



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ
„ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“-ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И КЛИНИЧНА ФАРМАКОЛОГИЯ И
ТЕРАПИЯ**

Веселин Петров Маринов

**ФАРМАКОЛОГИЧНО ПРОУЧВАНЕ НА ЕФЕКТИТЕ НА
БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА ОТ РАСТИТЕЛЕН
ПРОИЗХОД В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЕН МОДЕЛ НА
ВЪЗПАЛИТЕЛНИ ЧРЕВНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ**

Автореферат

на дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен

„Доктор“

по научна специалност „Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)“

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

Научен консултант: Проф. д-р Мария Ангелова Цанева, д.м.

Варна, 2020 г.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на Катедрен съвет на Катедрата по фармакология и клинична фармакология и терапия при Медицински университет – Варна, състояло се на 10.06.2020 г., и е насочен за публична защита пред научно жури в състав:

- 1. Проф. д-р Стефка Вълчева-Кузманова, д.м.н. – председател (становище)*
- 2. Проф. д-р Иванка Илиева Костадинова, д.м.н. (рецензия)*
- 3. Проф. д-р Петко Пенков Маринов д.м. (рецензия)*
- 4. Доцент д-р Румен Павлов Николов, д.м. (становище)*
- 5. Доцент д-р Делян Пенев Делев, д.м. (становище)*

Дисертационният труд съдържа общо 190 страници, онагледен е с 59 фигури и 43 таблици. Книгописът включва 336 заглавия на латиница и 6 на кирилица.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 30.09.2020 г. от 10.00 ч. в електронната платформа „Blackboard“ 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

ANO1 – Anoctamin-1

COX – Cyclooxygenase

fMLF – N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine

FOXP3 – Forkhead box P3 protein

GM-CSF – Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

IBD – Inflammatory bowel disease

ICAM-1 – Intercellular adhesion molecule-1

IFN γ – Interferon gamma

IL – Interleukin

iNOS – Inducible nitric oxide synthase

I κ B – Inhibitor of nuclear factor kappa B

JAK – Janus kinase

LPS – Lipopolysaccharide

MAdCAM-1 – mucosal addressin cell adhesion molecule-1

MAPK – Mitogen-activated protein kinase

MUC2 – Mucin 2

NF-AT – Nuclear factor of activated T cells

NF- κ B – Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK – Natural killer cells

NOD2 – Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2

PG – Prostaglandin

PPAR- γ – Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

STAT – Signal transducer and activator of transcription

TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances

TGF- β – Transforming growth factor beta

TNF (TNF α) – Tumor necrosis factor (tumor necrosis factor alpha)

БК – Болест на Крон

ВЧЗ – Възпалителни чревни заболявания

ГИТ – Гастроинтестинален тракт

ГК – Галова киселина

РАС – Реактивни азотни съединения

РКС – Реактивни кислородни съединения

ТНБС – Тринитробензенсулфонова киселина

УК – Улцерозен колит

Съдържание

I.	ВЪВЕДЕНИЕ	6
II.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	7
III.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	8
1.	Материали	8
1.1.	Експериментални животни	8
1.2.	Експериментални вещества	8
2.	Експериментален модел на ВЧЗ: ТНБС-индуциран колит	9
2.1.	Експериментална постановка	9
2.2.	Метод за функционална оценка	9
2.3.	Метод за макроскопска оценка	10
2.4.	Метод за хистопатологична оценка	12
2.5.	Биохимични методи.....	13
2.6.	Статистически методи.....	14
IV.	СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ	15
1.	Ефект на анетол върху модел на ТНБС-индуциран колит при плъхове	15
1.1.	Експериментална постановка	15
1.2.	Функционална оценка	18
1.3.	Макроскопска оценка	19
1.4.	Хистопатологична оценка.....	25
1.5.	Биохимични резултати	29
1.6.	Обсъждане	31
2.	Ефект на евгенол върху модел на ТНБС-индуциран колит при плъхове	34
2.1.	Експериментална постановка	34
2.2.	Функционална оценка	37
2.3.	Макроскопска оценка	41
2.4.	Хистопатологична оценка.....	47

2.5. Биохимични резултати	51
2.6. Обсъждане	53
3. Ефект на галова киселина върху модел на ТНБС-индуциран колит при плъхове.....	57
3.1. Експериментална постановка	57
3.2. Функционална оценка	60
3.3. Макроскопска оценка	63
3.4. Хистопатологична оценка.....	69
3.5. Биохимични резултати	74
3.6. Обсъждане	76
V. ИЗВОДИ	80
VI. ПРИНОСИ	82
VII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	83
I. Списък на публикациите	83
II. Списък на участията в научни форуми	83

I. ВЪВЕДЕНИЕ

ВЧЗ представляват група заболявания с разнообразна клинична изява, които се обединяват от наличието на хронично чревно възпаление и се разделят на две основни нозологични единици: БК и УК. Те се причисляват към социално-значимите заболявания, тъй като засягат млади хора в трудоспособна възраст и хроничният им характер обуславя постоянен дискомфорт, болки и страдания, както и невъзможност за нормален начин на живот.

Въпреки огромния положен обем научна работа, етиопатогенезата на заболяването все още не е достатъчно добре изяснена. Ясно е, че някои от факторите, свързани със съвременния начин на живот, предразполагат към ВЧЗ, тъй като честотата на срещане на заболяването се е увеличила десетократно след процеса на индустриализация в западните държави, а същата тенденция се наблюдава и в новоиндустриализираните държави през последните десетилетия.

Скорешните генетични и имунологични открития несъмнено хвърлят светлина върху патогенетичните механизми на заболяването. Успоредно с това обаче са открити нови, противоречащи на досегашните теории фактори, което още повече увеличава комплексността на проблема. Все по-ясно става, че ВЧЗ са хетерогенна група заболявания, а вариращата фенотипна изява е израз на комплексното взаимодействие на множество генетични, имунни и екологични механизми. Вследствие на тази имунна дисрегулация в крайна сметка се стига до развитието на патологичен, прекомерно силен възпалителен отговор спрямо нормалната чревна микрофлора.

Тъй като е невъзможно прилагането на етиологична терапия, терапевтичните усилия са насочени към патогенетично повлияване на заболяването чрез употреба на конвенционални или биологични имуномодулиращи медикаменти. Дори и най-съвременната биологична терапия обаче на практика се оказва недостатъчно ефективна, въпреки огромния финансов ресурс, изразходван за нейното разработване и производство. При това ограничената терапевтична полза е свързана с множество сериозни странични ефекти.

Поради всички тези причини в последните години се наблюдава нарастващ интерес към изучаване на ефектите на алтернативни природни продукти, повлияващи чревното възпаление. Експерименталните животински модели са незаменим етап от процеса на разработване на нови терапевтични опции.

Анетол, евгенол и галова киселина са мощни природни антиоксиданти. Противовъзпалителната им активност е изследвана в множество аспекти, но все още липсват експериментални данни относно техните ефекти в модели на чревно възпаление. Предвид натрупаните досега научни данни може убедено да се предположи, че резултатите от тези изследвания биха били обещаващи.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на този проект е:

Изследване на фармакологичните ефекти на анетол, евгенол и галова киселина, приложени перорално в различни дози при плъхове с експериментален модел на колит, предизвикан от тринитробензенсулфонова киселина.

Задачи:

За изпълнението на тази цел си поставихме следните основни задачи:

1. Да се получи експериментален модел на ТНБС-индуциран колит, потвърден с функционални, макроскопски, хистопатологични и биохимични показатели.
2. Да се изследват ефектите на анетол в различни дози в експериментален модел на ТНБС-индуциран колит при плъхове чрез проследяване на функционални, макроскопски, хистопатологични и биохимични показатели.
3. Да се изследват ефектите на евгенол в различни дози в експериментален модел на ТНБС-индуциран колит при плъхове чрез проследяване на функционални, макроскопски, хистопатологични и биохимични показатели.
4. Да се изследват ефектите на галова киселина в различни дози в експериментален модел на ТНБС-индуциран колит при плъхове чрез проследяване на функционални, макроскопски, хистопатологични и биохимични показатели.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали

1.1. Експериментални животни

Опитите са проведени върху мъжки Wistar плъхове с тегло в рамките на 250-350 грама, отглеждани в пластмасови клетки, максимум по 6 животни в клетка. Осигурени са били стандартните условия за отглеждане на лабораторни животни – добра вентилация, постоянна температура от 20-25 °С, неограничен достъп до вода и храна и 12-часов режим светлина/ тъмнина.

Третирането на животните и планираните експерименти са в съответствие с националните закони (Наредба № 20 от 01.11.2012 г. за минималните изисквания за защита и хуманно отношение към опитните животни и изискванията към обектите за използването, отглеждането и/или доставката им) и международни изисквания (EU Directive, 2010/63/EU for animal experiments) и са извършени след получено разрешение за работа с експериментални животни (Разрешително за използване на животни в опити № 68, издадено от Българската агенция по безопасност на храните към Министерство на земеделието и храните, на основание чл. 155, ал 7 от ЗВД и становището на комисията по етика №23 от 02.10.2012 г.).

1.2. Експериментални вещества

Използвани са ТНБС, анетол, евгенол и галова киселина на фирма Sigma-Aldrich (Germany).

