

## РЕЗЮМЕТА НА НАУЧНИТЕ ТРУДОВЕ

### НА

Гл. ас. Мирослав Цонков Ефтимов, д.м.

представена за участие в конкурс за заемане на академична длъжност „доцент“ по професионално направление 7.4. Обществено здраве, научна специалност: Управление на общественото здраве (лекарствена употреба и фармакоикономика в здравеопазването)

#### **В4. Научни публикации (не по-малко от 10) в издания, които са реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация**

1. **B4.1** Ivanova D, Pavlov D, **Eftimov M**, Kalchev K, Nashar M, Tzaneva M, Valcheva-Kuzmanova S. Subchronic toxicity study of ethanol infusion from *Cotinus coggygia* wood in rats. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 2013; 19(2): 182-185.

*Cotinus coggygia* is considered to be a poisonous plant, however there are data from traditional medicine indicating an internal use of plant infusions. The aim of this study was to examine the subchronic toxicity of ethanol infusion from *C. coggygia* wood in experimental animals. Three groups of 10 male Wistar rats were treated by stomach gavage for 30 days as follows: (1) distilled water, (2) 20% ethanol, (3) 20% ethanol infusion from wood at doses of 10 ml/kg b.w. Biochemical results showed that the treatment with ethanol infusion from *C. coggygia* wood did not cause subchronic toxicity on liver, kidney or brain. Histological investigation did not detect pathological deviations in the organs of the treated group as compared to both controls. Therefore, *C. coggygia* does not exhibit toxicity and may be used for further study of effects in vivo.

#### **Изследване за субхронична токсичност на етанолов инфуз от дървесина на *Cotinus coggygia* при плъхове**

*Cotinus coggygia* се счита за отровно растение, но данни от традиционната медицина показват, че инфузи от растението могат да бъдат приемани орално. Целта на това проучване е да се изследва субхроничната токсичност на етаноловия инфуз от дървесина на *C. coggygia* при експериментални животни. Три групи от по 10 мъжки Wistar плъха бяха третирани чрез стомашна сонда в продължение на 30 дни, както следва: (1) дестилирана вода, (2) 20% етанол, (3) 20% етанолен инфуз от дървесина на *C. coggygia* в доза от 10 ml/kg телесно тегло. Биохимичните резултати показват, че третирането с етанолов инфуз от дървесина на *C. coggygia* не предизвиква субхронична токсичност върху черния дроб, бъбреците или мозъка. Хистологичното изследване не открива патологични отклонения в органите на третираната група в сравнение с контролите. Следователно *C. coggygia* не проявява токсичност и може да се използва за по-нататъшно изследване на ефектите in vivo.

2. **B4.2** Pavlov D, Nashar M, **Eftimov M**, Kalchev K, Valcheva-Kuzmanova S, Tzaneva M, Ivanova D. Subchronic toxicity study of aqueous infusion from *Cotinus coggygria* leaves in Wistar rats. *Comptes Rendus de l'Académie Bulgare des Sciences* 2013; 66(5): 749-756.

The Eurasian smoke tree (*Cotinus coggygria*) is used by the Balkan folk medicine for its antiseptic and antimicrobial properties as well as for treatment of gingival and throat inflammations. Although *C. coggygria* has been applied mainly externally because of the large gallotannins content, there are few reports for internal use of its leaves against gastric ulcer, diarrhoea, nephritis, anthrax, asthma, cardiac and urinal diseases and even diabetes mellitus. The aim of this study is to examine the toxicity of *C. coggygria* leaves aqueous infusion in experimental animals. Male Wistar rats were treated by stomach gavage with different concentrations of herb infusion (1, 2 and 4%) or distilled water at doses of 10 ml/kg b.w. After 30 days of treatment, the animals were sacrificed and the blood and organs were collected for biochemical and histopathological analyses. Results showed that treatment with aqueous infusion from *C. coggygria* did not cause subchronic toxicity on liver and kidney. Histological investigation did not detect pathological deviations in the organs of treated groups compared with control. No significant changes were observed in the serum levels of hepatic enzymes, urea, creatinine, triacylglycerols and total thyols. The subchronic administration of *C. coggygria* infusion is non-toxic in the applied concentrations and therefore it can be used to study healing effects as reported by the Balkan traditional medicine.

#### **Изследване на субхроничната токсичност на воден инфуз от листата на *Cotinus coggygria* при Wistar плъхове**

Смрадликата (*Cotinus coggygria*) се използва от балканската народна медицина заради своите антисептични и антимикробни свойства, както и за лечение на възпаления на венците и гърлото. Въпреки че *C. coggygria* се прилага главно външно поради голямото съдържание на галотанини, има данни за вътрешна употреба на листата и при стомашна язва, диария, нефрит, антракс, астма, сърдечни и бъбречни заболявания, и дори захарен диабет. Целта на това изследване е да се изследва токсичността на водния инфуз от листата на *C. coggygria* при експериментални животни. Мъжки плъхове Wistar бяха третирани чрез стомашна сонда с различни концентрации на воден инфуз (1, 2 и 4%) или дестилирана вода в дози от 10 ml/kg телесно тегло. След 30 дневно третиране, животните бяха умъртвени и кръвта и органите бяха събрани за биохимични и хистопатологични анализи. Резултатите показват, че лечението с воден инфуз от *C. coggygria* не предизвиква субхронична токсичност върху черния дроб и бъбреците. Хистологичното изследване не открива патологични отклонения в органите на третираните групи в сравнение с контролата. Не са наблюдавани значителни промени в серумните нива на чернодробните ензими, урея, креатинин, триацилглицероли и общи тиоли. Субхроничното приложение на инфуз от *C. coggygria* не е токсично в приложените концентрации и следователно може да се използва за изследване на лечебните ефекти, както се съобщава от балканската традиционна медицина.

3. **B4.3** **Eftimov M**, Pavlov D, Nashar M, Ivanova D, Tzaneva M, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of aqueous infusion from *Cotinus coggygria* leaves on behavior and lipid peroxidation in rats. *Farmacia* 2016; 64 (1): 67-71.

The aim of this study was to investigate the effects of an aqueous infusion from *Cotinus coggygia* leaves (AICCL) on behaviour and on lipid peroxidation in male Wistar rats. The animals were treated orally with three concentrations (1/100, 2/100 and 4/100) AICCL at doses of 10 mL/kg b.w. Control rats received distilled water (10 mL/kg b.w.). After 30 days of treatment, the open field test (OFT) and the forced swim test (FST) were carried out and the lipid peroxidation marker, malondialdehyde (MDA) was measured as a biomarker of oxidative stress. In the OFT, AICCL at all concentrations did not significantly affect the horizontal activity and dose-dependently increased the vertical activity, the effect being significant ( $p < 0.05$ ) at the highest concentration. In the FST, AICCL shortened the immobility time and the effect was significant ( $p < 0.05$ ) at the concentration of 2/100. AICCL did not cause sedation and motor discoordination, and reduced the signs of depression. AICCL caused a tendency to decrease MDA levels in both serum and brain homogenate, but the reduction was not statistically significant. Thus, the favorable effects of AICCL on brain functions in this experiment cannot be attributed to the antioxidant action.

#### **Ефекти на воден инфуз от листа на *Cotinus coggygia* върху поведението и липидната пероксидация при плъхове**

Целта на това проучване беше да се изследват ефектите на воден инфуз от листа на *Cotinus coggygia* (AICCL) върху поведението и върху липидната пероксидация при мъжки плъхове Wistar. Животните бяха третираны орално с три концентрации (1/100, 2/100 и 4/100) AICCL в дози от 10 mL/kg телесно тегло. Контролните плъхове получаваха дестилирана вода (10 mL/kg телесно тегло). След 30 дни третиране бяха проведени тест открито поле (OFT) и тест за принудително плуване (FST) и бе измерена липидната пероксидация чрез малондиалдехид (MDA), като биомаркер на оксидативен стрес. В OFT, AICCL при всички концентрации не повлиява значително хоризонталната активност и дозо-зависимо повишава вертикалната активност, като ефектът е значим ( $p < 0,05$ ) при най-високата концентрация. При FST, AICCL съкращава времето на неподвижност и ефектът е значим ( $p < 0,05$ ) при концентрация 2/100. AICCL не предизвиква седация и двигателна дискоординация, и намалява признаците на депресия. AICCL предизвиква тенденция за намаляване на нивата на MDA както в серума, така и в мозъчния хомогенат, но намалението не е статистически значимо. Затова, благоприятните ефекти на AICCL върху мозъчните функции в този експеримент не могат да бъдат приписани на антиоксидантното му действие.

4. **B4.4** Valcheva-Kuzmanova S, Denev P, **Eftimov M**, Georgieva A, Kuzmanova V, Kuzmanov A, Kuzmanov K, Tzaneva M. Protective effects of *Aronia melanocarpa* juices either alone or combined with extracts from *Rosa canina* or *Alchemilla vulgaris* in a rat model of indomethacin-induced gastric ulcers. *Food and Chemical Toxicology* 2019; 132: 110739.

The aim of the study was to investigate the effects of four *Aronia melanocarpa*-based juices in a rat model of indomethacin-induced gastric ulceration. The juices were: AM1 and AM2 (produced from aronia fruits at 20 °C and 60 °C, respectively), AMRC (a mixture of AM2 with *Rosa canina* extract) and AMAV (aronia juice with *Alchemilla vulgaris*). Male Wistar rats were used. Each of the juices (10 ml/kg) was administered for 10 days. Indomethacin (30 mg/kg) was injected subcutaneously and after 4 h, the effects were estimated. Indomethacin caused heavy destructions of the gastric mucosa, increased the expression of Bax and decreased the expression of Bcl-2,

induced a certain increase in lipid peroxidation and a slight decrease in gastric PGE2 content. The pretreatment with the juices reduced the severity of indomethacin-induced gastric lesions and antagonized the effects of indomethacin on apoptosis and lipid peroxidation. The highest was the protective effect of AMAV, the juice with the highest polyphenolic content. The protective effect of *Aronia melanocarpa*-based juices against indomethacin-induced gastric lesions could be attributed to their polyphenolic contents. The mechanism involved to the highest extent in the protective effect of the juices was the inhibition of apoptosis.

**Протективни ефекти на плодови сокове от *Aronia melanocarpa*, приготвени самостоятелно или комбинирани с екстракти от *Rosa canina* или *Alchemilla vulgaris* в модел на индометацин-индуцирани стомашни язви при плъхове**

Целта на изследването е да се проучат ефектите от четири сока на основата на *Aronia melanocarpa* в модел на индометацин-индуцирана стомашна язва при плъхове. Соковете са: AM1 и AM2 (произведени от плодове на арония при 20 °C и 60 °C, съответно), AMRC (смес от AM2 с екстракт от *Rosa canina*) и AMAV (сок от арония с *Alchemilla vulgaris*). Използвани са мъжки Wistar плъхове. Всеки от соковете (10 ml/kg) е прилаган в продължение на 10 дни. Индометацин (30 mg/kg) е инжектиран подкожно и след 4 часа се оценяват ефектите. Индометацинът причинява тежки деструкции на стомашната лигавица, повишава експресията на Вах и намалява експресията на Bcl-2, предизвиква известно повишаване на липидната пероксидация и леко намаляване на стомашното съдържание на PGE2. Претретирането със соковете намалява тежестта на предизвиканите от индометацин стомашни лезии и антагонизира ефектите на индометацин върху апоптозата и липидната пероксидация. Най-висок е защитният ефект на AMAV, сокът с най-високо полифенолно съдържание. Защитният ефект на соковете на основата на *Aronia melanocarpa* срещу предизвикани от индометацин стомашни язви вероятно се дължи на тяхното полифенолно съдържание. Механизмът, участващ в най-голяма степен в протективния ефект на соковете, е инхибирането на апоптозата.

5. **B4.5** Borisova V, Eftimov M, Valcheva-Kuzmanova S. Assessment of *Chaenomeles maulei* fruit juice effects in tests for depression and anxiety. *Acta Medica Bulgarica*, 2019; 46(1): 34-38.

Depression and anxiety are prevalent chronic psychiatric disorders affecting many people worldwide. Over the past decades, much attention has been drawn to herbal psychopharmacology, offering fewer adverse reactions. The main bioactive compounds in *Chaenomeles maulei* fruits are polyphenols known for their behavioral effects. The objective of the present study was to assess *Chaenomeles maulei* fruit juice (CMFJ) effects in tests for anxiety and depression. The animals used were 32 male healthy Wistar rats treated orally with CMFJ for 16 days. They were divided in four groups of 8 animals. The control group received distilled water and the rest of the groups were treated with CMFJ at 2.5, 5 and 10 ml/kg doses. We assessed the social interaction time as a measure of anxiety and the immobility time in the forced swim test as a measure of behavioral despair. In the social interaction test, the 14 days administration of CMFJ did not produce any significant changes in the time spent in social interaction. After 16 days of administration all doses of CMFJ significantly decreased the immobility time of the rats ( $p < 0.05$ ) in comparison to the

control group. These results allow making the conclusion that CMFJ lacked anxiolytic activity, but showed an antidepressant-like effect.

### Оценка на ефектите на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тестове за депресия и тревожност

Депресията и тревожността са хронични психиатрични разстройства, засягащи много хора по света. През последните десетилетия голямо внимание се обръща на растителната психофармакология, където нежеланите реакции са ограничени до минимум. Основните биоактивни съединения в плодовете на *Chaenomeles maulei* са полифеноли, известни със своите ефекти върху поведението. Целта на настоящото проучване беше да се оценят ефектите на плодovия сок от *Chaenomeles maulei* (CMFJ) при тестове за тревожност и депресия. Използваните животни са 32 здрави мъжки Wistar плъха, третирани орално с CMFJ в продължение на 16 дни. Те бяха разделени на четири групи по 8 животни. Контролната група получи дестилирана вода, а останалите групи бяха третирани с CMFJ при дози от 2,5, 5 и 10 ml/kg. Оценено бе времето за социално взаимодействие като показател за безпокойство и времето за неподвижност в теста за принудително плуване като показател за депресивно-подобно поведение. В теста за социално взаимодействие, 14-дневното приложение на CMFJ не доведе до значими промени във времето на социално взаимодействие между плъховете. След 16-дневно приложение, всички дози CMFJ значително намаляват времето на неподвижност на плъховете ( $p < 0,05$ ) в сравнение с контролната група. Тези резултати позволяват да се направи заключението, че CMFJ няма анксиолитична активност, но показва антидепресивно-подобен ефект.

6. **B4.6** Borisova V, Eftimov M, Valcheva-Kuzmanova S. Biochemical evaluation of liver and kidney function after subchronic administration of *Chaenomeles maulei* fruit juice to rats. *Bulgarian Chemical Communications* 2019; 51 (Special Issue A): 29-34.

*Chaenomeles japonica* var. *maulei* (Mast.) Lavall, e, belonging to the *Chaenomeles* genus, contains high concentrations of polyphenols with antioxidant and anti-inflammatory activities. The aim of the current research was to evaluate the effects of *Chaenomeles maulei* fruit juice (CMFJ) on liver and kidney functions after subchronic juice administration to rats using biochemical parameters. Male healthy Wistar rats ( $n=64$ ) were used, 32 of them treated for 14 days and the rest 32 animals treated for 30 days. For each treatment period, the animals were divided in 4 groups of 8 rats: Control, CMFJ2.5, CMFJ5 and CMFJ10. The serum enzymes used for the assessment of liver function were: aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) determined on the 14th and 30th day. The indices measured for kidney function were serum concentrations of creatinine and urea on the 14th and 30th day. The serum levels of AST were significantly reduced after 30 days of CMFJ (10 ml/kg) administration ( $p < 0.05$ ) in comparison with the Control. The rest of the liver enzyme tests did not show a significant difference between the control animals and the CMFJ-treated animals. There was also no significant change in the indices of kidney function after 14 and 30 days of CMFJ administration. In conclusion, the results from the current investigation showed the safety of the subchronic CMFJ administration. The highest dose of CMFJ produced a reduction in the levels of AST, probably because of its polyphenolic content known to be antioxidant and organ-protective.

## Биохимично оценяване на чернодробната и бъбречната функция след субхронично приложение на плодов сок от *Chaenomeles maulei* при плъхове

*Chaenomeles japonica* var. *maulei* (Mast.) Lavall, принадлежащ към рода *Chaenomeles*, съдържа високи концентрации на полифеноли с антиоксидантно и противовъзпалително действие. Целта на настоящото изследване е да се оценят ефектите на плодовия сок от *Chaenomeles maulei* (CMFJ) върху функциите на черния дроб и бъбреците, след субхронично приложение при плъхове, като се използват биохимични параметри. Използвани са мъжки плъхове Wistar (n=64), 32 от тях са третирани в продължение на 14 дни, а останалите 32 животни са третирани в продължение на 30 дни. За всеки период на третиране, животните бяха разделени на 4 групи от 8 плъха: контрола, CMFJ2.5, CMFJ5 и CMFJ10. Серумните ензими, използвани за оценка на чернодробната функция - аспартат аминотрансфераза (AST), аланин аминотрансфераза (ALT) и алкална фосфатаза (ALP), са измерени на 14-ия и 30-ия ден. Индексите, за оценяване на бъбречната функция, са серумните нива на креатинин и урея, определени на 14-ия и 30-ия ден. Нивата на AST бяха значително намалени след 30-дневно приложение на CMFJ (10 ml/kg) ( $p < 0,05$ ), в сравнение с контролата. При останалите чернодробни ензимни не се наблюдава значима разлика между контролите и третираните с CMFJ животни. Също така няма значителна промяна в индексите на бъбречната функция след 14- и 30-дневно от приложението на CMFJ. В заключение, резултатите от настоящото проучване показаха безопасността на субхроничното приложение на CMFJ. Най-високата доза CMFJ доведе до намаляване на нивата на AST, вероятно дължащо се на полифенолите, за които е известно, че притежават антиоксидантно и органо-протективно действие.

7. **B4.7** Abtulov M, Zhelyazkova-Savova M, Gancheva S, Kuzmanov K, Pavlov D, Kuzmanova V, Kuzmanov A, Salbashian M, **Eftimov M**, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of *Kochia scoparia* on carrageenan-induced paw edema in experimental model of metabolic syndrome. *Bulgarian Chemical Communications*, 2020, 52, Special Issue D, 55-57.

