

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

Д-р Дария Леонидовна Чивчибаши-Павлова

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ЕНДОТЕЛНАТА
ДИСФУНКЦИЯ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН
МОДЕЛ НА ЗАТЛЪСТЯВАНЕ И
СУПЛЕМЕНТАЦИЯ С МЕЛАТОНИН**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане
на образователна и научна степен
ДОКТОР

Научна специалност:

Патофизиология

Научен ръководител:

Доц. д-р Камелия Братоева, д.м.

Варна, 2022

Дисертационният труд съдържа общо 170 страници, онагледен е с 35 фигури и 10 таблици. Цитирани са 313 литературни източника, от които 51 на кирилица и 262 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден, приет и насочен към защита пред научно жури от разширен Катедрен съвет при Катедра по физиология и патофизиология на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна на 28.01.2022 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на ВОт..... часа на открито заседание на научно жури в състав:

Външни членове:

Проф. д-р Анелия Александрова Димитрова, д.м.

Проф. д-р Адриана Иванова Бочева, д.м.

Доц. д-р Емилия Цветанова Цакова-Лакова, д.м.

Вътрешни членове:

Доц. д-р Радко Златков Радев, д.м.

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

Резервен външен член:

Доц. д-р Калинка Маринова Демирева, д.м.

Резервен вътрешен член:

Доц. д-р Маргарита Стефанова Великова, д.м.

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

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	5
I. ВЪВЕДЕНИЕ	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	9
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	10
1. Основни процедури по експериментален модел на затлъстяване	10
1.1. Експериментални животни	10
1.2. Използвана храна	10
1.3. Използвани фармакологични средства и други субстанции ..	12
1.4. Дизайн на експеримента	13
2. Използвани експериментални методи	14
2.1. Зоометрични изследвания	14
2.2. Биохимични и клиничко-лабораторни методи	15
2.3. Имунологични методи	15
2.4. Генетични методи	16
2.5. Морфологични методи	17
3. Статистическа обработка на резултатите в проучването	22
3.1. Дескриптивни методи	22
3.2. Аналитични методи	22
IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	24
1. Роля на метаболитните нарушения при ВФД за развитие на ЕД и протективното действие на мелатонин	24
1.1. Промени в телесното тегло, теглото на РПМТ и зоометрични показатели	24
1.2. Промени в серумните нива на липиди	32
1.3. Промени в серумните нива на глюкоза	35

2. Ролята на фруктозоиндуцирано нискостепенно възпаление за развитие на ЕД и протективното действие на мелатонин.	38
2.1. Промени в серумните нива на TNF- α	38
2.2. Промени в експресията на NF-kB в аорта	42
3. Роля на ОС при ВФД за развитие на ЕД и протективното действие на мелатонин	45
3.1. Промени в експресията на Nrf-2 в аортната стена при ВФД и ефекти на екзогенния мелатонин	45
3.2. Промени в експресията на HO-1 в аортната стена при ВФД и ендотелопротективния ефект на мелатонин	47
3.3. Промени в експресията на SOD-1 в ендотелни клетки на <i>a. abdominalis</i> при ВФД и ендотелопротективния ефект на мелатонин	50
3.4. Промени в експресията на NOS3 в ендотелните клетки на <i>a. abdominalis</i> при ВФД и ендотелопротективния ефект на мелатонин	56
3.5. Промени в експресията на Flt-1 в ендотелните клетки на <i>a. abdominalis</i> при ВФД и ендотелопротективния ефект на мелатонин	62
4. Влиянието на мелатонин върху фруктозоиндуцираните морфологични промени в аортата	69
4.1. Промени в морфометричните показатели на <i>a. abdominalis</i> при ВФД и протектиращ ефект на екзогенния мелатонин	69
V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	78
VI. ИЗВОДИ	79
VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	81
VIII. ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	83
IX. БЛАГОДАРНОСТИ	84

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АФК	активни форми на кислорода
ВГМК	васкуларни гладкомускулни клетки
ВФД	високофруктозна диета
ЕД	ендотелна дисфункция
ЗД, ЗД тип 2	захарен диабет, захарен диабет тип 2
ИБС	исхемична болест на сърцето
ИР	инсулинова резистентност
ИТМ	индекс на телесната маса
ОС	оксидативен стрес
СМК	свободни мастни киселини
ТГ	триглицериди
СО	въглероден оксид
eNOS	ендотелен азотен оксид синтаза
GPx	глутатион пероксидаза
HDL	високоплътен холестерол
LDL, VLDL	нископлътна и много нископлътна фракция на холестерола
NF-kB	нуклеарен фактор „каппа-би“
NO	азотен оксид
Nrf-2	нуклеарен-2 еритроид свързан фактор
SOD	супероксид дисмутаза
TNF- α	тумор-некротизиращ фактор алфа
VEGF	съдов ендотелен растежен фактор
HO-1	хем оксигеназа -1

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Към днешна дата затлъстяването остава не достатъчно изучена болест, която се е превърнала в глобален проблем. Постоянен ръст на броя на засегнатите е довел до това, че СЗО разглежда затлъстяването като „неинфекциозна епидемия на нашето време“ (СЗО, 1997). Високият ръст на заболяемост от затлъстяване представлява сериозен медико-социален проблем, тъй като съпътстващите коморбидни състояния като артериална хипертония, атеросклероза, ИБС и др. водят до ранна инвалидизация и преждевременна смърт, изискващ незабавно разрешение (СЗО, 1997; Guh et al., 2009; Шляхто et al., 2017). Като основен патогенетичен фактор, свързващ затлъстяването с тези компликации, се счита развитието на ендотелна дисфункция. Затова ендотелната дисфункция на фона на затлъстяване се смята за отключващ механизъм за развитие и прогресиране на ССЗ, които са водеща причина за смърт в целия свят, включително България (Guh et al., 2009; СЗО, 2018).

Според СЗО в Реп. България смъртността от кардиоваскуларни заболявания е 64% (СЗО, 2018). Тези цифри налагат своевременно диагностициране на затлъстяването, както и идентифициране на асоциираните с него патологии. Социалната значимост на инвалидизиращи усложнения на ССЗ определя необходимостта за търсене на нови подходи за ранна диагностика и таргетната им корекция (СЗО, 2020). От друга страна, търсенето на възможности за терапевтично въздействие върху ендотела с цел профилактика или намаляване на уврежданията на съдовата стена е едно от най-перспективните направления в профилактиката и лечението на кардиометаболитните заболявания (2010; Guh et al., 2009; Шляхто et al., 2017). Установено е, че функциите на ендотела се нарушават много преди морфологичните и клиничните признаци на ССЗ, особено при затлъстяване, захарен диабет тип 2 и др. Затова ендотелната дисфункция се смята за предиктор на висок риск за развитие на тези патологии (Мельникова, 2015; Кашкалда, 2020; Лындина и Шишкин, 2018; Коновалова, 2012).

Още през 60-те години на XX век австралийският патолог Х. Флори за първи път е предположил, че развитието на ССЗ и метаболитните нарушения е тясно свързано с патологична промяна във функциите на ендотела. Това предположение напълно съвпада със съвременните

представи за ендотелната дисфункция като универсално и водещо звено в патогенезата на съдовите увреждания и предхожда патоморфологичните промени в съдовата стена на кардиометаболитните заболявания, асоцирани със съдовата патология. Според последни проучвания развитието на ендотелната дисфункция е тясно свързано с възпалителен отговор поради нарушен баланс на свободно радикално окисление в организма и развитие на оксидативен стрес. Нарушенията в клетъчния окислително-редукционен баланс играят ключова роля в уврежданията на ендотела, продукцията и секрецията на провъзпалителни цитокини, като по този начин патогенетично свързват оксидативния стрес, хроничното възпаление и нарушената функция на ендотела (Kleinert et al., 2018; O'Neill et al., 2015). **Проучванията в тази насока представляват предизвикателство от научна гледна точка, предвид възможностите за разработване на нов подход в терапията на свързаните с ендотелната дисфункция заболявания. Изследването на възможни ендотелопротектори с антиоксидантни и противовъзпалителни свойства би могло да разкрие вероятни механизми за протекция или корекция на вече съществуваща ендотелна дисфункция, особено при затлъстяване.**

От друга страна, в наличната литература са представени изследвания, които са недостатъчни, за да се направи комплексна оценка за увреждането на ендотела в ранните, обратими прояви на ендотелна дисфункция. Данните от литературата са оскъдни и противоречиви, а маркерите на ендотелната дисфункция все още са слабо проучени. Съвременните методи са ограничени, в повечето случаи инвазивни и диагностицират съдовите увреждания в необратим стадий, което прави този тип проучвания изключително актуални. Обаче, по обективни причини, решение на горепосочените въпроси в условия на *in vivo* в пълен обем е невъзможно. Във връзка с което перспективно направление е възможността да се моделира ендотелна дисфункция при животни, тъй като моделът е много сходен с уврежданията при хора (Герасимов et al., 2015). Въз основа на това ние създадохме хипотеза с цел да установим ранните, обратими прояви на ендотелна дисфункция и комплексната функционална връзка между патоморфологичните промени в стената на абдоминалната аорта, маркери на оксидативен стрес и хронично ниско-степенно възпаление при фруктозо-индуциран модел на затлъстяване и суплементация с мелатонин. С настоящото проучване целим изясня-

ване не само на молекулярните механизми на увреждане и протекция на ендотела при затлъстяване, но и нови възможности за терапевтично повлияване, които да улеснят транслирането и приложимостта на тези знания в клинични условия.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Цел

Да се проучат някои възможни патогенетични механизми за ранни, обратими прояви на ендотелна дисфункция и комплексната функционална връзка между патоморфологичните промени в стената на абдоминална аорта, маркери на оксидативен стрес и хронично нискостепенно възпаление при фруктозо-индуциран модел на затлъстяване и суплементация с мелатонин.

Задачи

Да се изследват метаболитните промени при високофруктозна диета.

1. Да се изследват патоморфологичните промени в аортната стена при високофруктозна диета.
2. Да се изучи ролята на оксидативния стрес и хроничното нискостепенно възпаление за съдово увреждане при високофруктозна диета.
3. Да се изследва ролята на клетъчния повърхностен маркер Flt-1 (рецептор на VEGF-1) в развитието на съдово увреждане при високофруктозна диета.
4. Да се направи комплексна оценка на функционалната връзка между изследваните маркери на оксидативен стрес, хронично нискостепенно възпаление и патоморфологични промени в аортната стена при високофруктозна диета.
5. Да се проучи ендотелопротективното действие на мелатонина.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Основни процедури по експериментален модел на затлъстяване

1.1. Експериментални животни

За целта на експерименталното проучване бяха използвани 32 лабораторни бели плъхове, линия Wistar, от мъжки пол, с тегло 70–158 г. Опитните животни бяха предоставени от и отглеждани във вивариума на Медицински университет – Варна. Всяка експериментална група беше отгледана в отделна клетка при стандартни условия: температура на обкръжаващата среда $20 \pm 4^\circ\text{C}$, влажност 50–60% и 12-часов дневен ритъм.

Експериментът се проведе при спазване на изискванията на националните нормативни документи и европейската Директива на Европейския парламент за протекция на животните, използвани за научни и експериментални цели (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes).

Експерименталната постановка беше одобрена от Комисията по етично отношение към експерименталните животни към БАБХ. Разрешителното за използване на животни в експеримента е вписано в регистъра на БАБХ (към Министерството на земеделието и храните) с регистрационен номер 272 от 2020 г.).

1.2. Използвана храна

Храната, която опитните животни приемат през целия период на изследването, е стандартна, приготвена по рецепта на производителя (ХЛ-Топ Микс ООД) със следния аналитичен състав: суров протеин 20,08%; сурови влакнини 5,99%; сурови мазнини 2,15%; сурова пепел 5,26%; калций 0,72%; фосфор 0,59%; усвоим фосфор 0,151%; натрий 0,130%; лизин 0,91%; метионин 0,35%. Съставът на хранителните добавки включва: витамини, провитамини и вещества с подобен ефект: витамин А 4,50 хил. IU/kg; витамин D 1350,00 IU/kg; витамин Е 13,50 IU/kg; смеси на елементи с микроконцентрация: желязо 176,89 mg/kg; манган 91, 87 mg/kg; цинк 94,68 mg/kg; мед 22,87 mg/kg; йод 0,92 mg/kg; селен 0,47 mg/kg (таблица 1).

Таблица 1. Основни продукти, които влизат в състава на приеманата стандартна храна (ТорМix, производство на ХЛ-Топ Микс ООД, фуражен завод, с. Каляново, общ. Сливен, партида: ПЛ10020656).

Продукт	% съдържание/IU/kg/mg/kg
Компонентен състав:	
Пшеница	
Царевица	
Слънчогледов шпрот	
Пшенични трици	
Калциев карбонат	
Натриев хлорид	
Аналитичен състав:	
Суров протеин	20,08%
Сурови влакнини	5,99%
Сурови мазнини	2,15%
Сурова пепел	5,26%
Калций	0,72%
Фосфор	0,59%
Усвоим фосфор	0,151%
Натрий	0,130%
Лизин	0,91%
Метионин	0,35%
Хранителни добавки:	
Витамин А	4,5 хил. IU/kg
Витамин D	1350,00 IU/kg
Витамин Е	13,50 mg/kg
Желязо	176,89 mg/kg
Манган	91,87 mg/kg
Цинк	94,68 mg/kg
Мед	22,87 mg/kg
Йод	0,92 mg/kg
Селен	0,47 mg/kg
Технологични добавки	
Лигносулфанати E565	
Антиоксиданти: ВНТ (E321)	45,0 mg/kg

1.3. Използвани фармакологични средства и други субстанции

1.3.1. Мелатонин

В продължение на 12 седмици в определените за третиране експериментални групи се прилага мелатонин в течна лекарствена форма (HERBA MEDICA, България). Последният се приема *per os*.

С оглед определяне на ефективна доза за адекватно приложение на базата на експерименталния опит на други автори (Nduhirabandi et al., 2017) беше подбрана дозата от 4 мг/кг/24 ч., която залегна в основата на експерименталната постановка.

С оглед определяне на адекватния часов интервал за ефективна суплементация беше подбран светлият период на денонощието – на базата на експерименталния опит (Prunet-Marcassus et al., 2003) и обоснования (Vanecek, 1998; Morgan et al., 1994) на други автори.

1.3.2. Воден разтвор на глюкоза

В продължение на 12 седмици на определените за третиране експериментални животни се дава 20% разтвор на глюкозо-фруктозен сироп, който се предлага за пиене *ad libitum*. Използваме разтвор, получен от 52% – на фруктоза, произведена от царевичен сироп. Високофруктозният царевичен сироп е сертифициран за използване като подсладител и консервант в хранително-вкусовата промишленост, производство на завод „АМИЛУМ“ – град Разград (ISOGLUCOSE 031), и е със състав, представен в таблица 2 и 3.

Адекватна за приложение доза на водния разтвор на глюкоза определяхме въз основа на литературни данни (Dupas et al., 2018; Mamikutty et al., 2014).

Таблица 2. Състав на високофруктозен царевичен сироп, използван в експеримента (ISOGLUCOSE 031, производство на завод „АМИЛУМ“ – град Разград).

Продукт	% съдържание
Фруктоза – BETX, на DS	52%
Сухо вещество	75,1%
Монозахариди – BETX, на DS	95,6%

Таблица 3. Състав на хранителни вещества, съдържащи се във високофруктозен царевичен сироп, използван в експеримента (ISOGLUCOSE 031, производство на завод „АМИЛУМ“ – град Разград)

Хранително вещество	Съдържание в 100 г продукт
Енергия	1.275,0000 kJ
Калории	300 kcal
Общи мазнини	0 г
Наситени мазнини	0 г
Въглехидрати	75 г
Захари	73.3 г
Протеин	0 г
Сол	0 г

1.4. Дизайн на експеримента

Експерименталните животни са разпределени в четири групи ($n=8$) в зависимост от използваните медикаменти за третиране и режим на хранене (Фиг.1):

- **Първа група** – контролна група (**К**) – плъхове, подложени на стандартна диета;
- **Втора група** – група с модел на затлъстяване, (**Фру**) – плъхове, подложени на високофруктозна диета;
- **Трета група** – група с модел на затлъстяване суплементирана с мелатонин (**Фру + Ме**) – плъхове, подложени на високофруктозна диета и суплементирани с мелатонин, приеман *per os* в доза 4 мг/кг/24 ч. (индивидуално изчислена доза за всяка седмица);
- **Четвърта група** – контролна група, суплементирана с мелатонин (**К + Ме**) – плъхове, подложени на стандартна диета и суплементирани с мелатонин (продукция на HERBA MEDICA, България), приеман *per os* в доза 4 мг/кг/24 ч. (индивидуално изчислена доза за всяка седмица).

След разпределението по експериментални групи се провежда предварително аклиматизация за период от две седмици, през които опитните животни приемат храна и вода *ad libitum*. Телесното тегло на всеки плъх се нанася в протоколна тетрадка.

След период на аклиматизацията животните от всички експериментални групи се оставят да приемат стандартна храна и вода на воля през цялото денонощие. Ежедневно се контролира приемът на вода, воден разтвор на глюкоза, храна и мелатонин. Ежедневно се осъществява общо наблюдение за здравословното състояние на животните, задействани в експериментална постановка.

Телесното тегло на всеки плъх от 3-та и 4-та група е от изключително значение за изчисляване на индивидуална доза на мелатонин за всяка седмица (4 мг/кг). Мелатонинът се прилага *per os* с помощта на полипропиленова орогастрална сондичка за лабораторни гризачи (продукция на INSTECH, Plymouth Meeting, PA USA).

След аклиматизация ежедневно на 2-ра, 3-та експериментални групи се дава вода и прясно приготвен 20% воден разтвор на фруктоза *ad libitum*. След 12-седмично натоварване с 20% фруктозен разтвор (2-ра и 3-та групи), време, необходимо за развитие на признаци на затлъстяване (Ferreira-Santos et al., 2020), и прилагане на мелатонин (3-та и 4-та група), кръв за биохимично изследване се взима от югуларната вена на плъховете след предварителна наркоза с Ketamine в доза 15–25 mg/kg i.m. (Anaket, solutio pro injectionibus, Richter Pharma AG, Austria). Под обща анестезия с Ketamine се оценяват зоометрични показатели на всяко животно и се определят ИТМ и индекс на Lee.

След евтаназия с прилагане на Ketamine в летална доза 148 mg/kg (Rebuelto et al., 2002) се извършва аутопсия по метода на Коптяева et al. (2018) с евисцерация, макроскопско оценяване на вътрешните органи, съдове от еластичен и мускуло-еластичен тип (аорта, *aa. iliaca communes*, *aa. renales*), главен мозък и ретроперитонеална мастна тъкан (РПМТ) с последваща подготовка на тези спесименти за морфологичен/морфометричен анализ и за PCR изследване с изолиране на RNA. С тази цел част от некропсичния материал веднага се поставя във фризера на –70°C, а другата част се фиксира в 10% неутрален буфериран формалин.

2. Използвани експериментални методи

2.1. Зоометрични изследвания

• Телесна маса

Телесната маса на всяко експериментално животно (г) се определя веднъж седмично с дигитална везна (производство на TIMETRON,

Astria, модел FA-6405). Непосредствено преди приключването на експеримента е определено крайното тегло на всяко животно.

- **Дължина (назо-анално разстояние)**

Дължината на животните е определена, като се измерваше с милиметрова линия разстоянието от носа до аналния отвор. Това е утвърден начин за установяване на дължината на плъхове в експериментални проучвания (Savcheniuk et al., 2014).

- **Обиколка на корема**

Обиколката на корема е определена в см с измерване през най-широката му част при поставяне на животното в положение по гръб.

- **Обиколка на гръдния кош**

Обиколката на гръдния кош е определена в см с измерване през най-широката му част при поставяне на животното в положение по гръб.