1.2.1. Анетол (anethole)

Анетол е бистра, безцветна до кехлибарена течност със сладък вкус и специфичен аромат на анасон. Плътност: 0.99 g/cm³ при 20 °С. Молекулно тегло: 148.21 g/mol. Анетол е слабо разтворим във вода, но проявява висока разтворимост в етанол.

1.2.2. Евгенол (eugenol)

Евгенол представлява безцветна до бледо-жълтеникава гъста течност с приятна миризма и пиперлив вкус. Плътност: 1.06 g/cm³, Молекулно тегло: 164.20 g/mol. Слабо разтворим във вода, добре разтворим в органични разтворители.

1.2.3. Галова киселина (gallic acid)

Галова киселина представлява бял прах без миризма и с леко горчив привкус. Плътност: 1.69 g/cm³ при 20 °C. Молекулно тегло: 170.12 g/mol. Слабо разтворима във вода и етанол.

1.2.4. ТНБС (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid)

Представлява разтвор на тринитробензенсулфонова киселина във вода с концентрация 1 М (29.3%). Молекулно тегло 293.16 g/mol. Притежава висока реактивност спрямо първичните амини на аминокиселини в състава на пептиди, като се образува продукт с жълт цвят. Съхранява се при -20 °C, тъй като при високи температури се разпада и образува седимент от пикринова киселина.

2. Експериментален модел на ВЧЗ: ТНБС-индуциран колит

2.1. Експериментална постановка

Моделът е описан за пръв път от Morris и колеги (1989 г.). Тринитробензенсулфонова киселина (ТНБС) в доза от 10 mg се разтваря в 0.25 ml 50-процентен етанол. Полученият разтвор се прилага ректално на гладували 24 ч, анестезирани лабораторни плъхове с тегло 250-300 грама. Използва се катетър с външен диаметър 2 мм, който се вкарва в дебелото черво на разстояние 8 см. проксимално от ануса. След инстилация животните се позиционират надолу с главата в продължение на 1-2 мин, с цел предотвратяване на изтичане и равномерно разпределение на разтвора.

2.2. Метод за функционална оценка

По време на опита се проследява и сравнява състоянието на плъховете: промяна в теглото, брой дефекации и консистенция, наличие на кръв в изпражненията. Тежестта на възпалението може да варира в зависимост от индивидуални особености на животните като възраст, тегло, генетични особености, чревна микрофлора, както и продължителността на анестезията след апликация на ТНБС (Scheiffele et al., 2002).

2.2.1. Диаричен синдром

Провежда се ежедневна оценка на телесното тегло и степента на изразеност на диаричния синдром. Клиничната изява на диарията се оценява по замърсяването около ануса и консистенцията на изпражненията в точки: 0 – отсъствие на течни или кашести изпражнения; 1 – кашести изпражнения; 2 – течни изпражнения. Наличието на кръв в изпражненията и около ануса се оценява по аналогична точкова скала.

2.2.2. Промяна в телесното тегло

Преди началото на експеримента и до края на експеримента всекидневно се измерва теглото на животните. В условията на остро възпаление се увеличава продукцията на проинфламаторните цитокини TNF α , IL-1, IL-6 и IFN γ . Те упражняват кахектично действие чрез влияние върху хипоталамуса, както и чрез директно катаболно действие върху скелетната мускулатура (Weber et al., 2010). В резултат на това се наблюдава намален тегловен прираст или редукция на телесното тегло при експерименталните животни. Поради това промяната в телесното тегло може да се използва като признак, корелиращ с тежестта на системната възпалителна реакция.

2.3.Метод за макроскопска оценка

2.3.1. Дължина на дебелото черво

След евтаназията на животните се отделя колона и се почиства от фекални материи. След това се измерва теглото и дължината на органа. При животните с ТНБС-индуциран колит се наблюдавано статистически значимо скъсяване на дебелото черво. При ТНБС-индуцирания модел на колит не се наблюдава значимо отлагане на колаген в тъканите, а по-скоро наблюдаваното скъсяване е вследствие на контракция на гладкомускулния слой в стената на дебелото черво. Ректалната инстилация на ТНБС предизвиква възпаление с последващо повишаване на тъканните концентрации на serotonin, substance P, prostaglandin E2 и histamine. Тези медиатори на възпалението имат контрахиращо действие по отношение гладката мускулатура на чревната стена (Tokita et al., 2015). Поради това скъсяването на червото на 7ми ден след индукция на колита има добра корелация със степента на възпаление.

2.3.2. Тегло на дебело черво и на дисталните 10 см от органа

Третирането с ТНБС предизвиква сигнификантно повишаване на теглото на дебелото черво, корелиращо с тежестта на възпалението в засегнатия участък. Тъй като инстилацията на ТНБС се извършва на разстояние от 8 см от ануса, поинформативно е теглото на дисталните 10 см от дебелото черво. Увеличението на теглото е най-вече за сметка на тъканния оток. Ексудацията на течност в интерстициалното пространство при възпаление се дължи на увеличен пермеабилитет на съдовете, най-вече капиляри и венили. Основният механизъм, обясняващ повишения пермеабилитет, е свързан с разширяването на пространствата между ендотелните клетки на съдовата стена. Това се причинява от възпалителните медиатори, индуциращи биохимични промени в ендотелните клетки. Вследствие на процес на реорганизация на цитоскелета се осъществява

контракция на ендотелните клетки и намалява свързващото действие на протеините, изграждащи междуклетъчните връзки (Ochoa et al., 2012).

2.3.3. Площ на увредата

ТНБС предизвиква видима с просто око увреда, изразяваща се в некроза и улцерации на епителния слой, а в по-тежките случаи и на подлежащите слоеве на чревната стена. Площта на епителна увреда е в пряка връзка с тежестта на възпалението. Механизмът на тъканната увреда все още не достатъчно добре проучен, но се знае, че ТНБС е силно реактивен хаптен и поради това се свързва ковалентно с тъканните протеини и ги модифицира. Клетките на моноцитомacroфагеалната система разпознават и фагоцитират хаптенизираните молекули и ги презентират на CD4 позитивните клетки. Това води до индукция на клетъчно-медирана имунна реакция на свръхчувствителност от забавен тип с главното участие на Th1 и Th17 лимфоцитите. Ходът на възпалението е протрахиран с максимум на видимата увреда около 7-ми ден след индукцията на колита. Епителната и тъканна увреда възникват вследствие увеличената експресия на адхезионни молекули, стимулиращи локалната акумулация на цитотоксични лимфоцити, както и вследствие продукцията на реактивни кислородни и азотни съединения от неутрофили и макрофаги (Neurath et al., 1995).

2.3.4. Адхезии към съседни органи

При възпалителните процеси в коремната кухина в процеса на възстановяване често се формират адхезии – сраствания от съединителна тъкан към съседни покрити с перитонеум органи, както и към оментума. Образуването на адхезии се обуславя от действието на секретирани вследствие възпалението цитокини, растежни фактори и молекули за клетъчна адхезия, които водят до пролиферация на фибробласти, мезотелни клетки, както и неоангиогенеза. От друга страна, на този процес се противопоставят антиинфламаторните цитокини, като IL-10 и TGF- β , както и фибринолитичната система. Степента на изразеност на адхезии към съседни органи е в пряка зависимост от интензивността на възпалителната реакция. Макроскопското морфологично изследване се оценява по отношение на адхезиите чрез точкова скала: 0 – без адхезии, 1 – трудно отпрепариране, 2 – видими адхезии, 3 – множество адхезии.