Metabolic syndrome (MS) is a global health issue affecting a significant part of the world population. Low-grade inflammation is one of the specific features of MS. *Kochia scoparia* is an annual plant used in the traditional Chinese medicine. The present study aimed to examine the effect of an aqueous infusion of *K. scoparia* seeds on the acute carrageenan-induced rat paw inflammation in an experimental model of MS. Forty male Wistar rats were allocated into four groups: MS, MS+1.5KS, MS+3.0KS and MS+6.0KS, all receiving a high-fat high-fructose diet. The drinking fluid of MS group was 10% fructose in water while the other three groups were drinking 10% fructose in aqueous *K. scoparia* (KS) seeds infusion of different strengths (prepared from 1.5, 3.0 and 6.0 g KS seeds in 100 ml of boiling water, respectively). At the end of the 10 weeks of dietary intervention, carrageenan (1 mg as 0.1 ml solution) was injected in the left hind paw. The paw edema was measured on the 30th, 60th, 120th, 180th, 240th and 300th minute after the injection. On the 30th minute, *K. scoparia* seeds infusion caused a significant dose-dependent decline in the paw edema. No further effect of the infusion was observed during the next time intervals. In conclusion, the results from the present study showed that the chronic administration of the aqueous *K. scoparia* seeds infusion decreased the carrageenan-induced paw inflammation in rats with metabolic syndrome but the anti-inflammatory effect appeared to be weak and short-lived.

## Ефекти на върху индуциран от карагенан оток на лапа в експериментален модел на метаболитен синдром

Метаболитният синдром (МС) е глобален здравен проблем, който засяга значителна част от световното население. Нискостепенното възпаление е една от специфичните характеристики на МС. *Kochia scoparia* е едногодишно растение, използвано в традиционната китайска медицина. Настоящото проучване имаше за цел да изследва ефекта от воден инфуз от семена на *K. scoparia* върху острото възпаление на лапата на плъх, предизвикано от карагенан, в експериментален модел на МС. Четиридесет мъжки Wistar плъхове бяха разпределени в четири групи: MS, MS+1.5KS, MS+3.0KS и MS+6.0KS, всички получаващи диета с високо съдържание на мазнини и фруктоза. Течността за пиене на групата MS беше 10% фруктоза във вода, докато другите три групи пиеха 10% фруктоза във воден инфуз от семена на *K. scoparia* (KS) с различни концентрации (приготвени съответно от 1.5, 3.0 и 6.0 g семена на KS в 100 ml вряща вода). В края на 10-тата седмица на диетата, карагенан (1 mg като 0,1 ml разтвор) беше инжектиран в лявата задна лапа. Отокът на лапата се измерва на 30-та, 60-та, 120-та, 180-та, 240-та и 300-та минута след инжектирането. На 30-ата минута инфузията на семена на *K. scoparia* причинява значително дозозависимо намаляване на отока на лапата. През следващите интервали от време не се наблюдава допълнителен ефект от инфуза. В заключение, резултатите от настоящото проучване показват, че хроничното приложение на воден инфуз от семена на *K. scoparia* намалява предизвиканото от карагенан възпаление на лапите при плъхове с метаболитен синдром, но противовъзпалителният ефект изглежда е слаб и краткотраен.

8. **B4.8** Georgieva A, Eftimov M, Todorova M, Kuzmanova V, Kuzmanov A, Kuzmanov K, Vlaskovska M, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of ovariectomy-induced estrogen deficit on rat behaviour, lipid metabolism, inflammation, bone mineral density, and turnover. *Folia medica*, 2021, 63(3): 385-391.

**Aim:** The objective of the present study was to make a complex evaluation of behaviour, lipid metabolism, inflammation, and bone turnover in an ovariectomized rat model used to simulate postmenopausal clinical findings.

**Materials and methods:** Female Wistar rats were divided into 2 groups of 16 animals each: sham operated (SO) animals and ovariectomized (OVX) animals. Three months after the operation, a battery of behavioral tests was performed including an open field test (OFT), elevated plus-maze test (EPM), the social interaction test (SIT), the forced swim test (FST), and a hot plate test (HPT). At termination of experiment, weight gain and fat deposits (total and retroperitoneal) were measured. Serum concentrations of blood lipids were determined. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and alkaline phosphatase (ALP) serum concentrations were used for evaluation of the inflammation and bone turnover, respectively. Femur bone mineral density (BMD) was evaluated using dual energy X-ray absorptiometry.

**Results:** OVX rats did not demonstrate any significant behavioural changes in OFT and EPM tests but showed a decreased interaction time in SIT and an increased immobility time in FST test which indicated anxiety and depression. The OVX rats had a significantly lower pain sensitivity threshold. They had greater weight gain, increased total and retroperitoneal fat deposits, as well as elevated

total fat/body weight and retroperitoneal fat/body weight ratios. Blood cholesterol, ALP and TNF-alpha of the OVX group were also significantly higher. Femur BMD of OVX rats was slightly but not significantly reduced.

Conclusions: Estrogen deficiency in OVX rats caused depression, anxiety, hyperalgesia, obesity, dyslipidemia, and inflammation before the reduction in bone mineral density was prominent.

### **Ефекти на индуциран от овариектомия естрогенен дефицит върху поведението, липидния метаболизъм, възпалението, костната плътност и реорганизация при плъхове**

Цел: Целта на настоящото проучване беше да се направи комплексна оценка на поведението, липидния метаболизъм, възпалението и костния обмен в модел на овариектомия при плъхове, използван за симулиране на симптоми на менопаузата.

Материали и методи: Женски Wistar плъхове бяха разделени на 2 групи от по 16 животни всяка: фалшиво оперирани (SO) животни и овариектомирани (OVX). Три месеца след операцията беше извършен набор от поведенчески тестове, включително тест открито поле (OFT), тест с повдигнат кръстосан лабиринт (EPM), тест за социално взаимодействие (SIT), тест за принудително плуване (FST) и тест гореща плоча (HPT). В края на експеримента бяха измерени наддаването на тегло и мастните натрупвания (общо и ретроперитонеално). Определени бяха серумните концентрации на липидите. Концентрациите на фактор на TNF-алфа и алкална фосфатаза (ALP) бяха използвани за оценка съответно на възпалението и костния обмен. Костната минерална плътност на бедрената кост (BMD) беше оценена с помощта на рентгенова абсорбциометрия.

Резултати: OVX плъхове не показаха значими промени в поведението при OFT и EPM тестове, но беше установено намалено време на взаимодействие в SIT и увеличено време на неподвижност в FST, което показва тревожност и депресия. OVX плъховете имат значително по-нисък праг на чувствителност към болка. Те имаха по-голямо наддаване на тегло, увеличени общи и ретроперитонеални мастни натрупвания, както и повишени съотношения обща мазнина/телесно тегло и ретроперитонеална мазнина/телесно тегло. Холестеролът, ALP и TNF-алфа на група OVX също са значително по-високи. BMD на бедрената кост на OVX плъховете е леко, но не значимо намалена.

Закljučения: Дефицитът на естроген при OVX плъховете причинява депресия, тревожност, хипералгезия, затлъстяване, дислипидемия и възпаление, а намаляването на минералната плътност на костите не е значимо.

9. **B4.9** Georgieva A, **Eftimov M**, Todorova M, Kuzmanova V, Kuzmanov A, Kuzmanov K, Vlaskovska M, Valcheva-Kuzmanova S. Effect of chlorogenic acid on behaviour and metabolism in ovariectomized rats. *Farmacia*, 2022, 70(1): 54-58.

The objective of the present study was to make a complex evaluation of the effect of chlorogenic acid (CGA) on behavior, lipid metabolism and bone mineral density (BMD) in an ovariectomized (OVX) rat model. Female Wistar rats were divided in 3 groups, each of 14 animals – sham operated (SO), OVX and the last group ovariectomized rats treated with CGA. Three months after the



operation, rat behaviour was investigated in the open field test (OFT), elevated plus-maze test (EPM), social interaction test (SIT), forced swimming test (FST) and hot plate test (HPT). Weight gain, total and retroperitoneal fat deposits were measured, as well as serum concentrations of total cholesterol. Femur BMD was also evaluated. CGA managed to improve some of the negative consequences of the oestrogen deficit (anxiety and depressive behavior, increased pain sensitivity and decreased BMD) and did not affect others (increased fat accumulation and elevated cholesterol levels).

#### **Ефект на хлорогенова киселина и метаболизма при овариектомирани плъхове**

Целта на настоящото изследване беше да се направи комплексна оценка на ефекта на хлорогеновата киселина (CGA) върху поведението, липидния метаболизъм и костната минерална плътност (BMD), в модел на овариектомия (OVX) при плъхове. Женски Wistar плъхове бяха разделени на 3 групи, всяка от 14 животни – фиктивно оперирани (SO), OVX и група овариектомирани плъхове, третирани с CGA. Три месеца след операцията поведението на плъхове беше изследвано в тест открито поле (OFT), повдигнат кръстосан лабиринт (EPM), тест за социално взаимодействие (SIT), тест за принудително плуване (FST) и тест с гореща плоча (HPT). Бяха измерени наддаването на тегло, общите и ретроперитонеалните мазнини, както и серумните концентрации на общия холестерол. Костно-минералната плътност (КМП) на бедрената кост също беше определена. CGA подобрява някои от негативните последици от дефицита на естроген (тревожност и депресивно поведение, повишена чувствителност към болка и намалена КМП), но не повлиява повишеното натрупване на мазнини и повишените нива на холестерол.

10. **B4.10** Reyzov M, **Eftimov M**, Gancheva S, Todorova M, Zhelyazkova-Savova M, Tzaneva 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, 51(3): 390-402.

Metabolic syndrome (MS) is a serious health condition. The purpose of this study was to investigate the effects of polyphenol-rich *Aronia melanocarpa* fruit juice (AMFJ) on glucose tolerance, triglyceride levels, and adipose tissue in rats with MS induced by high-fat high-fructose (HFHF) diet. Fifty rats were allocated in 5 groups: control, MS, MS+AMFJ2.5, MS+AMFJ5, and MS+AMFJ10. In the course of 10 weeks, the control group was on a regular rat diet while the other groups received HFHF diet. During the experiment, control and MS groups were treated daily orally with distilled water (10.0 mL/kg) and the other three groups – with AMFJ at doses of 2.5, 5.0, and 10.0 mL/kg, respectively. In MS rats, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, visceral obesity, and increased adipocyte size were observed. In AMFJ-treated groups, the serum glucose and triglycerides, as well as visceral fat and adipocyte size decreased significantly and did not differ from those of the control group. AMFJ at doses 2.5 and 5.0 mL/kg showed an anti-apoptotic activity in adipocytes, while at the dose of 10 mL/kg a pro-apoptotic effect was detected. In conclusion, AMFJ could antagonize most of the negative consequences of HFHF diet on carbohydrate and lipid metabolism in a rat MS model.

#### **Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху глюкозния толеранс, липидния метаболизъм и затлъстяване в модел на метаболитен синдром при плъхове**

Метаболитният синдром (МС) е сериозно болестно състояние. Целта на това проучване е да се изследват ефектите от богатия на полифеноли плодов сок от *Aronia melanocarpa* (AMFJ) върху глюкозния толеранс, нивата на триглицеридите и мастната тъкан при плъхове с МС, предизвикан от диета с високо съдържание на мазнини и фруктоза (HFHF). Петдесет плъха бяха разпределени в 5 групи: контрола, MS, MS+AMFJ2.5, MS+AMFJ5 и MS+AMFJ10. В продължение на 10 седмици контролната група приемаше храна с нормална калорийност, докато останалите групи получиха HFHF диета. По време на експеримента контролната и МС групата са третирани ежедневно перорално с дестилирана вода (10.0 mL/kg), а останалите три групи – с AMFJ в дози съответно 2.5, 5.0 и 10.0 mL/kg. При MS плъхове са наблюдавани глюкозна нетолерантност, хипертриглицеридемия, висцерално затлъстяване и увеличен размер на адипоцитите. В групите, третирани с AMFJ, серумната глюкоза и триглицеридите, както и висцералната мазнина и размерът на адипоцитите намаляват значително и не се различават от тези на контролната група. AMFJ в дози 2,5 и 5,0 mL/kg показва антиапоптотична активност в адипоцитите, докато при доза от 10 mL/kg се открива проапоптотичен ефект. В заключение, AMFJ може да антагонизира повечето от негативните последици от HFHF диетата върху въглехидратния и липидния метаболизъм в модел на MS при плъхове.

#### **Г7. Публикации и доклади, публикувани в научни издания, реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни с научна информация**

1. **Г7.1** Pavlov D, **Eftimov M**, Tsaneva M, Garrard M, Novakovic M, Nashar M, Ivanova D, Ignatova S, Trifunovic S, Valcheva-Kuzmanova S. Fustin-, sulfuretin- and gallotannin-rich infusions from leaves and heartwood of the Eurasian smoke tree (*Cotinus coggygia* Scop.) demonstrate antioxidant and anti-inflammatory effects in rats. *FEBS J* 2016; 283 (Suppl 1): 99-100.

Decoctions from Smoke tree (*Cotinus coggygia*), well known as poisonous plant, are used topically by the Balkan and Anatolian folk medicine for their antiseptic properties. We studied phyto-chemical composition and biological effects of aqueous infusion from leaves (AICCL) and ethanol infusion from heartwood (EICCW) in rat models of oxidative stress and inflammation after internal administration. Phytochemical analyses were done on UHPLC-ESI/ToF/MS and HPLC. Models were 3: Paracetamol (P)-induced liver toxicity (PILT), Indomethacin (IN)-induced gastric ulcerogenesis (INIGU), and Carrageenan (Carr)-induced rat paw edema (CIRPO). Eight groups of Male Wistar rats (n=64; 200–250 g) were used in PILT: Water control (C), P, 1/100AICCL+P, 2/100 AICCL+P, 4/100 AICCL+P, Ethanol control (Et), Et+P, 1/1000 EICCW+P. Similar 8 groups were used in INIGU and CIRPO (IN or Carr instead of P). Rats were orally pretreated with AICCL or EICCW (10 mL/kg) by intragastric gavage. Groups C and P/IN/Carr received water. Groups Et and Et+P/IN/Carr received 20% Ethanol. The pretreatment lasted 7 days in PILT, 3 days in INIGU, and 15 days in CIRPO. Antioxidant effects were evaluated by biochemical and histopathological methods. Anti-inflammatory effect was evaluated by Digital plethysmometer LE7500. Major components were gallotannins and gallic acid (AICCL),

fustin and sulfuretin (EICCW). Liver enzymes were significantly lower in 1/100 AICCL+P, compared to P. The hepatic parenchyma of 1/100 AICCL+P was without necrosis. 2/100 AICCL significantly decrease malondialdehyde levels and ulcerosis. The average paw oedema volume in 2/100 AICCL+Carr was significantly lower, compared to Carr. Our study demonstrated the hepatoprotective effect of 1/100AICCL, gastroprotective effect of 2/100 AICCL and EICCW, and anti-inflammatory effect of 2/100 AICCL. The most probable mechanism of these beneficial effects is decrease of lipid peroxidation, due to the in vivo antioxidant properties of the infusions.

**Богати на фустин, сулфуретин и галотанини инфузи от листата и дървесината на смрадлика (*Cotinus coggygia* Scop.) демонстрират антиоксидантни и противовъзпалителни ефекти при плъхове**

Инфузите от смрадлика (*Cotinus coggygia*), добре познато като отровно растение, се използват локално от балканската и анадолската народна медицина заради техните антисептични свойства. Изследвахме фитохимичния състав и биологичните ефекти на воден инфуз от листа (AICCL) и етанолен инфуз от сърцевина (EICCW), в модели на оксидативен стрес и възпаление след орално приложение при плъхове. Фитохимичните анализи бяха направени на UHPLC-ESI/ToF/MS и HPLC. Моделите са 3: индуцирана от парацетамол (P) чернодробна токсичност (PILT), индуцирана от индометацин (IN) стомашна улцерогенеза (INIGU) и индуциран от карагенан (Carr) оток на лапата на плъх (CIRPO). Осем групи мъжки плъхове Wistar (n=64; 200–250 g) бяха използвани в PILT: Контрола вода (C), P, 1/100AICCL+P, 2/100 AICCL+P, 4/100 AICCL+P, Контрола етанол (Et), Et+P, 1/1000 EICCW+P. Подобни 8 групи бяха използвани в INIGU и CIRPO (IN или Carr вместо P). Плъховете бяха предварително третирани орално с AICCL или EICCW (10 mL/kg) чрез интрагастрална сонда. Групи C и P/IN/Carr получаваха вода. Групите Et и Et+P/IN/Carr приемаха 20% етанол. Претретиранието продължи 7 дни в PILT, 3 дни в INIGU и 15 дни в CIRPO. Антиоксидантните ефекти са оценени чрез биохимични и хистопатологични методи. Противовъзпалителният ефект е оценен с цифров плетизмометър LE7500. Основните компоненти са галотанини и галова киселина (AICCL), фустин и сулфуретин (EICCW). Чернодробните ензими са значително по-ниски при 1/100 AICCL+P в сравнение с P. Чернодробният паренхим на 1/100 AICCL+P е без некроза. 2/100 AICCL значително намалява нивата на малондиалдехид и улцерогенезата. Средният обем на оток на лапата при 2/100 AICCL+Carr е значително по-нисък в сравнение с Carr. Нашето проучване демонстрира хепатопротективен ефект на 1/100AICCL, гастропротективен ефект на 2/100 AICCL и EICCW и противовъзпалителен ефект на 2/100 AICCL. Най-вероятният механизъм на тези полезни ефекти е намаляването на липидната пероксидация, поради in vivo антиоксидантните свойства на инфузите.

2. **Г7.2** Kuzmanova V, Kuzmanov A, Georgieva A, **Eftimov M**, Todorova M, Kuzmanov K, Temelkova K, Vlaskovska M, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of chlorogenic acid on BMD and pain sensitivity threshold in ovariectomized rats. *Osteoporosis International* 2018; 29 (1): S298-S298.

Objective: Chlorogenic acid (CGA), one of the most abundant polyphenols in human diet, found in high concentrations in coffee, has been demonstrated to possess a potent antioxidant activity,

important metabolic functions and an analgesic effect in hyperalgesic conditions in neuropathic and inflammatory pain. The aim of the present study was to investigate the effects of CGA on weight gain, BMD and osteoporotic hyperalgesia in an ovariectomized (OVX) rat model of postmenopausal osteoporosis.

