



PROSPERITAS VESTRA FINIS NOSTRA!

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

ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА

КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И КЛИНИЧНА ФАРМАКОЛОГИЯ И ТЕРАПИЯ

Мехмед Рейзов Абтулов

**ФАРМАКОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА ЕФЕКТИТЕ НА ПЛОДОВ СОК
ОТ ARONIA MELANOCARPA В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА
МЕТАБОЛИТЕН СИНДРОМ**

АВТОРЕФЕРАТ

На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР“ по научна специалност „Фармакология (вкл. фармакокинетика и
химиотерапия)“

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

Варна, 2022 г.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрен съвет на Катедрата по фармакология и клинична фармакология и терапия при Медицински университет – Варна, състояло се на 20.06.2022 г., и е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:

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

Дисертационният труд съдържа общо 159 страници, онагледен е с 30 фигури и 27 таблици. Книгописът включва 407 заглавия на латиница и 3 на кирилица.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 26.09.2022 г. от 10.00 ч. в онлайн платформа на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

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

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

CCL4: carbon tetrachloride

FAS: fatty acid synthase

GAE: gallic acid equivalent

GPx: glutathione peroxidase

GSH: glutathione

HDL: high-density lipoprotein

HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance

ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1

IL: interleukin

LDL: low-density lipoprotein

MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1

MDA: malondialdehyde

NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease

NF-κB: nuclear factor-kappa beta

Nrf2: nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2

OFT: open field test

PPAR-γ: peroxisome proliferator activated receptor-γ

PRT: place recognition test

SEM: standard error of mean

SIT: social interaction test

SOD: superoxide dismutase

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances

TNF-α: tumor necrosis factor-alpha

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1

VLDL: very-low-density lipoprotein

АСССБ: атеросклеротична сърдечно-съдова болест

АХ: артериална хипертония

БАВ: биологично активни вещества

ВМВФ: високомастна, високофруктозна

ГТТ: глюкозо-толерансен тест

ЗД: захарен диабет

ИР: инсулинова резистентност

МС: метаболитен синдром

ПСАМ: плодов сок от *Aronia melanocarpa*

ПФ: полифеноли

РААС: ренин-ангиотензин-алдостеронова система

РКФ: реактивни кислородни форми

СМК: свободни мастни киселини

ССЗ: сърдечно-съдови заболявания

T2ЗД: захарен диабет тип 2

ТГ: триглицериди

Съдържание

I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	9
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	10
1. Материали.....	10
1.1. Опитни животни.....	10
1.2. Използвани вещества.....	10
1.3. Използвани реагенти и китове.....	11
2. Методи	11
2.1. Индуциране на метаболитен синдром и третиране	11
2.2. Индуциране на остро възпаление на задна лапа	12
2.3. Методи за изследване на поведението	13
2.4. Биохимични методи.....	15
2.5. Определяне на индекси на мезентериалната, паранефралната, перигонадната, ретроперитонеалната и общата мастна тъкан	17
2.6. Хистологични и имунохистохимични методи	17
2.7. Статистически методи	19
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	20
1. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху поведението в модел на метаболитен синдром	20
1.1. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> в тест открито поле.....	20
1.2. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> в тест за разпознаване на мястото на предмети.....	22
1.3. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> в тест за принудително плуване.....	23
1.4. Обсъждане	24
2. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху биохимични маркери на енергийния метаболизъм.....	28
2.1. Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху нивото на кръвната глюкоза в хода на глюкозо-толерансен тест	28
2.2. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху серумните триглицериди.....	31
3. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху антиоксидантни ензими.....	33
3.1. Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху активността на SOD.....	33

3.2.	Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху GРх	35
3.3.	Обсъждане	35
4.	Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху мастната тъкан.	38
4.1.	Мастнотъканни индекси.....	38
4.2.	Хистология на мастната тъкан.....	40
4.3.	Апоптоза в мастната тъкан.....	41
4.4.	Обсъждане	46
5.	Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху миокард и коронарни съдове	49
5.1.	Хистология на миокарда	49
5.2.	Хистология на коронарен съд.....	50
5.3.	Обсъждане	51
6.	Ефекти на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху черния дроб.....	55
6.1.	Хистология на черния дроб.....	55
6.2.	Експресия на Вах, Bcl-2 и MAC387 в черния дроб	56
6.3.	Обсъждане	61
7.	Ефект на плодов сок от <i>Aronia melanocarpa</i> върху карагенан-индуциран оток на задна лапа.....	65
7.1.	Резултати.....	65
7.2.	Обсъждане	66
V.	ИЗВОДИ	70
VI.	ПРИНОСИ.....	74
VII.	СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	76

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Метаболитният синдром (МС) е съвкупност от клинични и биохимични отклонения, които увеличават риска от развитие на сърдечно-съдови заболявания (ССЗ) и захарен диабет тип 2 (Т2ЗД). Тези нарушения включват: абнормни нива на глюкоза на гладно и на серумни триглицериди (ТГ), ниски нива на HDL-холестерол, централно (висцерално) затлъстяване и повишено над нормална стойност артериално кръвно налягане (АН). Ясното дефиниране на синдрома е необходимо, тъй като това спомага за откриването на пациенти, които са рискови за развитие на атеросклеротична сърдечно-съдова болест (АСССБ) или Т2ЗД.

Медико-социалното значение на МС е огромно, тъй като в световен мащаб се наблюдава трайна тенденция за повишаване на неговата честота както сред възрастни, така и в детската възраст. За това допринася „западният“ начин на живот, характеризиращ се с консумация на висококалорични хранителни продукти и напитки и намалената физическа активност. Такъв нездравословен начин на живот води до натрупване на мастна тъкан около корема и развитие на т.нар. висцерално затлъстяване.

Въпреки напредъка в изучаването на МС и идентифицирането на рисковите фактори, етиопатогенезата му не е напълно изяснена. Основната приета хипотеза е, че висцералната мастна тъкан, считана за най-големия ендокринен орган, продуцира т.нар. адипоцитокени, които индуцират инсулинова резистентност и нискостепенно възпаление. Тези две патогенетични моменти се смятат ключови в развитието на МС и асоциираните с него усложнения.

Главният акцент при лечението на МС е подобряване на инсулиновата чувствителност. Препоръчва се повишаване на физическата активност, диетични интервенции, целящи редукция в калорийния внос и прием на медикаменти, стимулиращи инсулиновия отговор. Въпреки това, лечението не винаги е ефективно. Затова усилията са насочени към търсене на алтернативи при терапията.

Растенията се изучават интензивно в опитите да се изолират биологично активни вещества (БАВ), които биха могли да притежават терапевтичен потенциал при МС. Към тях се отнасят полифенолите (ПФ). Те се състоят от две или повече бензенови ядра, с различни функционални групи, прикрепени към тях. ПФ представляват значителен интерес сред научната общност, тъй като през последните години техните ефекти са масово проучвани както *in vitro*, така и *in vivo* и продължават да бъдат. Леснодостъпният им характер и сравнително ниската цена при тяхното добиване ги правят много подходящи за проучвания в различни експериментални модели на заболявания (включително в модели на МС) за тестване на потенциалните им ефекти.

Сред растенията с много богато ПФ съдържание се откроява *Aronia melanocarpa*. Съществуват убедителни доказателства, че ПФ, съдържащи се в арониевите плодове, притежават инсулин-очувствяща и противовъзпалителна активност. Влиянието на арониевите ПФ върху различните компоненти на МС (хипертриглицеридемия, хипергликемия, обезитет, артериална хипертония) е изследвано и са докладвани благоприятни ефекти, но предимно при здрави субекти или при опитни животни в модели на определени заболявания (артериална хипертония, захарен диабет, дислипидемия).

Ако това е така, при субекти (експериментални животни) с диетично-индуциран МС приложението на плодов сок от *Aronia melanocarpa* (ПСАМ), богат на ПФ, би повлиял благоприятно клиничко-биохимичните нарушения.

Понастоящем липсват данни за изследвани ефекти на ПСАМ при експериментални животни с диетично индуциран МС. За да се потвърдят гореспоменатите ефекти при МС, са нужни допълнителни проучвания.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е:

Да се изследват и обобщят фармакологичните ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* (ПСАМ), приложен перорално в три различни дози при плъхове с експериментален модел на метаболитен синдром (МС), предизвикан от високомастна, високофруктозна (ВМВФ) диета.

Задачи

За изпълнението на тази цел си поставихме следните *задачи*:

1. Да се индуцира МС при експериментални животни чрез 10-седмично приложение на ВМВФ диета.
2. В така получен модел на МС да се изследват ефектите на ПСАМ върху:
 - 2.1. Поведенческите индекси, предоставящи информация за:
 - 2.1.1. Общата двигателна активност;
 - 2.1.2. Пространствената памет;
 - 2.1.3. Тревожността;
 - 2.1.4. Депресивно-подобното поведение;
 - 2.2. Биохимични маркери на енергийния метаболизъм:
 - 2.2.1. Глюкозната регулация;
 - 2.2.2. Серумните триглицериди;
 - 2.3. Серумната активност на антиоксидантни ензими;
 - 2.4. Мастнотъканните индекси (на ретроперитонеална, мезентериална, перигонадна, паранефрална и тотална мастна тъкан);
 - 2.5. Структурата на висцералната мастна тъкан, миокарда, коронарните съдове и черния дроб;
 - 2.6. Имунохистохимичната експресия на маркери на апоптоза (в мастна тъкан и черен дроб) и възпаление (в черен дроб);
 - 2.7. Карагенан-индуцирано остро възпаление на задна лапа.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Опитни животни

Експерименталният дизайн включва 50 мъжки Wistar плъхове (160-280 г). Те са отглеждани в пластмасови клетки при средна стайна температура 20-25°C, под 12-часов цикъл на светлина/тъмнина и при свободен достъп до храна и вода.

Всички процедури по третирането на експерименталните животни и опитите са провеждани в съответствие с ЕС директива 2010/63/EU и са одобрени от Българската агенция по безопасност на храните (Разрешително №177/07.07.2017г.).

1.2. Използвани вещества.

1.2.1 Плодов сок от *Aronia melanocarpa* (ПСАМ)

Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* (ПСАМ), използван в настоящето проучване, е приготвен чрез смилане, пресоване и изцеждане на свежи плодове (Valcheva-Kuzmanova et al., 2014). Полученият сок е филтриран консервиран с калиев сорбат (1.0 g/l) и е съхраняван в хладилник до провеждане на експеримента. В **Таблица 1** е отразено полифенолното съдържание на сока.

Таблица 1. Съдържание на ПФ в използвания в експеримента плодов сок от *Aronia melanocarpa*; GAE: gallic acid equivalents

Полифеноли	Съдържание
Общи феноли	5461 mg GAE/l
Общи проантоцианидини	3122.5 mg/l
Цианидин 3-галактозид	143.7 mg/l
Цианидин 3-арабинозид	61.7 mg/l
Цианидин 3-глюкозид	4.4 mg/l
Цианидин 3-ксилозид	11.6 mg/l

Хлорогенова киселина	585 mg/l
Неохлорогенова киселина	830 mg/l

1.3. Използвани реагенти и китове

Използваните в имунохистохимичните анализи антитела, реактивите за оцветяване и работните концентрации са представени на **Таблица 2** и **Таблица 3**. Използвано е антитяло Вах (В-9), кат. № 7480, Bcl-2 кат. № 7382, Macrophage Marker Mac387 кат. № 66204. Антителата са производство на Santa Cruz Biotechnology.

Таблица 2. Използвани реагенти за извършване на имунохистохимичен анализ

Антитяло	Разреждане	Позитивна контрола	Маркер за	Фирма производител
Anti-Bax	1:50	Лимфен възел	апоптоза	Santa Cruz Biotechnology
Anti- Bcl-2	1:50	Лимфен възел	апоптоза	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Mac387	1:50	Лимфен възел	макрофаги	Santa Cruz Biotechnology

Таблица 3. Системи за оцветяване и други реактиви

HRP-DAB System	Оригинална оцветяваща система	Dako
Mayer's hematoxilin	Counterstaining	Dako

За определяне на серумните нива на ТГ е използван индивидуален кит на производител Bio Maxima, Полша. Активността на ензимите супероксид дисмутаза (SOD) и глутатион пероксидаза (GPx) е изследвана чрез китове на производител Calbiochem, Германия.

2. Методи

2.1. Индуциране на метаболитен синдром и третиране

Опитните животни са разделени на 5 групи (10 плъхове в група): контрола, МС, МС+ПСАМ_{2,5}, МС+ПСАМ₅, МС+ПСАМ₁₀. Контролните животни са получавали обикновена лабораторна диета и питейна вода, останали групи – високомастна, високофруктозна (ВМВФ) диета и 10%-ен разтвор на фруктоза вместо питейна вода за индукция на МС (Gancheva et al., 2015). ВМВФ диета се състои от гранули, обогатени със 17% свинска мас и 17% фруктоза. Калорийният прием при тази диета съответства на 405 ккал/100 г, като свинската мас осигурява 38% от енергийния внос, фруктозата – 17%. Фруктозният разтвор осигурява допълнителен 40 ккал/100 г калориен прием.

В продължение на 10 седмици експерименталните групи са третирани еднократно дневно чрез орогастрална сонда. Контролната и МС групи са третирани с дестилирана вода в обем 10 мл/кг телесно тегло. Групите МС+ПСАМ_{2.5}, МС+ПСАМ₅ и МС+ПСАМ₁₀ са третирани с нарастващи дози плодов сок: 2.5 мл/кг, 5.0 мл/кг и 10 мл/кг. ПСАМ в дози 2.5 и 5.0 мл/кг е разреден с дестилирана вода до общ обем 10 мл/кг.

Диетата и третирането на експерименталните групи са обобщени на **Таблица 4**.

Таблица 4. Експериментален протокол; *ВМВФ: високомастна, високофруктозна*

Група	Диета	Третиране
Контролна	Обикновена	10 мл/кг вода
МС	ВМВФ	10 мл/кг вода
МС+ПСАМ _{2.5}	ВМВФ	2.5 мл ПСАМ, разреден до обем 10 мл/кг
МС+ПСАМ ₅	ВМВФ	5.0 мл ПСАМ, разреден до обем 10 мл/кг
МС+ПСАМ ₁₀	ВМВФ	10 мл ПСАМ

2.2. Индуциране на остро възпаление на задна лапа

В края на експеримента (10. седмица), 1 мг карагенан, разтворен във физиологичен разтвор, е инжектиран в лявата задна лапа на плъховете в групи МС, МС+ПСАМ_{2.5}, МС+ПСАМ₅ и МС+ПСАМ₁₀ за индукция на остър възпалителен отговор. Обемът на лапата (мл) е измерен 0, 30, 60, 120, 180, 240 и 300 мин. след инжектирането с помощта на дигитален плетизмометър LE7500 (Panlab, Barcelona). Интензитетът на възпалението е определен чрез разликата в обема на лапата преди и след инжектиране на веществото.

Отокът на лапата (мл) е изчислен по формулата:

$$(V_s - V_0), \text{ където:}$$

V_s –обем на лапата, измерен в съответния времеви интервал след карагенанова инжекция;

V_0 –изходен обем на лапата.

Инхибицията на отока на лапата (%) е изчислена по формулата:

$$(V_C - V_T) / V_C \times 100, \text{ където:}$$

V_C – среден обем на отока на лапата на контролната за този опит група (МС);

V_T – среден обем на отока на лапата за всяка третирана група.

2.3. Методи за изследване на поведението

След 8. седмица са проведени поведенчески тестове за оценка на двигателната активност, тревожността, паметта и депресивно-подобното поведение на животните с вече индуциран МС. За целта за използвани следните методи: тест открито поле, тест за социално взаимодействие, тест за разпознаване на мястото на предмети и тест за принудително плуване.

2.3.1. Тест открито поле (Open field test, OFT)

Разработен от Калвин Хол (Belovicova et al., 2017), OFT дава информация за общата локомоторна активност на тестваните животни. За провеждане на теста е използвано дървено поле (100 cm x 100 cm), заобиколено от стени с височина 40 cm. То е разделено със сини линии на 25 квадрата с размери 20 cm x 20 cm. Тестваният плъх е поставен в центъра на полето и поведението му се изследван чрез директно наблюдение в продължение на 5 минути. Общият брой на квадратите, пресечени от четирите лапи, отразява хоризонтална активност. Вертикалната активност се оценявана по броя на изправянията на задните лапи. След всяко изследвано животно полето е почистено с кърпа със спиртен разтвор и подсушавано.

2.3.2. Тест за социално взаимодействие (Social interaction test, SIT)

Тестът, въведен от File and Hyde (1978) (File and Hyde, 1978), служи за определяне на нивото на тревожност на експерименталните животни, съдейки по времето, прекарано на социално взаимодействие на изследваното експериментално животно с непознат партньор в теста. За изпълнение на теста два плъха от различни клетки са едновременно поставени в противоположните ъгли на арената на открито. Животните са имали еднакво третиране и сходно телесно тегло (с разлика, не по-голяма от 10%). Времето, прекарано в активно социално взаимодействие (подстригване, подушване, слеждане, пълзене под/над партньора), е обратно пропорционално на нивото на тревожност. Пасивният контакт (например лежане или седене при наличие на телесен контакт) не се счита за социално взаимодействие.

2.3.3. Тест за разпознаване на мястото на предмети (Place recognition test, PRT)

Представлява модификация на теста за разпознаване на обекти и цели проучване на пространствената памет (Lueptow, 2017). Използвано е оградено със стени поле с размери 60 x 60 x 40 cm, което е равномерно осветено от източник на изкуствена светлина. Тестът е провеждан в две сесии, като първата е тренировъчна. За целта са използвани два еднакви паралелепипеда, разположени симетрично и прикрепени към пода на полето, за да не могат да бъдат премествани. Животното е поставяно в центъра на арената и в продължение на 3 минути е отчитано времето за изучаване на предметите. След всяко животно полето и предметите са почиствани със спиртен разтвор и подсушавани. Тридесет минути след тренировъчната сесия е провеждана втората, като е променено местоположението на единия от предметите в полето. Отново, в рамките на 3 минути е наблюдавано поведението на животното и документирано времето на изучаване на двата предмета. Като показател за пространствената памет е изчислен дискриминационен индекс:

$$B/(A+B), \text{ където:}$$

A – времето на изучаване на предмета със запазено местоположение

B – времето на изучаване на предмета с променено местоположение.

По-висока стойност на индекса е показател за по-добра пространствена памет.

2.3.4. Тест за принудително плуване (Forced swim test, FST).

Методът е описан от Porsolt et al. (Porsolt et al., 1977). FST се използва се за определяне на наличието депресивно-подобно поведение при гризачи. За целта е използван стъклен цилиндър с диаметър 17 cm и височина 60 cm, който е запълнен с вода до 30 cm.

Животното е поставено в цилиндъра за 5 минути и е наблюдавано неговото поведение, като е внимавано то да не подпира дъното чрез лапа/и и/или опашка.

Тестът е провеждан в две сесии, като първата е тренировъчна. Записвани и анализирани са резултатите от втората сесия. Интервалът между двете сесии е 24 часа. Животното е наблюдавано за наличие/липса на движение и е измерено времето, прекарано в неподвижност в секунди. Плуването е показател за двигателна активност, докато неподвижността говори за състояние на безнадежност и наличие на депресивно-подобно поведение.

2.4. Биохимични методи

2.4.1 Получаване на кръвен серум

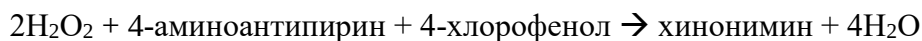
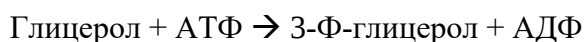
Експерименталните животни са анестезирани с диетилов етер, кръв е взета от сублингвалните вени и епруветките с кръв са центрофугирани при 2000 оборота за 10 мин. Отделеният серум е съхраняван при температура -20° C до момента на провеждане на биохимичните анализи.

2.4.2. Глюкозо-толерансен тест (ГТТ)

Тестът е проведен през 10.седмица от експеримента. След 12-часово гладуване плъховете са инжектирани интраперитонеално с 40%-ен разтвор на глюкоза в доза 2 г/кг телесно тегло. За изследването на кръвната глюкоза е използвана кръвна проба от дисталния край на опашката (получена чрез инцизия съгласно метода на Fluttert et al., 2000). Кръвната глюкоза е измерена с глюкомер ACCU-CHEK Performa и тест ленти ACCU-CHEK Performa преди инжектирането (0.мин), както и 30, 60 и 90 минути след това.

2.4.3. Определяне на триглицериди в кръвен серум

ТГ са определени спrekтpофотометрично чрез използване на стандартен кит. ТГ се хидролизират от ензима липопротеин липаза до глицерол и мастни киселини. Глицерол се фосфорилира чрез АТФ от ензима глицерол киназа, при което се синтезират дихидроацетон фосфат и H₂O₂. H₂O₂ се свързва с 4-хлорофенол и 4-аминоантипирин, при който се образува оцветен комплекс:



Интензитетът на цвета на полученото цветно съединение, измерен спектрофотометрично, съответства на концентрацията на ТГ.

За целта се използва реагент, съставен от: PIPES buffer pH 7,00; 4-chlorophenol; 4-aminoantipyrine; ATP; glycerol kinase; peroxidase; lipoprotein lipase; glycerol phosphate oxidase; sodium azide и non-reactive surfactants and stabilizers. Използва се и

триглицериден стандарт, представляващ глицерин, съответстващ на 2.25 mmol/l триглицеридна концентрация.

Първоначално се изследва оптичестката плътност на стандарта. Използва се 1000 µl стандарт, който първо се инкубира за 5 min при температура 37°C или 10 min при температура 25°C, след което отчита абсорбцията при дължина на вълната 490-550 nm. Последва спектрофотометрично изследване на пробите серум. 1000 µl от всяка епруветка, съдържаща серум, се смесва с 10 µl от реагента, така получената смес отново се инкубира при същите температура и продължителност, след което се измерва оптичната плътност спектрофотометрично. Използван е спектрофотометър Aurius 2021 UV-VIS (Cecil Instruments Ltd, UK). Концентрацията на триглицеридите в пробите се калкулира чрез формулата:

Концентрация на триглицериди [mmol/l] = $\frac{A(\text{Проба})}{A(\text{Стандарт})}$ x концентрация на стандарта, където:

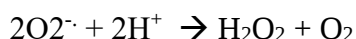
A (Проба) = Абсорбция на пробата

A (Стандарт) = Абсорбция на стандарта.