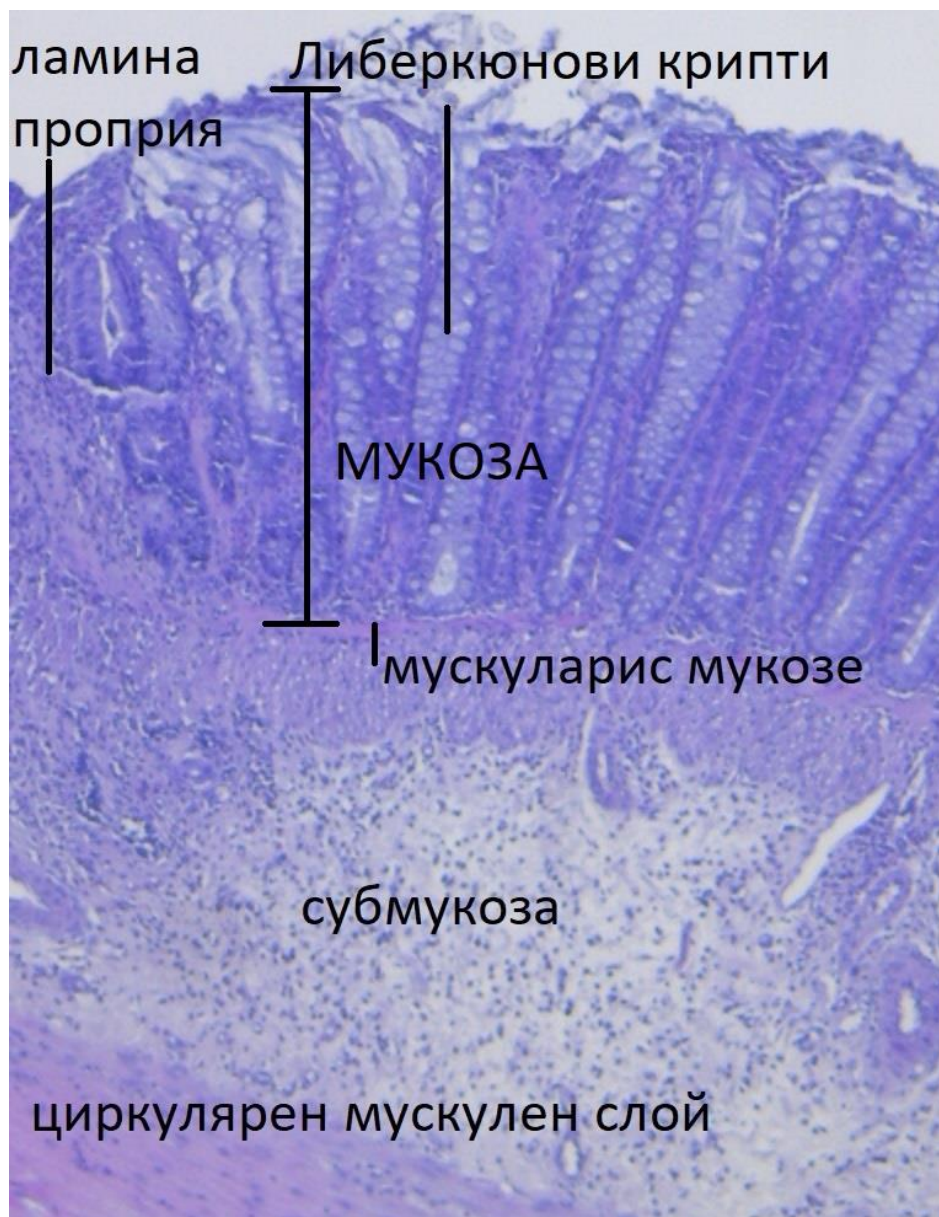
2.3.5. Удебеляване на чревната стена

Удебеляването на чревната стена е пропорционално на степента на възпаление и се дължи на тъканния оток, тъканната инфилтрация с възпалителни клетки (лимфоцити, моноцити, макрофаги, неутрофилни гранулоцити), както и пролиферацията на мезенхимни клетки с отлагане на интерстициален матрикс.

Удебеляването на стената се оценява по следната скала: 0 – няма разлика с нормално черво, 1 – дебелина 1-2 mm, 2 – дебелина над 2 mm.

2.4.Метод за хистопатологична оценка

Стената на дебелото черво е изградена от четири слоя, означени на Фиг. 5.



Фиг. 1. Хистологичен строеж на стената на дебело черво. Оцветяване с ХЕ, увеличение $\times 100$

- Лигавичната покривка – мукоза (tunica mucosa), е изградена от три слоя:
 - Lamina epithelialis mucosae, представляваща еднореден цилиндричен епител. Епителът в дебелото черво образува тубулозни епителни инвагинации – Либеркюнови крипти (crypts of Lieberkühn), наричани още чревни крипти или чревни

жлези. Те са изградени основно от гоблетови (чашковидни) клетки и секретират мукус. Слизната секреция в дебелото черво е организирана във вътрешен и външен мукусен слой, като вътрешният е плътно прикрепен към подлежащите епителни клетки.

- *Lamina propria mucosae* – подлежащ слой рехаво съединителна тъкан между криптите, който съдържаща кръвоносни и лимфни съдове, нервни влакна и моноклеарни клетки, организирани в лимфни фоликули и Пайерови плаки.
- *Lamina muscularis mucosae* е тънък гладкомускулен слой, ограничаващ ламина проприя от субмукоза.
- Подлигавичен слой – субмукоза (*tela submucosa*) – представлява рехаво съединителна тъкан, съдържаща кръвоносни и лимфни съдове, лимфни фоликули и субмукозния нервен плексус.
- Мускулна обвивка (*tunica muscularis, muscularis propria*) – два слоя от гладкомускулни клетки: вътрешен циркулярен (*stratum circulare*) и външен надлъжен (*stratum longitudinale*). В дебелото черво надлъжният мускулен слой е представен от три лентовидни образувания (*taenia coli*).
- Външен слой (*tunica serosa* или *tunica adventitia*) – съответно перитонеалната серозна обвивка или непокритите със серозна ципа части от дебелото черво.

За целите на хистопатологичното изследване се вземат проби от променените участъци от органа, фиксират се в 10% буфериран формалдехид и след това се изготвят срези с дебелина 5 микрометра, като препаратите се оцветяват с хематоксилин и еозин. Описват се последователно промените в отделните участъци: мукозен епител с ламина проприя, крипти, субмукоза, мускулен слой. Отделните слоеве се описват според присъствието и изразеността на следните показатели: оток, полиморфнонуклеарна инфилтрация, моноклеарна инфилтрация, улцерации, грануляционна тъкан, дилатации и деформации на крипти, митотична активност, редукция в броя на гоблетовите клетки. Всеки критерий се оценява по скала от 0 до 4 в зависимост от промените: 0 – без промени, 1 – незначителни изменения, 2 – слаби промени, 3 – умерено изразени промени, 4 – силно изразени промени.

2.5. Биохимични методи

2.5.1. Получаване на хомогенат от стена на дебело черво

Един грам от тъканта се смесва с 10 ml ледено студен TRIS/HCL буфер (среда за отделяне) и се хомогенизира посредством хомогенизатор при 4000 rpm за 10 min. Полученият хомогенат се центрофугира при 2000 rpm, $t^{\circ} = 4^{\circ}\text{C}$, 10 min.

за отделяне на грубата утайка, а супернатантът се използва за биохимични изследвания.

2.5.2. Получаване на кръвен серум

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

2.5.3. Определяне на реагиращи с тиобарбитурова киселина субстанции в хомогенат от дебело черво и в кръвен серум

Вследствие на оксидативния стрес се произвеждат реактивни кислородни и азотни съединения, които имат извънредно кратък полуживот и поради това е трудно да бъдат измерени директно. Като индиректен маркер за степента на оксидативен стрес се използват нивата на малонов диалдехид и други реагиращи с тиобарбитурова киселина субстанции (thiobarbituric acid reactive substances – TBARS). Те представляват нискомолекулни съединения, получаващи се вследствие оксидативния стрес и са крайни продукти на пероксидацията на тъканни липиди. Малонов диалдехид има свойството да се свързва с две молекули ТБК, при което се получава съединение с розов цвят, абсорбиращо светлина с дължина на вълната 532 – 535 nm.

Определяне на нивата на TBARS се извършва по метода на Okawa et al. (1979). Измерва се цветът, получен от реакцията на тиобарбитуровата киселина с липидните пероксиди. Към хомогенат от стената на дебело черво или към кръвен серум, съдържащ ТБК-реактивните производни, се добавя 0.8% разтвор на ТБК. Пробите се инкубират за 2 часа на водна баня (95°C), след което се охлаждат до стайна температура. Промяната в оптичната плътност се отчита спектрофотометрично в абсорбционни единици при дължина на вълната 532 nm. На основата на тези показания се изчисляват стойностите на TBARS в nmol/g тъкан или nmol/ml серум. Като лабораторен стандарт се използва малонов диалдехид – главният реактивен алдехид, получаващ се вследствие пероксидацията на полиненаситените мастни киселини в биологичните мембрани (Okawa et al., 1979). Използван е спектрофотометър AURIUS 2021 (Cecil Instruments Ltd, UK).

2.6. Статистически методи

Статистическата обработка на резултатите от изследванията е извършена чрез еднофакторен вариационен анализ (one-way ANOVA), последван от Dunnett's Multiple Comparison Post Test. Резултатите са представени като средна стойност ± SEM. Статистическа достоверност се приема при $p < 0.05$. Използван е статистически пакет GraphPad Prism (Version 5.00, GraphPad Software, Inc.).

IV. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Ефект на анетол върху модел на ТНБС-индуциран колит при плъхове

1.1. *Експериментална постановка*

Експериментът е проведен върху 60 мъжки Wistar плъха, разделени в 6 групи от по 10 животни: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С.

При животните от групи ТНБС, А62.5, А125, А250 и С е индуциран експериментален колит чрез ректална апликация на ТНБС в доза от 10 mg на плъх, разтворен в 0.25 ml 50-процентен етанол. Преди апликацията плъховете са гладували в продължение на 24 часа, но са имали осигурен свободен достъп до питейна вода. Животните са анестезирани непосредствено преди ректалната инстилация чрез интраперитонеално приложение на thiopental в доза от 50 mg/kg. ТНБС е въведен ректално с помощта на гъвкава канюла на дълбочина 8 см от ануса. При контролната група плъхове е приложен физиологичен серум вместо ТНБС-съдържащ етанолов разтвор. След апликацията плъховете са позиционирани с главата надолу в продължение на няколко минути, за да се предотврати ректалното изтичане на разтвора. След възстановяване от анестезията е осигурен непрекъснат, свободен достъп до храна и вода.

