

2024



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

ФАКУЛТЕТ „МЕДИЦИНА“

КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И КЛИНИЧНА ФАРМАКОЛОГИЯ И ТЕРАПИЯ

ЕЛИС РАФАИЛОВА ГАСАНЗАДЕЕВА

**ФАРМАКОЛОГИЧНИ ПРОУЧВАНИЯ С АНЕТОЛ В
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА ЗАТЛЪСТЯВАНЕ**

АВТОРЕФЕРАТ

За присъждане на образователна и научна степен

“ДОКТОР”

**По докторска програма „Фармакология (вкл. фармакокинетика и
химеотерапия)“**

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

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрен съвет на Катедрата по фармакология и клинична фармакология и терапия при Медицински университет – Варна, състояло се на 30.04.2024 г., и е насочен за публична защита пред Научно жури в състав:

- 1. Доц. д-р Силвия Ганчева Маринова, д.м.*
- 2. Проф. д-р Иванка Илиева Костадинова, д.м*
- 3. Доц. д-р Мария Делчева Желязкова-Савова, д.м*
- 4. Доц. д-р Диана Илиева Пендичева-Духленска, д.м.*
- 5. Доц. маг. фарм. Мирослав Цонков Ефтимов, д.м.*

Дисертационният труд съдържа общо 157 страници, онагледен е с 40 фигури и 27 таблици. Книгописът включва 309 заглавия на латиница и 2 на кирилица.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 12.07.2024 г. от 14.00 ч. в онлайн платформа на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна.

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

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

COX-2 – циклооксигеназа-2

MAO-A – моноаминооксидаза-A

HbA1c- гликиран хемоглобин

hASC – human adipose-derived stem cells

NO - азотен оксид

PGE2- простагландин E2

PI3K/Akt/mTOR- phosphatidylinositol 3/ serine-threonine protein B (PKB or AKT) /mammalian target of rapamycin

ИТМ- индекс на телесна маса

LDL (low-density lipoprotein) – холестерол в липопротеините с ниска плътност

HDL (high-density lipoprotein) – холестерол в липопротеините с висока плътност

FDA (Food and Drug Administration) – Американска Агенция по храните и лекарствата

СК-MB – MB фракция на ензима креатинкиназа

PC1 – прохормон конвертаза 1

POMC – проопиомеланокортин

AST – аспартат аминотрансфераза

ALT – аланин аминотрансфераза

AP – алкална фосфатаза

HbA1c – гликиран хемоглобин

SOD – супероксид дисмутаза

MDA – малондиалдехид

TBARS – вещества, реагиращи с тиобарбитурова киселина

ГТТ - глюкозо-толерансен тест

СЗО – Световна здравна организация

VSG – вертикална ръкавна гастректомия

RYGB – стомашен байпас Roux-en-Y

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	9
III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	11
1. Материали.....	11
1.1. Опитни животни.....	11
1.2. Анетол.....	11
2. Методи.....	11
2.1. Индуциране на затлъстяване и третиране.....	11
2.2. Изчисляване на калориен и флуиден прием и наддаване на телесно тегло....	12
2.3. Поведенчески методи.....	12
2.3.1. Тест открито поле (ТОП)	13
2.3.2. Тест за социално взаимодействие (ТСВ)	13
2.3.3. Тест за принудително плуване (ТПП)	14
2.3.4. Тест за разпознаване мястото на предмети (ТРМП).....	14
2.4. Фракциониране на тъкани и органи, и приготвяне на органни хомогенати...15	
2.4.1. Получаване на кръвен серум.....	15
2.4.2. Изолиране на органи.....	15
2.4.2. Приготвяне на тъканни хомогенати.....	15
2.5. Биохимични и клинико-лабораторни тестове.....	15
2.5.1. Глюкозо-толерантен тест (ГТТ) и определяне на нивата на глюкозата в кръвен серум.....	15
2.5.2. Изследване нивата на триглицериди	16
2.5.3. Изследване нивата на холестерол	16
2.5.4. Определяне на чернодробни ензими в серум.....	16
2.5.5. Определяне на вещества, реагиращи с тиобарбитуровата киселина в серум и тъканни хомогенати.....	17
2.5.6. Определяне на нивата на супероксид дисмутаза (СОД) в серум	17

2.5.7. Определяне на времето на кръвосъсирване.....	17
2.6. Определяне на тъканни индекси.....	17
2.6.1. Определяне на индекси на мезентериална, паранефрална, перигонадна, ретроперитонеална и обща мастна тъкан.....	18
2.6.2. Определяне на чернодробен индекс.....	18
2.7. Хистологични методи.....	18
2.8. Имунохистохимични методи.....	18
2.9. Индуциране на остро възпаление на задна лапа.....	19
2.10. Статистически методи.....	19
IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	20
1. Ефекти на анетол върху телесното тегло, приема на калории и течности.....	20
1.1. Резултати.....	20
1.2. Обсъждане.....	23
2. Ефекти на анетол върху поведението в модел на затлъстяване.....	25
2.1. Ефекти на анетол в тест открито поле.....	25
2.2. Ефекти на анетол в тест за социално взаимодействие.....	27
2.3. Ефекти на анетол в тест за принудително плуване.....	28
2.4. Ефекти на анетол в тест за разпознаване на мястото на предмети.....	30
2.5. Обсъждане.....	31
3. Ефект на анетол върху биохимични и клиничко-лабораторни показатели.....	34
3.1. Ефект на анетол върху показатели на метаболизма.....	34
3.1.1. Кръвна глюкоза в хода на глюкозо-толерантен тест.....	34
3.1.2. Липиден профил.....	38
3.1.3. Време на кръвосъсирване.....	39
3.1.4. Обсъждане.....	40
3.2. Ефекти на анетол върху показатели на антиоксидантната защита и оксидативния стрес.....	45
3.2.1. Серумни нива на супероксид дисмутаза (СОД)	45
3.2.2. Нива на вещества, реагиращи с тиобарбитурова киселина (TBARS) в серум и хомогенат от мозък.....	46

3.2.3.Обсъждане.....	48
4. Ефекти на анетол върху мастната тъкан.....	50
4.1. Мастнотъканни индекси.....	50
4.2. Хистология на ретроперитонеална мастна тъкан.....	54
4.3. Имунохистохимия на ретроперитонеална мастната тъкан.....	55
4.3.1.Експресия на BAX.....	55
4.3.2.Експресия на BCL-2.....	57
4.3.3.Съотношение BAX/BCL-2.....	59
4.3.4.Експресия на MAC387.....	60
4.4. Обсъждане.....	62
5. Ефекти на анетол върху миокард и коронарни съдове.....	67
5.1. Хистология на миокард.....	67
5.2. Хистология на коронарен съд.....	68
5.3. Ефекти на анетол върху нивата на вещества, реагиращи с тиобарбитурова киселина (TBARS) в тъканен хомогенат от сърце	69
5.4. Обсъждане.....	71
6. Ефекти на анетол върху черен дроб	71
6.1. Телго на черен дроб и чернодробен индекс.....	72
6.2. Ефекти на анетол върху нивата на вещества, реагиращи с тиобарбитурова киселина (TBARS) в тъканен хомогенат от черен дроб	73
6.3. Чернодробни ензими (AST, ALT, AP)	73
6.4. Хистология на черен дроб.....	75
6.5. Имунохистохимия на черен дроб.....	77
6.5.1.Експресия на BAX.....	77
6.5.2.Експресия на BCL-2.....	79
6.5.3.Съотношение BAX/BCL-2.....	81
6.5.4.Експресия на MAC387.....	82
6.6. Обсъждане.....	83
7. Ефекти на анетол върху карагенан-индуциран оток на задна лапа.....	87
7.1. Резултати.....	87

7.2. Обсъждане.....	88
V. ИЗВОДИ.....	92
VI. ПРИНОСИ.....	96
VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	97

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Затлъстяването е глобален проблем с характер на епидемия и нарастваща честота в днешно време. Генетични, социално-икономически и ендокринни фактори, а също така подлежащо заболяване или медикаментозна терапия се разглеждат като подлежащи причини за появата му. Състоянието е не само естетически непривлекателно, но е и сериозен медицински проблем, като повишава риска от развитие на сърдечносъдови заболявания, диабет, инфертилитет, невродегенеративни и когнитивни заболявания, карцином и други (Britannica. 2024). Затлъстяването и съпътстващите го заболявания водят до значителни разходи за здравеопазване, поради заболяемостта, смъртта и намалената производителност, които причинява. То влияе на различни възрастови групи, включително деца, юноши и възрастни от двата пола (World Health Organization. Obesity). Управлението на затлъстяването изисква комбинация от промени в начина на живот и медикаментозно лечение. Намаляване на телесното тегло с 5-10% дава многобройни предимства по отношение на сърдечносъдовото и метаболитното здраве. Макар и рядко подходяща, може да се използва и бариатричната хирургия. Увеличаването на теглото след спиране на лечението не е рядко срещано. Екстрактите от лечебни растения набират голяма популярност като терапия за отслабване. Фитохимичните продукти се използват от дълго време за профилактика и лечение на хронични заболявания. Необходими са обаче допълнителни изследвания за тяхната ефективност, дългосрочна безопасност, подходяща доза и странични ефекти (Esteghamati et al., 2015).

По данни на Световната здравна организация 80% от хората получават основните си медицински грижи от традиционната медицина чрез използване на растителни екстракти или техните активни компоненти. Ароматните растения се използват в традиционната медицина за множество заболявания. В тях са открити голям брой активни фитохимикали, включително флавоноиди, терпеноиди, лигнани, полифеноли, кумарини и други. Всъщност много лекарства са с растителен произход – резерпин, салицилова киселина, сена, дигиталисови гликозиди, паклитаксел и други (Craig. 1999). Хранителната промишленост е поставила като приоритет търсенето на естествени вещества като заместител на синтетичните хранителни добавки. Поради тази причина

ароматните растения със своите благоприятни ефект върху здравето намират все по-широко приложение в производството на храни. Хранително-вкусовата промишленост използва значителното хранително съдържание и силния антиоксидантен капацитет на тези вещества. Различни екстракти от лечебни и ароматни растения, за които е научно доказано, че осигуряват ползи за здравето, се включват в хранителни композиции. Голямото наличие на биоактивни вещества в тях и икономически изгодния им добив като източници ги правят удобно използвани в минимално преработени хранителни продукти (Dikme, 2023). Досега само единично проучване разглежда ефектите на монотерпена анетол при затлъстяване (Noreen et al., 2023). Това налага необходимостта от последващи проучвания относно ефектите на ароматното съединение върху индуцираните от затлъстяването здравни последици.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛТА на настоящия дисертационен труд беше да се изследват и обобщят фармакологичните ефекти на анетол, приложен перорално в нарастващи дози при плъхове в модел на затлъстяване, индуцирано от висококалорична диета (ВКД).

За изпълнението на тази цел си поставихме следните ЗАДАЧИ:

1. Да се предизвика затлъстяване при здрави експериментални животни чрез приложение на висококалорична диета (ВКД) в продължение на 10 седмици.
2. В така получения модел да затлъстяване да се изследват ефектите на анетол върху:
 - 2.1. Телесното тегло
 - 2.2. Калорийния и флуиден прием
 - 2.3. Поведението, анализирайки данни за:
 - 2.3.1. Общата двигателна активност
 - 2.3.2. Тревожността
 - 2.3.3. Депресивно-подобното поведение
 - 2.3.4. Пространствената памет
 - 2.4. Биохимични и клинико-лабораторни показатели:
 - 2.4.1. Кръвна глюкоза
 - 2.4.2. Серумни триглицериди
 - 2.4.3. Серумен холестерол
 - 2.4.4. Чернодробни ензими – аспартат аминотрансфераза (AST), аланин аминотрансфераза (ALT), алкална фосфатаза (AP)
 - 2.4.5. Време на кръвосъсирване
 - 2.5. Показатели на антиоксидантна защита и оксидативен стрес:
 - 2.5.1. Супероксид дисмутаза (СОД) в серум
 - 2.5.2. Вещства, реагиращи с тиобарбитуровата киселина (TBARS) в серум и тъканни хомогенати от мозък, черен дроб и сърце
 - 2.6. Тъканни индекси:

- 2.6.1. Маснотъканни индекси (на ретроперитонеална, мезентериална, перигонадна, паранефрална и тотална масна тъкан)
- 2.6.2. Чернодробен индекс
- 2.7. Хистология на черен дроб, ретроперитонеална масна тъкан, миокард и коронарни съдове
- 2.8. Имунохистохимични маркери за апоптоза/антиапоптоза и възпаление в черен дроб и ретроперитонеална масна тъкан
- 2.9. Карагенан-индуцирано остро възпаление на задна лапа.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. *Опитни животни*

Опитите са проведени върху 50 мъжки Wistar плъха, отглеждани във Вивариума на Медицински университет Варна при стандартни лабораторни условия, във вентилирани помещения със стайна температура 20-25°C и 12-часов светлина-тъмнина цикъл, настанени в стандартни пластмасови клетки. Експериментите са проведени в съответствие с националните и международни закони и политики, основани на Европейската директива за защита на животните в науката (2010/63/EC) и етично одобрени от Българската агенция по безопасност на храните (Документ No 177/07.07.2017 г.).

1.2. *Анетол*

В настоящия експеримент опитните животни са третирани с експерименталното вещество: Анетол (Sigma-Aldrich, Germany), който представлява бистра, безцветна до кехлибарена течност със специфичен анасонов аромат сладък и вкус. Плътността на анетол е 0.99 g/cm³ при 20 °C, а молекулно тегло - 148.21 g/mol. Експерименталното вещество е високо разтворимо в етанол и слабо разтворимо във вода. Като разтворител в настоящия експеримент се използва слънчогледово олио.

2. Методи

2.1. *Индукване на затлъстяване и третиране*

Животните са разпределени в 5 групи по 10 на брой: контрола, ВКД, ВКД+62.5А, ВКД+125А и ВКД+250А. В продължение на 10 седмици животните от контролната група (К) са приемали стандартна лабораторна гранулирана храна за плъхове и обикновена питейна вода, а ВКД групите – висококалорична диета. Тя е с повишено съдържание на животински мазнини (17%) и прости захари (17%) и се получава чрез обогатяване на стандартните гранули със свинска мас и фруктоза. В допълнение, питейната вода е заменена с 10%-ен разтвор на фруктоза при животните от ВКД групите (Gancheva et al., 2015b). Енергийното съдържание на стандартната гранулирана диета е 279 kcal/100 g, а на

висококалоричната – 405 kcal/100 g, като животните приемат и допълнителни 40 kcal на всеки 100 ml консумиран фруктозен разтвор. Групите ВКД+62.5А, ВКД+125А и ВКД+250А са третирани всекидневно с анетол в дози съответно 62.5 mg/kg, 125 mg/kg и 250 mg/kg. Анетолът е прилаган перорално чрез мека сонда, разтворен в слънчогледово олио, в обем от 0.3 ml/100 g телесно тегло по едно и също време сутрин в 8 часа. Групи контрола и ВКД са сондирани всекидневно с разтворителя, прилаган в същия обем. Опитните животни са евтаназирани под обща етерна анестезия 24 часа след последното третиране.

Обобщени данни за диетата и третирането на експерименталните животни са представени на **Таблица 1**.

Таблица 1. Експериментален протокол; ВКД- висококалорична диета- свинска мас 17% и фруктоза 17% към стандартните гранули; 10% фруктоза към водата за пиене.

Група	Диета	Перорално третиране (10 седмици)				
		ВКД	Анетол 62.5 mg/kg	Анетол 125 mg/kg	Анетол 250 mg/kg	Слънчогледово олио
Контрола	√					√
ВКД		√				√
ВКД+62.5А		√	√			
ВКД+125А		√		√		
ВКД+250А		√			√	

2.2. Изчисляване на калориен и флуиден прием, и наддаване на телесното тегло

Известно количество храна (измерено в грамове) се дава на плъховете със свободен достъп, като на всеки 3 дни се претегля останалото количество храна. Изчислява се приемът на храна в грамове на плъх за всеки 3 дни и накрая се изчислява среден прием на храна за плъх за целия период на третирането. Приемът на калории се изчислява чрез

превръщане на приетата храна и фруктозна течност в калории, въз основа на известните ни данни за кароличност. Приемът на течности също се следи на всеки 3 дни и се изчислява подобно на приетата храна.

Телесното тегло на животните е измервано всяка седмица. Наддаването на телесното тегло в грамове е изчислено по следната формула : крайно телесно тегло – първоначално телесно тегло. Наддаването на телесното тегло в проценти е изчислено по следната формула : $[(\text{крайно телесно тегло} - \text{първоначално телесно тегло}) / \text{Първоначално телесно тегло}] * 100$.

2.3. Поведенчески методи

2.3.1. Тест открито поле (ТОП)

Тест открито поле се използва широко за изследване на изследователското поведение и общата активност на гризачи (Crusio et al., 2001). Откритото поле се състои от затворена дървена арена с размери 100×100×40 см. Подът е разграфен на еднакви по размер квадрати със синя линия с размери 20×20 см. Плъхът се поставя в центъра на арената и му е позволено да я изследва в продължение на 5 минути. Това се извършва за всяко едно животно, като резултатите се отчитат мануално. Като мярка за двигателна активност се отчитат броят на хоризонталните движения (квадратите, които животното прекосява с четирите си лапи) и вертикалните движения (брой повдигания на задни лапи, включително подпирането до стените на полето с предни лапи) (Belovicova et al., 2017).

2.3.2. Тест за социално взаимодействие (ТСВ)

Тестът за социално взаимодействие се провежда на същата квадратна арена, използвана за тест открито поле. Той служи за определяне нивото на тревожност при гризачите (File et al., 1978). Всеки плъх се тества с неизвестен партньор от друга клетка, с който не се различават по третиране и телесно тегло с повече от 10%. Двойката плъхове се поставят в противоположните ъгли на арената и се наблюдават в продължение на 5 мин. Отчита се времето, прекарано в активно социално взаимодействие (подушване, оправяне на козината, преследване, покачване върху или пълзене под партньора), което е обратно пропорционално на нивото на тревожност. Времето, прекарано в пасивно взаимодействие

(в седнало или легнало положение в контакт с партньора) не се счита за социално взаимодействие.

2.3.3. Тест за принудително плуване (ТПП)

Това е често използван тест за определяне наличието на депресивно поведение. Тестът се състои от две сесии – тренировъчна и тестова сесия, проведени в два последователни дни през 24 часа. Плъховете се поставят в прозрачен стъклен цилиндър (с диаметър 17 cm и височина 50 cm), напълнен с вода (температура 21 ± 1 °C) до ниво 30 cm, което не позволява животните да се подпират с опашка или лапа до дъното. Тренировъчната и тестовата сесия са по 5 минути. Наличието/липсата на движения в цилиндъра се отчитат мануално, като се анализират резултатите само от тестовата сесия. Времето, през което животните са неподвижни и не се опитват да избягат от водата, се счита за показател на депресивно поведение (Slattery et al., 2012). Намаляването на времето на неподвижност от дадено експериментално вещество се тълкува като проява на антидепресивен ефект (Slattery et al., 2012).

2.3.4. Тест за разпознаване мястото на предмети (ТРМП)

Тестът е модификация на теста за разпознаване на нови обекти, като цели да оцени пространствената памет (Vogel-Ciernia et al., 2014). Тестът е проведен в правоъгълна дървена арена, която е част от арена за тест открито поле, с размери 65 x 45 cm, оградена от 40-сантиметрови стени. По този начин животните вече са запознати с арената, което направи ненужна специална сесия за привикване. Тестът се състои от 2 сесии – тренировка и тестова сесия, всяка от които продължава по 3 минути. Тренировката се провежда с два идентични предмета (паралелепипеди, прикрепени към пода без възможност за преместване), поставени симетрично. Времето, прекарано в ориентиране на носа на животното към обекта от разстояние 1 cm или по-малко, активно приближаване и подушване на обекта, катерене по обекта (но не и седене върху него), се счита за изследване. Между животните, арената и предметите са почиствани със 70% етанол. Тестовата сесия е проведена 30 минути след тренировката. По време на тестовата сесия един от обектите се премества на място, различно от това в тренировъчната сесия. Записва се продължителността на времето, прекарано в изследване на обекта с новото

местоположение (Б) и обекта с познатото местоположение (А). Индексът на разпознаване $B/(A + B)$ е изчислен като съотношение между времето Б и общото време на изследване (А + Б) по време на тестовата сесия и е използван като мярка за пространствена памет.

2.4. Фракционироване на тъкани и органи, и приготвяне на органични хомогенати

2.4.1. Получаване на кръвен серум

В края на експеримента, след анестезиране на опитните животни с диетилов етер, е взета кръв от подезичните вени, събирана е в епруветки и е центрофугирана при 2000 x g rpm за 10 min. Отделеният серум е съхраняван при минус 20 °C до момента на биохимичните анализи.

2.4.2. Изолиране на органи

След декапитализация на опитните животни е отпрепарирана мастната тъкан - мезентериална, паранефрална, перигонадна, ретроперитонеална – и отделните фракции са претеглени. Изчислена е общата мастна тъкан. Отпрепарирани са черният дроб, сърцето и мозъка. Черният дроб е претеглен. Проби от черен дроб, сърце и ретроперитонеална мастна тъкан са фиксирани за хистологично изследване, а черен дроб и ретроперитонеална мастна тъкан - и за имунохистохимично изследване. Проби от мозъчна, сърдечна и чернодробна тъкан са замразени за тъканни хомогенати.

2.4.3. Приготвяне на тъканни хомогенати

От мозъчна, сърдечна и чернодробна тъкан са приготвени хомогенати за биохимични изследвания. Тъканите са хомогенизирани с помощта на ледено студен Tris/HCl, 50 mM, pH 7.4 в съотношение 1:5 за мозък и 1:10 за черен дроб и сърце. Хомогенатите са центрофугирани (2000 rpm, 10 min, 4 °C). Използвани са супернатантите.

2.5. Биохимични и клинично-лабораторни тестове

2.5.1. Глюкозо-толерантен тест (ГТТ) и определяне на нивата на глюкозата в кръвен серум

Глюкозо-толерантният тест е проведен посредством интраперитонеално инжектиране на опитните животни с 40%-ен разтвор на глюкоза в доза 2 g/kg. Кръвната захар е изследвана с глюкомер ACCU-CHEK Performa и тест ленти ACCU-CHEK Performa.

Кръвните проби са взети чрез инцизия в дисталния край на опашката по метода на Fluttert (Fluttert et al., 2000) непосредствено преди инжектирането с глюкоза и 30, 60 и 90 минути след това.

2.5.2. Изследване нивата на триглицериди

Нивата на триглицеридите са измерени в кръвен серум с използване на стандартни китове (BioMaxima S.A., Poland) според инструкциите на производителя. При този метод триглицеридите се хидролизират от липопротеинлипаза до глицерол и мастни киселини. Глицеролът се фосфорилира с АТР от глицеролкиназа, при което се получава глицерол-3-фосфат и аденозин дифосфат. Глицерол-3-фосфатът се окислява от глицеролкиназата до дихидроксиацетонфосфат и водороден пероксид. Последният се свързва с 4-хлорофенол и 4-аминоантипирин, в резултат на което се получава оцветен комплекс. Интензивността на цвета на получения комплекс се измерва фотометрично при дължина на вълната 500 nm и е пропорционална на концентрацията на триглицеридите. Използван е спектрофотометър AURIUS 2021 (Cecil Instruments Ltd., UK).

2.5.3. Изследване нивата на холестерол

Нивата на холестерола са изследвани в кръвен серум със стандартни китове (BioMaxima S.A., Poland) според инструкциите на производителя. При този метод холестероловите естери се хидролизират от холестеролестеразата до холестерол и свободни мастни киселини. Свободният холестерол се окислява от холестеролоксидаза, при което се освобождава водороден пероксид. Той се свързва с 10-фенол и 4-аминоантипирин, при което се получава оцветен комплекс. Интензивността на цвета на получения комплекс се измерва фотометрично при дължина на вълната 500 nm и е пропорционална на концентрацията на холестерола. Използван е спектрофотометър AURIUS 2021 (Cecil Instruments Ltd., UK).

2.5.4. Определяне на чернодробни ензими в серум

Измерени са серумните нива на аспартат аминотрансфераза (AST) и аланин аминотрансфераза (ALT) чрез колориметрични комплекти Qumica Clinica Aplicada S.A.,

Полша, а алкална фосфатаза (AP) - Biomaxima S.A., Полша. Чернодробните ензими са измерени спектрофотометрично. Резултатите са изразени като единици на литър (U/l).

2.5.5. Определяне на вещества, реагиращи с тиобарбитуровата киселина (TBARS) в серум и тъканни хомогенати

Те служат като маркер за липидна пероксидация, количествено определени са в мозъчна, сърдечна и чернодробна тъкан. Измерването на TBARS е извършено колориметрично (спектрофотометър CE2021, Cecil Instruments Ltd, UK) при дължина на вълната 532 nm, следвайки процедурата, описана от Ohkawa et al., 1979. Този подход определя количествено абсорбцията на цвета, генериран от реакцията между тиобарбитурова киселина и липидни пероксиди. Нивата на TBARS са измерени в nmol/g тъкан. Референтният стандарт е малондиалдехид (МДА), основният продукт, получен от мембранни мастни киселини по време на тяхното пероксидиране.

2.5.6. Определяне на нивата на супероксид дисмутаза (СОД) в серум

Активността на антиоксидантния ензим е измерена с помощта на кит (Boster Biological Technology Co., Ltd.) за ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) и е извършена, спазвайки инструкциите на производителя, използвайки BioTek 800 TS четец за микроплаки. Комплектът съдържа тетразолова сол за идентифициране на супероксидни радикали, произведени от ксантин оксидаза и хипоксантин. Една единица СОД се определя като количеството ензим, необходимо за предизвикване на 50% дисмутация на супероксидния радикал. Активността на СОД се измерва в U/ml.

2.5.7. Определяне на времето на кръвосъсирване

Показателят е измерен мануално, като се отчита времето от стартиране на реакцията до образуването на фибринополомер, измерено в секунди. Представява израз на иницирирането на коагулационната система, образуването на тромбин и първия фибринополимер.

2.6. Определяне на тъканни индекси

2.6.1. Индекси на мезентериална, паранефрална, перигонадна, ретроперитонеална и обща мастна тъкан

След евтаназирането на опитните животни мезентериалната, паранефралната, перигонадната и ретроперитонеалната мастна тъкан са отпрепарирани, отделните фракции са претеглени, изчислена е общата мастна тъкан. Изчислен е индекса на затлъстяване, изразен като процент от общото телесно тегло чрез индекса на общата мастна тъкан по следната формула: $\text{тегло мастна тъкан (г)} / \text{общо телесно тегло (г)} \times 100$. Матнотъканните индекси са изчислени по формулата: $\text{мастно депо (г)} / \text{общо телесно тегло (г)} \times 100$.

2.6.2. Определяне на чернодробен индекс

Чернодробният индекс е изчислен по формулата: $\text{тегло черен дроб (г)} / \text{общо телесно тегло (г)} \times 100$.

2.7. Хистологични методи

За хистологично изследване са използвани тъканни късчета от ретроперитонеална мастна тъкан, черен дроб, миокард и коронарен съд, които са фиксирани в 10% неутрален формалин. Обработването на материала става чрез дехидратация с алкохол и включване в парафин. Оцветяването е с хематокселин /еозин.

2.8. Имунохистохимични методи

За имунохистохимично изследване е използван мини KIT high Ph DAKO K8024 техника за индиректна имунопероксидаза. За да се осигурят отрицателни контроли, резени от парафиновите блокове се инкубират с нормален неимунен серум вместо с първичното антитяло. Универсалната високочувствителна система за визуализация за откриване на антитела EnVision FLEX се използва за оценка на имунохистохимичната експресия на проапоптотичния маркер BAX, антиапоптотичен маркер BCL-2 и провъзпалителния маркер MAC387, чрез използване на заешки поликлонални антитела срещу BAX (Santa Cruz Biotechnology, sc-6236) и BCL-2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-492) и мише моноклонално антитяло срещу MAC387 (Santa Cruz Biotechnology, sc-66204). И трите маркера са в разреждане 1:50.

