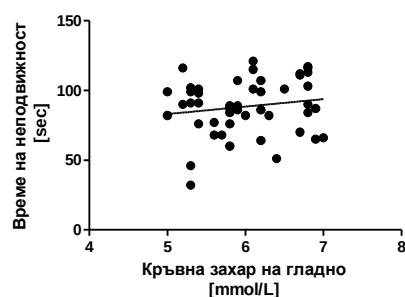
Кръвна захар спрямо време на взаимодействие
при нетретираните и третираните с warfarin плъхове

**B**

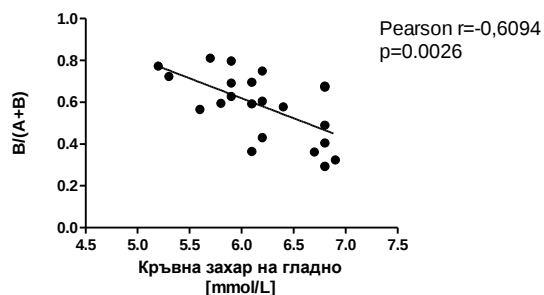
Кръвна захар спрямо време на неподвижност
при нетретираните с warfarin плъхове



Кръвна захар спрямо време на неподвижност
при нетретираните и третираните с warfarin плъхове

**C**

Кръвна захар спрямо дискриминационен индекс
при нетретираните с warfarin плъхове



Кръвна захар спрямо дискриминационен индекс
при нетретираните и третираните с warfarin плъхове



Фиг. 27. Връзка между нивата на кръвна захар и показателите от теста за социално взаимодействие (A), теста за принудително плуване (B) и теста за разпознаване на място (C) при анализиране на резултатите на нетретираните с warfarin плъхове (лява колона) и на всички плъхове (дясна колона).

3.3. Дискусия

3.3.1. *Верифициране модела на субклиничен дефицит на витамин К при интактни плъхове*

Резултатът от експериментите ни върху плъхове с модел на метаболитен синдром доведоха до заключението, че остеокалцинът в неговата некарбоксилирана форма (ucOC) е хормонално активен и изпълнява важна физиологична роля, както по отношение на енергийния метаболизъм, така и на поведението на опитните животни. Това логично повдига въпроса би ли довела промяната в нивата на ucOC до промяна в показателите на енергийния метаболизъм и поведението. Тъй като ucOC е витамин К-зависим протеин, експерименталният модел на субклиничен дефицит на витамин К, създаден от Price et al. (1998) с цел индукция на съдова калцификация, изглежда подходящ метод, чрез който нивата на ucOC да бъдат повишени. В оригиналния модел се използват високи дози warfarin, многократно надвишаващи терапевтичните, в които той се използва като антикоагулант. Това поражда опасението, че въпреки профилактичното приложение на витамин K1, е възможно да се получат кръвоизливи в опитните животни. В модела на Price et al. (1998) не се описват смъртни случаи и не са наблюдавани кръвоизливи, както и промяна в протромбиновото време. Опитните животни в оригиналния модел са мъжки Sprague-Dawley плъхове, а използваните от нас бяха порода Wistar. Тази разлика в биологичния вид би могла да се отрази на чувствителността на животните към действието на антикоагуланта. Това наложи моделът на субклиничен дефицит на витамин К, преди да бъде включен в опитна постановка с индукция на метаболитен синдром, да бъде изпитан върху интактни плъхове.

Моделът на Price et al. (1998) е използван и от други научни групи, много от които го модифицират. При някои модификации warfarin и витамин К са смесвани с храната (Schurgers et al., 2007), а в други експерименти warfarin е разтворен в питейната вода (Bouvet et al., 2007). В тези постановки моделът сработва успешно въпреки променения път на приложение, което показва, че пероралното въвеждане на експерименталните вещества е също толкова ефективно като инжекционното. Като пътища на приложение в нашия експеримент с цел адаптация на модела ние избрахме инжекционно подкожно въвеждане на warfarin и перорално приложение на витамин K1. Дозите на веществата в началото на експеримента бяха идентични с тези на Price et al. (1998) – 150 mg/kg warfarin, прилаган през 12 часа, и 15 mg/kg витамин K1, прилаган на 24 часа. В края на първата седмица от третирането бяха отчетени 4 смъртни случая асоциирани с кръвоизливи в подкожната тъкан в групата третирана с warfarin. Поради това експериментът беше продължен с двойно по-ниска доза warfarin – 150 mg/kg на 24 часа и с по-висока доза витамин K1 – 22.5 mg/kg веднъж дневно. В тези дози веществата бяха прилагани още 3 седмици, като повече смъртни случаи не бяха наблюдавани. Причина за кръвоизливите, въпреки стриктното спазване на протокола на Price et al. (1998), би могла да бъде видово обусловена по-висока чувствителност на плъховете порода Wistar в сравнение с Sprague-Dawley към антикоагулантния ефект на warfarin или промяната в пътя на приложение на витамин K1 от инжекционен, както е в модела на Price et al. (1998), в перорален.

При определяне на серумните стойности на двете форми на ОС се установи многократно (повече от 7 пъти) повишаване на нивата на ucOC в третираната с warfarin група. Нивата на cOC бяха съответно понижени повече от 5 пъти. Тези резултати показаха, че моделът на субклиничен дефицит на витамин К е бил успешно реализиран в нашия експеримент. Поради липсата на достатъчно витамин К процесът на карбоксилиране на ОС, като един от екстрахепаталните gla-протеини, се е нарушил, което е довело до това значително повишаване концентрацията на некарбоксилираната му форма.

Вторият експеримент беше предприет с цел потвърждаване на безопасността на направената от нас модификация на модела. Той беше проведен с променените дози на warfarin и витамин К и беше със същата обща продължителност – 4 седмици. След като се убедихме в добрата поносимост на прилаганите лекарства в хода на експеримента, тази модификация на модела беше приета като безопасен и ефективен метод за фармакологично повлияване нивата на ucOC.

При сравняване показателите на енергийния метаболизъм на контролните и третираните с warfarin плъхове не се установиха различия в повечето показатели. Това е обяснимо, майки предвид, че животните бяха интактни и с нормален енергиен метаболизъм. Все пак имаше тенденция към благоприятно повлияване на метаболитните показатели при плъховете третираните с warfarin – индексът на мастната тъкан беше понижен в единия експеримент, а в другия се установи подобрена чувствителност към инсулин на 60-тата минута от ИТТ. Тези промени в енергийния метаболизъм подкрепят теорията за хормоналната роля на ucOC. Може да се приеме, че повишените нива на ucOC са довели до повишена продукция на адипонектин от адипоцитите и съответно до увеличена инсулинова чувствителност. В изследванията на Ferron et al. (2008 и 2012) върху интактни мишки се наблюдават подобни на нашите ефекти – повишена инсулиновата чувствителност и намалено количество висцерална мастна тъкан, предизвикани при третиране на животните с високи концентрации ucOC. Според Ferron et al. (2008) ucOC приложен инфузионно води и до намаляване на серумните триглицериди – ефект, който не беше наблюдаван в нашия експеримент, вероятно поради различния използван животински вид. Друга възможна причина за липсата на ефект върху част от показателите на енергийния метаболизъм би могла да бъде относително краткият срок на третиране на опитните животни. Според Ferron et al. (2012) намаляване на кръвната захар на гладно при интактни мишки се наблюдава в резултат на ежедневно интермитентно приложение на ucOC едва от 5-ата седмица на третирането.

При провеждането на поведенческите тестове се установи тенденция към намаляване на степента на тревожност при плъховете третираните с warfarin: в първия експеримент животните от експерименталната група бяха с по-високо време на социално взаимодействие в сравнение с контролните, а във втория беше налице недостоверно повишаване на времето прекарано в централната зона в OFT. Времето на неподвижност в FST беше недостоверно понижено при първия експеримент. Липсата на по-категорични резултати в полза на анксиолитичния и антидепресантния ефект на повишения ucOC може да се обясни с това, че животните от експерименталната група са сравнявани със здрави контролни плъхове, които не проявяват признаци на тревожно

или депресивно-подобно поведение. Все пак при извършване на корелационния анализ се откри зависимост между нивата на ucOC и част от поведенческите показатели – налице беше негативна корелация между ucOC и времето на неподвижност и позитивна връзка между ucOC и времето на социално взаимодействие. Тези резултати подкрепят наблюденията, както от нашите предшестващи експерименти върху плъхове с метаболитен синдром, така и тези на Oury et al. (2013b), провеждани върху ОС-дефицитни мишки. При животните на Oury et al. (2013b) ucOC оказва ефект не само върху степента на тревожност и депресивното поведение, но и в теста за пространствена памет – воден лабиринт. В нашия експеримент връзка между нивата на ucOC и резултатите от ORT не се откри. Вероятно разпознавателната памет, за разлика от пространствената, не е зависима от нивата на ucOC.