Methods: Female Wistar rats were divided into 3 groups, each of 14 animals: SO (sham operated), OVX and OVX+CGA. The daily oral treatment started 2 weeks after the operation and lasted for 10 weeks. Groups SO and OVX were treated with distilled water (10 ml/kg). OVX+CGA group was treated with CGA (20 mg/kg as a 10 ml/kg solution). At the end of the treatment period, weight gain was calculated and femur BMD was measured by DXA using a computer program for small subjects. Hot plate test was performed to assess thermal pain sensitivity.

Results: OVX rats had a significantly higher ( $p<0.05$ ) weight gain than SO rats. The weight gain of OVX+CGA group was significantly lower ( $p<0.05$ ) than that of OVX group. Ovariectomy caused a reduction in femur BMD. BMD of OVX+CGA rats was significantly higher ( $p<0.05$ ) than that of OVX rats and did not differ from that of SO rats. In the hot plate test, the latent time of OVX rats was significantly shorter ( $p<0.05$ ) than that of SO rats. The latent time of OVX+CGA group was significantly longer ( $p<0.05$ ) than that of OVX rats and was not significantly different from that of SO group.

Conclusions: Treatment of OVX rats with CGA reduced body weight gain, antagonized OVX-induced decrease in BMD and prevented osteoporotic hyperalgesia to heat. Therefore, CGA and CGA-rich diets might be beneficial for postmenopausal osteoporosis prevention.

### **Ефекти на хлорогеновата киселина върху костно-минералната плътност и прага на болкова чувствителност при овариектомирани плъхове**

Цел: Хлорогенната киселина (CGA), един от най-разпространените полифеноли в човешката диета, открит във високи концентрации в кафето, притежава мощна антиоксидантна активност, важни метаболитни функции и аналгетичен ефект при хипералгетични състояния, при невропатична и възпалителна болка. Целта на настоящото проучване беше да се изследват ефектите на CGA върху наддаването на тегло, костно-минералната плътност (КМП) и остеопоротичната хипералгезия при овариектомия-индуциран (OVX) модел на постменопаузална остеопороза при плъхове.

Методи: Женски Wistar плъхове бяха разделени на 3 групи, всяка от 14 животни: SO (фалшиво оперирани), OVX и OVX+CGA. Ежедневното перорално третиране започна 2 седмици след операцията и продължи 10 седмици. Групите SO и OVX бяха третирани с дестилирана вода (10 ml/kg). Групата OVX+CGA приемаше CGA (20 mg/kg като 10 ml/kg разтвор). В края на третирането беше изчислено наддаването на тегло и КМП на бедрената кост беше измерена чрез DXA с помощта на компютърна програма. Извършен е тест с гореща плоча за оценка на чувствителността към термична болка.

Резултати: OVX плъховете имат значително по-високо ( $p<0,05$ ) наддаване на тегло от SO плъховете. Увеличаването на теглото на групата OVX+CGA е значително по-малко ( $p<0,05$ ) от това на групата OVX. Овариектомията причинява намаляване на КМП на бедрената кост.

КМП на OVX+CGA плъхове е значително по-висока ( $p<0,05$ ) от тази на OVX плъхове и не се различава от тази на SO животни. При теста с гореща плоча, латентното време на OVX плъхове е значително по-кратко ( $p<0,05$ ) от това на SO групата. Латентното време на OVX+CGA групата е значително по-дълго ( $p<0,05$ ) от това на OVX плъхове и не се различава значително от това на SO.

Заклучения: Третирането на OVX плъхове с CGA намалява наддаването на тегло, антагонизира OVX-индуцираното намаление на КМП и предотвратява остеопорозната хипералгезия към топлина. Следователно CGA и храните богати на CGA, могат да бъдат от полза за превенцията на постменопаузалната остеопороза.

3. **Г7.3** Marchev S, Temelkova K, Todorova M, **Eftimov M**, Georgieva A, Kuzmanova V, Kuzmanov A, Bankova V, Surcheva S, Vlaskovska M, Valcheva-Kuzmanova S. Effects of antioxidants from *Aronia melanocarpa* and *Apium graveolens* on experimental model of osteoporosis. *Osteoporosis International* 2018; 29 (1): S338-S338.

Objective: Treatment of osteoporosis remains a therapeutic challenge. Various mechanism-directed medicines have been introduced, bearing as well adverse effects. The aim of present study was to use natural plant/fruit extracts as a part of everyday lifestyle to postpone development of osteoporosis.

Methods: Female Wistar rats were used. Control animals were sham operated and the rest were ovariectomized. After ovariectomy, rats were randomized and received for 12 weeks: distilled water, HPLC-standardized *Aronia melanocarpa* fruit juice (10 ml/kg) or *Apium graveolens* extract (equal to 2.4 mg/kg quercetin). Femur BMD was measured 3 months after ovariectomy by DXA (Hologic Discovery A, version 13.2:3), using a computer program for small subjects (Small Animal Rat WB). The heat pain sensitivity was measured by the hot plate test (Ugo Basile, Italy).

Results: The in vivo osteoporotic changes in femur appearing due to the continuous estrogen deficit (ED) in ovariectomized rats proved a reliable model of experimental osteoporosis/osteopenia. The results showed that ED decreased the BMD in femur by 11%. *Aronia melanocarpa* fruit juice treatment was able to counteract the osteoporotic changes. The BMD values in the group receiving *Aronia melanocarpa* fruit juice were 13% higher ( $p<0.05$ ) than the respective values of ovariectomized animals treated with distilled water. Similar was the effect of *Apium graveolens* extract treatment. Behavioral results showed that the nociceptive threshold in ovariectomized rats decreased by 13% measured by the hot plate test ( $p<0.05$  vs. sham operated animals). Treatment with *Aronia melanocarpa* or *Apium graveolens* prevented the pro-nociceptive effect of osteoporosis.

Conclusion: The results suggest that natural antioxidants from *Aronia melanocarpa* and *Apium graveolens* could be an alternative management for postponing postmenopausal osteopenia/osteoporosis.

**Ефекти на антиоксидантите от *Aronia melanocarpa* и *Apium graveolens* в експериментален модел на остеопороза**

Цел: Лечението на остеопорозата остава терапевтично предизвикателство. Въведени са различни механизъм-специфични лекарства, които обаче притежават и нежелани ефекти. Целта на настоящото изследване е да се използват естествени растителни/плодови екстракти като част от ежедневната диета, които да профилактират остеопорозата.

Методи: Използвани са женски Wistar плъхове. Контролните животни бяха фалшиво оперирани, а останалите бяха овариектомирани. След овариектомия, плъховете са разпределени в групи и третирани в продължение на 12 седмици с дестилирана вода, стандартизиран чрез HPLC плодов сок от *Aronia melanocarpa* (10 ml/kg) или екстракт от *Apium graveolens* (равно на 2,4 mg/kg кверцетин). КМП на бедрената кост бе измерена 3 месеца след овариектомията чрез DXA (Hologic Discovery A, версия 13.2:3), като се използва компютърна програма (Small Animal Rat WB). Чувствителността към топлинна болка беше установена чрез тест с гореща плоча (Ugo Basile, Италия).

Резултати: In vivo остеопорозните промени в бедрената кост, появяващи се поради дефицит на естроген (ЕД) при овариектомирани плъхове, се оказаха надежден модел на експериментална остеопороза/остеопения. Резултатите показват, че ЕД намалява КМП в бедрената кост с 11%. Лечението с плодов сок *Aronia melanocarpa* успя да противодейства на остеопорозните промени. Стойностите на КМП в групата, получаваща плодов сок от *Aronia melanocarpa*, са с 13% по-високи ( $p < 0,05$ ) от съответните стойности на овариектомирани животни, третирани с дестилирана вода. Подобен е ефектът от приложението на екстракт от *Apium graveolens*. Поведенческите резултати показват, че ноцицептивният праг при плъхове с овариектомия намалява с 13%, измерено чрез теста с гореща плоча ( $p < 0,05$  спрямо фалшиво оперирани животни). Третирането с *Aronia melanocarpa* или *Apium graveolens* предотвратява проноцицептивния ефект на остеопорозата.

Заключение: Резултатите показват, че естествените антиоксиданти от *Aronia melanocarpa* и *Apium graveolens* могат да бъдат алтернативно лечение за отлагане на постменопаузалната остеопения/остеопороза.

4. **Г7.4** Valcheva-Kuzmanova S, **Eftimov M**, Kuzmanov K. Polyphenol-rich *Aronia melanocarpa* fruit juice antagonizes behavioral changes and oxidative stress in rats exposed to disruption of circadian rhythms. *European Neuropsychopharmacology* 2018; 29: S562-S563.

Background: In rodents exposure to constant light leads to anxiety-like and depression-like behavior and induces oxidative stress. Polyphenol-rich *Aronia melanocarpa* fruit juice (AMFJ) has been shown to possess pronounced effects on central nervous system functions.

Aim: The aim of the present study was to investigate the effects of AMFJ on behavior and brain oxidative stress in rats exposed to disruption of circadian rhythms (DCR).

Methods: Male Wistar rats (200-250 g) were divided into 4 experimental groups of 12 rats each: Control, DCR, DCR + AMFJ5 and DCR + AMFJ10. Control rats were maintained on a standard 12:12 light/dark cycle while the rest of the animals were exposed to constant light for 14 days. During this period, the animals received daily orally one of the following treatments: distilled water

10 ml/kg (groups Control and DCR), AMFJ 5 ml/kg (group DCR + AMFJ5) and AMFJ 10 ml/kg (group DCR + AMFJ10). The contents of main polyphenolic substances in 100 ml AMFJ were: total phenolics, 665.2 mg; total proanthocyanidins, 392.6 mg; chlorogenic acid, 69.1 mg and neochlorogenic acid, 84.0 mg. Behavioral tests were conducted after the 14 days experimental period. The general locomotor activity (horizontal and vertical) was investigated in the open field test (OFT). Social interaction test (SIT) was used to assess anxiety. The decreased time for social contacts between animals showed an anxiety-like behavior. The forced swim test (FST) was used to investigate the depression-like state. It was performed in two sessions and the results from the second session were recorded. The increased immobility time was a measure of the depression-like behavior. Oxidative stress in rat brains was investigated by the determination of thiobarbituric acid reactive substances. Experimental data were analyzed by one-way ANOVA using the GraphPad Prism statistical software.

Summary of results: OFT results showed that neither DCR nor animal treatment with the two AMFJ doses caused significant changes in the horizontal and vertical locomotor activity. In the SIT, DCR caused a significant reduction of the time for social contacts between rats indicating an increase of anxiety. This effect was completely antagonized by the two AMFJ doses. In the FST, the immobility time of DCR rats was significantly increased in comparison with that of the Control group. Having in mind the OFT results, the prolonged immobility time of DCR rats could not be attributed to a decrease in the general locomotor activity but showed the development of a depression-like state. DCR + AMFJ5 and DCR + AMFJ10 groups had immobility time values which were shorter than the immobility time of DCR group and did not differ significantly from the immobility time of the Control group. DCR induced oxidative stress in rat brains indicated by the increased levels of TBARS. AMFJ dose-dependently reduced TBARS and in DCR + AMFJ10 group they did not differ significantly from the control level.

Conclusion: Administration of *Aronia melanocarpa* fruit juice to rats exposed to disruption of circadian rhythms prevented the development of anxiety-like and depressionlike state and these effects on behavior were accompanied by reduction of oxidative stress in rat brains.

### **Богатият на полифеноли плодов сок от *Aronia melanocarpa* антагонизира поведенческите промени и оксидативния стрес при плъхове с нарушен циркаден ритъм**

Въведение: При гризачи излагането на постоянна светлина води до поведение, свързано с тревожност и депресия, и предизвиква оксидативен стрес. Доказано е, че богатият на полифеноли плодов сок от *Aronia melanocarpa* (AMFJ) има изразени ефекти върху функциите на централната нервна система.

Цел: Целта на настоящото проучване е да се изследват ефектите на AMFJ върху поведението и мозъчния оксидативен стрес при плъхове, изложени на нарушаване на циркадните ритми (DCR).

Методи: Мъжки Wistar плъхове (200-250 g) бяха разделени на 4 експериментални групи от по 12 плъха всяка: контрола, DCR, DCR + AMFJ5 и DCR + AMFJ10. Контролните плъхове са на стандартен цикъл 12:12 светлина/тъмнина, докато останалите животни се излагат на постоянна светлина в продължение на 14 дни. През този период животните получават

ежедневно перорално едно от следните третираня: дестилирана вода 10 ml/kg (групи Control и DCR), AMFJ 5 ml/kg (група DCR + AMFJ5) и AMFJ 10 ml/kg (група DCR + AMFJ10). Съдържанието на основните полифенолни вещества в 100 ml AMFJ е: общи феноли 665,2 mg; общи проантоцианидини, 392,6 mg; хлорогенова киселина, 69,1 mg и неохлорогенова киселина, 84,0 mg. Поведенческите тестове бяха проведени след 14-дневния експериментален период. Общата локомоторна активност (хоризонтална и вертикална) беше изследвана в теста открито поле (OFT). Тестът за социално взаимодействие (SIT) беше използван за оценка на тревожността. Намаленото време за социални контакти между животните показва поведение, подобно на тревожност. Тестът за принудително плуване (FST) беше използван за изследване на подобно на депресия състояние. Извършен е в две сесии и резултатите от втората сесия са записани. Увеличеното време на неподвижност е мярка за депресивно-подобно поведение. Оксидативният стрес в мозъка на плъхове е изследван чрез определяне на реагиращи с тиобарбитурова киселина вещества. Експерименталните данни бяха анализирани чрез еднофакторен ANOVA, с помощта на статистическия софтуер GraphPad Prism.

Обобщение на резултатите: Резултатите от OFT показват, че нито DCR, нито третирането на животни с двете дози AMFJ причинява значителни промени в хоризонталната и вертикалната локомоторна активност. В SIT, DCR причинява значително намаляване на времето за социални контакти между плъхове, което показва повишаване на тревожността. Този ефект беше напълно антагонизиран от двете дози AMFJ. В FST, времето на неподвижност на DCR плъховете е значително увеличено в сравнение с това на контролната група. Имайки предвид резултатите от OFT, удълженото време на неподвижност на DCR плъхове не може да се отдаде на намаляване на общата двигателна активност и показва развитие на състояние, подобно на депресия. Групите DCR + AMFJ5 и DCR + AMFJ10 имаха стойности на времето на неподвижност, които бяха по-кратки от времето на неподвижност на DCR групата и не се различаваха значително от времето на неподвижност на контролната група. DCR индуцира оксидативен стрес в мозъка на плъховете, показан от повишените нива на TBARS. AMFJ дозозависимо намалява TBARS и в групата DCR + AMFJ10 те не се различават значително от контролното ниво.

Заклучение: Прилагането на плодов сок от *Aronia melanocarpa* на плъхове, изложени на нарушаване на циркадния ритъм, предотвратява развитието на тревожност и депресивно-подобно състояние, и тези ефекти върху поведението са придружени от намаляване на оксидативния стрес в мозъка на плъховете.

5. **Г7.5** 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. *European Neuropsychopharmacology* 2019; 29: S477-S478.

Background: There is significant clinical evidence of the coexistence of metabolic syndrome and central nervous system (CNS) disorders like anxiety and cognitive impairment. Polyphenol-rich *Aronia melanocarpa* fruit juice (AMFJ) has been shown to possess pronounced effects on CNS functions.



**Objective:** The aim of the present study was to investigate the effects of AMFJ on behavior in rats with diet-induced metabolic syndrome (MS).

**Methods:** Male Wistar rats (180-250 g) were divided into 5 groups (n = 10): Control, MS, MS + AMFJ2.5, MS + AMFJ5 and MS + AMFJ10. The control animals were fed a standard rat chow and were given plain water to drink. The rats from groups MS, MS + AMFJ2.5, MS + AMFJ5 and MS + AMFJ10 were subjected to a diet-induced MS. For 10 weeks, they were given a high-fat high-fructose (HFHF) diet with lard (17%) and fructose (17%) added to the standard rat chow and a 10% fructose solution instead of drinking water. During this period, the animals received daily orally one of the following treatments: distilled water 10 ml/kg (groups Control and MS), AMFJ 2.5 ml/kg (group MS + AMFJ2.5), AMFJ 5 ml/kg (group MS + AMFJ5) and AMFJ 10 ml/kg (group MS + AMFJ10). The contents of main polyphenolic substances in 1 ml of AMFJ were: total phenolics, 7.1 mg; total proanthocyanidins, 3.9 mg; flavonoids, 1.9 mg; anthocyanins, 1.1 mg; chlorogenic acid, 0.7 mg and neochlorogenic acid, 0.8 mg. Behavioral tests were conducted after the treatment period. The general locomotor activity (horizontal and vertical) was investigated in the open field test (OFT). Social interaction test (SIT) was used to assess anxiety. The decreased time for social contacts between animals was considered an indicator of anxiety-like behavior. The spatial memory of the animals was assessed by the recognition index in the place recognition test (PRT). Experimental data were analyzed by Student's t-test using the GraphPad Prism statistical software.

**Results:** The results from the OFT showed no difference in the general locomotor activity between the control and MS group. AMFJ treatment dose-dependently reduced the horizontal activity of the animals and the effect was significant at the highest dose ( $p = 0.0349$ ). In the SIT, the time of social interaction was significantly reduced ( $p = 0.0139$ ) in MS rats, indicating an increased level of anxiety. AMFJ at the dose of 2.5 ml/kg stimulated social contacts between rats ( $p = 0.0067$  vs. MS), demonstrating an anxiolytic-like effect. The lack of this effect at the higher AMFJ doses could be attributed to the decreased general locomotor activity. Significant deterioration of spatial memory in rats from MS group ( $p = 0.0183$ ) was observed in the PRT. The recognition index of all AMFJ-treated groups did not differ significantly from the control level and was improved in comparison with that of MS rats with values of  $p = 0.0065$  (MS + AMFJ2.5),  $p = 0.0005$  (MS + AMFJ5) and  $p = 0.0016$  (MS + AMFJ10).

**Conclusion:** Administration of *Aronia melanocarpa* fruit juice to rats with diet-induced metabolic syndrome prevented the development of anxiety-like state and the deterioration of the spatial memory which might be attributed to its polyphenolic ingredients.

### **Поведенчески ефекти на богатия на полифеноли плодов сок от *Aronia melanocarpa* при плъхове с индуциран от диета метаболитен синдром**

**Въведение:** Има множество клинични доказателства за коморбидността на метаболитен синдром и нарушения на централната нервна система (ЦНС), като тревожност и когнитивно увреждане. Доказано е, че богатият на полифеноли плодов сок от *Aronia melanocarpa* (AMFJ) има изразен ефект върху функциите на ЦНС.