Имунохистохимичната експресия на BAX и BCL-2 и MAC387 е оценена полуколичествено чрез определяне на експресията на поле, състоящо се от минимум петдесет клетки от всяка проба. За черен дроб интензивността на цитоплазмената

експресия е оценена като : 0 липсва реакция, 1+ слаба позитивност, 2+ умерена позитивност или 3+ силна позитивност. Изчисляването на експресията на маркерите в мастната тъкан е различна, поради периферното разположение на ядрата и наличие на големи цитоплазмени липидни включвания. То се определя като: 0 - липсва реакция или позитивна 1+ в зависимост от отсъствието или наличието на интрануклеарни имунни депозити. Определено е съотношението BAX/BCL-2 за всяка група и са сравнени стойностите между групите.

2.9. Индуциране на остро възпаление на задна лапа

В края на периода на лечение е инжектирана доза от 1 mg карагенан в плантарната повърхност на лявата задна лапа на плъховете. Карагенанът се прилага като пряко произведен разтвор в 0,9% физиологичен разтвор, за да се генерира остра възпалителна реакция. Обемите на лапите (в милилитри) са измерени в различни времеви точки: преди инжектиране, на 30-та минута и на 1-ви, 2-ри, 3-ти, 4-ти и 5-ти час след инжектирането. Измерванията са направени с помощта на цифров плетизмометър LE7500 Panlab, Барселона. Разликата в обема на лапите преди и след инжектирането е пряко пропорционална на интензивността на причиненото възпаление. Изчисляването на отока на лапите (в милилитри) е извършено по следната формула: Отокът на лапите се изчислява по формулата $V_s - V_0$, където V_s представлява обема на лапата, измерен на шест интервала от време след инжектирането на карагенан, а V_0 представлява първоначалния обем на лапата.

2.10. Статистически методи

Данните са представени като средна стойност $\pm$ стандартна грешка (SEM) и са анализирани чрез Student's t-test, тест за линеарна зависимост, еднофакторен вариационен анализ (One-way ANOVA), последван от пост тест на Dunnet. За обработка на данните от кръзната глюкоза в хода на глюкозо-толерантния тест е използван двуфакторен вариационен анализът Two-way ANOVA, последван Bonferroni пост. Ниво на $p < 0.05$ е считано за значимо. Използван е статистически софтуер GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Ефект на анетол върху телесното тегло, калориен и флуиден прием

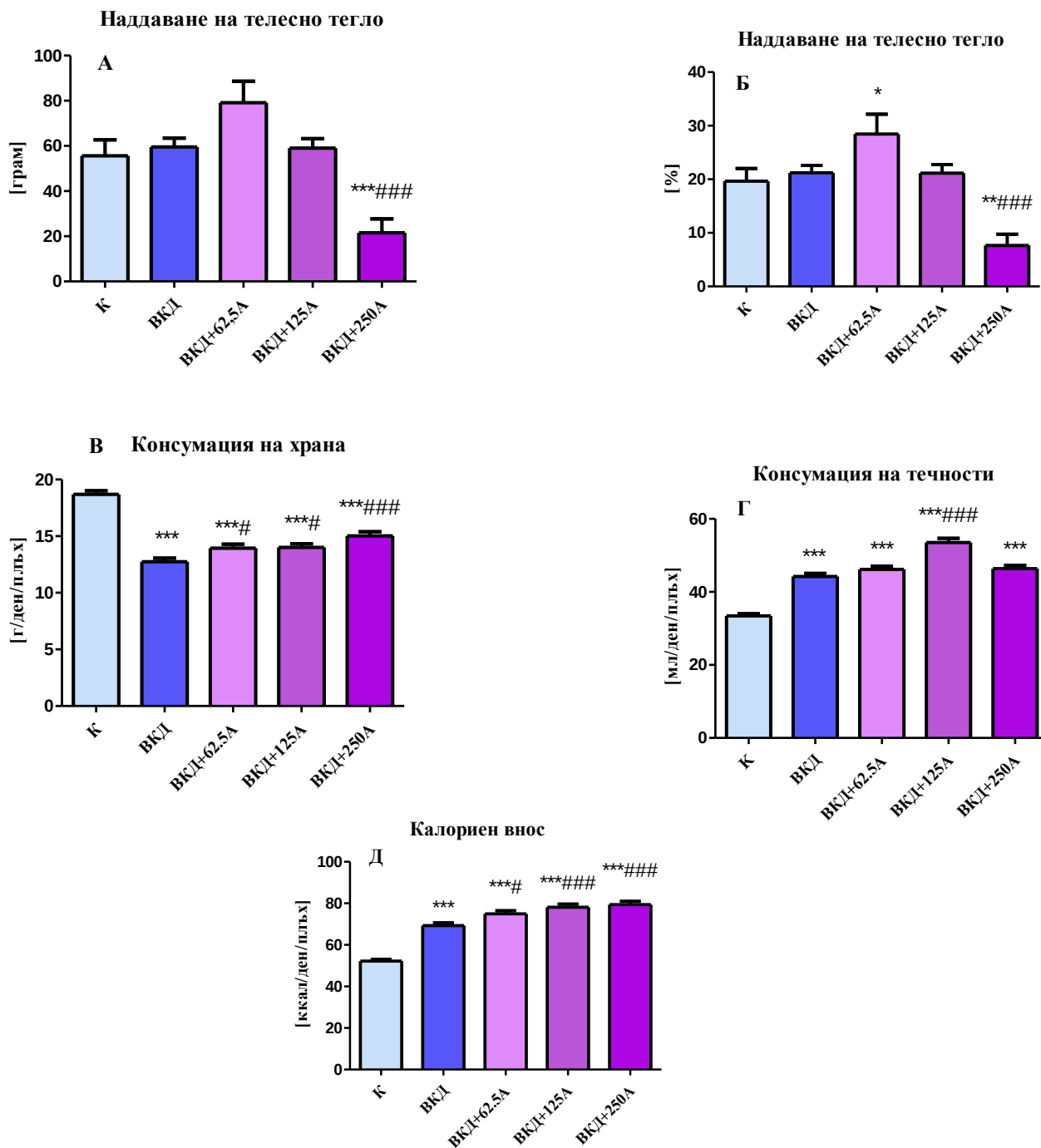
1.1. Резултати

Резултатите са представени на Таблица 1 и Фигури 1 и 2.

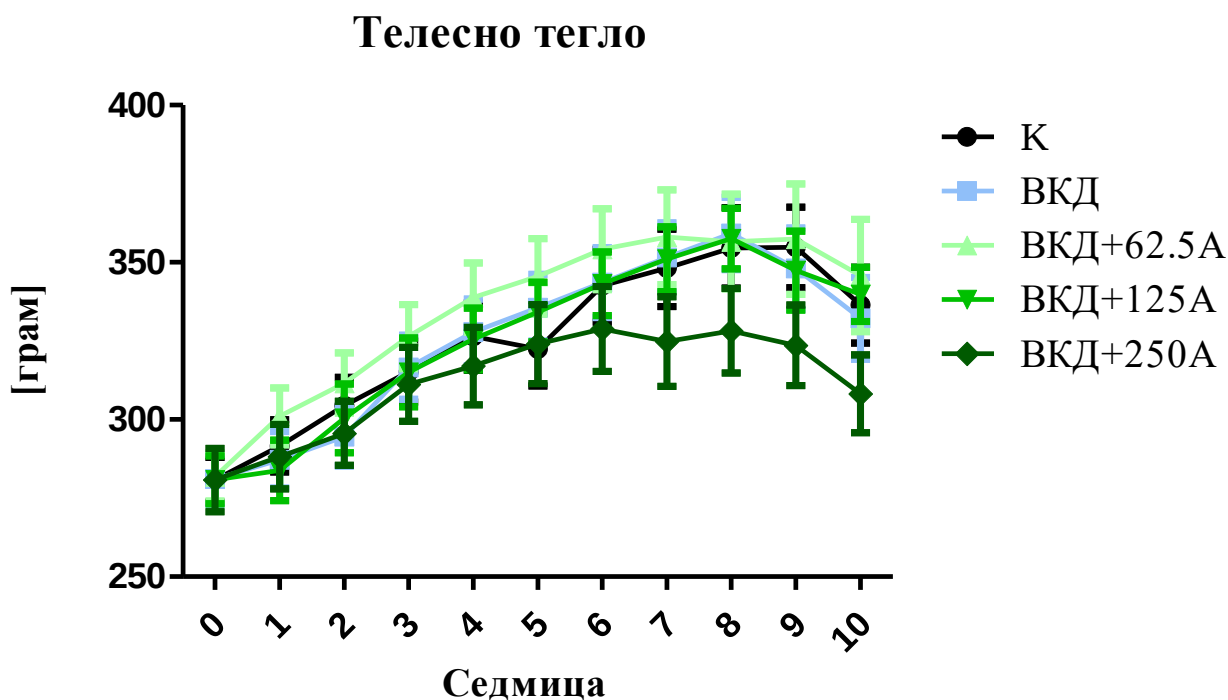
В настоящия експеримент ВКД не промени значимо крайното телесно тегло на опитните гризачи, като не се наблюдава промяна в наддаването на телесното тегло като абсолютна стойност и като процент от изходното. Резултатите са на фона на понижена консумация на храна в грамове ($p < 0,001$), но повишен калориен внос и повишени течности ($p < 0,001$). Третирането с анетол във всички дози не променя крайното телесно тегло, но високата доза възпрепятства наддаването на телесно тегло спрямо група ВКД ($p < 0,001$). Третирането с анетол повишава консумацията на храна значимо ($p < 0,001$) спрямо група ВКД във всичките си дози: $p < 0,05$ за ВКД+62.5А и ВКД+125А и $p < 0,001$ за ВКД+250А, като ефектът е определен за концентрация-зависим от пост-теста за линеарен тренд ($P < 0.0001$). Флуидният прием също е повишен от приема на анетол от доза 125 mg/kg в спрямо група ВКД ($p < 0,001$). Консумацията на калории е значимо повишена при анетол-третираните групи в сравнение с група ВКД: $p < 0,05$ за ВКД+62.5А, $p < 0,01$ за ВКД+125А и $p < 0,001$ за ВКД+250А. Пост-тестът за линеарен тренд установява дозо-зависимин ефект на анетола ($P < 0.0001$).

Таблица 2. Биологични параметри, свързани с енергийния метаболизъм при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M.; *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ спрямо контролната група (К); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ спрямо ВКД

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Изходно телесно тегло (г)	280.8 $\pm$ 7.2	281.0 $\pm$ 7.9	281.8 $\pm$ 7.7	280.8 $\pm$ 7.6	280.8 $\pm$ 10.1
Крайно телесно тегло (г)	336.4 $\pm$ 12.0	332.2 $\pm$ 13.0	360.0 $\pm$ 12.1	339.8 $\pm$ 8.6	308.2 $\pm$ 12.4
Наддаване на телесно тегло (г)	55.6 $\pm$ 7.1	59.6 $\pm$ 3.9	79.1 $\pm$ 9.5	59.0 $\pm$ 4.2	21.6 $\pm$ 6.1 ***###
Наддаване на телесно тегло (% от изходното)	19.7 $\pm$ 2,3	21.2 $\pm$ 1.4	28.5 $\pm$ 3.7*	21.1 $\pm$ 1.6	7.6 $\pm$ 2.1 **###
Консумация на храна (г/ден/плъх)	18.70 $\pm$ 0.3	12.73 $\pm$ 0.3 ***	13.94 $\pm$ 0.4 ***#	14.01 $\pm$ 0.3***#	15.02 $\pm$ 0.4 ***###
Консумация на течности (мл/ден/плъх)	33.43 $\pm$ 0.6	44.21 $\pm$ 0.8 ***	46.18 $\pm$ 0.9 ***	53.51 $\pm$ 1.1 ***###	46.37 $\pm$ 0.9 ***
Калориен внос (ккал/ден/плъх)	52.17 $\pm$ 0.9	69.26 $\pm$ 1.4 ***	74.93 $\pm$ 1.5 ***#	78.17 $\pm$ 1.4 ***###	79.38 $\pm$ 1.6 ***###



Фигура 1. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (БКД) в дози 62.5 mg/kg (БКД+62.5A), 125 mg/kg (БКД+125A) и 250 mg/kg (БКД+250A), върху надаването на телесното тегло (измерено в грамове и като процентно съотношение (А и Б), консумацията на храна (В), течности (Г) и калориен внос (Д); *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ спрямо контролната група (К); # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ спрямо БКД



Фигура 2. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху промяната на телесната маса по седмици.

1.2. Обсъждане

След 10 седмици диета с високо съдържание на мазнини и фруктоза плъховете от група ВКД не показаха значимо увеличение на телесното тегло в сравнение с контролата. Други проучвания също достигат до извода, че приложението на тази диета в продължение на 16 седмици при младите плъхове не показва значимо увеличение на телесното тегло (Marija et al., 2023). Намаленото съдържание на протеини във високомастна високофруктозната диета може да не задоволява физиологичните изисквания, което води до намаляване на растежа на младите животни (Even et al., 2021). Също така се наблюдава значимо намаляване на средната консумация на храна във ВКД групата на фона на повишен калориен прием в сравнение с контролната група на обичайната диета. Това води до заключението, че дори диетата, която консумират, да е по-калорична, общото количество приета храна не е достатъчно, за да предизвика увеличаване на телесното

тегло. Проучвания с диети с високо съдържание на мазнини и високо съдържание на фруктоза с 45% мазнини и 30% или 15% разтвор на фруктоза са с по-нисък среден дневен прием. Въпреки това се наблюдава увеличение на приема на калории, телесното тегло, както и на мазнините при тези животни. От друга страна, 60-дневната фруктозна диета не води до увеличаване на телесната маса при 30-дневни мъжки плъхове Wistar в сравнение с плъхове на нормална диета, както се съобщава от De Castro et al. (2013).

Приложението на анетол не повлиява телесното тегло при отитните плъхове, но се наблюдава намаляване на наддаването на телесно тегло от високите дози анетол. Други проучване също установяват подобни резултати, а именно, че добавянето на транс-анетол не оказва съществено влияние върху средния дневен прираст, телесното тегло и съотношението храна/прираст при бройлери. Средната дневна консумация на фураж е значимо увеличена (Yu et al., 2021). Както копърът, така и транс-анетолът намаляват нивата на кръвната захар и интензивността на загуба на тегло при плъхове с индуциран диабет (Samadi-Noshahr et al., 2020). Също така са наблюдавани намаляване приема на храна и вода (Samadi-Noshahr et al., 2020). Други проучвания показват противоположни ефекти на анетол спрямо телесното тегло. Прилагането на анетол предотвратява загубата на тегло на животните с болест на Паркинсон по време на лечението, което най-вероятно е свързано с антиоксидантните му свойства върху стомашно-чревния тракт и способността му да подобрява храносмилането и абсорбцията (Moradi Vastegani et al., 2023a). Установено е, че телесното тегло е намалено при животните с диабетна нефропатия. Наблюдава се увеличение на телесното тегло на животните, третирани с екстракт богат на анетол (Vellapandian et al., 2022). Приемът на транс-анетол в дози от 105 до 550 mg/kg телесно тегло на ден в различни концентрации (от 0.25 до 1%) води до преходно намаляване на телесното тегло при плъхове (Truhaut et al., 1989). Imbabi et al. показват, че в сравнение с нетретираната група добавянето на масло от копър, съдържащо 75% анетол повишава ($p < 0,05$) телесното тегло на зайци в 8 и 12 седмици и средния дневен прираст (Imbabi et al., 2021). Анетолът води до намаляване на телесното тегло на плъхове с висок холестерол след 6-седмично третиране (Noreen et al., 2023). Субкутното лечение с анетол в доза от 30 mg/kg дневно не повлиява телесното тегло или поведението на третираните мишки (Massimiliano et al. 2007).

Дехидратацията води до заболявания като топлинен удар, но също така повишава вероятността от развитие на камъни в бъбреците, хронично бъбречно заболяване, инфекции на пикочните пътища, сърдечно-съдови нарушения и метаболитни заболявания. Умерената дехидратация оказва влияние както върху настроението, така и върху когнитивните способности (Nakamura Y, 2020). В настоящия експеримент анетол в средни дози повишава приема на течности, без това да повлиява на общото телесно тегло. Анетол повишава консумацията на храна и количеството приети калории в текущото проучване. Същият резултат се наблюдава и при инхалацията на вещества, съдържащи фенилпропаноидни структури. Етерично масло от кърпи или отделни негови съставки (трансцинамалдехид, евгенол и транс-анетол) увеличават апетита и количеството консумирана храна при мишки (Ogawa et al., 2016). Според Hur et al. при плъхове инхалацията на етерично масло от копър не повлиява нито наддаването на телесно тегло, нито количеството на приемана храна (Hur et al, 2006). Според Bae et al., разглеждащи ефекта на копъра върху апетита при жени с наднормено тегло, приемът на чай от копър преди хранене потиска субективното чувство за глад и увеличава усещането за ситост, макар че не променя количеството на консумирана храна (Bae et al., 2018). Подобно потискане на апетита е установено и от Kim et al. (2005) като подлагат жени със затлъстяване на ароматерапия с етерично масло от копър.

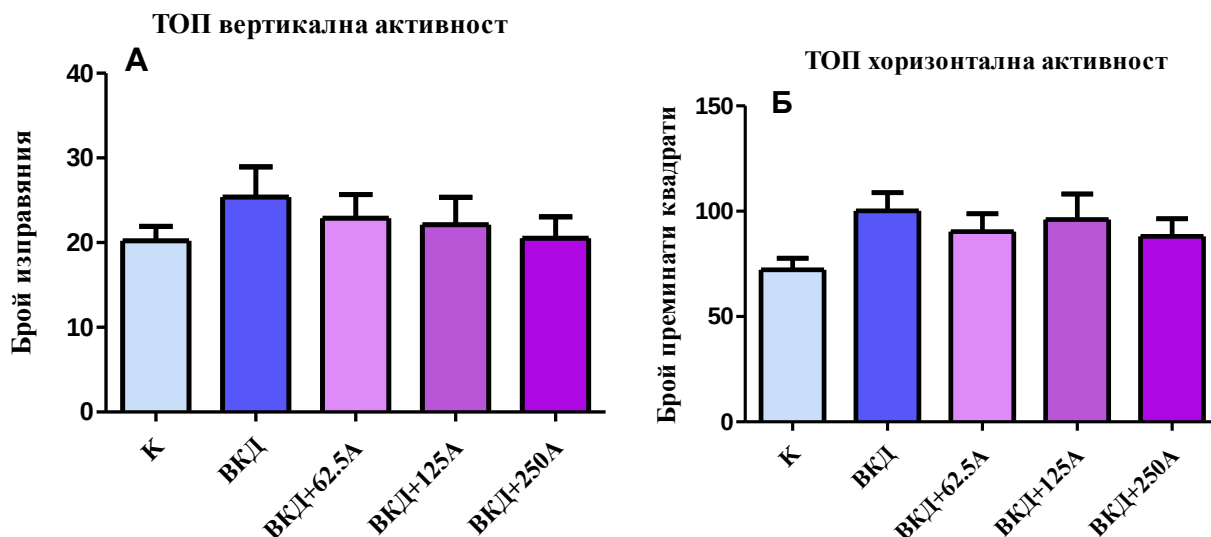
2. Ефект на анетол върху поведението в модел на затлъстяване

2.1. Тест открито поле (ТОП)

Фигура 3 и **Таблица 3** представят промените в броя прекосени квадрати в арената при ТОП, използвани за оценка на хоризонталната двигателна активност и промените в броя на изправянията на гризачите, даващи информация за верикалната активност. Еднофакторният вариационен анализ не показва значим ефект на третирането върху хоризонталната активност: $F(4,43) = 1.342$, $P = 0.2701$. Не се установява статистически значима промяна и при вертикалната двигателна активност след третирането с анетол на опитните животни: $F(4,45) = 0.5457$, $P = 0.7030$.

Таблица 3. Брой хоризонтални и верикални движения в тест открито поле при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M.

Показател Група	Хоризонтална активност (брой прекосени линии)	Вертикална активност (брой изправяния)
К	72.2 $\pm$ 5,48	20,2 $\pm$ 5,45
ВКД	100,2 $\pm$ 8,57	25,4 $\pm$ 11,23
ВКД+62.5А	90,3 $\pm$ 8,55	22,9 $\pm$ 8,84
ВКД+125А	96,1 $\pm$ 12,05	22.1 $\pm$ 10,27
ВКД+250А	88.0 $\pm$ 8.45	20.5 $\pm$ 8,03



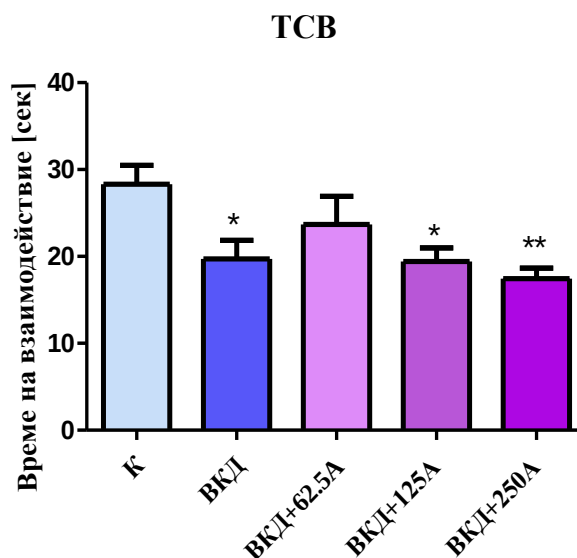
Фигура 3. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху вертикалните (А) и хоризонталните (Б) движения в тест открито поле (ТОП).

2.1. Ефект на анетол в тест социално взаимодействие (ТСВ)

Както е показано на **Фигура 4** и **Таблица 4**, висококалоричната диета намалява времето на взаимодействие между плъховете (19.71 ± 2.15 сек) в сравнение с контролата (28.32 ± 2.18 сек) при статистическа значимост $p < 0.05$. Ниската доза анетол 62.5 mg/kg предотвратява този ефект, като времето на взаимодействие между плъховете от група ВКД+62.5А не се различава значимо от това на контролата (23.69 ± 3.22 сек). Времето на взаимодействие между плъховете от група ВКД+125А е 19.41 ± 1.57 сек, а това на група ВКД+250А е 17.44 ± 1.19 сек. Така времето на социално взаимодействие в тези групи не се различава значимо от това на група ВКД и остава значимо по-ниско от това на контролата ($p < 0.05$ за група ВКД+125А и $p < 0.01$ за група ВКД+250А).

Таблица 4. Време, измерено в секунди, за социално взаимодействие при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M. * $p < 0.05$ спрямо контролата (К); ** $p < 0.01$ спрямо контролата (К)

Група Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Продължителност на социално взаимодействие (секунди) (mean $\pm$ SEM)	28,3 $\pm$ 2,2	19,7 $\pm$ 2,1 *	23,7 $\pm$ 3,2	19,4 $\pm$ 1,6 *	17,4 $\pm$ 1,2 **



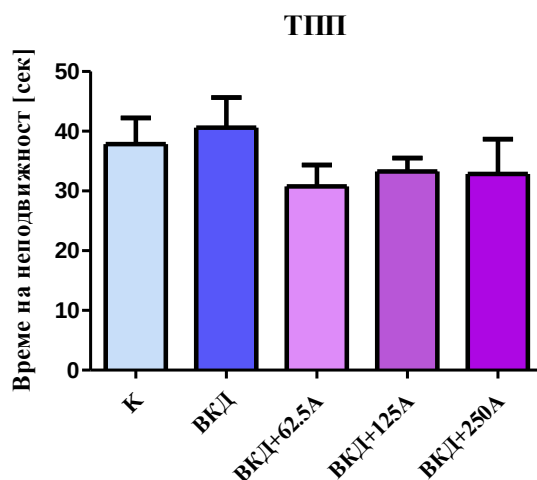
Фигура 4. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху времето за взаимодействие между животните в тест за социално взаимодействие (ТСВ); * $p < 0.05$ спрямо контролата (К); ** $p < 0.01$ спрямо контролата (К)

2.3. Ефекти на анетол в тест принудително плуване (ТПП)

Данните на **Фигура 5** и **Таблица 5** за ТПП, които са анализирани чрез one-way ANOVA, разкриват тенденция за намаляване продължителността на неподвижост при анетол-третирните групи, без статистическа значимост [$F(4,42) = 0.7794$, $P = 0.5449$]. Тази тенденция вероятно не се дължи на намалена двигателна активност, тъй като в ТОП не се наблюдава такава. Следователно тенденцията за намаляване на времето на неподвижност може да се счита за проява на антидепресивен ефект.

Таблица 5. Време, измерено в секунди, прекарано в имобилност при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M.

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Време на имобилност (секунди) (mean $\pm$ SEM)	37.85 $\pm$ 4.36	40.6 $\pm$ 5.06	30.75 $\pm$ 3,62	33,28 $\pm$ 2.24	32.85 $\pm$ 5.86



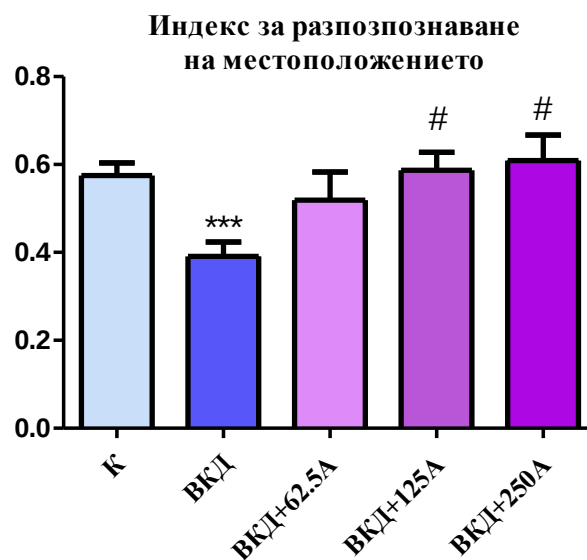
Фигура 5. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху времето на неподвижност в тест за принудително плуване (ТПП)

2.4. Ефект на анетол в тест за разпознаване на мястото на предмети

Students's t-test показва значимо намаление ($p < 0.001$) на индекса на разпознаване в групата на ВКД (0.39 ± 0.033) в сравнение с контролната група (0.57 ± 0.028), представен на **Таблица 6 и Фигура 6**. Значителен ефект от третирането с анетол върху пространствената памет е показан чрез ANOVA ($F = 3.802$, $P = 0.0182$). Пост-тестът на Dunnet показва значимо по-висок индекс на разпознаване на местоположението в групите ВКД+125А (0.59 ± 0.041) и ВКД+250А (0.61 ± 0.058) в сравнение с групата на ВКД (0.39 ± 0.033), $p < 0.05$. Пост-тестът за линеарен тренд установява значим зависимост от концентрацията ефект на анетола ($P = 0.0028$). Индексът на разпознаване на местоположението при всички групи, третирани с анетол, не се различава значимо от този на контролната група (ANOVA: $F = 0.5806$, $P = 0.6318$).

Таблица 6. Стойности на индекса за разпознаване на местоположението от теста за разпознаване на мястото на обекта при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; *** $p < 0.001$ спрямо контролната група (К); # $p < 0.05$ спрямо ВКД

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
B/(A+B) (mean $\pm$ SEM)	0.57 ± 0.03	0.39 ± 0.03 ***	0.52 ± 0.06	0.59 ± 0.04 #	0.61 ± 0.06 #



Фигура 6. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А) върху индекса за разпознаване на местоположението в тест за разпознаване на мястото на обекта. *** $p < 0.001$ спрямо контролната група (К); # $p < 0.05$ спрямо ВКД.

2.5. Обсъждане

Промени в двигателната активност или седация са важни поведенчески състояния, които трябва да се вземат под внимание при интерпретиране на резултатите от други поведенчески тестове.