Основната цел на тези два последователни експеримента не беше да се търсят метаболитни или поведенчески промени в опитните животни, а да се потвърди възможността нивата на ucOC да бъдат повишени без риск от кървене посредством високи дози warfarin. Въпреки наложилата се в хода на опита модификация на модела на Price et al. (1998), желаните промени бяха постигнати успешно.

3.3.2. *Warfarin и енергиен метаболизъм в модел на метаболитен синдром*

Целта на експеримента беше да се установят ефектите на warfarin, като фармакологично средство, повишаващо нивата на ucOC върху енергийната обмяна и поведението на опитните животни, при вече утвърден модел на метаболитен синдром.

При сравняване на консумираното количество храна и течности се установи, че животните на висококалорична диета са приемали по-малко количество храна без значение дали са третирани с warfarin или не. За сметка на това те са приемали по-голямо количество течности и са получавали по-висок общ калориен внос. Тези наблюдения бяха направени още в експеримента с цел верификация на модела на метаболитен синдром. Третирането с warfarin се отрази на количеството приемани течности – и в двете групи, получаващи warfarin, консумацията беше по-малка от тази в съответстващите им нетретирани с warfarin групи. Моделът на Price et al. (1998) във всичките си модификации до този момент е използван само за индукция на съдова калцификация и подобни промени в консумацията на течности не е търсена и съответно установявана в други опитни постановки. Въпреки статистически значителното намаление на консумацията на течности, тя беше в рамките на нормалното за този животински вид – малко над 30 мл дневно на плъх. Намалената консумация не се отрази значително на общия калориен внос и не доведе до достоверни разлики в този показател между групите третирани с warfarin и съответстващите им нетретирани групи. По тази причина може да приемем, че намалената консумация на течности не е била фактор, водещ до разлики в биохимичните или поведенчески показатели на животните.

Крайните телесни тегла на опитните животни от различните групи не се различаваха достоверно както в началото, така и в края на експеримента. Това не е изненадващо и е наблюдавано и в другите наши експерименти с индукция на метаболитен синдром. Висцерално затлъстяване, задължителен и основен компонент на синдрома и фактор в

патогенезата на инсулиновата резистентност, се установи в нетретираната с warfarin група, получаваща HFHF диета. Другите компоненти на метаболитния синдром в тази група бяха повишените нива на кръвна захар на гладно, нарушеният глюкозен толеранс на 30-ата минута, намалените нива на HDL-холестерола. Площта под кривата в GTT, както и атерогенните индекси холестерол/HDL-холестерол и триглицериди/HDL-холестерол бяха по-високи в тази група в сравнение с контролната. Въпреки липсата на хипертриглицеридемия и хиперхолестеролемия, останалите метаболитни отклонения бяха достатъчни според консенсуса на IDF от 2006 г. за считане на модела на метаболитен синдром за успешен в тази опитна постановка.

Приложението на warfarin се отрази на повечето метаболитни показатели. Висцералната мастна тъкан беше редуцирана. Показателите за оценка на висцералното затлъстяване в група WK1+MS бяха на практика еднакви с тези на контролните животни от група C. Те се понижиха и при плъховете от група WK1. Ефектът на warfarin върху въглехидратния метаболизъм също беше добре изразен. Животните подложени на диетична манипулация развиха хипергликемия на гладно, установена при контролното измерване на кръвната захар в края на 5-ата седмица от експеримента. Приложението на warfarin възстанови нарушения въглехидратен метаболизъм. В третираната с warfarin група, получаваща висококалорична диета бяха нормални, както нивата на кръвна захар на гладно, така и глюкозо-толерантния тест.

Третирането с warfarin повлия и липидния метаболизъм. Нивата на HDL-холестерола бяха повишени и в двете групи, получаващи warfarin, като промените бяха достоверни само при наличие на диетично обременяване. Причината за това вероятно е изразеното намаляване на тази холестеролова фракция в групата с модел на метаболитен синдром вследствие на висококалоричната диета. HDL-холестеролът е основен антиатерогенен фактор и ниските му нива се асоциират с увеличен сърдечно-съдов риск и повишена обща смъртност при пациенти с метаболитен синдром (Ju et al., 2017). При животните без метаболитен синдром, които получаваха стандартна диета, третирането с warfarin в рамките на този експеримент подобри, освен HDL-холестерола, и друг показател на липидния профил – серумните триглицериди бяха понижени. Като следствие на тези биохимични промени, беше намален и атерогенният индекс триглицериди/HDL-холестерол. Тези ефекти върху липидния метаболизъм на интактните животни не бяха наблюдавани в предните експерименталните постановки проведени с цел тестване на модела на субклиничен дефицит на витамин K. Възможно обяснение е малко по-дългият период на третиране с warfarin в този експеримент (6 седмици) в сравнение с предишните (4 седмици).

В литературата няма много публикации, с които могат да бъдат сравнявани тези резултати. Повечето експерименти, изследващи метаболитната роля на ucOC са провеждани върху генетично-модифицирани животни (Lee et al., 2007; Pi et al., 2008; Hinoi et al., 2008; Ferron et al., 2015). При изследванията на Ferron et al. (2008 и 2011) върху нормални мишки, подложени на обогатена с мазнини диета, се откриват сходни на нашите ефекти върху висцералното затлъстяване, кръвнозахарните нива и глюкозния толеранс. В тези експерименти благоприятното повлияване на метаболизма се постига

чрез директно въвеждане на рекомбинантен ucOC посредством имплантирани инфузионни помпи или ежедневни инжекции. В нашия експеримент същите ефекти се наблюдаваха като резултат от третиране с warfarin. Като се вземат предвид значителните промени в нивата на ucOC, които се постигнаха в използвания от нас модел, можем да заключим, че наблюдаваното повлияване на въглехидратния метаболизъм и висцералното затлъстяване се дължат именно на фармакологично индуцираното повишаване на нивата на ucOC. Вероятно и при плъховете, както при мишките, ucOC повлиява енергийния метаболизъм директно чрез активиране на Gprc5a рецептори (Pi et al., 2011; Wei et al., 2014a) и индиректно чрез стимулиране освобождаването на GLP-1 (Mizokami et al., 2013).

3.3.3. *Warfarin и поведенчески промени в модел на метаболитен синдром*

Проведените поведенчески тестове потвърдиха и в този експеримент, че обогатената с животински мазнини и фруктоза диета индуцира невро-психични промени в опитните животни. Подложените на диетичната манипулация плъхове бяха с намалено време на социално взаимодействие в SIT и повишено (с гранична достоверност) време на неподвижност в FST. Тези резултати показваха наличие на тревожно поведение и тенденция към депресивно-подобно поведение в опитните животни. В предишните ни опитни постановки с индукция на метаболитен синдром за оценка на когнитивните функции беше използван тестът за разпознаване на обект. В повечето от тях, противно на очакванията, не бяха установени паметови промени вследствие на диетичната манипулация. Възможна причина за липсата на резултати в нашите предишни опити е по-ниската чувствителност към диетично-индуцирана увреда на перириналната кора, ангажирана в разпознаването на обект, отколкото на хипокампа, отговорен за пространствената памет (Broadbent et al., 2004; Marwitz et al., 2015). В настоящия опит тестът, който използвахме за оценка на когнитивните функции е модификация на ORT, при която по време на изпитната сесия се променя не вида на единия предмет, а неговото място в полето. Приема се, че при теста за разпознаване на място се изпитва не разпознавателната, а пространствената памет (Antunes and Biala, 2012). Резултатите, които получихме, показваха намален дискриминационен индекс при животните с модел на метаболитен синдром в сравнение с контролните, т.е. установихме увреждане на пространствената памет. Тези резултати са в унисон с експерименталните постановки, намиращи дефицит в пространствената памет на опитните животни, където са използвани тестове основани на различни лабиринти (Jurdak et al., 2008; McNay et al., 2010; Can et al., 2012; Kosari et al., 2012 и др.). Нашето изследване потвърждава, че PRT е също толкова чувствителен за оценка на пространствената памет, като утвърдените за целта други тестове.

Приложението на warfarin се отрази на поведението на животните, подложени на диетична манипулация, без засягане на двигателната активност. Третирането с warfarin предотврати развитието на тревожно и депресивно-подобно поведение, както и нарушенията в когнитивните функции на опитните животни. Показателите на животните, получаващи HFHF диета и третирани с warfarin не се различаваха от тези на контролните плъхове.

Негативната връзка между нивата на кръвна захар и времето на социално взаимодействие при нетретираните с warfarin плъхове показва, че степента на тревожност корелира с тежестта на хипергликемията, предизвикана от диетичната манипулация. Вероятно хипергликемията посредством механизмите на оксидативен стрес и хронично възпаление предизвиква промени в ЦНС и тревожно поведение. При прибавяне на резултатите на третираните с warfarin животни в анализа тази зависимост се запази. Това показва, че механизмът на анксиолитично действие на warfarin е свързан с благоприятното повлияване на въглехидратния метаболизъм. Тъй като подобреният въглехидратен метаболизъм по всяка вероятност се дължи на повишените нива на ucOC, може да заключим, че това е и механизмът на повлияване на тревожността.