**Цел:** Целта на настоящото проучване е да се изследват ефектите на AMFJ върху поведението на плъхове с индуциран от диета метаболитен синдром (МС).

Методи: Мъжки Wistar плъхове (180-250 g) бяха разделени на 5 групи (n = 10): контрола, MS, MS + AMFJ2.5, MS + AMFJ5 и MS + AMFJ10. Контролните животни бяха хранени със стандартна храна и имаха свободен достъп до вода за пиене. Плъховете от групите MS, MS + AMFJ2.5, MS + AMFJ5 и MS + AMFJ10 бяха подложени на индуциран от диета MS. В продължение на 10 седмици бяха на диета с високо съдържание на мазнини и фруктоза (HFHF) - свинска мас (17%) и фруктоза (17%), добавени към стандартната храна за плъхове и 10% разтвор на фруктоза вместо питейна вода. През този период животните получаваха ежедневно перорално едно от следните третириания: дестилирана вода 10 ml/kg (групи Контрол и MS), AMFJ 2,5 ml/kg (група MS + AMFJ2.5), AMFJ 5 ml/kg (група MS + AMFJ5) и AMFJ 10 ml/kg (група MS + AMFJ10). Съдържанието на основните полифенолни вещества в 1 ml AMFJ бе: общи феноли 7,1 mg; общи проантоцианидини, 3,9 mg; флавоноиди, 1,9 mg; антоцианини, 1,1 mg; хлорогенна киселина, 0,7 mg и неохлорогенна киселина, 0,8 mg. След периода на третиране бяха проведени поведенчески тестове. Общата локомоторна активност (хоризонтална и вертикална) беше изследвана в тест открито поле (OFT). Тестът за социално взаимодействие (SIT) беше използван за оценка на тревожността. Намаленото време за социални контакти между животните се счита за индикатор за подобно на тревожност поведение. Пространствената памет на животните беше оценена чрез индекса на разпознаване в теста за разпознаване на място (PRT). Експерименталните данни бяха анализирани чрез t-теста на Student с помощта на статистическия софтуер GraphPad Prism.

Резултати: Резултатите от OFT не показват разлика в общата локомоторна активност между контролната и MS групата. Лечението с AMFJ дозозависимо намалява хоризонталната активност на животните и ефектът е значителен при най-високата доза ( $p = 0,0349$ ). В SIT времето на социално взаимодействие е значително намалено ( $p = 0,0139$ ) при MS плъхове, което показва повишено ниво на тревожност. AMFJ в доза от 2,5 ml/kg стимулира социални контакти между плъхове ( $p = 0,0067$  спрямо MS), демонстрирайки анксиолитичен ефект. Липсата на този ефект при по-високите дози AMFJ може да се дължи на намалената обща двигателна активност. При PRT се наблюдава значително влошаване на пространствената памет при плъхове от MS група ( $p = 0,0183$ ). Индексът на разпознаване на всички третириани с AMFJ групи не се различава значително от контролното ниво и е подобрен в сравнение с този на MS плъховете със стойности на  $p = 0,0065$  (MS + AMFJ2.5),  $p = 0,0005$  (MS + AMFJ5) и  $p = 0,0016$  (MS + AMFJ10).

Заклучение: Прилагането на плодов сок от *Aronia melanocarpa* на плъхове с индуциран от диета метаболитен синдром предотвратява развитието на подобно на тревожност състояние и влошаването на пространствената памет, което може да се дължи на неговите полифенолни съставки.

6. **Г7.6** Gancheva S, Eftimov M, Todorova M, Reyzov M, Valcheva-Kuzmanova S, Zhelyazkova-Savova M. Behavioral effects of aqueous infusion of *Kochia scoparia* seeds in rats with diet-induced metabolic syndrome. *European Neuropsychopharmacology* 2019; 29: S478-S479.

**Background:** Anxiety, depression, and cognitive impairment are commonly observed in patients with obesity, metabolic syndrome and diabetes. This clinically established connection has been extensively studied experimentally. Among the possible mechanisms bridging the metabolic

alterations with behavioral deficits are the low-grade chronic inflammation, oxidative stress and insulin resistance. Addressing these mechanisms in metabolic disorders can be a helpful strategy against associated neuropsychiatric conditions. Many phytochemicals exhibit favorable metabolic effects. Our unpublished data showed that aqueous infusion from seeds of *Kochia scoparia* (KS) exerted glucose lowering and antioxidant effects, among others. The main constituents of KS have been found to be triterpenoid glycosides, primarily momordin1c, and triterpenoids are known to have neuroprotective properties.

**Objective:** The aim of the present study was to test the effect of the aqueous infusion from *Kochia scoparia* seeds in behavioral models of anxiety, depression and cognitive impairment associated with a diet-induced metabolic syndrome (MS) in rats.

**Material and methods:** Adult male Wistar rats were allocated into five groups: control rats (C), rats with MS, rats with MS treated by the aqueous infusion of KS of different strengths: MS + 1.5% KS, MS + 3% KS, MS + 6% KS. To induce a metabolic syndrome, the corresponding rats were fed by rat chow enriched in lard and fructose, and by 10% fructose in the drinking water. KS infusion was administered orally as drinking water. The treatment duration was 10 weeks. At the end of the experiment, behavioral tests were performed. Spatial memory was assessed by the recognition index in the place recognition (PR) paradigm. Depression was examined by the forced swimming test (FST). To evaluate anxiety, social interaction test (SIT) was used, as well as the time spent in the center of the open field (OF). Student's t-test was used to compare two groups.

**Results:** Feeding rats with high-fat high-fructose diet resulted in behavioral alterations, manifested by memory impairment in the MS rats ( $p = 0.0179$ ). In the FST, immobility time was slightly increased in the MS group, indicating a trend towards inducing a depression-like state. In the anxiety tests, the diet reduced with a marginal significance the time of social interaction ( $p = 0.0789$ ) and of stay in the OF center ( $p = 0.057$ ), revealing features of anxiety. Treating rats with KS prevented most of the behavioral changes. In the PR test, the highest dose of KS significantly increased the recognition index ( $p = 0.0221$ ). All the doses of KS significantly reduced the immobility time in the FST: 1.5% KS ( $p = 0.0392$ ), 3% KS ( $p = 0.0034$ ) and 6% KS ( $p = 0.0068$ ). In the SIT, KS increased insignificantly the time of social interaction with most pronounced effect with the 3% infusion ( $p = 0.0761$ ). In the OF test, KS significantly prolonged the stay in the central zone in all groups: 1.5% KS ( $p = 0.0191$ ), 3% KS ( $p = 0.0083$ ), 6% KS ( $p = 0.0249$ ).

**Conclusion:** The aqueous infusion of *Kochia scoparia* seeds attenuated the behavioral impairments of the diet-induced metabolic syndrome in rats. The infusion was shown to produce spatial memory-improving, antidepressant and anxiety reducing effects. Further experiments will help to elucidate the mechanisms whereby KS affects these behaviors.

### **Поведенчески ефекти на воден инфуз от семена на *Kochia scoparia* при плъхове с индуциран от диета метаболитен синдром**

Въведение: Тревожност, депресия и нарушения в когнитивните функции са често наблюдавани при пациенти със затлъстяване, метаболитен синдром и диабет. Тази връзка е широко изследвана експериментално. Сред възможните механизми, свързващи метаболитните промени с поведенчески дефицити, са нискостепенното хронично възпаление, оксидативния стрес и инсулиновата резистентност. Овладеяването им може да бъде полезна стратегия при свързани с метаболитни нарушения невропсихиатрични състояния. Много фитохимикали проявяват благоприятни метаболитни ефекти. Нашите непубликувани данни показват, че водната инфузия от семена на *Kochia scoparia* (KS) притежава глюкозопонижаващ и антиоксидантен ефект, наред с много други. Установено е,

че основните съставки на KS са тритерпеноидни гликозиди, предимно momordin1c и е известно, че тритерпеноидите имат невропротективни свойства.

Цел: Целта на настоящото изследване е да се изследва ефекта на воден инфуз от семена на *Kochia scoparia* в поведенчески модели на тревожност, депресия и когнитивно увреждане, свързани с индуциран от диета метаболитен синдром (МС) при плъхове.

Материали и методи: Възрастни мъжки плъхове Wistar бяха разделени на пет групи: контроли (С); плъхове с MS; плъхове с MS, третирани с воден инфуз на KS с различни концентрации: MS + 1,5% KS, MS + 3% KS, MS + 6% KS. За да се предизвика метаболитен синдром, съответните плъхове са хранени с храна, обогатена със свинска мас и фруктоза и с 10% фруктоза във водата за пиене. Инфузът на KS се прилага перорално като вода за пиене. Продължителността на третирането е 10 седмици. В края на експеримента бяха проведени поведенчески тестове. Пространствената памет беше оценена чрез индекса на разпознаване в тест за разпознаване на място (PR). Депресията беше изследвана чрез теста за принудително плуване (FST). За оценка на тревожността е използван тест за социално взаимодействие (SIT), както и времето, прекарано в центъра на открито поле (OF). Student's t-test беше използван за сравняване на две групи.

Резултати: Храненето на плъхове с диета с високо съдържание на мазнини и фруктоза води до промени в поведението, проявяващи се чрез увреждане на паметта при плъхове с МС ( $p = 0,0179$ ). При FST времето на неподвижност е леко увеличено в групата с МС, което показва тенденция за подобно на депресия състояние. При тестовете за тревожност диетата намалява с незначителна значимост времето на социално взаимодействие ( $p = 0.0789$ ) и на престой в OF центъра ( $p = 0.057$ ), разкривайки характеристики на тревожност. Третирането на плъхове със KS предотврати повечето от поведенческите промени. В PR теста най-високата доза KS значително повишава индекса на разпознаване ( $p = 0.0221$ ). Всички дози KS значително намаляват времето на неподвижност в FST: 1.5% KS ( $p = 0.0392$ ), 3% KS ( $p = 0.0034$ ) и 6% KS ( $p = 0.0068$ ). В SIT, KS увеличава незначително времето на социално взаимодействие с най-изразен ефект при 3% инфуз ( $p = 0.0761$ ). При OF теста KS значимо удължава престоя в централната зона във всички групи: 1.5% KS ( $p = 0.0191$ ), 3% KS ( $p = 0.0083$ ), 6% KS ( $p = 0.0249$ ).

Заклучение: Водният инфуз на семена от *Kochia scoparia* намалява поведенческите увреждания на индуцирания от диета метаболитен синдром при плъхове. Инфуза подобрява пространствената памет, има антидепресивни и намаляващи тревожността ефекти. По-нататъшни експерименти ще помогнат за изясняване на механизмите, чрез които KS влияе върху тези поведенчески промени.

7. Г7.7 Valcheva-Kuzmanova S, Georgieva A, Eftimov M, Todorova M, Kuzmanova V, Kuzmanov A, Marchev S, Kuzmanov K, Vlaskovska M. Effects of polyphenol-rich *Aronia melanocarpa* fruit juice on bone mineral density and pain sensitivity threshold in ovariectomized rats. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2019; 75 (Suppl. 1): S72-S73.

**Introduction:** Osteoporosis is a major disorder in menopause. Dietary interventions are an important tool for bone strengthening. *Aronia melanocarpa* fruit juice (AMFJ), a rich source of polyphenols, has been demonstrated to possess a potent antioxidant activity and important metabolic functions. The most popular model of osteoporosis/osteopenia is generated in rodents by ovariectomy. Pain hypersensitivity develops in ovariectomy-induced osteoporosis.

**Objectives:** The aim of the present study was to investigate the effects of AMFJ on pain sensitivity threshold and bone mineral density (BMD) in ovariectomized (OVX) rats.

**Methods:** Female Wistar rats were divided into 4 groups, each of 14 animals: SO (sham-operated), OVX, OVX+AMFJ<sub>5</sub> and OVX+AMFJ<sub>10</sub>. Beginning 2 weeks after the operation, SO and OVX groups were treated daily orally with distilled water (10 ml/kg) while OVX+AMFJ<sub>5</sub> and OVX+AMFJ<sub>10</sub> rats received AMFJ at doses of 5 ml/kg and 10 ml/kg, respectively. The main polyphenolic substances in 1 ml AMFJ were: total phenolics (6.65 mg), total proanthocyanidins (3.93 mg), chlorogenic acid (0.69 mg) and neochlorogenic acid (0.84 mg). After 10 weeks of treatment, hot plate test was performed to assess thermal pain sensitivity. Femur BMD was measured by dual energy X-ray absorptiometry using a computer program for small subjects.

**Results:** In the hot plate test, the latency time of OVX rats was significantly shorter ( $p < 0.05$ ) than that of SO rats. Hot-plate latency periods of both OVX+AMFJ<sub>5</sub> and OVX+AMFJ<sub>10</sub> groups were not significantly different from SO latency time and were significantly longer ( $p < 0.001$ ) compared to the results of OVX rats. Three months after ovariectomy, the femur BMD of OVX group was reduced compared to SO group. AMFJ dose-dependently prevented bone loss. Thus, BMD of OVX+AMFJ<sub>10</sub> rats was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that of OVX rats.

**Conclusions:** Treatment of OVX rats with AMFJ antagonized OVX-induced decrease in BMD and prevented osteoporotic hyperalgesia to heat. Therefore, AMFJ might be beneficial for postmenopausal osteoporosis prevention.

### **Ефекти на богатият на полифеноли плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху костно-минералната плътност и прагът на болкова чувствителност при овариектомирани плъхове**

**Въведение:** Остеопорозата е основно проблем по време на менопаузата. Храненето е много важно за укрепване на костите. Доказано е, че плодовият сок от *Aronia melanocarpa* (AMFJ), богат източник на полифеноли, притежава мощна антиоксидантна активност и важни метаболитни функции. Най-популярният модел на остеопороза/остеопения при гризачи е чрез овариектомия. Болкова свръхчувствителност е друг проблем, който се наблюдава при остеопороза, предизвикана от овариектомия.

**Цел:** Целта на настоящото проучване беше да се изследват ефектите на AMFJ върху прага на чувствителност към болка и костната минерална плътност (BMD) при плъхове с овариектомия (OVX).

**Методи:** Женски Wistar плъхове бяха разделени на 4 групи, всяка от 14 животни: SO (фалшиво оперирани), OVX, OVX+AMFJ<sub>5</sub> и OVX+AMFJ<sub>10</sub>. Започвайки 2 седмици след операцията, групите SO и OVX бяха третирани ежедневно, перорално, с дестилирана вода (10 ml/kg), докато плъховете OVX+AMFJ<sub>5</sub> и OVX+AMFJ<sub>10</sub> получаваха AMFJ в дози, съответно, от 5 ml/kg и 10 ml/kg. Основните полифенолни вещества в 1 ml AMFJ са: общи феноли (6,65 mg), общи проантоцианидини (3,93 mg), хлорогенна киселина (0,69 mg) и неохлорогенна киселина (0,84 mg). След 10 седмици третиране беше извършен тест с гореща плоча за оценка на чувствителността към термична болка. BMD на бедрената кост беше измерена чрез рентгенова абсорбциометрия, като се използва компютърен софтуер.

**Резултати:** При теста с гореща плоча времето на латентност на OVX плъхове е значително по-кратко ( $p < 0,05$ ) от това на SO плъхове. Времето на латентност към горещата плоча на групите OVX+AMFJ<sub>5</sub>, и OVX+AMFJ<sub>10</sub> не се различава значително от това на SO и е

значително по-дълго ( $p < 0,001$ ) в сравнение с резултатите от OVX плъхове. Три месеца след овариектомията BMD на бедрената кост на групата OVX е намалена в сравнение с групата SO. AMFJ, в зависимост от дозата предотвратява костната загуба. BMD на OVX+AMFJ10 плъхове е значително по-висока ( $p < 0,05$ ) от тази на OVX плъхове.

Заклучения: Третирането на OVX плъхове с AMFJ антагонизира OVX-индуцираното намаление на BMD и предотвратява остеопорозната хипералгезия към топлина. Следователно, AMFJ може да бъде полезен за превенция на постменопаузалната остеопороза.

8. **Г7.8** Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanova V, Kuzmanov A, **Eftimov M**, Todorova M, Georgieva A, Kuzmanov K, Marchev S, Vlaskovska M. Effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice on metabolic indices in a rat ovariectomy-induced model of bone loss. *Osteoporosis International* 2019; 30: S465-S465.

Objective: Polyphenols are intensively studied because of their beneficial effects on human health. The aim of the study was to investigate the effects of polyphenol-rich *Aronia melanocarpa* fruit juice (AMFJ) on metabolic indices in a rat model of bone loss.

Methods: Female Wistar rats were divided into 4 groups, each of 14 animals: SO (sham-operated), OV (ovariectomized), OV+AMFJ5 and OV+AMFJ10. Beginning 2 weeks after the operation, in the course of 10 weeks, the animals were treated daily orally. SO and OV groups received distilled water. OV+AMFJ5 and OV+AMFJ10 groups were respectively treated with AMFJ at doses of 5 and 10 ml/kg. Weight was measured throughout the experiment, and weight gain was calculated. At the end of the experiment, femur BMD was evaluated by DXA, fat deposits (total, retroperitoneal and mesenteric) and blood lipids were measured.

Results: AMFJ dose-dependently antagonized OV-induced BMD reduction. Thus, in OV+AMFJ10 group the BMD was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that of OV group. OV rats had a significantly higher ( $p < 0.05$ ) weight gain than SO rats. The total and retroperitoneal fat deposits of OV group were significantly higher ( $p < 0.01$ ) than those of SO group and the mesenteric fat was insignificantly increased. This accounted for significantly higher ratios of total fat/body weight ( $p < 0.05$ ) and retroperitoneal fat/body weight ( $p < 0.01$ ) of OV rats compared to SO rats. Blood cholesterol level of OV group was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that of SO group. AMFJ in the two doses could not counteract these effects of ovariectomy on metabolism. Thus, the weight gain, total fat, retroperitoneal fat and the calculated ratios of total fat/body weight and retroperitoneal fat/body weight, as well as the blood cholesterol of OV+AMFJ5 and OV+AMFJ10 groups were significantly higher than those of SO group and were no significantly different from those of OV rats.

Conclusion: In a rat ovariectomy-induced model of bone loss, *Aronia melanocarpa* fruit juice antagonized the reduction of BMD but could not antagonize the effects of ovariectomy on lipid metabolism.