- **Индекс на Lee**

Индексът на Lee е бърз и точен критерий за затлъстяване при експериментални животни. Той е изчислен по формулата, предложена от Bernardis и Patterson (1968):

$$\text{Индекс на Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{Телесна маса (g)}}}{\text{Назо-анално разстояние (см)}}$$

2.2. Биохимични и клинично-лабораторни методи

2.2.1. Определяне на нивата на ТГ, глюкоза, LDL и HDL в серума

Серумните нива на липиди-ТГ, глюкоза, LDL и HDL се определят при спазване на стандартна процедура с автоматичен анализатор OLIMPUS; AU 640.

2.3. Имунологични методи

2.3.1. Определяне на нивата на TNF- α в серума

Нивата на тумор некрозис фактор- α (TNF- α) в серуми на животни от всяка експериментална група се определят чрез метода на Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), използвайки готов кит за 96-ямкова плака за ELISA четец (Rat TNF - α , каталожен номер: 865.000.096, Diaclone SAS, France) . Количественото TNF- α се извършва, спазвайки инструкции за употреба на фирмата производител.

2.4. Генетични методи

2.4.1. *Определяне на нивото на генна експресия: RT-PCR – изолиране на тотална РНК от аорта, обратна транскрипция, количествен RT-PCR*

• *Изолиране на РНК от аорта*

За изолирането на РНК се използват прясно замразени спесименти от аорта. Аорталната стена е механично хомогенизирана и обработена с TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, USA), като лабораторният протокол по изолирането следва указанията на производителя. Изолираната РНК се разтваря в 10 µl вода и се замразява на –80°C. Тотална РНК се измерва с помощта на Take 3 microplate on Synergy™ 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, USA).

За определяне нивото на генна експресия е използван two-step количествен Real-Time PCR.

• *Първа стъпка – кДНК синтеза и пре-амплификация*

Синтезирането на кДНК се осъществява, използвайки 0.20 µg от тотална РНК с помощта на RivertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA), като лабораторният протокол следва указанията на производителя. PCR реакцията се осъществява с апаратура на GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). Синтезираните проби на кДНК се разтварят в 20 µl вода, чиста от нуклеази, и се замразяват на –20°C.

Преамплифицирането на 0.3 µl кДНК се осъществява, използвайки 0.15 µl For/Rev ген-специфични праймери (100 µM). За тази реакция се използват 0.18 MgCl (25 mM), 2.5 µL 2x Red Taq полимераза (Genaxxon Bioscience, Germany) и вода за PCR до 5 µL. Условиата за осъществяване на реакцията са следните: 95°C/3 мин.; 5x цикъла на 95°C/5 сек., 60°C/10 сек., 72°C/32 сек.; финално изстудяване на пробите до 4°C, 10 мин. Преамплифицираната кДНК се разтваря x3 пъти във вода за PCR и се съхранява на –20°C.

• *Втора стъпка – количествен RT-PCR анализ*

Количествен RT-PCR анализ се осъществява, използвайки AmplifyMe SG Universal Mix (AM02, BLIRT, Poland), следвайки указанията на производителя и данните, получени от melting curve анализ. RT-PCR реакцията се прави, използвайки ABI 7500 Real Time PCR System апаратура (Applied Biosystems, USA). За ендогенната контрола се из-

ползва β -actin. Олигонуклеотидна последователност на използваните в анализа праймери (Sigma-Aldrich, USA) е представена в Таблица 4.

Всички изследвания се представят в 3 екземпляра. Нивата на генната експресия са представени като относителни единици (RU) mRNA, нормализирани срещу β -actin като вътрешна контрола. Нивата на mRNA експресията се калкулират, прилагайки $2^{-\Delta\Delta ct}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

Таблица 4. Олигонуклеотидна последователност на използваните при количествен RT-PCR анализ праймери (Sigma-Aldrich, USA).

Таргетен ген	Forward праймер (5'-3')	Reverse праймер
Rat β - actin	ACCGTGAAAAGATGACCCAG	CAGAGGCATACAGGGACAAC
Rat HO-1	CTAAGACCGCCTTCCTGCTC	TGTCTGTGAGGGACTCTGGT
Rat Nrf-2	GCTATTTTCCATCCCCGAGTTAC	ATTGCTGTCCATCTCTGTCAG
Rat NF-kB1	TGCGACAGATGGGCTACAC	TGTCTCCACACCACTGTCCAC

2.5. Морфологични методи

2.5.1. Макроскопско изследване

• Макроскопско оценяване на аорта

Аортата на всяко експериментално животно внимателно се отпрепарира по метода на Коптяева et al. заедно с периваскуларна мастна тъкан. Част от абдоминалната аорта се фиксира в 10% неутрален буферизиран формалин (за хистологични изследвания и морфометричен анализ). Другата част на аортата (гръдна и абдоминална сегменти) се промива с физиологичен разтвор и се замразява във фризера на -70°C (за PCR изследване, изолиране на РНК).

• Макроскопско оценяване на РПМТ

РПМТ на всяко експериментално животно внимателно се отпрепарира по метода на Коптяева et al., оглежда се за видими макроскопски промени и се претегля с дигитална везна (производство на TIMETRON, Austria, модел FA-6405). След макроскопското оценяване част от материала (около 1 г.) се промива с физиологичен разтвор и се замразява във фризера на -70°C (за PCR изследване, изолиране на РНК).

2.5.2. Хистологични методи

2.5.2.1. Рутинен хистологичен анализ

• Анализ на материал от аорта

Средно по 3 трансверзални среза (1 блокче) са изследвани от всяка абдоминална аорта. Материалите са фиксирани в 10% неутрален буфериран формалин и след съответната обработка, включени в парафин с точка на топене 52–54°C, с цел изготвяне на парафинови блокчета. Срези с дебелина 4 µm са стандартно оцветени с хематоксилин-еозин за морфологична/морфометрична оценка на хистологичните промени в стената на аортата.

2.5.2.2. Морфометричен анализ на аорта

С цел морфометричен анализ на аорта се измерват и статистически обработват следните показатели: дебелина на цялата аортна стена (µm), дебелина на *t. intima* – *t. media* комплекс (µm), вътрешен диаметър на съда (µm). При всяко изследване се измерват поне 3 произволни полета от образа (3 измервания за абдоминалната част на аортата), като от всяко животно бяха изследвани 3 отделни среза от аортната стена при увеличение x40. Морфометричното изследване и приложените микрофотографски снимки на хистологичните препарати се изготвят с помощта на софтуера – Aperio Image score (v12.3.3.5048).

С цел да се изследват функционалните характеристики на съда, по-точно оценката на пропускливата способност на аортата, за всяко експериментално животно се изчислява индекс на Керноган. За изчисляване на индекса на Керноган ние използваме модифицираната формула на Коптяев и съавт. (2018):

$$\text{Индекс на Керноган} = \frac{\text{Дебелина на } t. \textit{intima} - t. \textit{media} \text{ комплекс (}\mu\text{m)}}{\text{Вътрешен диаметър на съда (}\mu\text{m)}}$$

2.5.3. Имунохистохимични методи

Методика и използвани антитела

Използван бе индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ с помощта на EnVision™ FLEX, HighpH, DAKO, с каталожен номер K8000.

Използвани са следните антитела: SOD-1 антитяло, BioVision Inc., USA, с каталожен номер 3458-100, поликлонално заешко антитяло, в

разреждане 1:200 и антигенно разкриване при pH 9,0; NOS3 анти тяло, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Germany, с каталожен номер sc-376751, моноклонално мише анти тяло, в разреждане 1:300 с антигенно разкриване при pH 9,0; Flt-1 анти тяло, Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., China, с каталожен номер FNab09393, поликлонално заешко анти тяло, в разреждане 1:1000, с антигенно разкриване при pH 9,0 (Таблица 5).

Използваната система за имунохистохимично оцветяване съдържа пероксидазен блокиращ реагент за блокиране на ендогенната пероксидаза, вторично анти тяло, конюгирано с ензим хрянова пероксидаза (HRP) и подходящ хромогенен субстрат диаминобензидин (DAB) и хематоксилин за контра оцветяване.

Подготовка на спесименти за имунохистохимично изследване

За имунохистохимично изследване се използват фрагменти от аорта и РПМТ на животните от експериментални групи. Оформените късчета материал се фиксират чрез имерсия за 48 часа при стайна температура в неутрален буфериран 10% формалин и след дехидратация с възходяща концентрация се включват в парафин.

Парафинови срезове от аорта и РПМТ с дебелина 4 µm се монтират на силанизирани предметни стъкла (Thermo Fisher Scientific). Монтираните срезове се изсушават за едно денонощие при температура 37°C. На стайна температура срезове депарафинират в две смени ксилол за по 10 мин. и след това се рехидратират в низходяща алкохолна редица: етанол 100% за 5 мин. →етанол 90% за 5 мин. →етанол 80% за 5 мин. →етанол 70% за 5 мин. След което срезите се измиват с течаща вода и се поставят в dH₂O.

Таблица 5. *Първични анти тела, използвани в настоящото проучване*

Анти тяло	Произход	Каталожен номер	Разреждане
SOD-1	BioVision Inc., USA	3458-100	1:200
NOS3	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Germany	Sc-376751	1:300
Flt-1	Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., China	FNab09393	1:1000

Срезите са оцветени според EnVision™ FLEX, HighpH, DAKO (каталожен номер K8000) протокола на производителя, като за всички стъпки се използва влажна камера.

Определяне експресията на SOD-1 и NOS3 в a. abdominalis

Имунохистохимичен протокол

1. Депарафиниране до dH₂O.
2. Антигенно възстановяване в antigen retrieval solution (DAKO) – high ph (ph 9,0) на 97°C за 20 мин. и после се охлажда до 65°C в ptLink (DAKO).
3. Промиване с измиващ буфер (TBS) 1x10 мин., на стайна температура.
4. Инкубация с пероксидазен блокиращ разтвор (3% H₂O₂) за 10 мин. на стайна температура за блокиране на ендогенната пероксидазна активност.
5. Промиване с измиващ буфер (TBS) 2x10 мин.
6. Инкубация с първичното антитяло (rb SOD-1 и moNOS3) в съответното разреждане (1:200 и 1:300) за 20 мин. на стайна температура.
7. Промиване с измиващ буфер (TBS) за 3x10 мин.
8. Инкубация с маркиран полимер HRP (goat anti-mouse, anti-rabbit) за 30 мин. на стайна температура (1:100).
9. Промиване с измиващ буфер (TBS) за 3x10 мин. на стайна температура.
10. Инкубация на срезите с хромоген (в разреждане 1:20 спрямо DAB) за 2x5 мин., при непрекъснато микроскопиране
11. Изплакване с dH₂O за 2 мин.
12. Контраоцветяване с хематоксилин за 1 мин.
13. Изплакване на пробите с dH₂O вода за 5 мин.
14. Дехидриране във възходяща алкохолна редица етанол 70% за 5 мин. →етанол 80% за 5 мин. →етанол 90% за 5 мин. →етанол 100% за 5 мин. и подготовка на срезите за включване.
15. Включване в среда чрез използване на покривно стъкло (Thermo Fisher Scientific).

За SOD-1 бе използвана позитивна контрола от биопсичен материал – дуктален карцином на млечна жлеза.

За NOS3 за позитивна контрола бе използван биопсичен материал от плацента.

Определяне на експресията на Flt-1 а. abdominalis

Имунохистохимичен протокол

1. Депарафиниране до dH₂O
2. Антигенно възстановяване в antigen retrieval solution (DAKO) –high ph (ph 9,0) на 97°C за 20 мин и после се охлажда до 65°C в ptLink (DAKO).
3. Промиване с измиващ буфер (TBS) 1x10 мин.
4. Инкубация с пероксидазен блокиращ разтвор (3% H₂O₂) за 10 мин. на стайна температура за блокиране на ендогенната пероксидазна активност.
5. Промиване с измиващ буфер (TBS) 2x10 мин.
6. Инкубация с първичното антитяло (rb Flt-1) в съответното разреждане (1:50, 1:100), за 30 мин. на стайна температура.
7. Промиване с измиващ буфер (TBS) за 3x10 мин.
8. Инкубация с маркиран полимер HRP (goat anti-mouse, anti-rabbit) за 30 мин. на стайна температура (1:100).
9. Промиване с измиващ буфер (TBS) за 3x10 мин. на стайна температура.
10. Инкубация на срезите с хромоген (в разреждане 1:20 спрямо DAB) за 2x5 мин., при непрекъснато микроскопиране.
11. Изплакване с dH₂O за 2 мин.
12. Контраоцветяване с хематоксилин за 1 мин.
13. Изплакване на пробите с dH₂O вода за 5 мин.
14. Дехидриране във възходяща алкохолна редица етанол 70% за 5 мин. →етанол 80% за 5 мин. →етанол 90% за 5 мин. →етанол 100% за 5 мин. и подготовка на срезите за включване.
15. Включване в среда чрез използване на покривно стъкло (Thermo Fisher Scientific).

За позитивна контрола бе използван биопсичен материал от плацента.

Методи за отчитане на експресията на антителата

Препаратите са сканирани с помощта на апарат Leica Aperio Scan Scope AT2 device (AperioTechnologies, Vista, CA) с последващи анализи на образите със софтуер ImageScope V12.1.0.5029 (Aperio).

Интензивността на имунната реакция в отделните ендотелоцити

и адипоцити се определя чрез индекс на наситеност. В зависимост от количеството на отложения имунен преципитат в отделните клетки те се разпределят в четири категории (Detre et al., 1995):

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

Изследването е извършено върху 50 ендотелни клетки от всеки срез на абдоминалната аорта. Средната интензивност на имунната реакция се определя, като броят на клетките от всяка категория се умножи по съответния коефициент 0, 1, 2 или 3 и получената сума се раздели на общия брой клетки (Zhang, 2017).

3. Статистическа обработка на резултатите в проучването

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

3.1. Дескриптивни методи

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

3.2. Аналитични методи

1. T-test бе използван за сравняване на средните величини на две групи при проследяване на ефекта на медикаментите върху третираните и здравите плъхове. Статистически значими бяха разликите между групите, при $p \leq 0.05$.
2. Вариационен анализ (ANOVA) бе използван за сравняване на разликите в лечението на трите експериментални групи с третираните плъхове. Разликите бяха приемани за достоверни при приетата за биологични експерименти стойност $p < 0.05$.
3. Корелационен анализ бе използван за изследване на зависимости между показателите и установяване на силата на тяхното

влияние върху уврежданията. Оценката на силата на зависимостта между променливите се базира на резултатите от коефициента на Пирсън (r). Степента на асоциация между променливите бе определяна като значителна при $r > 0.5 < r = 0.7$; голяма при $0.7 < r = 0.9$ и изключително голяма при $r > 0.9$ при $p < 0.05$. Статистическата обработка на данните се извърши с компютърна програма SPSS v21. Графиките за построени с графична програма Graph Pad Prism 7.0.

IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Роля на метаболитните нарушения при ВФД за развитие на ЕД и протективното действие на мелатонин

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

1.1.1. Резултати

• Резултати, получени от измерването на телесната маса

Резултатите от ежеседмично, в продължение на 3 месеца, измерване на телесната маса на плъховете от всички изследвани групи демонстрират равномерно нарастване на телесната маса и в четирите групи до края на експерименталния период. Таблица 6 демонстрира промените в телесната маса в началото на експеримента, на 5-та седмица, на 9-та седмица и в края на експеримента.

Таблица 6. Промени в телесната маса по периоди

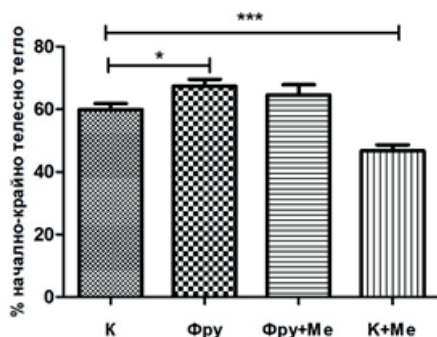
Период на измерване на телесната маса	К	Фру	Фру + Ме	К + Ме
Начално телесно тегло	129.3 + 6.4	130.0 + 8.0	118.0 + 8.8	127.6 + 4.06
5-та седмица	289.0 + 9.1	326.8 + 5,4**	279.5 + 5.1+++	191.3 + 4.9####
9-та седмица	318.6 + 12.8	365.3 + 14.6*	327.5 + 8.9+	229.5 + 6.8####
Крайно телесно тегло/12-та седмица	330.5 + 10.01	399.8 + 6.2***	338.5 + 10.01+++	240.8 + 6.6####

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), (N = 8). К – контролна група; Фру – група на ВФД; Фру + Ме – група на ВФД и прием на мелатонин; К+МЕ – контролна група с прием на мелатонин. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – статистическа значимост между Фру групата и К. + $p < 0,05$; +++ $p < 0,001$ – статистическа значимост между Фру + Ме група и Фру група. #### $p < 0,001$ статистическа значимост на резултата между К + МЕ и К групи, t – test

Резултатите ни демонстрират статистически значимо по-бързо наддаване на телесно тегло при плъховете от Фру групата спрямо контролите през целия период на експерименталната постановка: на 5-та седмица – ** $p < 0,01$, на 9-та седмица – * $p < 0,05$ и 12-та седмица – *** $p <$

0,001. От друга страна, през целия период на експеримента екзогенният мелатонин статистически значимо забавяше нарастването на телесната маса както при плъхове на ВФД, така и при здрави контроли.

Анализ на наддаването на телесното тегло между изследваните групи, измерено като процент от началното и крайното телесно тегло на животните в групата, демонстрират статистически значима разлика между плъховете от Фру групата спрямо контролата – * $p < 0,05$. Прилагане на екзогенния при животни на ВФД доведе до леко редуциране на телесната маса спрямо Фру групата. Статистически по-значима е разликата, която се наблюдава между контролите и плъховете, хранени с традиционна храна, и суплементирани с мелатонин – *** $p < 0,001$ (Фиг.1).



Фиг. 1. Промени в наддаване на телесното тегло между изследваните групи, измерено като процент от началното и крайното телесно тегло на животните в групата

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($n = 8$). К – контролна група; Фру – група на ВФД; Фру + Ме – група на ВФД и суплементирана с мелатонин; К + Ме – контролна група, суплементирана с мелатонин. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, t – test

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

Нашите резултати демонстрират статистически значимо по-високи стойности на КО при плъховете от Фру групата спрямо контролите – ^{aaa} $p = 0,0002$. Суплементиране с мелатонин значително редуцира този показател при плъховете на ВФД спрямо контролната група – ^b $p < 0,05$. В групата, хранена с традиционна храна, прилагането на екзогенния мелатонин статистически значимо редуцира всички изследвани зоомет-

рични показатели спрямо контролата: КО – $**p < 0,01$, ГО – $**p < 0,01$ и НА – $***p < 0,001$

Резултатите от измерването на назо-аналното разстояние (НА), ко-ремната обиколка (КО) и гръдната обиколка (ГО) са представени в Таблица 7.