Ежедневното орално третиране на животните чрез орогастрална канюла е започнато 24 часа след индукцията на колита и е продължило 5 дни. Групите Контрола и ТНБС са получавали само слънчогледово олио. Групите А62.5, А125 и А250 са третирани с анетол в дози 62.5 mg/kg, 125 mg/kg и 250 mg/kg телесна маса, разтворен в слънчогледово олио до обем от 10 ml/kg телесна маса. Група С е лекувана със sulphasalazine в доза от 400 mg/kg, разтворен в слънчогледово олио също до обем от 10 ml/kg телесна маса. Третирането на групите с експериментални животни е обобщено в Таблица 3.

Таблица 1. Ректална инстилация и перорално третиране на експерименталните животни от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С

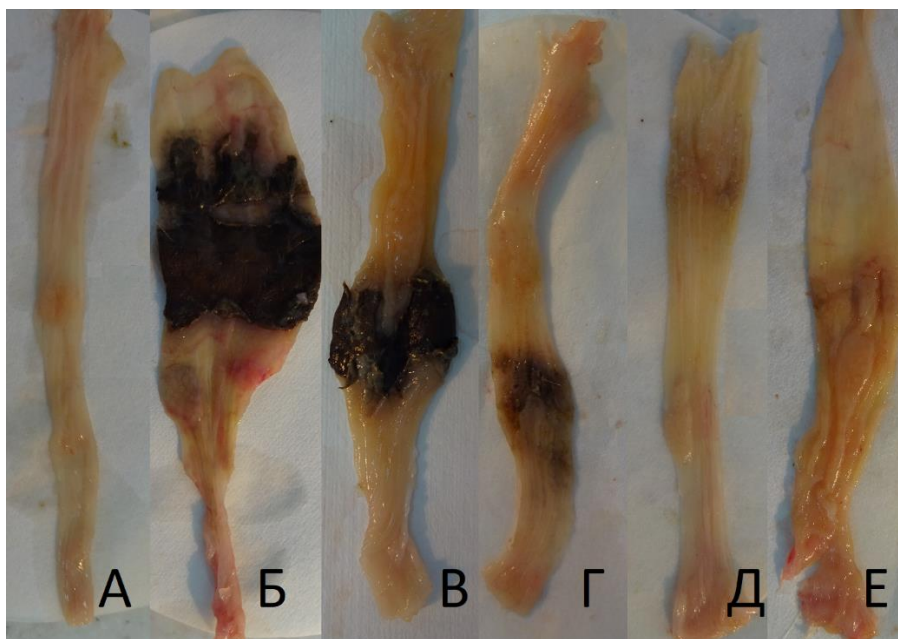
Група:	Брой животни	Ректална апликация на:	Интрагастрално петдневно третиране с:
Контрола	10	0.25 ml физиологичен серум	Слънчогледово олио
ТНБС	10	10 mg ТНБС в 0.25 ml 50% етанол	Слънчогледово олио
А62.5	10	10 mg ТНБС в 0.25 ml 50% етанол	Анетол 62.5 mg/kg, разтворен в слънчогледово олио
А125	10	10 mg ТНБС в 0.25 ml 50% етанол	Анетол 125 mg/kg, разтворен в слънчогледово олио
А250	10	10 mg ТНБС в 0.25 ml 50% етанол	Анетол 250 mg/kg, разтворен в слънчогледово олио
С	10	10 mg ТНБС в 0.25 ml 50% етанол	Sulphasalazine 400 mg/kg, разтворен в слънчогледово олио

Телесното тегло на животните е оценявано ежедневно. Едно денонощие преди приключването на експеримента е спрян свободният достъп до храна. На седми ден от експеримента е измерено крайното тегло на животните. Оценена е промяната на крайното тегло на животното (прираст или редукция) спрямо началното. След това животните са анестезирани чрез инхалационно приложение на диетилов етер и са евтаназирани чрез декапитация. Взети са кръвни проби за получаване на серум за биохимични изследвания. Направена е аутопсия на животните с отваряне на коремната кухина и оценка на тежестта на колита според макроскопските критерии, представени в Таблица 4.

Таблица 2. Функционални и макроскопски критерии за оценка на тежестта на колита

Макроскопски показател	Мерна единица
Прираст или редукция на тегло	грамове
Дължина на дебелото черво	сантиметри
Тегло на дебелото черво	грамове
Площ на увредата	квадратни милиметри
Адхезии към съседни органи	Скала: 0 – липса на адхезии, 1 – трудна дисекция, 2 – видими адхезии
Удебеляване на стената	Скала: 0 – няма разлика с нормално черво, 1 – дебелина 1-2 mm, 2 – дебелина над 2 mm

Типичният макроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С е представен на Фиг. 6. При група Контрола лигавицата на дебелото черво е с нормална морфология. При групите, увредени от ТНБС, разтворен в 50% етанол, в зависимост от степента на увреда се наблюдават оток, хиперемия, епителни ерозии и хеморагии, а в тежките случаи улцерации, покрити с некротични материи.



Фиг. 2. Типичен макроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от групи: Контрола (А), ТНБС (Б), А62.5 (В), А125 (Г), А250 (Д) и С (Е), в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

1.2. Функционална оценка

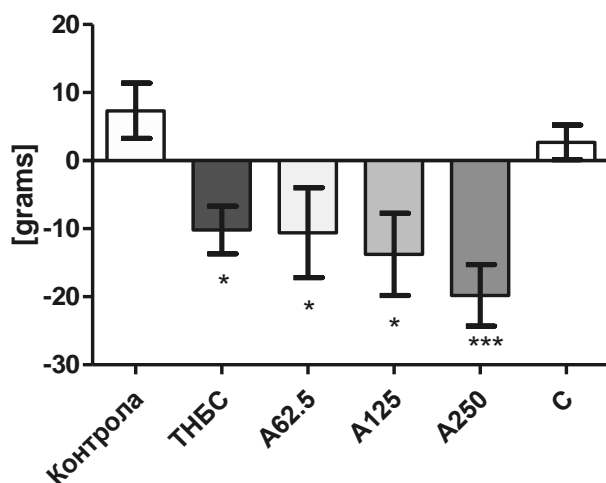
1.2.1. Ефект от 5-дневното третиране с анетол върху редуцията или наддаването на телесно тегло на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Резултатите са представени в Таблица 5 и Фиг. 7. Седем дни след индукция на колита при животните от група Контрола се наблюдава прираст на телесна маса. При групи ТНБС, А62.5 и А125 се отчита статистически значима ($p < 0.05$) редукция на телесното тегло в сравнение с Контрола. При групите, третирани с увеличаващи се този анетол, се открива пропорционално намаление на телесните тегла и при група А250 загубата на телесна маса е най-голяма ($p < 0.001$) в сравнение с Контрола. Групата, третирана със sulphasalazine, има прираст на телесна маса, но в по-малка степен в сравнение с Контрола

Таблица 3. . Редуцията или наддаване на телесно тегло 7 дни след индукция на колит при плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	А62.5	А125	А250	С
Редуцията на телесно тегло на седми ден (Mean \pm SEM)	7.3 \pm 4.1	-10.2 \pm 3.5	-10.6 \pm 6.6	-13.7 \pm 6.0	-19.8 \pm 4.5	2.7 \pm 2.6

Редукция или наддаване на телесно тегло



Фиг. 3. Редукция или наддаване на телесно тегло след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

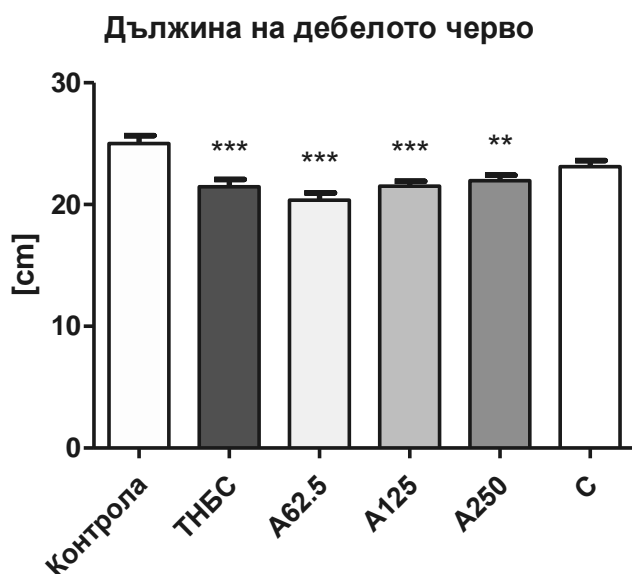
1.3.Макроскопска оценка

1.3.1. Ефект от третиране с анетол върху дължина на дебелото черво при плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Резултатите са представени в Таблица 6 и на Фиг. 8. При всички групи животни с ТНБС-индуцирано възпаление се наблюдава скъсяване на дебелото черво спрямо група Контрола. Това скъсяване е статистически значимо при групи ТНБС, А62.5 и А125 ($p < 0.001$) и в по-малка степен при група А250 ($p < 0.01$). При животните, лекувани със sulphasalazine, скъсяването не е толкова силно изразено и няма статистическа разлика спрямо Контрола. Няма сигнификантна разлика при третираните с анетол или sulphasalazine групи в сравнение с група ТНБС.