Подобна негативна корелация се откри и между кръвната захар и дискриминационния индекс в PRT сред нетретираните с warfarin плъхове. При добавяне на третираните с warfarin животни в анализа зависимостта се изгуби. Това показва, че вероятно ефектът на warfarin върху пространствената памет не се осъществява посредством повлияването на въглехидратния метаболизъм. Ефектът върху когнитивните функции може да се обясни отново с повишените нива на ucOC. Установено е при мишки, че той повлиява мозъчната функция (Oury et al., 2013b). Специфичните му рецептори в мозъка, Gpr158, са различни от тези в периферията, Gprc3a, така че централните ефекти са независими от метаболитните. Мозъчните рецептори на ucOC са установени в хипокампа (Khrimian et al., 2017), а именно той е отговорен за пространствената памет на животните. При изследване на когнитивните функции на генетично-интактни мишки е установено, че с напредване на възрастта на животните представянето им в тестове, оценяващи зависимата от хипокампа памет, се влошава. Третирането им с плазма от млади мишки води до подобро функциониране, но само ако в плазмата има ucOC (Khrimian et al., 2017). Тези резултати при мишки, както и нашите изследвания върху плъхове показват, че ucOC изпълнява важна регулаторна роля в процесите на памет и обучение и че неговото повишаване може да доведе до подобряване на тези процеси, особено ако те са нарушени.

Депресията е заболяване, при което неврогенезата в областта на хипокампа и фронталния кортекс е нарушена. Процесът на неврогенеза е зависим от BDNF и намаляването на неговите нива се асоциира с развитието на депресия. При изследването на Khrimian et al. (2017) е установено, че активирането на Gpr158 рецепторите от ucOC води до увеличаване на нивата на BDNF. Освен това ucOC повлиява и моноаминергичната невротрансмисия в различни региони на ЦНС, включително хипокампа, като увеличава нивата на серотонин и норепинефрин (Oury et al., 2013b). Тези механизми могат да обяснят наблюдавания от нас антидепресантен ефект на третирането с warfarin. Повлияването на енергийния метаболизъм може и да подпомага това антидепресантно действие, но директна връзка между кръвната захар и степента на депресивно поведение не се откри. Това показва, че водещият механизъм на антидепресантния ефект е друг.

Данни за връзка между нивата на ОС и честотата на тревожно-депресивните разстройства при хора в литературата липсва. Едно проучване съобщава за положителна зависимост между нивата на общия ОС и когнитивните функции при здрави жени в напреднала

възраст (Bradburn et al., 2016). Ролята на ОС в различните му форми за функционирането на ЦНС при хора тепърва ще бъде изследвана.

В заключение може да се обобщи, че при плъхове, подложени на обогатена с мазнини и фруктоза диета, приложението на warfarin подобри енергийния метаболизъм и предотврати развитието на метаболитен синдром. Тревожността, депресията и когнитивните нарушения, които се наблюдаваха при животните с метаболитен синдром също се повлияха благоприятно. Ефектите на warfarin най-вероятно се дължат на фармакологичното повишаване на нивата на ucОС. Той, от своя страна, може да повлияе метаболитните и поведенческите симптоми. Ефектите му върху поведението могат да бъдат директни или да се медираат от подобрения енергиен метаболизъм.

4. Ефекти на alendronate при плъхове с експериментален модел на метаболитен синдром

4.1. Дизайн на експеримента

В експерименталната постановка бяха включени 48 мъжки Wistar плъха с изходно телесно тегло между 208 и 262 г, които бяха разпределени в 4 групи по 12 плъха: група С (контрола), група ALD (интактни плъхове третирани с alendronate), група MS (животни с диетично индуциран метаболитен синдром) и група ALD+MS (животни с диетично индуциран метаболитен синдром третирани с alendronate). Групи С и ALD получаваха стандартна лабораторна гранулирана храна и питейна вода, а тези от групи MS и ALD+MS приемаха HFHF диета с цел индукция на метаболитен синдром. Животните от групи ALD и ALD+MS бяха третирани с alendronate, разтворен във физиологичен разтвор. Приложението беше подкожно, 3 пъти седмично в доза 50 mcg/kg телесно тегло. Животните от групи С и MS получаваха разтворителя – физиологичен разтвор в същия обем (0.1 ml/100 g телесно тегло) по същия път на приложение в същите дни. Продължителността на експеримента беше 15 седмици.

Измервани биологични параметри: Консумацията на храна и течности беше отчитана ежедневно и беше пресметната като средна консумация за ден на плъх. Калорийният внос беше пресметнат. Телесното тегло беше проследявано 3 пъти седмично. След евтаназирането на животните беше отпрепарирана и претеглена мастната тъкан около десния бъбрек. Пресметнат беше индексът на мастната тъкан.

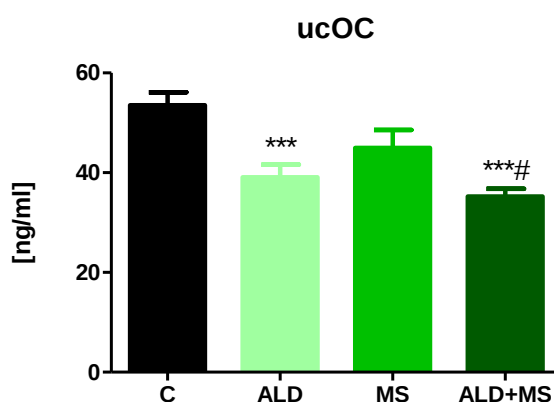
Биохимични изследвания: В края на експеримента *in vivo* беше измерена кръвната захар на гладно и беше проведен глюкозо-толерантен тест (GTT). Пресметната беше площта под кривата (AUC). При приключването на експеримента бяха взети кръвни проби от подезичната вена за изследване на серумните стойности на ucOC.

Поведенчески тестове: В края на експеримента бяха проведени поведенчески тестове: за оценка на двигателната активност беше използван тест открито поле (OFT), за оценка на тревожно-подобно поведение се проведе тест за социално взаимодействие (SIT), на депресивно-подобно поведение – тест за принудително плуване (FST), за оценка на пространствената памет беше използван тест за разпознаване на място (PRT).

Статистически анализ: Групите бяха сравнявани по две (група С с група MS; група С с група ALD; група С с група ALD+MS; група MS с група ALD+MS) с помощта на two-tailed unpaired Student's t-test. GTT беше анализиран чрез двуфакторен вариационен анализ (two-way ANOVA с последващ Bonferroni пост тест). Асоциации между два показателя бяха търсени с корелационен анализ и линейна регресия.

4.2. Ефекти на alendronate върху нивата на некарбоксилирания остеокалцин

Промените в нивата на некарбоксилирания остеокалцин са представени на фиг. 28. И двата вида третиране – диетичната манипулация и приложението на alendronate – доведоха до намаляване на серумните стойности на ucOC. В група C средната му концентрацията беше 53.53 ± 2.575 ng/ml. Във всички останали групи нивата му бяха понижени в сравнение с контролната, като в група MS средните стойности бяха 44.98 ± 3.572 ng/ml и промените бяха с гранична достоверност ($t=1.995$, $df=19$, $p=0.0605$). Третирането с alendronate доведе до значително понижение на нивата на ucOC: в група ALD средните стойности бяха 39.09 ± 2.54 ng/ml ($t=3.992$, $df=22$, $p=0.0006$ при сравнение с група C), а в група ALD+MS нивата бяха най-ниски – 35.22 ± 1.538 ng/ml, с достоверна разлика спрямо група C ($t=5.966$, $df=21$, $p<0.0001$), и спрямо група MS ($t=2.684$, $df=18$, $p=0.0152$).



Фиг. 28. Промени в нивата на некарбоксилирания остеокалцин (ucOC) при третиране с alendronate. *** $p<0.001$ vs C; # $p<0.05$ vs MS