**Ефекти на плодов сок от върху метаболитните показатели при плъхове с овариектомия-индуциран дефицит на костна плътност**

Цел: Полифенолите се изследват интензивно поради тяхното полезно въздействие върху човешкото здраве. Целта на изследването е да се проучат ефектите на богатия на полифеноли плодов сок от *Aronia melanocarpa* (AMFJ) върху метаболитните показатели в модел на дефицит на костна плътност при плъхове.

Методи: Женски плъхове Wistar бяха разделени на 4 групи, всяка от 14 животни: SO (фалшиво оперирани), OV (овариектомирани), OV+AMFJ5 и OV+AMFJ10. Започвайки 2 седмици след операцията, в продължение на 10 седмици животните се третираха ежедневно орално. SO и OV групите получаваха дестилирана вода. Групите OV+AMFJ5 и OV+AMFJ10 бяха съответно третирани с AMFJ в дози от 5 и 10 ml/kg. По време на експеримента се измерваше теглото и се изчисляваше наддаването на тегло. В края на експеримента BMD на бедрената кост беше оценена чрез DXA, бяха измерени мастните натрупвания (общи, ретроперитонеални и мезентериални) и серумните липиди.

Резултати: AMFJ дозозависимо антагонизира OV-индуцираното намаляване на BMD. В групата OV+AMFJ10, BMD е значително по-висока ( $p<0,05$ ) от тази на група OV. OV плъхове имат значително по-високо ( $p<0,05$ ) наддаване на тегло от група SO. Общите и ретроперитонеалните мастни натрупвания на OV групата са значително по-високи ( $p<0,01$ ) от тези на SO групата, а мезентериалната мазнина е незначително увеличена. Това се дължи на значително по-високи съотношения обща мазнина/телесно тегло ( $p<0,05$ ) и ретроперитонеална мазнина/телесно тегло ( $p<0,01$ ) на OV плъхове в сравнение с SO плъхове. Нивото на холестерола в кръвта на OV групата е значително по-високо ( $p<0,05$ ) от това на SO групата. AMFJ, в двете дози не може да противодейства на тези ефекти на овариектомията върху метаболизма. По този начин наддаването на тегло, общата мазнина, ретроперитонеалната мазнина и изчислените съотношения на общата мазнина/телесно тегло и ретроперитонеалната мазнина/телесно тегло, както и холестеролът в кръвта на групите OV+AMFJ5 и OV+AMFJ10 бяха значително по-високи от тези на SO група и не се различават значително от тези на OV плъхове.

Заклучение: В модел на загуба на костна плътност, предизвикан от овариектомия при плъхове, плодовият сок от *Aronia melanocarpa* противодейства на намаляването на BMD, но не може да противодейства на ефектите от овариектомията върху липидния метаболизъм.

9. **Г7.9** Valcheva-Kuzmanova S, Todorova M, Georgieva A, **Eftimov M**, Kuzmanova V, Kuzmanov A, Kuzmanov K, Vlaskovska M. Behavioral effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice in rats with ovariectomy-induced reduction of bone mineral density. *Osteoporosis International* 2019; 30: S483-S483.

Objective: *Aronia melanocarpa* fruit juice (AMFJ), rich in polyphenols, possesses pronounced effects on central nervous system functions. This study aimed to investigate AMFJ effects on locomotor activity, anxiety and depressive behavior in rats with ovariectomy-induced reduction of BMD.

Methods: Female Wistar rats were divided into 4 groups: SO (sham-operated), OV (ovariectomized), OV+AMFJ5 and OV+AMFJ10. Beginning 2 weeks after the operation, rats were treated daily orally with distilled water (SO and OV groups) or with AMFJ at doses of 5 and 10 ml/kg (OV+AMFJ5 and OV+AMFJ10 groups, respectively). After 10 weeks, femur BMD was measured and animal behaviors were recorded in the open field test (OFT), social interaction (SI) test and forced swim test (FST).

Results: AMFJ dose-dependently antagonized OV-induced BMD reduction. In the OFT, ovariectomy caused a slight reduction in locomotor activity. The horizontal movements of OV+AMFJ5 and OV+AMFJ10 groups were significantly lower ( $p<0.01$ ) than those of SO and OV rats and the vertical movements of OV+AMFJ10 group were significantly lower ( $p<0.05$ ) than those of SO group. This AMFJ-induced dose-dependent decrease in locomotion was probably due to a sedative effect. The SI time of OV rats was significantly decreased ( $p<0.01$  vs. SO group) showing the development of an anxiety state. The SI time of OV+AMFJ5 group was not significantly different from that of SO rats demonstrating an anti-anxiety effect of that AMFJ dose. The SI time of OV+AMFJ10 group was similar to that of OV group, probably affected by the higher reduction of locomotion by 10 ml/kg AMFJ. In the FST, the immobility time (IT) of OV group was significantly increased ( $p<0.01$  vs. SO group) indicating the development of depression. The IT of OV+AMFJ5 group did not differ significantly from that of OV group. For OV+AMFJ10 group, the IT was significantly lower ( $p<0.05$ ) than that of OV group, not significantly different from that of SO group, indicating an anti-depressive effect of that AMFJ dose.

Conclusion: AMFJ reduced the locomotor activity probably due to sedation, antagonized ovariectomy-induced anxiety and depressive behavior in rats.

### **Поведенчески ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* при плъхове с индуциран от овариектомия дефицит на костната плътност**

Цел: Богатият на полифеноли плодов сок от *Aronia melanocarpa* (AMFJ) притежава изразени ефекти върху функциите на централната нервна система. Целта на настоящето проучване бе да изследва ефектите на AMFJ върху локомоторната активност, тревожността и депресивното поведение при плъхове с индуцирано от овариектомия намаление на костно-минералната плътност (BMD).

Методи: Женски плъхове Wistar бяха разделени на 4 групи: SO (фалшиво оперирани), OV (овариектомирани), OV+AMFJ5 и OV+AMFJ10. Започвайки 2 седмици след операцията, плъховете се третират ежедневно, перорално с дестилирана вода (SO и OV групи) или с AMFJ в дози от 5 и 10 ml/kg (OV+AMFJ5 и OV+AMFJ10 групи, съответно). След 10 седмици беше измерена BMD на бедрената кост и поведението на животните беше изследвано в тест открито поле (OFT), тест за социално взаимодействие (SI) и тест за принудително плуване (FST).

Резултати: AMFJ дозозависимо антагонизира OV-индуцираното намаляване на BMD. В OFT овариектомията причинява леко намаляване на двигателната активност. Горизонталните движения на OV+AMFJ5 и OV+AMFJ10 групите са значително по-малко ( $p<0,01$ ) от тези на SO и OV плъхове, а вертикалните движения на OV+AMFJ10 групата са значително по-малко



( $p < 0,05$ ) от тези на SO групата. Това дозозависимо намаление на двигателната активност вероятно се дължи на седативен ефект. SI времето на OV плъхове беше значително намалено ( $p < 0,01$  спрямо SO група), което показва развитието на състояние на тревожност. SI времето на групата OV+AMFJ5 не се различава значително от това на SO плъхове, демонстрирайки анксиолитично-подобен ефект на тази доза AMFJ. SI времето на групата OV+AMFJ10 е подобно на това на групата OV, вероятно повлияно от по-голямото намаляване на двигателната активност при третиране с 10 ml/kg AMFJ. В FST времето на неподвижност (IT) на OV групата е значително увеличено ( $p < 0,01$  спрямо SO групата), което показва развитието на депресия. IT на групата OV+AMFJ5 не се различава значително от тази на групата OV. За групата OV+AMFJ10 IT беше значително по-кратко ( $p < 0,05$ ) от този на групата OV и не се различава значително от този на групата SO, което показва антидепресивно-подобен ефект на тази доза AMFJ.

Заклучение: AMFJ при плъхове намалява локомоторната активност, вероятно поради седация, антагонизира тревожността и депресивно поведение, предизвикани от овариектомия.

10. **G7.10** Valcheva-Kuzmanova S, Kuzmanov A, Kuzmanova V, **Eftimov M**, Georgieva A, Todorova M, Kuzmanov K, Marchev S, Vlaskovska M. Evaluation of lipid metabolism, inflammation and bone turnover in a rat model of ovariectomy-induced bone loss. *Osteoporosis International* 2019; 30: S501-S501.

Objective: Ovariectomized (OVX) rat is an animal model which simulates the clinical findings in postmenopausal conditions. The aim of the present study was to make a complex evaluation of lipid metabolism, inflammation and bone turnover in an ovariectomized (OVX) rat model of postmenopausal bone loss using anthropometric and biochemical indices.

Methods: Female Wistar rats were divided into 2 groups, each of 14 animals: SO (sham operated) and OVX. Three months after the operation, femur BMD was measured by DXA using a computer program for small subjects. Weight was measured throughout the experiment and weight gain was calculated. At termination of the experiment, fat deposits (total, retroperitoneal and mesenteric) and blood lipids were measured. Inflammation was evaluated by serum concentrations of TNF-alpha. Serum alkaline phosphatase (ALP) was determined as a marker of bone turnover.

Results: Three months after ovariectomy, the femur BMD of OVX rats was reduced but not significantly. OVX rats had a significantly higher ( $p < 0.05$ ) weight gain (12.4%) than SO rats (3.9%). The total and retroperitoneal fat deposits of OVX group were significantly higher ( $p < 0.01$ ) than those of SO group while the mesenteric fat was also increased but not significantly. This accounted for significantly higher ratios of total fat/animal weight ( $p < 0.05$ ) and retroperitoneal fat/animal weight ( $p < 0.01$ ) of OVX rats compared to SO rats. Blood cholesterol level of OVX group was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that of SO group. The ALP concentration was significantly elevated ( $p < 0.05$ ) in OVX group showing an increased bone turnover. TNF alpha was significantly higher ( $p < 0.05$  vs. SO group) in the OVX group indicating the development of inflammation.

Conclusion: At the stage when the reduction in BMD was not significant, estrogen deficiency in OVX rats caused a state of obesity, dyslipidemia and inflammation.

### **Оценка на липидния метаболизъм, възпалението и костния обмен в индуциран от овариектомия модел на загуба на костна плътност при плъхове**

Цел: Овариектомията (OVX) при плъхове е животински модел, който симулира клиничните находки на менопаузата. Целта на настоящото изследване беше да се направи комплексна оценка на липидния метаболизъм, възпалението и костния обмен в модел на овариектомия-индуцирана (OVX) постменопаузална костна загуба при плъхове, като се използват антропометрични и биохимични индекси.

Методи: Женски плъхове Wistar бяха разделени на 2 групи, всяка от 14 животни: SO (фалшиво оперирани) и OVX. Три месеца след операцията костно-минералната плътност (BMD) на бедрената кост беше измерена чрез DXA с помощта на компютърна програма. По време на експеримента се измерваше теглото и се изчисляваше наддаването. При приключването на експеримента бяха измерени мастни натрупвания (обща, ретроперитонеална и мезентериална) и серумните липиди. Възпалението беше оценено чрез серумни концентрации на TNF-алфа. Серумната алкална фосфатаза (ALP) се определяше като маркер за костен обмен.

Резултати: Три месеца след овариектомия, BMD на бедрената кост на OVX плъхове е намалена, но незначително. Плъховете OVX имат значително по-високо ( $p < 0,05$ ) наддаване на тегло (12,4%) отколкото SO плъховете (3,9%). Общите и ретроперитонеалните мастни отлагания на OVX групата са значително по-високи ( $p < 0,01$ ) от тези на SO групата, докато мезентериалната мазнина също е увеличена, но незначително. Отчетени бяха значително по-високи съотношения на обща мазнина/тегло на животни ( $p < 0,05$ ) и ретроперитонеална мазнина/тегло на животни ( $p < 0,01$ ) на OVX плъхове в сравнение с SO плъхове. Нивото на холестерола в кръвта на група OVX е значително по-високо ( $p < 0,05$ ) от това на група SO. Концентрацията на ALP е значително повишена ( $p < 0,05$ ) в групата OVX, което показва повишен костен обмен. Стойностите на TNF алфа са значително по-високи ( $p < 0,05$  спрямо групата SO) в група OVX, което показва развитието на възпаление.

Заклучение: По време на етапа, когато още не наблюдавано значимо намаляване на BMD, естрогенният дефицит при OVX плъхове причинява състояние на затлъстяване, дислипидемия и възпаление.

### **Г8. Публикации и доклади, публикувани в нереферирани списания с научно рецензиране или публикувани в редактирани колективни томове**

1. **Г8.1** Pavlov D, Eftimov M, Tzaneva M, Ivanova D, Nashar M, Kobakova I, Valcheva-Kuzmanova S. Gastroprotective effect of ethanol infusion from *Cotinus coggygia* wood in rats. *Scripta Scientifica Medica* 2013; 45(5): 7-12.

**PURPOSE:** The Smoke tree (*Cotinus coggygia*) is a medicinal plant that is traditionally used by the Balkan and Anatolian folk medicine for its antiseptic and anti-inflammatory properties. There are few reports about the internal usage of ethanol extracts from *C. coggygia* wood against gastric ulcer. The aim of this study was to explore the effect of ethanol infusion from *Cotinus coggygia* wood (EICCW) on indomethacin-induced ulcerogenesis in rats and its possible effect on the gastric oxidative status.

**MATERIAL AND METHODS:** EICCW was applied by oral gavage (volume: 10 ml/kg) as a pretreatment 3 days before a single intragastric administration of indomethacin (dose: 100 mg/kg). Gastric erosions were evaluated histopathologically. Malondialdehyde (MDA) in blood serum and stomach was measured as a biochemical marker of lipid peroxidation. Gastric necrosis was also evaluated by alkaline phosphatase (ALP) and uric acid (UA) assays.

**RESULTS:** EICCW reduced the elevated by indomethacin gastric MDA, ALP and UA levels. Histopathological studies demonstrated that EICCW induced a reduction of the depth and severity of indomethacin-induced mucosal lesions.

**CONCLUSION:** Indomethacin-induced gastric mucosal damage was accompanied by the development of oxidative stress. EICCW-pretreatment alleviated the gastric lesions, and prevented the indomethacin-induced elevation of gastric ALP and UA. It could be suggested that the gastroprotective effect of EICCW was due to its antioxidant properties as evidenced by the decreased gastric MDA levels.

### **Гастропротективен ефект на етанолов инфуз от дървесината на *Cotinus coggygia* при пльхове**

**ЦЕЛ:** Смардликата (*Cotinus coggygia*) е лечебно растение, което традиционно се използва от балканската и анадолската народна медицина заради своите антисептични и противовъзпалителни свойства. Има малко доклади за вътрешната употреба на етанолови екстракти от дървесина на *C. coggygia* срещу стомашна язва. Целта на това проучване беше да се изследва ефектът на етанолов инфуз от дървесина на *Cotinus coggygia* (EICCW) върху индуцирана от индометацин улцерогенеза при пльхове и неговия възможен ефект върху стомашния оксидативен статус.

**МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:** EICCW се прилага чрез орална сонда (обем: 10 ml/kg) като претретиране 3 дни преди интрагастралното приложение на индометацин (доза: 100 mg/kg). Стомашните ерозии се оценяват хистопатологично. Малондиалдехидът (MDA) в серум и стомах се измерва като биохимичен маркер за липидна пероксидация. Стомашната некроза също беше оценена чрез нивата на алкална фосфатаза (ALP) и пикочна киселина (UA).

**РЕЗУЛТАТИ:** EICCW намалява повишените от индометацин стомашни нива на MDA, ALP и UA. Хистопатологичните изследвания показват, че EICCW индуцира намаляване на дълбочината и тежестта на предизвиканите от индометацин мукозни лезии.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Предизвиканото от индометацин увреждане на стомашната лигавица е придружено от развитие на оксидативен стрес. Претретирането с EICCW намалява стомашните лезии и предотвратява предизвиканото от индометацин повишаване на

стомашната ALP и UA. Може да се предположи, че гастропротективният ефект на EICCW се дължи на неговите антиоксидантни свойства, както се вижда от понижените стомашни нива на MDA.

2. **Г8.2** Павлов Д, Цанева М, Вълчева-Кузманова С, Нашар М, Калчев К, **Ефтимов М**, Иванова Д. Биохимично и хистопатологично проучване на протективния ефект на воден извлек от листа на смрадлика (*Cotinus coggygia*) в модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност при плъхове. *Медицински Университет – Пловдив, МНД „Асклепий” – НАУКА И МЛАДОСТ – Сборник научни съобщения от конкурсна сесия 2013* 2013: 134-138.

Objective: The aim of the study was to investigate the protective effect of an aqueous infusion of *Cotinus coggygia* leaves (WICCL) in a rat model of paracetamol-induced hepatotoxicity.

Materials and methods: Experimental animals were divided into 5 groups of 8 rats each: Control (C), Paracetamol (P), 1% WICCL+P, 2% WICCL+P and 4% WICCL+P. WICCL was administered orally in concentrations of 1, 2 and 4% respectively to groups 1% WICCL+P, 2% WICCL+P and 4% WICCL+P as a pretreatment for 7 days before a single intraperitoneal injection of paracetamol (1g/kg) and 2 days after. Groups C and P received distilled water. The concentration of total thiols, MDA, AST, ALT, ALP, UA were determined. Histological changes in the liver were also examined.

Results: A statistically significant decrease ( $p < 0.05$ ) in serum AST levels was found for group 1% WICCL+P compared to group P. For the same group was reported a tendency to decrease ALT activity. No significant changes were recorded at higher doses of WICCL on AST and ALT. There were no significant differences in the WICCL-treated groups in ALP levels. No changes were found in the biochemical markers for oxidative stress - MDA, SH-groups and UA. Histological examination showed preserved liver architectonics and insignificant number of apoptotic cells in the 1% WICCL treated group.

Conclusion: The aqueous extract of *Cotinus coggygia* leaves exhibits a hepatoprotective effect at a concentration of 1%. No such effect was found for 2% and 4% WICCL.

**Биохимично и хистопатологично проучване на протективния ефект на воден извлек от листа на смрадлика (*Cotinus coggygia*) в модел на парацетамол-индуцирана хепатотоксичност при плъхове.**

Цел: Целта на проучването е да се изследва протективният ефект на воден извлек от листа на смрадлика *Cotinus coggygia* (ВИЛС) в модел на индуцирана от парацетамол хепатотоксичност при плъхове.