Таблица 4. Дължина на дебелото черво в сантиметри след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	А62.5	А125	А250	С
Показател						
Дължина на дебелото черво (Mean \pm SEM)	25.0 \pm 0.7	21.5 \pm 0.6	20.4 \pm 0.6	21.5 \pm 0.4	22.0 \pm 0.5	23.1 \pm 0.5



Фиг. 4. Дължина на дебелото черво в сантиметри след третиране на плъхове с ТНБС-индуциран колит от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

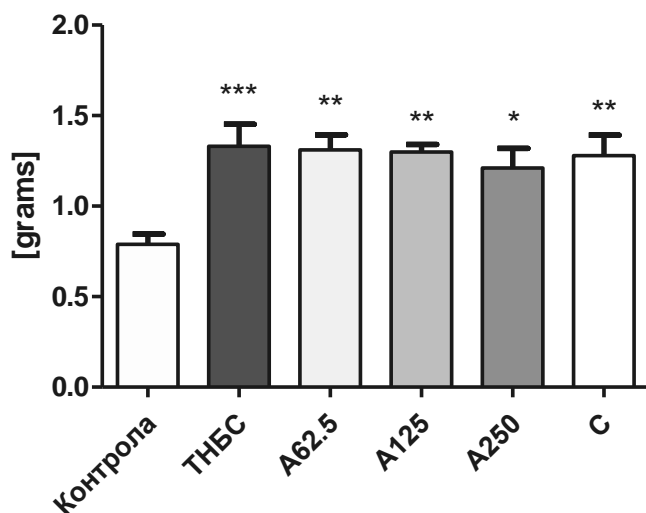
1.3.2. Ефект от третиране с анетол върху тегло на дебелото черво на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Резултатите са представени в Таблица 7 и на Фиг. 9. При група ТНБС се наблюдава статистически значимо ($p < 0.001$) увеличение на теглото на дисталните 10 см от дебело черво в сравнение с Контрола. Нарастването на теглото на органа е по-малко при групи А62.5, А125, С ($p < 0.01$) и най-малко при група А250 ($p < 0.05$) в сравнение с Контрола. Не се наблюдава статистическа разлика между ТНБС-увредените групи.

Таблица 5. Тегло на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	А62.5	А125	А250	С
Показател						
Тегло на дебело черво (Mean \pm SEM)	0.79 \pm 0.06	1.33 \pm 0.12	1.31 \pm 0.08	1.30 \pm 0.04	1.21 \pm 0.11	1.28 \pm 0.11

Тегло на дебело черво (дисталните 10 см)



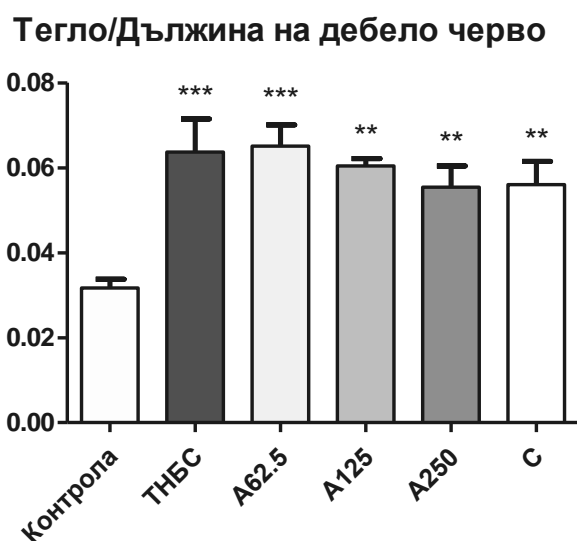
Фиг. 5. Тегло на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

1.3.3. Ефект от третиране с анетол върху съотношението на теглото към общата дължина на дебелото черво на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

При всички, третирани с ТНБС групи, се наблюдава статистически значимо увеличение на съотношението между тегло и дължина на дебело черво в сравнение с Контрола. Това съотношение е по-малко ($p < 0.01$) при лекуваните със sulphasalazine или с по-високи дози анетол групи (A125, A250), отколкото при групи ТНБС и A62.5 ($p < 0.001$). Не се наблюдава статистическа разлика между ТНБС-увредените групи (Таблица 8 и Фиг. 10).

Таблица 6. Съотношение на теглото към общата дължина на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, A62.5, A125, A250 и C, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	A62.5	A125	A250	C
Показател						
Съотношение тегло/дължина (Mean \pm SEM)	0.03 \pm 0.00	0.06 \pm 0.01	0.07 \pm 0.00	0.06 \pm 0.00	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01



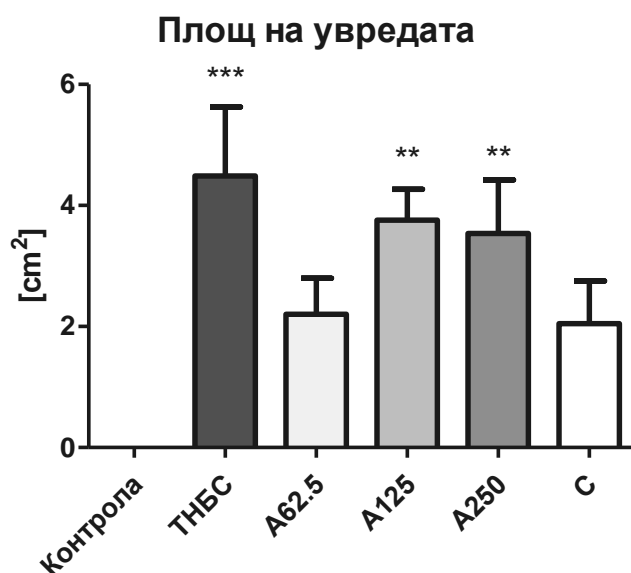
Фиг. 6. Съотношение на теглото към общата дължина на дебелото черво, след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, A62.5, A125, A250 и C, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

1.3.4. Ефект от третиране с анетол върху площта на увреда на лигавицата на дебелото черво на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Ректалната апликация на ТНБС води до деструктивна увреда, чиято площ при отделните групи е представена в Таблица 9 и на Фиг. 11. Група Контрола са третирани с физиологичен серум и при тях няма признаци на увреда. Разликата в площта е статистически значима при група ТНБС ($p < 0.001$) и групи А125 и А250 ($p < 0.01$) спрямо Контрола. Най-малка е площта на увреда при групи А62.5 и С, при които няма статистическа разлика спрямо Контрола. Разликата при тези групи не достига статистическа значимост спрямо ТНБС.

Таблица 7. Площ на увредата на лигавицата на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	А62.5	А125	А250	С
Показател						
Площ на увреда (Mean \pm SEM)	0.00 \pm 0.00	4.49 \pm 1.14	2.21 \pm 0.59	3.76 \pm 0.51	3.54 \pm 0.88	2.05 \pm 0.70



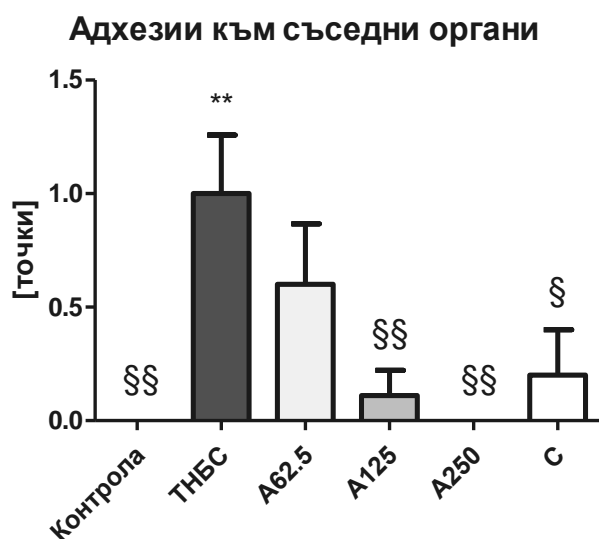
Фиг. 7. Площ на увредата на лигавицата на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

1.3.5. Ефект от третиране с анетол върху наличието на адхезии към съседни на дебелото черво органи в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите (в точкова скала) са представени в Таблица 10 и на Фиг. 12. При група ТНБС се наблюдава появата на интраабдоминални адхезии ($p < 0.01$) сравнено с Контрола. При третираните с анетол и sulphasalazine групи се установява подобрене по отношение на този показател и статистическата разлика не е значима в сравнение с Контрола. При сравнение на отделните групи с група ТНБС се отчита статистическо подобрене при група А250 и А125 ($p < 0.01$), както и в по-малка степен ($p < 0.05$) при група sulphasalazine.