В достъпната литература се открива единични експериментални изследвания на ефекти на анетол в модел на затлъстяване, въпреки известното му благоприятно влияние върху затлъстяването. Според наличната документация, настоящото проучване е първото, търсещо ефектите на анетол, прилаган в нарастващи дози, върху двигателната активност и пространствената памет при плъхове, получаващи висококалорична диета. В потвърждение на получения резултат в настоящото проучване, Ritter et al също отчитат отсъствието на промяна в локомоцията в тест открито поле при третирането на плъхове с различни дози анетол (Ritter et al., 2014). Hassanzadeh et al. отразяват същия резултат при NMRI мишки, третирани с транс-анетол в дози 25 mg/kg и 50 mg/kg интраперитониално (Hassanzadeh et al., 2022). Приложението на анетол в продължение на 21 дни при Swiss

albino мишки също не променя локомоцията (Dhingra et al., 2019). Подобен е и резултатът при приложението на есенциално масло от копър със съдържание 82.08% анетол интраперитонеално при Albino мишки в дози 100–400 mg/kg (Abbasi-Maleki et al., 2021).

Тревожните разстройства, които засягат една осма от световното население, са основен обект на психофармакологичните изследвания. Висцералното затлъстяване при хората води до голяма вероятност от развитие на тревожни-депресивни заболявания и когнитивно увреждане (Tang et al., 2021; Fulton et al., 2022). Представени са много психодинамични, психоаналитични, поведенчески, когнитивни, генетични и биологични хипотези за обяснение на разнородната етиология на тревожните разстройства (Shri et al., 2010). Настоящият експеримент показва, че анетол в доза 62.5mg/kg предотвратява развитието на тревожност при опитните животни на висококалорична диета, докато в дози 125 и 250 mg/kg не показва подобен ефект. Niksokhan et al. наблюдават при плъхове анксиолитичен ефект на 250 и 300 mg/kg хидроалкохолен екстракт от семената на *Pimpinella anisum*, чийто основен компонент е анетол (Niksokhan et al., 2015). *In vivo* проучване показва, че метанолов екстракт от плодове на *Illicium verum* (китайски звездовиден анасон), приложен в доза 200 mg интраперитонеално при плъхове, има анксиолитично действие (Chouksey et al., 2013). Масло от копър, прилагано в доза 0.5 ml/ден в продължение на 3 седмици, показва значителен анксиолитичен ефект при плъхове (Perveen et al., 2017). При проучване, проведено с 60 жени след менопауза, приемът на копър не показва значимо понижение на тревожността и депресията (Ghazanfarpour et al., 2017).

Проведеното изследване разкрива, че приложението на ВКД води до незначимо повишаване на времето на неподвижност. Приложението на анетол показва тенденция за намаляване времето на неподвижност, даващо информация за антидепресивен ефект. В друго проучване транс-анетолът предизвиква значителна антидепресивна активност при мишки без стрес и изложени на стрес, като за вероятен механизъм се смята инхибицията на мозъчната моноаминооксидаза-А и намаляване на оксидативния стрес. В допълнение, антидепресивният ефект на транс-анетола (25 mg/kg) е сравним с този на антидепресанта флуоксетин (Dhingra et al., 2019). Антидепресантния ефект на етерично масло от копър в дози 100–400 mg/kg при мишки се описва от Abbasi-Maleki et al., 2021. Многократното

приложение на масло от копър в обем 0.5 ml/ден със съдържание 60-90% транс-анетол може да има антидепресивен ефект, сравним с този на флуоксетин (Perveen et al., 2017). Hassanzadeh и съавт. също доказват антидепресивния ефект на транс-анетол 25 mg/kg и 50 mg/kg (Hassanzadeh et al., 2022). Авторите откриват също така, че прилагането на допаминови антагонисти на животните, третирани с анетол значително инхибира антидепресантния му ефект в теста за принудително плуване. Това откритие дава информация, че допаминергичната система може да играе роля в антидепресант-подобното действие на анетол (Hassanzadeh et al., 2022).

Експериментални животни, които консумират диета с високо съдържание на калории, са с нарушена пространствената памет и развиват тревожност (Reyzov et al., 2019). В настоящото проучване ВКД индуцира увреждане на пространствената памет и намалява антиоксидантните защитни механизми при експерименталните животни. Множество доказателства сочат, че затлъстяването е свързано с увреждане на паметта и оксидативен стрес. Heyward et. al. установяват, че затлъстяването, индуцирано чрез диета, води до спад на пространствената памет, която е зависима от хипокампуса, но паметта за разпознаване на обекти не е засегната (Heyward et al., 2016). Счита се, че инсулиновата резистентност уврежда хипокампалната физиологична функция и синаптичната пластичност (Stranahan et al., 2008). Тази констатация осигурява връзката между пространствената памет и затлъстяването. Друг основен механизъм на когнитивен спад е намаляването на хипокампалия мозъчен невротрофичен фактор (Stranahan et al., 2008).

В настоящото проучване третирането с анетол подобрява увреждането на пространствената памет по доза-зависим начин. Продължителността на третирането (9 седмици) е достатъчно дълга, за да може ароматното съединение да упражни своя ефект за подобряване на пространствената памет. Подобряващите паметта и невропротективните свойства на анетола са демонстрирани в редица проучвания (Marinov and Valcheva-Kuzmanova, 2015). Анетолът е ключово съединение на *Shanzhuyu* (китайска билка), за което е доказано, че регулира отлагането на амилоид, оксидативния стрес и апоптозата чрез регулиране на сигналните пътища, участващи в патогенезата на болестта на Алцхаймер (Qu et al., 2020). Анетол като един от основните компоненти на *Uncaria rhynchophylla* се счита за потенциален кандидат за бъдещо антиамнезно лекарство, тъй

като е доказано, че подобрява паметта при тестове като воден лабиринт на Морис и пасивно избягване (Shin al., 2013). В хармония с предишното твърдение, лечението с анетол в доза от 250 mg/kg подобрява когнитивната дисфункция, индуцирана от ротенон, както при тест за разпознаване на нови обекти, така и при пасивния тест за избягване (Vastegani et al., 2023). Приложението на транс-анетол в доза 50 mg/kg в продължение на 14 дни подобрява потенциала за запазване на паметта при плъхове с модел на болестта на Хънтингтън (Rajan et al., 2016). Индуцираното от триметилтин хлорид увреждане на дългосрочно потенциране (LTP) може да бъде овладяно от транс-анетол чрез действие върху N-метил-D-аспартат (NMDA) рецептора (Chang et al., 2022).

3. Ефект на анетол върху биохимични и клинично-лабораторни показатели

3.1. Ефект на анетол върху показатели на метаболизма

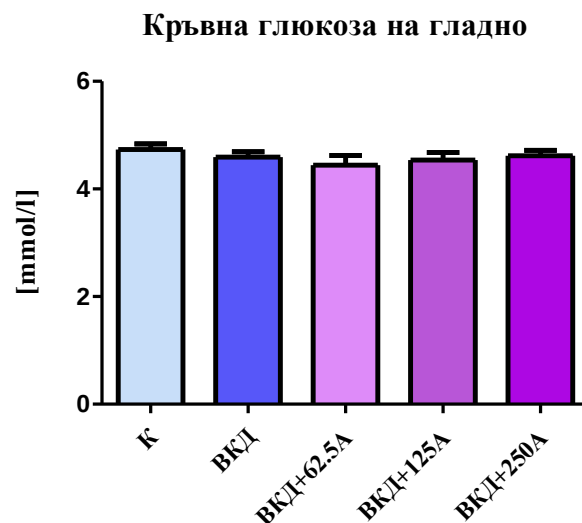
3.1.1. Кръвна глюкоза в хода на глюкозо-толерантен тест (ГТТ)

Фигура 7 представя плазмените нива на кръвната глюкоза на гладно, представени като mmol/l, при контролните и експерименталните животни. Не се открива статистическа значимост между различните групи.

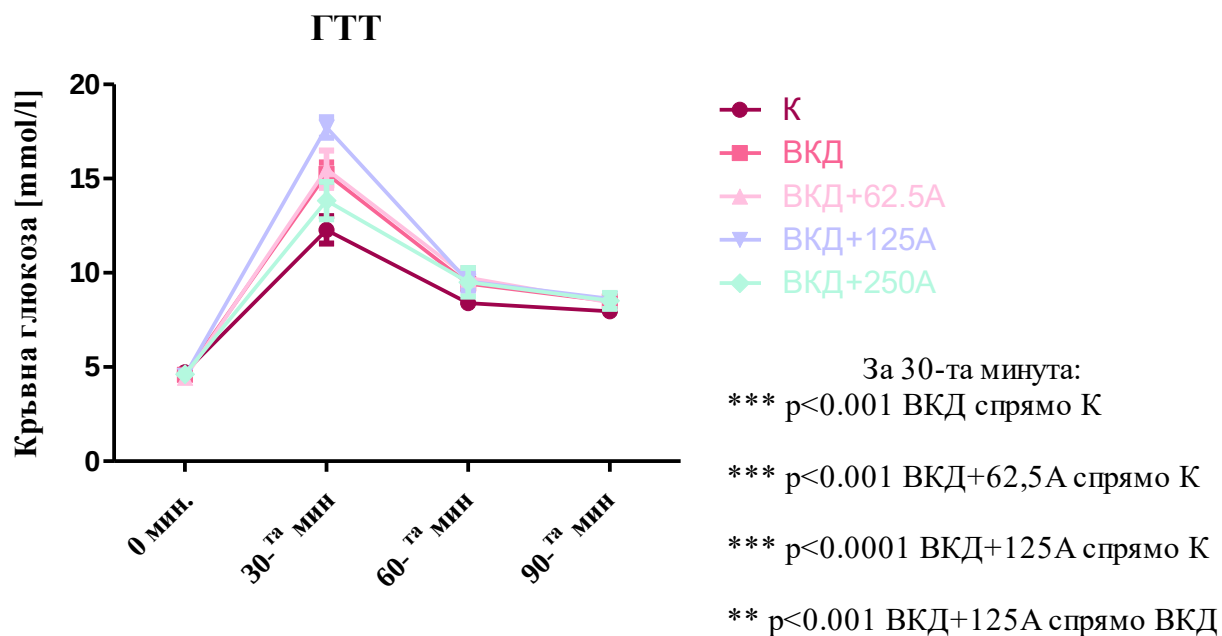
Резултатите от ГТТ са показани на **Фигура 8 и Таблица 7** представени като mmol/l в съответните времеви интервали. Приемът на ВКД води до повишаване нивата на кръвна глюкоза на 30-та минута. Анализът two-way ANOVA, последван от Bonferroni пост тест разкрива, че на 30-та минута глюкозните нива са значимо повишени в сравнение с контролната група при анетол-третираните групи с изключение на ВКД+250А. За групи ВКД+65А и ВКД+125 значимостта е $p < 0,001$ спрямо контролата, като при група ВКД+125 се наблюдава значимо повишаване на стойностите и спрямо група ВКД ($p < 0,01$). На 60-та и 90-та минута не се установяват достоверни разлики в нивата на кръвна глюкоза между групите. Площта под кривата (AUC), изчислена за количественото общо увеличение на кръвната глюкоза по време на ГТТ (**Фигура 9 и Таблица 8**), също разкрива влошаване на глюкозния толеранс от консумацията на ВКД ($p < 0,05$). Третирането с анетол в дози 62.5 и 125 mg/kg не предотвратява тази промяна (съответно $p < 0,01$ и $p < 0,001$ спрямо контролата). В групата, получаваща най-висока доза анетол 250 mg/kg, стойността за площта под кривата на глюкозните нива не се различава значимо от тази на контролната група.

Таблица 7. Стойности на кръвната глюкоза в хода на глюкозо-толерантен тест, представена като абсолютни стойности (mmol/l) и процент (%) от изходната стойност на 30-та, 60-та и 90-та мин при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; ***p<0.001 спрямо контролната група (К) и ##p<0.01 спрямо група ВКД

Група	30-та мин		60-та мин		90-та мин	
	(mmol/l)	(%)	(mmol/l)	(%)	(mmol/l)	(%)
К	12.28 $\pm$ 0.73	260.6 $\pm$ 16.1	8.39 $\pm$ 0,30	177.62 $\pm$ 5.92	7.96 $\pm$ 0.36	168.25 $\pm$ 6.50
ВКД	15.25 $\pm$ 0.60***	333.45 $\pm$ 14.53***	9.42 $\pm$ 0,31	206.30 $\pm$ 8.46	8.49 $\pm$ 0.31	185.77 $\pm$ 7.62
ВКД+62.5А	15.50 $\pm$ 1***	349.98 $\pm$ 20.28***	9.74 $\pm$ 0,51	219.60 $\pm$ 8.68	8.42 $\pm$ 0,34	191.29 $\pm$ 9.79
ВКД+125А	17.31 $\pm$ 0,40***##	392.83 $\pm$ 14.30***##	9.17 $\pm$ 0,34	212.16 $\pm$ 12,74	8.63 $\pm$ 0,27	191.77 $\pm$ 8.74
ВКД+250А	13.84 $\pm$ 0,99	300.12 $\pm$ 22.13	8.82 $\pm$ 0,39	206.98 $\pm$ 18.81	8.19 $\pm$ 0,29	185.36 $\pm$ 10.87



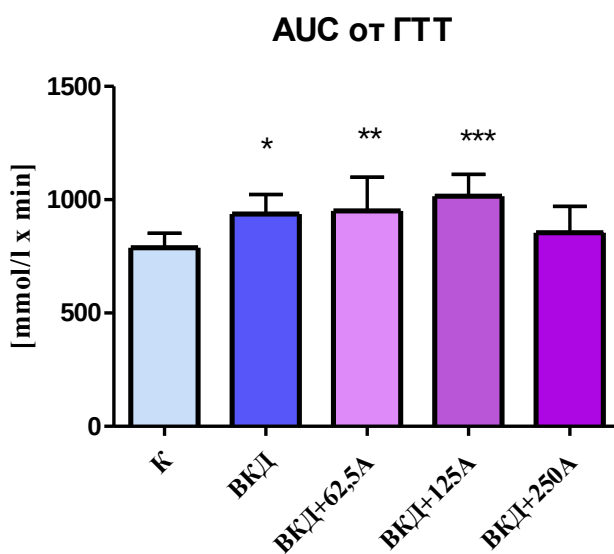
Фигура 7. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (БКД) в дози 62.5 mg/kg (БКД+62.5А), 125 mg/kg (БКД+125А) и 250 mg/kg (БКД+250А), върху кръвната глюкоза на гладно



Фигура 8. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (БКД) в дози 62.5 mg/kg (БКД+62.5А), 125 mg/kg (БКД+125А) и 250 mg/kg (БКД+250А), върху кръвната глюкоза в хода на глюкозо-толерантен тест

Таблица 8. Площ под кривата (AUC) на стойности на кръвната глюкоза в хода на глюкозо-толерантен тест при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третиран с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група (К)

Площ под кривата (AUC)	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Кръвна глюкоза	788,3 $\pm$ 21,23	936,4 $\pm$ 27,54 *	950,4 $\pm$ 49,56 **	1016 $\pm$ 30,31 ***	854,7 $\pm$ 38,54



Фигура 9. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху площта под кривата (AUC) в хода на глюкозо-толерантен тест; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група (К)

3.1.2. Ефект на анетол върху липидния профил

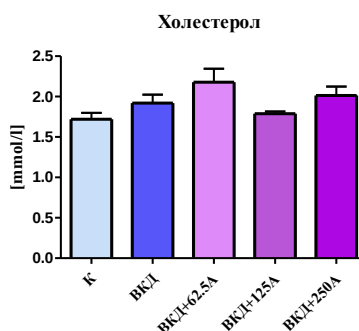
Нивата на серумните триглицериди са представени на **Фигура 10** и **Таблица 9**. В група ВКД няма значима промяна в този показател в сравнение с контролната група.

Третирането с анетол на опитните животни не води до статистически значима промяна на серумните триглицериди в сравнение с група ВКД.

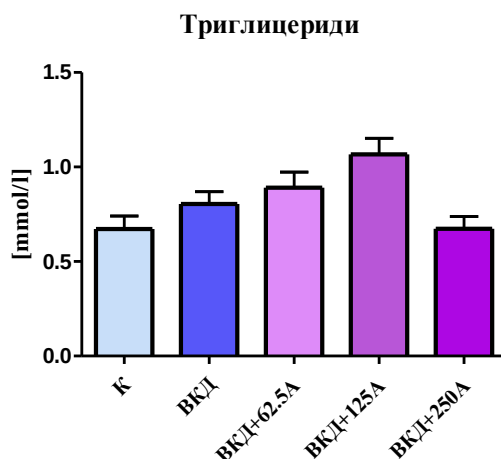
Нивата на серумния холестерол са представени на **Фигура 11** и **Таблица 9**. Резултатите от статистическия анализ са подобни на триглицеридите. Липсва значим ефект както от ВКД, така и от третирането с анетол.

Таблица 9. Липиден профил при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третиран с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M

Група	Липиден профил	
	Серумни триглицериди	Общ холестерол
К	$0,67 \pm 0,70$	$1,72 \pm 0,08$
ВКД	$0,80 \pm 0,06$	$1,92 \pm 0,10$
ВКД+62.5А	$0,89 \pm 0,08$	$2,18 \pm 0,17$
ВКД+125А	$1,07 \pm 0,08$	$1,79 \pm 0,03$
ВКД+250А	$0,67 \pm 0,07$	$2,01 \pm 0,11$



Фигура 10. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху серумния холестерол



Фигура 11. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху серумните триглицериди

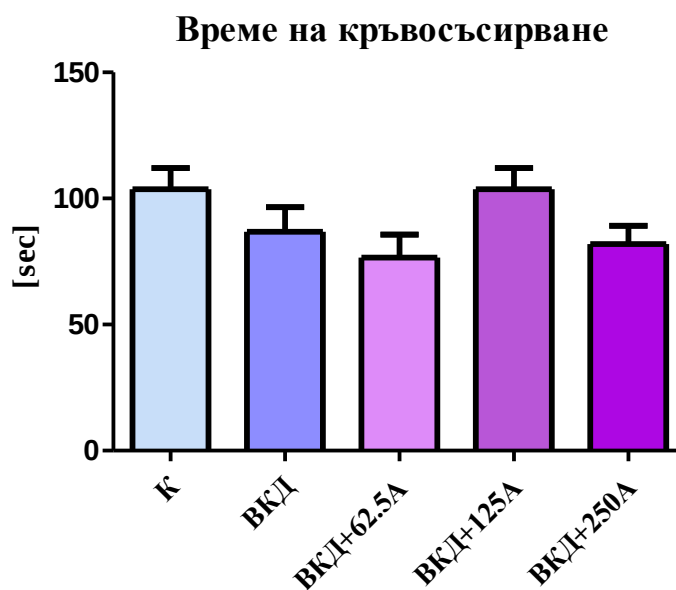
3.1.3. Ефект на анетол върху времето на кръвосъсирване

Измерените стойности на времето на кръвосъсирване са представени на **Таблица 10** и **Фигура 12**.

Времето на кръвосъсирване е незначимо понижено от консумацията на ВКД със стойности $86,86 \pm 9,72$ сек, в сравнение с контролното ниво от $103,7 \pm 8,32$ сек. Прилагането на анетол не води до промяна в нивата на показателя, като те остават близки до тези на ВКД групата. (ANOVA: $F = 2,161$, $P = 0,0952$).

Таблица 10. Стойности времето на кръвосъсирване при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез ВКД, третирани с анетол в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Време на кръвосъсирване (сек.)	$103,7 \pm 8,32$	$86,86 \pm 9,72$	$76,50 \pm 9,18$	$103,6 \pm 8,40$	$81,88 \pm 7,30$



Фигура 12. Ефект на анетол (A), прилаган при плъхове на висококалорична диета (БКД) в дози 62.5 mg/kg (БКД+62.5A), 125 mg/kg (БКД+125A) и 250 mg/kg (БКД+250A), върху времето на кръвосъсирване;

3.1.4. Обсъждане

Състоянието, известно като липотоксичност, се проявява, когато метаболитите ектопично натрупвани липиди повлияват действието на инсулина в периферните тъкани и синтеза на инсулин в панкреаса (Unger. 2002). Маснатата тъкан е приблизителен показател за риска от диабет (Unger and Scherer Gluttony, 2010). Всъщност изследванията показват, че наднорменото тегло може да повиши нивата на провъзпалителни молекули като индуктор капа В киназа (IkK), ядрен фактор капа В (NF-kB) и c-Jun N-терминална киназа (JNK), които пречат на вътреклетъчната инсулинова сигнализация и причиняват инсулинова резистентност (Shoelson et al., 2003).

Въпреки това се смята, че само един механизъм не може да обясни инсулиновата резистентност. По този начин се предполага, че оксидативният стрес играе роля в механизма на инсулиновата резистентност (Pieri et al., 2023). Резултатите от проучване на Genever et al. показват, че затлъстяването, свързано с оксидативния стрес, може да бъде механизъм, причиняващ инсулинова резистентност. Други проучвания обаче противоречат

на това. Loh и сътр. показват, че мишки, при които липсва глутатионпероксидаза 1 (Gpx1), ключов ензим, участващ в отстраняването на физиологичните реактивни кислородни съединения (ROS), са защитени от развитието на инсулинова резистентност, предизвикана от диета с високо съдържание на мазнини (Loh et al., 2009).

В настоящото проучване ВКД променя метаболизма на глюкозата – ГТТ демонстрира нарушен глюкозен толеранс в групата на ВКД в сравнение с контролната. Нивото на кръвната глюкоза се различава значимо на 30-та минута от теста. Нивата на глюкозата в кръвта на гладно не са променени, но глюкозният толеранс е засегнат. ВКД, използвана в модела, е свързана с инсулинова резистентност, хипергликемия и други биохимични промени (Gancheva et al., 2015a). ГТТ е по-чувствителен индикатор за ранни проблеми в регулирането на глюкозата, отколкото плазмената глюкоза на гладно или HbA1c (Ceriello, 2005).

Черният дроб се счита за централен метаболитен орган в организма с важна роля в глюкозната хомеостаза (Petersen et al., 2017). Ефектите на анетолa върху въглехидратния метаболизъм са проучвани от Sheikh et al. при плъхове, подложени на модел на стрептозотоцин-индуциран диабет тип 2 (Sheikh et al., 2015). В това проучване приложението на транс-анетол в доза от 80 mg/kg се свързва със значимо намаляване на нивата на плазмената глюкоза и гликирания хемоглобин, повишаване на нивото на инсулина и подобряване на глюкозния толеранс. Анализът на данните за серумната глюкоза при бройлери показва статистически значимо намаление в групата, приемала 0,5 g/kg анасон със спад от около 5,7% в сравнение с контролната група (Soltan et al., 2008). Прилагането на транс-анетол на плъхове със стрептозотоцин-индуциран диабет води до значителен антихипергликемичен ефект, намалявайки нивата на глюкоза, докато тези на инсулина се нормализират. Тези промени са сравними с резултатите, получени при третиране с антидиабетното лекарство глибенкламид, дори и по отношение на HbA1c. Голямо предимство на транс-анетол е, че не повлиява кръвната глюкоза при здрави плъхове без диабет (Bashir et al., 2015). Приложението на транс-анетол предотвратява нарушенията на глюкозния толеранс при диабетни плъхове (Bashir et al., 2015). Точният механизъм на действие не е устоян, но като подлежащи механизми се смятат възобновяване на нивата на ключови за въглехидратната обмяна ензими, нормализиране на

гликогеновото съдържание в черен дроб и мускули. Доказано е, че анетолът притежава действие, инхибиращо амилазата. Този ефект е даже по-силно изразен от този на амилазния инхибитор акарбоза (Jurado et al., 2003). Също така анетол влияе на ключови ензими, участващи в метаболизма на въглехидратите и може да се използва като благоприятно биоактивно съединение при разработването на терапевтични средства срещу захарен диабет тип 2 (Samyal et al., 2011).

В друго проучване Vellapandian et al. съобщават, че богатата на анетол фракция (100 mg/kg), получена от ароматни билки, понижава нивото на кръвната захар и подобрява липидния профил (Vellapandian et al., 2022). Етаноловият екстракт от надземната и кореновата част на естрагона (250 mg/kg телесно тегло) значимо понижава кръвната захар, холестерола, триглицеридите и нивото на LDL в плазмата в сравнение с контролната група при мишки с индуциран диабет и хипергликемия, като същевременно значимо повишава нивата на HDL. Този антихипергликемичен ефект е сравним с конвенционалното лекарство глибенкламид. Повишаването на инсулиновата секреция от бета-клетките на панкреаса е един от потенциалните механизми, по които етаноловият екстракт от естрагон, богат на естрагол (изомер на анетола) (Ayoughi et al., 2011) намалява нивата на глюкоза в кръвта (Samyal et al., 2021). Обикновено повишената глюкоза причинява аномалии в метаболизма на липопротеините, като води до повишаване на триглицеридите и холестерола, което показва, че глюкозата от периферните тъкани прехвърля мазнини от мастната тъкан (Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993). В настоящия експеримент не се установява ефект на анетола върху нивата на серумните липиди. Групите, получаващи анетол, не се отличават от група ВКД, но в този експеримент ВКД не предизвиква хиперлипидемия. В експерименти на други изследователи анетолът демонстрира антидислипидемични ефекти. Такива са докладвани от Samadi-Noshahr et al. при плъхове със стрептозотоцин-индуциран диабет (Samadi-Noshahr et al., 2021). При здрави плъхове, третирани с анасоново масло, съдържащо 80-90% транс-анетол, също са установени благоприятни промени в липидния профил с намаляване нивата на триглицеридите и общия холестерол (Helal et al., 2019). Суплементацията с транс-анетол подобрява липидния профил и при изследване, проведено върху здрави мъжки бройлери (Yu et al., 2021). Добавянето на анетол към храната на плъхове с високо съдържание на

мазнини значимо намалява нивата на концентрация на триглицериди, LDL и VLDL в кръвта им ($p < 0,05$) (Noreen et al., 2023). Приложението на копър, който е богат на анетол, върху плъхове с диета-индуцирано затлъстяване също води до намаляване на серумните нива на холестерола и триглицеридите, като редуцира и телесното тегло на опитните животни (Nawal et al., 2019). При хора ефектът на анетол върху енергийния метаболизъм не е изследван. Все пак има клинични проучвания, разглеждащи влиянието на консумацията на копър. Двойно-сляпо рандомизирано плацебо-контролирано проучване, проведено върху постменопаузални жени, показва, че приемът на копър не води до значими разлики в липидния профил между изследваните групи – резултат, подобен на наблюдавания в нашия експеримент. Все пак при жените, суплементирани с копър, се наблюдава известно подобряване на нивата на HDL-холестерола в края на изследването в сравнение с изходните стойности (Afiat et al., 2018). Soltan *et al.* откриват, че различните концентрации на разтвор от семена от анасон (0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25 и 1,5 процента) нямат ефект върху холестерола, триглицеридите LDL, VLDL и HDL в плазмата ($p > 0,05$) (Soltan et al., 2021). Както копърът, така и анетолът намаляват нивата на серумните триглицериди, общия холестерол, LDL фракцията и повишават нивата на HDL (Samadi-Noshahr Z, et al., 2021). Sedláková et al. съобщават, че наличието на анетол, тимол и карвон в растенията копър и кимион води до намаляване на нивата на холестерола и триглицеридите, което най-вероятно е свързано с намалена резорбция на мазнини в червата (Sedláková et al., 2003).

В настоящия експеримент ВКД не промени времето на кръвосъсирване. Анетолът също не показва значим ефект. Подобни резултати са наблюдавани при изследване на водния екстракт на етеричното масло от канела, с наличие на транс-анетол 64,12%, който не проявява ефект върху времето за съсирване на кръв от здрави доброволци. Въпреки това, чистият екстракт от канела значително намалява времето за съсирване в сравнение с контролната група (Hosseini et al., 2013).

Пероралното приложение на хидроалкохолен екстракт от копър в дози от 250, 500, 750 и 1000 mg/kg телесно тегло за период от 30 дни не води до значителни промени във времето на кръвене в сравнение с контролната група (Mansouri et al., 2015). По отношение на тромбоцитите, отсъствие на антитромбоцитен ефект е докладван от Imbabí et al., които

установяват липсата на статистически значима разлика в броя на тромбоците при третиране на зайци с масло от копър за 8 седмици (Imbabi et al., 2021).

От друга страна, в достъпната литература има данни за антиагрегантен ефект на анетол. Проучване, идентифициращо етерични масла, богати на фенилпропаноиди (*A. dracunculus*, *F. vulgare*, *O. quixos*, *O. basilicum*), установява, че те са най-ефективни при инхибиране на тромбоцитната агрегация. Това предполага корелация между тези химични компоненти на етеричните масла и способността им да инхибират тази биологична активност. Следователно може да се предположи, че антитромбоцитната активност на масло от копър може да се дължи на неговата фенилпропаноидна част, която се състои предимно от анетол (около 75 %) (Tognolini et al., 2006).