2.4.4. Определяне на активността на антиоксидантни ензими в серум

Серумната активност на SOD е определена чрез спектрофотометричен метод като е използван стандартен кит.

SOD е металоензим, катализиращ дисмутацията на супероксиден анион до молекулен кислород и водороден пероксид и играе съществена роля в клетъчната антиоксидантна защита:



Принцип: Китът използва тетразолиева сол за детекция на супероксиден радикал, генериран от ксантин оксидазата и хипоксантин. Една единица SOD се дефинира като концентрация на ензима, необходима за 50% дисмутация на супероксидния радикал.

Серумната активност на GPx е определена спектрофотометрично чрез използване на стандартен кит.

GPx катализира редукцията на хидропероксиди с помощта на редуциран глутатион и защитава клетките от оксидативна увреда.

Принцип: Методът се базира на имуноензимно измерване на глутатион пероксидазната активност индиректно чрез реакция с глутатион пероксидазата. Окислен глутатион, продуциран след редукция на хидропероксид от ензима GPx, се рециклира до редуцирана форма от глутатион редуктаза и NADPH:



Окислението на NADPH до NADP⁺ е съпроводено с намаление в абсорбцията при дължина на вълната 340 nm . Скоростта на намаление е правопрпорционална на GPx активност в съответната проба.

2.5. Определяне на индекси на мезентериалната, паранефралната, перигонадната, ретроперитонеалната и общата мастна тъкан

Мезентериалните, перигонадните, паранефралните и ретроперитонеалните мастни депа са дисекирани и претеглени. Общата висцерална мастна тъкан е претеглена.

Съответните мастни индекси са изчислявани по формулата: тегло на мастната тъкан/общо телесно тегло * 10².

2.6. Хистологични и имунохистохимични методи

2.6.1 Хистологични методи

Тъканни късчета с ширина 1 см, дължина 1 см и дебелина 0.5 см от ретроперитонеална мастна тъкан, черен дроб и миокард с коронарни артерии са фиксирани в 10% неутрален буфериран формалин и след подходяща обработка са включвани в парафин с точка на топене 52-54°. Срези с дебелина 5 µm са оцветени стандартно с хематоксилин-еозин за оценка на хистологичните промени.

2.6.2. Имунохистохимични методи

Използван е индиректен имунопероксидазен метод за имунохистохимичен анализ с помощта на mini KIT high Ph DAKO K8024. Негативните контроли са изработени като вместо първичното анти тяло, срези от използваните парафинови блокчета се инкубират с нормален неимунен серум. За позитивни контроли са използвани тъкани от лимфен възел, които са оцветени с Anti-Bax, Anti- Bcl-2 и Anti-Mac387.

Подготовка на включените в парафин материали за имунохистохимично изследване.

❖ Срезите с дебелина 4 μm от тъканните материали (фиксираны в неутрален формалин и включени в парафин) бяха нарязани и поставени върху силанизирани стъкла.

❖ **Депарафинирането** се осъществи в низходяща редица от алкохоли, както следва: етанол 100% 3 мин., етанол 90% 3 мин., етанол 80% 3 мин., етанол 70% 3 мин., ксилол 3 x 10 мин. След това срезите се измива с течаща вода и се поставиха в дестилирана вода.

❖ **Антигенно разкриване:** разкриването на антигените се осъществи с предварително загрят до 65°C En Vision FLEX Target Retrieval Solution (работен разтвор) в PT Link контейнер, като срезите бяха инкубирани за 20 мин. при pH=9. След охлаждане пробите бяха промити на стайна температура с измиващ буфер FLEX Wash Buffer (20x) за 1-5 минути.

Имунохистохимичен протокол

Срезите бяха оцветени по FLEX протокол, като за всички стъпки се използва влажна камера:

❖ Инкубация с пероксидазен блокиращ разтвор (3% H₂O₂) за 5 минути на стайна температура за блокиране на ендогенната пероксидазна активност. Изплакване с измиващ буфер за 5 мин;

❖ Инкубация с първичното антитяло с разреждане 1:50 за 20 мин. на стайна температура;

❖ Промиване с измиващ буфер за 2 x 5 мин. на стайна температура;

❖ Инкубация с маркиран полимер HRP за 20 мин. на стайна температура;

❖ Промиване с измиващ буфер за 3 x 5 мин. на стайна температура;

❖ Инкубация на срезите с хромоген DAB пероксидазен разтвор за 2 x 5 мин., при непрекъснато микроскопиране;

❖ Промиване с буфер за 2 мин;

❖ Изплакване с дестилирана вода за 2 мин;

❖ Контраоцветяване с Mayer's hematoxylin за 5 мин;

❖ Изплакване на пробите с дестилирана вода за 5 мин;

❖ Дехидриране в обратен възходящ ред етанол 70%, етанол 80%, етанол 90%, етанол 100% със същата продължителност, както при депарафинирането;

❖ Поставяне в монтираща среда.

Нива на експресия на изследваните антитела и интерпретация на резултатите

Имунохистохимичната експресия на Вах и Bcl-2 и MAC387 бе оценена полуколичествено чрез определяне на експресията на най-малко петдесет клетки от всяка проба в произволно избрани полета. За всяка клетка интензивността на цитоплазмената експресия е оценена като : 0 - липсва реакция, 1+ слаба позитивност, 2+ умерена позитивност или 3+ силна позитивност. За мастната тъкан, поради наличие на големи цитоплазмени липидни включвания и периферното разположение на ядрата, експресията е определяна като: 0 - липсва реакция или позитивна 1+ в зависимост от отсъствието или наличието на интрануклеарни имунни депозити.

Определено е съотношението Вах/Bcl-2 за всяка група и са сравнени стойностите между групите.

2.7.Статистически методи

Обработката и анализът на данните от изследванията са извършени с помощта на статистически софтуер GraphPad Prism 7.00 (San Diego, California), като са използвани еднофакторен и двуфакторен вариационен анализ (one-way и two-way ANOVA) и Student's t-test. ANOVA анализите са последвани от Dunnett's multiple comparisons test. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка (mean $\pm$ SEM). Статистическа достоверност е приета при стойност на $p < 0.05$.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

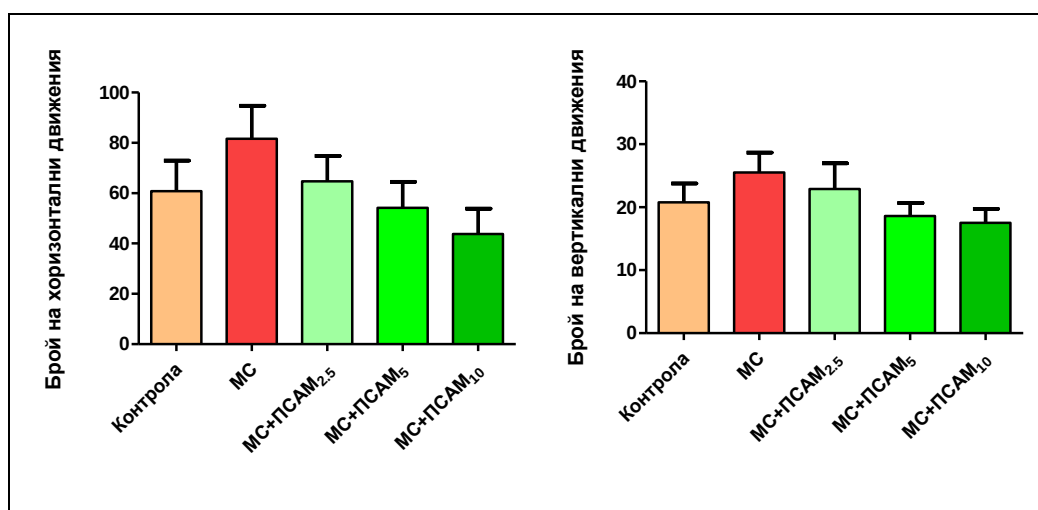
1. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху поведението в модел на метаболитен синдром

1.1. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* в тест открито поле

Резултатите са представени в **Таблица 5** и **Фигура 1**. След статистически анализ на получените резултати се не установява значима разлика в броя на хоризонталните и вертикалните движения сред изследваните експериментални групи.

Таблица 5. Брой на хоризонтални и вертикални движения в открито поле на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг

Показател	Контрола	МС	МС + ПСАМ _{2.5}	МС + ПСАМ ₅	МС + ПСАМ ₁₀	One-Way ANOVA
Брой на хоризонтални движения	60.7 ± 12.18	81.6 ± 13.15	64.7 ± 10.13	54.2 ± 10.37	43.8 ± 10.07	0.1963
Брой на вертикални движения	20.7 ± 3.01	35.35 ± 3.17	22.9 ± 4.09	18.6 ± 2.09	17.5 ± 2.26	0.3343



Фигура 1. Брой на хоризонтални и вертикални движения в открито поле на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг

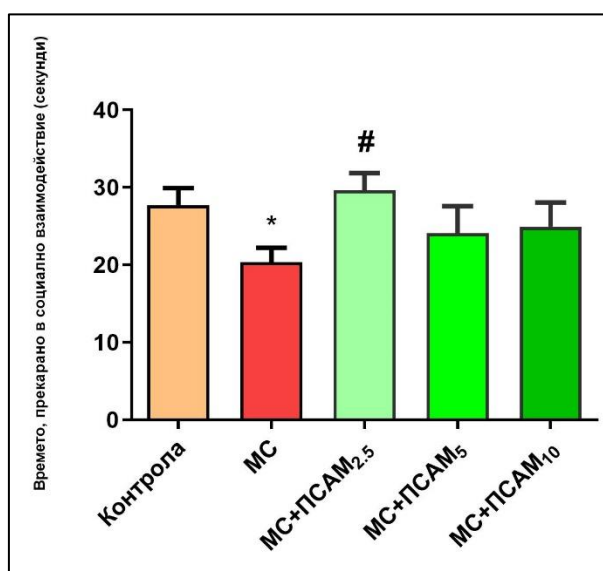
1.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* в тест за социално взаимодействие

Резултатите са представени в **Таблица 6** и на **Фигура 2**.

Таблица 6. Продължителност (секунди) на социалното взаимодействие с тест-партньор при плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг;

* $p < 0.05$ спрямо контролната група, # $p < 0.05$ спрямо група МС

Показател	Контрола	МС	МС+ПСАМ _{2.5}	МС+ПСАМ ₅	МС+ПСАМ ₁₀
Продължителност на социалното взаимодействие (секунди) (Mean $\pm$ SEM)	28.96 $\pm$ 1.89	20.73 $\pm$ 1.86*	29.63 $\pm$ 2.21#	24.09 $\pm$ 3.49	24.93 $\pm$ 3.13



Фигура 2. Време (секунди), прекарано в социално взаимодействие при плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; * $p < 0.05$ спрямо контролната група, # $p < 0.05$ спрямо група МС

One-way ANOVA отчита значима разлика сред групите във времето, прекарано в социално взаимодействие. Последващ Dunnett's анализ показва значително намаление (с 28.4%) на социалното взаимодействие с тест-партньор на плъховете от група МС ($p < 0.05$ спрямо контролната група). Третираниите с ПСАМ групи показват по-продължително време на социално взаимодействие като ефектът е значим в група

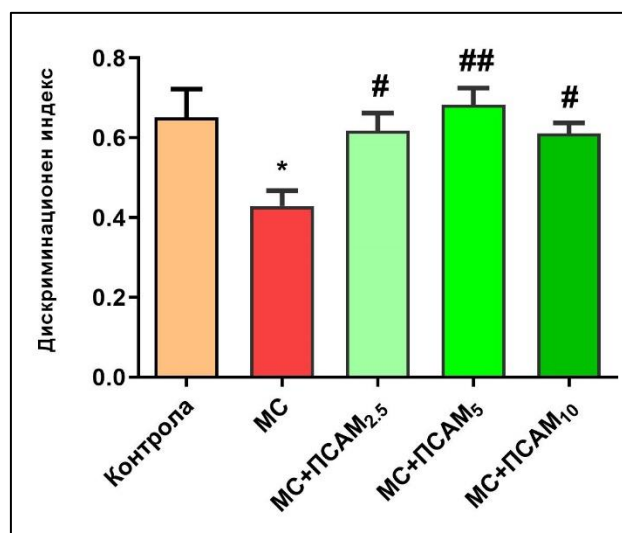
МС+ПСАМ_{2.5} ($p < 0.05$ спрямо група МС) (подобрене с 43%). Освен това, между трите третиранни с ПСАМ групи и контролата липсва значима разлика във времето, прекарано в социално взаимодействие (**Фигура 2**).

1.2. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* в тест за разпознаване на мястото на предмети

Резултатите са отразени в **Таблица 7** и на **Фигура 3**.

Таблица 7. Дискриминационен индекс на плъхове с диетично-индуциран МС, третиранни с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; * $p < 0.05$ спрямо контролната група, # $p < 0.05$ спрямо група МС, ## $p < 0.01$ спрямо група МС

Показател	Контрола	МС	МС+ПСАМ _{2.5}	МС+ПСАМ ₅	МС+ПСАМ ₁₀
В/ (А+В) (Mean±SEM)	0.65±0.07	0.44±0.04*	0.62±0.05#	0.68±0.04##	0.61±0.03#



Фигура 3. Дискриминационен индекс при плъхове с диетично-индуциран МС, третиранни с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; * $p < 0.05$ спрямо контролната група, # $p < 0.05$ спрямо група МС, ## $p < 0.01$ спрямо група МС

One-way ANOVA анализът откроява значителна разлика между групите ($p=0.0076$). Dunnett post-hoc тест показва значително нарушение в пространствената памет на плъховете от група МС - дискриминационният индекс при МС плъховете намалява с

32.3% ($p < 0.05$ спрямо контролната група). Значително подобрене в пространствената памет е документирано при плъховете от всички групи, третирани с ПСАМ - в група МС+ПСАМ_{2.5} индексът се повишава с 40.9% ($p < 0.05$ спрямо група МС), в група МС+ПСАМ₅ - с 54.5 % ($p < 0.01$ спрямо група МС) и в група МС+ПСАМ₁₀ – с 38,6 % ($p < 0.05$ спрямо група МС). Освен това, при животните, третирани с арониев сок, липсва статистическа разлика в индекса спрямо контролните животни.

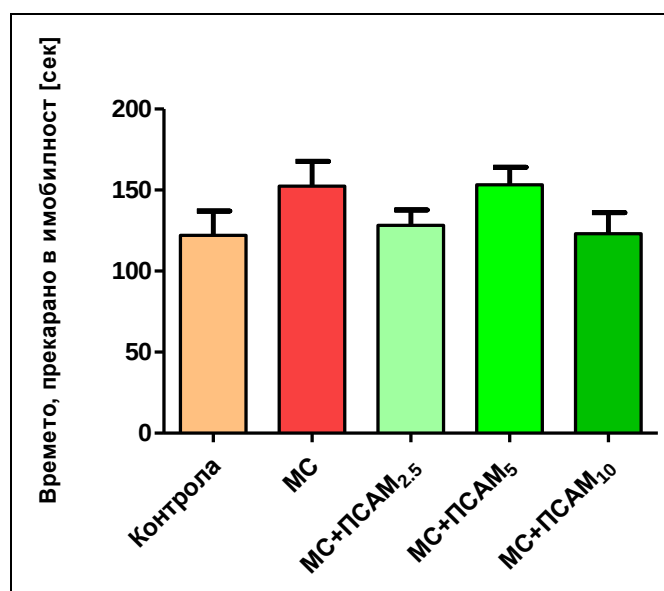
1.3. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* в тест за принудително плуване

Резултатите от теста за принудително плуване са отразени в **Таблица 13** и **Фигура 4**.

След направеният статистически анализ не се установява значителна разлика във времето, прекарано в имобилност сред тестваните експериментални групи.

Таблица 8. Време, прекарано в имобилност (секунди) в тест за принудително плуване при плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг

Показател	Контрола	МС	МС+ПСАМ _{2.5}	МС+ПСАМ ₅	МС+ПСАМ ₁₀	One-way ANOVA (p)
Времето на имобилност (секунди) (Mean±SEM)	122.1±42.22	152.4±48.30	128.3±27.03	153.2±34.54	123.1±36.83	0.2276



Фигура 4. Време, прекарано в имобилност (секунди) в тест за принудително плуване при плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг

1.4. Обсъждане

Все повече доказателства демонстрират връзката между МС, затлъстяването, захарния диабет и неврокогнитивните нарушения. Общите характеристики на тези състояния включват ИР, митохондриална дисфункция и оксидативен стрес (Cardoso and Moreira, 2019).

Отдавна се смята, че черният дроб, мастната тъкан и скелетната мускулатура са „класическите таргети“ на инсулин, а мозъкът се счита за „чувствителен към инсулин“ орган. Новопоявилите се данни показват, че инсулинът играе значителна роля в регулирането на мозъчните функции (Gray et al., 2014), като влияе върху приема на храна и енергийната хомеостаза, чувствителността към миризми, преживяемостта на невроните, както и на удължаването и формирането на невроналните дендрити (Cardoso et al., 2009; Kellar and Craft, 2020; Taouis and Torres-Aleman, 2019). „Мозъчна“ ИР се счита за модерна концепция в патогенезата на МС и свързаните с него нарушения (Kellar and Craft, 2020). В такова резистентно състояние дисрегулацията на инсулиновия сигнален път нарушава мозъчния енергиен метаболизъм и експресията на инсулин-чувствителни гени, регулиращи когнитивните функции, и повишава оксидативния стрес. Интересното е, че периферната ИР влияе върху мозъчната ИР или служи като нейн индиректен индикатор. В подкрепа на това има данни, показващи, че синаптичната пластичност и когнитивната функция корелират негативно с хипергликемията и периферната ИР при животински модели на затлъстяване или захарен диабет (Cardoso and Moreira, 2019). Такава връзка е документирана в модели на МС, индуцирани от диета с високо съдържание на мазнини при плъхове (Carvalho et al., 2015; Sa-Nguanmoo et al., 2016; Sa-Nguanmoo et al., 2017). Клинично тези връзки са демонстрирани от проучване при пациенти с предиабетни състояния, което разкрива, че ИР е основният предиктор за намаляване на паметта (Willmann et al., 2020).

Митохондриите са основният източник на клетъчна енергия. Освен тази тяхна основна функция, те регулират термогенезата, апоптозата на клетките, калциевата хомеостаза, генерират и обезвреждат РКФ (Mahjoub and Masrour-Roudsari, 2012).

Митохондриалната дисфункция се счита обща патофизиологична характеристика на МС (Dorszewska and Kozubski, 2018) и неврокогнитивните нарушения (Guo et al., 2013). Вследствие на нарушена митохондриална функция окислителното увреждане може да засили увреждането на невроните и да предизвика невродегенерация. В

експериментални модели на затлъстяване, захарен диабет или МС (състояния, характеризиращи се с оксидативен стрес) (Asmat et al., 2016; Mahjoub and Masrour-Roudsari, 2012; Marseglia et al., 2014) е доказано, че когнитивната активност корелира негативно с оксидативния стрес (Kim et al., 2016; Pintana et al., 2014).

Тревожността е нормален емоционален отговор към реална или потенциална заплаха, но когато е крайна и продължителна, се счита за патологична. Тревожните разстройства са сред най-честите психиатрични разстройства в световен мащаб. Освен това, съществува и висок риск от развитие на други психиатрични заболявания като депресивни разстройства (Ströhle et al., 2018). Асоциацията на МС с депресия и тревожност е фокус на значителен интерес. Докато епидемиологични наблюдения и проучвания потвърждават връзката на МС с депресивните разстройства (Pan et al., 2012; Skilton et al., 2007), връзката с тревожността е дискутабилна. Въпреки преобладаващите отрицателни резултати, скорошен мета-анализ съобщава за значителна връзка между тревожност и МС (Tang et al., 2017). Интересното е, че в едно проучване са установени възрастови различия, като тревожността е по-честа при възрастни с МС, а депресивно поведение е преобладаващо при деца (Kahl et al., 2015). Връзката между МС и тревожните състояния изглежда е двупосочна: тревожността повишава нивото на хормона на стреса кортизол, а кортизолът стимулира висцералната адипогенеза. Освен това се предполага, че IL, секретирани от висцералната мастна тъкан, са в състояние да стимулират освобождаването на кортизол. По този начин антагонизмът на IL при хора със затлъстяване се свързва с намаляване в нивото на кортизол, систоличното АН и сърдечната честота (Urwyler et al., 2017). ИР би могла да се бъде друга връзка между разстройства на настроението и МС, тъй като Grillo et al. установяват, че понижената регулация на инсулиновите рецептори в хипоталамуса е свързана с по-висок риск от депресия и тревожност (Grillo et al., 2011; Grillo et al., 2011; Grillo et al., 2007). Освен това е установена корелация между липидната пероксидация и характеристиките на тревожност и депресия при плъхове с диетично-индуциран МС (Gancheva et al., 2015).

Настоящото изследване има за цел да се тестват ефектите на ПСАМ върху поведението на плъхове с диетично-индуциран МС.

Установено е, че при опитни животни ВМВФ диета, описана в настоящото изследване, е в състояние да предизвика симптоми на МС като висцерално затлъстяване, нарушен

глюкозен толеранс, ИР, повишени ТГ и оксидативен стрес (Gancheva et al., 2015). От друга страна, ефектите на ПСАМ върху нарушенията на паметта и настроението са тествани по-рано в различни експериментални условия. За доказване на способността на плодовият сок да подобри заучаването и паметта при здрави плъхове е използвана двустранната задача за активно избягване (Valcheva-Kuzmanova et al., 2013) или тест за пасивно избягване (Valcheva-Kuzmanova et al., 2014b). Анксиолитични ефекти също са демонстрирани чрез използване на SIT и тест повдигнат кръстосан лабиринт при млади, здрави мъжки плъхове, както и антидепресивна активност във FST след еднократно или продължително приложение на ПСАМ (Eftimov and Valcheva-Kuzmanova, 2013; Valcheva-Kuzmanova et al., 2013; Valcheva-Kuzmanova and Zhelyazkova-Savova, 2009). Освен това е открито, че ПСАМ проявява противовъзпалителни и антиоксидантни ефекти, както *in vivo*, така и в *in vitro* условия (Olas et al., 2008; Valcheva-Kuzmanova et al., 2018; Valcheva-Kuzmanova et al., 2014a). Подобни резултати са докладвани от други автори в различни експериментални и клинични проучвания (Banach et al., 2020; Ryszawa et al., 2006; Zielinska-Przyjemska et al., 2007).