Таблица 7. Промени в зоометричните показатели на плъховете според експерименталната група

Зоометричен показател	К	Фру	Фру + Ме	К+Ме
НА	24.31 ± 0.23	24.00 ± 0.38	23.50 ± 0.42	22.06 ± 0.17***
КО	16.81 ± 0.23	19.44 ± 0.45 ^{aaa}	18.00 ± 0.27 ^a	15.58 ± 0.3**
ГО	15.25 ± 0.33	16.50 ± 0.83	15.38 ± 0.21	13.75 ± 0.27**

Легенда: Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), (N = 8). К – контролна група; ФРУ – група на ВФД; ФРУ + Ме – група на ВФД и прием на мелатонин; К+МЕ – контролна група с прием на мелатонин; ^{aaa} $p = 0,0002$ – статистическа значимост между К и ФРУ; ^a $p < 0,05$ – статистическа значимост между ФРУ + МЕ група и ФРУ група; $**p < 0,01$ – статистическа значимост между К+МЕ и К; $***p < 0,001$ – статистическа значимост между К + МЕ и К, t – test

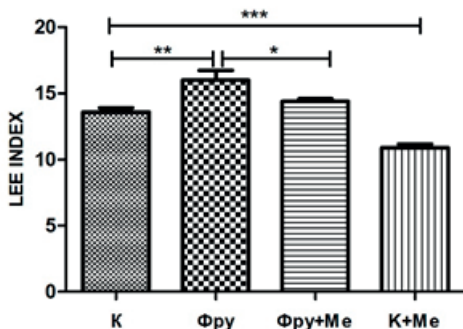
• Резултати, получени от изчисляването на индекса на Lee

Индексът на Lee е бърз и точен критерий за затлъстяване при експериментални животни. Резултатите от анализирането на разликите в индекса на Lee между плъховете в изследваните групи демонстрират статистически значими разлики между Фру групата и контролата – $**p < 0.001$; животните от Фру групата показват по-висок Lee индекс спрямо контролата. Lee индексът при плъховете на ВФД и суплементирани с мелатонин е статистически значимо по-нисък спрямо Фру групата – $*p < 0.05$ и наближава стойностите на контролата. Наблюдава се и статистически значима разлика между контролата и групата плъхове на традиционна храна и суплементирана с мелатонин – Lee индексът в последната е по-нисък – $***p < 0.0005$ (Фиг. 2).

• Резултати от макроскопското изследване на РПМТ

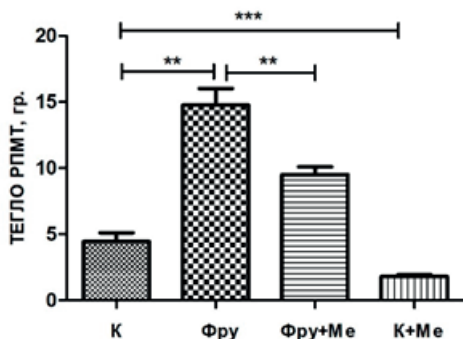
Резултатите от макроскопското изследване на РПМТ демонстрират разлики между изследваните групи. Теглото на РПМТ във Фру групата е статистически значимо по-високо спрямо контролите – $**p < 0.001$. Суплементираните с мелатонин плъхове на ВФД демонстрират значител-

но редуциране на теглото на РПМТ (със статистическа значимост от $**p < 0.001$). Особено правят впечатление значителните различия в количеството на РПМТ между животните в контролната група и плъхове на традиционна диета и суплементиране с мелатонин: теглото на РПМТ в последната е статистически значимо по-ниско – $***p < 0.0001$ (Фиг. 3 и Фиг. 4).



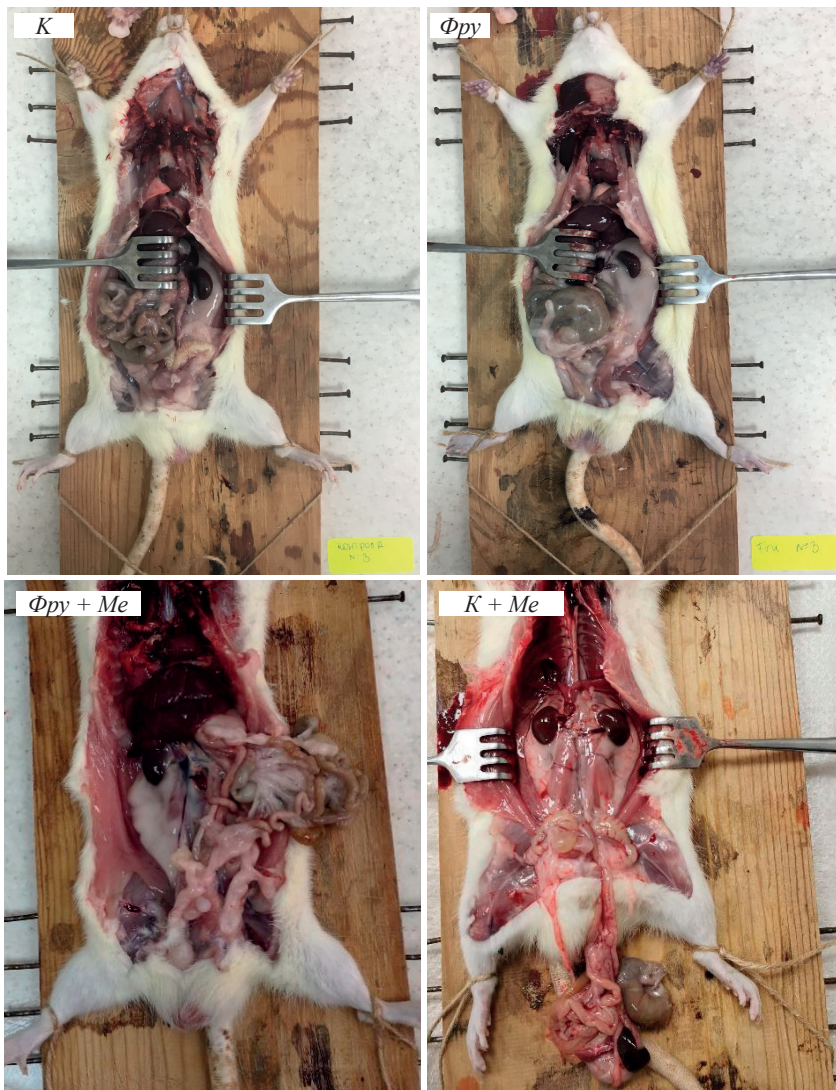
Фиг. 2. Разлики в индекса на Lee между животните в експерименталните групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($n = 8$); К – контролна група; К + Ме – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру – група на фруктозна диета; Фру + Ме – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза; $***p < 0.0005$; $**p < 0.001$; $*p < 0.05$ – статистическа значимост между третираните групи и контролата, t – test



Фиг. 3. Промени в теглото на РПМТ между изследваните групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($n = 8$); К – контролна група; К + Ме – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру – група на фруктозна диета; Фру + Ме – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза; $**p < 0.001$; $***p < 0.0001$ – статистическа значимост между третираните групи и контролата, t – test



Фиг. 4. Макроскопски промени в РПМТ между изследваните групи

Легенда: К – контролна група; К + Me – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру – група на фруктозна диета; Фру + Me – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза

1.1.2. Обсъждане: Промени в телесното тегло, теглото на РПМТ и зоометрични показатели

Получените от нас резултати показват, че прилагането на ВФД в продължение на 12 седмици води до развитие на затлъстяване от висцерален тип, проявено с увеличено телесно тегло, тегло на РПМТ и характеристиките за този тип затлъстяване промени в зоометричните показатели – коремна обиколка (КО) и Lee индекс.

В края на експеримента телесното тегло на всички животни, подложени на ВФД, беше увеличено спрямо контролите. Наблюдавахме статистически значимо наддаване на телесното тегло във всички групи и по седмици. Патогенезата на затлъстяването при консумиране на фруктоза е най-вероятно комплексна и включва няколко механизма. Потенциално значим механизъм е индуцирането на резистентност към лептин, водеща до липсата за усещане на ситост при консумиране на фруктоза, за разлика от глюкозата, което води до хиперфагия, положителен енергиен баланс и покачване на телесната маса (Tappy et al., 2010). Важно наблюдение е, че употребата на фруктоза промотира депозиция на липиди предимно във висцералната мастна тъкан, за разлика от употребата на глюкоза, която се съпровожда с липидни отлагания в подкожната мастна тъкан– документирано и от други автори (Stanhope et al., 2009). Това обяснява развитието на абдоминален тип затлъстяване при ВФД. В подкрепа на този механизъм са получените резултати от измерване на КО на плъховете в експеримента. КО беше статистически значимо по-висока във Фру групата спрямо контролата и групите, суплементирани с мелатонин. Нашите резултати подкрепят предположението и на други автори (Мичурина et al., 2018; Калиниченко, 2018), че мелатонинът може да се разглежда като перспективно средство за лечение на затлъстяване, заради способността си да потиска липогенезата. Също така нашите резултати демонстрират, че екзогенно приложенят мелатонин значително намалява КО и при здрави контроли.

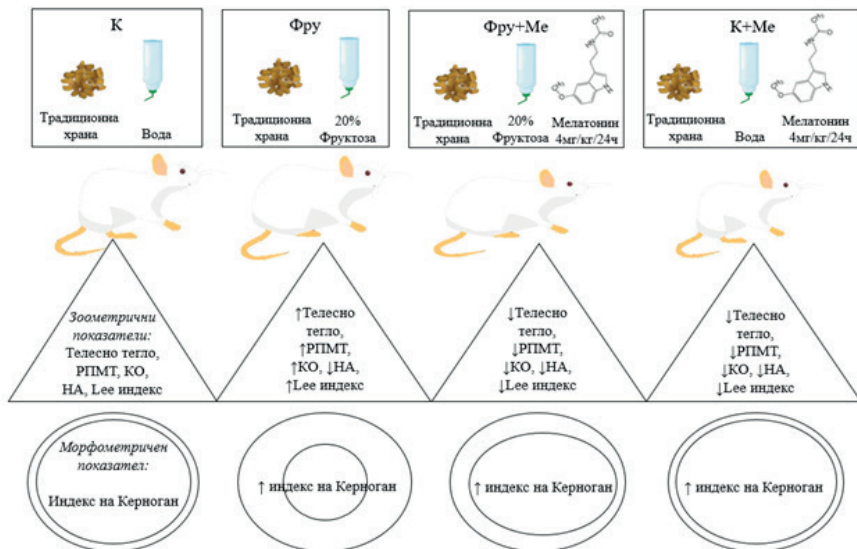
Установено е, че фруктозата повишава чернодробната липогенеза. Така, според изследванията на Khitan и Kim, 2013, продължителното консумиране на фруктоза води до увеличен синтез на мастни киселини и отлагане на липиди в организма (Khitan и Kim, 2013). Още повече, според същите автори, хроничното фруктозно натоваарване повлиява

и адипоцитната диференциация, което води до хиперплазия и хипертрофия на пре- и адипоцитите в бялата мастна тъкан. От друга страна, дисфункционалните прояви от страна на мастната тъкан са патогенетично свързани с намален синтез на адипонектин и повишено освобождаване на диabetогенни цитокини, които са причина за развитие и влошаване на инсулиновата резистентност, още един стимул за развитие на затлъстяване (Khitani и Kim, 2013). При сравняване на телесното тегло между изследваните групи като % от началното и крайно тегло беше установено, че плъховете, подложени на ВФД, имат по-висок процент на наддаване спрямо контролите – статистическо значимо увеличение на телесното тегло с около 10%. Според някои автори повишеното тегло с над 10% при експериментални животни се означава като умерено затлъстяване, отговарящо на ИТМ при хора средно 35 (затлъстяване) (Kim et al., 2017; Novell et al., 2007).

Интересно е да се отбележи, че мелатонинът има ефект върху теглото на плъховете, хранени само с традиционна храна, и тези, суплементирани с мелатонин. Наблюдават се статистически значими разлики между теглото в двете групи, което предполага за влиянието на мелатонина върху липогенезата и намаление на телесното тегло и при здрави контроли.

Нашите резултати показват, че ВФД води и до значително увеличение на теглото на РПМТ спрямо контролната група. Това съответства с предположението на Bray et al. за *de novo* липогенеза в адипоцитите на висцералната мастна тъкан при натоваване с фруктоза (Bray et al., 2004). От друга страна, екзогенно приложеният мелатонин значително намалява количеството на РПМТ в групите, суплементирани с мелатонин.

Освен коремната обиколка, интересно е да се отбележат промените и в други зоометрични показатели. Така, според нашите резултати мелатонинът има ефект върху размера на назо-аналното разстояние и гръдните обиколки на плъховете, хранени само с традиционна храна, и тези, суплементирани с мелатонин. Наблюдават се статистически значими разлики между двете групи, което предполага за влиянието на мелатонин върху тези зоометрични показатели при здрави контроли (Фиг. 5).



Фиг. 5. Протективно действие на мелатонина при фруктозо-индуцирани промени в зоометричните показатели и патологично ремоделиране на аортната стена

Легенда: К – контролна група; Фру група на ВФД; Фру + Ме – група на ВФД и прием на мелатонин; К+МЕ – контролна група с прием на мелатонин; RPMT – ретроперитонеална мастна тъкан; КО – коремна обиколка; НА – назо-анално разстояние

Изчисленият индекс на Lee за изследваните от нас групи, като точен критерий за затлъстяване при експериментални животни (Bernardis и Patterson, 1968), потвърди гореописаните резултати от нашето изследване – лечението с мелатонин има статистически значими резултати, свързани с намаляване на индекса на Lee в Фру + Ме група спрямо групата на ВФД. Мелатонинът има ефект и върху Lee индекса на плъховете, хранени само с традиционна храна, и тези, суплементирани с мелатонин. Патогенетичните механизми, чрез които лечението с мелатонин понижава тези показатели, не са изяснени. Може да се предположи, че терапевтичните ефекти на мелатонина въздействат върху фактори, регулиращи приема на храна или енергиен разход. Вероятно антиоксидантната активност на мелатонина протектира срещу дисфункцията на висцералната мастна тъкан при обременяване с фруктоза (Bratoeva

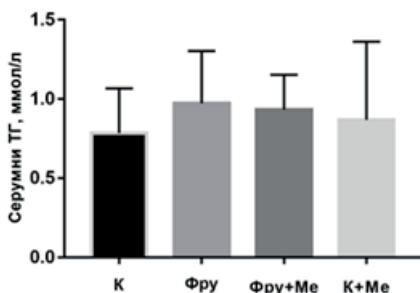
et al., 2015), което възстановява адекватна секреция на адипоцитокени, упражняващи контрол и върху енергийния метаболизъм.

Множество изследвания потвърждават патогенетичната връзка между висцералното затлъстяване и ЕД (Корельская, 2015; Guh et al., 2009). Рискът за развитие на ЕД нараства с промяната на антропометричните показатели, които характеризират този тип на разпределението на мастна тъкан, в частност коремната обиколка (Jansen et al., 2004). Така, според Koning и съавт., нарастването на коремната обиколка покачва риска за развитие на сърдечносъдови патологии (Koning et al, 2007). Във връзка с това може да се предположи, че мелатонинът привлича ендотелопротективни свойства чрез намаляването на телесното тегло, теглото на висцералната мастна тъкан и коремната обиколка.

1.2. Промени в серумните нива на липиди

1.2.1. Резултати

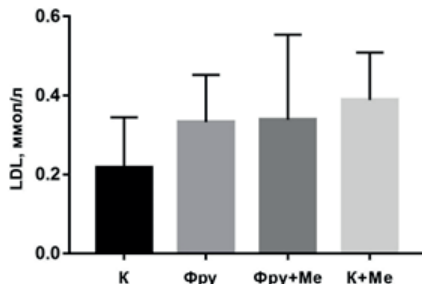
Резултатите от биохимичното изследване демонстрират тенденция към покачване на нивата на ТГ в серума на плъховете от Фру групата спрямо контролите (без статистическа значимост). В групата плъхове на ВФД и суплементирани с мелатонин наблюдаваме леко редуциране на серумните нива на ТГ спрямо Фру групата (без статистическа значимост). Нивата на ТГ в серумите на плъхове на традиционна диета и суплементирана с мелатонин са по-ниски спрямо групи на ВФД, но по-високи спрямо контролата (без статистическа значимост) (Фиг. 6).



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

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($n = 8$); К – контролна група; К + Ме – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру – група на фруктозна диета; Фру + Ме – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза.

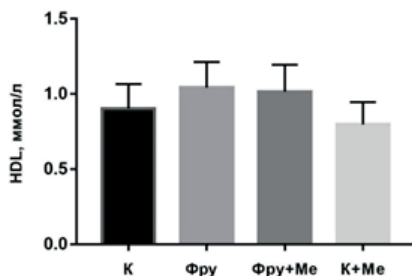
Също така нашите резултати демонстрират тенденция към покачване на нивата на LDL в серума на плъховете, подложени на ВФД, спрямо контролната група (без статистическа значимост). В групите, суплементирани с мелатонин, също така се наблюдава тенденция към леко покачване на нивата на LDL спрямо контролата (без статистическа значимост) (Фиг. 7).



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

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($n = 8$); К – контролна група; К + Ме – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру – група на фруктозна диета; Фру + Ме – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза

Наблюдава се и тенденция към покачване на нивата на HDL в серума на плъховете, подложени на ВФД, спрямо контролната група (без статистическа значимост). Животни, суплементирани с мелатонин, демонстрират редуциране на нивата на HDL спрямо Фру групата (без статистическа значимост). Плъховете на традиционна храна и суплементирани с мелатонин демонстрират по-ниски нива на HDL спрямо контролата (Фиг. 8)



Фиг. 8. Промени в серумните нива на HDL в експерименталните групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($n = 8$); К – контролна група; К + Ме – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру – група на фруктозна диета; Фру + Ме – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза

1.2.2. Обсъждане: Промени в серумните нива на липиди

Дисфункцията на мастната тъкан при висцерално затлъстяване се характеризира с такива нарушения в липидната обмяна като дислипидемия вследствие на ИР и повишена продукция на ТГ в черния дроб. Нашите данни демонстрират значимо увеличаване на серумните нива на ТГ при ВФД спрямо контролата. Резултатите от прилагането на мелатонин демонстрират тенденция към редуциране на хипертриглицеридемията (без статистическа достоверност), без достигане до стойностите на контролната група. Нивата на HDL са статистически незначимо по-качени при плъховете, подложени на ВФД, спрямо контролата и не се повишават (без статистическа достоверност) при плъховете, суплементирани с мелатонин.

Нашите резултати съответстват с предположението на други автори (Sartang et al., 2018), че суплементация с мелатонин няма статистически значим ефект върху нивата на HDL, докато значимо редуцира нивата на ТГ.

Механизмите за фруктозо-индуцираната дислипидемия са все още неизяснени напълно, но вероятно метаболитните нарушения при висцерално затлъстяване и ИР водят до аномалии в липидната обмяна, което се демонстрира с тенденция към повишаване на нивата на ТГ в нашия експериментален модел. Нашите резултати потвърждават липидогенния потенциал на фруктозата, водещ до дислипидемия (Taru et al., 2010; Khitan и Kim, 2013; Chahirov, 2008). Превръщането на фруктозата след остър или хроничен прием в мастни киселини чрез *de novo* липогенеза е вече известен факт (Khitan и Kim, 2013). Доказано е, че диетата с високо съдържание на фруктоза директно стимулира експресията в черния дроб на транскрипционните фактори – SREBP-1 и ChREBP, които са основни индуктори в синтеза на СМК и ТГ от глюкоза (Kim et al., 2016; Dentin et al., 2004). От друга страна, превръщането на излишната глюкоза в мастни киселини повишава количеството на малонил-КоА, който спира прехвърлянето им в митохондриите за окисление, като ги ориентира към естерифициране в ТГ.

Дислипидемията, в частност хипертриглицеридемията, е независим рисков фактор за развитие на ССЗ, съответно, патогенетично обвързан с ЕД (Шляхто et al., 2017). Патогенетичната връзка между дислипидемията и развитието на ЕД може да се обясни с това, че дислипидемията

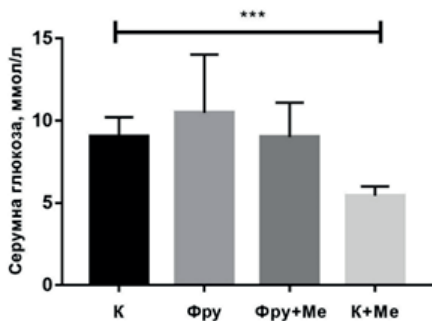
повишава експресията на адхезионни молекули (ICAM-1, VCAM-1) на повърхността на ендотелните клетки, нарушавайки по този начин взаимодействието им с циркулиращи левкоцити. Това впоследствие води до развитието на адхезионна форма ЕД и ремоделирането на съдовата стена (Шулькина, 2018; Лындина и Шишкин, 2018).