Маслото от копър и основната му съставка анетол показват сходно ниво на ефективност при предотвратяване на агрегацията, причинена от арахидонова киселина, колаген, АДФ при морски свинчета. Освен това, анетол потиска процеса на тромбин-индуцирано свиване на съсирека, като притежава дестабилизиращ ефект върху него (Tognolini et al., 2007). Вазорелаксиращата активност също има значение за антитромбоцитното действие, тъй като е свързано с потискането на повишената вътреклетъчна калциева активност в съдовия ендотел (Xiong et al., 1995). Прекомерният приток на калций в клетките нарушава съдовия тонус, като контролира вазоконстрикцията и насърчава производството на вазоактивни вещества (Xiong et al., 1995). Ефектът на анетола върху аортата на плъхове със или без ендотел е вазорелаксиращ, като не зависи от азотния оксид. Тези ефекти са наблюдавани при дози, за които е доказано, че имат антитромбоцитни свойства и не са цитотоксични *in vitro*. Анетолът, прилаган перорално в доза 30 mg/kg дневно в продължение на 5 дни, показва антитромботично действие. При антитромботичната доза не се наблюдават никакви прохеморагични странични ефекти, за разлика от ацетилсалициловата киселина, която е използвана като референтно лекарство (Tognolini et al., 2007).

Транс-анетолът потиска концентрацията на инхибитора на плазминогенния активатор-1 (PAI-1) в изолирани преантрални яйчникови фоликули на кози (Sá et al., 2017).

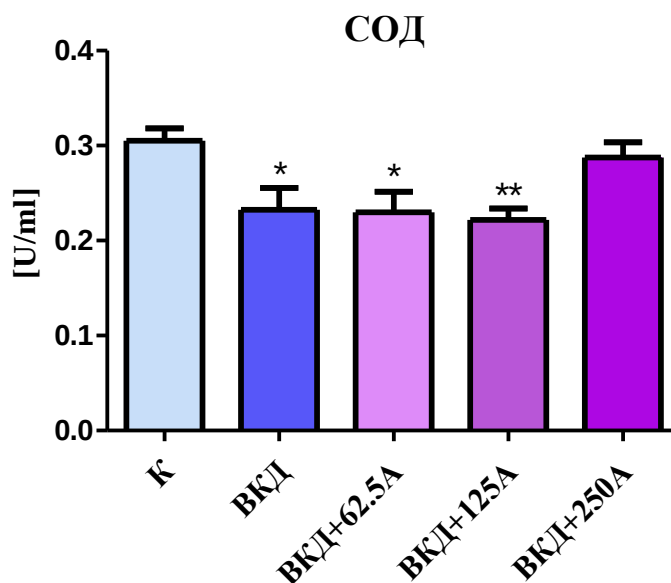
3.2. Ефекти на анетол върху показатели на антиоксидантната защита и оксидативния стрес

3.2.1. Ефекти на анетол върху серумните нива на супероксид дисмутаза (СОД)

Както е показано на **Фигура 13** и **Таблица 11**, активността на серумната супероксид дисмутаза (СОД) в групата ВКД ($0,23 \pm 0,02$ U/ml) е значимо по-ниска ($p < 0,05$) в сравнение с контролното ниво ($0,31 \pm 0,01$ U/ml). Нивата на антиоксидантния ензим остават ниски в групите ВКД+62.5А ($0,23 \pm 0,02$ U/ml) и ВКД+125А ($0,22 \pm 0,01$ U/ml). Активността на СОД в групата на ВКД+250А ($0,29 \pm 0,02$ U/ml) не показва статистически значима разлика в сравнение с контролната група.

Таблица 11. Серумни нива на супероксид дисмутаза (СОД) при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контролната група (К)

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Стойност на СОД, измерена в U/ml	0.31 ± 0.01	$0.23 \pm 0.02^*$	$0.23 \pm 0.02^*$	$0.22 \pm 0.01^{**}$	0.29 ± 0.02



Фигура 13. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху серумната супероксид димутаза СОД; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контролната група (К)

3.2.2. Ефект на анетол върху нива на веществата, реагиращи с тиобарбитурова киселина (TBARS) в серум и хомогенат от мозък

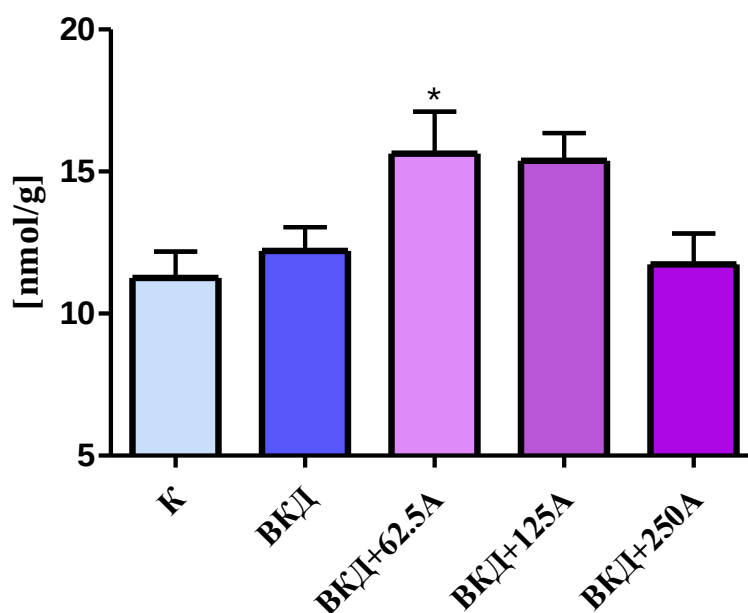
Стойностите на TBARS в серум са поазани на **Фигура 14** и Таблица..... Серумните нива на TBARS в групата на ВКД+62.5 (15.64 ± 1.47 nmol/g) са повишени ($p < 0.05$) в сравнение с контролното ниво (11.26 ± 0.92 nmol/g). Нивата на TBARS в група ВКД+250А (11.73 ± 1.09 nmol/g) не показват статистически значима разлика в сравнение с контролната група.

Фигура 15 и **Таблица 12** показват нивата на мозъчните TBARS. Консумацията на ВКД води до значимо повишаване на нивата на TBARS в мозъка със стойности 13.78 ± 1.05 nmol/g, в сравнение с контролното ниво от 9.91 ± 0.89 nmol/g ($p < 0.05$, t-тест на Student). Прилагането на анетол води до намаляване на нивата на TBARS в мозъчния хомогенат. Измерените нивата на TBARS в мозъка са: 11.52 ± 1.53 nmol/g за група ВКД+62.5А, 11.61 ± 1.05 nmol/g за група ВКД+125А и 11.32 ± 1.26 nmol/g за група ВКД+250А, като посочените стойности не показват значима разлика в сравнение с контролната група (ANOVA: $F = 0.4218$, $P = 0.7386$).

Таблица 12. Серумни нива на TBARS при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; * $p < 0.05$ спрямо контролната група (К)

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Серумните нива на TBARS измерени в nmol/g	11.26 $\pm$ 0.92	12.98 $\pm$ 1.08	15.64 $\pm$ 1.47 *	15.38 $\pm$ 0.97	11.73 $\pm$ 1.09

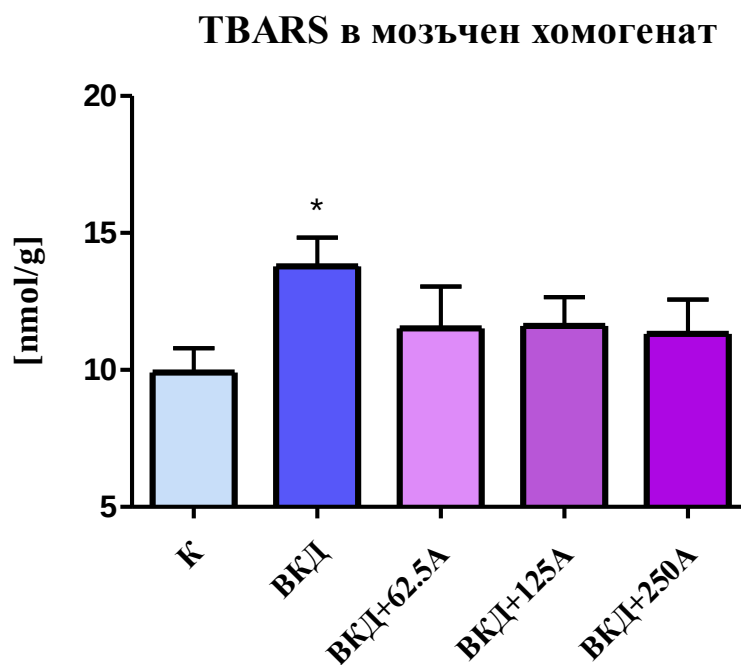
TBARS в серум



Фигура 14. Ефект на анетол, прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху серумните нива на TBARS; * $p < 0.05$ спрямо контролната група (К)

Таблица 13. Нива на TBARS в тъканен хомогенат от мозък при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; * $p < 0.05$ спрямо контролната група (К)

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Нива на TBARS в мозъчен хомогенат, измерени в nmol/g	9.9 $\pm$ 0.89	13.78 $\pm$ 1.05*	11.52 $\pm$ 1.53	11.61 $\pm$ 1.05	11.32 $\pm$ 1.26



Фигура 15. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху нивата на TBARS в тъканен хомогенат от мозък; * $p < 0.05$ спрямо контролната група (К)

3.2.3. Обсъждане

Затлъстяването често се свързва с диета, в която липсват основни хранителни вещества и не осигурява достатъчно антиоксиданти. Неадекватните нива на плазмени микроелементи, като фолиева киселина, витамин В, витамин С, желязо и цинк, могат да имитират увреждането на ДНК, причинено от радиацията и оксидативно увреждане (Ames et al., 2001). Повишените продукти на липидната пероксидация в мозъка и намалената активност на супероксид дисмутаза (СОД), в серума в настоящия експеримент показват, че ВКД причинява оксидативен стрес и намалена антиоксидантна защита. Третирането на плъховете с анетол може да противодейства на тези ефекти от храненето на гризачите с ВКД. Ендогенните антиоксидантни ензими, включително каталаза (КАТ) и СОД, са от съществено значение за елиминирането на реактивните кислородни видове и защитата на клетките от вредните ефекти на оксидативния стрес. Няколко проучвания показват, че диетата с високо съдържание на мазнини е свързана с по-ниски кръвни нива на антиоксидантни ензими като глутатион S-трансфераза, СОД и КАТ (Emami et al., 2016). Получени са доказателствата от Maciejczyk et al., че хипоталамусът и мозъчната кора на плъховете имат по-високи концентрации на малондиалдехид (МДА) след получаване на диета с високо съдържание на мазнини за продължителен период от време (Maciejczyk et al., 2018). Прилагането на анетол върху плъхове на диета с високо съдържание на мазнини за период от 6 седмици води до значимо повишаване на активността на ензимите СОД и КАТ в кръвта, като също така при животните се наблюдава намаляване на серумните нива на МДА (Maciejczyk et al., 2018). Третирането с анетол води до значимо повишаване на активност на СОД в мозъка и намаляване на нивата на МДА в мозъка при плъхове с ротенон-индуцирана Болест на Паркинсон (Aazza et al., 2011). Когато плъхове с диабетна нефропатия, които са приемали нездравословна диета („junk food”), получат богата на анетол фракция, техните нива на СОД и редуциран глутатион се увеличават значимо (Vellapandian et al., 2022). Приложението върху плъхове на 200 mg/kg/ден на плода *Foeniculum vulgare*, който съдържа като основна съставка транс-анетол, в продължение на три седмици увеличава значимо активността на СОД и КАТ (Choi E et al., 2004). Освен това е доказано, че липидната пероксидация значимо намалява, изразено с намаляване на МДА (Choi E et al., 2004). МДА е алдехид, който се образува при окисление на полиненаситени мастни киселини. Той е широко признат като надежден индикатор за

оксидативен стрес (Olusi, 2002). Реакцията на МДА с органични съединения, като ДНК и протеини, може да доведе до образуване на адукти. Тези адукти имат токсично действие върху биологичните молекули (Mas-bargues, 2021). След три седмици третиране с транс-анетол стресираните плъхове показват значим спад в нивата на МДА в мозъка (Dhingra et al., 2019). Ryu et al. демонстрират, че благодарение на антиоксидантната и митохондриалната си защита, анетолът проявява невропротективни ефекти (Ryu et al., 2014). При животински модел на епилепсия е доказано, че анетолът намалява количеството нитрити и МДА, присъстващи в мозъка (Raman et al., 2020). Освен това, Raman et al. показват, че паметта се подобрява при социално изолирани плъхове, на които е приложено третиране с анетол, което показва, че този ефект може да се дължи на антиоксидантно действие, инхибиране на ензима холинестеразата и хипокампадно засилване на дългосрочното потенциране (LTP) (Salimian et al., 2022). Освен това плъховете, на които е даван анетол в доза 80 mg/kg от телесно тегло, имат значимо повишена активност на СОД. Това проучване също така показва, че намаляването на оксидативния стрес при плъхове с поликистозни яйчници е доза-зависимо (Moradi Negahdari et al., 2022). Съществуват данни, че маслото от копър действа като антиоксидант, поради способността си да инхибира липидната пероксидация и намалява оксидативния стрес при мишки с гама-облъчване. Третирането на животните преди радиацията води до цитопротективен ефект и нормализиране на серумните МДА и СОД (Mohamad et al., 2011).

4. Ефекти на анетол върху мастната тъкан

4.1. Мастнотъканни индекси

Индексите на различните видове мастната тъкан са представени на **Таблица 14** и **Фигура 16**.

One-way ANOVA анализът разкрива, че индексът на ретроперитонеалната мастна тъкан в групата на ВКД (2.16 ± 0.08) е значимо по-висок ($p < 0,001$) в сравнение с контролното ниво (1.32 ± 0.11). Нивата на индекса в група ВКД+250А (1.61 ± 0.08) са значимо по-ниски ($p < 0,05$) в сравнение с група ВКД.

Не се откриват значими разлики между всички групи при индекса на перигонадната мастна тъкан ($F = 1.523$).

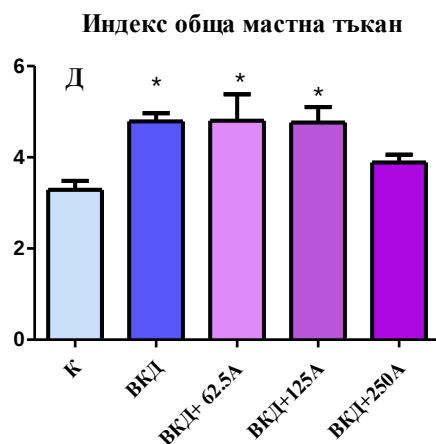
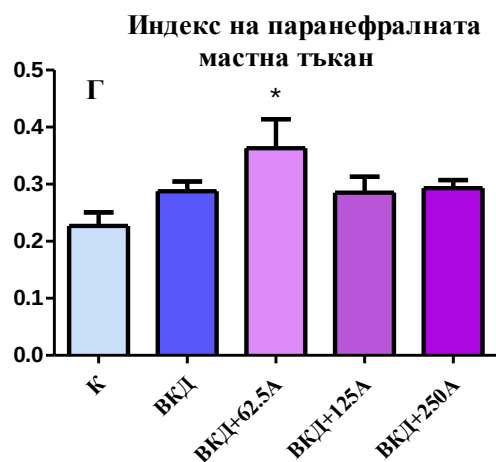
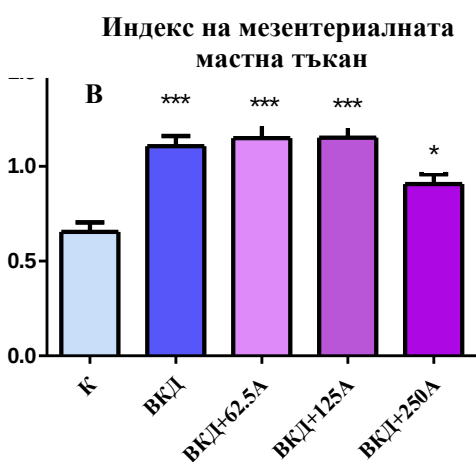
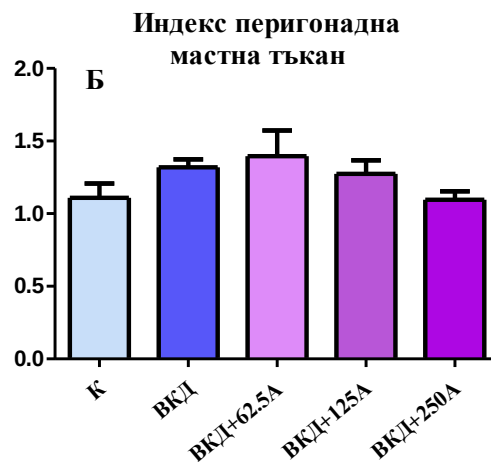
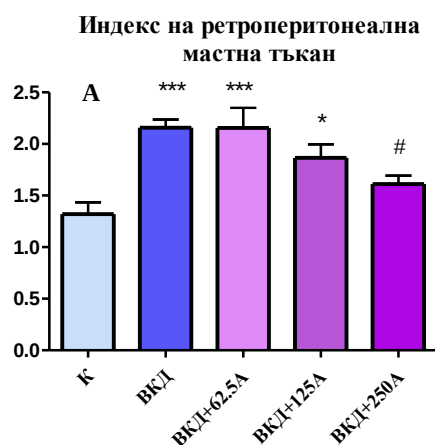
Резултатите от анализа на индекса на мезентериалната мастна тъкан показват, че консумацията на ВКД води до значимо повишаване на индекса със стойности 1.10 ± 0.05 , в сравнение с контролното ниво от 0.65 ± 0.05 ($p < 0.001$). Прилагането на анетол не води до намаляване на индекса, като той остава по-висок от контролата: 1.15 ± 0.09 ($p < 0.001$) за група ВКД+62.5А ($p < 0.001$), 1.15 ± 0.07 ($p < 0.05$) за група ВКД+125А и 0.90 ± 0.05 за група ВКД+250А (ANOVA: $F = 10.86$).

Не се наблюдава значимост в индекса на паранефралната мастна тъкан между ВКД и контролата. Ниските дози на анетол ВКД+62.5А ($p < 0.05$) повишават индекса, докато при останалите анетол-третираните групи не се открива значимост.

Индексът на общата мастна тъкан се използва за оценка на затлъстяването. Еднофакторният вариационен анализ One-way ANOVA показва значим ефект на третирането: $F(4,43)=3.868$, $P=0.0090$. Пост тестът на Dunnet разкрива повишаване на индекса в група ВКД в сравнение с контролната ($p < 0.05$). Индексът остава значимо повишен ($p < 0.05$) спрямо контролата и в групи ВКД+62.5А и ВКД+125А. В група ВКД+250А, получаваща най-високата доза анетол, индексът на общата мастна тъкан не се отличава значимо от този на контролните животни.

Таблица 14. Индекси на ретроперитонеалната, перигонадната, мезентериалната, паранефралната и общата мастна тъкан при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ спрямо контролната група (К); # $p < 0.05$ спрямо ВКД

Група	Индекс на ретроперитонеалната мастна тъкан	Индекс на перигонадната мастна тъкан	Индекс на мезентериалната мастна тъкан	Индекс на паранефралната мастна тъкан	Индекс на общата мастна тъкан
К	1.32 $\pm$ 0.11	1.10 $\pm$ 0.10	0.65 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.02	3.29 $\pm$ 0.19
ВКД	2.16 $\pm$ 0.08 ***	1.32 $\pm$ 0.06	1.10 $\pm$ 0.05***	0.29 $\pm$ 0.02 *	4.79 $\pm$ 0.18 *
ВКД+62.5А	2.16 $\pm$ 0.19 ***	1.40 $\pm$ 0.18	1.15 $\pm$ 0.09 ***	0.36 $\pm$ 0.05	4.80 $\pm$ 0.58 *
ВКД+125А	1.87 $\pm$ 0.13 *	1.28 $\pm$ 0.09	1.15 $\pm$ 0.07 ***	0.29 $\pm$ 0.03	4.76 $\pm$ 0.34 *
ВКД+250А	1.61 $\pm$ 0.08 #	1.10 $\pm$ 0.06	0.91 $\pm$ 0.05 *	0.29 $\pm$ 0.01	3.89 $\pm$ 0.17

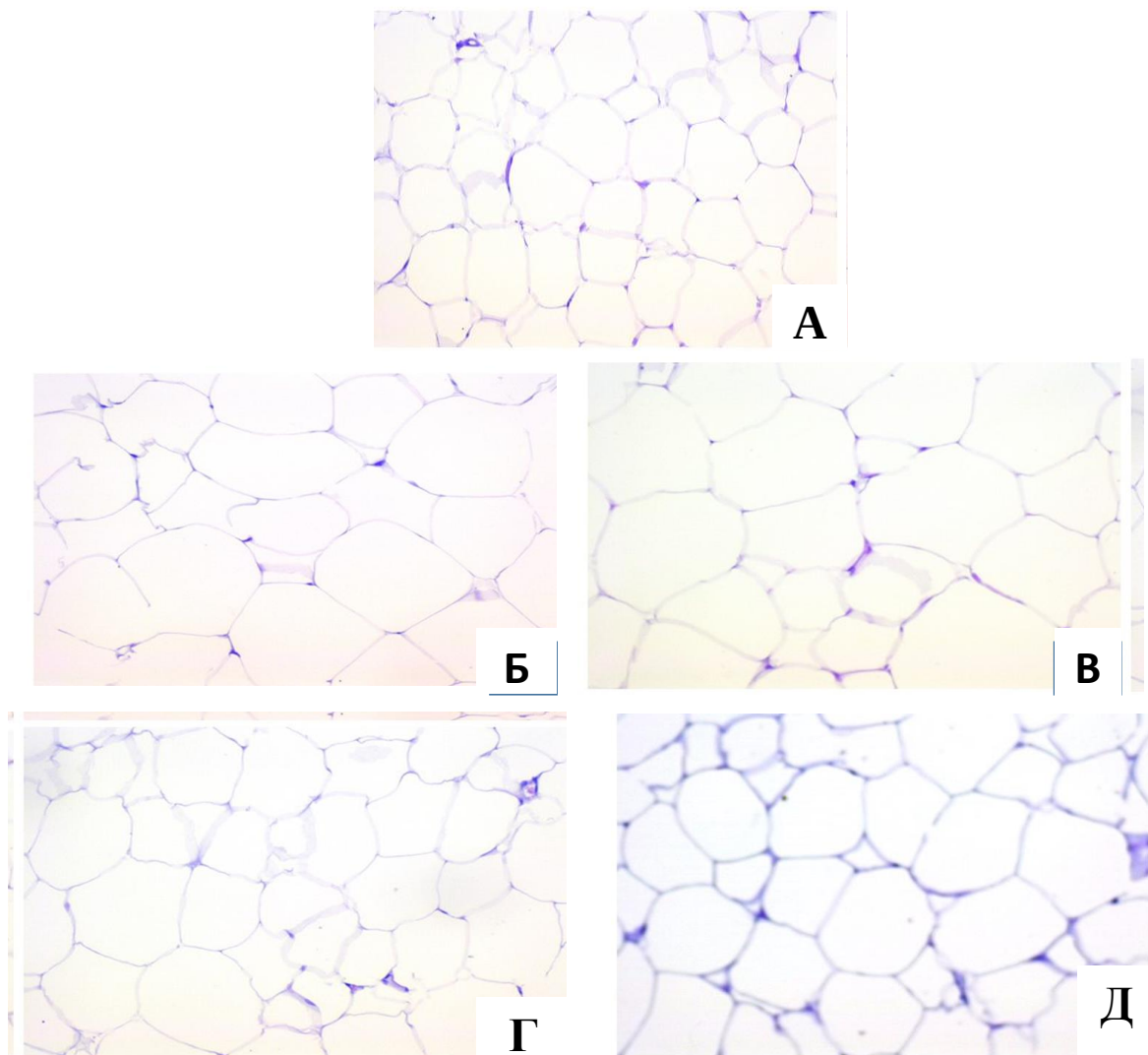


Фигура 16. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (БКД) в дози 62.5 mg/kg (БКД+62.5A), 125 mg/kg (БКД+125A) и 250 mg/kg (БКД+250A) върху индексите на ретроперитонеалната (А), перигонадната (Б), мезентериалната (В), паранефралната (Г) и общата мастна тъкан (Д); *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ спрямо контролната група (К); # $p < 0.05$ спрямо БКД

4.2. Хистология на ретроперитонеална мастна тъкан

Хистологичните резултати за ретроперитонеална мастна тъкан са представени на **Фигура 17**.

В контролната група животни пробладеват адипоцити със средни размери и овална или полигонална форма с периферно разположено ядро (**Фигура 17**, панел А). В ретроперитонеална мастна тъкан на плъховете от групата със затлъстяване преобладават адипоцити с големи размери (**Фигура 17**, панел Б). В ретроперитонеалната мастна тъкан на животните от група ВКД+62.5А са представени адипоцити със средни до големи размери с преобладаване на адипоцитите с големите размери (**Фигура 17**, панел В), което не ги различава от група ВКД. В група ВКД+125А размерът на адипоцитите намалява, наблюдават се мастни лобули с адипоцити със средни и големи размери, на места и тъкан с възпалителни промени (**Фигура 17**, панел Г). При групата, третирана с най-високата доза анетол (ВКД+250А) размерът на адипоцитите е подобен на този при контролната група, наблюдават се средни и големи по размери адипоцити (**Фигура 17**, панел Д).