В настоящото изследване най-забележимите поведенчески промени в група МС са изразеното тревожно поведение, демонстрирано в SIT и нарушението на паметта, наблюдавано в PRT. Тестът на Porsolt не демонстрира значително депресивно-подобно състояние, предизвикано от диета, въпреки увеличаването на времето на имобилност в група МС.

На фона на повишената тревожност, причинена от консумацията на ВМВФ диета, прилагането на ПСАМ ефективно нормализира поведението на плъховете в най-ниската използвана доза, както е оценено от SIT. Като се има предвид ролята на оксидативния стрес (Bouayed et al., 2009) и вероятно също на възпалението (Vogelzangs et al., 2013) в генезата на тревожността, защитният ефект на ПСАМ може да бъде свързан с потискане на тези патогенетични механизми. Освен това, в наши предходни проучвания е доказано, че ВМВФ диета причинява повишаване на липидната пероксидация, което корелира с нивото на тревожност при плъхове (Gancheva et al., 2015).

Антиоксидантните и противовъзпалителните действия на ПСАМ са правдоподобно обяснение на резултатите от теста за пространствена памет, където се наблюдава значително подобрене при всички използвани дози, антагонизиращи вредния ефект от

диетата. Известно е, че пространствената памет е чувствителна към манипулации с калорични диети (McNay et al., 2010). Следователно антиамнестичният ефект в нашето изследване може да бъде свързан с антиоксидантната активност на ПСАМ. Доказано е, че сокът от Арония противодейства на намаляването на параоксоназната активност в мозъчната тъкан на плъхове, хранени с ВМВФ диета (Francik et al., 2014).

Невропротективните ефекти на екстракта от арония са демонстрирани и върху клетки от хипокамп на мишки в *in vitro* условия (Lee et al., 2017), където глутамат-индуцираната клетъчна смърт, продукцията на РКФ и вътреклетъчните нива на калций са потиснати, съпроводени с повишаване на активността на антиоксидантните ензими GPx и глутатион редуктаза. Ролята на арониевите антоцианини върху когнитивно-подобряващия ефект е оценена от Wen et al. в модел на амилоид-бета (A β)-индуцирани паметови нарушения при плъхове. Наблюдавано е, че третирането с пречистени антоцианини е свързано с подобрена пространствена памет в теста за воден лабиринт на Морис, както и със защита на хипокампаалните клетки от A β -индуцирана токсичност (Wen et al., 2020). В друго проучване е изследван ефектът на антоцианини, получени от Арония, върху свързаните с възрастта дегенеративни промени в мозъка на плъхове, предизвикани от инжектирането на D-галактоза. Добавянето на антоцианини предотвратява свързания с възрастта когнитивен спад и подобрява антиоксидантната защита на невроните, както се вижда от намаленото ниво на MDA и повишената активност на SOD и GPx (Wei J et al., 2017).

Като се има предвид ролята, която ИР играе в развитието на когнитивни нарушения, тя може да се разглежда като таргет, чрез която ПСАМ може да подобри невро-поведенческите промени, предизвикани от ВМВФ диета. Ефектите на *Aronia melanocarpa* върху ИР са изследвани в предклинични проучвания. При T23D, индуциран от богата на фруктоза диета или стрептозотоцин при плъхове, 8-седмичното лечение с екстракт от *Aronia melanocarpa* значително намалява нивата на инсулин и стойността на НОМА-IR, подобрява глюкозния толеранс и повишава съдържанието на гликоген в черния дроб (Mu J et al., 2020). Kim et al. демонстрират, че метанолов екстракт от *Aronia melanocarpa* модулира адипогенезата и подобрява ИР при индуцирано от високофруктозна диета затлъстяване при мишки. Тези ефекти са придружени от подобряване на липидния профил с намаляване на серумните ТГ и LDL (Kim et al., 2018).

Резултатите от този експеримент, показващи подобрене на поведенческите индекси, компрометирани от приема на ВМВФ диета при плъхове, са напълно в съответствие с известните антиоксидантни, противовъзпалителни и благоприятни метаболитни ефекти на ПСАМ.

2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху биохимични маркери на енергийния метаболизъм

2.1. Ефекти на плодов сок от Aronia melanocarpa върху нивото на кръвната глюкоза в хода на глюкозо-толерансен тест

2.1.1. Резултати

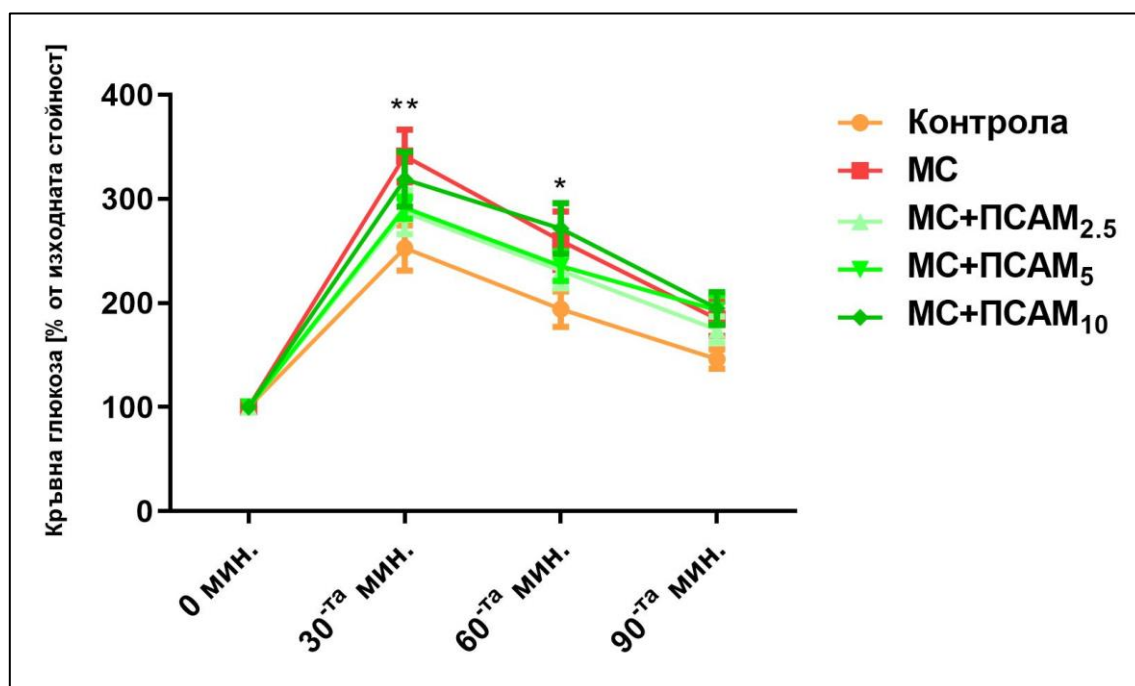
Резултатите от ГТТ са представени в **Таблица 9** и на **Фигура 5**.

Статистическият анализ със Student's t-test открива гранична значимост ($p=0.059$) в абсолютните стойности на серумната глюкоза (ммол/л) на 30. минута в хода на ГТТ между контролната група и група МС. Представени като процент от изходната стойност (%) за същия времеви интервал се открива значимо повишение в глюкозните нива в група МС в сравнение с контролната група ($p < 0.05$).

Two-way ANOVA анализ с последващ Dunnett тест показват значимо повишение (изразено като процент от изходната стойност) в кръвната глюкоза на плъховете от група МС в сравнение с плъховете от контролната група. Такава значимост се открива на 30. минута ($p < 0.01$ спрямо контролната група) и на 60. минута ($p < 0.05$ спрямо контролната група) след интраперитонеалната глюкозна инжекция. Въпреки липсата на значимо подобрене на гликемията при третираните с плодов сок животни, глюкозните нива на плъховете от групи МС+ПСАМ_{2,5} и МС+ПСАМ₅ на 30-та и 60-та са сходни на тези на плъховете от контролната група.

Таблица 9. Ниво на кръвната глюкоза в хода на глюкозо-толерансен тест, представено като абсолютни стойности (ммол/л) и процент (%) от изходната стойност на 30^{-та}, 60^{-та} и 90^{-та} минута, при плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; ^(&)p=0.059 спрямо контролната група, [&]p < 0.05 спрямо контролната група – съгласно Student's t-test анализ; *p < 0.05 спрямо контролната група, **p < 0.01 спрямо контролната група – съгласно two-way ANOVA

	30 ^{-та} минута		60 ^{-та} минута		90 ^{-та} минута	
	ммол/л	% от изходната стойност	ммол/л	% от изходната стойност	ммол/л	% от изходната стойност
Контролна	15±1.11	252.7±21.76	11.35±0.77	194.1±17.22	8.51±0.51	146.1±9.33
МС	18.19±1.05 ^(&)	341.1±25.28 ^{&**}	13.13±1.16	259.8±28.08 [*]	9.35±0.63	184.9±16.41
МС+ПСАМ _{2.5}	15.48±1.13	287.2±21.00	12.36±0.66	231.2±17.18	9.34±0.51	174.5±12.70
МС+ПСАМ ₅	14.19±0.73	291.6±10.71	11.59±1.12	235.6±14.53	9.34±0.61	193.1±14.19
МС+ПСАМ ₁₀	17.03±1.35	318.9±26.28	14.11±0.98	271.5±24.27	10.21±0.54	194.7±15.79



Фигура 5. Нивото на кръвната глюкоза в хода на глюкозо-толерансен тест, представено като процент (%) от изходната стойност на 0^{-та}, 30^{-та}, 60^{-та} и 90^{-та} минута при плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; *p < 0.05 - група МС спрямо контролната група, **p < 0.01 – група МС спрямо контролната група : two-way ANOVA

2.1.2. Обсъждане

Гликемичните нарушения са водеща причина за ускоряване на атеросклеротичния процес (Aronson and Rayfield, 2002) и увеличаване на риска от сърдечно-съдови и мозъчно-съдови заболявания и инциденти при лица, засегнати от МС и/или ЗД. Интервенциите, целящи нормализиране на глюкозния толеранс, биха намалили тези рискове.

Традиционно, ИР се разглежда като основния патогенетичен механизъм в развитието на гликемични нарушения при лица с МС. Най-често използваният метод за оценка на инсулиновата резистентност при опитни животни е ГТТ. Доказано е, че ВМВФ диета, използвана в това проучване, индуцира ИР и хипергликемия (Gancheva et al., 2015). Резултатите от настоящото проучване потвърждават тези резултати, тъй като МС нарушава глюкозния контрол и вероятно предизвиква ИР след 10-седмичен експериментален период. ПСАМ подобрява тази нарушена регулация чрез отслабване на ефекта на ВМВФ диета, като по този начин поддържа глюкозата на нива, които не се различават от контролните стойности. Глюкозо-понижаващият ефект на ПСАМ е демонстриран в експериментален модел на захарен диабет (Valcheva-Kuzmanova et al., 2007c). От една страна, влиянието на *Aronia melanocarpa* върху кръвната глюкоза може да се обясни с потенциалния инсулин-очувствяващ ефект след субхроничен период на лечение. Съгласно наличните литературни данни, *Aronia melanocarpa* и нейните фенолни съединения могат да стимулират чернодробните ефекти на инсулин (гликогеногенеза) и да намалят нивото на серумната глюкоза (Mu et al., 2020). От друга страна, механизмите, свързани с усвояването и транспорта на въглехидратите, е възможно да бъдат въввлечени в глюкозопонижаващия ефект на сока. Алфа-глюкозидазата е ензим, отговорен за разграждането и усвояването на въглехидратите в тънкото черво. По този начин неговото инхибиране може да намали глюкозното ниво. Инхибиране на α -глюкозидазата активност е демонстрирана за сок от арония (Yamane et al., 2017) и екстракт от плодове от *Aronia melanocarpa* (Bräunlich M et al., 2013). Авторите установяват, че тези ефекти са най-силно изразени при антоцианините цианидин 3-арабинозид и най-слабо изразени при цианидин 3-ксилозид (Bräunlich M et al., 2013). Сокът, използван в това проучване, притежава високо съдържание на цианидин 3-арабинозид. Потенциалният хипогликемичен ефект на сока може да се дължи още на стимулиране на инсулиновата секреция, тъй като плодовете на *Aronia melanocarpa* са изключително богати на антоцианини, които демонстрират такъв ефект

in vitro (Jayaprakasam et al., 2005). Освен това, в модел на стрептозотоцин-индуциран Т13Д е потвърден бета-клетъчният протективен ефект на *Aronia melanocarpa* (Jeon YD et al., 2018), което на практика означава подобрена инсулинова секреция. DPP-IV-инхибиторната активност на сока от арония е докладвана от Yamane et al. (2017). Благоприятните ефекти на ПСАМ върху гликемичния контрол са докладвани в клинични проучвания при пациенти със Т23Д – значително намаляване на кръвната глюкоза и нивото на гликирания хемоглобин е наблюдавано от Simeonov et al. (Simeonov et al., 2002) и Milutinovic et al. (Milutinovic et al., 2019).

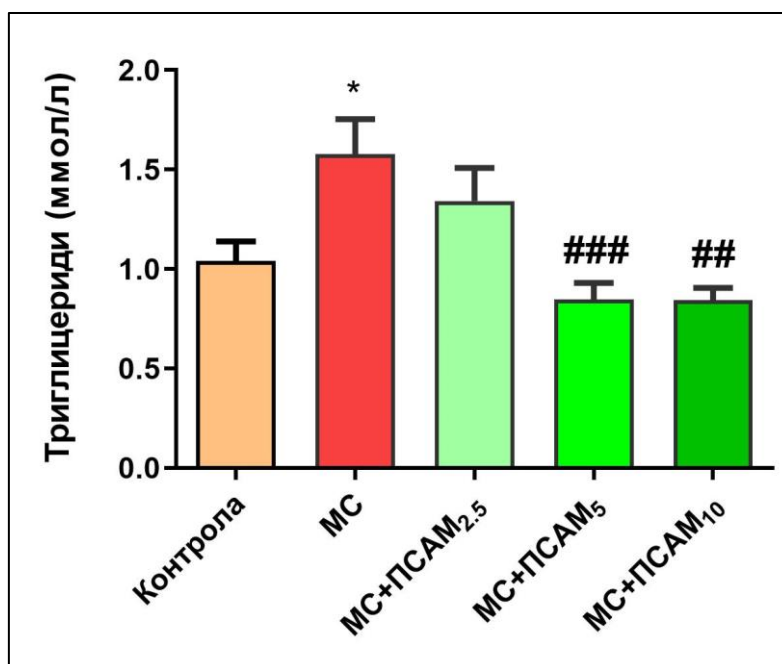
2.2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху серумните триглицериди

2.2.1. Резултати

Резултатите са представени в **Таблица 10** и на **Фигура 6**. ВМВФ диета при плъховете от МС група води до значимо повишаване (с 51.9%) на нивото на серумните ТГ ($p < 0.05$ спрямо контролната група). Третирането с ПСАМ повлиява благоприятно ТГ и доза-зависимо намалява техните нива – животните от групи МС+ПСАМ₅ и МС+ПСАМ₁₀ са със значимо по-ниски стойности (съответно $p < 0.001$ и $p < 0.01$ спрямо група МС), като в тези две групи се регистрира 46.2% редукция в нивата. ПСАМ антагонизира хипертриглицеридемичният ефект на ВМВФ-диетата и в трите третиранни с ПСАМ групи стойностите на ТГ не се различават значимо от тези на контролната група.

Таблица 10. Нива на серумни триглицериди (ТГ, ммол/л) при плъхове с диетично-индуциран МС, третиранни с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; * $p < 0.05$ спрямо контролната група, ^{##} $p < 0.01$ спрямо МС, ^{###} $p < 0.001$ спрямо МС

	Контрола	МС	МС+ПСАМ _{2.5}	МС+ПСАМ ₅	МС+ПСАМ ₁₀
ТГ (ммол/л)	1.04±0.10	1.58±0.17*	1.34±0.17	0.85±0.08 ^{###}	0.85±0.06 ^{##}
Mean±SEM					



Фигура 6. Нива на серумни триглицериди (ммол/л) в модел на диетично-индуциран МС при плъхове, третирани с РСАМ в дози 2.5, 5 и 10 мл/кг; * $p < 0.05$ спрямо контролната група, ## $p < 0.01$ спрямо МС, ### $p < 0.001$ спрямо МС

2.2.2. Обсъждане

Дислипидемията, свързана се с МС, се характеризира с големи по размер VLDL частици, които индуцират продукцията на атерогенни LDL и занижени нива на протективните HDL-частици. Тези фактори директно оказват влияние върху атерогенния риск и развитието на АСССБ. В допълнение, скорошно проучване доказва, че завишените стойности при МС лица представляват независим рисков фактор и за активиране на тромбоцитната агрегация (Wang et al., 2020). Хипертриглицеридемията представлява едновременно компонент и рисков фактор за МС (Nilsson et al., 2019). Освен това, отдавна е известно, че високите стойности на ТГ са идентифицирани като рисков фактор за развитие на остър панкреатит (Yang and McNabb-Baltar, 2020).

Основната цел при фармакологичното лечение е намаляване риска от развитие на остър панкреатит при пациенти с изразена хипертриглицеридемия и на сърдечно-съдовите заболявания при пациенти с умерена хипертриглицеридемия (Simha, 2020).

Понастоящем в контрола на серумните нива на ТГ се използват фибрати, статини, омега-3 мастни киселини, ezetimibe и PCSK9-инхибитори. В допълнение, хипертриглицеридемията би могла да бъде контролирана с оптимизиране на начина на

живот, а именно чрез повишаване на физическата активност и избягване на продължителни периоди на обездвижване, избягване на консумацията на алкохол, контрол на кръвната глюкоза (при лица с предиабетни състояния/ЗД) и оптимален диетичен режим (Parhofer and Laufs, 2019).

Наличните до момента научни данни показват, че ПФ, съдържащи се в *Aronia melanocarpa*, упражняват антихипертриглицеридемичен ефект (Jurendić and Ščetar, 2021). Изхождайки от този факт, си поставихме за цел да проучим ефекта на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху серумните нива на ТГ при плъхове с диетично-индуциран МС.

В настоящото проучване ВМВФ-диета предизвиква забележимо увеличение на серумните ТГ (един от компонентите на МС) в група МС. Лечението с ПСАМ предотвратява повишаването на нивата на ТГ във всички третирани групи.

Механизмите, лежащи в основата на този ефект, могат да бъдат потърсени във влиянието на ПСАМ върху чревната абсорбция на липиди и чернодробния липиден метаболизъм. Мазнините, приети с храната, се разграждат в тънкото черво от панкреатичния ензим липаза до СМК, които се абсорбират след образуване на мицели от жлъчна киселина. Takaashi et al. (2015) съобщават, че богатите на антоцианини арониеви плодове инхибират активността на панкреатичната липаза, усвояването на хранителните мазнини и потискат постпрандиалната хиперлипидемия (Takahashi et al., 2015). Fatty acid synthase (FAS) е ензим, отговорен за чернодробната *de novo* липогенеза. ТГ се синтезират в черния дроб от натрупаните СМК. PPAR-γ, представляващ чернодробен транскрипционен фактор, регулира диференциацията на преадипоцитите, но също и хепаталния липопротеинов метаболизъм и липолизата. PPAR-γ индуцира активността на LPL и корелира положително с експресията на PPAR и образуването на липидни включвания в хепатоцитите. Установено е, че *Aronia melanocarpa* намалява експресията на PPAR-γ и FAS (Park et al., 2017). Тези събития могат да намалят притока на СМК в черния дроб и да намалят чернодробната синтеза на ТГ.

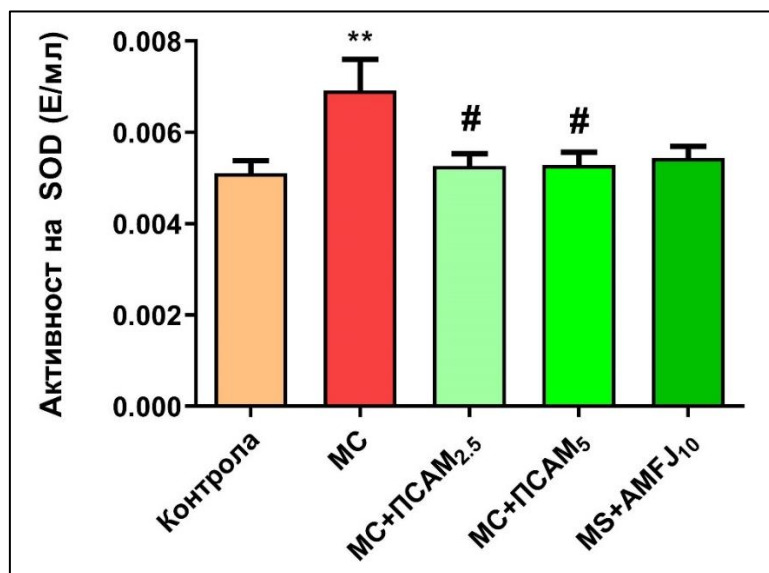
3. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху антиоксидантни ензими

3.1. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху активността на SOD

Резултатите са отразени в **Таблица 11** и на **Фигура 7**. One-way ANOVA показва статистически значими разлики между групите ($p=0.0174$), като последващия анализ с Dunnett's multiple comparison post-hoc тест отчита значимо по-висока активност на ензима в група МС (повишение с 35.3%) в сравнение с контролната група ($p < 0.01$). Третирането с ПСАМ намалява активността на антиоксидантния ензим спрямо МС групата, като ефектът е най-значим в групи МС+ПСАМ_{2.5} и МС+ПСАМ₅ ($p < 0.05$ спрямо група МС) – и в двете групи редукцията на активността на ензима е с 23.2%. Активността на SOD във всички третирани с ПСАМ групи е подобна на тази, наблюдавана при контролната група.