Причини за наблюдаваната тенденция на мелатонин да намалява нивата на серумните липиди не са изяснени. Най-вероятно антиоксидантната му активност протектира срещу дисфункционалните промени в мастната тъкан, потискайки ОС и намалявайки продукцията на проинфламаторни цитокини и СМК. Това води до намаляване на притока на СМК към черния дроб и съответно намалява липидогенезата и повишения синтез на ТГ. Това означава, че прилагането на екзогенен мелатонин при дислипидемия, в частност при покачени нива на ТГ в серума, може да носи протективен характер по отношение на съдовата стена и функциите на ендотела. По-точно, мелатонинът, редуцирайки нивата на ТГ, може да предпазва от развитието на адхезионна форми ЕД и ремоделиране на съдовата стена.

1.3. Промени в серумните нива на глюкоза

1.3.1. Резултати

Резултатите ни показват повишени нива на серумната глюкоза във Фру групата спрямо контролата (без статистическа значимост). Прилагане на екзогенния мелатонин в групата на ВФД редуцира нивата на серумната глюкоза спрямо Фру групата и доближава нивата ѝ до тези на контролата (без статистическа значимост). Нивата на серумната глюкоза при плъховете на традиционна диета и суплементирани с мелатонин също така са по-ниски от тези на контролата (със статистически значимост $^{***}p < 0.0001$) (Фиг. 9).



Фиг. 9. Промени в серумните нива на глюкоза в експерименталните групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($n = 8$); К – контролна група; К + Ме – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру – група на фруктозна диета; Фру + Ме – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза; *** $p < 0.0001$ – статистическа значимост между третите групи и контролата, t – test

1.1. Обсъждане: Промени в серумните нива на глюкозата

Получените от нас резултати показват, че ВФД предизвиква хипергликемия, статистически незначима в групата на ВФД спрямо контролата. Суплементацията с мелатонин редуцира серумните нива на глюкозата при плъховете на ВФД и ги доближава до тези на контролата. Приемът на мелатонин от плъховете, хранени с традиционна храна, обаче, статистически значимо понижава серумните нива на глюкозата спрямо контролата.

Ние предполагаме, че ВФД предизвиква хипергликемия чрез директното си действие върху въглехидратната обмяна в черния дроб чрез увреждане на инсулиновия сигнал и намаляване на глюкозната утилизация в периферните тъкани, най-вероятно като резултат на дисфункционалните промени в мастната тъкан и освобождаването на проинфламаторни цитокини (TNF- α), наситени СМК, АФК и др. (Hotamisligil et al., 2010). В допълнение, доказано е, че фруктозо-1-фосфат (първият продукт от метаболизма на фруктоза в черния дроб) също нарушава сигналния път на инсулина, което води до активиране на глюконеогенезата, потискане на синтезата на гликогена и повишено производство на глюкоза (Wei et al., 2007). Също така засиленото освобождаване на

СМК от дисфункционална мастна тъкан води до нежелани ефекти върху β -клетките на панкреаса поради липотоксичността на СМК и може да доведе до нарушена инсулинова секреция. Насочването на липидни метаболити от дисфункционалната мастна тъкан към черния дроб и скелната мускулатура води до липотоксичност, която е причина за производство на АФК, развитие на ОС и активиране на проинфламаторните пътища чрез NF- κ B, които също увреждат инсулиновия сигнал. Това води до инхибиране на усвояването на глюкоза в мускулите, а в черния дроб липсата на инсулинова активация увеличава производството на глюкоза и допринася за хипертриглицеридемията, която се наблюдава при пациенти и експериментални животни със затлъстяване и ЗД тип 2. В подкрепа на това е, че приемът на мелатонин редуцира теглото на РПМТ, което вероятно е причина и за наблюдавана тенденция към понижаване на серумните нива на глюкозата.

Причините за наблюдаваната тенденцията на мелатонина да намалява нивата на серумната глюкоза не са изяснени. Литературните данни от изследванията върху хора носят противоречив характер (Garault, 2020). Резултатите от нашето изследване демонстрират, че прилагането на мелатонин статистически незначимо редуцира серумните нива на глюкоза при плъхове на ВФД.

Нарушената обмяна на глюкозата играе патогенетична роля в развитието на ЕД. В частност, хипергликемията активира протеинкиназа-С и индуцира развитието на ОС, което, от една страна, води до повишен пермеабилитет на съдовата стена и от друга – нарушава ендотело-зависимата релаксация чрез инхибиране на синтеза на NO и потенциране на разграждането на тази молекула (Шулькина, 2018). Намаленият синтез/бионаличност на NO води до нарушено съотношение между ендотелозависима вазоконстрикция и вазодилатация в посока вазоконстрикция – най-ранния признак (Liao, 2013) и една от най-важните причини (Wilcox, 2013) за развитието на вазомоторен тип ЕД. В допълнение, хипергликемията промотира апоптотични промени в ендотела, които водят до ЕД (Wang и Li, 2017)

Предвид това, че хипергликемията патогенетично е свързана с една от най-ранно развиващи се форми на ендотелна дисфункция – вазомоторна, нашите резултати показват, че мелатонинът може да има потенциал да протектира срещу развитието на ЕД и чрез намаляването на нивата на глюкоза в серума (Фиг. 10).



Фиг. 10. Вероятни механизми за протекцията срещу ЕД при суплементация с мелатонин при ВФД

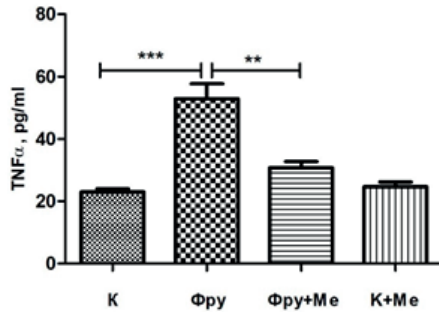
Легенда: ЕД – ендотелна дисфункция; ВФД – високофруктозна диета

2. Ролята на фруктозоиндуцирано нискостепенно възпаление за развитие на ЕД и протективното действие на мелатонин

2.1. Промени в серумните нива на TNF- α

2.1.1. Резултати

Резултатите от нашето изследване демонстрират покачване на нивата на TNF- α в серума на плъховете, подложени на ВФД, спрямо контролната група: със статистическа значимост при Фру групата – $^{***}p < 0.0001$ и без статистическа значимост при Фру + Ме групата. Суплементирането с мелатонин намали стойностите на TNF- α в серуми на плъховете спрямо Фру групата (статистически значимо за Фру + Ме групата – $^{**}p < 0.001$) (Фиг. 11).



Фиг. 11. Промени в серумните нива на *TNF-α* в експерименталните групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($n = 8$); К – контролна група; К + Ме – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру група на фруктозна диета; Фру + Ме – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$ – статистическа значимост между третираните групи и контролата, t – test

2.1.2. Обсъждане: Промени в серумните нива на *TNF-α*

Нискостепенното възпаление е друга ключова характеристика на висцералното затлъстяване. До момента известните патологични процеси, които поддържат това възпаление, са клетъчните увреждания в мастната тъкан в резултат на нарушена адипоцитна диференциация, хипоксия и оксидативен стрес с участието на адипоцити, ендотелни клетки и циркулиращи макрофаги. Една от основните промени е именно увеличение в процента на макрофаги, които са основен източник на провъзпалителните цитокини *TNF-α* и *IL-6*. Strissel et al. (2007) установяват положителна корелация между големината на адипоцитите, адипоцитната клетъчна смърт, нивата на *TNF-α* и *MCP-1* при затлъстели мишки още след 12-седмично хранене с богата на мазнини диета (Strissel et al., 2007).

Както макрофагите, така и адипоцитите са чувствителни към действието на *TNF-α*, които чрез активиране на възпалителния *IKK/NF-κB* сигнален път повишават експресията и на други медиатори на възпалението, като острофазни белтъци, интерлевкин-6 и др., водещи до самозахранващ се цикъл на повишено освобождаване на провъзпалителните цитокини от мастната тъкан, които циркулират в съдовата

система. (Hotamisligil и Shargill, 1993). Затова циркулиращите нива в серума на TNF- α са повишени при затлъстяване и тези промени са пряко свързани с инсулиновата резистентност и диабета, докато загубата на телесно тегло намалява нивата му. (Weisberg et al., 2003).

TNF- α е от първата линия провъзпалителни цитокини, играещи важна роля в отключването и провеждането на възпалителния отговор чрез активиране на експресията на транскрипционен фактор NF- κ B и по този начин повишава продукцията не само на провъзпалителни цитокини (TNF- α , IL-6), но и на реактивни свободни радикали (Schwabe et al., 2006). TNF- α играе важна роля при възпаление в съдовата стена и коагулация чрез многобройните си ефекти – повишава експресията на PAI-1 и потиска експресията на тромбомодулин и на протеин C в ендотелните клетки, индуциращи прокоагулантно състояние, патогенетично свързано с ЕД (Uysal et al., 1998). Също така е установено, че TNF- α индуцира експресията на тъканния фактор на повърхността на ендотелните клетки и моноцитите и стимулира процесите на коагулация и тромбообразуване, което е още един механизъм за развитие на ЕД (Tarantino et al., 2010).

Затова се счита, че нискостепенното възпаление при затлъстяване допринася за прогресирането на съдовите увреждания, предизвиквайки ендотелна дисфункция и повишен риск от сърдечносъдови и други кардиометаболитни заболявания, а TNF- α е доказан серумен маркер за тези нарушения.

Резултатите от нашите изследвания показват статистически значимо повишено серумно ниво на TNF- α и хистологични данни за патологични промени в аортната стена при плъхове на ВФД, които са значително редуцирани в групата, натоварена с фруктоза и суплементирана с мелатонин (със статистическа значимост). Съществуват убедителни доказателства, че хроничното фруктозно натоварване индуцира нискостепенно хронично възпаление (Zhang et al., 2009; Zhou et al., 2017). Фруктозо-асоциираната дисфункция в мастната тъкан води до засилена продукция на адипокини, свързани с възпалението, включващи и TNF- α (Chahirou et al., 2018).

В допълнение, TNF- α намалява ендотелната азотен оксид синтаза (eNOS), състояние, водещо до понижени нива на NO и намалена експресия на митохондриални гени, отговорни за окислителното фосфорилиране. Това води до повишен оксидативен стрес и натрупване на реак-

тивни кислородни видове (Schwabe et al., 2006). От друга страна, TNF- α стимулира продукцията на АФК в ендотелните клетки, което допринася за редуцирането на бионаличността на NO. Според редица изследвания именно този механизъм допринася за NO дефицит и развитието на васкуларна патология при ЗД (Zhang et al., 2009). В допълнение, TNF- α повишава продукцията на пероксинитрит (ONOO-), който доказано е асоцииран с намаляване на бионаличността на NO (El-Remessy, 2010).

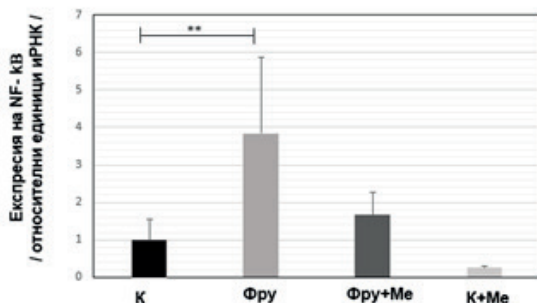
В действителност ние също установихме ниски нива на експресия на eNOS в групата на ВФД, високи нива на експресия на антиоксидантните SOD-1 и HO-1, които корелират с високите серумни нива на TNF- α . Прилагането на екзогенен мелатонин значимо понижи нивата на провъзпалителния маркер паралелно с показателите на оксидативен стрес, което подкрепя резултати на други изследователи, доказващи антиинфламаторната активност на този хормон. Това корелира с *in vivo* и *in vitro* изследванията на други автори, демонстриращи цитопротективния капацитет на мелатонина при диабетна ретинопатия (Tu et al., 2021). Положителният ефект на мелатонина върху функционалното състояние на съдовата стена вероятно се дължи на ограничаване на оксидативните и възпалителните процеси в съдовата стена, които доказано са отговорни за съдовото увреждане при хронично фруктозно натоваарване. Изследванията върху плъхове със ЗД демонстрират, че мелатонинът намалява ОС и потенцира синтеза на антиоксидантните ензими чрез задържането на Nrf-2 в ядрото, промотирайки фосфорилиране на протеин киназа B (Jiang et al., 2016). Jiang et al., (2012). В друго свое изследване авторите установяват, че механизмът на антиинфламаторното действие на мелатонин вероятно се изразява в инхибиране на NF-kB каскада (Jiang et al., 2012).

В допълнение може да се направи извод, че ОС, нискостепенното възпаление и дисфункцията на мастната тъкан при хронично фруктозно натоваарване допринасят за развитието на ЕД. Приложението на мелатонин намалява риска за развитие на ЕД при ВФД. Макар че според изследването на Tailleux et al.(2002) върху мишки с хиперхолестеролемия суплементирането с мелатонин е довело до акселериране на атеросклеротичния процес в проксималната аорта (Tailleux et al., 2002). Това акцентира вниманието на изследователите върху това, че са необходими допълнителни изследвания за изясняване на вазопротективните свойства на мелатонина от гледна точка на антиинфламаторните му ефекти (Фиг. 30).

2.2. Промени в експресията на NF-kB в аорта

2.2.1. Резултати

Резултатите от изследването ни демонстрират повишени нива на NF-kB експресията при плъхове, подложени на ВФД, спрямо контролата – статистически значимо за Фру групата – $**p < 0.001$. Прилагането на екзогенния мелатонин при плъхове, натоварени с фруктоза, е довело до редуциране на нивата на експресията спрямо Фру групата, доближавайки ги по тези на контролата (без статистическа достоверност). Групата плъхове на традиционна храна и суплементирана с мелатонин демонстрира най-ниските нива на експресията от всички изследвани експериментални групи (Фиг. 12).



Фиг. 12. Промени в експресията на NF-kB в аорта на изследваните групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (\pm SEM), ($n = 8$); К – контролна група; К + Ме – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру – група на фруктозна диета; Фру + Ме – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза; $**p < 0.001$ – статистическа значимост между третираните групи и контролата, t – test

2.2.2. Обсъждане: Промени в експресията на NF-kB в аорта

Заглъстяването е свързано с хронично активиране на възпалителни пътища както в адипоцитите, така и в макрофагите, пребиваващи във/или инфилтриращи мастната тъкан. Адипоцитите са не само депа за съхранение на липиди, но и секреторни клетки, които произвеждат провъзпалителни цитокини и адипокини.

Активирането на ядрения транскрипционен фактор κB (NF- κB) регулира експресията на възпалителни гени, които са от решаващо значение за патогенезата на възпалителните заболявания. Ядреният фактор NF- κB принадлежи към семейство транскрипционни фактори, за който се счита, че е първичен регулатор на възпалителните реакции в повечето клетъчни типове. Индуцира експресията на провъзпалителни гени, различни проинфламаторни цитокини като TNF- α и IL-1, хемокини и адхезионни молекули, които се освобождават първи при тъканно увреждане или инфекция (Akira et al., 2006).

В съдовите ендотелни клетки NF- κB медира индукцията на провъзпалителни цитокини, хемотактични фактори и адхезионни молекули, като по този начин насърчава адхезията на моноцити и прогресията на ендотелните увреждания до атеросклероза (Yu et al., 2015). Откриването на NF- κB в ядрата на макрофагите в атеросклеротични лезии (Brand et al., 1996) предполага, че активирането на NF- κB е свързано с атерогенезата. В допълнение, съдовият ендотел индуцира NF- κB в отговор на свързването на окислени липиди в кръвния поток (Brand et al., 1996). Някои автори установяват, че NF- κB , отчасти чрез стимулиране на оксидативния стрес, играе важна роля в медирането на ендотелната дисфункция в периферните артерии на възрастни хора със затлъстяване (Pierce et al., 2009). Резултатите от проучване на Xiaomei Liu et al. (2016) показват положителна корелация между оксидативния стрес и NF- κB , а също така по-висока степен на активиране на NF- κB сигналния път в белодробните тъкани на затлъстели мишки (Liu et al., 2016).

Активирането на NF- κB може да се индуцира по различни пътища. Класическият път включва стимулиране на TNF-, Toll-подобни или T-клетъчни рецептори. Доказани активатори на NF- κB при затлъстяване и ендотелна дисфункция е провъзпалителният TNF- α . В експеримент стимулирането на ендотелни клетки с TNF-алфа води до ядрено натрупване NF- κB и активиране на ендотелните клетки, които в отговор експресират инхибитор на активирането на NF- κB и κB -alpha (MAD-3). Нивата на инхибитора обаче падат бързо след TNF- α стимулация, което говори за тясната обратна връзка между нивата на TNF- α и активирането на транскрипционния фактор (Read et al., 1994). Установено е, че реактивните свободни радикали също стимулират редица транскрипционни фактори, включително NF- κB . Счита се, че NF- κB като

чувствителен към редокс средата е тясно свързан с оксидативния стрес (Niederberger и Geisslinger, 2008).

Следователно концепцията, че инхибирането на NF-κB може да бъде ефективна терапевтична стратегия за превенция и лечение на свързана с възрастта, затлъстяването и съдовата ендотелна дисфункция, е обещаваща за създаване на противовъзпалителни терапии.

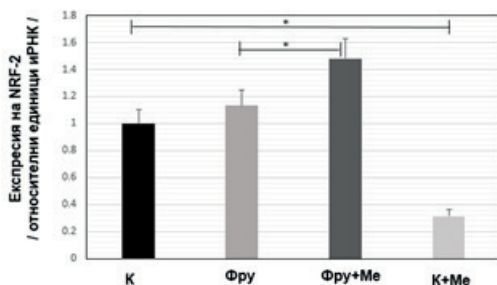
Получените от нас резултати демонстрират статистически значимо покачване на NF-κB в съдовата стена при плъхове от Фру групата спрямо контролите. Това потвърждава изследванията на други автори, свързващи ВФД с иницирането и поддържането на нискостепенно хронично възпаление в съдовата стена (Zhang et al., 2009; Zhou et al., 2017; Chahirou et al., 2018). Прилагането на мелатонин редуцира експресията почти двойно. Това може да се обясни с добре документирано от други автори антиинфламаторно действие на мелатонина (Jiang et al., 2012). Мелатонинът намалява NF-κB-зависимия провъзпалителен отговор, възстановява редокс баланса и митохондриалната хомеостаза (José et al., 2015). В подкрепа на това е, че паралелно с повишените нива на NF-κB в групата на фруктозно хранене са повишени серумните нива на TNF-α, установен е оксидативен стрес в съдовата стена, което потвърждава експериментите на други автори. Прилагането на мелатонин редуцира тези промени и възстановява фруктозо-индуцираните ендотелни увреждания. Остава под въпрос дали суплементацията с мелатонин в случая може да има и негативни ефекти по отношение потискане на експресията на транскрипционния фактор. Тъй като NF-κB изпълнява и редица физиологични функции, неселективното и пълно инхибиране може да доведе до няколко сериозни странични ефекти. Експериментални животни (нокаут -/-) на компоненти от сигналния път на NF-κB умират по време на ембрионалното развитие или перинатално, което показва решаващи функции на NF-κB в развитието и оцеляването на клетките (Lianxu et al., 2006) (Фиг. 30).

3. Роля на ОС при ВФД за развитие на ЕД и протективното действие на мелатонин

3.1. Промени в експресията на Nrf-2 в аортната стена при ВФД и ефекти на екзогенния мелатонин

3.1.1. Резултати

Резултатите ни демонстрират повишени нива на експресията на Nrf-2 в групи, подложени на ВФД, спрямо контролите (без статистическа значимост). Суплементиране с мелатонин при натоварените с фруктоза плъхове статистически значимо покачва нивата на експресията – $*p < 0.05$. Резултатите на здрави контроли, суплементирани с мелатонин, показват статистически значимо по-ниски стойности на експресията спрямо контролната група – $*p < 0.05$ (Фиг.13).