Фигура 17. Хистология на ретроперитонеална мастна тъкан при плъхове на висококалорична диета (панел Б), третирани с анетол в дози 62.5 mg/kg (панел В), 125 mg/kg (панел Г) и 250 mg/kg (панел Д); контролна група (панел А); оцветяване с хематоксилин еозин; увеличение x 200

4.3. Имунохистохимия на ретроперитонеална мастната тъкан

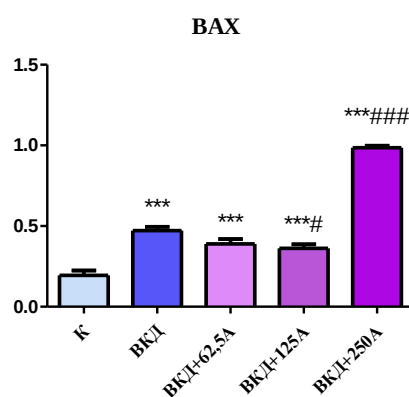
4.3.1. Експресия на VAX

Фигури 18 и 19 и Таблица 15 показват експресията на VAX в ретроперитонеална мастна тъкан. Експресията на VAX е значимо повишена при група ВКД със стойности $0,47 \pm 0,02$ в сравнение с контролното ниво от $0,19 \pm 0,03$ ($p < 0.001$). Приложението на анетол в доза 125 mg/kg антагонизира индуцирания от диетата ефект, което се изразява чрез

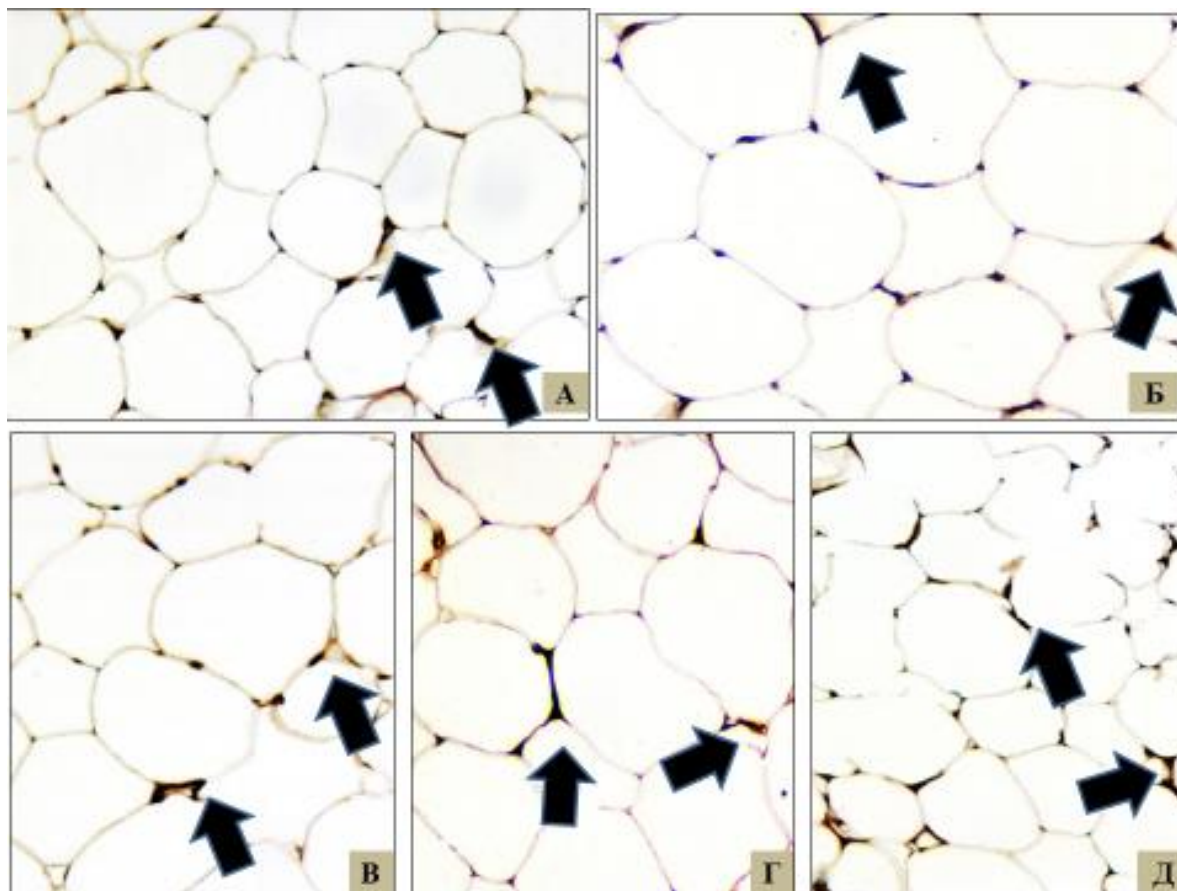
значимо намаляване на нивата на показателя спрямо ВКД групата: $0,39 \pm 0,03$ ($p < 0,05$), въпреки това, този показател остава висок спрямо контролната група ($p < 0,001$). Приложението на анетол в доза 250 mg/kg от своя страна показва противоположен ефект-експресията на ВАХ е повишена значимо спрямо ВКД групата, като също така и спрямо контролата ($p < 0,001$) (ANOVA: $F = 126,4$, $P < 0,0001$).

Таблица 15. Експресия на апоптотичния маркер ВАХ в ретроперитонеална мастна тъкан при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; *** $p < 0,001$ спрямо контролната група (К); # $p < 0,05$ спрямо ВКД, ### $p < 0,001$ спрямо ВКД

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Съотношение на клетки с (+) експресия на ВАХ спрямо брой клетки на поле	$0,19 \pm 0,03$	$0,47 \pm 0,02$ ***	$0,39 \pm 0,03$ ***	$0,36 \pm 0,02$ ***#	$0,99 \pm 0,01$ ***###



Фигура 18. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А) върху експресия на апоптотичния маркер ВАХ в ретроперитонеална мастна тъкан; *** $p < 0,001$ спрямо контролната група (К); # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ спрямо ВКД



Фигура 19. Експресия на апоптотичния маркер BAX в ретроперитонеална мастна тъкан при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (панел Б), третиран с анетол в дози 62.5 mg/kg (панел В), 125 mg/kg (панел Г) и 250 mg/kg (панел Д); контролна група (панел А); черна стрелка – цитоплазма на адипоцити; увеличение x 320

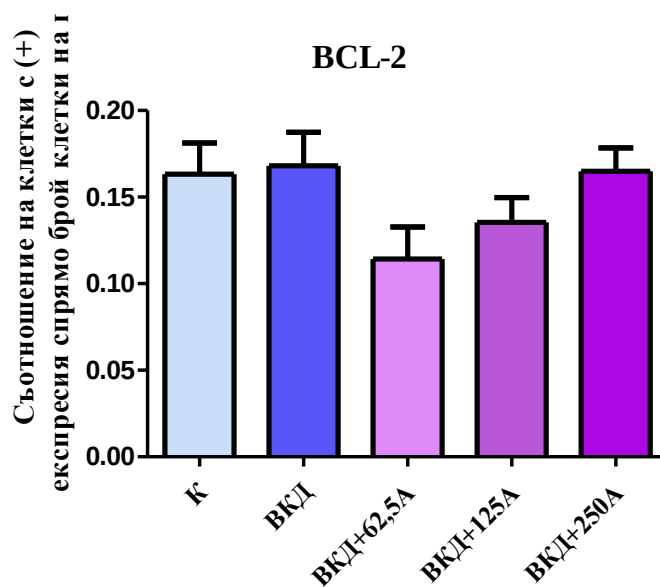
4.3.1. Експресия на BCL-2

Фигури 20 и 21 и Таблица 16 показват експресията на BCL-2 в ретроперитонеална мастна тъкан.

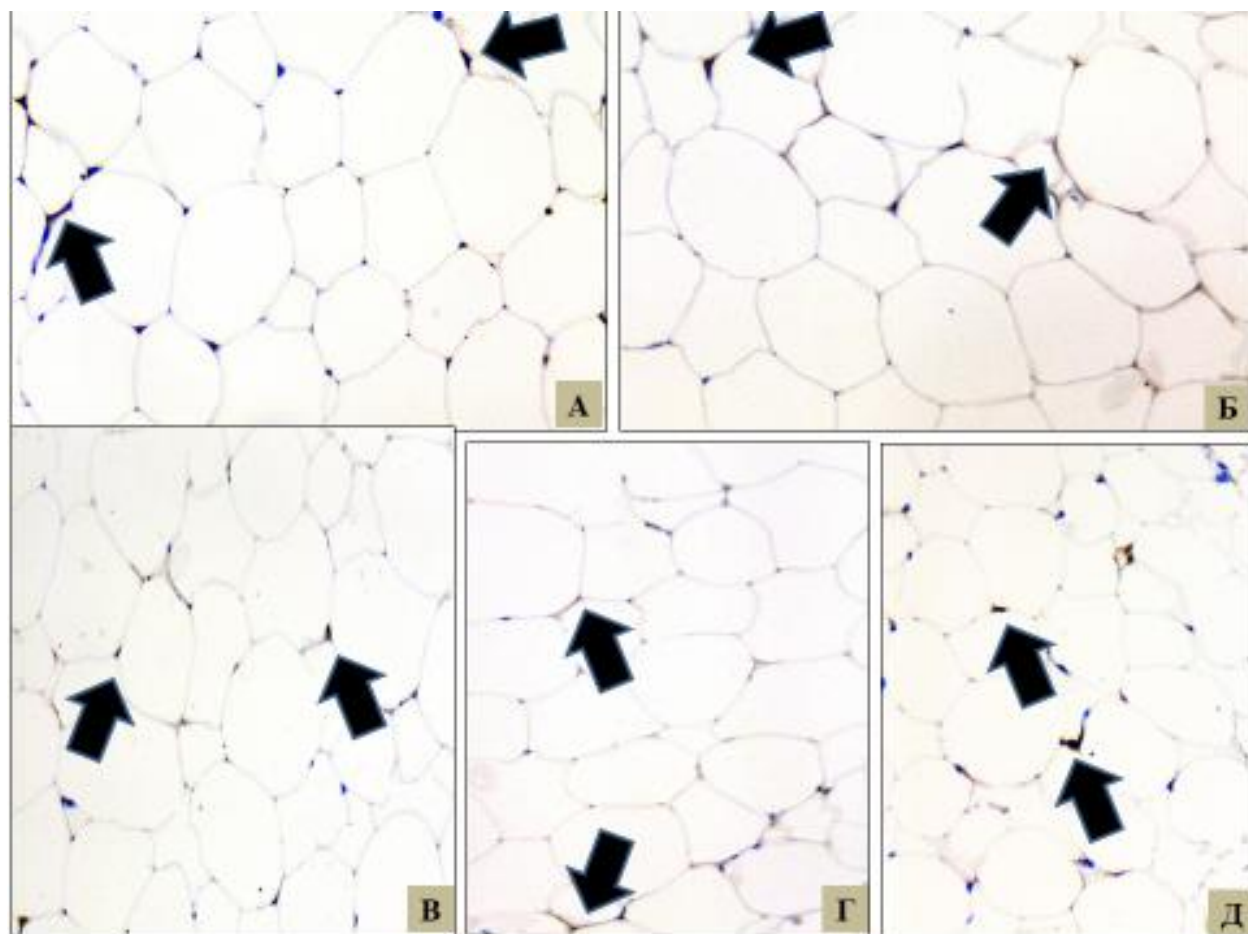
Липсва значимост между нивата на BCL-2 в група ВКД и контролната. Установява се тенденция за намаляване стойностите на показателя от третирането с анетол без статистическа значимост (ANOVA: $F = 1.883$, $P = 0.1261$).

Таблица 16. Експресия на антиапоптотичния маркер BCL-2 в ретроперитонеална мастна тъкан при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Съотношение на клетки с (+) експресия на BCL-2 спрямо общ брой клетки на поле	0,1632 $\pm$ 0.02	0,1680 $\pm$ 0.02	0,1142 $\pm$ 0.02	0,1354 $\pm$ 0.01	0,1650 $\pm$ 0.01



Фигура 20. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А) върху експресия на апоптотичния маркер BCL-2 в ретроперитонеална мастна тъкан



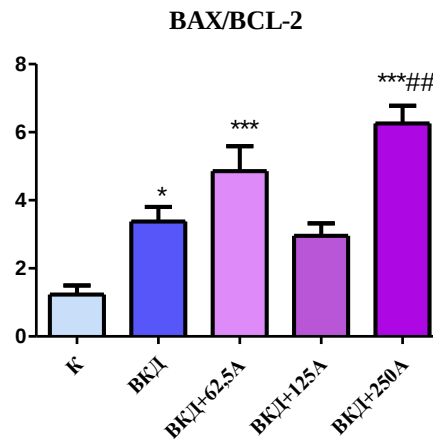
Фигура 21. Експресия на антиапоптотичния маркер BCL-2 в мастна тъкан при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (панел Б), третирани с анетол в дози 62.5 mg/kg (панел В), 125 mg/kg (панел Г) и 250 mg/kg (панел Д); контролна група (панел А); черна стрелка – цитоплазма на адипоцити; увеличение x 320

4.3.3. Съотношение BAX/BCL-2

One-way ANOVA анализът разкрива, че съотношението BAX/BCL-2 е значимо по-високо при група ВКД в сравнение с контролната група ($p < 0.05$), $F = 12.98$, $P < 0.0001$. Третирането с анетол в дози 62,5 и 250 mg/kg повишава показателя спрямо контролата ($p < 0.001$), като съотношението при доза 250 mg/kg остава високо и спрямо група ВКД ($p < 0.01$). Не се открива статистическа разлика между стойностите на ВКД+125А и контролата. Резултатите са представени на **Таблица 17** и **Фигура 22**.

Таблица 17. Съотношение BAX/BCL-2 в ретроперитонеална мастна тъкан при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група (К); ## $p < 0.01$ спрямо ВКД

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Съотношение BAX/BCL-2	1,232 $\pm$ 0.27	3,375 $\pm$ 0.43 *	4,857 $\pm$ 0.73 ***	2,958 $\pm$ 0.37	6,258 $\pm$ 0.52 ***####



Фигура 22. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А) върху съотношението BAX/BCL-2 в ретроперитонеална мастна тъкан; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ спрямо контролната група (К); ## $p < 0.01$ спрямо ВКД

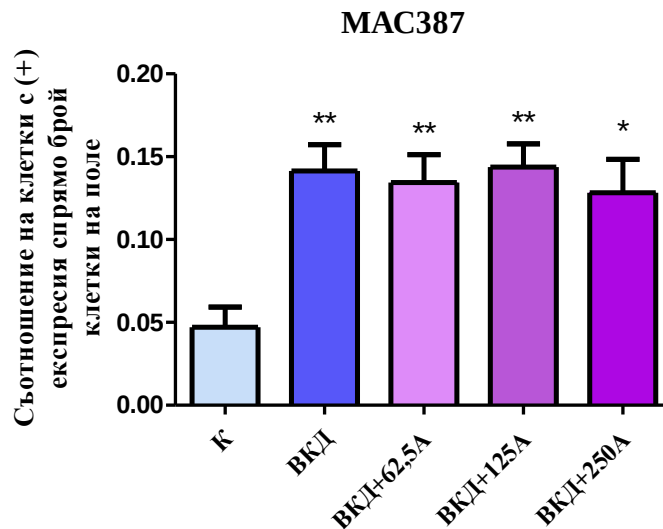
4.3.4. Експресия на MAC387 в ретроперитонеална мастна тъкан

One-way ANOVA анализът отчита статистическа разлика между групите, като пост тест на Dunnet показва повишаване на експресия на маркера MAC387 от консумацията на висококалорична диета ($p < 0.05$). Вследствие третирането с анетол експресията на MAC387 не се различава с тази на ВКД групата, като същевременно остава повишена спрямо

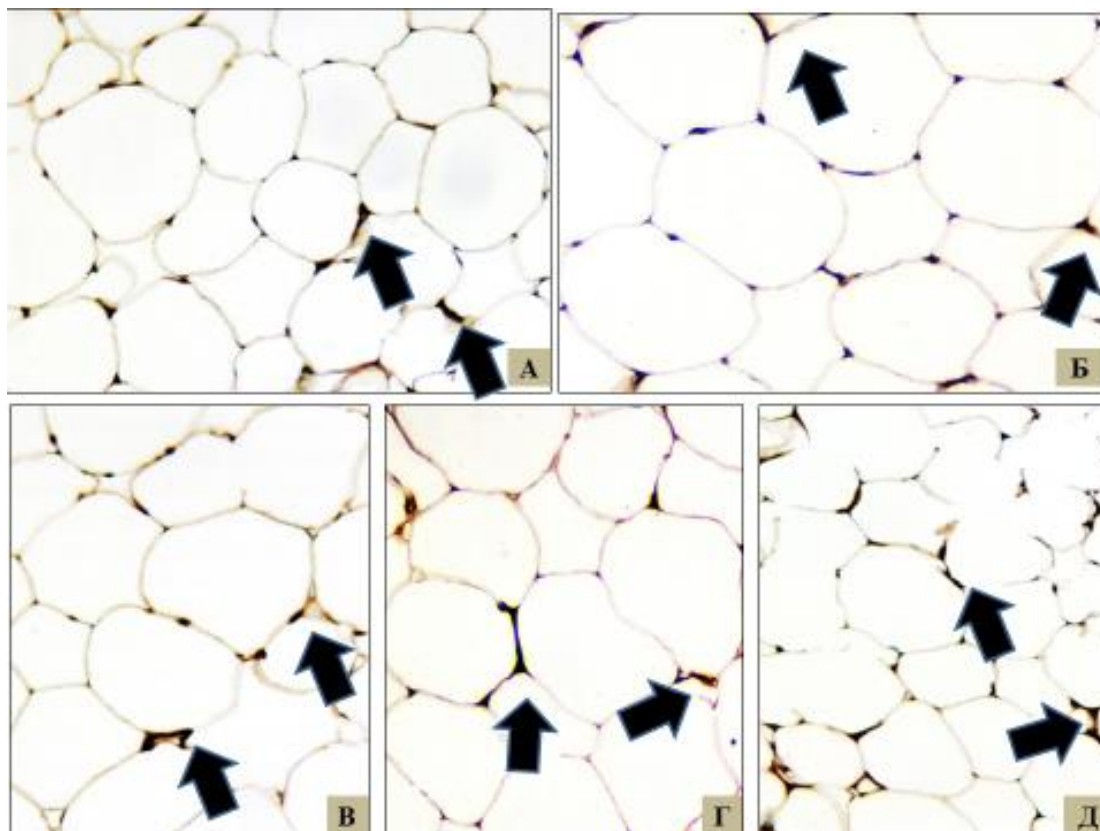
контролата: $p < 0.05$ за ВКД+250А и $p < 0.01$ за ВКД+62,5А и ВКД+125А (Таблица 18 и Фигури 23 и 24).

Таблица 18. Експресията на МАС387 в ретроперитонеална мастна тъкан при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контролната група (К)

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Съотношение на клетки с (+) експресия на МАС387 спрямо брой клетки на поле в мастна тъкан	$0,05 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0.02$ **	$0,13 \pm 0.02$ **	$0,14 \pm 0.01$ **	$0,13 \pm 0.02$ *



Фигура 23. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А) върху експресията на МАС387 в ретроперитонеална мастна тъкан; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ спрямо контролната група (К)



Фигура 24. Експресия на провъзпалителния маркер MAC387 в ретроперитонеална мастна тъкан при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (панел Б), третирани с анетол в дози 62.5 mg/kg (панел В), 125 mg/kg (панел Г) и 250 mg/kg (панел Д); контролна група (панел А); черна стрелка – цитоплазма на адипоцити; увеличение x 320

4.4. Обсъждане

Мастната тъкан е изключително динамичен орган, който играе няколко роли, като ендокринни, паракринни и аутокринни функции, в човешката физиология и болести (Trayhurn and Beattie, 2001). Чрез метаболитните, клетъчните и ендокринните процеси, които извършва, мастната тъкан е от решаващо значение за контрола на енергийния баланс в организма. Исторически мастната тъкан се разделя на катаболитна кафява мастна тъкан и анаболна бяла мастна тъкан (Lee et al., 2014). Традиционната функция на бялата мастна тъкан се описва като съхранение на енергия, като мастните киселини се освобождават при

нужда от “гориво”. Бялата мастна тъкан обаче изпълнява сложна роля в обмяната на веществата. Тази тъкан е необходима за здравословната хомеостаза на глюкозата и се предполага, че участва във възпалителните процеси. Откриването на лептина, важен хормон за енергийния баланс, който се произвежда предимно от белата мастна тъкан, придава на тъканта ендокринна функция. Сред протеините, които белите адипоцити секретират заедно с лептина, са ангиотензиноген, адипсин, ацилационно-стимулиращ протеин, адипонектин, ретинол-свързващ протеин, TNF-alfa, IL-6, инхибитор на тъканния плазминогенен активатор-1. Някои от тези протеини функционират като възпалителни цитокини, докато други участват в липидния метаболизъм, съдовата хемостаза или системата на комплемента. Ефектите на определени протеини могат да бъдат автокринни, паракринни или отдалечени от мастната тъкан в зависимост от мястото, където действат. Свързаният с фибриноген-ангиопоетин протеин, металотионеинът и резистинът са най-новите идентифицирани адипоцитни секреторни протеини. Смята се, че специфичен за мастната тъкан фактор, наречен резистин, причинява инсулинова резистентност, която е патогенетичната връзка между диабет и затлъстяване. Металосвързващият и реагиращ на стрес протеин металотионеин може да играе антиоксидантна роля. Откриването на пълния набор от секретирани протеини, определянето на функцията им и патофизиологичните ефекти при промени в мастната тъкан (затлъстяване, гладуване, кахексия) са основните предизвикателства при определянето на секреторните функции на бялата мастна тъкан. Нарастващ брой доказателства потвърждават, че метаболитните и сърдечносъдовите ефекти на затлъстяването са свързани с повишената синтеза на няколко адипоцитни компонента. Бялата мастна тъкан е важен секреторен и ендокринен орган, който изпълнява различни задачи, различни от това да складира мазнини (Trayhurn and Beattie, 2001).

Тези открития показват, че фокусирането върху клетъчната и метаболитната адаптивност на мастната тъкан може да открие нови терапевтични възможности за нарушения, свързани със затлъстяването (Lee et al., 2014) Регулирането на адипогенезата чрез нейните ключови механизми може да помогне в борбата със затлъстяването. Скорешни изследвания показват, че активирането на AMPK може да доведе до борба със затлъстяването. AMPK е ключов път за липидния метаболизъм, като регулира липогенезата, инсулиновата секреция и усвояването на глюкозата в много тъкани.

Упражненията или приемът на лекарства могат да предизвикат активиране на AMPK, което потенциално да се използва за лечение на затлъстяване или коригиране на метаболитните аномалии, свързани с диабет тип 2 (Hardie, 2010).

В настоящото проучване приложението на ВКД повишава теглото на ретроперитониалната, мезентериалната тъкан, като също така и индекса на общата мастна тъка. Диетата, която консумират гризачите, е по-калорична от конвенционалната диета и предизвиква висцерално затлъстяване, въпреки че не се наблюдава увеличаване на телесното тегло.

Намаляването на телесните мазнини до определена степен може да подобри баланса на вредните молекули и цялостното благосъстояние на ДНК при хора със затлъстяване. (Usman et al., 2018). В достъпната литература се откриват единични експериментални изследвания, разглеждащи потенциално благоприятно повлияване на затлъстяване от анетол. Резултатите от настоящия експеримент показват, че анетолът, приложен в достатъчно висока доза, е в състояние да предотврати развитието на висцерално затлъстяване при опитните животни. Подобни резултати докладват Kang et al., които прилагат транс-анетол на мишки, третирани с диета богата на мазнини (Kang et al., 2018). Според авторите на това изследване транс-анетолът стимулира превръщането на бялата мастна тъкан в кафява, активира кафявите адипоцити и промотира липидния катаболизъм, повлиявайки генната експресия в мастните клетки, като по този комплексен механизъм е в състояние да предотврати развитието на затлъстяване (Kang et al., 2018). Подобни ефекти върху генната експресия са установени върху чернодробна клетъчна линия от Song et al., според които транс-анетолът увеличава експресията на липолитичните гени и намалява тази на липогенните (Song et al., 2020).

Затлъстели мишки, харенени с висококалорична диета, намаляват наддаването на телесно тегло с около 27% в сравнение с контролните групи при третиране с анетол в дози 100 mg/kg. Анетол регулира липидния метаболизъм като намалява тегото на бялата мастна тъкан (БМТ) и увеличава това на кафявата (КМТ), като същевременно се повишават специфични за кафявите адипоцити гени и протеини (Kang et al., 2018). Хистологично също се потвърждава намаляването размера на адипоцита (Kang et al., 2018).

Според Masoudzadeh et. al добавянето на копър към храната на агнетта в концентрация 1 % количествено повишава експресията на гена DLK1 в мастната тъкан и намалява дебелината на гръбната мазнина (индекс на мобилизация или възстановяване на телесните резерви) в сравнение с контролната група, което показва, че DLK1 функционира като инхибитор на адипогенезата. Противно на очакванията, при концентрация 2%, където се наблюдава количествено по-висока генна експресия на DLK1, копърът не предизвиква разлика в дебелината на гръбната мастна тъкан (Masoudzadeh et al., 2020). Количеството на коремните мазнини при изследване на бройлери намалява незначимо в сравнение с контролната група, когато се използва естрагон на прах в концентрации 0,125, 0,25 и 0,5 процента (Hosseinzadeh et al., 2014). Приемът на транс-анетол в дози от 105 до 550 mg/kg телесно тегло на ден намалява натрупване на мазнини при плъхове (Truhaut et al., 1989). Анетол е също така и инхибитор на липидното пероксидиране (Stohs et al., 1986). Образуването на ROS е от съществено значение както за началото на адипоцитната диференциация, така и за активирането на гликогенсинтазната киназа при метаболизма на глюкозата (Rhee et al., 2016). Според Rhee et al антиадипогенното въздействие на анетола се дължи на неговата антиоксидантна активност и модулация на енергийния метаболизъм чрез потискане на mTOR (Rhee et al., 2018). Higuchi et. al установат, че антиоксидантните ензими като супероксиддисмутаза (СОД), каталаза и глутатион пероксидаза (GPX) се увеличават в hMSCs по време на адипогенезата. В клетките, подложени на адипогенеза, се наблюдава баланс между производството на ROS и ендогенните антиоксиданти. Подходите, насочени към ROS в адипоцитите, могат да доведат до нови начини за превенция и лечение на затлъстяването и метаболитния синдром (Higuchi et al., 2013). В условията на адипогенна индукция анетолът намалява натрупването на липиди в hMSC, без да променя цитотоксичността. Също така инхибира фосфорилирането на mTOR, PPAR и Akt. Важен факт е, че по време на адипогенната диференциация на hMSCs е установено активиране на AMPK в присъствието на анетол (Rhee et al., 2018). mTOR е идентифициран като значителен низходящ downstream ефектор в PI3K/Akt сигнализацията (Soumya et al., 2013), докато AMPK има анти-mTOR активност (Zhao et al., 2014). Анетол намалява фосфорилирането на mTOR, като същевременно увеличава фосфорилирането на AMPK (Rhee et al., 2018), което показва, че ROS имат ефект върху метаболитния път между

mTOR и AMPK, който може да бъде контролиран от анетол (Rhee et al., 2018). Приложението на анетол намалява свръхекспресията на адипогенни маркери и възстановява активирането на AMPK (Rhee et al., 2018). Всички тези взаимодействия водят до заключението, че анетолът е не само средство за отстраняване на ROS, но и инхибитор на адипогенните пътища, като Akt-mTOR-PPAR.

Апоптозата се контролира от няколко молекулярни сигнални пътища, включително митохондриални механизми. Семейството протеини BCL-2 строго регулира пропускливостта на митохондриалната външна мембрана по различни механизми. BCL-2 е идентифициран като решаващ регулатор на апоптозата, тъй като има способността да предпазва клетките от смърт, причинена от различни форми на увреждане, като радиация, химиотерапия или липса на растежни фактори (Kalkavan et al., 2017). Интегрирането на много вътреклетъчни сигнали от семейството на BCL-2, за да се определи дали клетката ще претърпи клетъчна смърт или оцеляване, е решаващ въпрос. В момента са открити общо тридесет члена, принадлежащи към семейството на BCL-2. Протеините от семейството BCL-2 могат да бъдат категоризирани в три категории въз основа на техните структурни прилики и функционални характеристики. Първата група се състои от BAX, BAK и BOK, които са активните ефектори на апоптоза. Втората група включва протеини само с BH3, докато третата група включва антиапоптотични протеини като BCL-2, BCL-xL, BCL-W, MCL-1 и A1 (Kalkavan et al., 2017). Смята се, че в здравите клетки BAX се намира в цитозола или непрекъснато се ретротранслокират от протеини, за да се избегне апоптоза (Kalkavan et al., 2017).

BCL-2 се открива в самообновяващи се популации от дълго живеещи стволови клетки, които се намират по базалната мембрана на различни епителни тъкани, като кожа, дебело черво и простата. Той обаче не присъства в напълно развитите клетки, които се намират на повърхността на тези тъкани. Смята се, че тези повърхностни клетки претърпяват програмирана клетъчна смърт, известна като апоптоза (Hockenbery, 1991).

Последните открития показват, че мастната тъкан функционира като динамичен орган, като постоянно генерира нови клетки и премахва адипоцитите чрез апоптоза. Това се случва както в нормални физиологични състояния, така и по време на болест (Prins et al. 1994). В настоящия експеримент висококалоричната диета повишава апоптотичния

потенциал на адипоцитите в ретроперитонеалната мастна тъкан. Приложението на анетол във високи дози значимо повишава този потенциал. С този резултат може да се обясни намаляването на ретроперитонеалната мастна тъкан, наблюдавана в текущото проучване. Според Zhu et al. (2015) индуцирането на митохондриални апоптотични събития в мастната тъкан, свързани с регулирането на протеините от семейството BCL-2 и други, може да бъде обещаващ терапевтичен подход за лечение за затлъстяване, чрез намаляване на броя на адипоцитите чрез индуциране на апоптозата.