Материали и методи: Опитните животни са разделени в 5 групи по 8 плъха: Контрола (К), Парацетамол (П), 1%ВИЛС+П, 2%ВИЛС+П и 4%ВИЛС+П. ВИЛС е прилаган орално в концентрации 1,2 и 4% съответно на групи 1%ВИЛС+П, 2%ВИЛС+П и 4%ВИЛС+П като претретиране за 7 дни преди еднократно интраперитонеално инжектиране на парацетамол (1г/кг) и 2 дни след това. Групи К и П получваха дестилирана вода. Бяха определени концентрацията на тотални тиоли, MDA, AST, ALT, ALP, UA. Бяха изследвани и хистологичните промени в черният дроб.

Резултати: Установено е статистически значимо понижение ( $p < 0.05$ ) в серумните нива на AST за група 1%ВИЛС+П в сравнение с група П. За същата група е отчетена тенденция за понижаване активността на ALT. Не са регистрирани значими промени на по-високите дози ВИЛС върху AST и ALT. Няма значими разлики в третираните с ВИЛС групи в нивата на ALP. Не са установени промени и в биохимичните маркери за оксидативен стрес – MDA, SH-групите и UA. Хистологичното изследване показва запазена чернодробна архитектура и незначителен брой апоптотични клетки при групата третирана 1% ВИЛС.

Извод: Водният извлек от листа на смрадлика проявява хепатопротективен ефект в концентрация 1%. Такъв ефект не е установен за 2% и 4% ВИЛС.

3. **Г8.3** Valcheva-Kuzmanova S, **Eftimov M**, Belcheva I, Tashev R, Belcheva S. Effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice on learning and memory in the two-way active avoidance task in rats. *Journal of Biomedical and Clinical Research* 2013; 6(1): 18-23.

*Aronia melanocarpa* fruits are one of the richest natural sources of phenolic substances, among them flavonoids, mainly from the subclass of anthocyanins. Flavonoids, which are constituents of *Aronia melanocarpa* fruit juice, have been found to localize in various brain regions that are important for memory. The aim of the present study was to investigate the learning and memory effects of *Aronia melanocarpa* fruit juice (AMFJ) in young/healthy male Wistar rats. AMFJ was applied orally for 21 and 30 days at a dose of 10 ml/kg b.w., and comparisons were made with saline-treated (10 ml/kg b.w.) controls. Learning and memory functions were evaluated, using the two-way active avoidance task (shuttle box). Administered for the two treatment periods, the juice significantly increased the number of avoidances on training days 1 and 2, as well as at the retention test (24 h after the 2 training session). These effects were more pronounced in rats treated with AMFJ for 30 days. The learning and memory effects of AMFJ are probably due to its polyphenolic constituents. The findings from the present study suggest that AMFJ applied subchronically improved learning and memory in young/healthy rats.

#### **Ефект на плодов сок от върху паметта и обучението в тест за двупосочно активно избягване при плъхове**

Плодовете на *Aronia melanocarpa* са един от най-богатите естествени източници на фенолни вещества, сред които флавоноиди, главно от подкласа на антоцианините. Установено е, че флавоноидите, които са съставни части на плодовия сок от *Aronia melanocarpa*, се локализируют в различни области на мозъка, които са важни за паметта. Целта на настоящото проучване беше да се изследват ефектите на ученето и паметта на плодовия сок от *Aronia melanocarpa* (AMFJ) при млади/здрави мъжки плъхове Wistar. AMFJ се прилага перорално в продължение на 21 и 30 дни в доза от 10 ml/kg телесно тегло и се правят сравнения с третираните с физиологичен разтвор (10 ml/kg телесно тегло) контроли. Функциите за учене и памет бяха оценени, като се използва двупосочната задача за активно избягване. Приложен за двата периода на лечение, сокът значително увеличи броя на избягванията в дните на обучение 1 и 2, както и при теста за задържане (24 часа след 2 тренировъчна сесия). Тези ефекти са по-изразени при плъхове, третираните с AMFJ в продължение на 30 дни. Ефектите на ученето и паметта на AMFJ вероятно се дължат на неговите полифенолни съставки.

Изводите от настоящото проучване предполагат, че AMFJ прилага субхронично подобрява паметта и обучението на млади/здрави плъхове.

4. **Г8.4** Valcheva-Kuzmanova S., **Eftimov M**, Kuzmanov K. Evaluation of oxidative stress in rats treated subchronically with ethanol. *Scripta Scientifica Medica* 2013; 45(1): 35-39.

**PURPOSE:** The aim of the present study was to evaluate the oxidative stress in male Wistar rats treated subchronically with ethanol.

**MATERIAL AND METHODS:** Ethanol was applied orally for 45 days. The daily dose of 7,9 g/kg as a 20% solution was divided in two equal treatments. Oxidative stress was evaluated by the concentration of thiobarbituric acid reacting substances (TBARS), markers of lipid peroxidation. TBARS were determined in rat serum, liver, kidneys, brain and testes.

**RESULTS:** Ethanol-induced toxicity was evidenced by a significantly lower ( $p < 0,001$ ) weight gain of ethanol-treated rats in comparison with distilled water-treated controls. TBARS in ethanol-treated rats were significantly increased ( $p < 0,05$ ) in serum ( $59,33 \pm 7,5$  nmol/mL vs the control value of  $41,55 \pm 3,9$  nmol/mL) and in testes ( $123,98 \pm 13,5$  nmol/g vs the control value of  $89,25 \pm 7,5$  nmol/g). They were, however, not significantly elevated in the liver, kidneys and brain. This effect in the liver was consistent with the insignificant elevation of liver enzymes in the serum of ethanol-treated rats.

**CONCLUSION:** The results from this study showed that in ethanol-treated rats, lipid peroxidation products were mostly increased in serum and testes as well the latter being more exposed to oxidative stress than other organs examined such as liver, kidneys and brain.

#### **Оценяване на оксидативния стрес при плъхове третиран с етанол**

**ЦЕЛ:** Целта на настоящото изследване е да се оцени оксидативният стрес при мъжки плъхове Wistar, третиран с етанол.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ:** Етанолът се прилага перорално в продължение на 45 дни. Дневната доза от 7,9 g/kg като 20% разтвор се разделя на две равни третираня. Оксидативният стрес се оценява чрез концентрацията на веществата, реагиращи на тиобарбитурова киселина (TBARS), маркери на липидна пероксидация. TBARS се определят в серум на плъх, черен дроб, бъбреци, мозък и тестиси.

**РЕЗУЛТАТИ:** Индуцираната от етанол токсичност се доказва чрез значително по-ниско ( $p < 0,001$ ) наддаване на тегло на третиран с етанол плъхове в сравнение с третираните с дестилирана вода контроли. TBARS при третиран с етанол плъхове са значително повишени ( $p < 0,05$ ) в серума ( $59,33 \pm 7,5$  nmol/mL спрямо контролната стойност от  $41,55 \pm 3,9$  nmol/mL) и в тестисите ( $123,98 \pm 13,5$  nmol/g спрямо контролната стойност от  $89,25 \pm 7,5$  nmol/g). Те обаче не са значително повишени в черния дроб, бъбреците и мозъка. Този ефект в черния дроб е в съответствие с незначителното повишаване на чернодробните ензими в серума на плъхове, третиран с етанол.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:** Резултатите от това проучване показват, че при плъхове, третиран с етанол, продуктите на липидна пероксидация са повишени най-вече в серума и тестисите,

като последните са по-изложени на оксидативен стрес, отколкото други изследвани органи, като черен дроб, бъбреци и мозък.

5. **Г8.5** Павлов Д, Ефтимов М, Цанева М, Иванова Д, Нашар М, Вълчева-Кузманова С. Гастропротективен ефект на воден извлек от листа на смрадлика (*Cotinus coggygria*) в модел на индометацин-индуцирана улцерогенеза при плъхове. *Медицински Университет – Пловдив, МНД „Асклепий” – НАУКА И МЛАДОСТ – Сборник научни съобщения от конкурсна сесия 2014* 2014: 37-41.

Objective: To investigate the gastroprotective effect of water infusion of *Cotinus coggygria* leaf (WICCL) in a model of indomethacin(Indo)-induced ulcerogenesis in rats.

Material and methods: Experimental animals were divided into 5 groups of 8: Control (C), Indomethacin (Indo), 1/100 WICCL + Indo, 2/100 WICCL + Indo and 4/100 WICCL + Indo. The three WICCL were administered as pretreatment in a volume of 10 ml/kg by gastric gavage for 3 days before a single intragastric indomethacin administration (dose: 100 mg/kg). Rats in groups C and Indo received distilled water. After euthanasia, a macroscopic evaluation of the ulcers was performed. Biochemical markers total thiols, MDA and ALP in serum and gastric homogenate were determined. A histopathological examination of the stomach was also performed.

Results: Pretreatment with 2/100 WICCL significantly reduced the number ( $p<0.05$ ) and area ( $p<0.01$ ) of ulcers, indicating a gastroprotective effect. No such effect was found for the other two infusions. The gastric mucosa of the animals of group 2/100 WICCL + Indo had a normal architecture, without erosions, identical to that of the control group. For the remaining two groups, which were pre-treated with 1/100 and 4/100 WICCL, respectively, no gastro-protective effect was found. A statistically significant decrease ( $p<0.01$ ) in gastric homogenate MDA concentration was reported for all three groups pretreated with WICCL compared to the Indo group. No statistically significant differences were found in the serum levels of MDA, PK and SH-groups.

Conclusions: Pretreatment with 2/100 WICCL ameliorates gastric lesions. It can be assumed that the gastroprotective effect of WICCL is due to its antioxidant properties.

#### **Гастропротективен ефект на воден извлек от листа на смрадлика (*Cotinus coggygria*) в модел на индометацин-индуцирана улцерогенеза при плъхове.**

Цел: Да се проучи гастропротективният ефект на воден извлек от листа на смрадлика (ВИЛС) в модел на индуцирана с индометацин (Индо) улцерогенеза при плъхове.

Материал и методи: Опитните животни са разделени в 5 групи по 8 броя: Контрола (К), Индометацин (Индо), 1/100 ВИЛС + Индо, 2/100 ВИЛС + Индо и 4/100 ВИЛС + Индо. Трите ВИЛС се прилагат като претретиране в обем 10 ml/kg чрез стомашна сонда в продължение на 3 дни преди еднократно интрагастрално третиране с индометацин (доза: 100 mg/kg). Плъховете от групи К и Индо са получавали дестилирана вода. След евтаназиране е извършена макроскопска оценка на язвите. Определени са биохимичните маркери тотални тиоли, MDA и ALP в серум и стомашен хомогенат. Извършено е и хистопатологично изследване на стомаха.

Резултати: Претретирането с 2/100 ВИЛС понижава значително броя ( $p<0,05$ ) и площта ( $p<0,01$ ) на язвите, което свидетелства за гастропротективен ефект. Такъв ефект не е установен за другите два извлека. Стомашната лигавица на животните от група 2/100 ВИЛС

+ Индо е с нормална архитектура, без ерозии, идентична с тази на контролната група. За останалите две групи, които са претретираны съответно с 1/100 и 4/100 ВИЛС, не е установен гастропротективен ефект на извлеките. Отчетено е статистически значимо понижение ( $p < 0,01$ ) в концентрацията на МДА в стомашен хомогенат и за трите групи, претретираны с ВИЛС в сравнение с група Индо. Не са установени статистически значими разлики в серумните нива на МДА, ПК и SH-групи.

Изводи: Претретирането с 2/100 ВИЛС облекчава стомашните лезии. Може да се предположи, че гастропро-тективният ефект на ВИЛС се дължи на неговите антиоксидантни свойства.

6. **Г8.6 Ефтимов М, Добрева Ц, Велкова Д, Кузманов К, Вълчева-Кузманова С.** Антидепресивно-подобен ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* при плъхове. *МНД „Асклепий” – НАУКА И МЛАДОСТ – Сборник научни съобщения от конкурсна сесия 2015:* 46-50.

Objective: To investigate the effect of *Aronia melanocarpa* fruit juice (AMFJ) on depressive like behavior in young/healthy rats and in models of anxiety-depressive behavior in rats.

Material and methods: 1. Male Wistar rats were divided into 3 groups: Control, AMFJ5 and AMFJ10. AMFJ was administered intragastrically for 30 days at doses of 5 and 10 ml/kg for groups AMFJ5 and AMFJ10. Controls received distilled water. 2. Male Wistar rats were divided into 4 groups: Control, SI, SI+AMFJ5 and SI+AMFJ10. For a period of 8 weeks, animals from groups SI, SI+AMFJ5 and SI+AMFJ10 were isolated in individual cages, while controls were kept in groups of 6 animals each. During the last 4 weeks of the period, groups SI+AMFJ5 and SI+AMFJ10 were treated orally with AMFJ at doses of 5 and 10 ml/kg. Controls and SI group received distilled water. 3. Female Wistar rats were divided into 4 groups: Control, Ethanol, E+AMFJ5 and E+AMFJ10. Control and Ethanol groups were pretreated twice with water, while E+AMFJ5 and E+AMFJ10 received AMFJ at doses of 5 and 10 ml/kg. One hour after each pretreatment, the Controls received water again, while the remaining groups were treated with ethanol 4g/kg, as a 20% solution. Treatments are carried out intragastrically for 14 days. At the end of the three experiments, a forced swim test (FST) was performed.

Results: After a 30-day treatment in experiment 1, AMFJ at a dose of 10 ml/kg significantly shortened immobility time compared to the control group ( $p < 0.05$ ). In experiment 2, again AMFJ at a dose of 10 ml/kg significantly shortened immobility time compared to the SI group ( $p < 0.05$ ). In the third experiment, there was a trend toward decreased immobility time in AMFJ-treated rats relative to the Ethanol group.

Conclusion: Subchronically administered AMFJ in young/healthy and socially isolated rats has an antidepressant-like effect in a forced swim test.

#### **Антидепресивно-подобен ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* при плъхове.**

Цел: Изследване на ефекта на плодов сок от *Aronia melanocarpa* (AMFJ) върху депресивната симптоматика при млади/здрави плъхове и в модели на тревожно-депресивно поведение при плъхове.



Материал и методи: 1. Мъжки Wistar плъхове са разделени в 3 групи: Контрола, AMFJ5 и AMFJ10. AMFJ е прилаган интрагастрално в продължение на 30 дни в дози 5 и 10 мл/кг за групи AMFJ5 и AMFJ10. Контролите са получавали дестилирана вода. 2. Мъжки Wistar плъхове са разделени в 4 групи: Контрола, SI, SI+AMFJ5 и SI+AMFJ10. За период от 8 седмици животните от групи SI, SI+AMFJ5 и SI+AMFJ10 са изолирани в индивидуални клетки, докато контролите са отглеждани в групи от по 6 животни. През последните 4 седмици на периода групи SI+AMFJ5 и SI+AMFJ10 са третирани орално с AMFJ в дози 5 и 10 мл/кг. Контролите и група SI са получавали дестилирана вода. 3. Женски Wistar плъхове са разделени в 4 групи: Контрола, Етанол, Е+AMFJ5 и Е+AMFJ10. Групи Контрола и Етанол са претретирани двукратно с вода, докато Е+AMFJ5 и Е+AMFJ10 приемат AMFJ в дози 5 и 10 мл/кг. Един час след всяко претретиране Контролите получават отново вода, докато останалите групи са третирани с етанол 4г/кг, като 20% разтвор. Третиранията се извършват интрагастрално, в продължение на 14 дни. В края на трите експеримента е извършен тест за принудително плуване (FST).

Резултати: След 30-дневно третиране в експеримент 1 AMFJ в доза 10 мл/кг скъсява значимо времето на неподвижност спрямо контролната група ( $p < 0,05$ ). В експеримент 2 отново AMFJ в доза 10 мл/кг скъсява значимо времето на неподвижност спрямо групата SI ( $p < 0,05$ ). В третия експеримент се наблюдава тенденция за намаляване на времето на неподвижност при третираните с AMFJ плъхове спрямо група Етанол.

Извод: Приложен субхронично AMFJ при млади/здрави плъхове и плъхове подложени на социална изолация има антидепресивно-подобен ефект в тест за принудително плуване.

7. **Г8.7 Eftimov M., Valcheva-Kuzmanova S.** Investigation of *Aronia melanocarpa* fruit juice for sedative-hypnotic effects in rats. *Journal of Biomedical and Clinical Research*, 2018; 11 (1): 77-82.

*Aronia melanocarpa* fruit juice (AMFJ) has been intensively studied for effects on the central nervous system. The study aimed to investigate AMFJ for possible sedative-hypnotic effects in rats after acute and subchronic administration. Male Wistar rats were treated orally with three doses of AMFJ (2.5, 5.0 and 10.0 ml/kg) either once (acute treatment) or in 30 days (subchronic treatment). Control rats were similarly treated with distilled water. The tests were performed 1 hour after the last AMFJ administration. The possible sedative-hypnotic effects of the juice were investigated in the open field test (OFT) and thiopental-induced sleeping time test. Substances with sedative-hypnotic effects decrease locomotor activity in the OFT and prolong the time of thiopental-induced sleep. The results from the OFT showed that neither the acute, nor the subchronic treatment of rats with all AMFJ doses affected the horizontal and vertical locomotor activity significantly. The two patterns of administration of AMFJ (acute and subchronic) had no significant effect on the duration of thiopental-induced sleep. The lack of effect of AMFJ on locomotor activity and the lack of prolongation of thiopental-induced sleep showed that AMFJ did not display sedative-hypnotic effects in rats.

**Изследвана на плодов сок от *Aronia melanocarpa* за седативно-хипнотичен ефект при плъхове**

Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* (AMFJ) е интензивно изследван за ефекти върху централната нервна система. Проучването имаше за цел да изследва AMFJ за възможни седативно-хипнотични ефекти при плъхове след остро и субхронично приложение. Мъжки плъхове Wistar бяха третирани орално с три дози AMFJ (2.5, 5.0 и 10.0 ml/kg) веднъж (остро лечение), или за 30 дни (субхронично лечение). Контролните плъхове бяха третирани по подобен начин с дестилирана вода. Тестовите са извършени 1 час след последното приложение на AMFJ. Възможните седативно-хипнотични ефекти на сока са изследвани в теста на открито (OFT) и тест за продължителност на съня, предизвикан от тиопентал. Веществата със седативно-хипнотичен ефект намаляват двигателната активност в OFT и удължават времето на съня, предизвикан от тиопентал. Резултатите от OFT показват, че нито остро, нито субхроничното лечение на плъхове с всички дози AMFJ повлиява значително хоризонталната и вертикалната локомоторна активност. Двата модела на приложение на AMFJ (остър и субхроничен) нямат значителен ефект върху продължителността на индуцирания от тиопентал сън. Липсата на ефект на AMFJ върху локомоторната активност и липсата на удължаване на индуцирания от тиопентал сън показва, че AMFJ не показва седативно-хипнотични ефекти при плъхове.