Фиг. 13. Промени в експресията на Nrf-2 в аорта на изследваните групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната ($\pm SEM$), ($n = 8$); К – контролна група; К + Ме – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру – група на фруктозна диета; Фру + Ме – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза; $*p < 0.05$ – статистическа значимост между третираните групи и контролата, t – test

3.1.2. Обсъждане: Промени в експресията на Nrf-2 в аортната стена при ВФД и ефекти на екзогенния мелатонин

Повишеното генериране на реактивни кислородни радикали при съдови заболявания като атеросклероза, диабет, хронична бъбречна недостатъчност и прееклампсия силно корелира с ендотелна дисфункция,

която води до нарушена ендотел-зависима релаксация и съдово увреждане. За да противодействат на окислителните увреждания, клетките индуцират освобождаването на детоксиращи ензими и антиоксидантни протеини чрез активиране на транскрипционни регулатори на гени, отговорни за тяхната експресия. Сигналният път Nrf-2/Keap1-ARE е най-мощният известен ендегенен антиоксидантен сигнален път, който ефективно се бори с индуцирани от оксидативен стрес наранявания на ендотелните клетки. Nrf-2 е доказан транскрипционен фактор, отговорен за повишената активност на антиоксидантните HO-1, глутатион редуктаза, супероксид дисмутаза, каталаза и др. в условията на оксидативен стрес. В този смисъл влиянието върху активността на Nrf-2 може да се използва за контролиране на оксидативния стрес. Към днешна дата са докладвани различни фармакологични Nrf-2 активатори с вазопротективни свойства, но клиничното им приложение е все още ограничено (Martin-Montalvo et al., 2011; Suzuki et al., 2013).

Нашите резултати демонстрират, че ВФД може да инициира покачване на експресията на транскрипционния фактор Nrf-2 в аортната стена без статистическа значимост спрямо контролата и статистически значимо спрямо Фру-група, лекувана с мелатонин. По литературни данни промените в експресията на Nrf-2 при фруктозно натоварване са противоречиви. Така, според изследванията на Savran и съавт. (2019), кардиоваскуларната токсичност на ВФД е тясно свързана с инхибирането на експресията на Nrf-2 и, съответно, загуба на антиинфламаторна и антиоксидантна защита (Savran et al., 2019).

Други експериментални изследвания обаче показват, че активността на транскрипционния фактор Nrf-2 в голяма степен зависи от фактори, които контролират стабилността на протеина или неговото ядрено разграждане (напр. Keap1) (Kato et al., 2004). По този начин, освен регулаторен механизъм, насърчаващ стабилизирането на Nrf-2 в отговор на оксидативен стрес, вероятно има конститутивен механизъм, насърчаващ разграждането му в клетките под стрес за предотвратяване на натрупването му по неконтролиран начин (Stewart et al., 2003). Първични невронни култури, третирани с химически активатори на Nrf2-ARE пътя, показват значително по-голяма устойчивост към невротоксичност, предизвикана от оксидативен стрес (Johnson et al., 2008) Следователно активирането и натрупването на Nrf-2 в ядрото в отговор на стрес сиг-

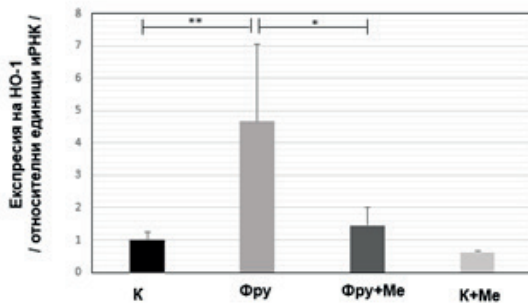
нали най-вероятно са резултат от неговото стабилизиране, медирано от механизми, които намаляват скоростта на неговото разграждане и са причина за променената му активност в различните експерименти. Прилагането на екзогенния мелатонин в нашия експеримент при плъховете на ВФД статистически значимо покачи експресията на Nrf-2 в аортната стена спрямо Фру групата, докато суплементирани с мелатонин плъхове на традиционна диета демонстрираха статистически значимо намаляване на експресията на Nrf-2 спрямо всички останали групи. Механизмите, чрез които мелатонинът променя експресията на Nrf-2 в състояние на оксидативен стрес и норма, са неизяснени. Нашите резултати показват, че мелатонинът вероятно, въздействайки върху Nrf-2 транскрипционна активност, води до повишаване на антиоксидантния капацитет на ендотела, тъй като повишените нива на Nrf-2 в съответните групи корелират с повишената експресия на SOD-1, HO-1 и NOS3.

Освен това активацията на пътя Nrf2-ARE е с доказано участие в широк спектър и от други клетъчни защитни функции, тъй като има противотуморни, антиоксидантни, антиапоптотични, противовъзпалителни и анти-атеросклеротични ефекти. Това предполага, че мелатонинът може да бъде потенциално полезен в цитозащитата при патологии, свързани с тези ефекти (Фиг. 30).

3.2. Промени в експресията на HO-1 в аортната стена при ВФД и ендотелопротективния ефект на мелатонин

3.2.1. Резултати

Резултатите от нашето изследване демонстрират покачени нива на генната експресия на HO-1 при плъхове, подложени на ВФД, спрямо контрола – със статистическа значимост от $p < 0.001$ за Фру групата. Суплементирани с мелатонин плъхове на ВФД демонстрират статистически значимо редуциране на нивата на експресията спрямо Фру групата – $*p < 0.05$. Животните, подложени на традиционна диета и суплементирани с мелатонин, имат по-ниска експресия спрямо всички останали експериментални групи (Фиг. 14).



Фиг. 14. Промени в експресията на NO-1 в аорта на изследваните групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (\pm SEM), ($n = 8$); К – контролна група; К + Ме – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру – група на фруктозна диета; Фру + Ме – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза; ** $p < 0.001$; * $p < 0.05$ – статистическа значимост между третираните групи и контролата, t – test

3.2.2. Обсъждане: Промени в експресията на NO-1 в аортната стена при ВФД и ендотелопротективния ефект на мелатонин

Според някои автори хроничното субтоксично образуване на активни свободни радикали може да доведе до предварителна подготовка на антиоксидантната защита за по-висока резистентност и адаптация към последващо окислително увреждане на тъканите. Това на практика се осъществява чрез активиране на цитозащитния Keap1-Nrf2 сигнален път, който регулира голям брой гени на ензими, повишаващи антиоксидантния капацитет на клетките като SOD, NO-1, глутатион-пероксидазата, глутатион редуктаза и др. (Schauer et al., 2003). По този начин индукцията на фактори за антиоксидантна защита повишава устойчивостта към последващи по-тежки за клетките атаки на АФК (Kensler et al., 2007). Според редица автори изследването на NO-1 дава оценка на адаптационните механизми на организма и възможности за терапевтично повлияване.

Характеристиката на индукцията на NO-1 при затлъстяване, като общ патофизиологичен механизъм за ендотелни увреждания, водещи

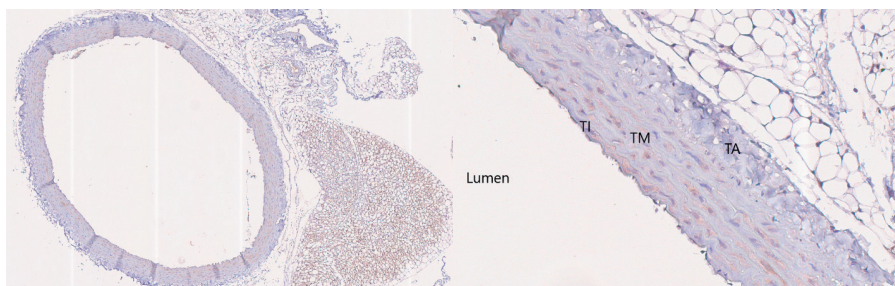
до компликации, не е изяснен и известен до момента. Нашите резултатите демонстрират, че генната експресия на HO-1 при ВФД се покачва – при плъховете, натоварени с фруктоза, се наблюдават статистически значимо по-високи нива на HO-1 експресията спрямо контролната група. Според редица автори HO-1 е контролиран от Nrf-2 ген и играе много важна роля в превенцията на ОС, възпаление и увреждания, асоциирани с АФК (Wang и Li, 2017). В нашето изследване прилагането на екзогенния мелатонин при плъхове на ВФД статистически значимо редуцира нивата на HO-1 експресия при животни, натоварени с фруктоза.

Връзката между експресията на HO-1 и растежния фактор VEGF се свързва с процесите на възпаление и ангиогенеза (Bussolati et al., 2006). HO-1 има доказан противовъзпалителен ефект върху съдовия ендотел. В нашия експеримент обаче ние допускаме, че HO-1 има по-скоро компенсаторен характер и повишените нива подкрепят мнението, че има капацитета на маркер на оксидативен стрес в съдовата стена (Chang et al., 2013). Понижените нива на HO-1, а високи на Flt-1 корелират с подобрене и възстановяване на ендотелната функция в групите, суплементирани с мелатонин. В групата на ВФД и затлъстяване се демонстрира съдово възпаление чрез повишение на маркерите NF-κB и TNF-α. Антиинфламаторните свойства на HO-1 не са достатъчни да протектират съдовата стена, тъй като бяха установени ендотелни увреждания и задебеляване на гладкомускулния слой. Прилагането на мелатонин очаквано понижи експресията на проинфламаторните маркери, а повиши експресията на Nrf-2. Докато понижаването на HO-1 експресията в тази група вероятно се дължи на друг, независим от цитозащитния Keap1-Nrf2 сигнален път на регулация. Ниската генна експресия на ензима води до и/или е израз на самоограничителен, патологичен процес, който действа по различен механизъм. Липсата на проучвания върху характеристиката на системната регулация на HO-1 и съответстващата биологична активност на ензима изисква необходимостта от допълнителни изследвания върху конкретните механизми на нарушената системна регулация на HO-1 при затлъстяване (Фиг. 30).

3.3. Промени в експресията на SOD-1 в ендотелни клетки на *a. abdominalis* при ВФД и ендотелопротективния ефект на мелатонин

3.3.1. Резултати

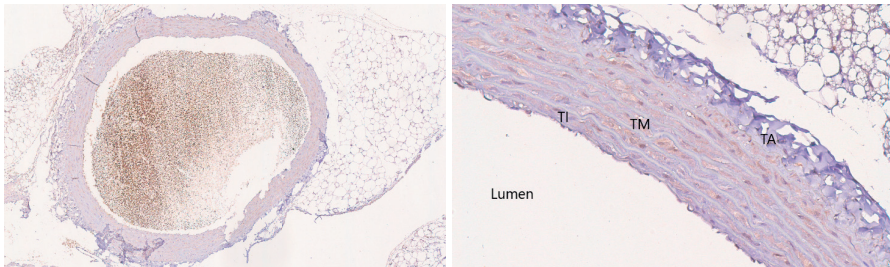
Резултатите ни демонстрират предимно много слаб до липсващ интензитет на експресията на SOD-1 в ендотелните клетки на *a. abdominalis* при плъхове от контролната група. Наблюдава се и позитивна цитоплазматична експресия във ВГМК в *t. media* и на места в стромата на периваскуларната мастна тъкан (Фиг. 15 и Фиг. 19).



Фиг. 15. Имунохистохимично изследване с анти SOD-1 при плъхове от контролна група. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope -v12.3.3.5048)

Легенда: TI – *t. intima*, TM – *t. media*, TA – *t. adventitia*

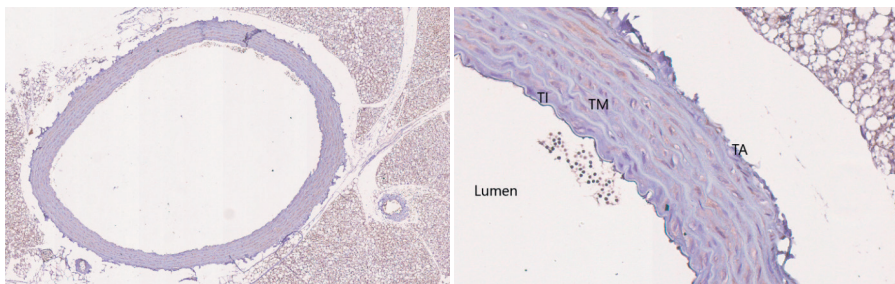
Експресията на SOD-1 в ендотелните клетки на *a. abdominalis* при плъхове от Фру групата е предимно с умерен характер. В *t. media* ВГМК демонстрират позитивна цитоплазматична експресия. Както и интензитетът на имунохистохимичната реакция в тези клетки и количество им надвишава това, наблюдавано при контролната група. Липсва експресия в *t. adventitia*. Докато периваскуларната мастна тъкан демонстрира по-дифузна спрямо контролната група позитивна експресия в стромалната си част (Фиг. 16 и Фиг. 19).



Фиг. 16. Имунохистохимично изследване с анти *SOD-1* при плъхове от Фру групата. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope -v12.3.3.5048)

Легенда: TI – t. intima, TM – t. media, TA – t. adventitia

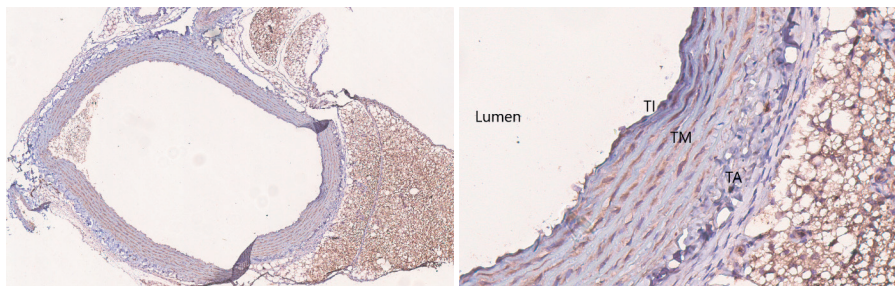
Експресията на *SOD-1* в ендотелните клетки на *a. abdominalis* при плъхове, подложени на ВФД, и суплементирани с мелатонин е предимно с характеристики на умерена до силна. В *t. media* ВГМК демонстрират позитивна цитоплазматична експресия. Като и интензитетът на имунохистохимичната реакция в тези клетки и количество им надвишава това, наблюдавано при контролната група. Периваскуларната мастна тъкан в тази експериментална група демонстрира дифузна, по-изразена спрямо контролите и Фру групата, експресия в стромата (Фиг.17 и Фиг. 19).



Фиг. 17. Имунохистохимично изследване с анти *SOD-1* при плъхове от група, подложена на ВФД, и суплементирани с мелатонин. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope-12.3.3.5048)

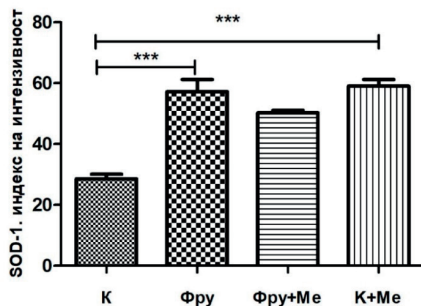
Легенда: TI – t. intima, TM – t. media, TA – t. adventitia

Експресията на SOD-1 в ендотелните клетки на *a. abdominalis* при плъхове от контролната група, суплементирана с мелатонин, е предимно с характеристики на интензивна. Същите характеристики на интензитета на експресията наблюдаваме и при ВГМК в *t. media* – експресията е цитоплазмена. Интересно е наблюдението, че интензитетът на имунохистохимичната реакция и количеството позитивни ВГМК надвишава това, наблюдавано както при контролната група, така и при Фру групата. Периваскуларната мастна тъкан също демонстрира по-интензивен и по-дифузен характер на експресията както спрямо контролната група, така и спрямо Фру групата (Фиг. 18 и Фиг. 19).



Фиг. 18. Имунохистохимично изследване с анти SOD-1 при плъхове от контролна група, суплементирани с мелатонин. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope-v12.3.3.5048)
Легенда: TI – t. intima, TM – t. media, TA – t. adventitia

По този начин резултатите от нашето изследване демонстрират статистически значима разлика между нивата на ендотелната експресия на SOD-1 в *a. abdominalis* при експерименталните групи. Експресията на SOD-1 е по-интензивна при плъховете, подложени на ВФД, спрямо контролната група, със статистическа значимост от $***p < 0.000$ за Фру групата. Суплементирани с мелатонин плъхове на ВФД демонстрират по-ниска експресия спрямо Фру групата (без статистическа значимост). Висок ИИР на SOD-1 спрямо контролите демонстрира и групата плъхове на традиционна диета и суплементирана с мелатонин – $***p < 0.0001$ (Фиг. 19).



Фиг. 19. Индекс на интензивност на реакцията (ИИР) на SOD-1 протеин в ендотела на абдоминалната аорта в експерименталните групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), (n = 8); К – контролна група; К + Me – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру – група на фруктозна диета; Фру+Me – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза; ***p < 0.0001 – статистическа значимост между третираните групи и контролата, t – test

3.3.2. Обсъждане: Промени в експресията на SOD-1 в ендотелни клетки на а. abdominalis при ВФД и ендотелопротективния ефект на мелатонин

Антиоксидантните ензими формират първата линия на защита срещу свободните радикали в условията на оксидативен стрес, като ги метаболизират до безвредни странични продукти. Тяхната регулация зависи главно от оксиредукционния статус на клетката, като се има предвид, че оксидантите са техните основни модулатори. Най-разпространеният в тъканите активен кислороден радикал, който се образува в хода на клетъчния метаболизъм, е супероксидният радикал ($O_2 - \cdot$). Повишената продукция на кислородни радикали в ендотела обаче е изключително фатално, тъй като супероксидите реагират с азотен оксид ($\cdot NO$) до образуване на пероксинитрили, които са силно увреждащи и водят до съдова дисфункция при атеросклероза. Излишното генериране на АФК е демонстрирано при атеросклероза и е доказано, че образуването на пероксинитрит се появява в атеросклеротични човешки съдове (Beckman et al., 1994).

Първата ензимна реакция в пътя на редукция на супероксида е дисмутацията на две молекули O_2^- , когато те се превръщат във водороден прекис и молекулен кислород. Ензимът в тази първа стъпка на елиминиране на супероксида е една от двете изоформи на супероксид дисмутаза – CuZnSOD (SOD-1), която основно присъства в цитозола.

SOD-1 е доминираща в съдовете изоформа на SOD (Faraci et al., 2004). Според редица изследвания недостигът на този ензим води до покачването на нивата на пероксинитрит и васкуларен супероксид, повишава миогенния тонус на съда и нарушения на ендотело-зависима вазодилатация както в големите артерии, така и микросъдове (Faraci et al., 2004). Също така, нарушения в експресията на SOD-1 може да иницират патологично ремоделиране на съдовата стена. В подкрепа на това твърдение са изследвания на Vaumbach et al. (2006), които демонстрират хипертрофични промени в стената на церебралните артерии при мишки с SOD-1 дефицит (Vaumbach et al., 2006).

Една от задачите, които си поставихме в изследването на ендотелната дисфункция при хронично фруктозно хранене на плъхове, е да определим ендотелната експресия на свързаната с оксидативния стрес SOD-1 и връзката ѝ с морфологични съдови промени и ендотел-зависимата релаксация, както и нивата на експресия на Nrf-2, HO-1, NOS3, Flt-1 и провъзпалителния транскрипционен нуклеарен фактор NF- κ B.

Резултатите от полуколичествения анализ на имунохимичната експресия на SOD-1 от ендотелни клетки на *a. abdominalis* демонстрират статистически значимо покачване на експресията във Фру групата спрямо контролите. Установихме, че експресията на SOD-1 е 2 пъти по-висока в цитопламата на ендотелните клетки, включително и в подлежащите слоеве от съдови гладкомускулни клетки и периваскуларна мастна тъкан. Високите нива на експресия на SOD-1 корелират положително с нивата на експресия на Nrf-2, HO-1 и ниски нива на NOS3, което е недвусмислен показател за развитието на оксидативен стрес в съдовата стена. Паралелно с това се наблюдават повишена експресия на NF- κ B, нива на серумен TNF- α и данни за патологични промени в аортната стена, което е демонстрация за това, че хроничното фруктозно натоварване индуцира и нискостепенно хронично възпаление.