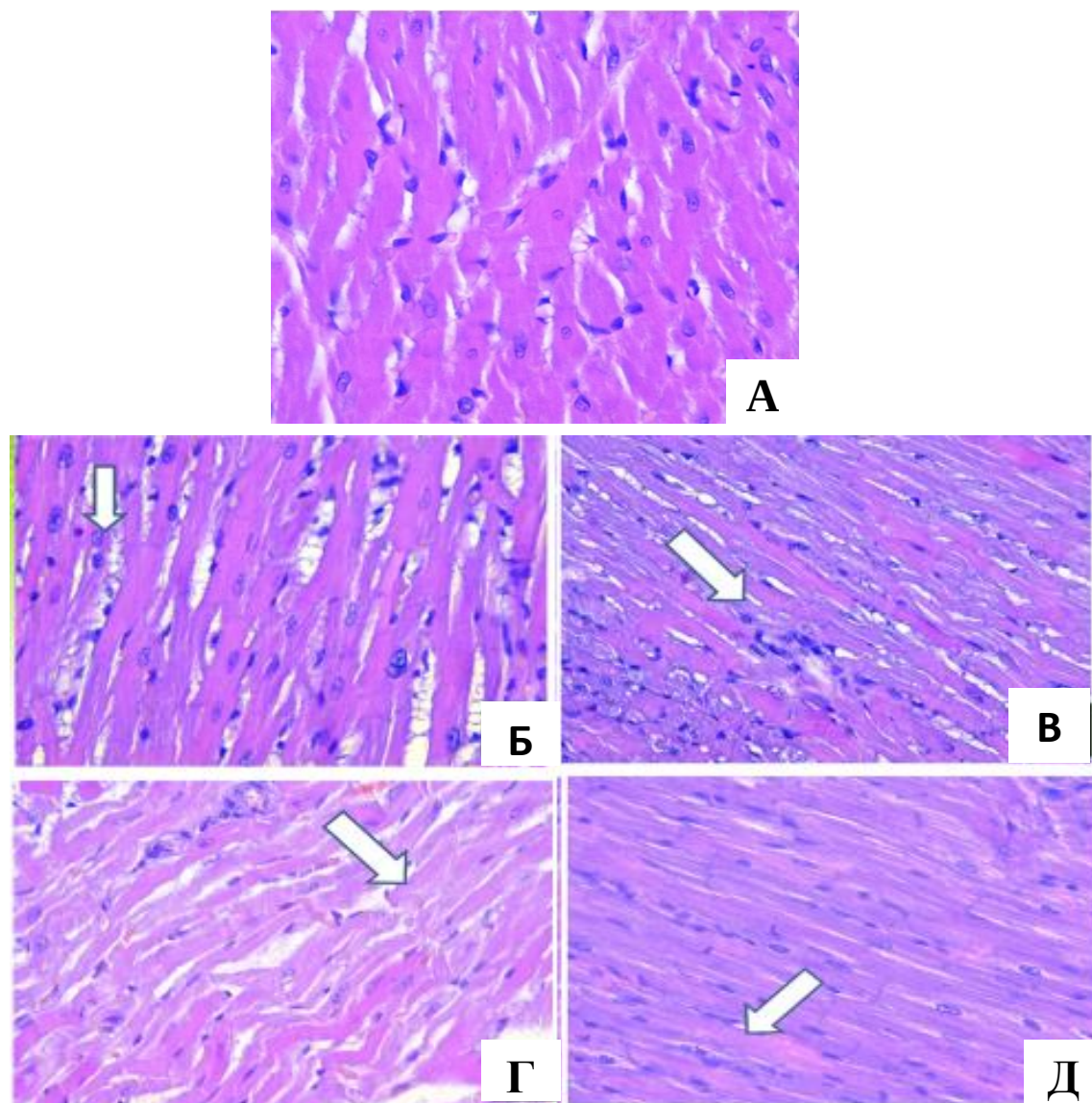
Хипергликемията е свързана с четирикратно увеличение на образуването на реактивни кислородни видове (ROS) в адипоцитите, което от своя страна насърчава възпалението (Lin et al., 2005).

5. Ефекти на анетол върху миокард и коронарни съдове

5.1. Хистология на миокард

Хистологичните резултати са показани на **Фигура 25**.

Миокардът на контролната група е с кардиомиоцити със сравнително еднаква дебелина. ВКД причинява увреждане на миокарда, кардиомиоцитите са с различна дебелина, раздалечени са и между тях се появяват вакуолизирани клетки, като също така са налични и кардиомиоцити с дегенеративни промени. Приложението на анетол, независимо от дозата, не успява да предотврати промените, предизвикани от затлъстяването в миокарда и те персистират.

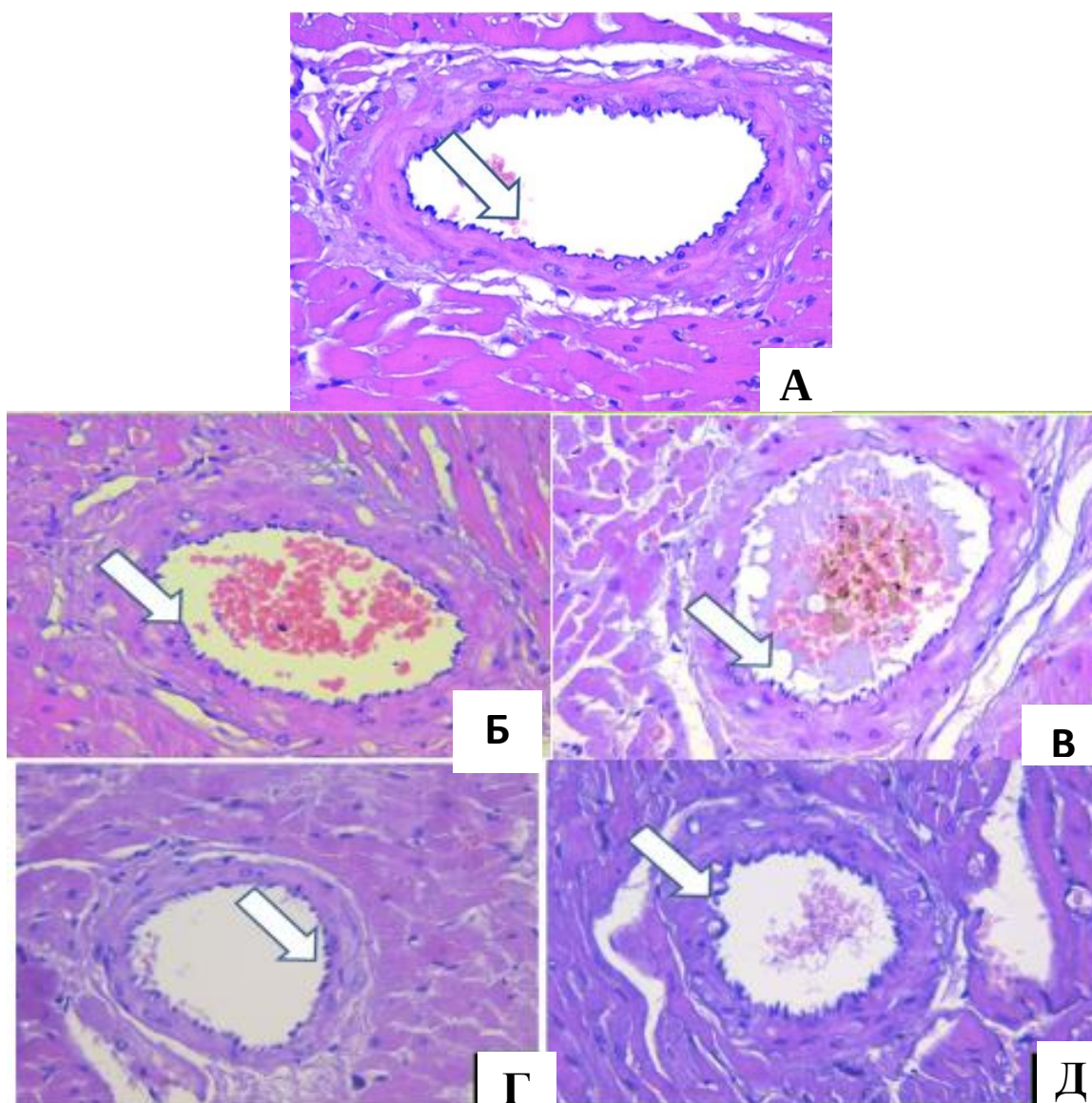


Фигура 25. Хистология на миокард при плъхове на висококалорична диета (панел Б), третиран с анетол в дози 62.5 mg/kg (панел В), 125 mg/kg (панел Г) и 250 mg/kg (панел Д); контролна група (панел А); оцветяване хематоксилин еозин; увеличение x 200

5.2. Хистология на коронарен съд

Хистологияните резултати са представени на **Фигура 26**.

Ендотеленият слой е добре изразен със запазена архитектура при плъховете от контролната група. Затлъстяването предизвиква увреждане на ендотела и настъпва фокална некроза на клетките. Приложението на анетол, независимо от дозата не успява да предотврати въздействието на висококалоричната диета, ендотелните клетки остават активирани, наблюдава се вакуолизация и има загуба на ендотелни клетки.



Фигура 26. Хистология на коронарен съд при плъхове на висококалорична диета (панел Б), третиран с анетол в дози 62.5 mg/kg (панел В), 125 mg/kg (панел Г) и 250 mg/kg (панел Д); контролна група (панел А); оцветяване хематоксилин еозин; увеличение x 200

5.3. Ефекти на анетол върху нивата на вещества, реагиращи с тиобарбитурова киселина (TBARS) в тъканен хомогенат от сърце

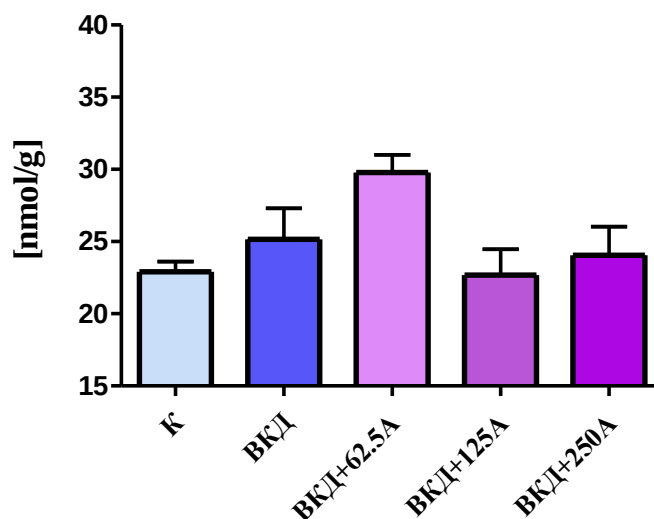
Фигура 27 и Таблица 19 показват нивата на TBARS в тъканен хомогенат от сърце. Консумацията на ВКД води до леко повишаване на нивата на TBARS със стойности 25.17

± 2.14 nmol/g, в сравнение с контролното ниво от 22.90 ± 0.72 nmol/g. Прилагането на анетол не променя нивата на TBARS в сърдечния хомогенат, въпреки че нивата на показателя са повишени при групата с доза 62.5 mg/kg анетол, като тази промяна е статистически незначима. Стойностите на TBARS в групи ВКД+125А и ВКД+250А не се различават от контролата.

Таблица 19. Нива на TBARS в хомогенат от сърце при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Нива на TBARS в хомогенат от сърце, измерени в nmol/g	22.90 ± 0.72	25.17 ± 2.14	29.79 ± 1.22	22.67 ± 1.79	24.06 ± 1.97

TBARS в миокард



Фигура 27. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху нивата на TBARS в тъканен хомогенат от сърце

5.4. Обсъждане

Изследванията сочат възможността дисрегулацията на имуновъзпалителните пътища да е основната причина за много сърдечно-съдови заболявания, включително инфаркт на миокарда. Това отваря нови, нетрадиционни терапевтични възможности за тези състояния (Lazzerini et al., 2019). Кардиомиоцитите учатват в сигнални пътища, които регулират увреждащите последствия, причинени от миокардния инфаркт (Gong et al., 2021). Тези пътища обхващат ядрения фактор капа В (NF-κB), тумор-некротизиращия фактор-алфа (TNF-α) и сигналните пътища на Т-клетъчния рецептор (TCR) (Matboli et al., 2022)

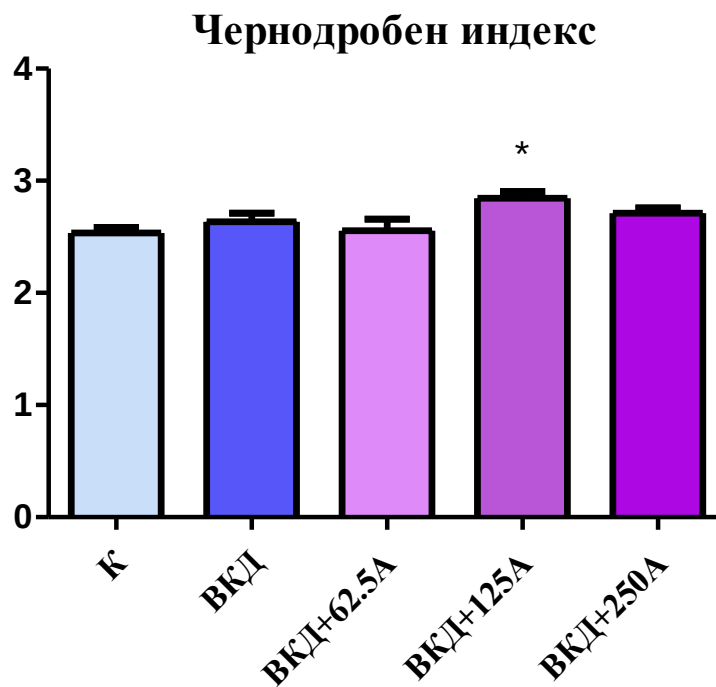
ВКД в текущото проучване уврежда миокарда и ендотела на съдовете, като биохимично не се наблюдава повишаване на липидната пероскидация в миокарда. Хистологично, анетолът не осъществява протективен ефект спрямо индуцираните от диетата промени. Биохимично, нивата на TBARS не се повлияват значително от анетол. Проучвания доказват, че анетол показва доза-зависим бимодален ефект върху контрактилитета на изолирана аорта на плъхове (Ryu et al., 2014). Анетолът намалява нивата на сърдечните ензими СК-МВ и тропонин, като демонстрира и подобрения в хистологичните характеристики на сърдечния мускул, придружени от значимо намаляване на сърдечната фиброза. Тези ефекти са наблюдавани в модел на исхемия/реперфузия, като също така плъховете, третирани с анетол показват значимо повишаване експресията на иРНК на VAV3, придружено от значимо намаляване на протеиновото ниво на TNF-κ в сърдечните тъкани. Освен това, по-високите дози на анетол имат по-голяма степен на ефикасност по отношение описаните кардиопротективни промени. Експерименталното вещество подобрява увреждането на сърдечната тъкан чрез потискане на активността на сърдечния възпалителен отговор, намалявайки нивата на TNF- α в сърдечната тъкан (Matboli et al., 2022). В друг модел на исхемия на сърце прилагането на анетол също нормализира биохимичните, молекулярните и хистопатологичните промени, предизвикани от исхемично-реперфузионни увреждания. Намалени са ензимите LDH, СК-МВ и сърдечния тропонин (Abdullah et al., 2023).

6. Ефекти на анетол върху черен дроб

6.1. Тегло на черен дроб и чернодробен индекс

Както е показано на **Таблица 20**, приемът на ВКД не предизвиква повишаване на телесното тегло на черния дроб. Третирането с анетол също не оказва влияние върху стойностите на показателя.

Стойностите на чернодробния индекс не се повишават от консумацията на ВКД. Пост тестът на Dunnett показва, че индексът е повишен при група ВКД+125А ($p < 0.05$) спрямо контролната група, докато при останалите третирани с анетол групи стойностите не се различават от тези на ВКД и контролата (**Таблица 20** и **Фигура 28**).



Фигура 28. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху чернодробния индекс; * $p < 0.05$ спрямо контролната група (К)

Таблица 20. Тегло на черен дроб (г), стойности на чернодробен индекс и нива на TBARS в хомогенат от черен дроб при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третиран с анетол (А) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250). Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; * $p < 0.05$ спрямо контролната група (К)

Група Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Тегло на черен дроб (г)	8.53 $\pm$ 0,4	8.98 $\pm$ 0.3	9.18 $\pm$ 0.4	9.67 $\pm$ 0.3	8.34 $\pm$ 0.3
Стойности на чернодробния индекс	2.54 $\pm$ 0.1	2.63 $\pm$ 0.08	2.56 $\pm$ 0.1	2.84 $\pm$ 0.06 *	2.71 $\pm$ 0.1
Нива на TBARS в хомогенат от черен дроб (nmol/g)	54.29 $\pm$ 3.7	56.48 $\pm$ 3.8	47.35 $\pm$ 2.0	49.32 $\pm$ 2.7	51.01 $\pm$ 2.2

6.2. Ефекти на анетол върху нивата на вещества, реагиращи с тиобарбитурова киселина (TBARS) в тъканен хомогенат от черен дроб

Прилагането на висококалорична диета в продължение на 10 седмици не показва съществени промени върху нивата на чернодробните TBARS (**Таблица 20**). Третирането с анетол не показва достоверна разлика за показателя (ANOVA: $F = 1.491$, $P = 0.2212$).

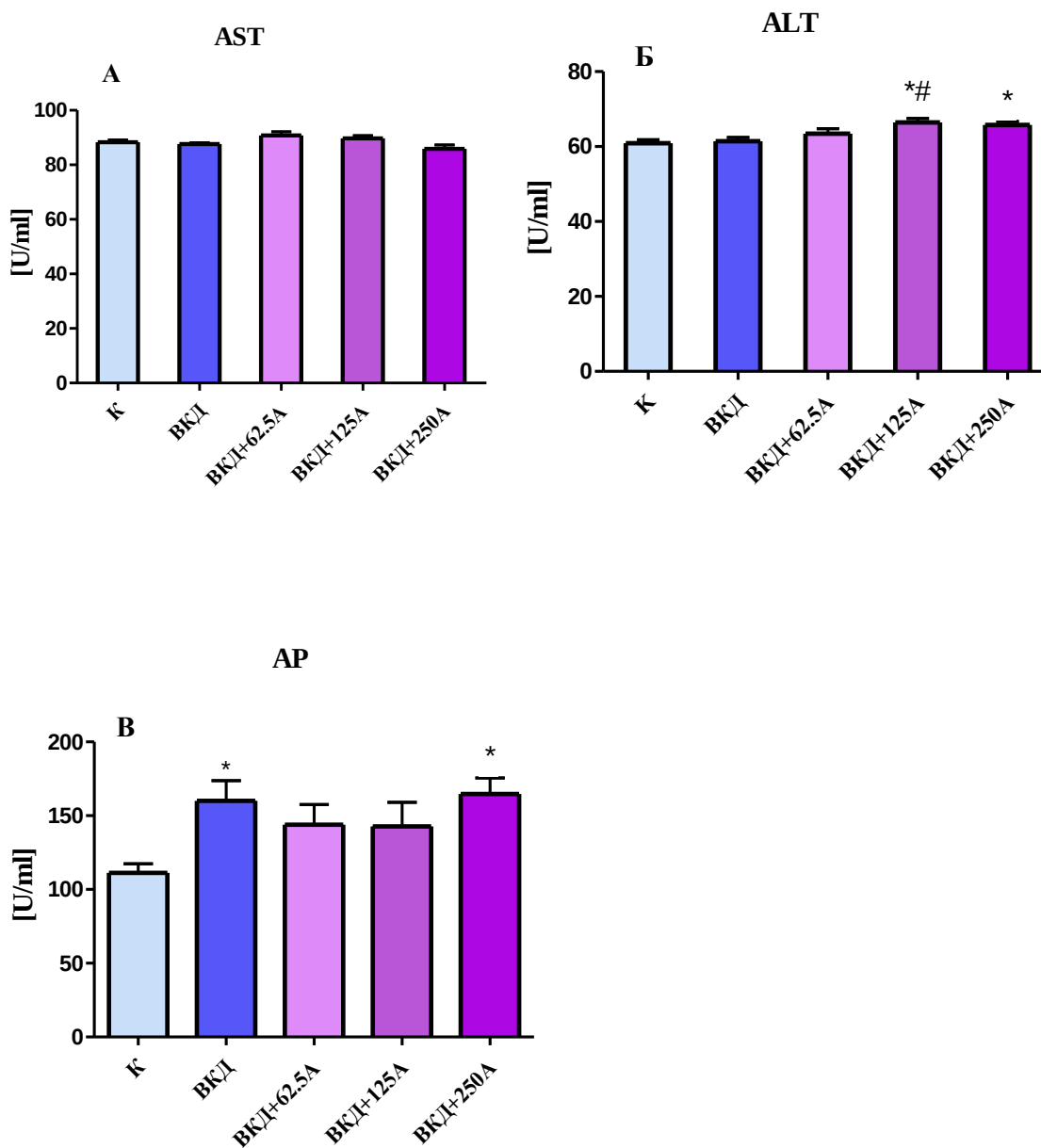
6.3. Чернодробни ензими- аспартат аминотрансфераза (AST), аланин аминотрансфераза (ALT), алкална фосфатаза (AP)

Стойностите на серумната концентрация на AST, ALT, AP са показани на **Фигура 29** и **Таблица 21**. Нивата на ALT не се индуцират от приема на ВКД. ANOVA анализът показва статистически значими разлики между експерименталните групи при серумните нива на ALT: $F = 4.811$, $P = 0.0033$. Пост тестът на Dunnett показва статистически значимо

повишаване на показателя в групата ВКД+125А ($66,4 \pm 1,09$ U/L) ($p < 0,05$) в сравнение с групите ВКД ($61,4 \pm 1,06$ U/L) и К ($60,92 \pm 0,89$ U/L). При серумните нива на АСТ също не се наблюдава повишаване от консумацията на ВКД. Еднопосочният анализ ANOVA показва значим ефект: $F(4, 40) = 3.093$, $P = 0.0261$. Dunnet's multiple comparison тестът не показва значими разлики в анетол-третираните групи. Стойностите на серумната АР са значимо повишени при ВКД групата спрямо контролната ($p < 0.05$), като тези промени персистират и при групата, третирана с анетол във високи дози ($p < 0.05$ спрямо К). ВКД+62,5А и ВКД+125А не показват статистически значима разлика в нивата на ензима в сравнение с контролата.

Таблица 21. Нива на серумните АСТ, АЛТ и АР при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; * $p < 0.05$ спрямо контролната група (К); # $p < 0.05$ спрямо група ВКД

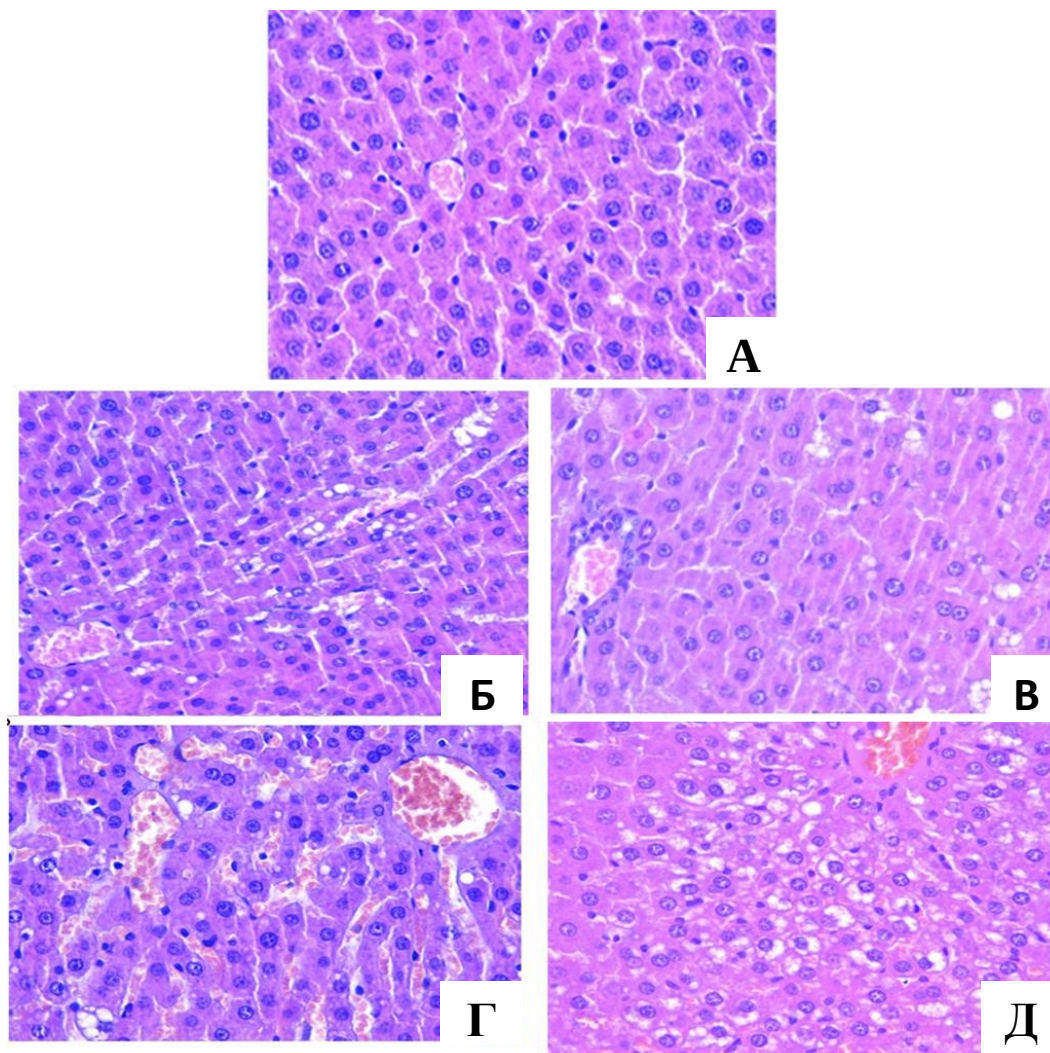
Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
АСТ	88.26 ± 0.88	87.60 ± 0.54	90.80 ± 1.33	89.74 ± 0.96	85.87 ± 1.41
АЛТ	60.92 ± 0.90	61.40 ± 1.07	63.40 ± 1.38	66.40 ± 1.10 *#	65.79 ± 0.93 *
АР	111.3 ± 6.17	$160.1 \pm 13.63^*$	143.9 ± 13.6	142.7 ± 16.44	$164.8 \pm 10.88^*$



Фигура 29. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (БКД) в дози 62.5 mg/kg (БКД+62.5A), 125 mg/kg (БКД+125A) и 250 mg/kg (БКД+250A), върху нивата на AST (Панел А), ALT (Панел Б) AP (Панел В); * $p < 0.05$ спрямо контролната група (К); # $p < 0.05$ спрямо група БКД

6.4. Хистология на черен дроб

Хепатоцитите на гризачите от контролната група са със запазена архитектура, като добре личат чернодробните гредички. При затлъстяване се развива дребнокапчеста стеатоза, която обхваща всички зони на чернодробното делче, но промените са най-изразени около *v. centralis*. Тежестта на промените в група, третирана с ниска доза анетол, не се различават от тези в група ВКД. По-високите дози на анетол също не променят съществено структурните промени на черния дроб. Наблюдават се хепатоцити с дегенеративни и възпалителни промени (Фигура 30).