Таблица 8. Макроскопска оценка на степента на изразеност на адхезии към съседни на дебелото черво органи, след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	А62.5	А125	А250	С
Показател						
Адхезии към съседни органи (Mean \pm SEM)	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.26	0.60 \pm 0.27	0.11 \pm 0.11	0.00 \pm 0.00	0.20 \pm 0.20



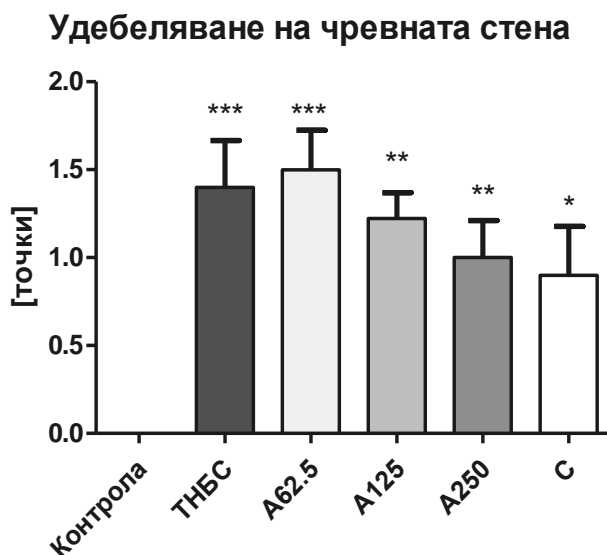
Фиг. 8. Макроскопска оценка на степента на изразеност на адхезии към съседни на дебелото черво органи след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит. ** $p < 0.01$, в сравнение с Контрола; § $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$, в сравнение с група ТНБС

1.3.6. Ефект от третиране с анетол върху удебеляване на стената на дебелото черво на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Резултатите (в точкова скала) са представени в Таблица 11 и на Фиг. 13. При група ТНБС се наблюдава удебеляване на чревната стена, което е статистически значимо ($p < 0.001$) спрямо Контрола. При група А62.6 също има подобно влошаване на този показател ($p < 0.001$) спрямо Контрола. При групи А125 и А250 се наблюдава известно подобрене ($p < 0.01$), а най-слабо изразено е удебеляването на чревната стена при група С ($p < 0.05$) спрямо Контрола. Разликата при всички тези групи не достига статистическа значимост спрямо група ТНБС.

Таблица 9. Удебеляване на стената на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	А62.5	А125	А250	С
Показател						
Удебеляване на стената на дебело черво (Mean \pm SEM)	0.00 \pm 0.00	1.40 \pm 0.27	1.50 \pm 0.22	1.22 \pm 0.15	1.00 \pm 0.21	0.90 \pm 0.28

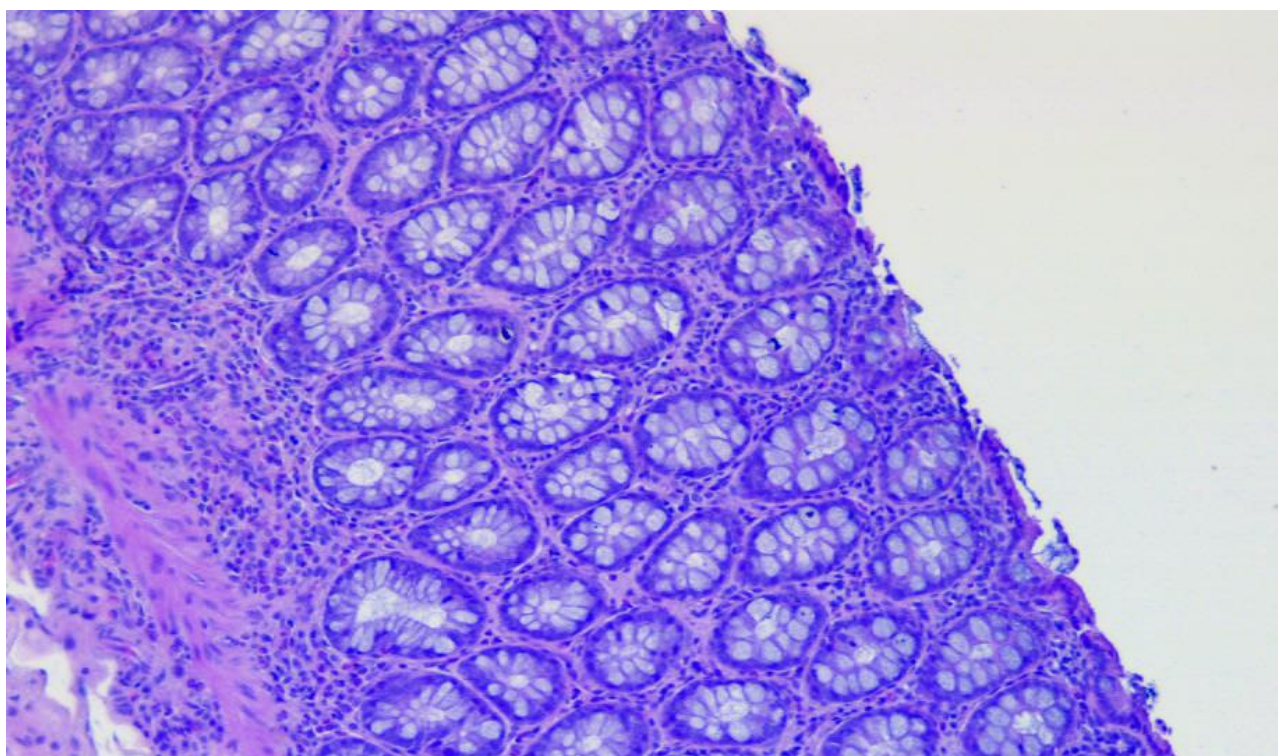


Фиг. 9. Удебеляване на стената на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

1.4. Хистопатологична оценка

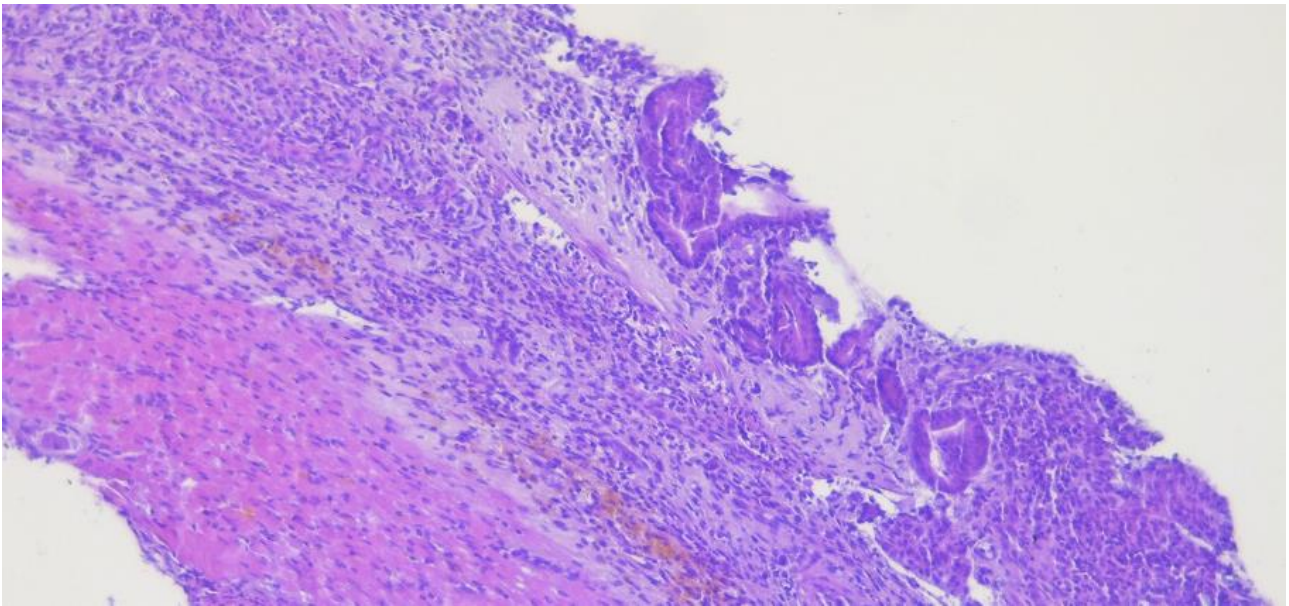
1.4.1. Микроскопски изглед

Типичният микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от група Контрола е представен на Фиг. 14. При хистологичното изследване при плъхове от група Контрола се наблюдава нормална морфология на епителния слой на лигавицата. Криптите са дълбоки и отворите им са тесни. Гоблетовите клетки са изобилни. Ламина проприя и субмукоза съдържат неголямо количество равномерно разпределени клетъчни елементи: фиброцити, фибробласти, лимфоцити и единични хистиоцити. Ламина мускуларис мукозе е представена от 1-2 слоя гладкомускулни клетки.