Повишената експресия на SOD-1 в съдовата стена на плъховете на ВФД вероятно е компенсаторна реакция срещу натрупаните суперок-

сидни радикали в ендотела при нарушен окислително-редукционен баланс. Паралелно с това, понижените нива на експресия на NOS3, които установихме в тази група, подкрепят тезата, че свободните радикали инхибират активността на този ензим и съответно продукцията на NO, а намалената продукция на NO е водещ патогенетичен фактор за нарушената вазомоторна функция на ендотела.

Доказано е, че дисбалансът в продукцията на свободните радикали и неутрализирането им води до ремоделиране на съдовата стена. В групата на ВФД установихме значимо задебеляване на коремната аорта и намален вътресъдов лумен, което е още едно доказателство за водещата роля на ОС във формирането на ЕД при фруктозно натоваване.

В нашия експеримент можем да разгледаме повишената активност на SOD-1 в групите на ВФД като потенциален маркер за изследване на ЕД, защото лечението с мелатонин намалява експресията на ензима.

Освен свойствата му като модулатор на циркадния ритъм за мелатонина бяха разкрити и няколко други действия. Неговата директна активност за улавяне на свободните радикали (Tan et al., 1993) и регулирането на генната транскрипция на антиоксидантни ензими. В нашето изследване суплементираните с мелатонин плъхове на ВФД демонстрираха по-висока експресия на SOD-1 спрямо контролите и по-ниска спрямо Фру групата (без статистическа значимост). Наблюдавахме статистически значимо покачване на експресията в плъховете на традиционна диета, суплементирани с мелатонин, спрямо контролата.

В своето проучване Ozturk G et al. (2000), установяват, че активността на чернодробната супероксиддисмутаза (SOD-1) се покачва при здрави плъхове, лекувани с мелатонин в продължение на 7 дни (Ozturk et al., 2000). В друг модел е установено, че приложението на мелатонин предотвратява увреждането на клетките и повишава нивата на иРНК за двата типа SOD- MnSOD и CuZnSOD (Antolin et al., 1996). Доказано е в редица изследвания, че мелатонинът инхибира NF- κ B активиране (Gilad et al., 1998) и регулира активирането или потискането на няколко транскрипционни фактора, свързани с поддържането на клетъчния окси-редукционен баланс (Urata et al. 1999), включително двете форми на SOD и GSH-Px (Rodrigues et al., 2004). По този начин нашите резултати демонстрират, че мелатонинът, покачвайки експресията на SOD-1 при плъхове, натовавани с ВФД, предпазва не само от функционални-

те промени в ендотела, в частност ендотело-зависима вазодилатация, но и редуцира ремоделирането на съдовата стена, индуцирано от ВФД. В подкрепа на това са резултатите, получени от морфологичното и морфометрично изследване, демонстриращи положителни ефекти на мелатонина върху архитектурата и функционалния капацитет (индекс на Керноган) на абдоминалната аорта при плъхове на ВФД (Фиг. 5 и Фиг. 30).

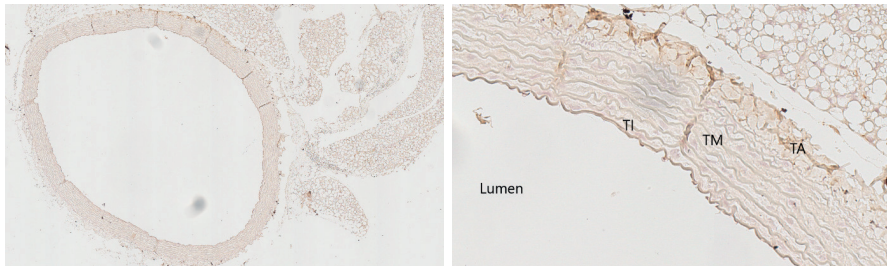
Една от основните роли на антиоксидантите, прилагани за протекция срещу ОС, е или да предотвратят продукцията на реактивни свободни радикали, или да засилят активността на ендогенните антиоксидантни защитни механизми. В този смисъл нашите изследвания демонстрират, че мелатонинът протектира съдовия ендотел и по двата механизма. Понижените нива на експресия на HO-1 в групите, суплементирани с мелатонин, демонстрират редуцирани нива на реактивни свободни радикали, а повишената експресия на SOD-1 в тези групи показва повишена ендогенна защита.

В заключение може да се обобщи, че суплементацията с мелатонин упражнява цитопротективен ефект върху съдовата стена чрез повишаване експресията на антиоксидантните ензими SOD-1, HO-1, транскрипционния фактор Nrf-2 и NOS3 и инхибиране на експресията на NF-kB, както и понижаване на нивата на серумния TNF- α .

3.4. Промени в експресията на NOS3 в ендотелните клетки на *a. abdominalis* при ВФД и ендотелопротективния ефект на мелатонин

3.4.1. Резултати

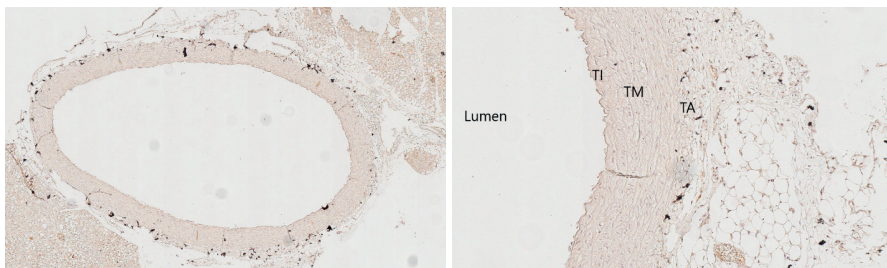
Резултатите от нашето изследване демонстрират предимно умерен интензитет на експресията на NOS3 в ендотелните клетки на *a. abdominalis* при плъховете от контролната група. Експресията в *t. media*, *t. adventitia* липсва. Експресията на NOS3 в стромата на периваскуларна мастна тъкан е дифузна и със слаб интензитет (Фиг. 20 и Фиг. 24).



Фиг. 20. Имунохистохимично изследване с анти *NOS3* при плъхове от контролна група. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope -v12.3.3.5048)

Легенда: *TI* – *t. intima*, *TM* – *t. media*, *TA* – *t. adventitia*

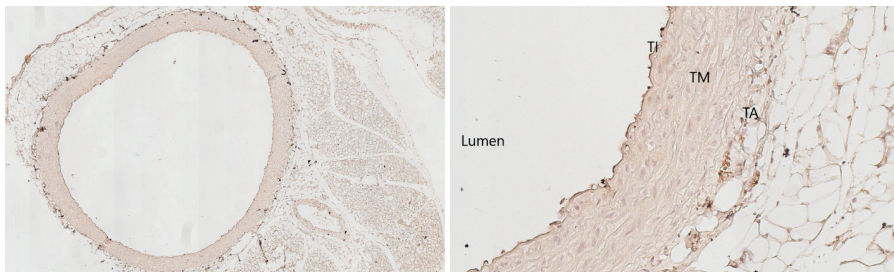
При плъховете от групата, подложена на ВФД, се наблюдава предимно липсващ до много слаб интензитет на експресията на *NOS3* в ендотелните клетки. В *t. media* и *t. adventitia* експресията липсва. Периваскуларната мастна тъкан, в стромалната и част, демонстрира дифузна експресия на *NOS3* с характеристики на слаба до умерена (Фиг. 21 и Фиг. 24).



Фиг. 21. Имунохистохимично изследване с анти *NOS3* при плъхове от групата, подложена на ВФД. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope -v12.3.3.5048)

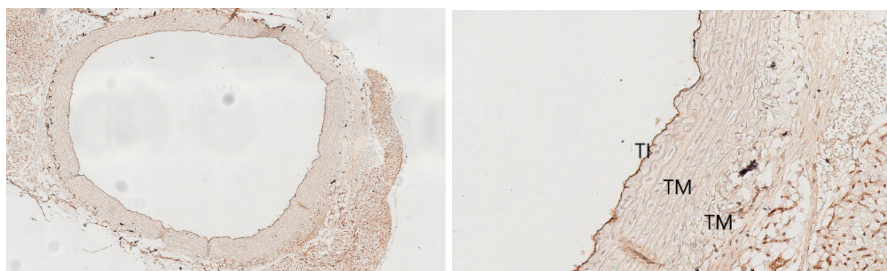
Легенда: *TI* – *t. intima*, *TM* – *t. media*, *TA* – *t. adventitia*

При плъховете на ВФД и суплементирани с мелатонин нашите резултати демонстрират предимно умерен интензитет на експресията на *NOS3* в ендотелните клетки на *a. abdominalis*. В *t. media* и *t. adventitia* позитивна експресия липсва. В стромата на периваскуларната мастна тъкан се наблюдава дифузна експресия с умерен интензитет на реакцията (Фиг. 22 и Фиг. 24).



Фиг. 22. Имунохистохимично изследване с анти NOS3 при плъхове от групата, подложена на ВФД, и суплементирани с мелатонин. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope -v12.3.3.5048)
 Легенда: TI – t. intima, TM – t. media, TA – t. adventitia

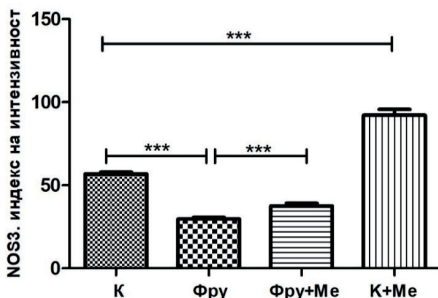
А плъховете на традиционна диета и суплементирани с мелатонин, демонстрират предимно силен интензитет на експресията на NOS3 в ендотелните клетки на абдоминалната аорта. Експресията в *t. media* и *t. adventitia* липсва. Периваскуларната мастна тъкан в стромалната си част демонстрира дифузна и силна по интензитет експресия на NOS3 (Фиг. 23 и Фиг. 24).



Фиг. 23. Имунохистохимично изследване с анти NOS3 при плъхове от групата, подложена на традиционна диета и суплементирани с мелатонин. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope-v12.3.3.5048)
 Легенда: TI – t. intima, TM – t. media, TA – t. adventitia

По този начин резултатите от нашето изследване демонстрират статистически значими разлики между нивата на ендотелната експресия на NOS3 в *a. abdominalis* при експерименталните групи. ИИР на

NOS3 протеин в групата, подложена на ВФД, е по-ниска в сравнение с контролната група със статистическа значимост от $***p < 0.0001$ за Фру групата. Суплементираната с мелатонин група на ВФД демонстрира по-висока експресия спрямо Фру групата – $***p < 0.0001$. А плъховете на традиционна диета и суплементирани с мелатонин показват статистически значимо по-високи нива на експресията спрямо контролите – $***p < 0.0001$ (Фиг. 24).



Фиг. 24. Индекс на интензивност на реакцията (ИИР) на NOS3 протеин в ендотела на абдоминалната аорта в експерименталните групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($n = 8$); К – контролна група; К + Ме – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру – група на фруктозна диета; Фру + Ме – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза; $***p < 0.0001$ – статистическа значимост между третираните групи и контролата, t – test

3.4.2. Обсъждане: Промени в експресията на NOS3 в ендотелните клетки на a. abdominalis при ВФД и ендотелопротективния ефект на мелатонин

Нарушаването на ендотелната функция се счита за ключово събитие в развитието и прогресията на атеросклерозата. Ендотелната синтеза на азотен оксид (NOS3, eNOS) е централен регулатор на клетъчната функция, който е важен за поддържане на ендотелната хомеостаза. eNOS е конститутивно експресиран ензим, който модулира повечето от функциите на ендотела. Намалената експресия на eNOS ензима и последващото намалено производство на NO водят до повишена чувствителност и риск от развитие на есенциална хипертония (Ahmed et al.,

2020), прееклампися, диабетна нефропатия (Eid et al., 2021), ретинопатия (Ninchoji et al., 2021) и други съдови патологии.

В допълнение, тъй като количеството NO, генерирано от съдовите ендотелни клетки, играе критична роля в регулирането и поддържането на съдовия тонус, миграцията, производството, пролиферацията и узряването на клетките, адхезията на левкоцитите и агрегацията на тромбоцитите може да се подразбира, че eNOS е ключова молекула за правилно функционираща и здрава сърдечносъдова система.

Храненето с фруктоза причинява окислително увреждане в различни тъкани и намалена експресия на eNOS. Кислородните радикали ограничават ефектите на NO върху съдовете, като го елиминират или потискат ензимното и неензимното му производство (Alderton et al., 1998). От друга страна, NO реагира със супероксидни радикали, като ги обезврежда, но това води до образуване на пероксинитрил с мощно окислително действие върху ендотела и нарушения в съдовата релаксация. Според Vanhoute и съавт.(2017) намалена бионаличност на NO поради редуцираната активност на eNOS и/или NO разграждане води до нарушена ендотело-зависима вазодилатация, тенденция към тромбообразуване и ремоделиране на съдовата стена (Vanhoute et al., 2017). Дефицитът на NO блокира действието на инсулина, тъй като инсулинът стимулира усвояването на глюкозата в скелетните мускули, увеличавайки притока на кръв към тях чрез NO-зависим път и по този механизъм прогнозира развитието на 3Д тип 2 (Masuo et al., 2003).

В изследванията си Pektas et al., (2015) демонстрират корелация между нарушена ендотело-зависима вазодилатация и намалена бионаличност на NO в аортите на фруктозо-натоварените плъхове (Pektas et al., 2015). Счита се, че повишените серумни нива на пикочната киселина са потенциален механизъм, свързващ фруктозната консумация и съдовите увреждания с висок риск от сърдечносъдови заболявания и захарен диабет (Lim et al., 2010). Фруктозата за разлика от другите захари единствена увеличава серумните нива на пикочна киселина. Метаболизирането ѝ в черния дроб и консумация на АТФ води до бързо изчерпване на втреклетъчния фосфат и образуване на пикочна киселина с отделянето на H_2O_2 (Hallfrisch, 1990). Фруктозо-индуцираната хиперурикемия предизвиква ендотелна дисфункция, намалявайки ендотелния NO, блокира ендотелната клетъчна пролиферация и миграция, повишава С-реактивния протеин и свръхпроизводство на триглицериди

(Kanellis et al., 2003). В предишни наши изследвания е установено, че прилагането на алопуринол (ксантиноксидазен инхибитор) намалява нивата на малондиалдехида и TNF- α , а повишава нивата на серумния глутатион (Bratоеva et al., 2015). Освен това хиперурикемията увеличава артериалното кръвно налягане, редуцирайки NO, което води до трайна системна и интраваскуларна вазоконстрикция и съдови увреждания (Nakagawa et al., 2006). Тези доказателства предполагат причинно-следствената роля на редуцираните от пикочната киселина нива на NO в патогенезата на фруктозо-индуцираните оксидативен стрес, ендотелни увреждания и метаболитни нарушения при затлъстяване в нашите изследвания.

От друга страна е установено, че фруктозната консумация намалява продукцията NO директно чрез инхибиране на eNOS. Miatelo et al. (2002) установяват, че експресията на eNOS в мезентериални съдове на плъхове на фруктозна диета намалява с около 30% (Miatelo et al., 2002). В допълнение, ВФД, индуцирайки ОС в съдовете, също негативно повлиява бионаличността на NO, а покачените нива на пероксинитрит инактивира eNOS (Bassossy et al., 2016; Li et al., 2016).

Анализът в настоящото проучване на имунохимичната експресия на NOS3 в абдоминална аорта демонстрира статистически значимо намаляване на експресията на NOS3 в ендотелите клетки на плъховете, натоварени с фруктоза, спрямо контролите. От друга страна, в тази група установихме повишени нива на експресия на SOD-1 и HO-1, което е категоричен признак за развитието на оксидативен стрес в ендотела. Морфометричният анализ показва увеличена дебелина на аортната стена и стеснен вътрешен диаметър при плъховете на ВФД спрямо контролата, както и статистически значимо покачване на индекса на Керноганс.

Взети заедно, резултатите демонстрират, че фруктозното хранене на плъховете в нашето изследване индуцира ОС, намалява синтеза на NO, което вероятно е свързано с ранните промени в стената на абдоминалната аорта – ремоделиране и влошени функционални характеристики, които са важни механизми за развитие на ЕД.

Суплементирането с мелатонин статистически значимо повиши експресията на NOS3 както при животни, натоварени с фруктоза, така и при здрави контроли, което се потвърждава и от други автори.

Мелатонинът и неговите метаболити са мощни физиологични антиоксиданти и улавящи свободните радикали (Siu et. al, 2006). Мела-

тонинът упражнява цитопротективни ефекти чрез повишаване производството на NO и активността на супероксид дисмутазата в условия на оксидативен стрес. Активността на SOD-1 в мозъчни хомогенати на фетус се повишава значително между 1 и 2 часа след прилагане на мелатонин в кръвообращението на майката (Okatani et al., 2000). Независимо мелатонинът може да поддържа фосфорилирането на NOS3 чрез активността на протеин-киназа C (Akt) (Sereso et al., 2019). Тези и множество други изследвания предполагат, че мелатонинът предпазва от развитието на ЕД и модулирането на ендотело-зависима вазодилатация чрез покаването експресията на NOS3 и бионаличността на NO (Hung et al., 2013; Muhlbauer, 2009).

Морфометричните показатели в групите, суплементирани с мелатонин, показват статистически значима редукция на дебелината на аортната стена, намален размер на вътрешния диаметър и запазени функционални характеристики на съда спрямо хранените само с фруктоза. Лечението с мелатонин намалява тези параметри до нива, които не се различават значително от контролата и в контролната група, суплементирана само с мелатонин. Това демонстрира ендотелопротективния ефект на мелатонин на фона ВФД. Резултатите от настоящото проучване предполагат, че лечението с мелатонин запазва ендотел-зависимата релаксация в аортите на плъховете, хранени с фруктоза, основно чрез повишена активност на NOS3 и бионаличност на NO.

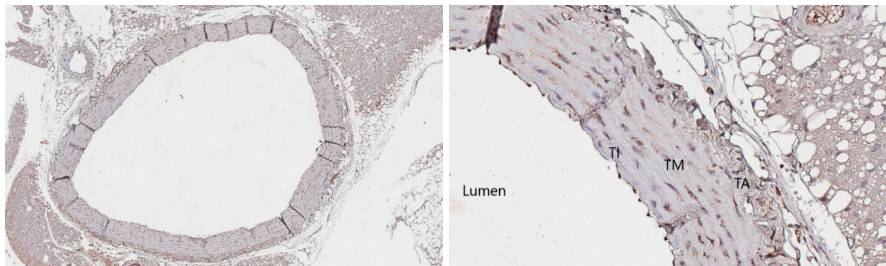
В заключение може да се каже, че намалената експресия eNOS, индуцирана от ВФД, се предотвратява ефективно чрез лечение с екзогенно приложен мелатонин, което допринася за протекцията на ендотела и гладкомускулните клетки в изследваните аорти на затлъстели плъхове (Фиг. 30).

3.5. Промени в експресията на Flt-1 в ендотелните клетки на *a. abdominalis* при ВФД и ендотелопротективния ефект на мелатонин

3.5.1. Резултати

Нашите резултати показват, че експресията на Flt-1 в ендотелните клетки на *a. abdominalis* при плъхове от контролната група е предимно с характеристики на интензивна. Някои ВГМК в *t. media* демонстрират позитивна цитоплазмена експресия с умерен интензитет. Структурите

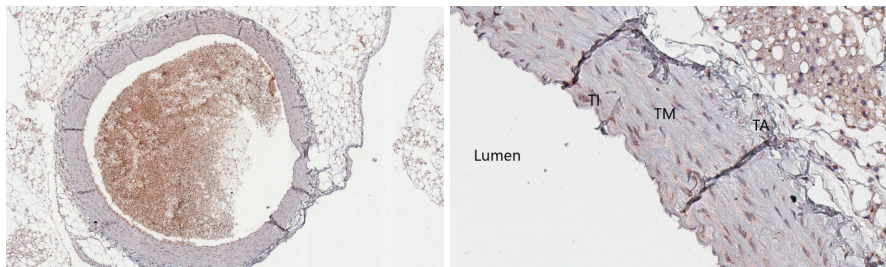
на *t. adventitia* също така показват позитивна експресия. Периваскуларната мастна тъкан – с фокуси на умерено интензивна експресия в стромата (Фиг. 25 и Фиг. 29).