8. **Г8.8 Ефтимов М**, Георгиева А, Тодорова М, Вълчева-Кузманова С. Изследване на ефектите на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху двигателната активност на плъхове в следродилния период. *Collection of articles from the National Scientific Conference "15 Years of Pharmacy in Medical University – Plovdiv"* 2018: 135-138.

A woman's brain undergoes remarkable physiological and behavioral changes during the postpartum period. *Aronia melanocarpa* fruit juice (AMFJ) and the chlorogenic acid (CGA) have proven effects on the functions of the central nervous system. The aim of the present study was to investigate the effects of AMFJ and CGA administered during pregnancy on the locomotor activity of postnatal rats.

Female Wistar rats (n=25) were divided into 5 groups: Control; Childbirth (P); P+AMFJ5; P+AMFJ10 and P+CGA. All groups except Control are fertilized. Between the 14th and 20th day of gestation, the rats were treated once a day, orally, as follows: groups Control and P - with distilled water (10 ml/kg), P+AMFJ5 and P+AMFJ10 - with AMFJ (respectively 5 and 10 ml/kg) and P+CGA – with CGA (20 mg/kg). On the second day after birth, an open field test was conducted to assess the motor activity of the animals. Both horizontal and vertical motor activity of group P was significantly lower compared to that of the Control (p<0.05). The number of horizontal and vertical movements of the animals of groups P+AMFJ5, P+AMFJ10 and P+CGA were not significantly different from those of the Control group. The results show that postnatal period in rats exhibit reduced locomotor activity in the open field test, which is likely the result of increased emotionality or anxiety associated with reduced exploratory behavior. AMFJ and CGA counteract this condition, possibly due to their anxiolytic-like activity.

#### **Изследване на ефектите на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху двигателната активност на плъхове в следродилния период.**

Мозъкът на жената претърпява забележителни физиологични и поведенчески промени по време на следродилния период. Плодовият сок от *Aronia melanocarpa* (AMFJ) и съдържащата

се в него хлорогенова киселина (CGA) са с доказани ефекти върху функциите на централната нервна система. Целта на настоящето проучване е да се изследват ефектите на AMFJ и CGA, прилагани по време на бременността, върху двигателната активност на плъхове в следродилния период.

Женски Wistar плъхове (n=25) са разделени в 5 групи: Контрола; Родилки (P); P+AMFJ5; P+AMFJ10 и P+CGA. Всички групи, с изключение на Контрола са заплодени. Между 14-ти и 20-ти гестационен ден, плъховете са третирани веднъж дневно, орално, както следва: групи Контрола и P – с дестилирана вода (10 мл/кг), P+AMFJ5 и P+AMFJ10 – с AMFJ (респективно 5 и 10 мл/кг) и P+CGA – с CGA (20 мг/кг). На вторият ден след раждането е проведен тест открито поле за оценяване на двигателната активност на животните.

Както хоризонталната, така и вертикалната двигателна активност на група P е значимо по-ниска в сравнение с тази на Контролата ( $p < 0,05$ ). Броят на хоризонталните и вертикалните движения на животните от групи P+AMFJ5, P+AMFJ10 и P+CGA не е значимо по-различен от тези на група Контрола.

Резултатите показват, че плъховете в следродилния период проявяват намалена двигателна активност в теста открито поле, което вероятно е резултат от повишената емоционалност или тревожност свързана с редуцирано изследователско поведение. AMFJ и CGA противодействат на това състояние, вероятно благодарение на тяхната анксиолитично-подобна активност.

9. **Г8.9** Тодорова М, **Ефтимов М**, Георгиева А, Кузманов К, Вълчева-Кузманова С. Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху поведението на пренатално третирани плъхове в тест открито поле. *Collection of articles from the National Scientific Conference "15 Years of Pharmacy in Medical University – Plovdiv"* 2018: 130-134.

*Aronia melanocarpa* fruit juice (AMFJ) and its constituent, chlorogenic acid (CGA), have been demonstrated to possess central nervous system effects in rats. This study aimed to determine the effects of AMFJ and CGA on open field behavior of prenatally exposed rats.

Pregnant Wistar rats (n=20) were divided into 4 groups: PC (pregnant control); P+AMFJ5; P+AMFJ10 and P+CGA. Between 14<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> gestational day, rats were treated once daily, orally as follows: PC group – distilled water (10 ml/kg), P+AMFJ5 and P+AMFJ10 groups – AMFJ (5 and 10 ml/kg, respectively) and P+CGA group – CGA (20 mg/kg). The newborns from the offspring (OFS) (n=44) were respectively the following groups: OFSC, OFS+AMFJ5, OFS+AMFJ10 and OFS+CGA. The open field test behaviors of both male and female OFS were measured at 29 days of age. The indices recorded were: horizontal movements (HMs) and vertical movements (VMs) as measures of locomotor activity and central time (CT) as a measure of anxiety.

HMs, VMs and CT of OFS+AMFJ5 and OFS+CGA groups were not significantly different from those of OFSC group. In OFS+AMFJ10, HMs and VMs were significantly decreased ( $p < 0.05$ ) and the CT was significantly increased ( $p < 0.05$ ) compared to the OFSC group. These changes in the open field behavior of OFS+AMFJ10 rats might be due to sedative-anxiolytic effects of the exposure to AMFJ.

## Ефекти на плодов сок от *Aronia melanocarpa* и хлорогенова киселина върху поведението на пренатално третирани плъхове в тест открито поле

Доказано е, че плодовият сок от *Aronia melanocarpa* (AMFJ) и съдържащата се в него хлорогенова киселина (CGA), имат ефекти върху централната нервна система при плъхове. Това проучване имаше за цел да определи ефектите на AMFJ и CGA върху поведението на пренатално изложени плъхове в тест открито поле.

Бременни Wistar плъхове (n=20) бяха разделени на 4 групи: PC (бременна контрола); P+AMFJ5; P+AMFJ10 и P+CGA. Между 14-ия и 20-ия гестационен ден плъховете са третирани веднъж дневно, орално, както следва: PC група – дестилирана вода (10 ml/kg), P+AMFJ5 и P+AMFJ10 групи – AMFJ (5 и 10 ml/kg, съответно) и P+CGA група – CGA (20 mg/kg). Новородените от потомството (OFS) (n=44) са разпределени съответно в следните групи: OFSC, OFS+AMFJ5, OFS+AMFJ10 и OFS+CGA. Беше изследвано поведението на мъжките и женските OFS на 29-дневна възраст в тест открито поле. Записаните индекси бяха: хоризонтални движения (HMs) и вертикални движения (VMs) като мерки за локомоторна активност и централно време (CT) като мярка за тревожност.

HMs, VMs и CT на групите OFS+AMFJ5 и OFS+CGA не се различават значително от тези на групата OFSC. В OFS+AMFJ10 HMs и VMs са значително намалени ( $p<0,05$ ) и CT е значително повишен ( $p<0,05$ ) в сравнение с групата на OFSC. Тези промени в поведението на плъхове OFS+AMFJ10 при тест открито поле може да се дължат на седативно-анксиолитични ефекти от третирането с AMFJ.

10. **Г8.10** Борисова В, **Ефтимов М**, Вълчева-Кузманова С. Анксиолитично-подобни ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест повдигнат кръстосан лабиринт. *Collection of articles from the National Scientific Conference "15 Years of Pharmacy in Medical University – Plovdiv"* 2018: 93-98.

Anxiety is a negative emotional state characterized by a feeling of unfounded fear, psychomotor tension and uncertainty in the presence of a threat. The aim of the present study was to investigate the anxiolytic-like effects of *Chaenomeles maulei* fruit juice on healthy rats in the elevated plus maze test.

32 experimental animals were treated orally, divided into 4 groups of 8 animals each: Controls treated with distilled water and three experimental groups treated with CMFJ at doses of 2.5, 5 and 10 ml/kg for 15 days. 60 min after the last treatment, a test session was conducted. Activity in open, closed arms and total number of entries were recorded for each animal. Increased activity in the open arms is indicative of anxiolytic-like effects.

CMFJ at a dose of 10 ml/kg increased the number of entries into the open arms ( $p<0.05$ ) compared to Control. The highest dose of CMFJ also significantly increased the time animals spent in the open arms compared to the controls ( $p<0.01$ ). The total number of arms entries was increased in all groups compared to the control, and this was statistically significant in the group treated with 10 ml/kg CMFJ ( $p<0.05$ ).

We can conclude that CMFJ at a dose of 10 ml/kg exhibits anxiolytic-like effects, which are accompanied by increased locomotor activity.

### **Анксиолитично-подобни ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* в тест повдигнат кръстосан лабиринт**

Тревожността представлява отрицателно емоционално състояние, характеризиращо се с чувство на необоснован страх, психомоторно напрежение и несигурност в присъствието на заплаха. Цел на настоящето проучване е да изследваме анксиолитично-подобните ефекти на плодов сок от *Chaenomeles maulei* върху здрави плъхове в тест повдигнат кръстосан лабиринт.

Общо 32 експериментални животни са третирани орално, разделени на 4 групи по 8 животни: Контрола, третирани с дестилирана вода и три експериментални групи, третирани с CMFJ в дози от 2,5, 5 и 10 мл/кг в продължение на 15 дни. 60 мин след последното третиране се провежда тестова сесия. За всяко животно се отчитат активност в отворени, затворени рамена и общ брой влизания. Повишена активност в отворените рамена е показател за анксиолитично-подобни ефекти.

CMFJ в доза 10 мл/кг повишава броя влизания в отворените рамена ( $p < 0,05$ ) спрямо Контролата. Също най-високата доза CMFJ води и до значимо удължено време, което животните прекарват в отворените рамена спрямо контролите ( $p < 0,01$ ). Общият брой влизания в рамената е повишен при всички групи спрямо контролната, като това е статистически значимо при групата третирана с 10 мл/кг CMFJ ( $p < 0,05$ ).

Можем да направим заключението, че CMFJ в доза 10 мл/кг проявява анксиолитично-подобни ефекти, които се съпровождат от повишена двигателна активност.

11. **Г8.11** Rafailova E, Gancheva S, Moneva K, Todorova M, **Eftimov M**, Reyzov M, Zhelyazkova-Savova M, Valcheva-Kuzmanova S. Effect of anethole on liver aminotransferases in rats with dietary induced metabolic syndrome. *Сборник с доклади от Национална конференция с международно участие "Природни науки '2020"*, 2-4.10.2020 г., гр. Шумен: 50-54.

Metabolic syndrome (MS) is a global health care problem characterized generally by abnormal obesity, insulin resistance, and hypertension. MS increases the risk of atherosclerotic cardiovascular disease, type 2 diabetes mellitus, chronic kidney disease, and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). ALT (alanine aminotransferase) and AST (aspartate aminotransferase) are reliable determinants of liver function. Anethole is an aromatic compound naturally occurring in the essential oils of anise and fennel. The current study aimed to assess the serum levels of AST and ALT in rats with dietary induced MS treated with anethole in increasing concentrations. Male Wistar rats were allocated into 5 groups ( $n=10$  per group): groups MS, MS+62.5A, MS+125A, MS+250A were receiving a high fat high fructose (HFHF) diet, and the control group (C) – a standard laboratory diet and tap water. Groups MS+62.5A, MS+125A, and MS+250A were treated orally with oily solution of anethole at doses 62.5 mg/kg, 125mg/kg, and 250 mg/kg, respectively. Groups C and MS received the solvent sunflower oil. The duration of treatment was 10 weeks. The results showed that anethole treatment caused an elevation of serum levels of liver

aminotransferases: AST was elevated in group MS+62.5A compared to MS, and ALT – in groups MS+125A and MS+250A compared MS and C. The conclusion of the current study is that anethole might worsen liver function in dietary induced MS in rats.

### **Ефект на анетол върху чернодробните аминотрансферази при плъхове с индуциран от диета метаболитен синдром**

Метаболитният синдром (МС) е глобален здравен проблем, характеризиращ се със затлъстяване, инсулинова резистентност и хипертония. МС повишава риска от атеросклеротични сърдечно-съдови заболявания, захарен диабет тип 2, хронично бъбречно заболяване и неалкохолна мастна чернодробна болест (NAFLD). ALT (аланин аминотрансфераза) и AST (аспартат аминотрансфераза) са надеждни детерминанти на чернодробната функция. Анетолът е ароматно съединение, което се среща естествено в етеричните масла от анасон и копър. Настоящото проучване имаше за цел да оцени серумните нива на AST и ALT при плъхове с диетично индуцирана МС, третирани с анетол в нарастващи концентрации. Мъжки плъхове Wistar бяха разпределени в 5 групи (n=10). Групите MS, MS+62.5A, MS+125A, MS+250A получаваха диета с високо съдържание на мазнини и фруктоза (HFHF), а контролната група (C) – стандартна лабораторна диета и вода. Групите MS+62.5A, MS+125A и MS+250A бяха третирани орално с маслен разтвор на анетол в дози съответно 62.5 mg/kg, 125 mg/kg и 250 mg/kg. Групи C и MS получаваха слънчогледово масло (разтворител за анетола). Продължителността на лечението е 10 седмици. Резултатите показват, че лечението с анетол предизвиква повишаване на серумните нива на чернодробните аминотрансферази: AST е повишен в групата MS+62.5A в сравнение с MS, а ALT – в групите MS+125A и MS+250A в сравнение с MS и C. Заключението на настоящото проучване е, че анетолът може да влоши чернодробната функция при диетично индуциран МС на плъхове.

12. **Г8.12 Eftimov M, Georgieva A, Valcheva-Kuzmanova S. Drug-induced hyperglycemia. *Varna Medical Forum*, 2021; 10(2): 164-71.**

Drug-induced hyperglycemia is a clinically relevant condition which is often underestimated. At the same time, it is frequent because many of the widely used drugs may cause it. High blood sugar levels may damage blood vessels and many organs. The aim of this review was to summarize the available literature data regarding the hyperglycemic effect of the most widely used drug groups. Our survey was performed by searching different web-based databases - Google Scholar, PubMed, etc. We found that the main drug groups, which are involved in cases of hyperglycemia and induction of diabetes are: some hormonal drugs, immunosuppressants, drugs affecting cardiovascular system and central neural system (CNS), antimicrobials and antiasthmatic drugs. Among the hormonal drugs, the most diabetogenic ones appear to be gonadotropin-releasing hormone agonists and glucocorticosteroids. Among the drugs affecting the cardiovascular system, thiazide diuretics, some beta blockers and powerful statins are worth mentioning. From drugs affecting the CNS, antipsychotics are distinguished with the highest risk of hyperglycemia. The most diabetogenic antimicrobial drugs belong to the groups of antiretroviral (nucleoside analogs and protease inhibitors) and fluoroquinolones. Beta-2 agonists are the most common hyperglycemic drugs in the antiasthmatic group. The hyperglycemia induced by all these drugs

may be due to different mechanisms - decreased insulin secretion and induction of insulin resistance, stimulation of glycogenolysis and gluconeogenesis in the liver and muscles, etc. Measures taken to overcome drug-induced hyperglycemia include prescribing medicines at the lowest risk of causing abnormalities in blood sugar levels, monitoring therapy, use of antidiabetic drugs such as metformin, and in severe hyperglycemia - even insulin. In conclusion, drug-induced hyperglycemia is a common problem in clinical practice. Measures are needed to increase the awareness among physicians about this adverse drug reaction and the ways to avoid and control it.

### **Лекарствено-индуцирана хипергликемия**

Лекарствено-индуцираната хипергликемия е клинично значим проблем, който е подценяван, но често срещан при множество от широко използваните лекарства. Повишените нива на кръвната захар могат да причинят увреждане на кръвоносните съдове и органите. Целта на настоящия обзор е да обобщи наличните литературни данни по отношение на хипергликемичния ефект на най-често използваните лекарствени групи. Проучването беше проведено чрез търсене на информация в различни web базирани бази данни – Google Scholar, Pub Med и др. Нашето проучване показва, че основните класове лекарства, асоциирани с хипергликемия и развитие на диабет, са: някои хормонални лекарства, имуносупресори, лекарства, повлияващи сърдечно-съдовата система и централната нервна система (ЦНС), противомикробни и антиастматични. Сред хормоналните лекарства най-силно диabetогенни се оказват агонистите на гонадотропин-освобождаващия хормон и глюкокортикостероидите. Сред лекарствата, повлияващи сърдечно-съдовата система, се открояват тиазидните диуретици, някои бета-блокери и мощните статини. От повлияващите ЦНС с най-висок риск от хипергликемия се отличават антипсихотичните лекарства. Сред противомикробните лекарства най-силно диabetогенни са антиретровирусните нуклеозидни аналози и протеазни инхибитори, както и флуорираните хинолони, а сред антиастматичните – бета-2 агонистите. Хипергликемичния ефект на тези лекарства се обуславя от различни механизми – намалена секреция на инсулин, индуциране на инсулинова резистентност, стимулиране на гликогенолизата и глюконеогенезата в мускулите и черния дроб и др. Мерките, прилагани за преодоляване на лекарствено-индуцираната хипергликемия, включват изписване на лекарства с най-малък риск да предизвикат нарушения в кръвната захарна нива, мониторинг на терапията, използването на антидиабетични лекарства като metformin, а при тежка хипергликемия – дори инсулин. В заключение, лекарствено-индуцираната хипергликемия е често срещан проблем в лечебната практика и са необходими мерки за повишаване на информираността за тази нежелана лекарствена реакция, начините за избягването и контролирането ѝ.

13. **Г8.13 Eftimov M, Hristova L, Valcheva-Kuzmanova S.** A study of the impact of COVID-19 on morbidity and temporary disability in a construction company for the period 2019-2021. *Varna medical forum*, 2023; 12: (online first)

Introduction: The COVID-19 pandemic has affected millions of people around the world. The peak of the disease in Bulgaria was in the period 2020–2021 and had an impact on all economic sectors.

In construction companies, the pandemic has led to fewer employment opportunities, labor shortages, and many postponed or suspended projects.

Materials and methods: The data was collected from certificates for temporary disability of workers in a construction company, with an average listed number of workers between 1317.5 and 1364.5 for a period of three years, from 2019 to 2021. For each year, the total number of primary cases and lost work days were analyzed, as well as their distribution among the groups of occupational diseases. The following indicators were calculated: the frequency of sick employees, the frequency of cases and labor losses due to temporary disability, as well as the frequency of cases and days with temporary disability for the infectious and parasitic diseases (incl. COVID-19) group.