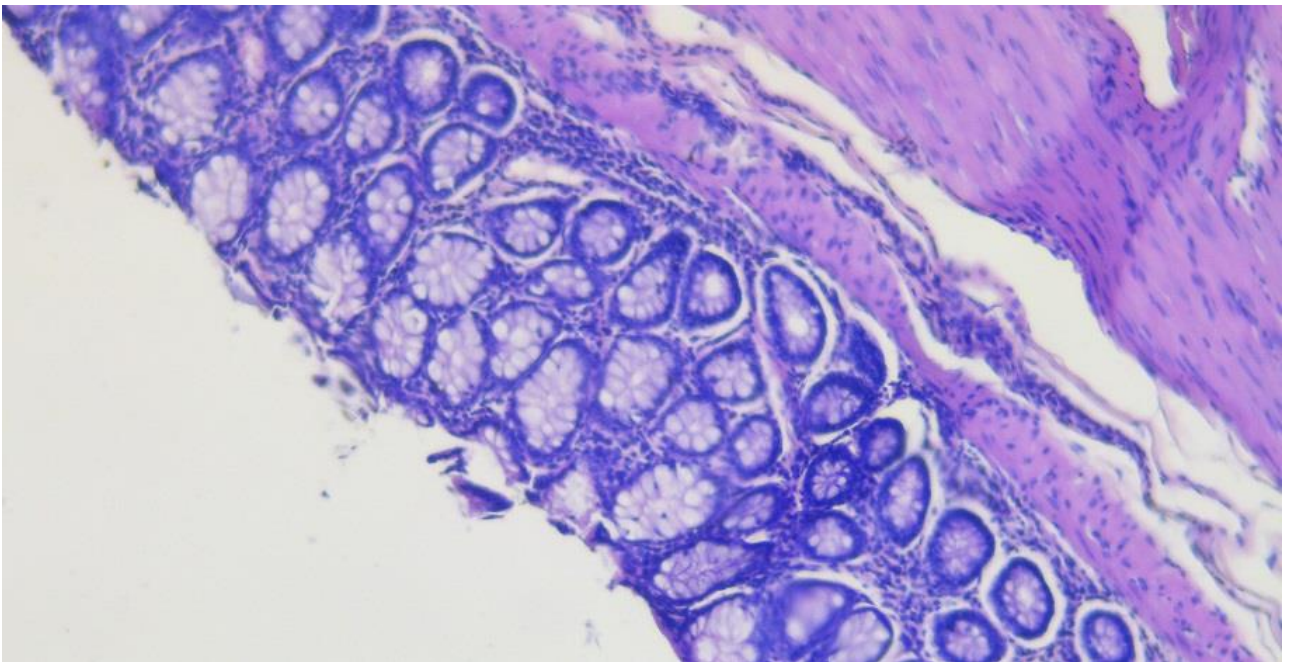
Фиг. 10. Типичен микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от група Контрола. Оцветяване с ХЕ, увеличение x100

Типичният микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от групи: ТНБС е представен на Фиг. 15. Увредата, причинена от ТНБС, води до дифузна или зонална деструкция на чревната стена и възпалително-клетъчна инфилтрация, достигаща мускуларис мукозе, субмукоза или мускуларис проприя. Възпалителната инфилтрация е представена от лимфоцити, неутрофилни гранулоцити, единични макрофаги и плазмоцити.



Фиг. 11. Типичен микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от група ТНБС. Оцветяване с ХЕ, увеличение $\times 100$

При групи А62.5, А125, А250 и С се наблюдава подобрене по отношение на деструкцията на чревната стена и възпалително-клетъчната инфилтрация, както и намалено засягане в дълбочина на чревната стена. Характерният микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от група А250 е представен на Фиг. 16.



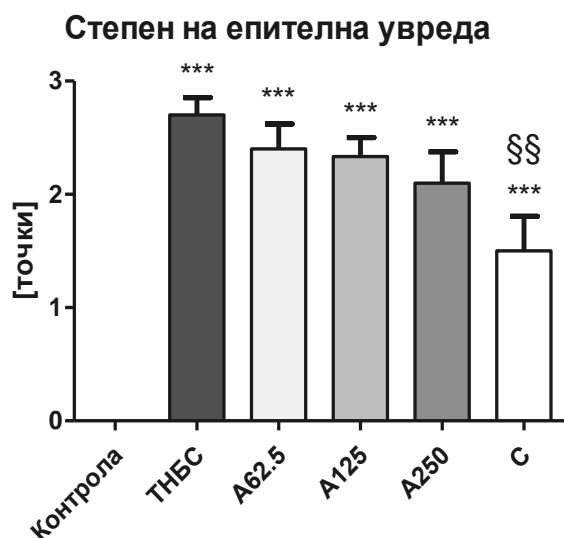
Фиг. 12. Типичен микроскопски изглед на лигавицата на дебело черво на животни от група А250. Оцветяване с ХЕ, увеличение $\times 100$

1.4.2. Ефект от третиране с анетол върху хистопатологичната оценка на степента на мукозна епителна увреда в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите (в точкова скала) са представени в Таблица 12 и на Фиг. 17. Предизвикването на колит чрез ректална апликация на ТНБС води до изразена епителна увреда на лигавицата на дебелото черво и при всички увредени групи се наблюдава статистически значима разлика ($p < 0.001$) в сравнение с Контрола. Третирането с увеличаващи се дози анетол, както и в най-голяма степен със sulphasalazine, води до подобрене по този показател, но без да има разлика в статистическата значимост. При сравняване с група ТНБС единствено при група С се отчита сигнификантно подобрене ($p < 0.01$).

Таблица 10. Хистопатологична оценка на степента на епителната увреда на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	А62.5	А125	А250	С
Показател						
Хистопатологична оценка (в точки) на степента на епителна увреда (Mean \pm SEM)	0.00 \pm 0.00	2.70 \pm 0.15	2.40 \pm 0.22	2.33 \pm 0.17	2.10 \pm 0.28	1.50 \pm 0.31



Фиг. 13. Хистопатологична оценка на степента на епителната увреда на дебелото черво (в точкова скала) след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола; §§ $p < 0.01$

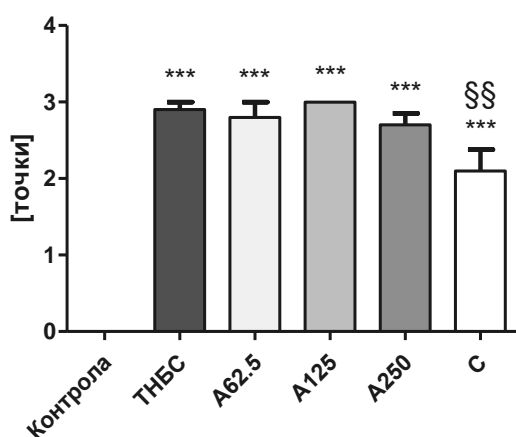
1.4.2. Ефект от третиране с анетол върху хистопатологичната оценка на възпалително-клетъчната инфилтрация в стена на дебелото черво в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите са представени в Таблица 13 и на Фиг. 18. Ректалната апликация на ТНБС води до изразена възпалително-клетъчната инфилтрация в стената на дебелото черво и при всички увредени групи се наблюдава статистически значима разлика ($p < 0.001$) в сравнение с Контрола. Третирането с анетол, както и в по-голяма степен със sulphasalazine, води до подобрене по този показател, но без статистически значима разлика. При сравняване с група ТНБС единствено при група С се отчита сигнификантно подобрене ($p < 0.01$).

Таблица 11. Хистопатологична оценка на възпалително-клетъчната инфилтрация в стената на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	А62.5	А125	А250	С
Показател						
Хистопатологична оценка на степен на възпалително-клетъчна инфилтрация (Mean \pm SEM)	0.00 \pm 0.00	2.90 \pm 0.10	2.80 \pm 0.20	3.00 \pm 0.00	2.70 \pm 0.15	2.10 \pm 0.28

Възпалително-клетъчна инфилтрация



Фиг. 14. Хистопатологична оценка на възпалително-клетъчната инфилтрация в стената на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, А62.5, А125, А250 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

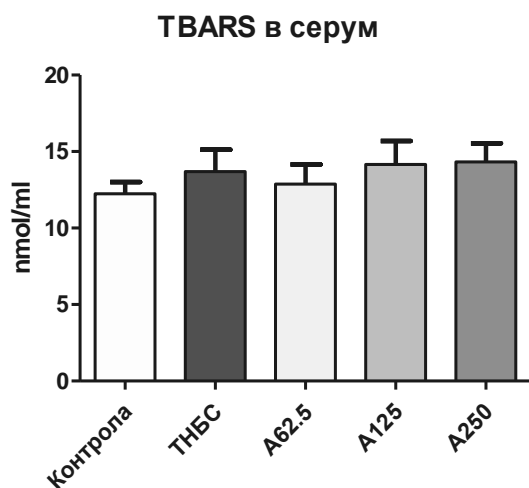
1.5. Биохимични резултати

1.5.1. Ефект от третиране с анетол върху нивата на оксидативния стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в кръвен серум в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите са представени в Таблица 14 и на Фиг. 19. Въпреки че в модел на ТНБС-индуциран колит може да се очакват увеличени нива на TBARS, при експеримента не се наблюдава значимо повишаване на нивата на TBARS в кръвен серум при увредените групи.