Фиг. 25. Иммунохистохимично изследване с анти *Flt-1* при плъхове от контролна група. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope -v12.3.3.5048)

Легенда: TI – *t. intima*, TM – *t. media*, TA – *t. adventitia*

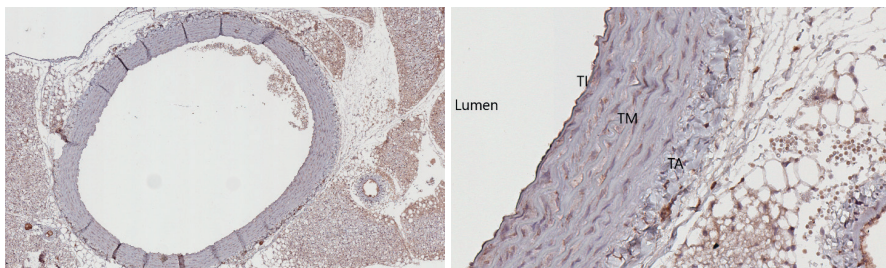
Плъховете от Фру групата демонстрират предимно липсващ до много слаб интензитет на експресията на *Flt-1* в ендотелните клетки на *a. abdominalis*. Докато някои ВГМК в *t. media* демонстрират умерена цитоплазматична експресия. Структурите на *t. adventitia* също така със фокуси на позитивна експресия със слаб характер на интензитета. В стромата на периваскуларна мастна тъкан наблюдаваме дифузна, с умерен характер на интензитета експресия на *Flt-1* (Фиг. 26 и Фиг. 29).



Фиг. 26. Иммунохистохимично изследване с анти *Flt-1* при плъхове от Фру групата. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope -v12.3.3.5048)

Легенда: TI – *t. intima*, TM – *t. media*, TA – *t. adventitia*

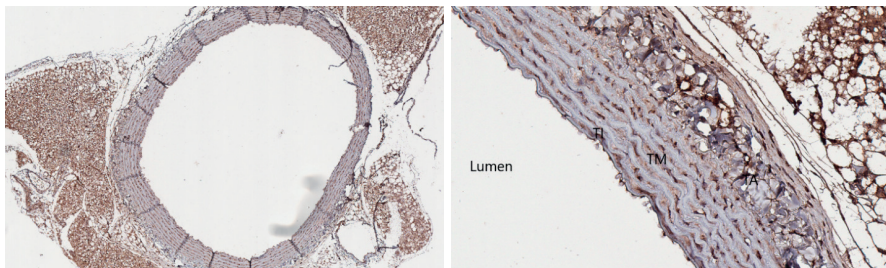
Резултатите ни също така демонстрират умерена до силна експресия на Flt-1 в ендотелните клетки на *a. abdominalis* при плъхове на ВФД и суплементирани с мелатонин. В *t. media* се наблюдават фокуси с ВГМК, демонстриращи позитивна цитоплазмена експресия със слаб до умерен характер на интензитета. Периваскуларната мастна тъкан в стромалната си част демонстрира дифузна, с характер на умерена до силна експресия (Фиг. 27 и Фиг. 29).



Фиг. 27. Имунохистохимично изследване с анти Flt-1 при плъхове от група, подложена на ВФД, и суплементирани с мелатонин. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope -v12.3.3.5048)

Легенда: TI – t. intima, TM – t. media, TA – t. adventitia

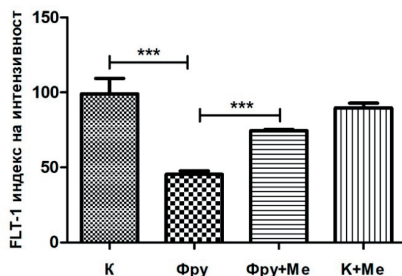
Плъхове на традиционна диета и суплементирани с мелатонин демонстрират силна експресия на Flt-1 в ендотелните клетки на *a. abdominalis*. ВГМК в *t. media* също така демонстрират позитивна цитоплазмена експресия. Като количеството на позитивни ВГМК надвишава това във Фру групата. Структурите на *t. adventitia* демонстрират фокуси на позитивна експресия с умерен до силен характер на интензитета. Периваскуларната мастна тъкан в стромалната си част демонстрира дифузна, интензивна по характер експресия (Фиг. 28 и Фиг. 29).



Фиг. 28. Имунохистохимично изследване с анти *Flt-1* при плъхове от групата, подложена на традиционна диета и суплементирани с мелатонин. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image score-v12.3.3.5048)

Легенда: TI – *t. intima*, TM – *t. media*, TA – *t. adventitia*

По този начин резултатите ни демонстрират показват значими разлики в ендотелната експресия на *Flt-1* в *a. abdominalis* при експерименталните групи. Фру групата демонстрира статистически значимо редуциране на експресията спрямо контролната група – $***p < 0.0001$. А суплементацията с мелатонин статистически значимо покачва нивата на експресията спрямо Фру групата – статистически значимо за Фру+Ме групата (Фиг. 29).



Фиг. 29. Индекс на интензивност на реакцията (ИИР) на *Flt-1* протеин в ендотела на абдоминалната аорта в експерименталните групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($n = 8$); К – контролна група; К + Ме – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру – група на фруктозна диета; Фру + Ме – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза; $***p < 0.0001$ – статистическа значимост между третираните групи и контролата, *t* – test

3.5.2. Обсъждане: Промени в експресията на Flt-1 в ендотелните клетки на *a. abdominalis* при ВФД и ендотелопротектовния ефект на мелатонин

VEGF-A е мултифункционален цитокин, есенциален за нормална хомеостаза на васкуларната стена. Ефектите на VEGF-A могат да бъдат както положителни, така и негативни за съда. Хиперекспресията на VEGF-A, например, води до повишен пермеабилитет на съдовете, съответно може да доведе до ендотелна дисфункция и ремоделиране на съдовата стена (Seki et al., 2018; Ahmad et al., 2011). Хипоекспресията и инхибиране на VEGF-A е също свързана с патологии, асоциирани с ендотелна дисфункция при преекламписия (Ahmad et al., 2011; Langdton-Cox et al., 2021). Това е свързано с продукцията на естествения инхибитор на VEGF-A –разтворимата форма на рецептора sFlt-1 (Ahmad et al., 2011; Langdton-Cox et al., 2021). sFlt-1 се образува от алтернативно съединение на *fms-like* тирозин киназа (Flt-1) гена и се свързва с всички изоформи на VEGF-A (Ahmad et al., 2011). Това показва, че поддържането на нормална хомеостаза в съда и циркулиращи фактори, управляващи ендотелната функция, е необходимо, за да може VEGF да демонстрира физиологичните си ефекти.

Според редица автори (Langdton-Cox et al., 2021; Matsubara et al., 2015) sFlt-1 като естествен антагонист/ инхибитор на VEGF-A (Ahmad et al., 2011) има антипролиферативно, антиинфламаторно действие. Показани нива на sFlt-1 се наблюдават при ендотелна дисфункция, свързана с преекламписия при жени, като нивото на sFlt-1 корелира с тежестта на заболяването. В други експерименти върху плъхове се демонстрира, че инхибирането/блокирането на sFlt-1 позитивно влияе върху съдовата стена (Langdton-Cox et al., 2021). Смята се, че sFlt-1 води до ендотелна дисфункция чрез антагонизирането на VEGF-A, който е есенциален за нормалното състояние на васкулатурата чрез поддържане на интегритета и ендотело-зависима вазодилатация чрез активиране на NO (Langdton-Cox et al., 2021; Matsubara et al., 2015; Neves et al., 2017). В условията на високи нива на циркулиращ sFlt-1 последният компететивно се свързва с VEGF-A и го инактивира. Това води до загуба на интегритета на васкуларната стена, намалена бионаличност на NO и съответно развитие на ендотелна дисфункция от вазомоторен тип и ремоделиране на съда (Langdton-Cox et al., 2021). Нашите резултати от имунохисто-

химичното изследване потвърждават тези твърдения. Натоварените с фруктоза плъхове демонстрират статистически значимо по-ниски нива на eNOS експресия в абдоминална аорта спрямо контролата. А суплементирането с мелатонон покачва тази експресия (със статистическа значимост).

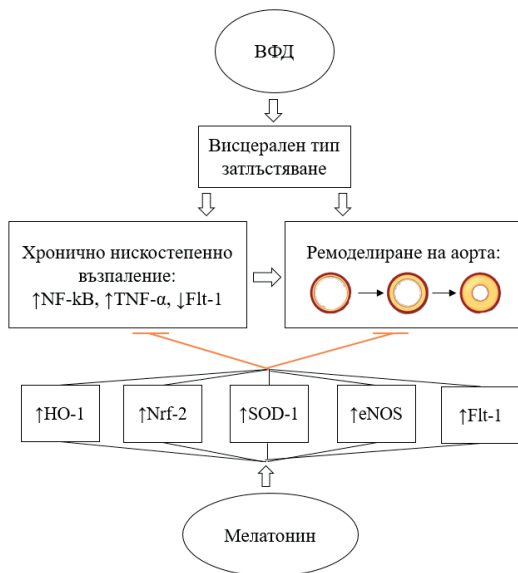
Според Bridges et al. нарушеният баланс между про- и антиангиогенни фактори като понижени нива на VEGF и покачени нива на sFlt-1 води до оксидативен стрес и допринася за развитие на ендотелна дисфункция (Bridges et al., 2009). ВФД и по-скоро асоциираните с нея исхемични/хипоксични промени засилват експресията на sFlt-1 и по този начин повлиява експресията на VEGF-а мембранныя рецептор Flt-1 в ендотелните клетки, като я инхибират (Korybalska, 2018).

Според нашето изследване суплементацията с мелатонин значимо покачва нивата на експресията на ендотелен Flt-1 в абдоминална аорта спрямо Фру групата – статистически значимо за Фру+Ме групата. Това корелира с резултатите на Kandemir et al.(2018), според които изследването на генната експресия на рецептора върху мишки демонстрира, че екзогенно приложеният мелатонинът покачва експресията на Flt-1 в ендотелните клетки на яйчник (Kandemir et al., 2018). Нашите резултати демонстрират, че мелатонина покачва експресията на Flt-1, инхибирана от ВФД до стойностите на контролата. В контраст, в *in vitro* изследванията на Gonzalez-Gonzalez et al.(2020) обаче прилагането на мелатонин намалява експресията на Flt-1 в HUVECs (Human umbilical vein endothelial cells) (Gonzalez-Gonzalez et al., 2020). И тук следва да се отбележи, че експресията на Flt-1 може да се различава във венозна съдова стена в *in vitro* условията от тези в артериален съд в *in vivo* експериментална постановка.

Сравнявайки нивата на експресия на Flt-1 и морфологичните промени в стената на коремната аорта във всички групи може да се направи заключението, че повишената активност на рецептора протектира срещу индуцираните от ВФД съдови увреждания. В групата на ВФД нивата на експресия на Flt-1 са статистически значимо най-ниски от останалите групи. Ниските експресионни нива съвпадат със задебеляване на съдовата стена, измерена чрез индекса на Керниган, което е показателно за ендотелно увреждане и съдово ремоделиране. Паралелно с това, високите нива на експресия на SOD-1, HO-1, Nrf-2 и NF-kb в ендотела на

аортите от тази група и потиснатата експресия на eNOS са индикатор за оксидативните увреждания и възпалителен отговор, което демонстрира обща патогенетична връзка за ранните ендотелни увреждания и съдово remodelиране при фруктозоиндуцираното затлъстяване.

В заключение може да се обобщи, че ВФД като основен източник на реактивни свободни радикали води до ендотелно увреждане чрез инхибиране на активността на мембранныя рецептор Flt-1. По този начин лишава ендотелните клетки от протекцията на VEGF срещу оксидативния стрес и възпаление. Вероятно фруктозното натоварване повишава експресията на sFlt-1 – естествения антагонист на VEGF-A в ендотелните клетки. Това води до инхибиране и на VEGF-зависима експресия на мембранно-асоциирания му рецептор Flt-1. Нашите резултати корелират с тази хипотеза – експерименталните групи, натоварени с фруктоза, имат по-ниски нива на Flt-1 експресията спрямо контролата (със статистическа значимост на Фру групата). От друга страна, мелатонинът блокира/инхибира sFlt-1, следователно премахва инхибиращия му ефект върху VEGF. Вероятно суплементация с мелатонин връща нивата на VEGF и Flt-1 експресията в рамките на норма. Нашите резултати потвърждават тази хипотезата, че експерименталните групи, суплементирани с мелатонин, демонстрират покачени нива на Flt-1 спрямо Фру групата. Експресията на Flt-1 в тези групи доближава стойностите на контролата. Особено демонстративно е това при плъховете на традиционна храна и суплементирани с мелатонин, което потвърждава ролята на мелатонина като антиоксидант и антиинфламаторно средство и същевременно патогенетичната връзка между оксидативния стрес, инфламаторен отговор и експресията на мембранныя рецептор Flt-1 за протекцията на ендотела при затлъстяване (Фиг. 30).



Фиг. 30. Протективно действие на мелатонин при фруктозо-индуцирано хронично нискостепенно възпаление, оксидативен стрес и патологично ремоделиране на аорта

Легенда: ВФД – високофруктозна диета; NF-kB – ядрен фактор каппа Би; TNF-α – тумор-некротизиращ-фактор-алфа; Flt-1 – рецептор за съдовия ендотелен растежен фактор; HO-1 – хем-оксигеназа 1; Nrf-2 – нуклеарен еритроиден фактор-2; SOD-1 – супероксид дисмутаза-1; eNOS – ендотелен азотен оксид синтаза

4. Влиянието на мелатонин върху фруктозоиндуцираните морфологични промени в аортата

4.1. Промени в морфометричните показатели на *a. abdominalis* при ВФД и протектиращ ефект на екзогенния мелатонин

4.1.1. Резултати

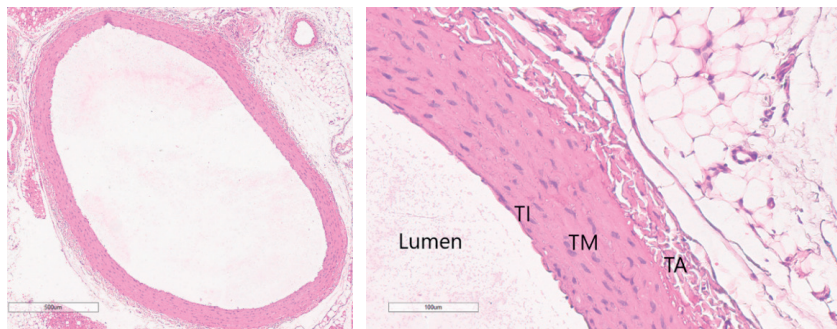
• Резултати от макроскопското изследване на аорта

При внимателния оглед на всяка отпрепарирана по време на аутопсията аорта бяха забелязани видими разлики в количеството на периваскуларна мастна тъкан в абдоминалната ѝ част. По точно, група плъхове, подложени на ВФД, демонстрираха по-голямо количество на периваскуларна мастна тъкан в сравнение с тези от контролата. Супле-

ментирани с мелатонин видимо редуцира количеството на периваскуларна мастна тъкан при плъхове, натоварени с фруктоза. Най-малко количество периваскуларна мастна тъкан демонстрират здрави контроли, суплементирани с мелатонин.

• Резултати от рутинно хистологично и имунохистохимично изследване на контролната група плъхове

Резултатите, получени от рутинен хистологичен анализ на *a. abdominalis* на плъховете от контролната група, демонстрират запазена архитектура на съдовата стена (Фиг. 31).



Фиг. 31. Абдоминална аорта на плъх от контролната група.

Оцветяване с хематоксилин и еозин. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$

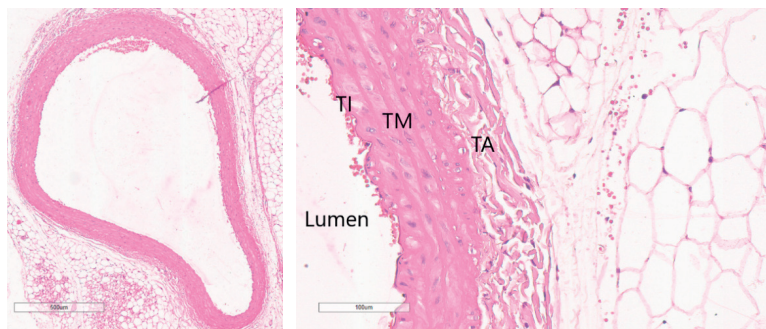
(Aperio Image scope -v12.3.3.5048)

Легенда: TI – t. intima, TM – t. media, TA – t. adventitia

От друга страна, нашите резултати демонстрират промени в архитектурата на стената на *a. abdominalis* при плъхове от Фру групата. В *t. intima* се наблюдава ирегуларност на ендотелния монослой, на места – вакуоларизация на ендотелиоцити и субендотелно набъбване. В *t. media* също наблюдаваме патоморфологични промени. В частност, пролиферация на ВГМК и наличие на перинуклеарно хало в тези клетки, фокуси с фрагментиране и изглаждане на еластични ламели. Промените в *t. adventitia* се характеризират с хиперемия на *v. vasorum* и периваскуларен оток (Фиг. 32).

Описаните промени в *t. intima* – *t. media* обуславят и морфометричните промени на съдовата стена, представени в Таблица 8 – задебеле-

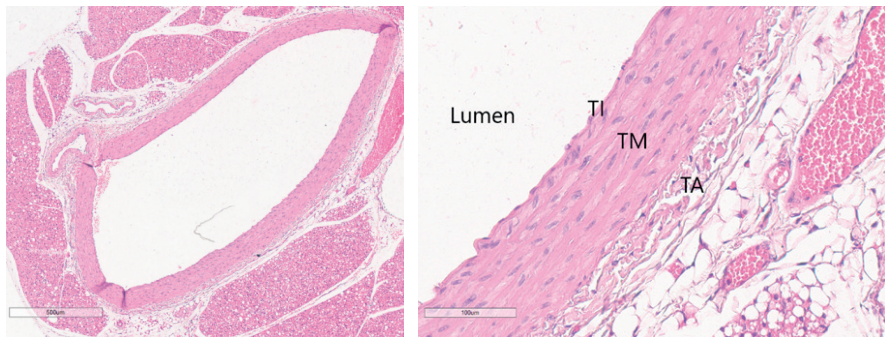
ляване на съдовата стена и съответно промяна в размера на вътрешния диаметър.



Фиг. 32. Абдоминална аорта на плъх от група, подложена на ВФД. Оцветяване с хематоксилин и еозин. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope -v12.3.3.5048)

Легенда: TI – t. intima, TM – t. media, TA – t. adventitia

Докато резултатите, получени от рутинен хистологичен анализ на *a. abdominalis* на плъховете, подложени на ВФД, и суплементирани с мелатонин, демонстрират по-леко изразени патоморфологични промени в съдовата стена спрямо тези при Фру групата, в *t. intima* все още се наблюдава ирегуларност на ендотелния монослой, но фокусите на вакуоларизация на ендотелиоцити и субендотелно набъбване са по-редки. В *t. media* пролиферация на ВГМК и наличие на перинуклеарно хало в тези клетки все още се наблюдава и изглаждане на еластични ламели, но почти липсва фрагментиране на последните. Промените в *t. adventitia*, в частност хиперемия на *v. vasorum* и периваскуларния оток – присъстват. Прави впечатление и наличието на по-големи количества кафява периваскуларна мастна тъкан спрямо Фру групата и контролата. Също така правят впечатление промените в дебелината на *t. intima – t. media* комплекса и размера на вътрешния диаметър – те са видимо променени спрямо Фру групата и доближават тези на контролите (Фиг. 32 и таблица 8).