Таблица 11. Активност на SOD (Е/мл) в серум на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; ** $p < 0.01$ спрямо контролната група, # $p < 0.05$ спрямо група МС

	Контрола	МС	МС+ПСАМ _{2.5}	МС+ПСАМ ₅	МС+ПСАМ ₁₀
Активност на GPx (Е/мл)	0.0051±0.0003	0.0069±0.0007**	0.0053±0.0003#	0.0053±0.0003#	0.0054±0.0003
Mean±SEM					



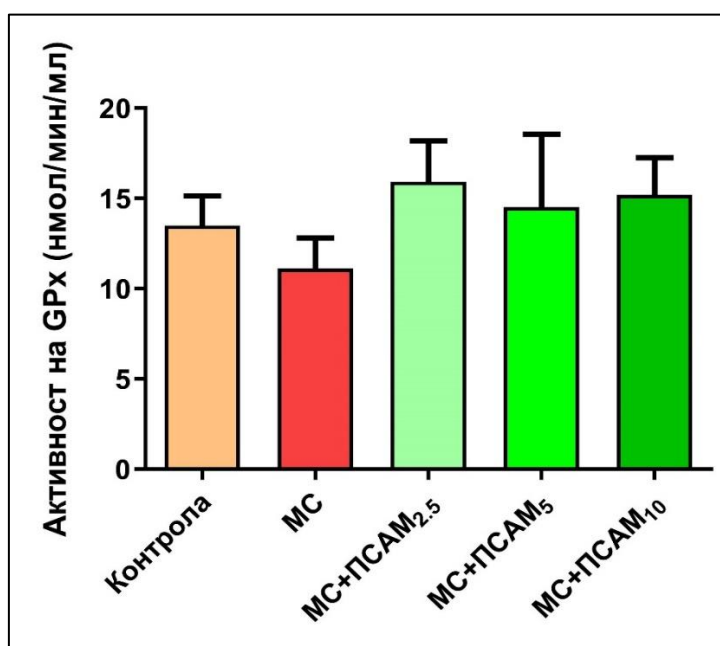
Фигура 7. Активност на SOD (Е/мл) в серум на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; ** $p < 0.01$ спрямо контролната група; # $p < 0.05$ спрямо група МС

3.2. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху GPx

Данните са показани в **Таблица 12** и **Фигура 8**. Въпреки тенденцията за повишаване на активността на ензима в третираните с ПСАМ групи, статистическият анализ не установява значима разлика сред тестваните експериментални групи.

Таблица 12. Активност на GPx (нмол/мин/мл) в серум на плъхове с диетично-индуциран МС, третиран с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг

	Контрола	МС	МС+ПСАМ _{2.5}	МС+ПСАМ ₅	МС+ПСАМ ₁₀	One-way ANOVA
Активност на GPx (нмол/мин/мл)	13.50±1.64	11.11±1.71	15.92±2.27	14.50±4.05	15.20±2.06	p=0.7067
Mean±SEM						



Фигура 8. Активност на GPx (нмол/мин/мл) в серум на плъхове с диетично-индуциран МС, третиран с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг

3.3. Обсъждане

Редица експериментални и клинични проучвания показват, че ИР, възпалението и оксидативният стрес играят ключова роля в патогенезата на МС. Висцералната мастна

тъкан е важен източник на РКФ и допринася за развитието на нискостепенно възпаление при МС. От една страна, оксидативният стрес е свързан с възпалителен отговор, активиран от *up*-регулацията на NF-κB. Този фактор контролира транскрипцията на гени, регулиращи продукцията на про-инфламаторни фактори – цитокини и адхезионни молекули (Marseglia et al., 2014; Hussain et al., 2016). От друга страна, възпалителният процес предизвиква оксидативен стрес. Провъзпалителните цитокини като TNF-α, IL-1β и IL-6, които се секретират от ексцесивното количество висцерална мастна тъкан, задълбочават оксидативния стрес чрез свързване със специфични рецептори и стимулиране на NF-κB сигналния път, като по този начин индуцират генериране на РКФ (Marseglia et al., 2014). В допълнение, проучванията показват също, че концентрацията на ендогенните антиоксиданти и активността на антиоксидантните ензими обикновено са намалени при МС (Ford et al., 2003; Hansel et al., 2004; Liu Y et al., 2020).

Предишно проучване показва, че МС, индуцирана от висококалорична диета, е способна да предизвика оксидативен стрес и повишена липидна пероксидация (измерена чрез нивата на TBARS) при плъхове (Gancheva et al., 2017). Въз основа на тези данни, в настоящото изследване нашата цел бе да се определи активността на ендогенните антиоксидантни ензими SOD и GPx при диетично-индуциран МС при плъхове. Настоящото проучване показва, че активността на SOD е по-висока в МС групата в сравнение с други групи, докато разлика в активността на GPx не е наблюдавана. Тези резултати са в съответствие с проучването на Vavrova et al., които също документират повишена активност на SOD и непроменена активност на GPx при пациенти с МС (Vávrová et al., 2013). Интересното е, че Yubero-Serrano et al. установяват връзка между броя на компонентите на МС и активността на SOD и предполагат, че ензимната активност може да се използва като инструмент за определяне на степента на оксидативния стрес при МС (Yubero-Serrano et al., 2013). Други експериментални и клинични проучвания също разкриват връзка между затлъстяването и повишената активност на SOD (Stefanović et al., 2008; Fujita et al., 2005). При физиологични условия малки количества супероксидни радикали се продуцират по време на автоокислението на глюкозата и клетъчното дишане в митохондриите. Ензими като NADPH оксидаза, ксантинооксидаза, COX и липоксигеназа могат допълнително да допринесат за генерирането на супероксид. Този радикал се инактивира от SOD до водороден пероксид, който впоследствие се превръща във вода

посредством действието на каталаза, GPx или тиоредоксин (Mahjoub and Masroug-Roudsari, 2012). Известно е, че повишеният хранителен прием (особено диета с високо съдържание на мазнини) увеличава активността на ензима NADPH оксидаза (DeVallance et al., 2019). Бихме могли да изградим хипотеза, че ВМВФ диета, прилагана на животни с МС в настоящия експеримент, индуцира продукцията на супероксид и компенсаторно повишава активността на SOD, целейки да инактивира радикала.

ПФ са голяма група от химични съединения, притежаващи два или повече фенолни пръстена и широко разпространени в природата. Мощното антиоксидантно действие на тези съединения се дължи на способността им да неутрализират свободните радикали чрез даряване на електрон или водороден атом (Tsao R, 2010). Плодовете на *Aronia melanocarpa* съдържат голямо количество ПФ и проявяват силни антиоксидантни свойства. Различни *in vitro* проучвания демонстрират способността на *Aronia* да свързва и инактивира различни радикали, включително супероксиден анион, хидроксилен радикал и реактивни азотни форми. В допълнение, ПФ, съдържащи се в *Aronia*, са мощни инхибитори на липидната пероксидация и потискат образуването на РКФ и реактивни азотни форми (Banach et al., 2020; Valcheva-Kuzmanova et al., 2007a; Valcheva-Kuzmanova S et al., 2014a, Valcheva-Kuzmanova et al., 2012). Редица експериментални проучвания демонстрират способността на ПСАМ да потиска оксидативния стрес (Valcheva-Kuzmanova, 2015; Kondeva-Burdina et al., 2015; Valcheva-Kuzmanova et al., 2014a; Valcheva-Kuzmanova et al., 2018; Valcheva-Kuzmanova et al., 2012) и да облекчава свързаните с него патологични състояния.

В настоящото проучване е оценен ефектът на ПСАМ върху активността на антиоксидантните защитни ензими SOD и GPx при животни с МС, предизвикана от ВМВФ диета. Плъховете, получаващи ВМВФ диета, след третиране с ПСАМ демонстрират по-ниска активност на SOD в сравнение с нетретираните със сока МС плъхове, като ефектът е значим в групи МС + ПСАМ_{2.5} и МС + ПСАМ₅. Важно е да се отбележи, че активността на SOD при всички третиране с ПСАМ животни е подобна на тази на контролните плъхове, получаващи обикновена лабораторна диета. Можем да обясним нашите резултати с мощната антиоксидантната активност на ПФ, присъстващи в плодовете. ПСАМ е възможно да противодейства на оксидативния стрес, индуциран от ВМВФ диета, да предотврати продукцията на супероксид и последващото компенсаторно активиране на SOD при плъховете, третирани с ПСАМ.

Активността на GPx остава непроменена в настоящето проучване. Нито ВМВФ диета, нито третирането с ПСАМ повлияват активността на този ензим. Възможно обяснение на наблюдавания резултат може да се намери във връзката между функцията на GPx и оксидативния стрес, свързан с МС. GPx действа като антиоксидантен ензим, залавящ продуктите на липидната пероксидация. Измерването и количественото определяне на липидната пероксидация може да се постигне чрез анализи на MDA, TBARS или изопростани (Gaschler and Stockwell, 2017; Montuschi et al., 2004). Въпреки че тези маркери не са тествани в този експеримент, има проучвания, разкриващи, че липидна пероксидация не се наблюдава задължително при затлъстяване и ЗД, предизвикани от високо съдържание на мазнини (Boyne et al., 2007; Sohet et al., 2009) (и вероятно при МС) и нивата на MDA, TBARS или изопростани (маркери за липидна пероксидация) са ниски. Този факт може да се обясни с наличието на витамин Е в мазнините, използвани като компонент на диети с високо съдържание на мазнини за индуциране на тези патологични състояния (Traber and Atkinson, 2007), тъй като витамин Е може да интерферира със серумната GPx активност.

4. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху мастната тъкан

4.1. Мастнотъканни индекси

Резултатите са отразени в **Таблица 13 и Фигура 9**.

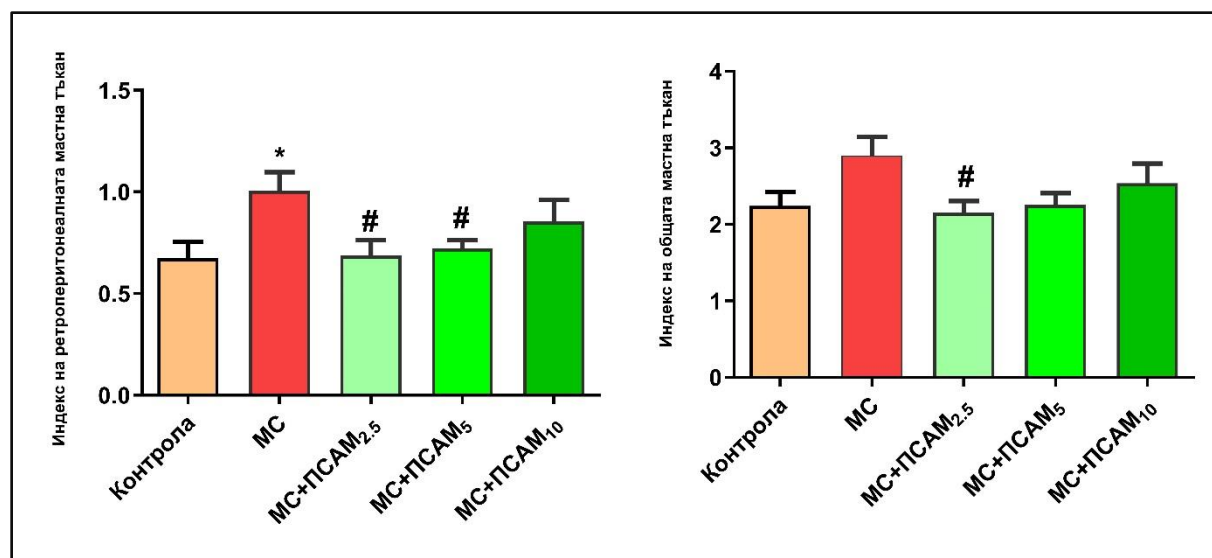
Индексът на ретроперитонеалната мастна тъкан в група МС е значително по-висок от този на плъховете от контролната група – регистрира се увеличение в стойността с 49.3% ($p < 0.05$ спрямо контролната група). В сравнение с група МС третираните с ПСАМ животни имат по-малко количество ретроперитонеалната мастна тъкан, като ефектът е значим в групи МС+ПСАМ_{2.5} и МС+ПСАМ₅ - понижението е съответно с 44.9% ($p < 0.05$ спрямо група МС) и 38.9% ($p < 0.05$ спрямо група МС). Прави впечатление, че индексът при всички третирани с ПСАМ групи не се различава значимо от този на контролната група (**Фигура 9**).

Липсва значимост в индекса на общата мастна тъкан между контролната и МС група. Наблюдава се тенденция на намаление на индекса след третиране с ПСАМ, като Dunnett post-hoc анализът отчита значително по-нисък индекс в група МС+ПСАМ_{2.5} (редукция с 34.9%) в сравнение с група МС ($p < 0.05$). Във всички третирани групи, индексът на общата мастна тъкан е със стойности, близки до тези на контролната група (**Фигура 9**).

Статистическият анализ не открива значими разлики в индексите на перигонадната, паранефралната и мезентериалната мастна тъкан.

Таблица 13. Индекси на мезентериалната, паранефралната, перигонадната, ретроперитонеалната и общата мастна тъкан при плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; * $p < 0.05$ спрямо контролната група, # $p < 0.05$ спрямо група МС

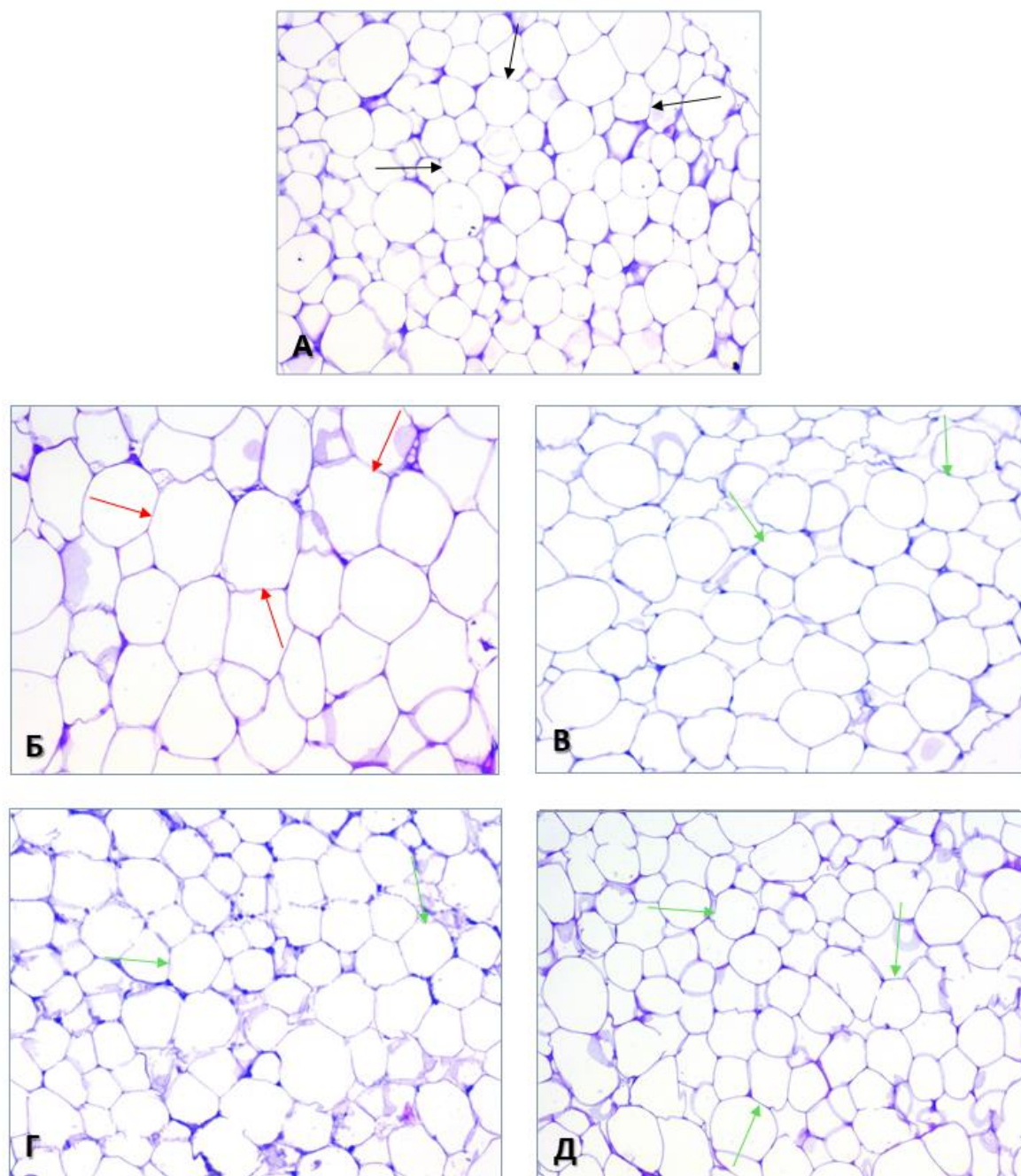
Група	Индекс на мезентериалната мастна тъкан	Индекс на паранефралната мастна тъкан	Индекс на перигонадната мастна тъкан	Индекс на ретроперитонеалната мастна тъкан	Индекс на общата мастна тъкан
Контрола	0.64±0.05	0.17±0.03	0.89±0.1	0.67±0.08	2.24±0.18
МС	0.69±0.06	0.21±0.04	1.00±0.08	1.00±0.09*	2.90±0.24
МС+ПСАМ _{2.5}	0.52±0.04	0.14±0.02	0.85±0.07	0.69±0.08 [#]	2.15±0.15 [#]
МС+ПСАМ ₅	0.57±0.04	0.14±0.02	0.78±0.06	0.72±0.04 [#]	2.26±0.15
МС+ПСАМ ₁₀	0.63±0.05	0.15±0.02	0.90±0.10	0.85±0.11	2.54±0.26



Фигура 9. Индекси на ретроперитонеалната и общата мастна тъкан при плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; * $p < 0.05$ спрямо контролната група, # $p < 0.05$ спрямо група МС

4.2. Хистология на мастната тъкан

Хистологичните находки са представени на **Фигура 10**.



Фигура 10. Мастна тъкан на плъхове от контролната група (А), група МС (Б), група МС+ПСАМ_{2,5} (В), група МС+ПСАМ₅ (Г) и група МС+ПСАМ₁₀ (Д); черни стрелки - адипоцити в норма, червени стрелки – уголемени адипоцити, зелени стрелки – редукция в размера на адипоцитите; оцветяване с хематоксилин-еозин; увеличение x200

Адипоцитите на ретроперитонеалната мастната тъкан при животните с МС са с увеличени размери в сравнение с контролната група. За разлика от контролната група, където преобладават малки и средни по размери адипоцити (**Фигура 10, панел А** – черни стрелки), при МС преобладават адипоцити с големи размери (**Фигура 10, панел Б** – червени стрелки). При животните третирани с ПСАМ, размерите на адипоцитите се редуцират (**Фигура 10, панели В, Г и Д** – зелени стрелки), като промените са най-отчетливи при най-високата доза на ПСАМ. При третиране с ПСАМ в дози 2.5 и 5.0 мл/кг адипоцитите намаляват размерите си, като преобладават такива със средни размери, докато при група МС+ПСАМ₁₀ преобладават средните и малки размери.

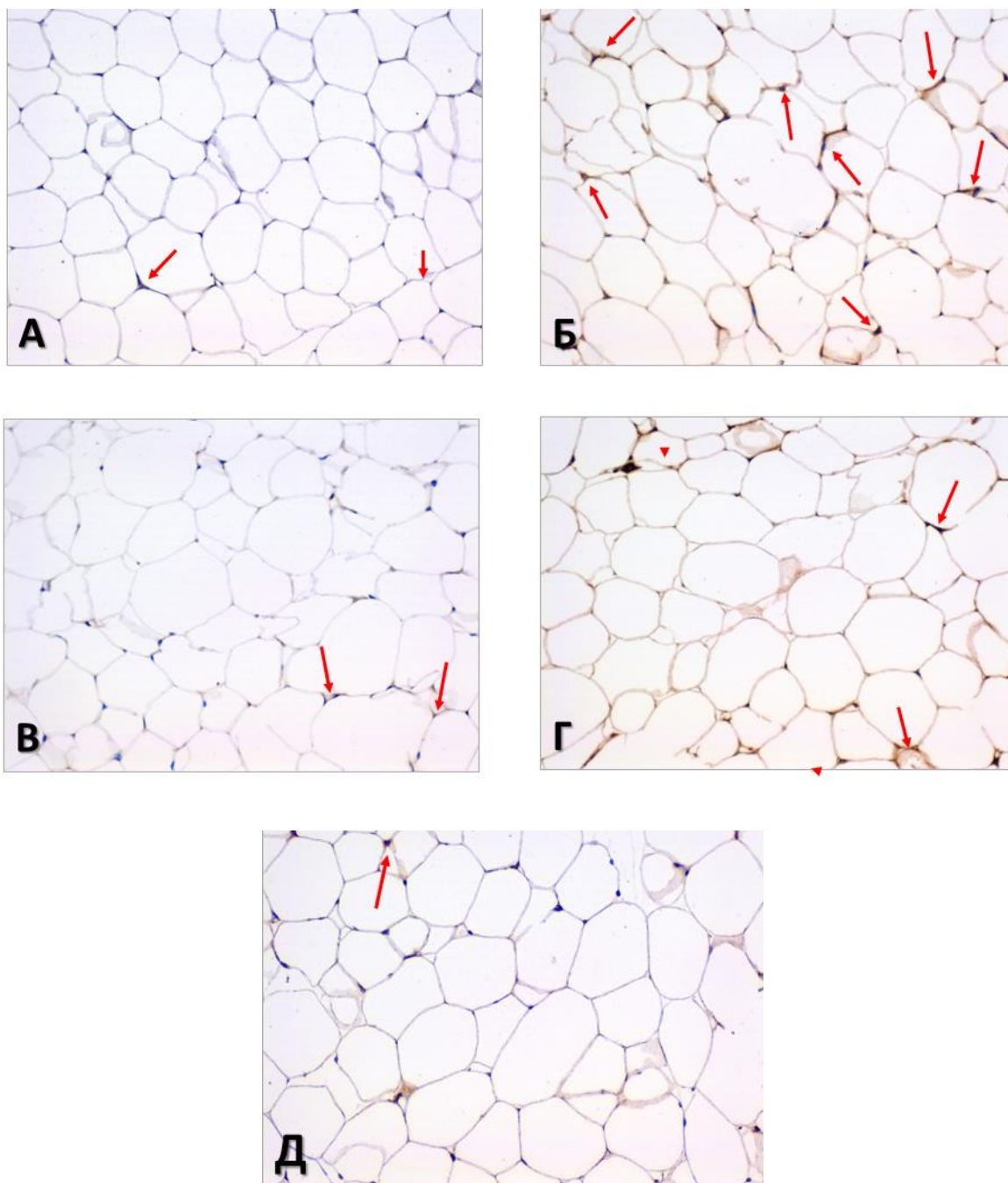
4.3. Апоптоза в мастната тъкан

4.3.1. Експресия на Вах

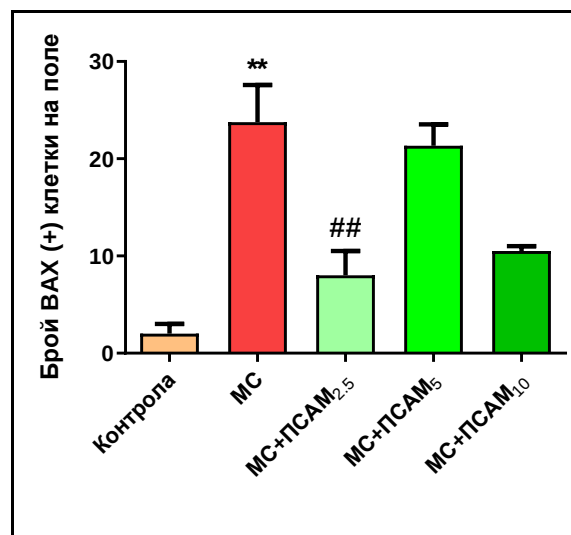
Резултатите са отразени в **Таблица 14** и на **Фигури 11 и 12**. Експресията на апоптотичния Вах протеин е значително завишена (над 11 пъти) в група МС в сравнение с контролната група ($p < 0.01$) (**Фигура 12**). Третирането с ПСАМ води до намаляване на експресията на проапоптотичния маркер и в трите групи, като този ефект е статистически значим в група МС+ ПСАМ_{2.5}, където се регистрира трикратно намаление в експресията ($p < 0.01$ спрямо група МС). В допълнение, ПСАМ антагонизира ефекта на ВМВФ диета върху експресията на проапоптотичния маркер в мастната тъкан и в трите дози и не се установява статистически значима разлика в експресията му в групи МС+ПСАМ_{2.5} и МС+ПСАМ₁₀ спрямо контролните стойности.