Results and discussion: During each of the analyzed years, there was a low frequency of registered illnesses and labor losses due to temporary disability in the construction company. This means that the COVID-19 recorded in 2020 and 2021 did not significantly affect these general indicators. Infectious and parasitic illnesses (including COVID-19) accounted for 17.1% of all reported disease cases throughout the three-year period and ranked third in the temporary morbidity of the contingent under investigation. In the group of infectious and parasitic diseases, the most were the cases of COVID-19 (74 for the entire period). Due to COVID-19, in 2020 and 2021, a high number of labor loss days were recorded, respectively, 297 and 721.

Conclusions: COVID-19 does not significantly affect the indicators of the frequency of cases and work losses from all diseases, but it occupies a significant part of the morbidity among infectious diseases for the period 2019–2021. The introduction of measures against the disease would decrease the number of cases and, accordingly, labor losses among workers.

### **Проучване на влиянието на КОВИД-19 върху заболяемостта и временната неработоспособност в строителна фирма за периода 2019-2021**

Увод: Пандемията от КОВИД-19 засегна милиони души по света. Пикът на заболяването в България беше през периода 2020–2021 г. и това оказва влияние на всички сектори от икономиката. В строителството пандемията доведе до по-малко възможности за заетост, недостиг на работна ръка и спирането или отлагането на множество проекти.

Материали и методи: Използвани са данните от болничните листи на работещите в строителна фирма със средносписъчен състав между 1317,5 и 1364,5 работници за период от 3 години - от 2019 г. до 2021 г. Анализирани са общият брой на първичните случаи и дните на трудозагуби за всяка година, както и тяхното разпределение по професионални групи заболявания. Изчислени са: честотата на боледувалите работещи, честота на случаите и трудозагубите с временна неработоспособност, както и честотата на случаите и дните с временна неработоспособност за група „Инфекциозни и паразитни болести (вкл. КОВИД-19)“.

Резултати и обсъждане: В строителната фирма за всяка от анализирани години има ниска честота на регистрирани заболявания, както и на трудозагубите с временна неработоспособност. Това означава, че КОВИД-19, регистриран през 2020 и 2021 г., не се е отразил значимо на тези общи показатели. За тригодишния период инфекциозните и



паразитните болести (вкл. КОВИД-19) заемат 17.1% от общия брой случаи регистрирани заболявания и са на трето място във временната заболеваемост на проучвания контингент. В групата на инфекциозните и паразитните болести най-много са случаите на КОВИД-19 - те са 74 за целия период. Поради заболяване от КОВИД-19 през 2020 г. и 2021 г. е регистрирана висока трудозагуба на дни, съответно 297 и 721 дни.

Изводи: КОВИД-19 не повлиява значимо показателите честота на случаите и трудозагубите от всички болести, но заема значителна част от заболеваемостта сред инфекциозните заболявания за периода 2019–2021 г. Въвеждането на мерки срещу заболяването би довело до по-малък брой случаи и съответно до по-малки трудозагуби сред работниците.

14. **Г8.14 Eftimov M, Hristova L, Valcheva-Kuzmanova S.** Retrospective analysis of morbidity and temporary disability in a construction company for the period 2019-2021. *Varna medical forum*, 2023; 12: (online first)

Introduction: Construction company employees are at a higher risk of work-related diseases and occupational injuries.

Materials and methods: The data from primary medical examinations performed at a construction company with an average listed number of 1340 employees for a 3-year period, from 2019 to 2021, was analyzed. The number of primary cases and lost work days for each year of the period were presented, distributed according to age groups and occupational disease classes. The indicators of morbidity and temporary work incapacity were determined and compared with indicative-normative groups according to Batkis-Lekarev.

Results and discussion: More than 49% of the construction company employees were over 45, and the morbidity and labor losses in this age group were the highest. There was a low frequency of registered diseases, a relatively high share of short-term work incapacity, cases of temporary work incapacity, and labor losses. The average duration of a case was high (over 10 days), and the relative share of frequent and long-term work incapacity was low in 2020 and 2021, and at an average level in 2019. Cases under the category „Diseases of the musculoskeletal system and connective tissue“ (DMSSCT) accounted for 23.1% of the total number of cases. Leading among them were the cases due to damage of the intervertebral discs in the lumbar and other segments with radiculopathy, with a frequency of 17.33 on average for the period. In terms of days of temporary work incapacity, the group DMSSCT was the leader with 27.8% of all days of temporary incapacity for work. The majority of labor losses were the result of damage to the intervertebral discs in the lumbar and other spinal segments due to radiculopathy (405.3 on average over the 3-year period).

Conclusions: Employees over 45 years of age had the highest morbidity rate during the period analyzed. The most common occupational diseases they suffered from were those of the musculoskeletal system and connective tissue. The majority of the cases involved damage to the intervertebral discs. The introduction and adherence to measures for safe working conditions, along with the development of an occupational risk assessment program, would definitely help reduce morbidity and temporary work incapacity in the long run.

## Ретроспективен анализ на заболяемостта и временната неработоспособност в строителна фирма за периода 2019-2021

Увод: Работниците в строителни фирми са с повишен риск от свързани с труда заболявания и трудов травматизъм.

Материали и методи: Анализирани са информацията от предоставените първични болнични листи в строителна фирма със средносписъчен състав от 1340 работници за периода от 2019 г. до 2021 г. Представени са броят на първичните случаи и дните на трудозагуби за съответната година, разпределени по възрастови групи и професионални класове заболявания. Определени са показателите на заболяемостта и временната неработоспособност и са сравнени с ориентировъчно-нормативни групи по Баткис-Лекарев.

Резултати и обсъждане: Над 49% от работещите в строителната фирма са във възрастовата група над 45 години като именно при тях са най-големи заболяемостта и трудозагубите. С ниски стойности са показателите честота на регистрираните заболявания, относителен дял на краткосрочна неработоспособност, честота на случаите с временна неработоспособност и честотата на трудозагубите. Средната продължителност на един случай е висока (над 10 дни), а относителният дял на често и дълго боледуващите е нисък за 2020 и 2021 г. и е на средно ниво през 2019 г. На първо място са случаите на болести на костно-мускулната система и съединителната тъкан (БКМССТ) - 23.1% от общия брой. Водещи сред тях са вследствие от увреждане на междупрешленните дискове в поясния и други отдели с радикулопатия, с честота от 17.33 средно за периода. И при дните на временна неработоспособност водещи са БКМССТ с 27.8% от всички дни на временна неработоспособност. Най-много дни на трудозагуби са резултат от увреждане на междупрешленните дискове в поясния и други отдели с радикулопатия - 405.3 средно за трите години.

Изводи: Най-изразена е заболяемостта в групата работници над 45 години, като най-проявени са БКМССТ, с най-много случаи на увреждане на междупрешленните дискове. Въвеждането и спазването на мерки за безопасни условия на труд и разработването на програма за оценяване на професионалните рискове би помогнало да се намали заболяемостта и временната неработоспособност.

15. **Г8.15** Markova N, **Eftimov M**, Valcheva-Kuzmanova S. Cost-effectiveness analysis of active cosmetic complexes used in the treatment of acne tested in an in vivo efficacy test. *Varna medical forum*, 2023; 12: (online first)

Introduction: Acne vulgaris is one of the most common dermatological diseases, affecting about 650 million people worldwide. The development of new anti-acne products is both time- and cost-consuming. The cost-effectiveness analysis enables an economic evaluation of the resources invested and the results obtained.

Aim: The aim of the study is to evaluate the cost-effectiveness of seven new active complexes of natural origin developed for use in cosmetic products for oily and acne-prone skin.

**Materials and methods:** The active complexes were designated as A, B, C, D, E, F, and G. Volunteers with a mild to moderate form of acne, between 18 and 60 years of age, applied various cosmetic products with the active complexes for a period of 2 to 8 weeks. Their skin condition was assessed by a dermatologist, both at the beginning and at the end of their treatment. A cost-effectiveness analysis was performed by determining the average cost per unit outcome and calculating an incremental cost-effectiveness ratio (ICER).

**Results:** The cost per unit of effect (1% skin condition improvement) in euros was calculated for each of the active complexes. The calculation was based on the percentage content of the active ingredient necessary to obtain the maximum effect for the corresponding period of application. The cost-effectiveness ratio (CER) has the lowest value of 0.0028 EUR for alternative C, that dominates over the others. The rest of the active complexes are in the following order: B > F > E > G > D > A. After calculating the ICER, the highest added value was observed when comparing complex A with C (0.2405 EUR for an additional 1% improvement) and the lowest when comparing F with D (0.00031 EUR for an additional 1% improvement).

**Conclusion:** The analysis of the results shows that in a test for in vivo efficacy in acne, the most “cost-effective” solution is active complex C (based on avocado oil). According to the cost-effectiveness analysis, it could be considered a cost-effective alternative to the other active complexes.

### **Анализ разход-ефективност на активни козметични комплекси за лечение на акне, тествани в ин виво тест за ефикасност**

**Увод:** Акне вулгарис (acne vulgaris) е едно от най-разпространените дерматологични заболявания, засягащо около 650 милиона души по света. Създаването на един нов продукт срещу акне е свързано с много време и разходи. Анализът разход-ефективност дава възможност за икономическа оценка на вложените ресурси и постигнатите резултати.

**Цел:** Целта на проучването е да се сравнят по анализа разход-ефективност седем нови активни комплекси от природен произход, разработени за влагане в козметични продукти за мазна и предразположена към акне кожа.

**Материали и методи:** Активните комплекси са обозначени като А, В, С, D, E, F и G. Доброволци с лека до умерена форма на акне, на възраст между 18 и 60 години, прилагат от 2 до 8 седмици козметични продукти с активните комплекси. В началото и в края на третирането състоянието на кожата е оценено от дерматолог. Извършен е анализ разход-ефективност, като е определен средният разход за единица резултат (CER) и е изчислено инкрементално съотношение разход/ефективност (ICER).

**Резултати:** Разходът за единица ефект (1% подобряване на състоянието) в евро е изчислен за всеки от активните комплекси въз основа на процентното съдържание на активната съставка, необходима за получаване на максимален ефект, за съответния период на приложение. Съотношението разход-ефективност (CER) е с най-ниска стойност 0.0028 EUR за алтернатива С и тя доминира над останалите, следвана от останалите активни комплекси в следния порядък: B>F>E>G>D>A. След изчисляване на ICER най-висока добавена стойност се наблюдава при сравняване на комплексите А и С - 0,2405 EUR за допълнителен %

подобрене, а най-ниска - при сравняване на F с D (0,00031 EUR за допълнителен % подобрене).

**Заклучение:** Анализът на резултатите показва, че в тест за ин виво ефикасност при акне най-ефективно решение спрямо разхода е активен комплекс С (на базата на масло от авокадо). Според анализа разход-ефективност той би могъл да се смята за стойностно ефективна алтернатива спрямо останалите активни комплекси.

### **Пълнотекстови публикации в научни списания и сборници, извън минималните наукометрични изисквания за заемане на АД „доцент“**

1. 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): 31-6.

**INTRODUCTION:** Chronic, low-grade inflammation plays a critical role in the pathogenesis of the metabolic syndrome (MS). *Aronia melanocarpa* fruits are rich in biologically active compounds - polyphenols, which possess a variety of health benefits including an anti-inflammatory effect.

**AIM:** The aim of this article is to evaluate the effect of polyphenol-rich *Aronia melanocarpa* fruit juice (AMFJ) on carrageenan-induced acute inflammation in rats with diet-induced MS. **MATERIALS AND METHODS:** Forty male Wistar rats were included in the experiment. They were allocated into 4 groups: MS, MS+AMFJ2.5, MS+AMFJ5, and MS+AMFJ10, all receiving high-fat high-fructose diet and 10% fructose in the drinking water for 10 weeks. The MS group served as a control and was treated daily with distilled water orally, while the other groups received AMFJ at doses of 2.5 mL/kg, 5 mL/kg, and 10 mL/kg, respectively. At the end of the experiment, carrageenan was injected in the left hind paw in order to induce acute inflammation. Paw edema was evaluated with plethysmometer on the 30 th min and 1st, 2 nd, 3rd, 4 th, and 5th hour after the injection.

**RESULTS:** In the MS group, the carrageenan-induced paw edema increased gradually with time reaching the highest value on the 5th hour. A decrease throughout the whole 5-hour period was observed in groups treated with AMFJ, the effect being most pronounced and statistically significant in MS+AMFJ5 group on the 2nd and 3rd hour.

**CONCLUSION:** *Aronia melanocarpa* fruit juice treatment in rats with MS resulted in a decrease in the carrageenan-induced paw inflammation. The anti-inflammatory effect might be attributed to the polyphenols in AMFJ.

### **Ефект на плодов сок от *Aronia melanocarpa* върху индуциран от карагенан оток на лапа при плъхове с метаболитен синдром**

**ВЪВЕДЕНИЕ:** Хроничното нискостепенно възпаление играе критична роля в патогенезата на метаболитния синдром (МС). Плодовете на *Aronia melanocarpa* са богати на биологично

активни съединения - полифеноли, които притежават различни ползи за здравето, включително противовъзпалително действие.

ЦЕЛ: Целта на това проучване е да оцени ефекта на богатия на полифеноли плодов сок от *Aronia melanocarpa* (AMFJ) върху индуцирано от карагенан остро възпаление при плъхове с индуциран от диета МС.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ: В експеримента са включени четиридесет мъжки плъхове Wistar. Те бяха разпределени в 4 групи: MS, MS+AMFJ2.5, MS+AMFJ5 и MS+AMFJ10, всички получаващи диета с високо съдържание на мазнини и фруктоза и 10% фруктоза в питейната вода в продължение на 10 седмици. MS групата служи като контрола и се третира ежедневно с дестилирана вода перорално, докато другите групи получават AMFJ в дози съответно 2,5 mL/kg, 5 mL/kg и 10 mL/kg. В края на експеримента карагенан се инжектира в лявата задна лапа, за да се предизвика остро възпаление. Отокът на лапата беше оценен с плетизмометър на 30-та минута и 1-ви, 2-ри, 3-ти, 4-ти и 5-ти час след инжектирането.

РЕЗУЛТАТИ: В групата с MS, предизвиканият от карагенан оток на лапата се увеличава постепенно с времето, достигайки най-високата стойност на 5-ия час. Намаляване през целия 5-часов период се наблюдава при групите, третирани с AMFJ, като ефектът е най-изразен и статистически значим в групата MS+AMFJ5 на 2-рия и 3-тия час.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Третирането с плодов сок на *Aronia melanocarpa* при плъхове с МС води до намаляване на индуцираното от карагенан възпаление на лапата. Противовъзпалителният ефект може да се дължи на полифенолите в AMFJ.

2. Rafailova E, Gancheva S, **Eftimov M**, Reyzov M, Moneva K, Todorova M, Zhelyazkova-Savova M, Valcheva-Kuzmanova S. Effect of anethole on visceral obesity and serum triglycerides and cholesterol levels in rats on a high-calorie diet. *Varna medical forum*, 2021; 10(3): 27-32.

Obesity is a disorder of high prevalence and social significance. Anethole is an aromatic compound found in anise and fennel essential oils. It produces antioxidant, anti-inflammatory and other beneficial effects. The aim of this study was to evaluate the effect of anethole, administered in increasing concentrations, on visceral adiposity and serum lipids in rats on a high-calorie diet (HCD). Fifty male Wistar rats were allocated into 5 groups: control, HCD, HCD+62.5A, HCD+125A, and HCD+250A. The HCD groups received a high-fat high-fructose diet and 10% fructose solution, and the control group received a standard laboratory diet and tap water. The HCD+62.5A, HCD+125A, and HCD+250A groups were treated daily orally with anethole dissolved in sunflower oil in a volume of 3 mL/kg at doses of 62.5 mg/kg, 125 mg/kg, and 250 mg/kg, respectively. The control and HCD groups received the solvent in the same volume and route of administration. The duration of the experiment was 10 weeks. At its end, blood samples were taken for biochemical tests and visceral adipose tissue was weighed. The results were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test with the statistical program GraphPad Prism 5.0. The visceral obesity index was significantly increased ( $p < 0.05$ ) in all groups receiving HCD except for HCD+250A. There was no significant increase in plasma triglycerides and cholesterol in the HCD group compared to the control one. Anethole treatment did not change significantly the triglyceride and cholesterol levels compared to these of the HCD group. Anethole

treatment affected beneficially the development of visceral obesity and did not change significantly serum triglyceride and cholesterol levels in rats receiving a high-calorie diet.

### **Ефект на анетола върху висцералното затлъстяване и серумните нива на триглицериди и холестерол при плъхове на висококалорична диета**

Затлъстяването е нарушение с висока честота и социална значимост. Анетолът е ароматно съединение, което се открива в състава на етеричните масла от анасон и копър. Той притежава антиоксидантни, противовъзпалителни и други благоприятни ефекти. Целта на изследването е да се оцени ефектът на анетола, прилаган в нарастващи концентрации, върху висцералното затлъстяване и серумните липиди при плъхове на висококалорична диета (ВКД). Изследването е проведено върху 50 мъжки Wistar плъха, разпределени в 5 групи: контрола, ВКД, ВКД+62.5А, ВКД+125А, ВКД+250А. ВКД групите са приемали висококалорична диета и 10%-ен разтвор на фруктоза, а контролната група – стандартна лабораторна диета и питейна вода. Групи ВКД+62.5А, ВКД+125А и ВКД+250А са третираны всекидневно перорално с анетол, разтворен в слънчогледово олио в обем 3 ml/kg, в дози съответно 62.5 mg/kg, 125 mg/kg и 250 mg/kg. Групи контрола и ВКД са получавали разтворителя в същия обем и път на приложение. Продължителността на експеримента е 10 седмици, след което е взета кръв за биохимични изследвания и е претеглена висцералната мастна тъкан. Резултатите са анализирани с еднофакторен вариационен анализ (One-way ANOVA), последван от пост тест на Dunnett със статистическата програма GraphPad Prism 5.0. Вариационният анализ установява, че индексът на висцералната мастна тъкан е значимо повишен ( $p < 0.05$ ) във всички групи, получаващи ВКД с изключение на ВКД+250А. В група ВКД няма значимо повишаване на плазмените триглицериди и холестерол спрямо контролата. Третирането с анетол не променя значимо нивата на триглицеридите и холестерола в сравнение с тези на група ВКД. Третирането с анетол повлиява благоприятно висцералното затлъстяване и няма значим ефект върху серумните нива на триглицеридите и холестерола при плъхове, получаващи висококалорична диета.