Фиг. 32. Абдоминална аорта на плъх от група, подложена на ВФД, и суплементирана с мелатонин. Оцветяване с хематоксилин и еозин. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope -v12.3.3.5048)
 Легенда: TI – t. intima, TM – t. media, TA – t. adventitia

Рутинен хистологичен анализ на *a. abdominalis* на плъховете от контролната група, суплементирана с мелатонин, демонстрира запазена архитектура на съдовата стена. Ирегулярността на ендотелния моностой в *t. intima* е слабо изразена, докато вакуолизация на ендотелните клетки и субепителният оток – липсват. Архитектурата на *t. media* наподобява тази на контролната група и се различава от Фру групата – липсва пролиферация на ВГМК и съответно задебеляване на *t. intima – t. media* комплекса, изглаждане и фрагментиране на еластичните ламели. Наблюдават се единични ВГМК с перинуклеарно хало. За разлика от Фру групата в *t. adventitia* липсва хиперемия на *v. vasorum* и периваскуларен оток. Промени в размера на вътрешния диаметър на съда не се наблюдават (Фиг.33 и Таблица 8). Прави впечатление това, че периваскуларната мастна тъкан основно е представена от кафява мастна тъкан за разлика от Фру групата и контролата.



Фиг. 33. Абдоминална аорта на плъх от контролната група, суплементирана с мелатонин (K+Me). Оцветяване с хематоксилин и еозин. Увеличение $\times 4$ и $\times 20$ (Aperio Image scope -v12.3.3.5048)

Легенда: TI – t. intima, TM – t. media, TA – t. adventitia

• Резултати от хистологичен, морфометричен и имунохистохимичен анализ на *a. abdominalis*

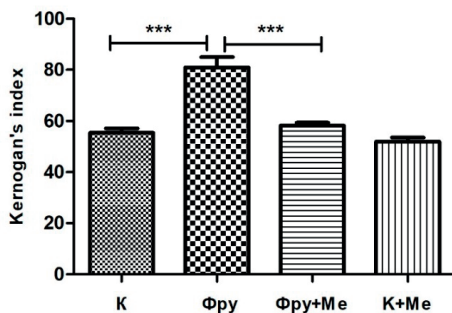
След хистологичния анализ на рутинно оцветени с хематоксилин-еозин срези на абдоминалната аорта морфометричният анализ на абдоминалната аорта показва статистически значими разлики между експерименталните групи. Като дебелината на цялата аортна стена и *t. intima – t. media* комплекс при плъховете на ВФД е по-голяма спрямо контролите – $^{aaa}p < 0,001$ и съответно $^{aaa}p < 0,001$, а вътрешният диаметър е по-стеснен – $^ap < 0,05$. Суплементирането с мелатонин при плъхове, натоварени с фруктоза, демонстративно редуцира дебелината на съдовата стена и *t. intima – t. media* комплекса спрямо Фру групата и доближава размерите на вътрешния диаметър до тези на контролата – $^{***}p < 0,001$. Изследваните за *a. abdominalis* морфометричните показатели: дебелина на цялата аортна стена (μm), дебелина на *t. intima – t. media* комплекс (μm), диаметър на вътрешен диаметър на съда (μm) са представени в Таблица 8.

Таблица 8. *Резултат от морфометричния анализ на a. abdominalis*

Група / Морфологичен показател	К	Фру	Фру+Ме	К+Ме
Дебелина на цяла аортна стена (µм)	119.9 ± 1.42	152.2 ± 3.09 ^{aaa}	133.0 ± 1.32 ^{***}	118.7 ± 1.38
Дебелина на <i>t. intima</i> – <i>t. media</i> комплекс (µм)	88.81 ± 0.78	113.7 ± 1.07 ^{aaa}	105.0 ± 0.63 ^{***}	87.93 ± 0.99
Вътрешен диаметър (µм)	1.627 ± 0.04	1.425 ± 0.07 ^a	1.816 ± 0.03 ^{***}	1.700 ± 0.05

Легенда: Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната (SEM), (N = 8). К – контролна група; ФРУ – група на ВФД; ФРУ + Ме – група на ВФД и прием на мелатонин; К + МЕ – контролна група с прием на мелатонин; ^ap < 0,05 – статистическа значимост между ФРУ и К група; ^{aaa}p < 0,001 – статистическа значимост между ФРУ и К група; *p < 0,01 – статистическа значимост между ФРУ + МЕ група и ФРУ група; ^{***}p < 0,001 – статистическа значимост между ФРУ+МЕ група и ФРУ група, t – test

Резултатът от анализирането на функционалните характеристики на *a. abdominalis* демонстрира статистически значими разлики между плъховете от различни експериментални групи. Така плъховете от Фру групата демонстрират по-висок индекс на Керноган, показател на съдова пропускливост, спрямо контролната група – ^{***}p < 0.0001. Суплементираните с мелатонин плъхове на ВФД демонстрират статистически значимо намаляване на този индекс спрямо Фру групата, до стойностите, близки до контролата – ^{***}p < 0.0001. Индексът на Керноган, изчислен за плъховете на традиционна диета и суплементирани с мелатонин, също така е близък до този на контролната група (Фиг. 34).



Фиг. 34. Промени в индекса на Керноган между изследваните групи

Легенда: Данните са представени като средна стойност \pm стандартна грешка на средната (SEM), ($n = 8$); К – контролна група; К + Ме – контролна група, суплементирана с мелатонин; Фру – група на фруктозна диета; Фру + Ме – група, суплементирана с мелатонин и фруктоза; *** $p < 0.0001$ – статистическа значимост между третираните групи и контролата, t -test

4.1.2. Обсъждане: промени в морфометричните показатели на *a. abdominalis* при ВФД и протектиращ ефект на екзогенния мелатонин

Резултатите от макроскопското изследване на абдоминалните аорти демонстрират промени, корелиращи с гореописаните разлики в теллата на РПМТ сред експерименталните групи: аортите на плъховете, подложени на ВФД, демонстрират по-обилно количество периваскуларна мастна тъкан спрямо контролата. Суплементирането с мелатонин редуцира количеството на периваскуларна мастна тъкан както при плъховете, подложени на ВФД, така и при плъховете на нормален хранителен режим (К + Ме).

Най-вероятно висцералното заглъстяване предизвиква хипертрофични и хиперпластични промени с последваща дисфункция във висцералната и периваскуларната мастна тъкан. Нашите резултати корелират с изследванията на други автори (Britton, 2011). Нискостепенното възпаление води до митохондриална дисфункция в адипоцитите със засилена продукция на АФК, което допринася за развитието и на ОС (Khitan и Kim, 2013). Това обяснява положителния ефект на суплементирането с мелатонин върху обема на периваскуларна мастна тъкан, предвид документирания в литературата антиинфламаторните и анти-

оксидантните му свойства, както и потенциала му за митохондриален протектор (Rusanova, 2019).

Нашите резултати демонстрират, че ВФД води до патоморфологични промени в стената и ремоделиране на *a. abdominalis*. Резултатите, получени от рутинен хистологичен анализ на *a. abdominalis* на плъховете от Фру групата, демонстрират промени в архитектурата на аорталната стена. В *t. intima* се наблюдава ирегулярност на ендотелния монослой, на места – вакуоларизация на ендотелиоцити и субендотелно набъбване. Според редица автори (Elbe et al., 2014; Тюренков et al., 2011 и Таха et al., 2018) тези промени са характерни за ЕД. Наблюдаваните от нас патоморфологични промени в *t. media* също се описват в литературата като типични за ЕД, а именно пролиферацията на ВГМК (Шилов et al., 2017), наличие на перинуклеарно хало в тези клетки (Elbe et al., 2014), фокуси с фрагментиране и изглаждане на еластични ламели (Шилов et al., 2017; Xiaofang et al., 2017). В *t. adventitia* също се наблюдават промени, които най-вероятно се асоциират с ЕД – хиперемия на *v. vasorum* и периваскуларен оток, което според някои автори е признак за ЕД (Тюренков et al., 2011; Таха et al., 2018).

Освен това в нашите изследвания наблюдавахме, статистически значими разлики в дебелината на цялата аортната стена, *t. intima – t. media* комплекса и размера на вътрешния диаметър при плъховете от Фру група спрямо контролите. Това корелира с резултатите от изследването на Handayani и съавтори, според които ВФД промотира задебеляването на цялата аортна стена (Handayani et al., 2021). В допълнение, редица автори съобщават, че тази промяна е предимно за сметка на задебеляването на в *t. intima – t. media* комплекса (Park et al., 2015; Шилов et al., 2017), което съответства с наблюдаваните от нас промени. Според други автори ВФД води и до промените във вътрешния диаметър на аортата при плъхове, което отново съответства с нашите резултати (Komnenov et al., 2020). В подкрепа на това са и получените резултати от изчисляването на индекса на Керноган, демонстриращ пропускливата способност на съда. Индексът на Керноган беше статистически значимо по-висок при плъховете от Фру групата спрямо контролите. Това демонстрира ефекта на ВФД не само върху морфологичните промени в аортната стена – задебеляване, загуба на еластичността, но и върху функционалния ѝ капацитет. Суплементирането с мелатонин зна-

чително редуцира дебелината на цялата аортна стена, дебелината на *t. intima* – *t. media* комплекса и промени във вътрешния диаметър на съда при плъховете на ВФД (със статистическа значимост). Също така, екзогенно приложеният мелатонин статистически значимо намали и индекса на Керноган при плъховете на ВФД и доближи стойностите му до контролата (Фиг. 5 и Фиг. 30). Тези резултати демонстрират, че мелатонинът може да се разглежда като перспективно средство за лечение на ранни васкуларни промени, асоциирани с висцерално затлъстяване – ремоделиране на съдовата стена и ранни дисфункционални промени. Тези изводи корелират с предположенията и на други автори, в частност изследванията на Rosei и съавт. (2017) върху мишки, които доказват положителен ефект на екзогенния мелатонин при хипертрофични промени в аортната стена до пълна регресия на ремоделирането (Rosei, 2017).

Механизмите за съдовопротективните свойства на екзогенния мелатонин при ВФД и висцералното затлъстяване са все още неизяснени напълно. Вероятно мелатонинът повлиява метаболитните нарушения и дисфункционални промени не само във висцералната мастна тъкан, но и в периваскуларната мастна тъкан, поради антиоксидантните и антиинфламаторните му характеристики.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящата разработка разширява знанията за патофизиологичните механизми на съдово увреждане в модел на затлъстяване. Получените данни показват убедителни доказателства, че при фруктозо-индуцирано затлъстяване оксидативният стрес и нискостепенното хронично системно възпаление предизвикват ранни патоморфологични промени в съдовата стена, ограничаване на функционалния капацитет на съда и по този начин допринасят за развитието на ендотелна дисфункция.

Направена е комплексна оценка върху причините за увреждането на ендотела в ранните обратими стадии и влошени функционални характеристики, които са важни механизми за клиничната проява на ендотелната дисфункция.

В проучването се установи протективното влияние на суплементацията на мелатонин върху показателите на метаболитни нарушения, оксидативен стрес, възпаление и морфометрия на аорта при фруктозно хранене. Резултатите са важни за характеризиране и допълване на фармакологичния профил на хормона мелатонин от гледна точка на антиоксидантното, противовъзпалително и цитопротективно действие върху ендотела и терапевтичния му потенциал.

VI. ИЗВОДИ

1. Високофруктозна диета, приложена на плъхове Wistar, води до промени в зоометричните показатели, които отговарят на основните критерии за диагностика на висцералното затлъстяване.
2. Високофруктозна диета, приложена на плъхове Wistar, води до патоморфологични и морфометрични промени в абдоминалната аорта, които отговарят на основните критерии за диагностика на ендотелна дисфункция.
3. Високофруктозна диета, приложена на плъхове Wistar, води до промени в редокс-хомеостазата чрез покачване на експресията на Nrf-2, SOD-1, HO-1 и инхибиране на експресията на NOS3.
4. Високофруктозната диета, приложена на плъховете, води до инхибирането на продукцията на Flt-1.
5. Установена е функционална връзка между морфометричните промени в стената на абдоминалната аорта и нивата на ендотелната имунохистохимична експресия на Flt-1.
6. Установена е функционална връзка между промени в зоометрични показатели, метаболитни нарушения, хронично нискостепенно възпаление и оксидативен стрес и промени в стената на абдоминалната аорта при хронично фруктозно натоварване.
7. Прилагането на екзогенния мелатонин на плъхове Wistar, подложени на високофруктозна диета, води до намаляване на телесното тегло, теглото на ретроперитонеалната мастна тъкан, намаляване на размера на коремната обиколка и протектира от метаболитни нарушения, асоциирани с висцерално затлъстяване.
8. Прилагането на екзогенния мелатонин на плъхове Wistar, подложени на високофруктозна диета, потиска възпалителния отговор чрез инхибиране на експресията на NF-kB в аортната стена и серумните нива на TNF- α .

9. Прилагането на екзогенния мелатонин на плъхове Wistar, подложени на високофруктозна диета, потиска оксидативните процеси в аортната стена чрез засилване на експресията на Nrf-2, SOD-1, HO-1 и NOS3.
10. Прилагането на екзогенния мелатонин на плъхове Wistar, подложени на високофруктозна диета, протектира срещу развитието на ендотелна дисфункция и ремоделиране на аортната стена чрез засилване на експресията на Flt-1.
11. Прилагането на екзогенния мелатонин на плъхове Wistar, подложени на традиционна диета, води до статистически значимо намаляване на теглото на ретроперитонеална мастна тъкан, размера на назо-аналното разстояние, на коремната и гръдната обиколки, индекса на Lee спрямо тези при плъховете от контролната група.
12. Прилагането на екзогенния мелатонин на плъхове Wistar, подложени на традиционна диета, статистически значимо редуцира нивата на серумната глюкоза спрямо тези при контролата.
13. Прилагането на екзогенния мелатонин на плъхове Wistar, подложени на традиционна диета, статистически значимо покачва ендотелната експресия на SOD-1 и NOS3 в абдоминалната аорта спрямо контролата.

VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Приноси с оригинален характер

- 1.1. За първи път е направена комплексна оценка и функционална връзка между показатели на оксидативен стрес (Nrf-2, SOD-1, HO-1), хронично нискостепенно възпаление (NF-kB и TNF- α), патоморфологични промени в аортна стена и ендотелната експресия на мембранныя рецептор Flt-1 при фруктозоиндуцирано затлъстяване.
- 1.2. За първи път се установява функционална връзка между ендотелна имунохистохимична експресия на NOS3 и Flt-1 в стената на абдоминалната аорта при плъхове с фруктозоиндуцирания модел на затлъстяване.
- 1.3. За първи път е установен ендотелопротективен ефект от прилагането на екзогенен мелатонин върху фруктозоиндуцираните промени в абдоминалната аорта чрез редуциране на оксидативния стрес, хронично нискостепенно възпаление, липидогенеза и засилване на ендотелната експресия на Flt-1, което регресира ремоделирането на съдовата стена и възстановява функционалния ѝ капацитет.

2. Приноси с потвърдителен характер

- 2.1. Високофруктозна диета предизвиква оксидативен стрес, хронично нискостепенно възпаление – измерени чрез Nrf-2, SOD-1, HO-1, NOS3, NF-kB в аортната стена и TNF- α в серума.
- 2.2. Високофруктозна диета води по покачване на телесното тегло, теглото на ретроперитонеалната и периваскуларната мастна тъкан, индекса на Lee и увеличава размера на коремната обиколка.

- 2.3. Високофруктозната диета води до патоморфологични и функционални промени в стената на абдоминалната аорта – задебеляване на цялата аортна стена за сметка на *t. intima* – *t. media* комплекса и стесняване на вътрешния диаметър.
- 2.4. Проявените ефекти на екзогенния мелатонин върху фруктозоиндуцираните повишено телесното тегло, количеството ретроперитонеална и периваскуларна мастна тъкан, размера на коремната обиколка и Lee-индекс потвърждават неговия потенциал като средство за лечение на затлъстяване.

3. Приноси с приложен характер

- 3.1. Проявените ефекти на суплементацията с мелатонин при здрави контроли върху телесно тегло, количество ретроперитонеална и периваскуларна мастна тъкан, размера на коремната обиколка, Lee-индекс демонстрират неговия потенциал като средство за профилактика на затлъстяване.
- 3.2. Проявените ефекти на екзогенния мелатонин върху фруктозоиндуцираните патоморфологични, морфометрични и функционални промени в абдоминалната аорта, както и нивата на Nrf-2, HO-1, SOD-1 експресията показват неговия потенциал като средство за лечение на ендотелната дисфункция и асоциираното с нея ремоделиране на васкуларната стена.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ И СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Публикации

- 1.1. Nuclear factor -E2-related factor 2: a potential preventive and therapeutic target for atherosclerosis, Chivchibashi D, Bekyarova G, Tzaneva M, Hristova M, Сборник статии от Национална научна конференция „15 години фармация в Медицински университет – Пловдив“, 2018
- 1.2. Effects of melatonin supplementation on body mass index in diet-induced obesity rat model, Dariya Chivchibashi-Pavlova, Diyana Kyuchukova, Ganka Bekyarova, Kamelia Bratoeva, Varna Medical Forum, 2022
- 1.3. New experimental models in the research of the pathophysiology of cardiovascular system, Nikolai Kalvachev, Diyana Kyuchukova, Dariya Leonidovna, Kameliya Bratoeva, Varna Medical Forum, 2022
- 1.4. Effects of melatonin supplementation on aortic wall in diet-induced obesity rat model, Dariya Chivchibashi-Pavlova, Kamelia Bratoeva, Cureus Journal of Medical Science, 2022 (in press)

2. Участия в научни форуми

2.1. Участие в международни научни форуми:

- 2.1.1. „Role of Nrf-2 in gastric mucosal protection“. Hristova M, Bekyarova G, Tzaneva M, Chivchibashi D, Kiselova-Kaneva Y., 13 – 16 май 2018: 28-th Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria (IMAB). Golden Sands, Bulgaria.
- 2.1.2. „Pathophysiology of the thermal trauma: what we know?“, Hristova M, Bekyarova G, Tzaneva M, Chivchibashi D., 13 – 16 май 2018: 28-th Annual Assembly of International Medical Association Bulgaria (IMAB). Golden Sands, Bulgaria.

2.2. Участие в национални научни форуми:

- 2.2.1. „Nuclear factor – E2-related factor 2: a potential preventive and therapeutic target for atherosclerosis”, D.Chivchibashi, G. Beqyarova, M. Tzaneva, M. Hristova, 1-3 юни 2018 г., Научна конференция „15 години фармация в МУ – Пловдив”, Хотел „Орфей“, гр. Девин.
- 2.2.2. „Effects of melatonin supplementation on body mass index in diet-induced obesity rat model“, 22 септември, 2021 г., Юбилейна научна конференция „60 години патофизиология“ - Медицински университет, гр. Варна

IX. БЛАГОДАРНОСТИ

Изказвам сърдечна благодарност на:

- Научния си ръководител доц. д-р Камелия Братоева, д.м. за изключително ценните професионални напътствия, търпението, отзивчивостта и безрезервната подкрепа по време на разработването на дисертационния труд.
- Колегите ми от УС „Патофизиология“ за тяхната подкрепа.
- Проф. д-р Антон Тончев, д.м.н. и лаборант Велина Кеновска от катедра по „Анатомия и клетъчна биология“ за безценната оказана помощ и ценните съвети при изработването на хистологични и имунохистохимични препарати.
- Доц. биол. Йоана Киселова, д.б., гл. ас. Оскан Тасинов, д.б. и гл. ас. Деяна Ванкова, д.б. от катедра „Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика“ за оказаната подкрепа и професионалните насоки за извършването на генетичните изследвания.
- Семейството ми, и специално съпруга ми, чиято обич ми дава сили и кураж да продължа напред.