Таблица 14. Експресия на апоптотичния маркер Вах в ретроперитонеална мастна тъкан при плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; ** $p < 0.01$ спрямо контролната група, ^{##} $p < 0.01$ спрямо група МС

	Контрола	МС	МС+ПСАМ _{2.5}	МС+ПСАМ ₅	МС+ПСАМ ₁₀
Брой Вах (+) клетки на поле (ретроперитонеална мастна тъкан)	2.00±1.00	23.75±3.84**	8.00±2.52 ^{##}	21.33±2.20	10.50±0.50
Mean±SEM					



Фигура 11. Експресия на апоптотичния маркер Вах (червени стрелки) в ретроперитонеална мастна тъкан на плъхове от контролната група (А), група МС (Б), група МС+ПСАМ_{2.5} (В), група МС+ПСАМ₅ (Г) и група МС+ПСАМ₁₀ (Д)



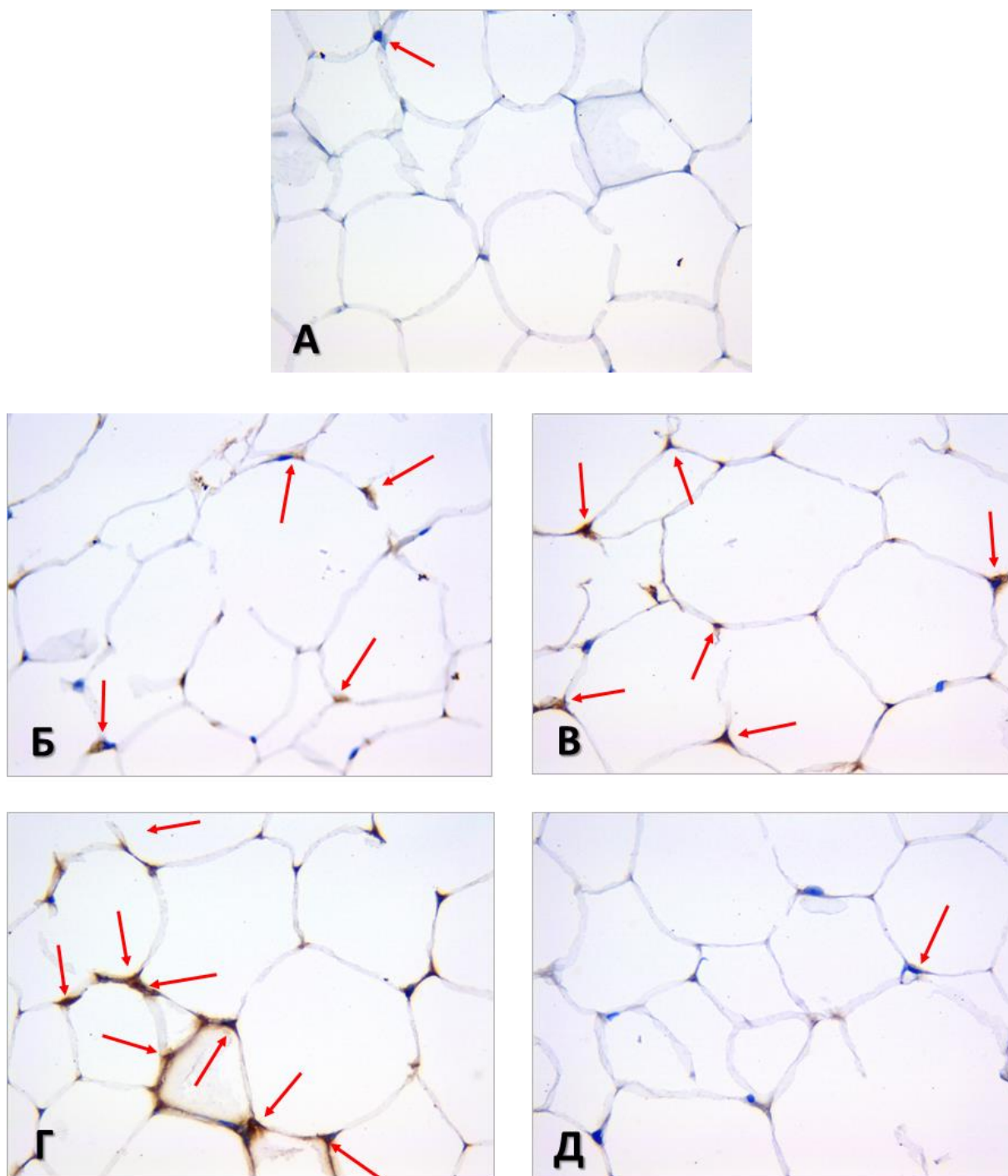
Фигура 12. Брой Вах позитивни клетки в ретроперитонеалната мастна тъкан при плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; **p < 0.01 спрямо контролната група, ##p < 0.01 спрямо група МС

4.3.2. Експресия на Bcl-2

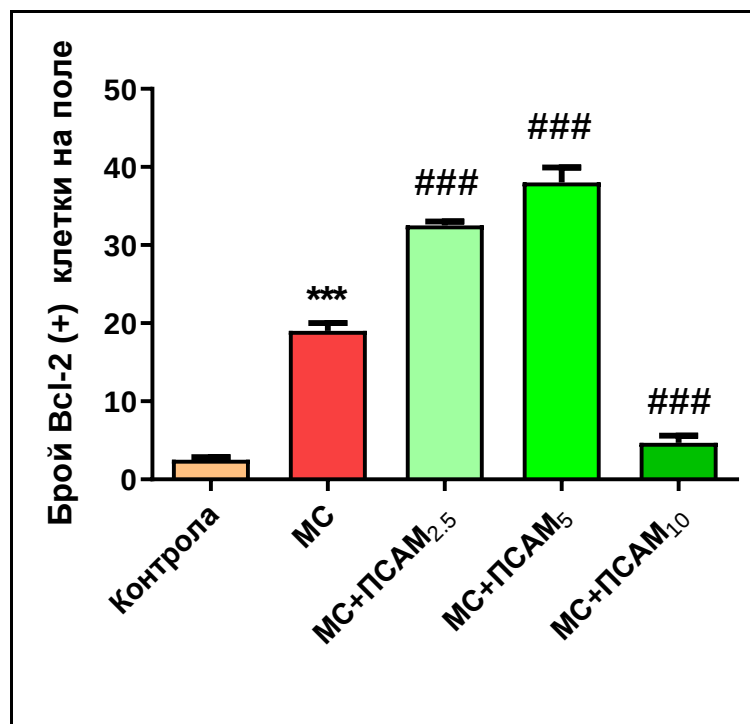
Резултатите са показани в **Таблица 15** и на **Фигури 13 и 14**. Адипоцитите на животните от група МС имат по-висока експресия на Bcl-2 (нарастване над 7 пъти) в сравнение с контролната група ($p < 0.001$). Статистически значимо повишение в нивото на маркера се наблюдава в групи МС+ПСАМ_{2.5} ($p < 0.001$ спрямо група МС) и МС+ПСАМ₅ ($p < 0.001$ спрямо група МС) - съответно със 71% и 100% . В група МС+ПСАМ₁₀ експресията на антиапоптоичния протеин намалява до ниво, близко до това на контролната група и между тези две групи не се отчита статистическа разлика в експресията на маркера.

Таблица 15. Експресия на антиапоптоичния маркер Bcl-2 в ретроперитонеална мастна тъкан на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; ***p < 0.001 спрямо контролната група, ###p < 0.001 спрямо група МС

	Контрола	МС	МС+ПСАМ _{2.5}	МС+ПСАМ ₅	МС+ПСАМ ₁₀
Брой Bcl-2 (+) клетки на поле (ретроперитонеална мастна тъкан)	2.50±0.34	19.00±1.00***	32.50±0.50###	38.00±1.96###	46.7±0.92###
Mean±SEM					



Фигура 13. Експресия на антиапоптоичния маркер Bcl-2 (червени стрелки) в ретроперитонеална мастна тъкан на плъхове от контролната група (А), група МС (Б), група МС+ПСАМ_{2.5} (В), група МС+ПСАМ₅ (Г) и група МС+ПСАМ₁₀ (Д)



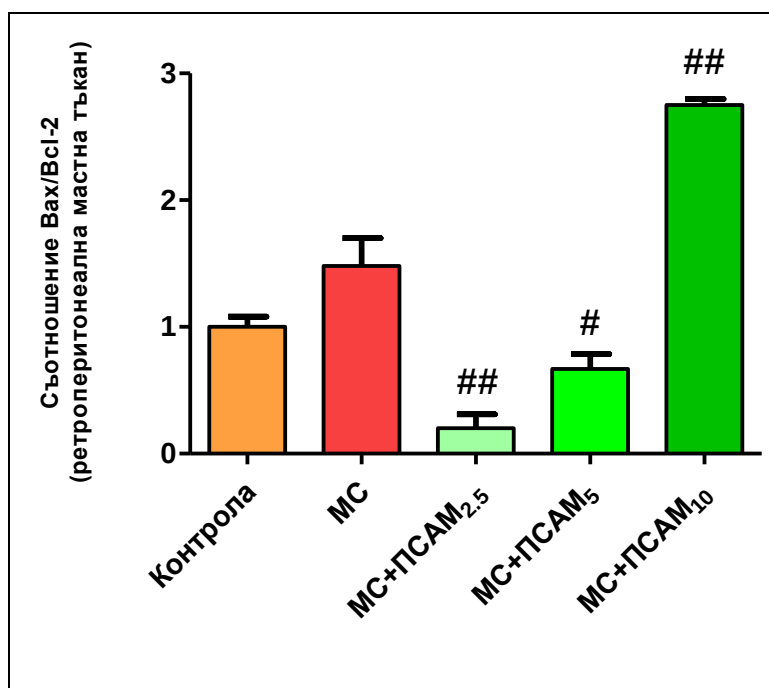
Фигура 14. Брой Bcl-2 позитивни клетки в ретроперитонеалната мастна тъкан на плъхове с диетично-индуциран MC, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; *** $p < 0.001$ спрямо контролната група, ### $p < 0.001$ спрямо група MC

4.3.3. Съотношение Вах/Bcl-2

Резултатите са представени в **Таблица 16** и на **Фигура 15**. Съотношението Вах/Bcl-2 при групата на MC е по-високо (повишение 48%) в сравнение с контролната група, което означава, че фенотипът на адипоцитите е апоптотичен. В дози 2.5 и 5.0 мл/кг, ПСАМ води до повишаване на експресията на Bcl-2 и съотношението намалява и в резултат на това клетките придобиват анти-апоптотичен фенотип. Това понижение е статистически значимо спрямо група MC в група MC+ПСАМ_{2.5} ($p < 0.01$ спрямо група MC), където се регистрира седемкратна редукция в съотношението и група MC+ПСАМ₅ ($p < 0.05$ спрямо група MC). Най-високата доза ПСАМ намалява експресията на Bcl-2 и стойността на съотношението Вах/Bcl-2 при група MC+ПСАМ₁₀ е значимо по-висока ($p < 0.01$) в сравнение с група MC (повишение с 85.8%), което показва, че в тази група преобладава проапоптотичен фенотип.

Таблица 16. Съотношение Вах/Vcl-2 в тъканни проби от ретроперитонеална мастна тъкан при плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10.0 мл/кг; [#] p < 0.05 спрямо група МС, ^{##} p < 0.01 спрямо група МС

	Контрола	МС	МС+ПСАМ _{2.5}	МС+ПСАМ ₅	МС+ПСАМ ₁₀
Съотношение Вах/Vcl-2 (ретроперитонеална мастна тъкан)	1.00±0.08	1.48±0.22	0.20±0.11 ^{##}	0.67±0.12 [#]	2.75±0.05 ^{##}
Mean±SEM					



Фигура 15. Съотношение Вах/Vcl-2 в тъканни проби от ретроперитонеална мастна тъкан на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10.0 мл/кг; *p < 0.05 спрямо контролната група, ***p < 0.01 спрямо контролната група

4.4. Обсъждане

Висцералното затлъстяване представлява отличителен белег на МС. Счита се, че към 2030 г. всеки втори възрастен ще бъде със затлъстяване и всеки четвърти - с изразено затлъстяване (Ward et al., 2019). Висцералното затлъстяване се асоциира с развитие на Т2ЗД, атеросклероза, артериална хипертония, дислипидемия, коронарно-съдова болест, НАМЧБ, остеоартрит, малигнени заболявания (карцином на гърда, матка, хранопровод

и бъбрек). (Pluta et al., 2022). Освен това, наднорменото тегло и затлъстяването се асоциират с по-тежко протичане на COVID-19 – инфекция, застрашаваща живота на милиони хора през последните 3 години (Foulkes et al., 2022).

Полифенолните съединения представляват мощни антиоксиданти, характеризиращи се с редица плейотропни ефекти. Нарастващ брой публикации демонстрират техният потенциал за благоприятно повлияване на висцералното затлъстяване и телесното тегло (Boccellino and D'Angelo, 2020). *Aronia melanocarpa* се нарежда сред растенията, чиито плодове са с много високо ПФ съдържание (Sidor and Gramza-Michałowska, 2019). Бихме могли да очакваме, че плодовият сок от *Aronia melanocarpa* ще повлияе благоприятно висцералното затлъстяване при плъхове с диетично-индуциран МС.

ВМВФ-диета, използвана в това проучване, предизвиква увеличаване на висцералната мастна тъкан и размера на адипоцитите. Лечението с ПСАМ антагонизира тези ефекти на диетата. Тези резултати са подобни на докладваните в други експериментални проучвания, фокусирани върху ефекта на арониеви екстракти върху теглото (Jakovljevic et al., 2018, Kim et al., 2018, Lim et al., 2019). Наблюдаваният ефект върху висцералното затлъстяване в този експеримент може да се дължи на високото полифенолно съдържание на ПСАМ. Доказано е, че ПФ на *Aronia melanocarpa* инхибират натрупването на липиди в адипоцитите и адипоцитната диференциация – два ключови момента за развитие на затлъстяване. Експресията на цитозин-цитозин-аденозин-аденозин-тимидин -усилващ протеин-алфа (ССААТ)/Enhancer-binding protein) и свързващ мастните киселини протеин (fatty acid-binding protein), които участват в тези два патогенетични момента, намалява след приложението на *Aronia melanocarpa* - ефект, описан от Park et al (Park et al., 2017).

Апоптозата е програмирана клетъчна смърт, която се от про- и антиапоптотични молекули. Белтъците от семейството на Bcl-2 (В-клетъчен лимфом 2), експресирани в митохондриите и гладкия ендоплазмен ретикулум, са основните контролори на този процес. Проапоптотичните членове на фамилията включват многодомейнни протеини като Вах и BH3-only протеини, докато антиапоптотични членове са Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bcl-b, Mcl-1 и Bfl-1. Апоптозата може да бъде иницирана чрез активиране на вътрешни или външни апоптотични пътища. Външният (“death”-рецепторен) път се активира от TNF и FAS-ligand след свързване с техните рецептори (TNF-R/ FAS-R). Вътрешният път се активира от клетъчен стрес, химиотерапия и лъчетерапия. Това

води до повишена пропускливост на външната митохондриална мембрана, освобождаване на цитохром с и ензими (каспази) в цитозола. Активирането на каспази (особено каспаза-3 и каспаза-7) води до апоптоза (Suvarna et al., 2019).

Проучванията установяват връзка между апоптозата и метаболитните последици от МС. Уголемяването на адипоцитите (което се наблюдава при затлъстяване) активира двата пътя на апоптоза, които от своя страна стимулират макрофагите в мастната тъкан (adipose tissue macrophages, АТМ). АТМ освобождават провъзпалителни цитокини, предизвикващи мета-възпаление и впоследствие - ИР, дислипидемия и чернодробна стеатоза (Alkhoury et al., 2021). Тъй като оксидативният стрес може да активира апоптозата (Dingeldein et al., 2019), разумно е да се очаква, че антиоксидантните съединения могат да потиснат този клетъчен процес. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* съдържа силни антиоксиданти като проантоцианидини, антоцианини и фенолни киселини. В това проучване е изследван ефектът на ПСАМ върху програмираната клетъчна смърт в мастната тъкан. За да се изясни този ефект, са изследвани експресиите на Bax и Bcl-2 в адипоцити от ретроперитонеалната мастна тъкан и е изчислено съотношението Bax/Bcl-2, което служи като инструмент за определяне на податливостта на клетките към апоптоза (Raisova et al., 2001). Това проучване показва, че адипоцитите на животните от група МС проявяват проапоптотичен фенотип, докато адипоцитите от групи МС+ПСАМ_{2.5} и МС+ПСАМ₅ проявяват антиапоптотичен фенотип. Тези резултати са в съответствие с други проучвания, описващи ефекта на *Aronia melanocarpa* върху апоптозата. Например, водният екстракт от *Aronia melanocarpa* намалява съотношението Bax/Bcl-2 в надбъбречните жлези в модел на адренална увреда, предизвикана от хексавалентен хром (Savici et al., 2021). Meng et al. потвърждават антиапоптотичната активност на арониевите антоцианини, които повишават експресията на Bcl-2 и намаляват тази на цитохром с, каспаза-3, каспаза-9 и Bax (Meng et al., 2018).

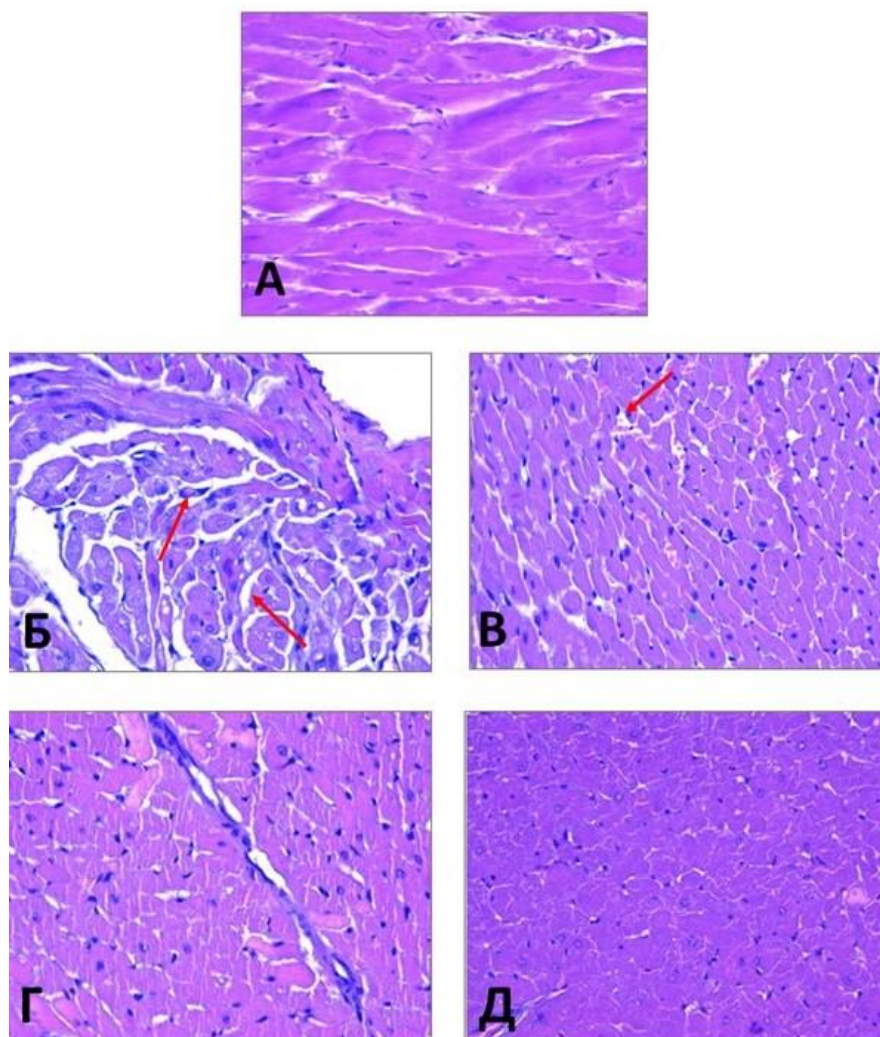
Противно на очакванията, групата, третирана с най-висока доза ПСАМ (10 мл/кг) е с най-високото съотношение Bax/Bcl-2 сред всички изследвани експериментални групи, дори по-високо от това на група МС. Според проучване върху клетъчни култури от остра лимфобластна левкемия, ПСАМ може да окаже проапоптотичен ефект при високи концентрации. Установено е, че някои ПФ в сока (главно производни на хлорогенова киселина, цианидин и кверцетин) могат да индуцират продукция на РКФ, което да наруши потенциала на митохондриалната мембрана, стимулира

освобождаването на цитохром с и да активира каспаза-3. Тези събития довеждат до апоптоза (Sharif et al., 2012). Можем да предположим, че най-високата доза плодов сок, използван в това проучване, притежава потенциал да индуцира доза-зависимо активиране на програмираната клетъчна смърт на адипоцитите чрез механизма, описан по-горе.

5. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху миокард и коронарни съдове

5.1. Хистология на миокарда

Хистологичните находки са показани на **Фигура 16**.

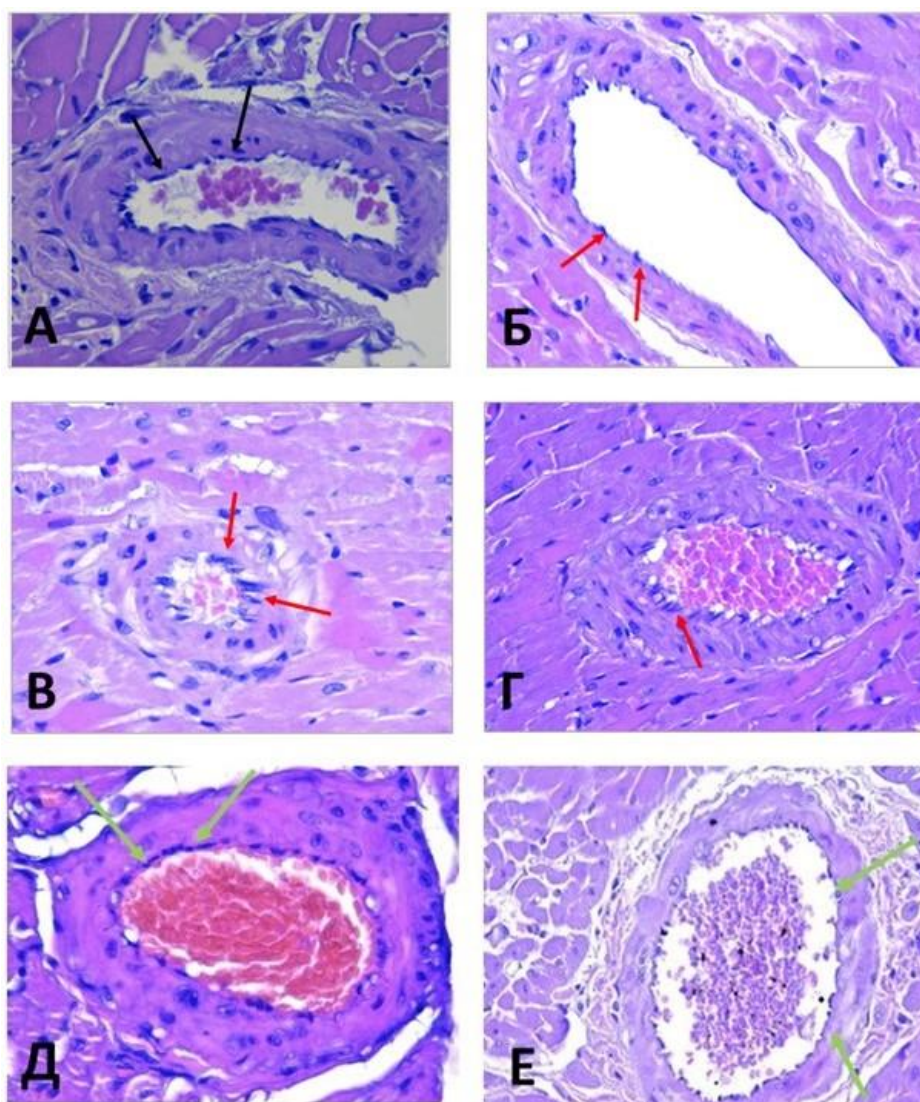


Фигура 16. Миокард на плъхове от контролната група (А), група МС (Б), група МС+ПСАМ_{2.5} (В), група МС+ПСАМ₅ (Г) и група МС+ПСАМ₁₀ (Д); червени стрелки – раздалечени кардиомиоцити; оцветяване с хематоксилин-еозин; увеличение x 100

В миокарда на плъхове от контролната група не се откриват морфологични промени в кардиомиоцитите. При МС се наблюдават дегенеративни промени в сърдечномускулните клетки, които са раздалечени едни от други. Ниската доза плодов сок намалява увреждането на кардиомиоцитите, но се откриват и такива с дегенеративни промени, макар и в единични клетки. При по-високите дози (групи МС+ПСАМ₅ и МС+ПСАМ₁₀) миокардът не показва хистологични отклонения.

5.2. Хистология на коронарен съд

Хистологичните находки са показани на **Фигура 17**.



Фигура 17. Коронарен съд на плъхове от контролната група (А), група МС (Б, В), група МС+ПСАМ_{2.5} (Г), група МС+ПСАМ₅ (Д) и група МС+ПСАМ₁₀ (Е); черни стрелки – ендотел в норма; червени стрелки – активирани ендотелни клетки, зелени стрелки – непрекъснат ендотелен слой

Коронарните артерии при плъхове от контролната група показват непрекъснат ендотелен слой и в стената им не се откриват структурни промени. При МС ендотелът е увреден, има некроза на ендотелните клетки и базалната мембрана е оголена. В група МС+ПСАМ_{2.5} ендотелът продължава да е увреден, а тези клетки, които са запазени, показват белези на активност – ядрата на ендотелните клетки са разположени перпендикулярно на базалната мембрана. При третиране с по-високи дози (групи МС+ПСАМ₅ и МС+ПСАМ₁₀) ендотелната тапицировка на коронарните артерии е нормална.

5.3. Обсъждане

Връзката между МС и повишения риск от ССЗ и инциденти е добре известна. Всеки един компонент на МС представлява индивидуален независим рисков фактор за развитие на коронарни калцификати, коронарна дисфункция, коронарно-съдова болест, миокардна дисфункция, остър миокарден инфаркт и/или сърдечна недостатъчност (Tune et al., 2017). Чрез образни и патологоанатомични изследвания са идентифицирани патогенетичните субстрати на тези усложнения при МС. Посредством магнитно-резонансна спектроскопия е открито, че при лица с МС и Т23Д миокардната акумулация на ТГ е увеличена и това корелира положително с миокардна деформация и перфузионни нарушения на миокарда (Gao Y et al., 2020). Хистологично при разгърнат МС в миокарда се установяват възпаление и фиброза (Li et al., 2012). Такива промени са описани и във възходящата аорта (Saraf et al., 2016). Чрез виртуална хистологична методика допълнително е установено, че в коронарните артерии на пациенти със ЗД и/или МС фиброатероматозни плаки са по-чести, като техните размери са по-големи в сравнение с тези без МС (Zheng M et al., 2011).

Патофизиологичните фактори, въввлечени в миокардните и съдовите увреди при МС, са няколко. Оксидативният стрес потенциира активирането на симпатиковата нервна система и РААС. От своя страна, тези системи индуцират оксидативен стрес – тоест връзката е двупосочна. (Koba, 2018; Fanelli and Zatz, 2011). Симпатиковата нервна система и РААС стимулират сърдечно-съдовата система – те индуцират положителни тропни ефекти в миокарда, както и вазоконстрикция и ендотелна увреда в кръвоносните съдове (Bruno et al., 2012; Aroor et al., 2013). Повишената продукция на адипоцитокени от абдоминалната мастна тъкан, заедно с гореспоменатите регулаторни системи, допринасят за повишаване на сърдечната честота, обема циркулираща кръв,

крайния диастолен обем в камерите, минутният обем на сърцето и съдовата резистентност. Тези промени довеждат до нарушен енергиен метаболизъм, абнормна кислородна нужда, диастолна дисфункция и концентрична хипертрофия на миокарда (Tune et al., 2017). Ендотелната активация, описана хистологично, представлява про-инфламаторен отговор (Blann, 2000) и е израз на ендотелната дисфункция при МС.

При МС, предиабетни състояния и 3Д артериалната съдова структура (ендотелният слой и базалната мембрана) се уврежда, което отключва значими за здравето микро- и макроваскуларни усложнения. Установено е, че ендотелната дисфункция е водещ механизъм, свързан със съдовите усложнения при МС. Намалената продукция на NO и повишената на вазоконстриктори и РКФ увреждат кръвоносните съдове, като крайният ефект е ускорен атеросклеротичен процес и повишение на АН – промени, наблюдавани при МС (Tran et al., 2020). Освен това отдавна е известно, че неблагоприятни метаболитни въздействия (хипергликемия) могат да активират матриксни металлопротеинази, които разграждат колаген тип IV на базалната мембрана на ендотела и я увреждат (Death et al., 2003).

В настоящето проучване е изследвано влиянието на МС върху хистологията на миокарда и коронарен съд на плъхове с МС и ефектът на ПСАМ върху структурата на тези органи. Висококалоричната диета при МС плъхове индуцира дегенерация в кардиомиоцитите и се нарушава тяхната микроархитектоника. В коронарен съд МС води до активиране на ендотелните клетки, ендотелна некроза и увредена базална мембрана. Третирането с ПСАМ подобрява хистологичната картина и премахва тези патологични промени както в миокарда, така и в коронарните кръвоносни съдове, особено в по-високи дози.

Отдавна е известно, че диета, богата на пресни зеленчуци и плодове, спомага за редукция на сърдечно-съдовия риск и се асоциира с намалена сърдечно-съдова смъртност (Hemler and Hu, 2019). Френската диета, характеризираща се с умерен прием на червено вино, средиземноморската диета, характеризираща се с прием на пълнозърнести продукти, плодове, зеленчуци, риба и маслиново масло и диетата с редовна консумация на зелен чай в Близкия Изток са все примери за диети, богати на ПФ и с доказани ССЗ-превантивни ефекти (Renaud and de Lorgeril, 1992; Huang and Sumpio, 2008; Arts and Hollman, 2005). Това дава основание да бъдат изследвани

ефектите на ПСАМ върху структурата на миокарда и коронарните съдове при диетично-индуциран МС.

Макар че проучванията относно ефекта на *Aronia melanocarpa* върху сърдечно-съдовата структура са оскъдни, наличните публикации показват благоприятни ефекти.

Проучване на Daskalova et al. от 2015 г. показва, че третирането на стареещи плъхове с арониев сок забавя възрастово-обусловеното акумулиране на колагенови влакна в аортната стена. Освен това е намалено нивото на атерогенния LDL-холестерол (Daskalova et al., 2015). Сходни са резултатите и от други проучвания на същия авторски колектив относно ефектите на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху съдовата стена при стареещи плъхове (Kitova et al., 2021). Скорошно тяхно проучване показва, че суплементация с ПСАМ при стареещи плъхове намалява количеството на колагенови влакна и мастноцитите в периваскуларното пространство в лявата камера и забавя възрастово-обусловеното ремоделиране на миокарда (Delchev et al., 2021).

Цитопротективните ефекти на ПСАМ в настоящето проучване биха могли да бъдат свързани на първо място с антиоксидантните свойства на съдържащите се ПФ. Nrf2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) е транскрипционен фактор, регулиращ клетъчният отговор при оксидативен стрес (Jadeja et al., 2016). Той повишава експресията на антиоксидантните ензими SOD, GPx и NADP(H) хинон оксидоредуктаза. В условия без продукция на свободни радикали Nrf2 е свързан с ECH-associated protein 1 (Keap1). Keap1 индуцира протеазомното лизиране и терминиране ефектите на Nrf2 (Nguyen et al., 2009). При оксидативен стрес двата белтъка се разделят, Nrf2 навлиза в клетъчното ядро и индуцира експресията на гени, кодиращи упоменатите антиоксидантни ензими. Предполага се, че този е основният механизъм, стоящ в основата на антиоксидантното действие на полифенолите. Така, антиоксидантната защита е вероятно да предотврати свръхактивацията на симпатикуса и РААС, и да предпази миокарда от МС-индуцирани структурни промени.

Антиоксидант-медиран кардиопротективен ефект е описан за флавонола катехин, както и за антоцианидините (цианидин и делфинидин) при проучване върху H9c2 кардиомиобласти (Akhlaghi and Bandy, 2012). В друго проучване екстракт от червена боровинка, богат на цианидин-3 галактозид, цианидин-3 арабинозид и цианидин-3 глюкозид, предотвратявайки оксидативния стрес, възпрепятства активирането на апоптотичните пътища в кардиомиоцитите (Isaak et al., 2017). ПСАМ, използван в настоящето проучване, е богат на тези флавоноиди.

Съществуват и данни за наличие на директен симпатолитичен ефект на някои флавоноли. В едно проучване кардиомиоцитната хипертрофия и апоптоза, медиирани от норепинефрин, са предотвратени от третирането с богата на антоцианини воден екстракт от дива боровинка *in vitro* (Louis et al., 2014). Антихипертрофичен ефект върху миокард е наблюдаван след приложението на ресвератрол в друго проучване, като този ефект е отдаден на повишената експресия на NO и AMPK (Thandapilly et al., 2011).

Друг предполагаем механизъм, който би могъл да предпази миокарда от увреда при МС, е супресията на РААС. Потискането на тази система би намалила както патологичното ремоделиране на миокарда, така и индуцираната от тази система продукция на РКФ, които същи са въввлечени в миокардните нарушения при МС. В своето проучване Parichatikanond et al. изследват въздействието флавонола кверцетин и антоцианините цианидин и делфинидин върху човешки ембрионални бъбречни (НЕК)-293 клетки, след претретиране с дексаметазон. Кортикостероидът повишава активността на ACE, докато споменатите ПФ я намаляват, независимо от третирането с дексаметазон (Parichatikanond et al., 2012). Екстракт от семена на асаи (*Euterpe oleracea*), богати на катехин, епикатехин и полимерни проантоцианидини, чрез модулиране на локалната (в бъбрека) или общата РААС активност намаляват възпалителният отговор и оксидативният стрес при МС субекти (Santos et al., 2020). Въпреки, че тези проучвания са проведени върху други тъкани, бихме могли да предположим, че същите ефекти могат да се проявят и върху миокардната тъкан.

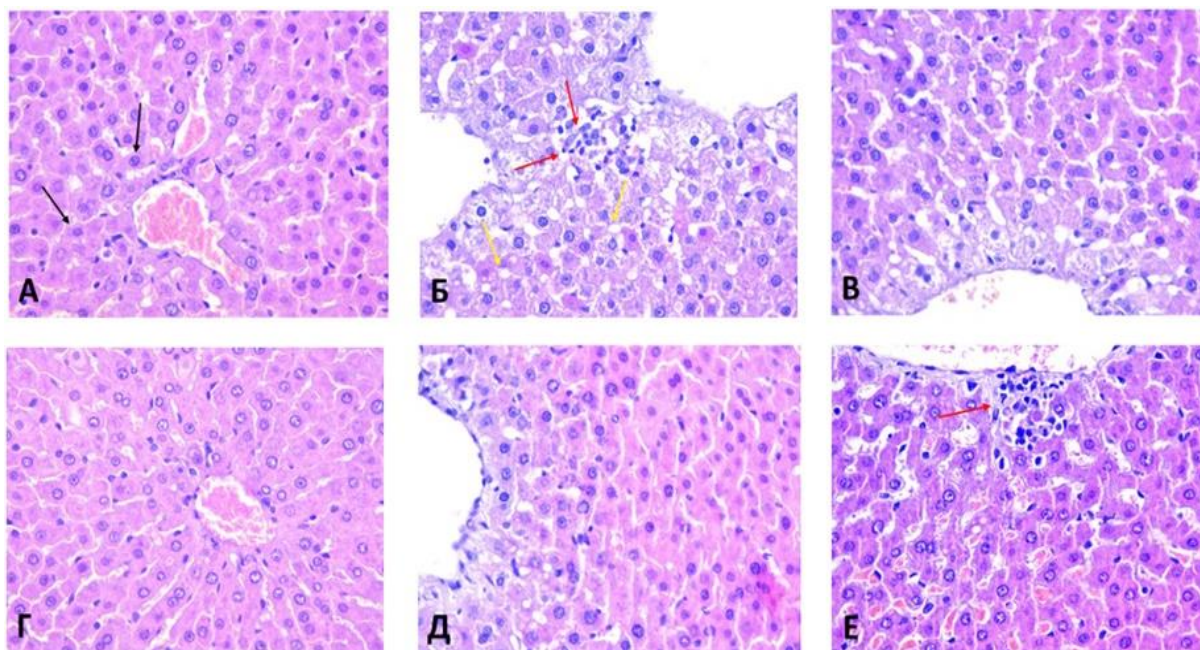
Вазопротективният ефект, демонстриран в настоящето изследване, е много вероятно да се дължи на медираното от съдържащите се в сока полифеноли подобрение в ендотелната функция. Съществуват голям брой проучвания, демонстриращи този ефект на ПФ (включително такива с произход от *Aronia melanocarpa*). Например Kim et al. доказват, че сок от *Aronia melanocarpa* е способна да индуцира релаксация на изолирани коронарни артерии. Авторите откриват, че съдържащите се в сока конюгирани цианидини и хлорогенови киселини фосфорилират ендотелната NOS и по този начин увеличават продукцията на съдорелаксиращият фактор NO (Kim et al., 2013). В друго проучване приложението богат на антоцианини арониев екстракт потиска TNF-алфа-медираната експресия на VCAM-1. Смята се, че този механизъм би могъл да лежи в основата на антиатерогенният ефект на *Aronia melanocarpa* (Iwashima et al., 2019). Сходни резултати описват Zapolska-Downar et al. - те откриват, че екстракт от арониеви плодове упражнява противовъзпалителен ефект върху човешки аортни

ендотелни клетки чрез потискане експресията на VCAM-, ICAM-1 и NF- κ B (Zapolska-Downar et al., 2012). Важно е да се отбележи, че в основата на описаните върху кръвоносните съдове ефекти също лежи антиоксидантният ефект на съдържащите се в *Aronia* полифенолни съединения. Следователно, отново този механизъм би могъл да обясни наблюдаваното в това проучване съдовопротективен ефект.

6. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху черния дроб

6.1. Хистология на черния дроб

Резултатите са показани на **Фигура 18**. В черния дроб на контролните плъхове се наблюдава нормална архитектура. При МС хепатоцитите са с дегенеративни промени, наблюдава се дребнокапчеста стеатоза, апоптотични телца и възпалителни грануломи, представени от лимфоцити. В групи МС+ПСАМ₅ и МС+ПСАМ₁₀ алтерацията на чернодробния паренхим е силно редуцирана, като в МС+ПСАМ₁₀ групата ефектът на ПСАМ е по-изразен, но се срещат все още възпалителни клетки и единични хепатоцити с некротични промени.



Фигура 18. Черен дроб на плъхове от контролната група (А), група МС (Б, В), група МС+ПСАМ_{2.5} (Г), група МС+ПСАМ₅ (Д) и група МС+ПСАМ₁₀ (Е); черни стрелки – хепатоцити в норма, жълти стрелки – хепатоцити с липидни включвания, червени стрелки – неспецифични грануломи около хепатоцити; оцветяване с хематоксилин-еозин; увеличение x 200

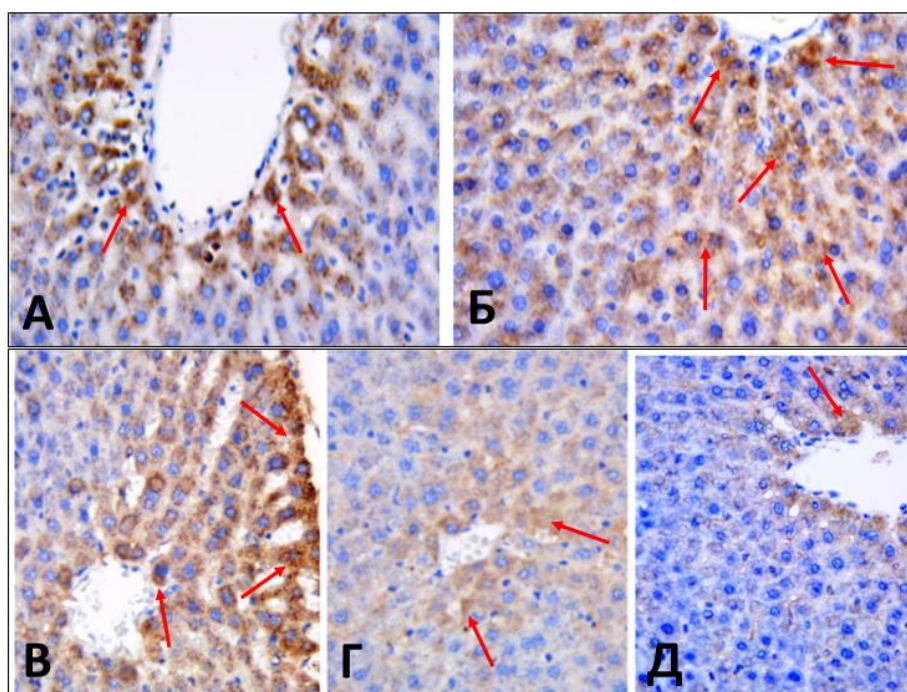
6.2. Експресия на Вах, Bcl-2 и MAC387 в черния дроб

6.2.1. Експресия на Вах

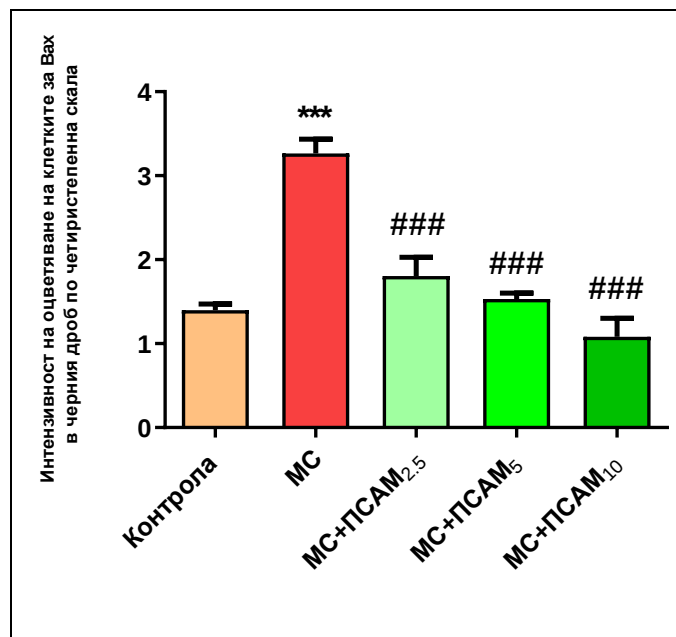
Резултати е отразен в Таблица 17 и на Фигури 19 и 20.