4.3. Ефекти на alendronate върху въглехидратния метаболизъм

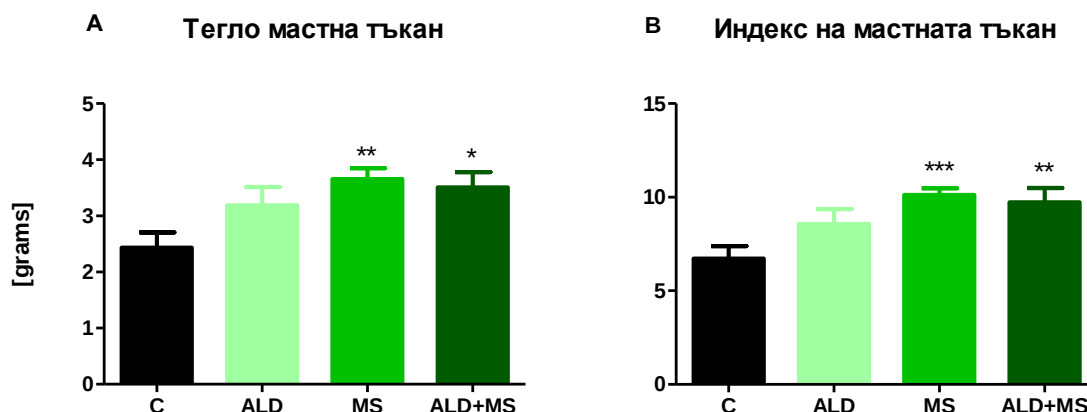
Животните, получаващи висококалорична диета консумираха по-малко количество храна, отколкото съответстващите им групи на стандартна лабораторна диета: средната дневна консумация на плъх в група C беше 24.04 ± 0.138 g, а в група MS – 14.79 ± 0.134 g ($t=47.96$, $df=194$, $p<0.0001$); в група ALD консумацията на храна беше 23.75 ± 0.086 g, а в група ALD+MS – 14.93 ± 0.126 g ($t=57.64$, $df=194$, $p<0.0001$). Между животните на една и съща диета нямаше разлики в количеството консумирана храна ($t=1.779$, $df=194$, $p=0.0768$ при сравняване на групи C и ALD; $t=0.7394$, $df=194$, $p=0.4606$ при сравняване на групи ALD и ALD+MS). Консумацията на течности беше по-висока в групите подложени на диетична манипулация: средната дневна консумация на плъх в група C беше 34.89 ± 0.281 ml, а в група MS – 49.74 ± 0.724 ml ($t=19.13$, $df=194$, $p<0.0001$); в група ALD консумацията беше 33.88 ± 0.255 ml, а в група ALD+MS – 46.06 ± 0.599 ml ($t=18.69$, $df=194$, $p<0.0001$). Групите третирани с alendronate приемаха по-малко количество течности в сравнение със съответстващите им нетретирани с alendronate групи (при сравняване на групи C и ALD $t=2.639$, $df=194$, $p=0.009$, а на MS и ALD+MS $t=3.921$, $df=194$, $p=0.0001$). Общият калориен внос (от консумираната храна и течности) при

групите с метаболитен синдром беше по-висок от този на групите, получаващи стандартна лабораторна диета: средната дневна стойност на плъх в група С беше 67.06 ± 0.386 kcal, а в група MS – 79.80 ± 0.524 kcal ($t=19.56$, $df=194$, $p<0.0001$); калорийният внос в група ALD беше 66.25 ± 0.241 kcal, а в група ALD+MS – 78.88 ± 0.432 kcal ($t=25.55$, $df=194$, $p<0.0001$). Третирането с alendronate не се отрази достоверно на общия калориен внос на животните въпреки намалението на обема на консумираните течности в тези групи (при сравняване на групи С и ALD $t=1.779$, $df=194$, $p=0.0768$, а на групи MS и ALD+MS $t=1.358$, $df=194$, $p=0.1761$).

Проследяваните биологични параметри са представени на таблица 15. В началото на експеримента средното тегло на животните от всички групи беше еднакво – 230 г. В края също нямаше разлики в средните телесни тегла: при сравняване на групи С и MS $t=1.030$, $df=22$, $p=0.3144$, за групи С и ALD $t=0.01446$, $df=22$, $p=0.9886$, за групи MS и ALD+MS $t=0.1085$, $df=22$, $p=0.9146$. Теглото на околореналната мастна тъкан (фиг. 29А) и индексът на мастната тъкан (фиг. 29В) се повишиха във всички групи, получаващи някакъв вид третиране в сравнение с контролната. При група ALD повишението беше недостоверно ($t=1.712$, $df=19$, $p=0.1031$ за абсолютната стойност и $t=1.696$, $df=19$, $p=0.1062$ за индекса). В групи MS и ALD+MS разликите в показателите бяха достоверни: $t=3.753$, $df=19$, $p=0.0013$ за абсолютната стойност и $t=4.695$, $df=19$, $p=0.0002$ за индекса при сравняване на С и MS; $t=2.73$, $df=19$, $p=0.0133$ за абсолютната стойност и $t=2.865$, $df=19$, $p=0.0099$ за индекса при сравняване на С и ALD+MS.

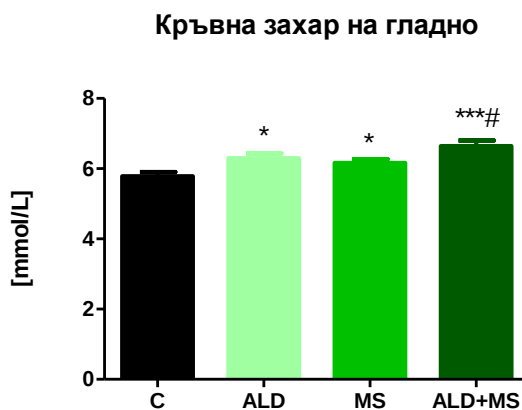
Таблица 15. Биологични параметри: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs С

	С	ALD	MS	ALD+MS
Изходно телесно тегло [g]	229.7 ± 5.104	229.5 ± 5.182	229.7 ± 4.471	229.8 ± 4.914
Крайно телесно тегло [g]	391.2 ± 9.95	391 ± 5.818	377.8 ± 8.288	379.2 ± 9.074
Тегло на мастна тъкан [g]	2.433 ± 0.275	3.192 ± 0.322	$3.658 \pm 0.194^{**}$	$3.508 \pm 0.271^{*}$
Индекс на мастна тъкан	6.716 ± 0.679	8.570 ± 0.796	$10.11 \pm 0.369^{***}$	$9.737 \pm 0.756^{**}$



Фиг. 29. Оценка на висцералното затлъстяване: абсолютно тегло на унилатералната околореналната мастна тъкан (A) и отношение спрямо телесното тегло (B): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs C

Кръвнотехарните нива в трите групи, получаващи някакво третиране бяха по-високи от тези в контролната (фиг. 30). Средните стойности в група C бяха 5.782 ± 0.12 mmol/l. Сравнени с тях нивата на кръвна захар бяха повишени в група ALD (6.295 ± 0.135 mmol/l; $t = 2.84$, $df = 20$, $p = 0.0101$), група MS (6.163 ± 0.105 mmol/l; $t = 2.4$, $df = 21$, $p = 0.0257$) и група ALD+MS (6.642 ± 0.162 mmol/l; $t = 4.202$, $df = 21$, $p = 0.0004$). В група ALD+MS нивото на кръвна захар беше по-високо от това на група MS ($t = 2.483$, $df = 22$, $p = 0.0211$).



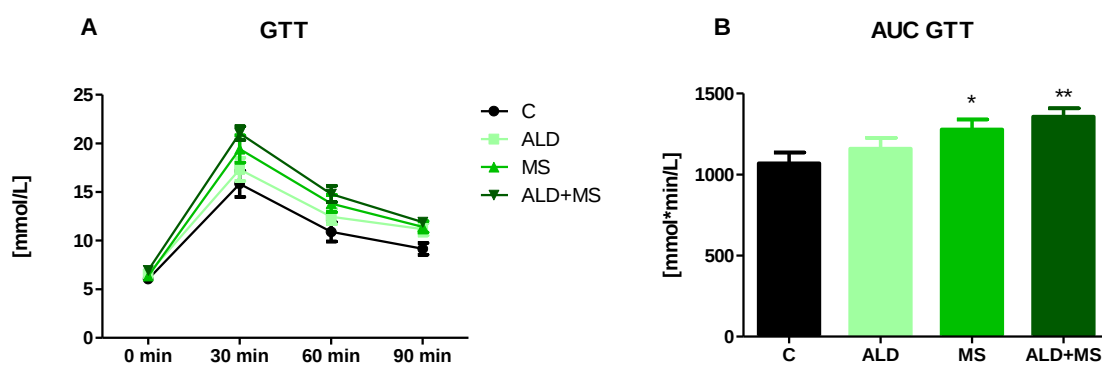
Фиг. 30. Кръвна захар на гладно: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs C; # $p < 0.05$ vs MS.

Резултатите от проведения GTT са представени на таблица 16 и фиг. 31A. Нарушен отговор при глюкозно обременяване се откри на 30-тата и 60-тата минута след инжектирането на глюкоза при животните и от двете групи с модел на метаболитен синдром, като при групата третирана с alendronate промените бяха по-силно проявени. (Two-way ANOVA $F(9,114) = 2.308$, $p = 0.0202$; за фактор третиране $F(3,114) = 4.95$, $p = 0.0053$). Площите под кривата AUC от GTT са представени на фиг. 31B: сравнени с контролната група (AUC 1070 ± 66.88 mmol*min/l) стойностите на AUC бяха повишени

недостоверно в група ALD ($1160 \pm 66.73 \text{ mmol} \cdot \text{min/l}$; $t=0.9523$, $df=17$, $p=0.3543$) и достоверно в група MS ($1279 \pm 61.34 \text{ mmol} \cdot \text{min/l}$; $t=2.307$, $df=19$, $p=0.0325$) и група ALD+MS ($1359 \pm 50.34 \text{ mmol} \cdot \text{min/l}$; $t=3.486$, $df=19$, $p=0.0025$). Разликата Между MS и ALD+MS беше недостоверна ($t=1.001$, $df=20$, $p=0.3287$).