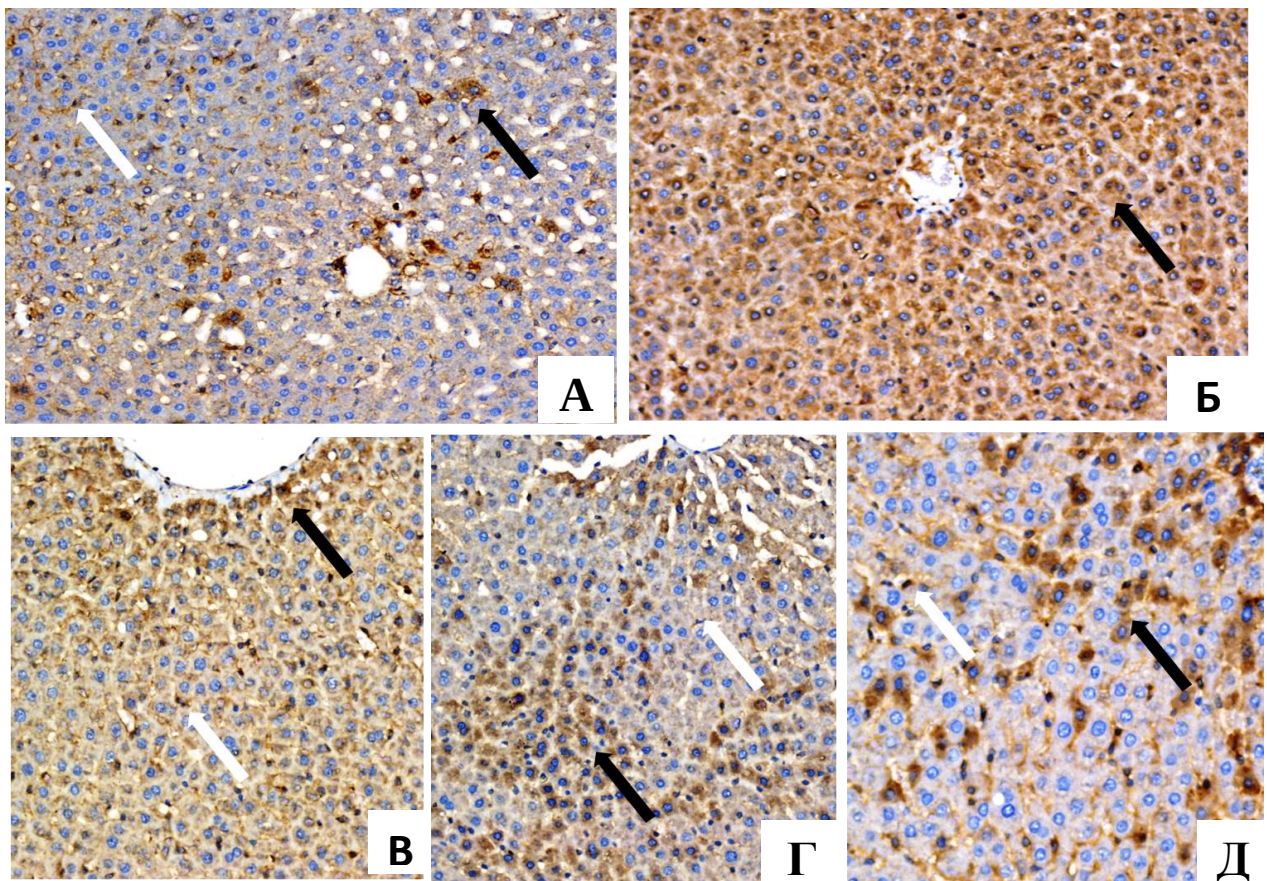


Фигура 30. Хистология на черен дроб при плъхове на висококалорична диета (панел Б), третиран с анетол в дози 62.5 mg/kg (панел В), 125 mg/kg (панел Г) и 250 mg/kg (панел Д); контролна група (панел А); оцветяване хематоксилин еозин; увеличение x 200

6.5. Имунохистохимия на черен дроб

6.5.1. Експресия на ВАХ в черен дроб

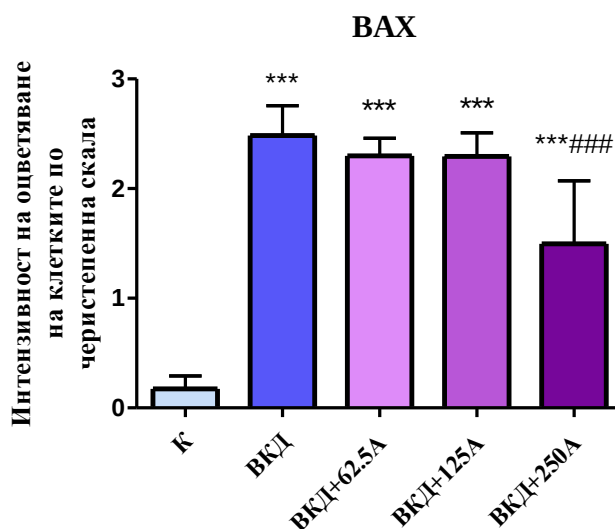
Маркерът ВАХ в контролната група се експресираща в синусоиди и в отделни хепатоцити (**Фигури 31 и 32, Таблица 22**). Консумацията на ВКД води до значимо повишаване на ВАХ апоптотичен протеин в хепатоцитите ($p < 0.001$ спрямо контрола). Експресията на ВАХ в групите ВКД+62.5А и ВКД+125А е в хепатоцити и синусоиди, като остава близка до група ВКД, докато в група ВКД+250А е значимо намалена ($p < 0.001$ в сравнение с ВКД), но остава по-висока от контролното ниво ($p < 0.001$).



Фигура 31. Експресия на апоптотичния маркер ВАХ в черен дроб при плъхове на висококалорична диета (панел Б), третиран с анетол в дози 62.5 mg/kg в панел В (ВКД+62.5А), 125 mg/kg в панел Г (ВКД+125А) и 250 mg/kg в панел Д (ВКД+250А); контролна група (панел А); бяла стрелка – синусоидални клетки, черна стрелка – хепатоцити; увеличение x 200

Таблица 22. Експресия на апоптотичния маркер ВАХ в черен дроб при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; *** $p < 0.0001$ спрямо контролната група (К), ### $p < 0.0001$ спрямо ВКД група

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Интензивност на оцветяване на клетките за ВАХ в черен дроб по черистепенна скала	0.18 $\pm$ 0.05	2.48 $\pm$ 0.10 ***	2.30 $\pm$ 0.07 ***	2.30 $\pm$ 0.06 ***	1.50 $\pm$ 0.16 ***####

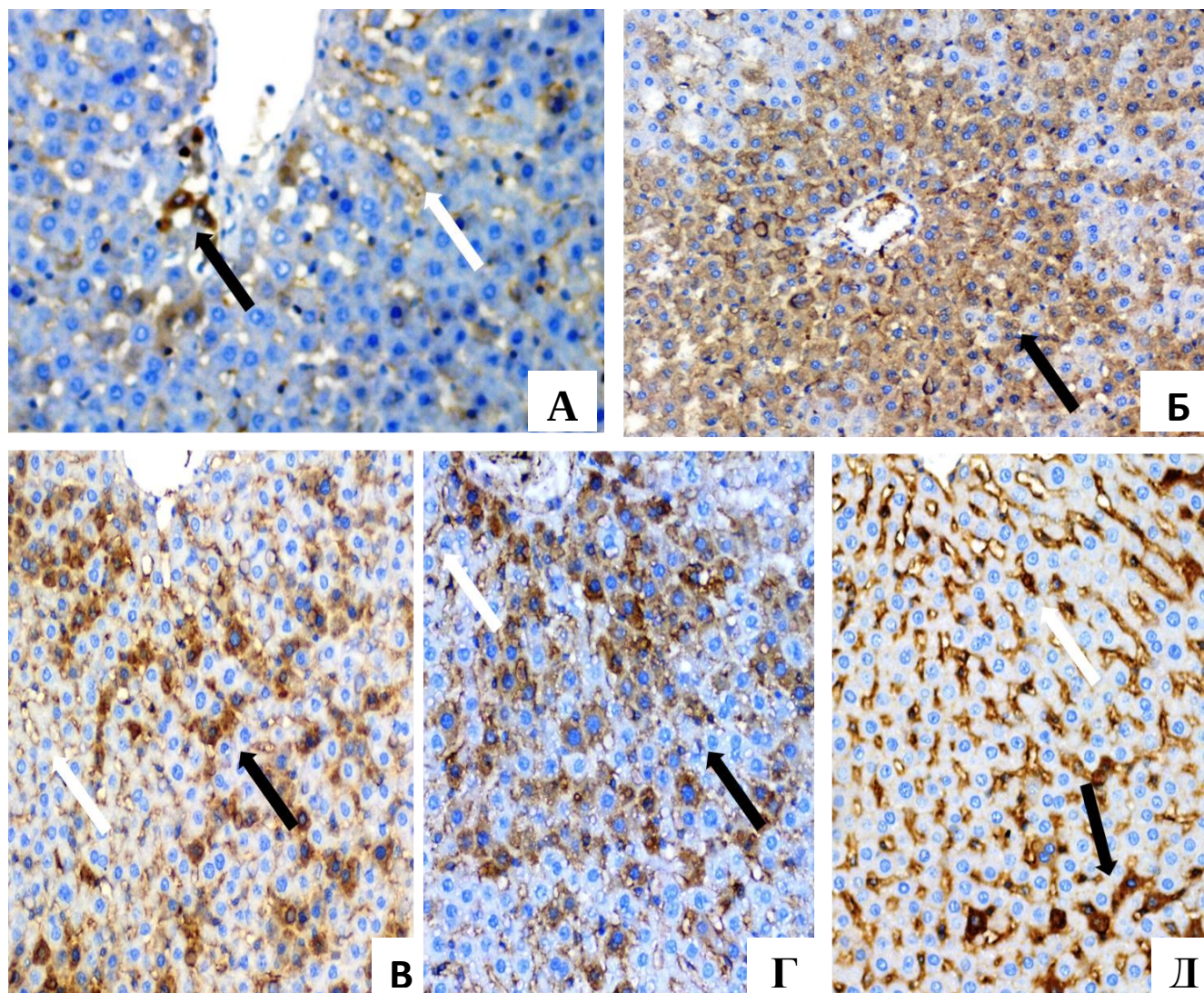


Фигура 32. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху апоптотичния маркер ВАХ в черен дроб; *** $p < 0.001$ спрямо контролната група (К), ### $p < 0.001$ спрямо ВКД група

6.5.2. Експресия на BCL-2 в черен дроб

Експресия на BCL-2 в чернодробния паренхим на контролната група се открива предимно в синусоиди и в отделни хепатоцити (Фигури 33 и 34, Таблица 23). Според

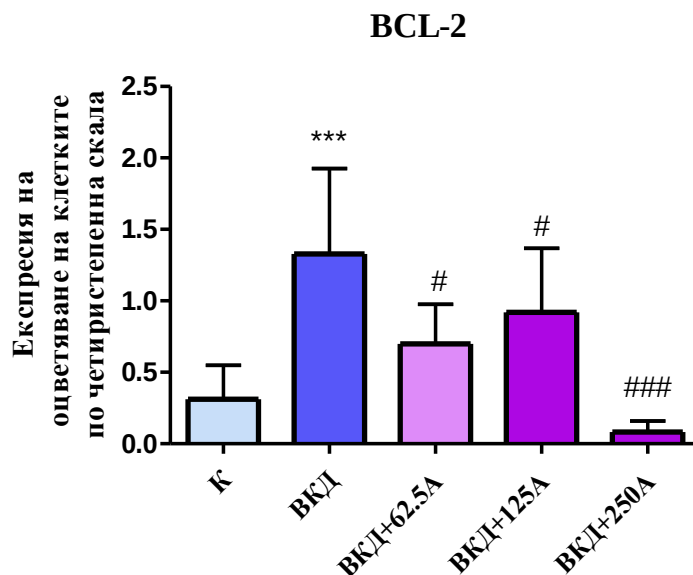
One-way ANOVA антиапоптоичният протеин BCL-2 е значимо повишен ($p < 0,001$ спрямо контролата) в група ВКД, като се експресира предимно в хепатоцитите. Приложението на анетол намалява експресията на BCL-2 в сравнение с ВКД: при групи ВКД+62.5А и ВКД+125А със значимост $p < 0.05$ и при ВКД+250А – с $p < 0.001$.



Фигура 33. Експресия на антиапоптоичния маркер BCL-2 в черен дроб при плъхове на висококалорична диета (панел Б), третирани с анетол в дози 62.5 mg/kg в панел В (ВКД+62.5А), 125 mg/kg в панел Г (ВКД+125А) и 250 mg/kg в панел Д (ВКД+250А); контролна група (панел А); бяла стрелка – синусоидални клетки, черна стрелка – хепатоцити; увеличение x 200

Таблица 23. Експресия на антиапоптоичния маркер BCL-2 в черен дроб при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; *** $p < 0.001$ спрямо контролната група (К); # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ спрямо ВКД група

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Интензивност на оцветяване на клетките за BCL-2 в черен дроб по четиристепенна скала на поле	0.31 ± 0.07	1.33 ± 0.17 ***	0.7 ± 0.11 #	0.92 ± 0.12 #	0.08 ± 0.02 ###



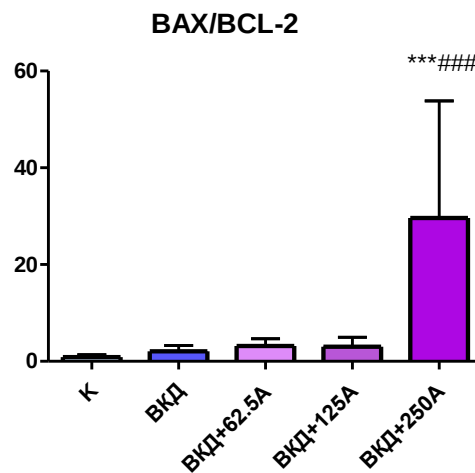
Фигура 34. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху антиапоптоичния маркер BCL-2 в черен дроб; *** $p < 0.001$ спрямо контролната група (К); # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ спрямо ВКД група

6.5.3. Съотношение BAX/BCL-2

Dunnet's multiple comparison post-hoc test не показва значимо повишаване на съотношението BAX/BCL-2 в група ВКД. Няма значими разлики в съотношението BAX/BCL-2 между анетол-третираните групи, с изключение на групата с ВКД+250А, за която съотношението е значимо повишено ($p < 0,001$) в сравнение както с контролната, така и с ВКД групата (Таблица 24 и Фигура 35).

Таблица 24. Съотношение BAX/BCL-2 в черен дроб при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; *** $p < 0.001$ спрямо контролната група (К); ### $p < 0.001$ спрямо ВКД група

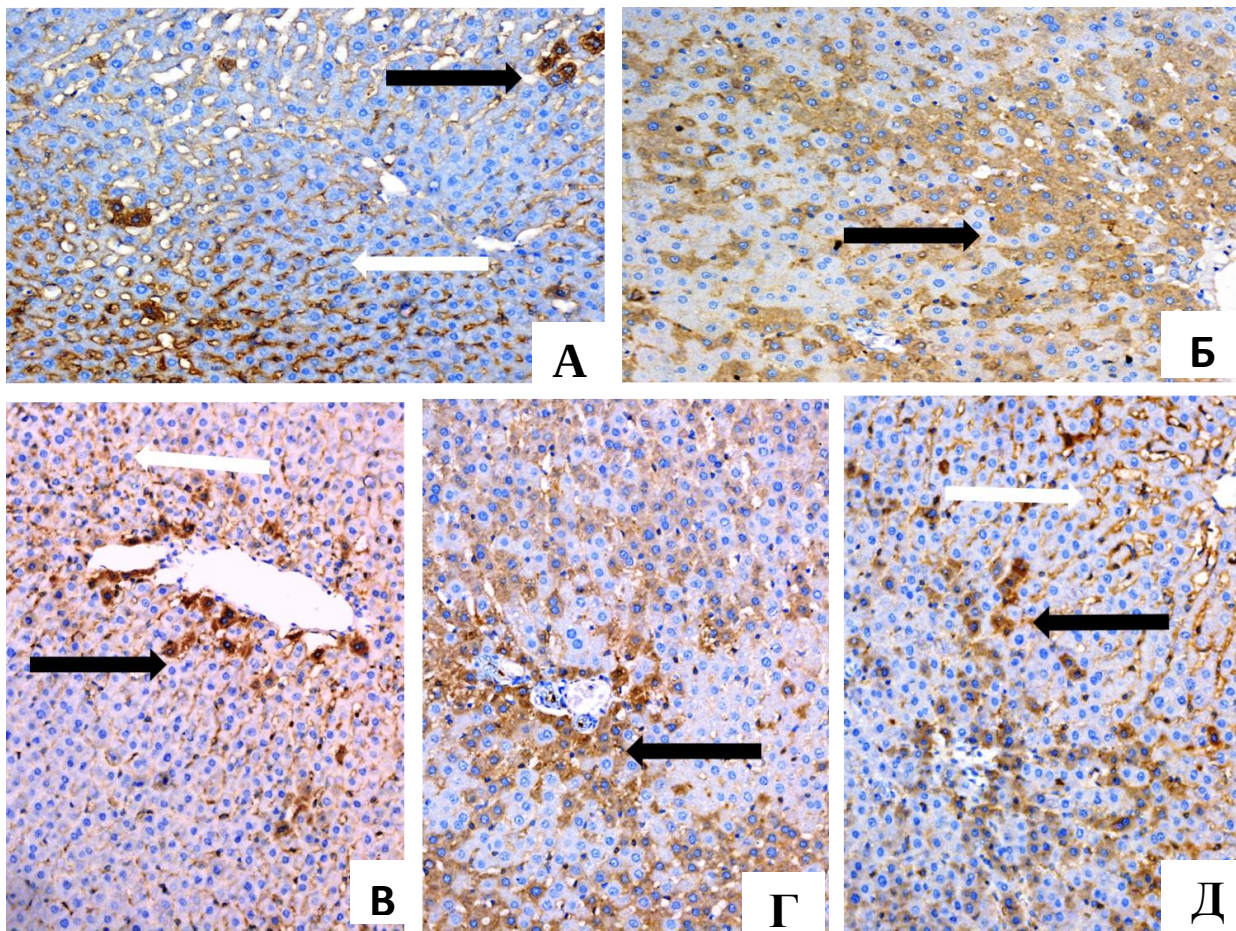
Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Съотношение BAX /BCL-2	0.86 ± 0.20	2.10 ± 0.45	3.16 ± 0.69	3.00 ± 0.56	29.62 ± 6.72 ***###



Фигура 35. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху съотношение BAX /BCL-2 в черен дроб; * $p < 0.05$ спрямо контролната група; ### $p < 0.001$ спрямо ВКД група

6.5.4. Експресия на MAC387

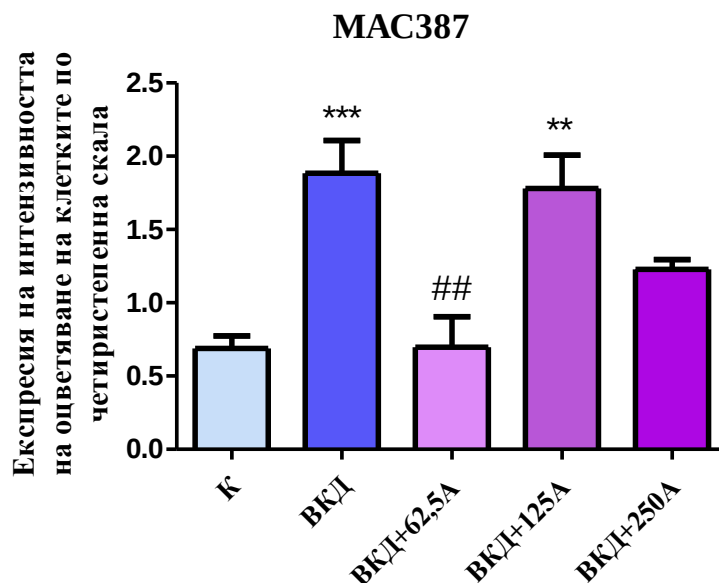
Както е показано на **Таблица 25** и **Фигури 36** и **37**, MAC387 в контролната група се експресира в синусоидални клетки (бяла стрелка) и в отделни хепатоцити (черна стрелка). Висококалоричната диета индуцира повишаване експресията на MAC387 спрямо контролата ($p < 0.001$). Третирането с анетол в дози 62.5 mg/kg предотвратява индуцираните промени ($p < 0.01$), като маркерът се експресира в синусоидални клетки и единични хепатоцити. Стойностите на високата доза на анетол 250 mg/kg остават близки до тези на контролата с експресия на маркера в синусоидални клетки и хепатоцити.



Фигура 36. Експресия на провъзпалителния маркер MAC387 в черен дроб при плъхове на висококалорична диета (панел Б), третирани с анетол в дози 62.5 mg/kg в панел В (ВКД+62.5А), 125 mg/kg в панел Г (ВКД+125А) и 250 mg/kg в панел Д (ВКД+250А); контролна група (панел А); бяла стрелка – синусоидални клетки, черна стрелка – хепатоцити

Таблица 25. Експресията на MAC387 в черен дроб при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M; **p<0.01, ***p<0.001 спрямо контролната група (К); ##p<0.01 спрямо ВКД

Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Експресия на оцветяването на клетките по четиристепенна скала за маркера MAC387 на поле	0.69 $\pm$ 0.09	1.88 $\pm$ 0.22 ***	0.70 $\pm$ 0.21 ##	1.78 $\pm$ 0.23 **	1.23 $\pm$ 0.07



Фигура 37. Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху експресия на MAC387 в черен дроб; **p<0.01 , ***p<0.001 спрямо контролната група (К); ##p<0.01 спрямо ВКД

6.6. Обсъждане

Чернодробните увреждания и дисфункция са широко признати като значителни здравни проблеми, които са достигнали пандемични нива в световен мащаб. Неалкохолната мастна чернодробна болест (НАМЧБ) е най-често срещаното хронично

заболяване на черния дроб с честота до 25% в световен мащаб. Честотата му е тясно свързана със затлъстяване (Kim et al., 2018). НАМЧБ и затлъстяването имат общи патофизиологични механизми, като ключов фактор е инсулиновата резистентност. В хепатоцитите хиперинсулинемията увеличава синтеза на мастни киселини "de novo". Чернодробният синтез на триглицериди се индуцира от повишеното съдържание на свободни мастни киселини в хепатоцитите и медираната от инсулин "up"-регулация на липогенните ензими (Kim et al., 2018). Като мярка за нормалното състояние на черния дроб се използват ALT и AST. AST се съдържа в различни тъкани, включително в мускулите (Bovera, 2007), но предимно е признат като маркер за чернодробната функция. Алкалната фосфатаза (AP) и гама-глутамилтрансферазата (GGT) са широко признати като индикатори за обструкция на жлъчния поток, по-специално за налягането на холестазата (Al-Amoudi, 2017). Когато мембраните на чернодробните клетки са увредени, изтичането на вътреклетъчните ензими в циркулацията води до повишаване на серумните нива на ALT и AST. ALT е силно специфичен за чернодробната тъкан и високата му серумна концентрация е индикатор за чернодробно увреждане (Engelmann et al., 2017; Sookoian et al., 2015). Разпределението на AST е предимно митохондриално (Engelmann et al., 2017).

Консумацията на ВКД не предизвиква хепатомегалия, промяна в липидната пероксидация на хепатоцитите или увеличаване на нивата на AST и ALT в експерименталните животни. За сметка на това се наблюдава стеатоза, повишени стойности на AP и повишен маркер за възпаление MAC387. Процеси като липотоксичност, оксидативен стрес и чернодробната *de novo* липогенеза са отговорни за метаболитни ефекти на фруктозата като инсулинова резистентност, затлъстяване, захарен диабет тип 2, повишено кръвно налягане, натрупването на липиди в черния дроб, което води до хепатомегалия (Tappy et al., 2010). Приложението на анетол не антагонизира хистологичните последици от диетата, а по отношение на биохимичния показател ALT даже влошава промените. По отношение на възпалителния маркер MAC387 ниските дози анетол предотваряват индуцираното от затлъстяването възпаление.

Според литературните данни анетолът допринася за намаляване на серумните нива на IL-1 β , TNF- α , ALT и AST, чието производство се повишава при възпаление на черния дроб, предизвикано от интраперитониално инжектиране на липополизахарид (LPS) и

повишава нивото на IL-10. В допълнение, количествата на IL-6 и TNF- α са намалени, а на IL-10 повишени и в черния дроб на групите, които приемат транс-анетол. Освен това, във възпаления черния дроб на бройлерите се наблюдава намаляване нивата на ядрения фактор карпа В р65 (NF- κ B р65) и експресията на TNF- α mRNA от анетол, като същевременно нивата на IL-10 и инхибитора на NF- κ B alpha (I κ B α) са увеличени (Tong et al., 2022; Purum et al., 2013).

Транс-анетол в дози 600 mg/kg предотвратява и предизвиканото от LPS остро възпаление на йеюнум при бройлери. Механизмите, чрез които се осъществява това са намаляване на активирането на NF- κ B, повишено ниво на IL-10 и понижено ниво IL-1 β в тъканта (Tong et al., 2022). Антиоксидантните показатели СОД, КАТ в тъкан от черен дроб на зайци, третирани с масло от копър са с по-високи концентрации спрямо контролната група (Imbabi et al., 2021).

Нивата на AST, ALT и AP в кръвта са значимо намалени ($p \leq 0.05$) при плъхове на високомастна диета, допълнена с анетол 20 mg/kg (Noreen et al., 2023). Транс-анетолът повлиява чернодробното увреждане, предизвикано от CCl₄, като намалява активността на AST, ALT и AP в дози от 160 mg/kg телесно тегло. Този ефект се наблюдава при 4-седмично третиране (Pandit et al., 2022). Претретирането с хидроалкохолен екстракт от семена на *Foeniculum vulgare* (копър) понижава нивата на ALT, AL и AST в серума на зайци при парацетамол-индуцирана хепатотоксичност (Nazir et al., 2020).

При други проучвания, третирането с масло от копър не променя серумните нива ALT на здрави зайци, докато стойностите на AST са значимо понижени (Imbabi et al., 2021).

Hosseinzadeh и Farhoomand (2014) стигат до заключението, че добавянето на 0,5 % естрагон (с високо съдържание на естрагол и анетол) на прах към храната за бройлери води до несигнификантно намаляване на теглото на черния дроб (Hosseinzadeh et al., 2014). Добавянето на масло от копър със съдържание 75 % анетол не показва статистически значими ефекти върху теглото на черния дроб (Imbabi et al., 2021).

Други проучвания получават сходни на нашите резултати. Според проучване от 1989 г. продължителната консумация на големи дози транс-анетол при женски плъхове причинява увреждане на черния дроб и малък брой чернодробни тумори (Truhaut et al.,

1989). Открити са хистологично няколко чернодробни аномалии при приложението на анетол в дози от 105 до 550 mg/kg телесно тегло на ден около 117 седмици, като са засегнати предимно възрастните плъхове. Лезиите включват модифицирани клетъчни клъстери, нодуларна хиперплазия, доброкачествени и злокачествени тумори, като по-често срещани в най-високата доза 1% и женският пол превалира (Truhaut et al., 1989). Проучванията показват, че постоянната консумация на големи дози транс-анетол води до редица вредни ефекти върху клетките, включително цитотоксичност, клетъчна некроза и клетъчен растеж. Хепатотоксичност е докладвана при плъхове по време на дългосрочни диетични опити, когато изчисленото дневно производство на анетол в черния дроб е надхвърлило 30 mg анетол на килограм телесно тегло. При женски плъхове се наблюдава хронична хепатотоксичност и слаба поява на чернодробни тумори при консумация на храна, съдържаща 550 mg транс-анетол на килограм телесно тегло всеки ден.

Оксидативният стрес има ефект на нарушаване на липидната пероксидация в хепатоцитите, което може да доведе до тяхното огромно натрупване. Хепатоцитите са увредени от хронична оксидативна стрес-индуцирана регулация на цитохром P450 2E1 (CYP2E1), въпреки че точният механизъм, водещ до клетъчна смърт, свързана с CYP2E1, все още не е известен (Seki et al., 2005).

Чернодробната стеатоза засяга производството на протеини, които са едновременно про- и антиапоптотични (Wang et al., 2017). Хепатоцитната апоптоза допринася за увреждане на черния дроб и фиброза, докато апоптозата на активираните звездовидни клетки (HSC) помага за ограничаване на чернодробната фиброза (Canbay et al., 2004). Също така, повишената експресия на BCL-2 и намалената на BAX играят роля за намаляване на негативните ефекти на индуцираната от реперфузия апоптоза. Тези изводи са постигнати чрез изследване на хеми-чернодробната артерия (Jin et al., 2012). Голям процент от холангиокарциномите са с положително оцветяване за BCL-2, докато хепатоцелуларния карцином е отрицателен за BCL-2. Освен това, половината от метастатични аденокарциноми експресират BCL-2. Също така, протеинът BCL-2 служи като отличителна характеристика на холангиокарцином, но не и на хепатоцелуларен карцином. Този протеин може потенциално да помогне за разграничаването на тези два вида първични чернодробни злокачествени заболявания (Charlotte et al., 1994). Експресия

на BCL-2 се наблюдава в жлъчните каналчета и епитела на малките жлъчни пътища в нормалния черен дроб, поради което могат да имат удължен живот, докато хепатоцитите и епителът на големите жлъчни пътища не показват никаква експресия на BCL-2. Пролифериралите епителни клетки на каналчетата при цироза и фокалната нодуларна хиперплазия са BCL-2-положителни.