Таблица 17. Интензивност на експресията на Вах (по четиристепенна скала) в черен дроб на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; *** $p < 0.001$ спрямо контролната група, ### $p < 0.001$ спрямо група МС

	Контрола	МС	МС+ПСАМ _{2.5}	МС+ПСАМ ₅	МС+ПСАМ ₁₀
Интензивност на оцветяване на клетките за Вах в черния дроб (по четиристепенна скала)	1.40±0.08	3.27±0.17***	1.81±0.22###	1.53±0.07###	1.08±0.22###
Mean±SEM					



Фигура 19. Експресия на апоптотичния маркер Вах (червени стрелки) в черен дроб на плъхове от контролната група (А), група МС (Б), група МС+ПСАМ2.5 (В), група МС+ПСАМ5 (Г) и група МС+ПСАМ10 (Д); имунохистохимия



Фигура 20. Интензивност на експресията на Вах (по четиристепенна скала) в черен дроб на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; *** $p < 0.001$ спрямо контролната група, ### $p < 0.001$ спрямо група МС

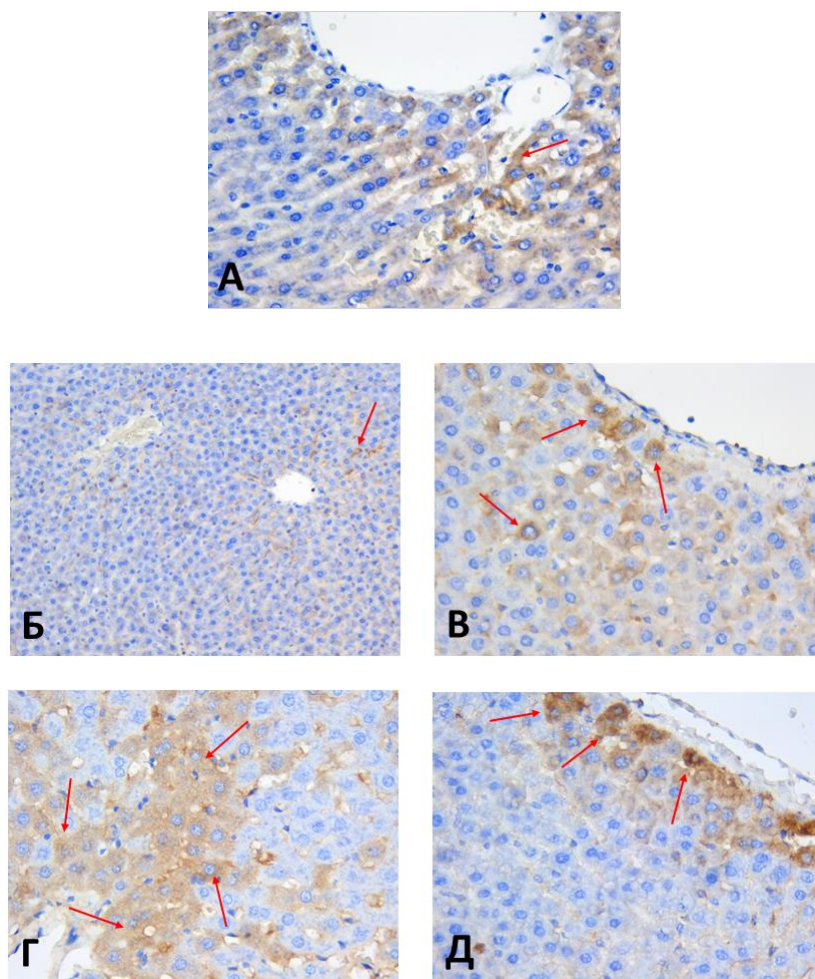
В чернодробния паренхим на плъхове от контролната група експресия на Вах се наблюдава предимно в хепатоцитите около *v. centralis*. МС индуцира дифузна експресия на маркера, като тази експресия е значително по-висока (над 2 пъти) в сравнение с контролната група ($p < 0.001$ спрямо контролната група). Третирането с плодов сок намалява доза-зависимо чернодробната експресия на апоптотичния маркер във всички групи ($p < 0.001$ спрямо група МС) и протекцията е най-изразена при най-високата доза. Намалението на експресията в групи МС+ПСАМ_{2.5}, МС+ПСАМ₅ и МС+ПСАМ₁₀ е съответно с 44.6%, 53,2% и 67%. Във всички третирани с ПСАМ групи експресията на маркера не се различава значимо от тази на контролната група

6.2.2. Експресия на Bcl-2

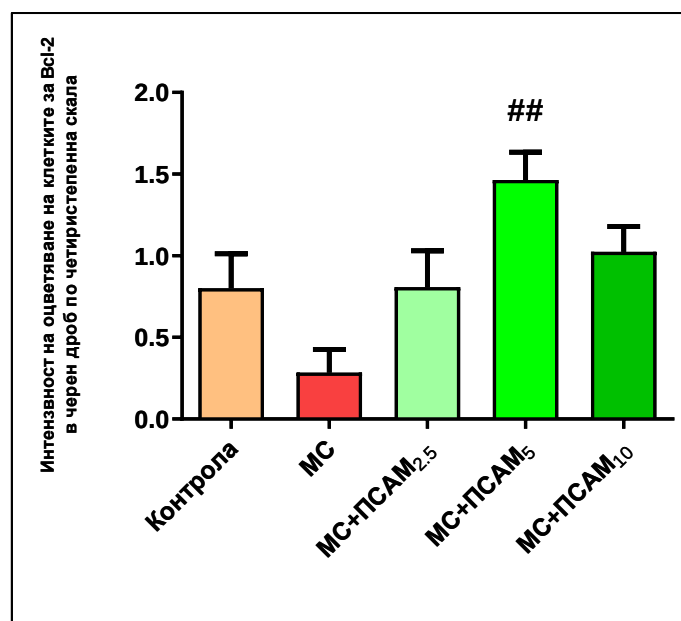
Резултатите са отразени в Таблица 18 и на Фигура 21 и 22. При контролната група експресията на Bcl-2 се наблюдава предимно в хепатоцити около *v. centralis*. Въпреки липсата на статистическа значимост, при група МС в чернодробния паренхим експресията на маркера се понижава с 65%. Спрямо група МС, в третираниите с плодов сок групи експресията на Bcl-2 е повишена в хепатоцитите и в синусоидалните клетки, като този ефект е статистически значим в група МС+ПСАМ₅ (петкратно увеличение на стойността) ($p < 0.01$ спрямо група МС).

Таблица 18. Интензивност на експресия на Bcl-2 (по четиристепенна скала) в черен дроб на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; ^{##}p < 0.01 спрямо група МС

	Контрола	МС	МС+ПСАМ _{2.5}	МС+ПСАМ ₅	МС+ПСАМ ₁₀
Интензивност на оцветяване на клетките за Bcl-2 в черния дроб (по четиристепенна скала)	0.80±0.21	0.28±0.14	0.81±0.22	1.46±0.17 ^{##}	1.02±0.15
Mean±SEM					



Фигура 21. Експресия на Bcl-2 (червени стрелки) в черен дроб на плъхове от контролната група (А), група МС (Б), група МС+ПСАМ_{2.5} (В), група МС+ПСАМ₅ (Г) и група МС+ПСАМ₁₀ (Д); имунохистохимия



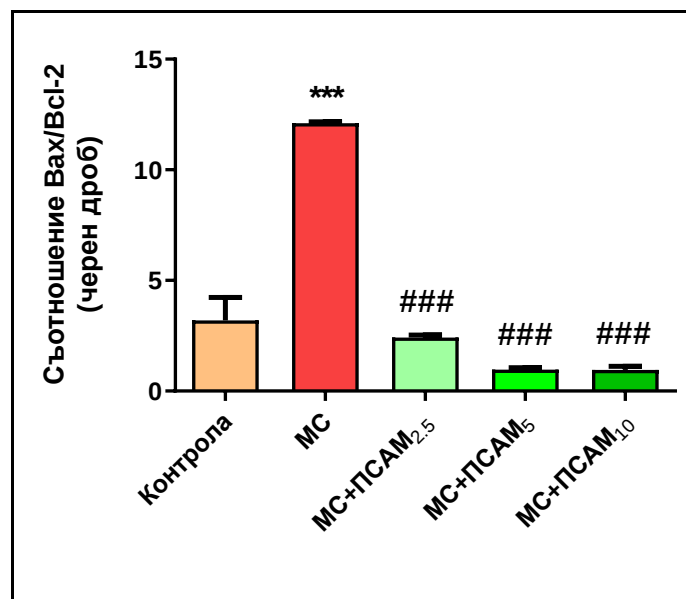
Фигура 22. Интензивност на експресия на Bcl-2 (по четиристепенна скала) в черен дроб на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; ## $p < 0.01$ спрямо група МС

6.2.3. Съотношение Вах/Bcl-2

Резултатите са показани в **Таблица 19** и **Фигура 23**. Съотношението Вах/Bcl-2 е статистически значимо повишено при плъхове с МС в сравнение с контролната група ($p < 0.001$) (**Фигура 27**). Приложението на ПСАМ намалява съотношението при всички третирани със сок групи до нива, близки и дори по-ниски от това на контролната група.

Таблица 19. Съотношение Вах/Bcl-2 в черен дроб на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; *** $p < 0.001$ спрямо контролната група, ### $p < 0.001$ спрямо група МС

	Контрола	МС	МС+ПСАМ _{2.5}	МС+ПСАМ ₅	МС+ПСАМ ₁₀
Съотношение Вах/Bcl-2 в черен дроб	3.19±1.03	12.11±0.06***	2.41±0.12###	0.97±0.09###	0.96±0.16###
Mean±SEM					



Фигура 23. Съотношение Bax/Bcl-2 в черен дроб на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; *** $p < 0.001$ спрямо контролната група, ### $p < 0.001$ спрямо МС

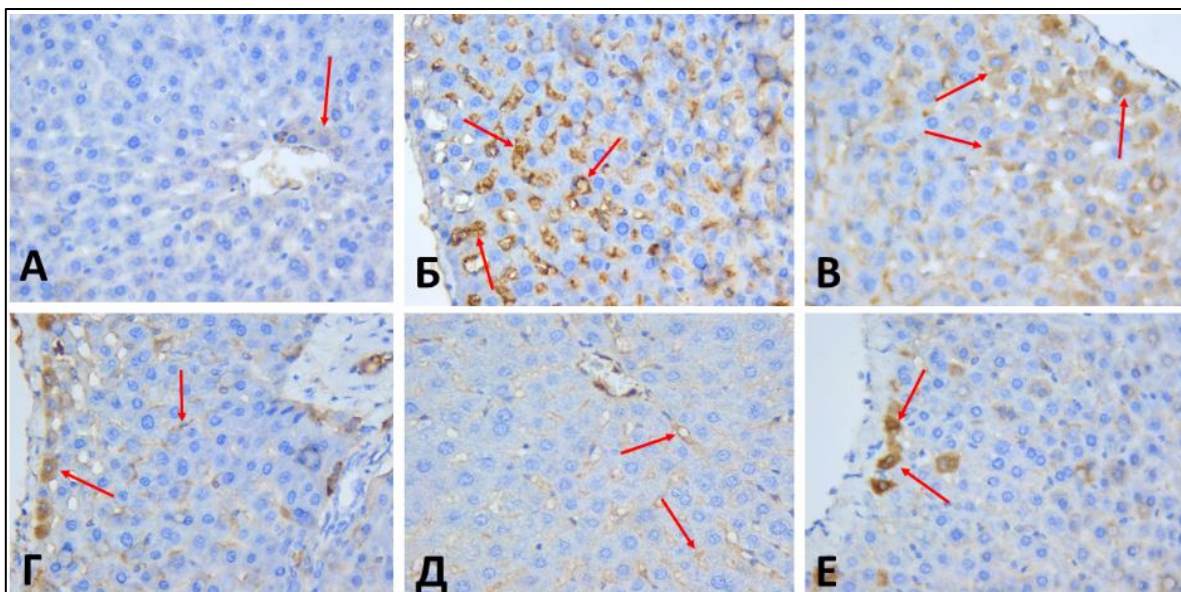
6.2.4. Експресия на MAC387

Резултатите са отразени в **Таблица 20** и на **Фигури 24** и **25**. В контролната група се наблюдава слаба експресия на макрофагеалния маркер, основно в единични хепатоцити около *v.centralis*. Значително повишена експресия се наблюдава в група МС, както в хепатоцити, така и в синусоидални клетки ($p < 0.001$ спрямо контролната група).

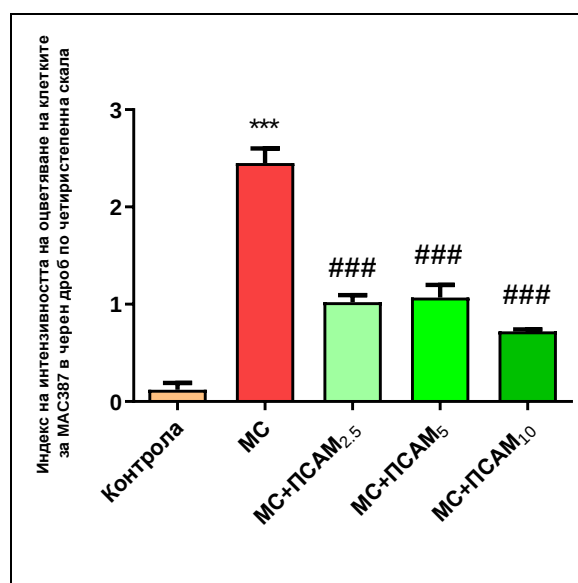
Третирането с ПСАМ значимо потиска експресията на маркера при всички използвани дози ($p < 0.001$ спрямо група МС), като понижението е най-изразено при доза 10 мл/кг.

Таблица 20. Интензивност на експресията на MAC387 (по четиристепенна скала) в черен дроб на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; *** $p < 0.001$ спрямо контролната група, ### $p < 0.001$ спрямо група МС

	Контрола	МС	МС+ПСАМ _{2.5}	МС+ПСАМ ₅	МС+ПСАМ ₁₀
Интензивност на оцветяване на клетките за MAC387 (черен дроб)	0.12±0.07	2.45±0.15***	1.02±0.07###	1.07±0.13###	0.72±0.02###
Mean±SEM					



Фигура 24. Експресия на MAC387 (червени стрелки) в черен дроб на плъхове от контролната група (А), група МС (Б и В), група МС+ПСАМ_{2.5} (Г), група МС+ПСАМ₅ (панел Д) и група МС+ПСАМ₁₀ (Е); имунохистохимия



Фигура 25. Интензивност на експресията на MAC387 (по четиристепенна скала) в черен дроб на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; *** $p < 0.001$ спрямо контролната група, ### $p < 0.001$ спрямо група МС

6.3. Обсъждане

Чернодробните нарушения, асоцииращи се с МС, са сред най-честите причини за чернодробна недостатъчност и хепатоцелуларен карцином в световен мащаб.

Нарастващата честота на НАМЧБ корелира пряко с резкия скок в случаите с болестно

затлъстяване и МС. НАМЧБ се приема за хепатална проява на МС. В Европа честотата ѝ варира между 26% и 30%, в Азия – 11,8-30%, в САЩ – около 39% (Goyal et al., 2020). Епидемиологични данни показват, че това състояние е сред втората водеща причина за чернодробна трансплантация в САЩ. Въпреки бавната прогресия, имайки предвид огромният брой засегнати лица, здравните и икономическите последици са значителни (Golabi et al., 2018). Тези данни доказват необходимостта от ранна диагноза и навременни мерки за превенцията ѝ.

От етиопатогенетична гледна точка НАМЧБ представлява мултифакторно обусловено състояние, като централна роля в развитието ѝ играе ИР. ИР корелира със степента на абдоминалното затлъстяване. Висцералната мастна тъкан действа като източник на секреция на адипоцитокени, намаляващи метаболитните ефекти на инсулин. Тези събития резултират в невъзможност за потискане на липолизата в мастната тъкан, освобождаване на СМК в кръвната циркулация и тяхната акумулация в хепатоцитите, където липогенезата е непотисната. Освен ИР, в патофизиологията на НАМЧБ са въвлечени и други фактори като оксидативен стрес, нискостепенно възпаление, митохондриална дисфункция и чревна дисбиоза. Липидното свръхнатоварване на черния дроб води до продукция на РКФ, които предизвикват от една страна увреда на ДНК, клетъчни мембрани и протеини, а от друга - митохондриална увреда и дисфункция. Първото въздействие пряко уврежда хепатоцитите. Митохондриалната дисфункция се проявява като повишена продукция на свободни радикали, цитокини (TNF- α , FAS-лиганд) и стимулиране на вътрешния (митохондриалния) апоптотичен път, медиран от Bax (Rinaldi et al., 2021). От друга страна, продуцираните цитокини индуцират нискостепенно състояние и активират външния ("death"-рецепторен) проапоптотичен път. Така, в патогенезата на НАМЧБ са въвлечени и двете апоптотични пътища (Alkhoury et al., 2011). Чревната дисбиоза и нарушаването на оста черво-черен дроб амплифицира нискостепенното възпаление и ИР (Rinaldi et al., 2021).

НАМЧБ включва спектър от заболявания като чернодробна стеатоза, стеатохепатит, чернодробна фиброза или цироза (Goyal et al., 2020). Хистологично се проявява като едноклетъчна стеатоза, с/без лобуларно/портално възпаление, балонна дегенерация на хепатоцитите, фиброза с различна степен на разпространение или цироза. Подобно на други хронични чернодробни заболявания, пациентите са изложени на по-висок риск от развитие на хепатоцелуларен карцином и други първични чернодробни тумори (Kleiner and Makhlouf, 2016).

За оценка на хепаталния статус, в настоящето проучване са изследвани хистологични срезове от черен дроб на експерименталните плъхове и допълнително са проведени имунохистохимични оцветявания на същите тъкани за детерминиране на степента на програмираната клетъчна смърт и възпалителният отговор. В хистологичните проби на животните от група МС са налице дегенеративни и некротични промени в хепатоцитите, възпалителен инфилтрат, като се среща и стеатоза, която е дребнокапчеста. Тези данни съответстват на наличните научни данни относно хепаталните прояви при МС. В третираните с арониев сок групи се наблюдава подобрене в хистологичната картина, като този ефект се повишава от по-ниската към по-високата доза сок, т.е. той е доза-зависим. Тези резултати отговарят на находките, описани от други автори, относно ефекта на *Aronia melanocarpa* върху черния дроб. Сред първите проучвания се откроява това на Valcheva-Kuzmanova et al. Те изследват ефекта на 5, 10 и 20 мл/кг ПСАМ в модел на CCl₄-индуцирана остра хепатотоксичност. Приложението на плодов сок намалява трансаминазната активност (АЛАТ, АСАТ), доза-зависимо намалява и нивото на МДА в черния дроб, хепаталните хистопатологични промени и предотвратява изчерпването на хепатален глутатион (Valcheva-Kuzmanova et al., 2004). В друго тяхно проучване, където ПСАМ е приложен преди индукция на хепатотоксичност от CCl₄, се потвърждават тези резултати (Valcheva-Kuzmanova et al., 2006). Ефектът е дори съпоставим с хепатопротективният агент sylimarin (Kondeva-Burdina et al., 2015). Хепатопротективните ефекти на *Aronia melanocarpa* се отдават на високото съдържание на антиоксидантни ПФ, способни да инактивират РКФ. Освен това, в модел на хронична алкохол-индуцирана хепатотоксичност е доказана и ролята на Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-like 2) в хепатопротекцията. Активацията на този фактор потиска ключови про-инфламаторни пътища и намалява нивата на свободни радикали (Wang Z et al., 2020). Известно, че същият фактор модулира активността на гени, регулиращи липидният метаболизъм и намалява липидна акумулация в черния дроб (Chambel et al., 2015). Така, индукцията на Nrf2-сигналният път (включително от ПСАМ) представлява важен път за повлияване на NAFLD. В друго изследване, в модел на чернодробна фиброза при плъхове въпреки, че не се открива антифибротичен ефект за ПСАМ, е потвърден благоприятният му ефект върху чернодробната хистология (намаляване на броя на вакуолизирани хепатоцити и лимфоцитна инфилтрация в черния дроб) (Piotrowska-Kempisty et al., 2020).

Имунохистохимичните изследвания са проведени за оценка на апоптотичния статус в черния дроб и степента на възпалителният отговор. Програмираната клетъчна смърт е оценена чрез изследване апоптотичния маркер Вах и антиапоптотичния маркер Bcl-2 и тяхното съотношение (Вах/Bcl-2). В съответствие с наличните литературни данни, в група МС експресията на проапоптотичния маркер е значително по-висок от контролите. Третирането с ПСАМ доза-зависимо намалява Вах и в трите групи. Експресията на антиапоптотичния Bcl-2 е с тенденция на занижаване в група МС в сравнение с контролната група. Приложението на арониев сок повишава експресията на този маркер и в трите групи, със значим ефект във втората третирана група (МС+ПСАМ₅). Съотношението Вах/Bcl-2, отразяващо податливостта на клетките към програмирана клетъчна смърт, е сигнификантно повишен в група МС спрямо всички други групи, което е израз на активна хепатоцитна апоптоза при МС. Приложението на ПСАМ намалява това отношение значително и в трите третирани групи. Тези наши резултати са в съответствие с антиапоптотичните ефекти на редица фенолни съединения и полифенолни екстракти със съдържание, близко на сока, използван в това проучване. Например богат на флаваноли и фенолни киселини екстракт от растението *Hibiscus sabdarifa L.l* предотвратява парацетамол-индуцираната чернодробна стеатоза, стимулирайки антиоксидантната защита, подобрявайки митохондриалната функция и намалявайки нивото на Вах. Описано е дозо-зависимо намаление на стеатозата (Lee CH et al., 2012). Хепатопротективният ефект на куркумин в частност се дължи на потискане на апоптозата и този ефект е доказан в проучване от 2016 г., където се установява, че той води до down-регулация на проапоптотичния Вах (Fadda et al., 2017).

Степента на имунният и възпалителен отговор в чернодробните срезове в настоящето проучване е изследвана чрез MAC387. MAC387 (macrophage marker antibody 387) представлява макрофагеален имунохистохимичен маркер, отдиференциращ локалните тъканни макрофаги от мигрирали от кръвната циркулация такива (Subimerb et al., 2010). Нашите резултати показват, че в МС групата се наблюдава изразено реактивно възпаление, като израз на това е значимо по-високият брой MAC387(+)-клетки. Този проинфламаторен отговор е потиснат от приложението на ПСАМ и в трите дози, където експресията на маркера (и съответно макрофагеалната инфилтрация в черния дроб) е значително потисната. Тези данни потвърждават наличието на хепатална патология при МС и за пореден път противовъзпалителните ефекти на *Aronia melanocarpa*, но за първи път се установява хепатопротективен ефект на плодовия сок в

модел на метаболитен синдром. Тези данни биха могли да служат за използването на този продукт в клиничната практика като терапевтичен функционален хранителен продукт при тази хепатална компликация на МС.