Таблица 16. Глюкозо-толерантен тест. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs C при използван Bonferroni пост тест

	0 min [mmol/l]	30 min [mmol/l]	60 min [mmol/l]	90 min [mmol/l]
C	6.055 ± 0.202	15.84 ± 1.349	10.9 ± 0.999	9.155 ± 0.605
ALD	6.589 ± 0.171	17.32 ± 1.197	12.48 ± 0.782	11.17 ± 0.637
MS	6.364 ± 0.119	$19.42 \pm 1.397^{**}$	$13.83 \pm 0.892^{*}$	11.44 ± 0.583
ALD+MS	6.945 ± 0.233	$21.05 \pm 0.708^{***}$	$14.81 \pm 0.846^{**}$	11.91 ± 0.467



Фиг. 31. Глюкозо-толерантен тест (A) и площ под кривата (B) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs C

4.4. Ефекти на alendronate върху поведението

Промените в поведението на опитните животни са представени на таблица 17.

В OFT липсваше разлика между групите в хоризонталните движения (при сравняване на групи C и ALD $t=0.6527$, $df=22$, $p=0.5207$; на групи C и MS $t=0.3918$, $df=22$, $p=0.6989$; на групи C и ALD+MS $t=1.342$, $df=22$, $p=0.1933$, на групи MS и ALD+MS $t=0.9733$, $df=22$, $p=0.341$). Броят на навлизанията в централното поле не се различаваше между групите (при сравняване на групи C и ALD $t=0.9508$, $df=22$, $p=0.352$; на групи C и MS $t=0$, $df=22$, $p=1$; на групи C и ALD+MS $t=0.4771$, $df=22$, $p=0.638$, на групи MS и ALD+MS $t=0.4771$, $df=22$, $p=0.638$). Времето прекарано в центъра (фиг. 32A) беше намалено в групата ALD+MS, както в сравнение с контролната група C ($t=2.243$, $df=22$, $p=0.0353$), така и с група MS ($t=3.477$, $df=22$, $p=0.0021$). Третирането само с alendronate и само с диета не доведе до промени в този показател: C vs ALD ($t=0.106$, $df=22$, $p=0.9166$) и C vs MS ($t=0.3136$, $df=22$, $p=0.7568$).

В SIT (фиг. 32B) се откри разлика между контролната група и група ALD ($t=2.464$, $df=20$, $p=0.0229$), както и между контролната група и група MS ($t=2.384$, $df=20$, $p=0.0271$). Група ALD+MS показва недостоверно намалено време на общуване в сравнение с група

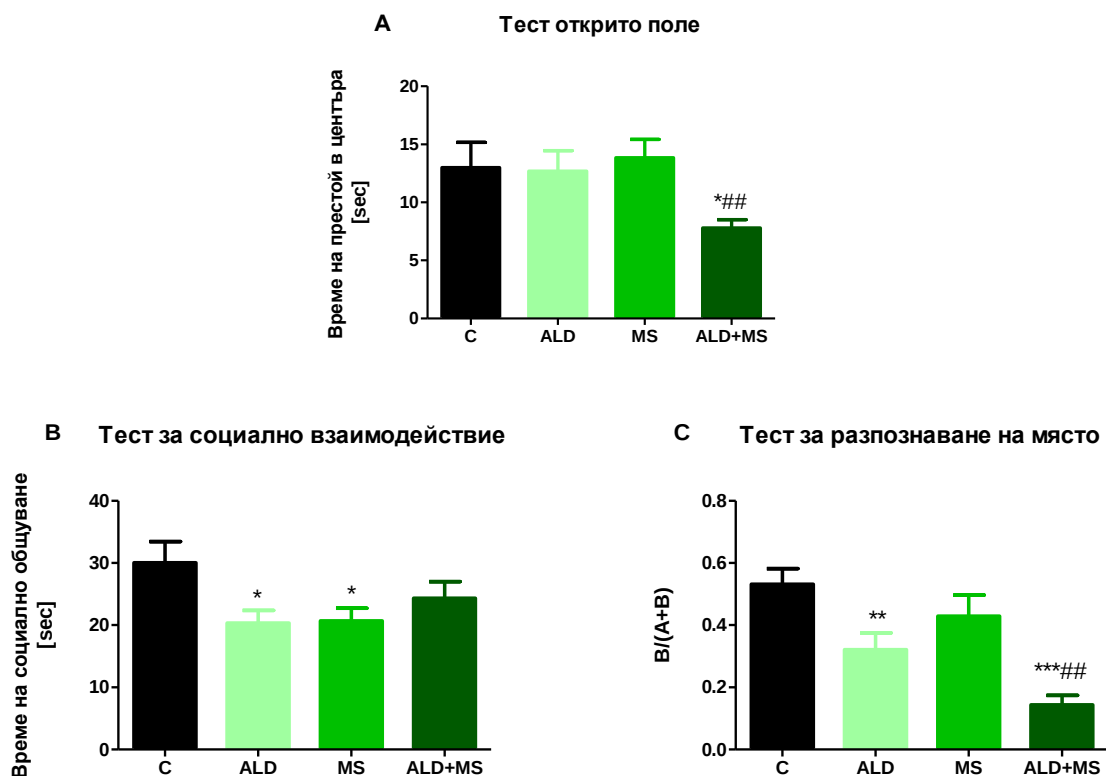
С ($t=1.328$, $df=20$, $p=0.1991$). Не се установиха различия между група ALD+MS и група MS ($t=1.09$, $df=20$, $p=0.2887$).

Във FST не се установиха различия във времето на неподвижност между експерименталните групи: група С vs ALD $t=0.2286$, $df=20$, $p=0.8215$; група С vs MS $t=0.5015$, $df=20$, $p=0.6215$; група С vs ALD+MS $t=0.04394$, $df=22$, $p=0.9654$, група MS vs ALD+MS $t=0.6872$, $df=20$, $p=0.4998$.

В PRT (фиг. 32С) контролната група беше с най-висока стойност на дискриминационен индекс $B/(A+B)$ – достоверно различен от група ALD $t=2.861$, $df=20$, $p=0.0097$ и от група ALD+MS $t=6.589$, $df=20$, $p<0.0001$, а спрямо група MS разликата беше недостоверна ($t=1.198$, $df=21$, $p=0.2442$). Дискриминационният индекс на група ALD+MS беше достоверно по-нисък от този на група MS ($t=3.711$, $df=21$, $p=0.0013$).

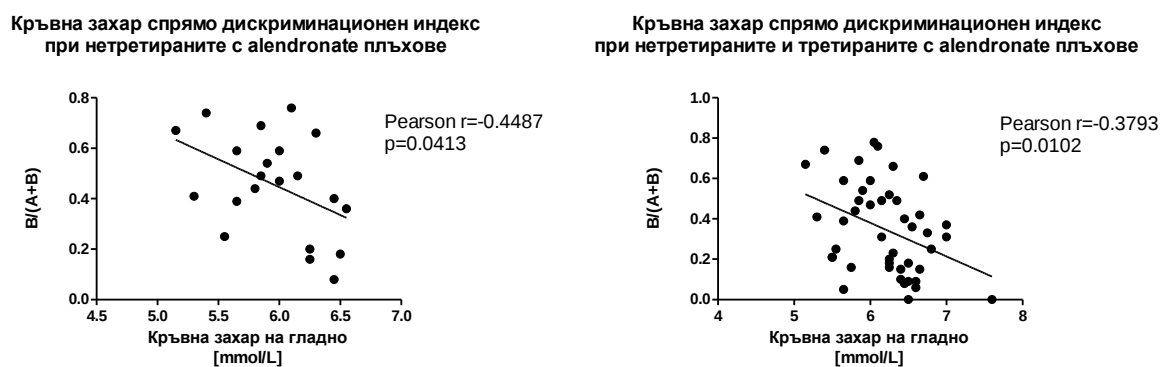
Таблица 17. Резултати от поведенческите тестове. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs С; ### $p<0.01$ vs MS

Показател/тест	С	ALD	MS	ALD+MS
Хоризонтални движения/OFT	63.00±8.366	55.17±8.606	58.50±7.868	47.92±7.505
Време в центъра [sec]/OFT	12.98±2.199	12.68±1.782	13.83±1.584	7.8±0.708***
Брой навлизания в центъра/OFT	1.25±0.372	1.75±0.372	1.25±0.372	1±0.369
Време на социално взаимодействие [sec]/SIT	30.06±3.372	20.34±2.052*	20.69±2.02*	24.35±2.677
Време на неподвижност [sec]/FST	72.17±10.67	74.90±2.496	78.70±6.213	71.58±7.894
Дискриминационен индекс $B/(A+B)$ /PRT	0.5318±0.05	0.3209±0.054**	0.4292±0.068	0.1436±0.031***##



Фиг. 32. Поведенчески тестове за оценка на тревожност (А и В) и пространствена памет (С). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs C; ## $p < 0.01$ vs MS

Корелационният анализ показва обратна зависимост между кръвната захар на гладно и дискриминационния индекс в PRT сред нетретираните с alendronate животни, която се запази при добавянето на третираните с alendronate плъхове (фиг. 33).