В здрави клетки, BAX се предполага да бъде неактивен и не е необходимо да бъде контролиран от антиапоптотични BCL-2 протеини (Kalkavan et al., 2017). В настоящия експеримент анетол във високи дози повишава отношението BAX/BCL-2, даващо информация за проапоптотичен фенотип. В достъпната литература липсват данни за ефект на анетол върху маркери на апоптоза/антиапоптоза на черен дроб в модел на затлъстяване. Анетол намалява проапоптотичния протеин p53 и онкогена Cyclin D (свързан с агресивна форма на хепатоцелуларен карцином) имунохистохимично при индуцирано от въглероден тетрахлорид увреждане на черния дроб при плъхове (Pandit et al., 2022).

MAC387 е употребен като маркер на възпаление. Всички видове хронични чернодробни заболявания показват повишена експресия на макрофаговия маркер CD68 и MAC387+ моноцитни макрофаги в порталните пътища (Saldarriaga et al., 2020). ВКД повиши експресията на маркера. Анетолът в ниски дози намалява експресията на маркера, благодарение на противовъзпалителните си свойства.

7. Ефекти на анетол върху карагенан-индуциран оток на задна лапа

7.1. Резултати

Резултатите по отношение на обема на отока на задна лапа на експерименталните животни са представени в **Таблицы 26 и 27** и **Фигура 38**.

Инжектирането на карагенан на задна лапа на плъховете индуцира остро възпаление във всички групи. Карагенан-индуцираният оток в група ВКД нараства постепенно от 0.16 ± 0.05 на 30-та минута до $0,78 \pm 0.04$ на 5-тия час. Липсва статистическа значимост на стойностите на отока при всички групи при всички часове.

Таблица 26. Стойности на оток на задна лапа при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез ВКД, третирани с анетол в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ S.E.M

Група	Обем на отока на 30- та минута	Обем на отока на 1- ви час	Обем на отока на 2- ри час	Обем на отока на 3ти час	Обем на отока на 4-ти час	Обем на отока на 5ти час
ВКД	0.16 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.03	0.72 $\pm$ 0.04	0.84 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.04
ВКД+62.5А	0.11 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.06	0.70 $\pm$ 0.04	0.84 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.06
ВКД+125А	0.20 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.14	0.69 $\pm$ 0.06	0.83 $\pm$ 0.07	0.97 $\pm$ 0.06
ВКД+250А	0.15 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.05	0.35 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.05	0.76 $\pm$ 0.06	0.79 $\pm$ 0.05

Таблица 27. Инхибиция на обема на задна лапа (%) при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез ВКД, третирани с анетол в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg.

Група	Инхибиция на обема на отока на 30-та минута	Инхибиция на обема на отока на 1-ви час	Инхибиция на обема на отока на 2-ри час	Инхибиция на обема на отока на 3ти час	Инхибиция на обема на отока на 4-ти час	Инхибиция на обема на отока на 5ти час
ВКД+62.5А	31 %	22%	-34%	3%	липсва	-15%
ВКД+125А	-27%	12%	-51%	3%	1%	-24%
ВКД+250А	8%	10%	-38%	18%	9%	-1%

7.1. Обсъждане

Моделът на възпаление обикновено се използва за оценка на ефикасността на противовъзпалителните лекарства (Winter et al., 1962; Grau, 1991). Cuzzocrea et al. (1998) откриват, че хистаминът, активирацият тромбоцитите фактор и метаболитите на арахидоновата киселина се генерират, когато възникне оток, предизвикан от карагенан.

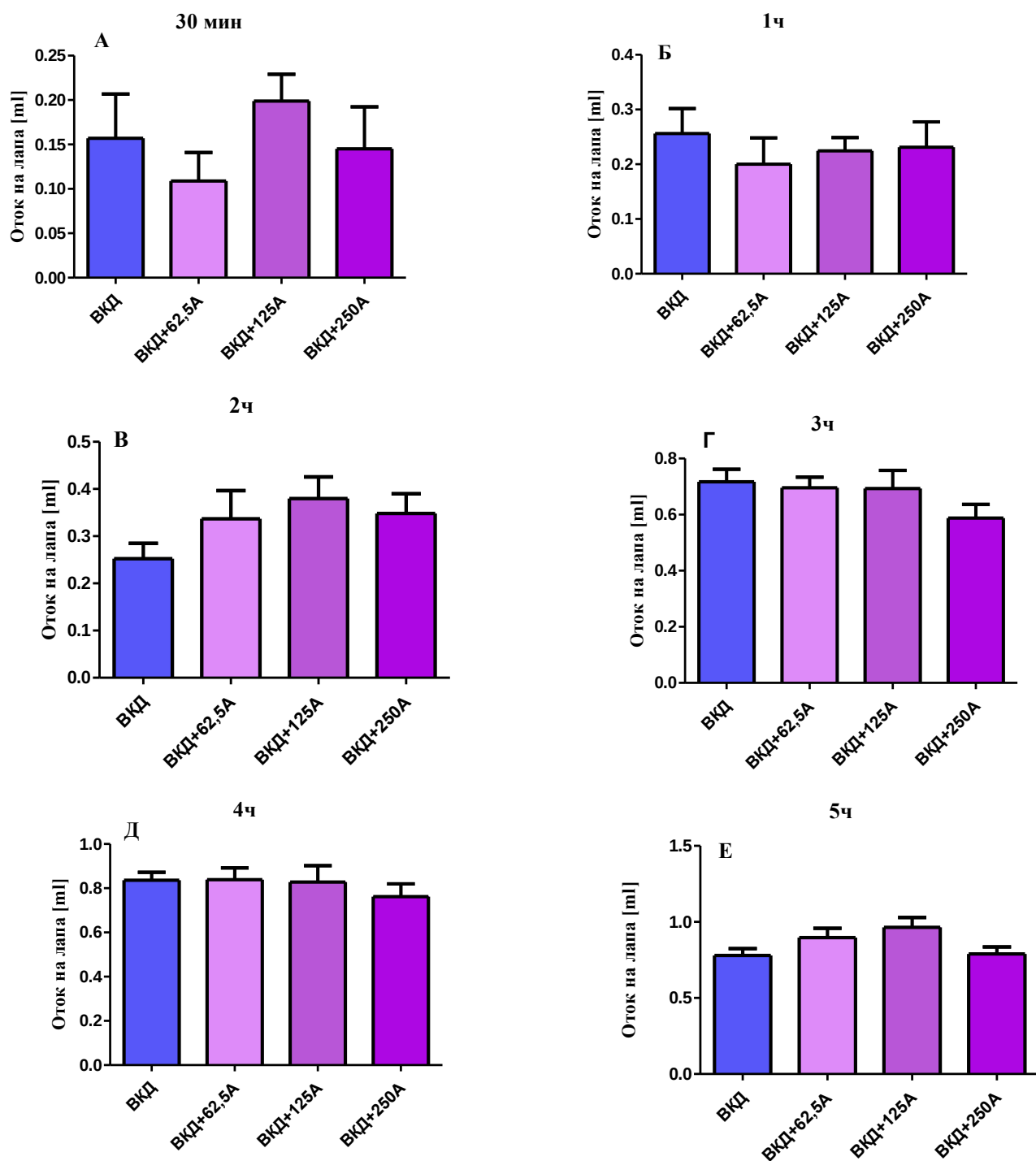
Неутрофилите претърпяват миграция и агрегация на мястото на възпалението, като част от забавения възпалителен отговор. По време на този процес неутрофилите освобождават реактивни кислородни видове, протеолитични ензими и други медиатори.

Нискостепенното възпаление е връзката между затлъстяването и инсулиновата резистентност, което води до последващи увреди в болшинството органи (Khanna et al., 2022). Маснатият тъкан секретира множество фактори като адипонектин, TNF- α и други, причина за нискостепенното възпаление. В настоящия експеримент затлъстяването не предизвиква възпаление (Trayhurn and Beattie, 2001). Третирането с анетол не потиска възпалителния отговор.

Редица проучвания доказват противовъзпалителния ефект на анетол. Анетолът води до намаляване на количеството провъзпалителни макрофаги и неутрофили, както и на провъзпалителните медиатори (Marinov and Valcheva-Kuzmanova, 2015). Освен това, изследване на анетол при модел на болка показва намаляване на освобождаването на възпалителни медиатори (Alessandra et al., 2014.). Установено е, че анетолът притежава инхибиращи свойства по отношение на генерирането на NO и PGE2, които участват в регулирането на неимунни остри възпалителни заболявания. Намалени са обемът на плевралния ексудат и броят на левкоцитите (Domiciano et al., 2015). Модулира възпалителните цитокини (TNF- α , IL-6, IL-1 β), ядрения фактор κ B (NF- κ B) и апоптотичното състояние в мозъчния хомогенат и серум. Анетолът намалява експресията на аквапорин 1 (AQP1) и стимулира активността на протеин киназа A (PKA). Сигнален път, свързан със синовиоцитите, който ефективно потиска клетъчното възпаление и смърт в модел на възпаление, предизвикано от H₂O₂ (Huang et al., 2024). Въпреки факта, че тези ефекти безспорно се предизвикват от анетол, възможно е те да се предизвикват от фармакологично активни чернодробни метаболити на самото вещество (Domiciano et al., 2013). Анетолът оказва противовъзпалително действие при перидонтит чрез потискане на провъзпалителните молекули, включително IL-1 β и TNF- α , като този ефект е сравним с ефектите, наблюдавани при кетопрофен (Moradi et al., 2014).

Анетол медира клетъчните реакции към TNF. Той ефикасно потиска активирането на NF- κ B, предизвикано от TNF. Допълнително потиска активирането на NF- κ B, предизвикано от различни възпалителни агенти (Chainy et al., 2000).

Анетолът потиска индуцирания от карагенан оток в дози от 3, 10 и 30 mg/kg във времевия диапазон от 60 до 240 минути след индукцията. Времевият диапазон показва, че анетолът предотвратява отока, причинен от субстанция Р, брадикинин, хистамин и TNF- α (Ponte et al., 2012). Прилагането на анетол в дози от 62,5 mg/kg, 125 mg/kg и 250 mg/kg ефективно намалява броя на левкоцити, включително и мононуклеарните и полиморфонуклеарните левкоцити при плъхове с индуциран гъбичков артрит (Wisniewski et al., 2024). Анетол е свързан с Т-клетъчен рецепторен сигнален път (Yea et al., 2006).



Фигура 28. Ефект на анетол, прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху карагенан-индуциран оток на 30-та мин (А), 1-ви час (Б), 2-ри час (В), 3-ти час (Г), 4-ти час (Д) и 5-ти час (Е)

V. ИЗВОДИ

1. Приложението на висококалорична диета в продължение на 10 седмици при мъжки Wistar плъхове индуцира затлъстяване. При опитните животни се повишава калорийният внос, което води до:
 - 1.1. Поведенчески нарушения – тревожност и нарушена пространствена памет;
 - 1.2. Биохимични нарушения – нарушен глюкозен толеранс, повишени стойности на алкалната фосфатаза, намалени серумни нива на супероксид дисмутаза, повишена липидна пероксидация в мозъка;
 - 1.3. Висцерално затлъстяване;
 - 1.4. Органни изменения, доказани хистопатологично:
 - 1.4.1. В миокарда – раздаличаване на кардиомиоцитите и вакуолизирани клетки, наличие на дегенеративни промени;
 - 1.4.2. В коронарните съдове – фокална некроза на ендотелните клетки;
 - 1.4.3. В ретроперитонеалната мастна тъкан – адипоцитна хипертрофия;
 - 1.4.4. В черения дроб – дребнокапчеста стеатоза;
 - 1.5. Повишени апоптоза и възпаление, доказани имунохистохимично:
 - 1.5.1. В ретроперитонеална мастната тъкан:
 - 1.5.1.1. Повишена експресия на про-апоптотичния BAX маркер, без промяна на антиапоптотичния BCL-2 маркер; Повишено съотношение BAX/BCL-2;
 - 1.5.1.2. Дифузна и значима експресия на про-инфламаторния маркер MAC387;
 - 1.5.2. В черния дроб:
 - 1.5.2.1. Дифузна и значитима експресия както на BAX, така и на BCL-2;
 - 1.5.2.2. Повишена експресия на про-инфламаторния MAC387.
2. Анетолът при субхронично приложение в хода на индукцията на затлъстяване повлиява някои от показателите на енергийния метаболизъм, поведението и органните промени, предизвикани от висококалоричната диета:
 - 2.1. Анетолът повишава значимо калорийния внос:

- 2.1.1. Значимо доза-зависимо повишава консумацията на храна във всички дози в сравнение с нетретираните групи;
- 2.1.2. Значимо повишава приема на фруктозен разтвор в доза 125 mg/kg.
- 2.2. Анетолът намалява наддаването на тегло в доза 250 mg/kg, независимо от повишения калориен внос.
- 2.3. Анетолът води до някои поведенчески промени:
 - 2.3.1. Не повлиява двигателната активност;
 - 2.3.2. Предотвратява индуцираната от висококалоричната диета тревожност в доза 62.5 mg/kg, установено чрез повишаване на времето на социално взаимодействие между опитните животни;
 - 2.3.3. Проявява тенденция за намаляване на депресивната симптоматика във всички приложени дози, за което свидетелства скъсяването на времето на неподвижност в теста за принудително плуване;
 - 2.3.4. Доза-зависимо подобрява пространствената памет, значимо в дози 125 и 250 mg/kg, като повишава индекса за разпознаване на местоположението на обекти.
- 2.4. Анетолът предизвиква промени в някои биохимични и клинично-лабораторни показатели:
 - 2.4.1. Не повлиява кръвната глюкоза на гладно, но в хода на глюкозотолерантния тест в доза от 250 mg/kg нормализира нарушения от висококалоричната диета глюкозен толеранс;
 - 2.4.2. Не повлиява нивата на серумните триглицериди и общия холестерол;
 - 2.4.3. Приложен в доза 125 mg/kg, значимо повишава нивата на аланин аминотрансфераза и не променя нивата на аспартат аминотрансфераза и алкална фосфатаза;
 - 2.4.4. Подобрява антиоксидантната защита на организма, като нормализира нивата на понижаваната от висококалоричната диета серумна супероксид дисмутаза в доза 250 mg/kg;
 - 2.4.5. Нормализира повишената от висококалоричната диета липидна пероксидация в мозъка във всички приложени дози;

- 2.4.6. Не променя нивата на липидна пероксидация в хомогенат от миокард, черен дроб и серум;
- 2.4.7. Не повлиява времето на кръвосъсирване.
- 2.5. Анетолът предизвиква промени в тъканните индекси:
 - 2.5.1. Понижава индекса на ретроперонеалната мастна тъкан в доза 250 mg/kg и постига стойности на индекса на общата мастна тъкан, близки до контролните в същата доза;
 - 2.5.2. Не променя значимо индексите на мезентериална, перигонадна и паранефрална мастна тъкан спрямо групата на висококалорична диета, но в доза 62.5 mg/kg повишава индекса на паранефрална мастна тъкан спрямо контролата;
 - 2.5.3. Не променя значимо чернодробния индекс спрямо групата на висококалорична диета, но в доза 125 mg/kg значимо повишава чернодробния индекс спрямо контролата;
- 2.6. Анетолът повлиява някои от органните промени, доказани хистологично в сравнение с групата на висококалорична диета:
 - 2.6.1. Не предотвратява увреждането на миокарда;
 - 2.6.2. Не антагонизира фокалната некроза в ендотела на коронарните съдове;
 - 2.6.3. В доза 250 mg/kg намалява значимо размера на адипоцитите в ретроперитонеалната мастна тъкан, като се постига морфологията на контролните мастни клетки;
 - 2.6.4. Не показва протективен ефект срещу дребно-капчестата стеатоза в черния дроб на затлъстелите плъхове.
- 2.7. Анетолът променя експресията на маркери на апоптоза/антиапоптоза и възпаление, доказани имунохистохимично:
 - 2.7.1 В ретроперитонеалната мастна тъкан в сравнение с групата на висококалорична диета:
 - 2.7.1.1. Експресията на апоптотичния маркер BAX е понижена от доза 125 mg/kg и повишена от доза 250 mg/kg;

2.7.1.2. Наблюдава се тенденция за намаляване на антиапоптотичния маркер BCL-2 от дози 62.5 и 125 mg/kg;

2.7.1.3. Съотношението BAX/BCL-2 е повишено значимо в доза 250 mg/kg;

2.7.1.4. Експресията на MAC387 не е променена от анетола.

2.7.2. В черения дроб в сравнение с групата на висококалорична диета:

2.7.2.1. Експресията на BAX е понижена значимо в доза 250 mg/kg;

2.7.2.2. Експресията на BCL-2 е понижена значимо при всички използвани дози, като най-изразн е ефектът в доза 250 mg/kg;

2.7.2.3. Съотношението BAX/BCL-2 е повишено значимо в доза 250 mg/kg;

2.7.2.4. Експресията на MAC387 е значимо понижена в доза 62.5 mg/kg.

2.7. Анетолът не повлиява карагенан-индуцирания оток на задната лапа при плъхове на висококалорична диета.

VI. ПРИНОСИ

1. За първи път са получени данни за ефекти за анетол върху консумацията на храна, течности и калориен внос при плъхове в експериментален модел на диетично-индуцирано затлъстяване, като са установени:
 - 1.1. Повишаване на консумацията на храна;
 - 1.2. Повишаване на приема на течности;
 - 1.3. Повишаване на калорийния внос.
2. За първи път са изследвани ефекти на анетол върху поведението при плъхове с експериментален модел на диетично-индуцирано затлъстяване, като са установени:
 - 1.1. Антианксиогенен ефект;
 - 1.2. Тенденция за намаляване на депресивната симптоматика;
 - 1.3. Подобряване на пространствената памет.
3. За първи път са получени данни за ефекта на анетол върху глюкозния толеранс и липидната пероксидация в мозъка при плъхове с експериментален модел на диетично-индуцирано затлъстяване, като са установени:
 - 2.1. Подобряващ глюкозния толеранс ефект;
 - 2.2. Потискане на липидната пероксидация в мозъка.
4. За първи път са получени данни за анетол върху хистологични находки в ретроперитонеалната мастна тъкан при плъхове с експериментален модел на диетично-индуцирано затлъстяване, като е установен антагонизиращ ефект спрямо индуцираното от висококалоричната диета уголемяване на адипоцитите.
5. За първи път са получени данни за ефекти на анетол върху програмираната клетъчна смърт в ретроперитонеална мастна тъкан и черен дроб при плъхове с експериментален модел на диетично-индуцирано затлъстяване, като е установено повишаване на проапоптотичния фенотип в ретроперитонеална мастната тъкан и черния дроб.
6. За първи път са получени данни за намаляване експресията на възпалителния маркер MAC387 в черния дроб от анетол в експериментален модел на диетично-индуцирано затлъстяване.

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

Списък на публикациите:

1. **E. Rafailova**, S. Gancheva, K. Moneva, M. Todorova, M. Eftimov, M. Reyzov, M. Zhelyazkova-Savova, S. Valcheva-Kuzmanova. Effect of anethole on liver aminotransferases in rats with dietary induced metabolic syndrome. Сборник към XVIII Национална конференция с международно участие "Природни науки'2020"; 50-54
2. **Е. Рафаилова**, С. Ганчева, К. Монева, М. Тодорова, М. Ефтимов, М. Рейзов, М. Желязкова-Савова, Ст. Вълчева-Кузманова; Ефект на анетол върху висцералното затлъстяване и серумните нива на триглицериди и холестерол при плъхове на висококалорична диета. Варненски медицински форум, 10, 2021, прил. 3, 27-32
3. **Рафаилова Е**, Тодорова М, Монева К, Рейзов М, Ганчева С, Ефтимов М, Желязкова-Савова М, Вълчева-Кузманова С; Ефекти на анетол върху поведението при плъховес експериментален модел на затлъстяване. Наука и младост 2022 г. приложение от III та Национална научна конференция „Дръзновение и младост във фармакологията 2022”, 133-138
4. **Е. Рафаилова**, С. Кузманова-Вълчева. Антиобезен ефект на избрани монотерпени – обзор. Сборник доклади от Двадесет и първа национална научна сесия за студенти и преподаватели „С визия към бъдещето“, Посветена на 75-годишнината от създаването на Медицински колеж към МУ – Плевен, 27-28 октомври 2023 г. 215-223
5. **Е. Рафаилова**, С. Вълчева-Кузманова. Последици за здравето от затлъстяването – обзор. Варненски медицински форум, т. 13, 2024, Online First; <https://journals.mu-varna.bg/index.php/vmf/issue/view/582>

Списък на участията:

1. K. Moneva, D. Pavlov, K. Kuzmanov, M. Todorova, S. Gancheva, **E. Rafailova**, M. Eftimov, M. Reyzov, M. Zhelyazkova-Savova, S. Valcheva-Kuzmanova „Evaluation of the effect of anethole on carrageenan-induced paw edema in metabolic rats“, Book of

- abstracts from Jubilee Scientific Conference “45 years Medical University - Pleven”, 12,.123,.2019.
2. S. Gancheva, K. Kuzmanov, D. Pavlov, M. Todorova, K. Moneva, M. Eftimov, M. Reysov, **E. Rafailova**, V. Kuzmanova, A. Kuzmanov, S. Todorov, M. Zhelyazkova-Savova „Effect of metabolic syndrome on carrageenan-induced paw edema in rats“, Book of abstracts from Jubilee Scientific Conference “45 years Medical University - Pleven”, 12, 116-117, 2019.
 3. **E. Rafailova**, S. Gancheva, K. Moneva, M. Todorova, M. Eftimov, M. Reysov, M. Zhelyazkova-Savova, S. Valcheva-Kuzmanova; Effect of anethole on liver aminotransferases in rats with dietary induced metabolic syndrome. XVIII Национална конференция с международно участие "Природни науки'2020" , 2-4 октомври 2020г; януари 2021г
 4. **Е. Рафаилова**, С. Ганчева, К. Монева, М. Тодорова, М. Ефтимов, М. Рейзов, М. Желязкова-Савова, Ст. Вълчева-Кузманова; Ефект на анетол върху висцералното затлъстяване и серумните нива на триглицериди и холестерол при плъхове на висококалорична диета . Юбилейна научна конференция "60 години Патопфизиология- Медицински университет Варна" , 24-25.09.2021г ,
 5. М. Цанева, **Е. Рафаилова**, С. Ганчева , М. Ефтимов, М. Рейзов, К. Монева, М. Тодорова, М. Желязкова-Савова, С. Вълчева-Кузманова; Ефект на анетол върху хистопатологичните промени в сърце, черен дроб и мастна тъкан при плъхове в модел на метаболитен синдром. XIII НАЦИОНАЛЕН КОНГРЕС ПО ПАТОЛОГИЯ, 10-12 септември 2021 г., гр. Бургас
 6. **Рафаилова Е**, Тодорова М, Монева К, Рейзов М , Ганчева С, Ефтимов М, Желязкова-Савова М, Вълчева-Кузманова С; Ефекти на анетол върху поведението при плъхове с експериментален модел на затлъстяване III та Национална научна конференция „Дръзновение и младост във фармакологията 2022”, 30 септември - 02 октомври 2022 год., Цигов чарк
 7. **Rafailova, E.**,Gancheva, S.,Eftimov, M.,Reyzov, M.,Moneva, K.,Todorova, M.,Zhelyazkova-Savova, M.,Valcheva-Kuzmanova, S.; Effect of anethole on anxiety in

rats on a high-calorie diet . 35th ECNP Congress, 15-18 Октомври 2022, Виена, Австрия

8. **Rafailova, E.**, Gancheva, S., Eftimov, M., Reyzov, M., Moneva, K., Todorova, M., Zhelyazkova-Savova, M., Valcheva-Kuzmanova, S. Effect of anethole on spatial memory in rats on a high-calorie diet ; 35th ECNP Congress, 15-18 Октомври 2022, Виена, Австрия
9. **Rafailova E**, Valcheva-Kuzmanova S. Obesity and organ damage – a review. Осми фармацевтичен бизнес форум и Научно-практическа конференция „Фармацевти и лекари – обединени в подкрепа на пациента“, 28-29 октомври, Варна, България. Scripta Scientifica Pharmaceutica, 9, Suppl. 1, 2022, p. 26.
10. **Е. Рафаилова**, С. Ганчева, М. Тодорова, К. Монева, М. Рейзов, М. Ефтимов, М. Желязкова-Савова, С. Вълчева-Кузманова. Ефекти на анетол върху нивото на кръвната глюкоза в глюкозо-толерантен тест при плъхове с експериментален модел на затлъстяване. Осми конгрес по фармация с международно участие, 27-30 април 2023, к.к. Боровец; стр.198; file:///E:/START.html
11. **Rafailova E.**, Gancheva S., Todorova M., Moneva K., Reyzov M., Eftimov M., Zhelyazkova-Savova M., Valcheva-Kuzmanova S. Anethole dose-dependently affects liver apoptosis/anti-apoptosis by regulating BAX/BCL-2 signaling pathways in rats on a high-calorie diet; 5th ICNPU: from Plants to Pharmacy Shelf, 30 May – 2 June, Sts. Constantine & Helena resort, Bulgaria. p.232
12. **E. Rafailova** , S. Gancheva , K. Moneva-Marinova , M. Reyzov , M. Eftimov , M. Todorova , M. Zhelyazkova-Savova , S. Valcheva-Kuzmanova. Anethole prevents high-calorie diet-induced brain lipid peroxidation in rats and normalizes superoxide dismutase activity. Neuroscience Applied, Volume 2, Supplement 2, 2023, 103315. 36th ECNP Congress, 7-10 October 2023, Barcelona, Spain
13. **E. Rafailova**, St. Valcheva-Kuzmanova. Potential anti-cancer activity of anethole – a review. Девети Фармацевтичен Бизнес Форум и Научно-практическа конференция „Факултет „Фармация“ – 15 години традиции, иновации, перспективи“ 20 – 21 октомври 2023, гр. Варна, к.к. „Слънчев ден“

14. **Елис Рафаилова**, Стефка Кузманова-Вълчева. Антиобезен ефект на избрани монотерпени – обзор. Двадесет и първа национална научна сесия за студенти и преподаватели „С визия към бъдещето“, Посветена на 75- годишнината от създаването на Медицински колеж към МУ – Плевен, 27-28 октомври 2023

Награди от Конференции:

1. Excellence award на 35 ECNP, 2022, Виена, Австрия за абстракта „Effect of anethole on spatial memory in rats on a high-calorie diet“- E. Rafailova, S. Gancheva, M. Eftimov, M. Reyzov, K. Moneva, M. Todorova, M. Zhelyazkova-Savova, S. Valcheva-Kuzmanova
2. Excellence award на 36 ECNP, 2023, Барселона, Испания за абстракта "Anethole prevents high-calorie diet-induced brain lipid peroxidation in rats and normalizes superoxide dismutase activity "- E. Rafailova, S. Gancheva, K. Moneva-Marinova, M. Eftimov, M. Reyzov M. Todorova, M. Zhelyazkova-Savova, S. Valcheva-Kuzmanova
3. 3-та награда при доклади на докторанти от Девети Фармацевтичен Бизнес Форум и Научно-практическа конференция „Факултет „Фармация“ – 15 години традиции, иновации, перспективи“ 20 – 21 октомври 2023, гр. Варна, к.к. „Слънчев ден“ за доклада „ Potential anti-cancer activity of anethole – a review“ - E. Rafailova, St. Valcheva-Kuzmanova

Извазвам най-сърдечните благодарности на моя научен ръководител – проф. Стефка Вълчева-Кузманова, на доц. Силвия Ганчева, на доц. Мария Желязкова-Савова, на проф. Мария Цанева за търпението, подкрепата, напътствията при осъществяване на дисертационния труд. Благодаря на всички колеги, участвали в експерименталната част на научното изследване. Поднасям благодарности на целия колектив от Катедрата за разбирането и съветите, които получих.