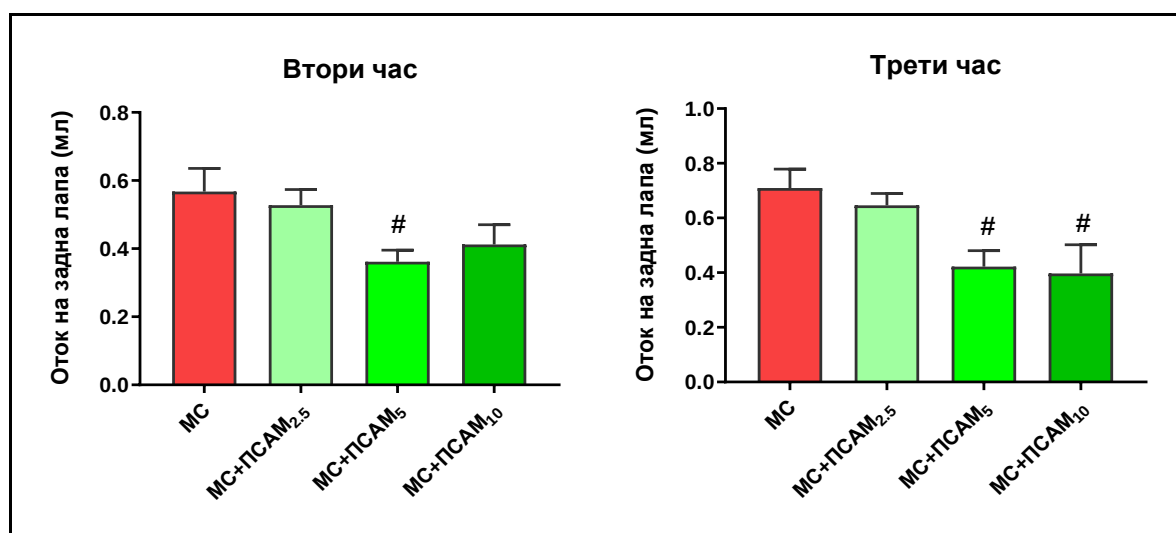
7. Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху карагенан-индуциран оток на задна лапа

7.1. Резултати

Резултатите са отразени в Таблицы 21 и 22 и на Фигура 26. Субплантарното инжектиране на карагенан индуцира остро възпаление на лявата задна лапа на плъховете от всички експериментални групи. В група МС карагенан-индуцираният оток нараства постепенно и достига стойност 0.87 ± 0.09 мл на петия час. Значимо намаление в обема на отока се наблюдава от доза 5 мл/кг ПСАМ на втория (37% инхибиция на отока) и третия час след инжектирането (41% инхибиция на отока) ($p < 0.05$ спрямо група МС) и от доза 10 мл/кг на третия час (44% инхибиция на отока) ($p < 0.05$ спрямо група МС). Въпреки регистрираните 54% и 49% инхибиция на отока на първия час съответно при групи МС+ПСАМ_{2.5} и МС+ПСАМ₁₀ спрямо група МС, липсва значимост при статистическия анализ на абсолютните стойности на обема на отока на тези групи.

Таблица 21. Стойности на оток на задна лапа (мл) на 30^{-тата} минута, както и на 1^{-ви}, 2^{-ри}, 3^{-ти}, 4^{-ти} и 5^{-ти} час от инжектирането на карагенан на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; # $p < 0.05$ спрямо група МС

Група	Обем на отока – 30 ^{-та} минута	Обем на отока – 1 ^{-ви} час	Обем на отока – 2 ^{-ри} час	Обем на отока – 3 ^{-ти} час	Обем на отока – 4 ^{-ти} час	Обем на отока – 5 ^{-ти} час
МС	0.16 ± 0.07	0.37 ± 0.08	0.57 ± 0.07	0.57 ± 0.07	0.75 ± 0.10	0.87 ± 0.09
МС+ПСАМ _{2.5}	0.12 ± 0.05	0.17 ± 0.06	0.53 ± 0.04	0.65 ± 0.04	0.78 ± 0.06	0.70 ± 0.12
МС+ПСАМ ₅	0.20 ± 0.01	0.24 ± 0.03	$0.36 \pm 0.03^{\#}$	$0.40 \pm 0.06^{\#}$	0.62 ± 0.08	0.70 ± 0.09
МС+ПСАМ ₁₀	0.14 ± 0.06	0.19 ± 0.06	0.41 ± 0.06	$0.40 \pm 0.10^{\#}$	0.56 ± 0.09	0.73 ± 0.07



Фигура 26. Обем на отока на задна лапа (мл) на 2^{-ри} (ляво) и 3^{-ти} (дясно) час след инжектиране на карагенан на плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10 мл/кг; [#]p < 0.05 спрямо МС

Таблица 22. Инхибиция на отока на задна лапа (%) при плъхове с диетично-индуциран МС, третирани с ПСАМ в дози 2.5, 5.0 и 10.0 мл/кг

	Инхибиция на обема на отока – 30-та минута	Инхибиция на обема на отока – 1-ви час	Инхибиция на обема на отока – 2-ри час	Инхибиция на обема на отока – 3-ти час	Инхибиция на обема на отока – 4-ти час	Инхибиция на обема на отока – 5-ти час
МС+ПСАМ _{2.5}	Липсва	54%	7%	8%	9%	19.5%
МС+ПСАМ ₅	25%	35%	37%	41%	18.5%	19.5%
МС+ПСАМ ₁₀	12.5%	49%	28%	44%	18.5%	16%

7.2. Обсъждане

МС се счита за хронично патологично състояние, характеризиращо се с нискостепенно възпаление. Този патофизиологичен момент се асоциира с ефектите на висцералната мастна тъкан, която продуцира възпалителни молекули (Eckel et al., 2005) .

Карагенан представлява мукополизахариден екстракт, изолиран от британския фармацевт Stanford през 1862 г (Morris, 2003). Когато се инжектира подкожно, той индуцира остър възпалителен отговор. Индуцираният от карагенан оток на лапата е често използван модел на остро възпаление в експерименталната медицина. Състои се от 2 фази: първа фаза (1-2 часа след инжектиране на карагенан), характеризираща се с

повишено освобождаване на серотонин, брадикинин, хистамин от мастоцитите, и втора фаза (3-6 часа след инжектиране на карагенан), характеризиращ се с инфилтрация на неутрофили, синтез на РКФ, освобождаване на продукти на арахидоновата киселина като простагландини, левкотриени и освобождаване на цитокини (IL-1 β , IL-6, IL-10 и TNF- α) (Vinegar et al., 1987; Crunkhorn and Meacock, 1971).

Плодовете на *Aronia melanocarpa* са сред растителните източници с много високо съдържание на полифенолни съставки. Понастоящем липсват литературни данни за изследване на ефектите на ПСАМ върху индуциран от карагенан оток на лапа в експериментален модел на МС. Това проучване изследва противовъзпалителния потенциал на богатият на ПФ ПСАМ при индуцирано от карагенан възпаление на задна лапа на плъхове с диетично-индуциран МС.

Настоящият експеримент демонстрира, че ПСАМ предизвиква потискане на острия възпалителен отговор по време на шестте времеви интервали, с най-израени ефекти на втория (в група МС+ПСАМ₅) и третия час (в група МС+ПСАМ₁₀) след инжектиране на карагенан. Ефектът на втория час може да се дължи на способността на ПСАМ да антагонизира ефектите на хистамин, серотонин и брадикинини. Такъв ефект на ПСАМ е документиран в модел на хистамин-индуцирано и серотонин-индуцирано възпаление на лапите на плъхове (Borissova et al., 1994). В това проучване противовъзпалителният ефект остава висок през третия час и е по-слабо изразен след това. По време на втората фаза на възпаление, предизвикано от карагенан, арониевият сок антагонизира ефекта на метаболитите на арахидоновата киселина и различни цитокини. Подобни активности на полифеноли от арония са демонстрирани в други проучвания. В миши модел на натриев декстран сулфат-индуциран улцерозен колит, арониев екстракт, администриран орално, потиска продукцията на простагландин E₂ и намалява нивата на азотен оксид, IL-6 и TNF- α в липополизахарид стимулирани макрофаги (Kang SH et al., 2017). В модел на белодробна токсичност, предизвикана от amiodarone, ПСАМ намалява IL-6 при плъхове (Valcheva-Kuzmanova et al., 2014). Установено е, че сухият екстракт от *Aronia melanocarpa* (съдържащ минимум 25% антоцианини) инхибира маркерите на възпаление (IL-1 β , TNF- α) и липидна пероксидация (MDA) в стимулирани с липополизахариди RAW 264 клетки (Banach et al., 2020). По подобен начин, в модел на МС при плъхове, предизвикани от диета, богата на фруктоза, администрация на арониев екстракт довежда до намаляване на провъзпалителните цитокини (IL-1 β , IL-6, TNF- α) и увеличаване на адипонектин (Qin and Anderson, 2012). Спортистите,

приемащи сок от арония, показват намаляване на ниво на TNF- α и по-висок общ антиоксидантен капацитет (Skarpańska-Stejnborn et al., 2014). Прием на екстракт от черна арония при пациенти след инфаркт на миокарда води до намаляване в нивото на MCP-1, CRP, IL-6, адхезионните молекули ICAM и VCAM и повишаване нивото на противовъзпалителния адипонектин (Naruszewicz et al., 2007). Цианидин 3-арабинозид притежава изразена антиоксидативна активност поради блокиране на прооксидантни ензими като 15-липоксигеназа и ксантин оксидаза (Bräunlich et al., 2013). В използвания сок този антоцианин е представен във сравнително висока концентрация, което вероятно допринася за наблюдавания остър противовъзпалителен ефект на ПСАМ.

Както е описано, индуцираното от карагенан възпаление на лапите е свързано с оксидативен стрес. Въз основа по този факт можем да предположим, че веществата с антиоксидантен ефект биха били полезни. Съществуват редица проучвания, които открояват антиоксидантната активност на полифенолите, съдържащи се в *Aronia melanocarpa*. Вълчева-Кузманова и сътр. установяват, че ПСАМ и неговите ПФ имат подобни на каталазата и супероксид дисмутазата ефекти и радикал-очистваща активност (Valcheva-Kuzmanova et al., 2007a; Valcheva-Kuzmanova et al., 2012). За сока, използван в този експеримент, е доказано, че притежава висок кислороден радикалабсорбционен капацитет и хидроксилен радикалпредотвратяващ капацитет *in vitro* (Valcheva-Kuzmanova et al., 2014). Богата на полифеноли екстракт от *Aronia melanocarpa* значително и доза-зависимо инхибира продукцията на супероксидния радикал при пациенти с висок сърдечно-съдов риск (артериална хипертония, хиперхолестеролемия, тютюнопушене и захарен диабет) (Ryszawa et al., 2006). В модел на колит, индуциран от 2,4,6-тринитробензенсулфонова киселина, ПСАМ подобрява макроскопичната и микроскопичната признаци на колит и предотвратяване увеличаването на концентрации на TBARS в дебелото черво (Valcheva-Kuzmanova et al., 2018). В проучване на Ciocioiu et al. антиоксидантната активност на богатия на полифеноли екстракт от *Aronia melanocarpa* е изследван в L-NAME-индуциран експериментален модел на АХ. Значително увеличение на GPx активност, общия антиоксидантен капацитет, както и значително намаляване в серумното ниво на MDA се наблюдава в групите, лекувани с арония (Ciocioiu et al., 2013).

Следователно, бихме могли да приемем, че наблюдаваните ефекти на ПСАМ в модел на остро възпаление, индуцирано от карагенан, е много вероятно да се дължат на

антиоксидантните и противовъзпалителни ефекти на съдържащите се в сока фенолни съединения.

V. ИЗВОДИ

1. Приложението на високомастна, високофруктозна диета при мъжки Wistar плъхове в продължение на 10 седмици индуцира метаболитен синдром. При експерименталните животни се наблюдават следните промени:

1.1. Настъпват поведенчески промени: пространствената памет се влошава, развива се тревожност.

1.2. Наблюдават се биохимични нарушения, характерни за метаболитния синдром – повишени нива на кръвната глюкоза в хода на глюкозо-толерансен тест и на серумните триглицериди.

1.3. Настъпват биохимични промени, отразяващи развитието на оксидативен стрес – компенсаторно повишаване на серумната SOD активност.

1.4. Развива се висцерално затлъстяване – клиничен признак на метаболитен синдром.

1.5. Хистопатологично:

1.5.1. В мастната тъкан се наблюдава адипоцитна хипертрофия.

1.5.2. В черния дроб се развиват възпалителни (лимфоцитна инфилтрация) и дегенеративни промени, дребнокапчеста стеатоза и хепатоцитна некроза.

1.5.3. В миокарда се наблюдават дегенеративни промени, изразени като раздалечаване на кардиомиоцитите.

1.5.4. В коронарен кръвоносен съд се получава активиране или некроза на ендотелните клетки и оголена базална мембрана.

1.6. Имунохистохимично:

1.6.1. В мастната тъкан експресията на про-апоптотичния Вах и на анти-апоптотичния Bcl-2 са повишени. Съотношението Вах/Bcl-2 също е повишено – израз на превалиращ апоптотичен процес.

1.6.2. В черния дроб експресията на Вах е дифузна и значителна, а тази на Bcl-2 е понижена. Повишеното съотношение Вах/Bcl-2 в хепатоцитите показва проапоптотичен фенотип. Експресията на про-инфламаторния MAC387 е значителна и се наблюдава както в хепатоцити, така и в синусоидални клетки – израз на възпалителна активност.

1.7. Субплантарното приложение на 1 мг карагенан при животните с метаболитен синдром индуцира остро възпаление и повишаване обема на задната лапа.

2. При експерименталните животни, пероралното приложение на плодов сок от *Aronia melanocarpa* в три различни дози (2.5 мл/кг, 5.0 мл/кг и 10 мл/кг) води до подобрене на значителна част от поведенческите, биохимичните, хистопатологичните и имунохистохимичните нарушения, свързани с метаболитния синдром:

2.1. Във всички дози се подобрява пространствената памет, като ефектът е най-изразен в доза 5.0 мл/кг.

2.2. Намалява индуцираната от метаболитния синдром тревожност, като ефектът е най-изразен в доза 2.5 мл/кг.

2.3. В хода на глюкозо-толерансен тест кръвната глюкоза се понижава до изходните (контролните) стойности на 30^{-тата} и 60^{-тата} минута от дози 2.5 и 5.0 мл/кг.

2.4. Серумните нива на триглицеридите намаляват доза-зависимо във всички третиранни групи.

2.5. Намалява оксидативният стрес, като се понижава компенсаторно повишената активност на SOD.

2.6. Понижават се индексите на ретроперитонеалната и тоталната мастна тъкан, като ефектът върху първия индекс е най-изразен в дози 2.5 и 5.0 мл/кг, а върху втория – в доза 2.5 мл/кг.

2.7. От всички дози се подобряват хистопатологичните промени, свързани с метаболитния синдром:

3.7.1. В мастната тъкан намалява значимо размерът на адипоцитите до размер, сходен с този на контролните плъхове.

3.7.2. В миокарда се възстановява кардиомиоцитната структура.

3.7.3. В кръвоносен съд се запазват ендотела и базалната мембрана.

3.7.4. В черния дроб се редуцират възпалителният инфилтрат, дегенеративните и стеатозните промени.

2.8. Подобряват се болшинстовото от индуцираните от метаболитния синдром имунохистохимични промени:

2.8.1. В мастната тъкан:

2.8.1.1. Експресията на Вах се понижава, като ефектът е значим от доза 2.5 мл/кг.

2.8.1.2. Експресията на Bcl-2 се повишава значимо в дози 2.5 и 5.0 мл/кг, докато дозата 10 мл/кг намалява значимо експресията.

2.8.1.3. Съотношението Вах/Bcl-2 намалява в по-ниските дози (2.5 и 5.0 мл/кг) и се повишава в доза 10 мл/кг.

2.8.2. В черния дроб:

3.8.2.1. Експресията на Вах се понижава значимо от всички дози.

2.8.2.2. Експресията на Bcl-2 нараства при всички използвани дози, като значим ефект се наблюдава в доза 5.0 мл/кг.

2.8.2.3. Съотношението Вах/Bcl-2 намалява значимо във всички използвани дози.

2.8.2.4. Експресията на MAC387 намалява значимо във всички дози.

2.9. Приложението на плодов сок от *Aronia melanocarpa* във всички дози и времеви интервали намалява отока на задна лапа при плъхове, като ефектът е значим на 2^{-ри} час при доза 5.0 мл/кг и на 3^{-ти} час при дози 5.0 мл/кг и 10 мл/кг.

VI. ПРИНОСИ

1. За първи път са получени данни за ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху поведението при плъхове с експериментален модел на диетично-индуциран метаболитен синдром, като са установени:

1.1. Анксиолитично-подобен ефект;

1.2. Подобрене на пространствената памет.

2. За първи път са получени данни за метаболитни ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* при плъхове с експериментален модел на диетично-индуциран метаболитен синдром, като са установени:

2.1. Глюкозопонижаващ ефект;

2.2. Антихипертриглицеридемичен ефект.

3. За първи път са получени данни за потискане на оксидативния стрес от плодов сок от *Aronia melanocarpa* при плъхове с експериментален модел на диетично-индуциран метаболитен синдром.

4. За първи път са получени данни за намаляване на висцералното затлъстяване от плодов сок от *Aronia melanocarpa* при плъхове с експериментален модел на диетично-индуциран метаболитен синдром.

5. За първи път са получени данни за протективни ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* спрямо хистопатологичните промени в мастна тъкан, миокард, коронарни съдове и черен дроб при плъхове с експериментален модел на диетично-индуциран метаболитен синдром.

6. За първи път са получени данни за ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху програмираната клетъчна смърт в мастна тъкан и черен дроб при плъхове с експериментален модел на диетично-индуциран метаболитен синдром, като е установено, че:

6.1. Сокът потиска програмираната клетъчна смърт в мастната тъкан в дози 2.5 и 5.0 мл/кг. За първи път е установено, че плодов сок от *Aronia melanocarpa* във

висока доза (10 мл/кг) може да индуцира апоптоза на адипоцитите в мастната тъкан. Това изисква по-задълбочени изследвания относно ефекта на сока върху адипоцитната апоптоза в различни дози и с различна продължителност на третиране с оглед идентифициране на възможните последици от такъв ефект.

6.2. Потиска програмираната клетъчна смърт в черния дроб при всички дози.

7. За първи път е установен противовъзпалителен ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* след карагенов-индуцирано остро възпаление на задна лапа при плъхове с експериментален модел на метаболитен синдром.

VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Списък на публикациите, свързани с дисертационния труд

1. **Abtulov M**, Valcheva-Kuzmanova S. Beneficial effects of polyphenols in metabolic syndrome – a review. Scripta Scientifica Medica 2021; 53(3): 9-20.

2. **Abtulov M**, Kuzmanova V, Kuzmanov A, Todorov S, Pavlov D, Kuzmanov K, Todorova M, Eftimov M, Gancheva S, Zhelyazkova-Savova M, Valcheva-Kuzmanova S. Effect of Aronia melanocarpa fruit juice on carrageenan-induced paw edema in metabolic syndrome rats. Scripta Scientifica Medica 2021; 53(3): 31-36.

3. **Abtulov M**, Gancheva S, Todorova M, Eftimov M, Zhelyazkova-Savova M, Valcheva-Kuzmanova S. Effect of Aronia melanocarpa fruit juice on the antioxidant defense system in rats with diet-induced metabolic syndrome. Scripta Scientifica Medica 2021; 53(4): 47-53.

4. **Reyzov M**, Eftimov M, Gancheva S, Todorova M, Zhelyazkova-Savova M, Tsaneva M, Valcheva-Kuzmanova S. Effect of Aronia melanocarpa fruit juice on glucose tolerance, lipid metabolism and obesity in a rat model of metabolic syndrome. Acta Alimentaria 2022 (**IF 2020: 0.650**) [Под печат]

2. Списък на участията, свързани с дисертационния труд

1. Todorova M, Eftimov M, Gancheva S, **Reyzov M**, Zhelyazkova-Savova M, Valcheva-Kuzmanova S. Behavioral effects of the polyphenol-rich Aronia melanocarpa fruit juice in

rats with diet-induced metabolic syndrome. 32nd ECNP Congress 7-10 September 2019, Copenhagen, Denmark.

2.**Reyzov M**, Todorova M, Gancheva S, Eftimov M, Valcheva-Kuzmanova S, Zhelyazkova-Savova M. Diet-induced metabolic syndrome in rats is associated with anxiety and impairment of spatial memory. Jubilee Scientific Conference “45 years Medical university – Pleven” 31 October – 02 November 2019, Pleven, Bulgaria.

3.Цанева М, **Абтулов М**, Ефтимов М, Ганчева С, Тодорова М, Желязкова-Савова М, Вълчева-Кузманова С. Плодов сок от *Aronia melanocarpa* подобрява хистопатологичните промени в черен дроб в експериментален модел на метаболитен синдром. XIII национален конгрес по патология, 10-12 септември 2021, Бургас, България. Сборник резюмета: стр. 55-56.

4.**Abtulov M**, Gancheva S, Todorova M, Eftimov M, Zhelyazkova-Savova M, Valcheva-Kuzmanova S. Effect of polyphenol-rich *Aronia melanocarpa* fruit juice on antioxidant defence system in rats with diet-induced metabolic syndrome. Seventh Pharmaceutical Business Forum and Scientific and Practical Conference “Digital solutions and innovation in pharmaceutical practice and education – challenges and opportunities”, 22-23 October 2021, Varna, Bulgaria. Scripta Scientifica Pharmaceutica 2021; 8(1): 46.

Поднасям най-сърдечните си благодарности на моя научен ръководител – проф. Стефка Вълчева-Кузманова, на проф. Мария Цанева, на доц. Мария Желязкова-Савова, на доц.Силвия Ганчева, на мои колеги и на всички работещи в катедрата. Благодаря също на моята учителка г-жа Нина Цонева, на мои близки приятели и на моето семейство. Без подкрепата и помощта Ви този труд не би бил реализиран в настоящия си вид. ☺