Фиг. 33. Връзка между нивата на кръвна захар и показателя $B/(A+B)$ от теста за разпознаване на място при анализиране на резултатите на нетретираните с alendronate плъхове (ляво) и на всички плъхове (дясно).

4.5. Дискусия

4.5.1. *Alendronate и некарбоскилиран остеокалцин*

За да бъде доказана ролята на ucOC в регулацията на енергийния метаболизъм и поведението на плъхове с модел на диетично-индуциран метаболитен синдром, е нужно да бъде изследван резултата, както от повишаването на нивата му, така и от намаляването им. Допуснахме, че за понижаване нивата на ucOC можем да използваме alendronate.

В експериментални условия alendronate е изследван главно в качеството му на антиостеопоротично средство, като в литературата се откриват разнообразни схеми на приложение. Само в една опитна постановка са изследвани нивата на ucOC и ние се спряхме на схема на приложение на alendronate подобна на описаната в нея (Lacombe et al., 2013).

Нашите резултати потвърдиха, че фармакологично повлияване на нивата на ucOC е напълно постижимо – третирането на опитните животни с alendronate ефективно понижи плазмените му нива. Този ефект на бифосфонатите е установен при мишки от Lacombe et al. (2013), както и при хора (Hirao et al., 2008; Aonuma et al., 2009; Mokuda et al., 2012). Резултатите от този експеримент показаха също, че двата фактора – третирането с alendronate и диетичната манипулация, имат синергичен ефект по отношение на нивата на ucOC.

4.5.2. *Alendronate и енергиен метаболизъм*

Подобно на предишните експерименти, консумацията на храна в групите, получаващи висококалорична диета беше значително по-ниска. Третирането с alendronate не повлия количеството приемана храна, но намали консумацията на течности. Въпреки това количеството приемани течности остана в рамките на нормалното и не се отрази на крайния общ калориен внос, така че животните от групите, получаващи HFHF диета приемаха по-голям брой калории дневно.

Анализът на показателите на енергийния метаболизъм показва, че те са претърпели промени не само под влияние на диетичната манипулация, но и в резултат от третирането с alendronate. Докато крайното телесно тегло не се промени между групите, висцералното затлъстяване се увеличи и в двете групи, получаващи HFHF диета. Третирането само с alendronate доведе до недостоверно повишаване на висцералната мастна тъкан. Понижаването на ucOC от бифосфоната изглежда не е достатъчно да предизвика затлъстяване, когато не е съпроводено от прием на нерационална диета. В същата посока бяха и резултатите от GTT. Животните и от двете групи, получаващи HFHF диета бяха с нарушен глюкозен толеранс на 30-тата и 60-тата минута след интраперитонеалното въвеждане на глюкоза, като промените бяха по-силно проявени в групата третирана с alendronate. Третирането само с alendronate доведе до влошаване на глюкозния толеранс, но промените бяха недостоверни. Най-чувствителният показател, променящ се от бифосфоната, беше кръвната захар на гладно. Тя се повиши, както в групите, получаващи висококалорична диета, така и в групата третирана само с alendronate. Комбинирането на alendronate с висококалоричната диета допълнително засили хипергликемията.

В литературата не се открива друг подобен експеримент, в който е търсен ефекта на alendronate в модел на метаболитен синдром при плъхове. Единствената опитна постановка, изследваща ефекта на alendronate върху енергийния метаболизъм е тази на Lacombe et al. (2013), където използваните опитни животни са здрави мъжки мишки. В резултат на третирането се повишава кръвната захар на гладно, както и в нашия експеримент. Настоящите резултати подкрепят теорията за хормоналната роля на ucOC и при плъхове. Изглежда той не само може да подобри въглехидратния метаболизъм, но е фактор необходим за неговото поддържане. Дефицитът на ucOC води до нарушена гликемия на гладно. В опита на Lacombe et al. (2013) нарушенията на въглехидратния метаболизъм са по-силно проявени, тъй като се влошава и глюкозния толеранс на 15-ата, 30-ата и 60-ата минута след инжектирането на глюкоза при здрави мишки. В нашия експеримент подобен ефект се откри само при комбиниране на фактора alendronate с фактора висококалорична диета. Възможно е тази разлика да се дължи на различния използван биологичен вид. Въглехидратният метаболизъм на мишките изглежда по-зависим от нивата на ucOC от този на плъховете.

Нашите експериментални резултати показаха, че приложението на alendronate може да влоши въглехидратния метаболизъм, особено когато се съчетава с нездравословна диета. Това е важен извод от гледна точка на безопасността на бифосфонатите като антиостеопоротични лекарства. Не се откриват много клинични проучвания, отчитащи метаболитните отклонения при прием на бифосфонати и резултатите от тях са много противоречиви: някои откриват влошаване на метаболитните показатели, като телесно тегло и висцерално затлъстяване, при лечение с alendronate (Schaffer et al., 2011), други не откриват никаква връзка между приема на бифосфонати и енергийния метаболизъм (Schwartz et al., 2013), а трети установяват протективен ефект на alendronate и намален риск от развитие на диабет тип 2 (Chan et al., 2015).

4.5.3. *Alendronate и промени в поведението*

Това е първият експеримент, при който е изследван ефекта на alendronate върху поведението на опитни животни, подложени на диетично-индуциран метаболитен синдром.

Не се откриват в литературата и данни за връзка между терапия с бифосфонати и тревожно-депресивни разстройства и/или когнитивни нарушения при хора.

Поведенческите тестове показаха, че при запазена двигателна активност на опитните животни, не само висококалоричната диета, но и третирането с alendronate води до състояние на тревожност. Това стана видно от теста за социално взаимодействие. Комбинираното третиране (ALD+MS) скъси времето на престой в центъра при OFT, което също е показател за повишена анксиогенеза. Парадоксално единствената експериментална постановка в литературата, изследваща ефекта на alendronate върху поведението на опитни животни, открива анксиолитичен ефект при извършване на OFT (Citraro et al., 2015). Бифосфонатът в този опит е прилаган като антиостеопоротичен медикамент на женски овариектомирани плъхове. Авторите откриват антидепресантен и анксиолитичен ефект на третирането, както и корелация между показателите на

тревожност и депресивно-подобно поведение с двигателната активност на животните, което води до крайното заключение, че промените в поведението се дължат на подобрената от alendronate костна и двигателна функция. В нашия експеримент анксиогенният ефект, проявен от alendronate се обяснява с намалените нива на uOC и съответно нарушената регулация на моноаминергичната невротрансмисия в ЦНС (Oury et al., 2013b).

В теста за оценка на пространствената памет животните третиран с alendronate бяха с намален дискриминационен индекс, като най-слабо беше представянето на групата, подложена на комбинирано въздействие от alendronate и HFHF диета. Намалени когнитивни функции са установени при ОС-дефицитни мишки (Oury et al., 2013b), както и при мишки в напреднала възраст – 16 месечни (Khrimian et al., 2017). В тези експерименти, както и в нашия, нарушението на пространствената памет се обяснява с намалените нива на uOC – резултат на генетичен дефицит при Oury et al. (2013b), напреднала възраст при Khrimian et al. (2017) или третиране с бифосфонат в нашия експеримент. Проведеният корелационен анализ разкри инверсна зависимост между кръвно-захарните нива и дискриминационния индекс, независимо от третирането с alendronate. Това показва, че увреждането на пространствената памет има връзка с хипергликемията. Вероятно намалените нива на uOC са оказали негативен ефект върху паметта отчасти и заради влошаването на въглехидратния метаболизъм, до което водят.

В тази експериментална постановка при FST не се установи промяна във времето на неподвижност. За разлика от предните опити животните с модел на метаболитен синдром не проявиха депресивно-подобно поведение. Нямаше подобни признаци и при третираните с alendronate животни. Тези резултати са изненадващи и трудно обясними като се имат предвид вече установените връзки, както между депресивното поведение и приема на диета обогатена с фруктоза и мазнини, така и между него и нивата на uOC.

В заключение може да се обобщи, че третирането на плъхове порода Wistar с alendronate доведе до понижаване на нивата на uOC и до влошаване на показателите на енергийния метаболизъм, особено при комбиниране с диета богата на фруктоза и животински мазнини. Бифосфонатите могат да доведат до тревожност и нарушение на когнитивните функции на опитните животни. По отношение на паметовите нарушения съществува синергизъм в действието на alendronate и висококалоричната диета.

5. Обобщена дискусия

През последните години се трупат експериментални данни за хормонална роля на витамин К-зависимия протеин остеокалцин в неговата некарбоксилирана форма за регулацията на енергийния метаболизъм при мишки чрез стимулиране на инсулиновата секреция и инсулиновата чувствителност на тъканите (Lee et al., 2007), но липсват данни за ефектите му върху плъхове. От друга страна, данни за самия витамин К, който карбоксилира остеокалцина и намалява некарбоксилираната му форма, показват благоприятни ефекти върху енергийния метаболизъм. Целта на настоящия проект беше да се изясни ролята на остеокалцина, както и на самия витамин К, в енергийната регулация при плъхове с метаболитен синдром. За целта бяха проведени поредица от експерименти.

Най-напред трябваше да разработим и верифицираме подходящ за нашите условия експериментален модел на метаболитния синдром, който да стои в основата на следващите опитни постановки. За целта сравнихме ефектите на две висококалорични диети и се спряхме на тази, обогатена с умерени количества животински мазнини и фруктоза, прибавени към стандартната лабораторна диета, като възпроизвеждаща най-много симптоми на метаболитния синдром при хора. Третирането на животните доведе до промени в енергийния метаболизъм, като висцерално затлъстяване, дислипидемия, нарушена инсулинова чувствителност. Повишиха се и нивата на оксидативен стрес. Освен до метаболитни нарушения, диетичната манипулация доведе и до промени в поведението на опитните животни – установени бяха повишено ниво на тревожност, депресивно-подобно поведение, а в някои от проведените експерименти и когнитивни нарушения.

Промените в енергийния метаболизъм и поведението, индуцирани от диетата, бяха съпроводени от намаляване на концентрацията на некарбоксилирания остеокалцин в серума. В това отношение нашите резултати подкрепят данните описани в експерименти върху интактни и генно-модифицирани мишки (Ferron et al., 2008; Ferron et al., 2012). Според тези и други постановки некарбоксилираният остеокалцин се освобождава в циркулацията от костната тъкан и се подлага на регулация от хормоните инсулин и лептин (Hinoi et al., 2008; Ferron et al., 2010; Fulzele et al., 2010). Инсулинът осъществява своята положителна регулаторна роля посредством активиране на рецепторите си в остеобластите. Развиващата се при метаболитен синдром инсулинова резистентност засяга не само черния дроб, скелетните мускули и мастната тъкан, но също и костите (Wei et al., 2014b). Нарушава се положителната инсулинова регулация, което води до понижени нива на освобождавания от остеобластите протеин. Той от своя страна е фактор, очувствяващ инсулиновите рецептори (Ferron et al., 2008), и понижаването на концентрацията му влошава още повече инсулиновата сигнализация. Така се оформя порочен кръг, който вероятно има отношение към патогенезата на биохимичните и поведенчески отклонения при плъховете с метаболитен синдром. Проведеният корелационен анализ в нашия експеримент показва негативна връзка на некарбоксилирания остеокалцин с нивата на кръвна захар и с тежестта на тревожността и депресивно-подобното поведение. Нашите резултати показват, че и при плъхове, както

при мишки, некарбоксилираният остеокалцин вероятно проявява хормонална активност и участва в регулацията на енергийния метаболизъм и поведението.

С цел допълнително охарактеризиране на хормоналната роля на некарбоксилирания остеокалцин предприехме два противоположни подхода за фармакологично индуцирана промяна в неговите плазмени концентрации. Имайки предвид, че процесът на костна резорбция се повлиява (като терапевтичен или нежелан ефект) от много лекарствени групи, би било интересно да се установи дали ефектите върху костите са свързани с промени в метаболизма и поведението.

При първата постановка използвахме високи дози от кумариновия антикоагулант warfarin (прилаган заедно с витамин K1 с цел предотвратяване на кървене), като посредством блокиране на процеса на карбоксилиране, повишихме драстично нивата на некарбоксилирания остеокалцин в серума. Това беше съпроводено с подобряване на въглехидратния метаболизъм и намаляване на количеството висцерална мастна тъкан, т.е. третираните с warfarin и висококалорична диета животни не развиха метаболитни отклонения. Ефектът на третирането може да се обясни с повишеното ниво на остеокалцина и стимулирането на отделянето на адипонектин от мастните клетки, което подобрява периферната инсулинова чувствителност (Lee et al., 2007; Ferron et al., 2008).

Третирането на животните с кумаринов антикоагулант предотврати и развитието на депресивно-тревожно поведение и когнитивни нарушения в опитните животни, получаващи обогатена с мазнини и фруктоза диета. Това би могло да се дължи на повишението в нивата на остеокалцина. Проведеният корелационен анализ показва, че анксиолитичният ефект от третирането би могъл да се обясни с повлияването на въглехидратния метаболизъм от увеличения остеокалцин, докато антидепресантният ефект и подобряването на когнитивните функции се осъществяват вероятно по други, независими от метаболитните ефекти, механизми.

При втората постановка третирахме опитните животни с бифосфоната alendronate, потискащ костната резорбция и намаляващ концентрацията на некарбоксилирания остеокалцин в плазмата. Приложението на alendronate върху интактни плъхове не доведе до значимо влошаване на повечето метаболитни показатели, с изключение на достоверно повишената кръвна захар. При животните, получаващи висококалорична диета обаче, третирането с alendronate доведе до допълнително влошаване на някои от метаболитните показатели, като кръвна захар на гладно и глюкозен толеранс. Резултатите от този експеримент повдигат въпроса дали приложението на бифосфонати като антиостеопоротични лекарства при хора би могло да доведе до метаболитни странични ефекти, особено ако се комбинира с нерационално хранене.

Освен влошаването на въглехидратния метаболизъм, третирането с alendronate доведе и до поведенчески промени, като бяха засегнати както животните, получаващи висококалорична диета, така и плъховете на стандартна лабораторна диета. Всички плъхове, получаващи alendronate, развиха прояви на тревожност и когнитивни нарушения. Ефектите върху паметта могат да се обяснят с намалените нива на некарбоксилирания остеокалцин и с влошания вследствие на това въглехидратен

метаболизъм, тъй като тежестта на когнитивните нарушения корелира с нивата на кръвна захар в плазмата.

Експериментите насочени към некарбоксилирания остеокалцин показаха, че той оказва регулаторна роля върху енергийния метаболизъм и поведението, тъй като промените в неговата плазмена концентрация се отразяват на съответните функции при плъхове. Остеокалцинът е витамин К-зависим протеин и при суплементация с този мастноразтворим витамин процесът на карбоксилирането му се активира, което означава, че нивата на некарбоксилираната форма би трябвало да се понижат. Третирането на животните с витамин К би следвало посредством повлияването на остеокалцина да влоши енергийния метаболизъм и невро-психичните нарушения, съпътстващи метаболитния синдром. В проведения от нас експеримент приложението на витамин К2 на интактни плъхове и на плъхове, подложени на висококалорична диета, обаче, доведе до подобряване на енергийния метаболизъм. Третирането с витамин К2 предотврати нарушаването на въглехидратния и липидния метаболизъм и предпази животните от развитие на метаболитен синдром. Подобни ефекти бяха наблюдавани и по отношение на поведенческите прояви при животните, хранени с нездравословна диета – третирането им с витамин К2 предотврати появата на тревожност и депресивно-подобни поромени. Анксиолитичният ефект е вероятно свързан с протективното действие на витамин К2 върху въглехидратния метаболизъм, докато антидепресантният ефект е независим от метаболитните промени.

Тези на пръв поглед противоречащи на хипотезата за хормонална роля на некарбоксилирания остеокалцин ефекти на витамин К2 биха могли да бъдат обяснени с добре документираните антиоксидантни и противовъзпалителни свойства на витамин К (Vervoort et al., 1997; Ohsaki et al., 2010; Westhofen et al., 2011), които са независими от неговата роля в гама-глутамилкарбоксилирането.

V. Изводи

- I. Третирането на млади мъжки плъхове порода Wistar с диета обогатена с умерено количество животински мазнини и фруктоза води до индукция на метаболитен синдром.
 1. В опитните животни се индуцират метаболитни отклонения, характерни за синдрома при хора – висцерално затлъстяване, дислипидемия, инсулинова резистентност.
 2. В опитните животни с посочените метаболитни отклонение се наблюдават промени в поведението – развиват се прояви на тревожност и депресивно-подобно поведение.
 3. В опитните животни се понижават нивата на некарбосилирания остеокалцин като се открива връзка между тези нива и степента на метаболитните и поведенчески отклонения.
- II. Витамин К оказва протективни ефекти върху енергийния метаболизъм и поведението на плъхове.
 1. Витамин К предотвратява развитието на метаболитен синдром при третиране с диета обогатена с мазнини и фруктоза.
 2. Витамин К предотвратява развитието на тревожност и депресивно-подобно поведение при третиране с диета обогатена с мазнини и фруктоза.
- III. Кумариновият антикоагулант warfarin повлиява енергийния метаболизъм и поведението на плъхове.
 1. Третирането с warfarin увеличава нивата на некарбоксилирания остеокалцин.
 2. Третирането с warfarin предотвратява развитието на метаболитен синдром при прием на диета обогатена с мазнини и фруктоза.
 3. Третирането с warfarin предотвратява появата на тревожност, депресивно-подобно поведение и когнитивни нарушения при прием на диета обогатена с мазнини и фруктоза.
 4. Най-вероятно метаболитните и поведенчески ефекти на warfarin се дължат на повишеното ниво на некарбоксилирания остеокалцин.
- IV. Бифосфонатът alendronate се отразява на енергийния метаболизъм и поведението на плъхове.
 1. Третирането с alendronate намалява нивата на некарбоксилирания остеокалцин.
 2. Третирането с alendronate влошава въглехидратния метаболизъм и показателите на метаболитния синдром при прием на диета обогатена с мазнини и фруктоза.
 3. Третирането с alendronate индуцира тревожност и когнитивни нарушения, както при интактни плъхове, така и при прием на диета обогатена с мазнини и фруктоза.
 4. Може да се предположи, че посочените ефекти на alendronate се дължат на пониженото ниво на некарбоксилирания остеокалцин.
- V. Проведените изследвания показват, че както витамин К, така и некарбоксилираният остеокалцин, упражняват благоприятни ефекти върху въглехидратния метаболизъм и поведенческите нарушения при метаболитен синдром, като най-вероятно действат по различен механизъм.

VI. Приноси

1. Разработен и верифициран е възпроизводим и икономичен диетичен модел на метаболитен синдром при плъхове порода Wistar
2. За първи път е установена връзка между показатели на енергийния метаболизъм и нивото на некарбоксилация остеокалцин при плъхове, като:
 - При модел на метаболитен синдром нивата на некарбоксилация остеокалцин са понижени.
 - Фармакологично повишеното ниво на некарбоксилация остеокалцин (с warfarin) е съпроводено с подобряване на метаболитните и поведенчески показатели
 - Фармакологично пониженото ниво на некарбоксилация остеокалцин (с alendronate) е съпроводено с влошаване на метаболитните и поведенчески показатели
3. За първи път лекарствата warfarin и alendronate са охарактеризирани от гледна точка на ефектите им върху метаболитни и поведенчески показатели.
4. За първи път е установено, че третирането с витамин K2 предотвратява развитието на метаболитен синдром и появата на тревожно-депресивно поведение при плъхове, подложени на диета обогатена с мазнини и фруктоза.

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

I. Списък на публикациите

1. **Gancheva S**, Zhelyazkova-Savova M, Galunska B, Chervenkov T. Experimental models of metabolic syndrome in rats. *Scripta Scientifica Medica* 2015;47(2):23-30
2. **Gancheva S**, Galunska B, Zhelyazkova-Savova M. Osteocalcin in a rat model of metabolic syndrome. *Adipobiology* 2015;7:31-36
3. **Gancheva S**, Zhelyazkova-Savova M. Vitamin K2 improves anxiety and depression but not cognition in rats with metabolic syndrome: a role of blood glucose? *Folia Medica* 2016;58(4):264-272
4. **Ганчева С**, Галунска Б, Желязкова-Савова М. Ефекти на витамин К2 при плъхове с модел на метаболитен синдром. *Scientific researches from the Jubilee Conference "Audacity and youth in pharmacology," dedicated to the 70th anniversary of the Department of Pharmacology at the Medical University of Plovdiv and 100 years since the birth of prof. Peycho Peychev - fondateur of pharmacology at MU Plovdiv.* 2017:89-96
5. **Gancheva S**, Zhelyazkova-Savova M. Subclinical vitamin K deficiency: an experimental approach – a review. *Scientific researches from the Jubilee Conference "Audacity and youth in pharmacology," dedicated to the 70th anniversary of the Department of Pharmacology at the Medical University of Plovdiv and 100 years since the birth of prof. Peycho Peychev - fondateur of pharmacology at MU Plovdiv.* 2017:82-88
6. **Gancheva S**, Galunska B, Zhelyazkova-Savova M. Diets rich in saturated fat and fructose induce anxiety and depression-like behaviors: Is there a role for lipid peroxidation? *International Journal of Experimental Pathology* 2017; 98(5):296-306 (IF 1.780)

II. Списък на участията в научни форуми

7. **Gancheva S**, Zhelyazkova-Savova M, Galunska B. Comparative biochemical and behavioral indices in rat models of metabolic syndrome and type 2 diabetes. The 32nd Balkan Medical Week 21-23 September 2012 Nis, Serbia. Abstract: P.164
8. **Gancheva S**, Zhelyazkova-Savova M, Galunska B. Our experience with experimental models of metabolic syndrome in rats. XII International Congress of Medical Sciences for students and young doctors 09 - 12 May 2013, Sofia, Bulgaria; Abstract: p.89
9. **Gancheva S**, Zhelyazkova-Savova M. Behavioral tests in rat models of metabolic syndrome. VII-ми Национален конгрес по фармакология 17 – 19 октомври 2014 г, Плевен, България. *Journal of Biomedical and Clinical Research* 2014, 7(1); Suppl. 1, p. 24
10. **Gancheva S**, Zhelyazkova-SavovaM, Galunska B, Chervenkov T. Rat models of metabolic syndrome VII-ми Национален конгрес по фармакология 17 – 19 октомври 2014 г, Плевен, България. *Journal of Biomedical and Clinical Research* 2014, 7(1); Suppl. 1, p. 65
11. **Gancheva S**, Zhelyazkova-SavovaM, Galunska B. Vitamin K: The multiple faces of an old vitamin. Научно-практическа конференция „Предизвикателства при

- обучението на магистър-фармацевти” 31 октомври – 2 ноември 2014 г. КК „Св. Св. Константин и Елена” – Варна, България. *Scripta Scientifica Pharmaceutica* 2014 (1), suppl. 1, p.35
12. **Gancheva S**, Zhelyazkova-Savova M. Vitamin K2 improves anxiety and depression but not cognition in rats with metabolic syndrome: interference with blood glucose? Anniversary Scientific Conference – 70 Years Medical University of Plovdiv 20 – 23 May 2015, Plovdiv, Bulgaria. *Folia Medica* 2015; 57; Suppl. 1, p. 59
 13. **Ганчева С**, Желязкова-Савова М, Галунска Б. Ефекти на витамин К2 при плъхове с модел на метаболитен синдром. Юбилейна научна конференция по фармакология и клинична фармакология за млади учени 05 – 07 Юни 2015, Цигов Чарк
 14. Zhelyazkova-Savova M, **Gancheva S**, Galunska B. Osteocalcin in a rat model of metabolic syndrome. 4th International Symposium on Adipobiology and Adipopharmacology (ISAA) 28 – 31 October 2015 Bucharest, Romania. *Romanian Journal of diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases* 2015; 22; Suppl. 2, p. 57-58.
 15. Zhelyazkova-Savova M, **Gancheva S**, Galunska B. Undercarboxylated osteocalcin and behavioral alterations in a rat model of metabolic syndrome. 29th European College of Neuropsychopharmacology Congress (ECNP) 17-20 September 2016, Vienna, Austria. *European Neuropsychopharmacology* 2016; 26(2):285 (IF 4.239)
 16. **Gancheva** Marinova S, Galunska B, Zhelyazkova-Savova M. Behavioral changes and osteocalcin in an experimental model of subclinical vitamin K deficiency in rats. 29th European College of Neuropsychopharmacology Congress (ECNP) 17-20 September 2016, Vienna, Austria. *European Neuropsychopharmacology* 2016; 26(2):280-281 (IF 4.239)
 17. **Ганчева С**, Желязкова-Савова М. Субклиничен дефицит на витамин К: експериментален подход. 6. Научна конференция „Дръзновение и младост във фармакологията“, 7-9 октомври, 2016, Цигов чарк, България
 18. Lukanov R, **Gancheva S**, Miladinova E, Panteleimonova S, Nikolaeva D, Zhelyazkova-Savova M. Experimental model of subclinical vitamin K deficiency: adaptation for the study of osteocalcin. Black Sea Symposium for Young Scientists in Biomedicine, 6 - 9 April, 2017, Varna. *Scripta Scientifica Vox Studentium*, 2017
 19. Zhelyazkova-Savova M, **Gancheva S**. Pharmacological inhibition of bone resorption induces cognitive impairment in rats on high fat high fructose diet: metabolic correlations. 30th European College of Neuropsychopharmacology Congress (ECNP) 02-05 September 2017, Paris, France *European Neuropsychopharmacology* 2017; 27: S730-S731. (IF 4.239)
 20. **Gancheva S**, Zhelyazkova-Savova M. Effects of alendronate on carbohydrate metabolism and behavior in young healthy rats. 2nd International Conference in Pharmacology: From Cellular Processes to Drug Targets, 19–20 October 2017, Rīga, Latvia,. *Intrinsic Activity* 2017; 5(Suppl. 1): A2.24; doi:10.25006/IA.5.S2-A2.24
 21. **Gancheva S**, Zhelyazkova-Savova M. Osteocalcin – is it just a vitamin K dependent protein? Fourth Pharmaceutical Business Forum and Scientific and Practical Conference “Innovation and Prospects in Pharmaceutical Practice” Varna, Bulgaria 27-29 October 2017. *Scripta Scientifica Pharmaceutica* 2017; 4 (Suppl. 2): 71