Таблица 12. Ефект от третиране с анетол върху нивата на оксидативния стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в кръвен серум в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Група	Контрола	ТНБС	A62.5	A125	A250
Показател					
Концентрация на TBARS в кръвен серум (Mean \pm SEM)	12.2 \pm 0.8	13.7 \pm 1.4	12.9 \pm 1.3	14.2 \pm 1.5	14.3 \pm 1.2



Фиг. 15. Ефект от третиране с анетол върху нивата на оксидативния стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в кръвен серум след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, A62.5, A125 и A250, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

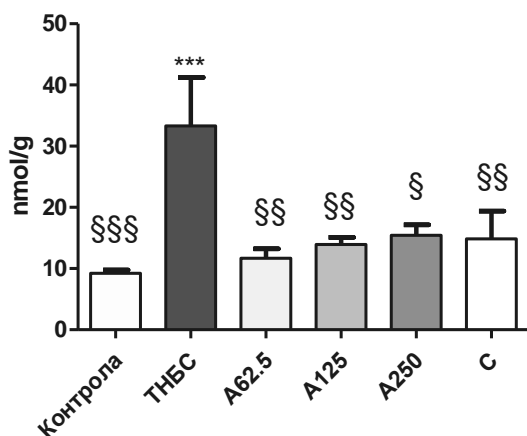
1.5.2. Ефект от третиране с анетол върху нивата на оксидативния стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в хомогенат от дебело черво в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите са представени в Таблица 15 и на Фиг. 20. Възпалителната реакция в модел на ТНБС-индуциран колит води до оксидативен стрес, изразяващ се чрез повишаване на нивата на TBARS в хомогенат от стената на дебело черво в статистически значима степен ($p < 0.001$) в сравнение с група Контрола. Анетол във всички дози, както и sulphasalazine, водят до понижение на този показател до степен при тези групи да не се отчита сигнификантна разлика в сравнение с Контрола. Освен това в сравнение с група ТНБС се наблюдава статистически значима разлика при групи А62.5, А125 и С ($p < 0.01$), както и при група А250 ($p < 0.05$).

Таблица 13. Ефект от третиране с анетол върху нивата на оксидативния стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в хомогенат от дебело черво в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Група	Контрола	ТНБС	А62.5	А125	А250	С
Показател						
Концентрация на TBARS в хомогенат от дебело черво (Mean \pm SEM)	9.24 \pm 0.5	33.32 \pm 7.8	11.69 \pm 1.5	13.93 \pm 1.2	15.42 \pm 1.7	14.87 \pm 4.5

ТBARS в хомогенат от дебело черво

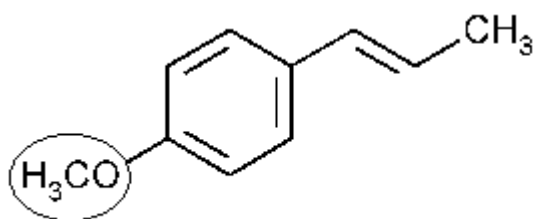


Фиг. 16. Ефект от третиране с анетол върху нивата на оксидативния стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в хомогенат от дебело черво в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола; § $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$ в сравнение с група ТНБС

1.6. Обсъждане

При третираните с ТНБС животни се наблюдава редукция на телесното тегло, което се обяснява със системната възпалителна реакция и действието на проинфламаторните цитокини $TNF\alpha$, $IL-1$ и $IL-6$. Приложението на анетол води до допълнителна доза-зависима редукция на телесното тегло при опитните животни, особено изразена в групите, третирани с големи дози анетол (250 mg/kg), но без да се наблюдава увеличена смъртност. Наблюдаваната редукция на тегло вероятно не се дължи на токсичност на веществото, а по-скоро може да бъде обяснена с промяна на вкусовите качества на храната и анорексигенен ефект на анетол. Подобна доза-зависима редукция на телесно тегло, за сметка основно на подкожната мастна тъкан, се наблюдава при плъхове, получавали анетол в дневни дози от 110 и повече mg/kg телесна маса (Truhaut et al., 1989). При тези дози и дори при 450 mg/kg не се отчита повишена смъртност или значителен канцерогенен риск (Newberne et al., 1999).

След перорален прием анетол претърпява интензивен чернодробен метаболизъм, основно чрез окислителни реакции в алиловата група и O-деметиране на метокси групата (Фиг. 21).



Фиг. 17. Химична структура на анетол

Образуваните полярни производни след това бързо се конюгираат с глицин, глюкуронова киселина и други, и се излъчват в урината, без да проявяват токсичност (Bounds et al., 1996; Caldwell et al., 1988). Около 3% от приетата доза обаче се метаболизира до хепатотоксичния метаболит anethole-epoxide. Този метаболитен продукт води до формиране на реактивни кислородни съединения и изчерпване на вътреклетъчния глутатион (Marshall et al., 1992). В резултат на това могат да настъпят органни и клетъчни промени при животни, приемали по-големи дози анетол. Също така третирането с високи дози анетол води до хепатоцелуларна хипертрофия и увеличено тегло на черния дроб за сметка на пролиферация на ендоплазмен ретикулум. Това се обяснява с факта, че анетол предизвиква индукция на ензими предимно от втора фаза на чернодробния метаболизъм, подобно на ензимната индукция предизвикана от phenobarbital (Rompelberg et al., 1993).

Анетол (респективно анасоново масло) няма мутагенен и тератогенен потенциал. Поради това е разрешен за употреба при хора в до 2.5 mg/kg тегло и има широко приложение в хранително-вкусовата индустрия при производството на сладкарски изделия и алкохолни напитки (Marinov et al., 2015; Newberne et al., 1999). Обичайният дневен прием като подправка е около 0.6 mg/kg, но при консумация на алкохолни напитки може да достигне до над 3.6 mg/kg телесна маса. В този случай основният токсичен ефект би бил вследствие на алкохолната интоксикация (Truhaut et al., 1989). Освен това метаболизирането на анетол чрез епоксидация е по-слабо изразено при хора отколкото при плъхове, поради което хепатотоксичността при хора е много по-слабо проявена (Newberne et al., 1999).

Вследствие на всичко това може да се заключи, че лекарствената употребата на анетол от хора би била безопасна. Наблюдаваният анорексигенен ефект при по-високи дози не е израз на токсичност и дори би могъл да има отделно терапевтично приложение при пациенти с метаболитен синдром.

Резултатите от експеримента показват, че приложението на евгенол при опитните животни води до подобрене по отношение на болшинството от изследваните показатели. Наблюдава се статистически значимо подобрене по отношение на интраабдоминалните адхезии и оксидативния стрес в чревната стена ($p < 0.01$) в сравнение с група ТНБС. Съществува и тенденция към подобрене по отношение на скъсяване и тегло на дебело черво, площ на увреда, удебеляване на чревна стена и хистопатологична находка. Резултатите от приложението на анетол по повечето от тези показатели са съизмерими с тези от приложението на sulphasalazine.

Тези ефекти на анетол и на неговите метаболити биха могли да се обяснят с инхибиция на механизмите на възпалителната реакция на няколко различни нива.

За анетол е известно, че потиска ранен етап от каскадата на TNF α -зависимата сигнална трансдукция и възпрепятства активацията на NF- κ B. Това е наблюдавано при плъхове, третирани с перорални дози от 250 mg/kg (da Rocha et al., 2017). При *in vitro* експерименти с клетъчни култури по-голямата част от TNF-индуцирания отговор се инхибира при моларна концентрация от 1mM (148 μ g/ml). Вероятно специфичният механизъм е чрез потискане действието на ензима I κ B-киназа, което възпрепятства фосфорилирането, убиквитинилирането и деградацията на I κ B протеина (Kang et al., 2013; Chai et al., 2000). Блокираната активация на NF- κ B води до намалена продукция на цитокините TNF α , IL-1 β , както и простагландини и азотен оксид. Намаленото производство на проинфламаторни медиатори вероятно обуславя и описаните в литературата антиноцицептивни ефекти на анетол, прилаган в перорални дози от над 62.5 mg/kg (Domiciano et al., 2013; Ritter et al., 2014).

Друг наблюдаван имунологичен ефект на анетол е увеличената експресия на регулаторните Foxp3+ лимфоцити в белия дроб и редуцията в производството на проинфламаторни цитокини на Th2-клетъчния отговор. Това

е установено при експеримент с орално прилаган анетол в дози от 20 mg/kg в продължение на 4 седмици, при което се облекчават симптомите на белодробно възпаление в овалбумин-индуциран модел на бронхиална астма при мишки. Вследствие на имуномодулаторните ефекти на анетол се наблюдава намалена белодробна инфилтрация с еозинофилни гранулоцити и лимфоцити в белодробния паренхим (Sung et al., 2017). Възможно е част от наблюдаваните противовъзпалителни ефекти в настоящия експеримент също да се обуславят от пролиферация на регулаторните Foxp3⁺ лимфоцити, стимулирана от анетол.

Анетол е мощен инхибитор на индуцираните от LTB₄ ролинг, адхезия и миграция на левкоцити към периваскуларната тъкан. Тази инхибиция се постига при *in vitro* концентрации от над 1 µg/ml и при перорални дози от 125 mg/kg. В тези концентрации анетол не проявява цитотоксичност спрямо левкоцитите, а липсата на активация от LTB₄ вероятно се дължи на блокиране на пострецепторната сигналната трансдукция (Estevão-Silva et al., 2014). Известно е, че локалното струпване на голям брой левкоцити води до тъканна увреда, както поради действието на лизозомни ензими и маталопротеинази, така и чрез производството на реактивни кислородни и азотни съединения (Eyles et al., 2006). Следователно потискащата хемотаксиса активност на анетол също би допринесла за намалената възпалителна увреда, наблюдавана макроскопски и хистопатологично.

Установено е още, че анетол в по-големи *in vitro* концентрации (над 25 µg/ml) намалява индуцираната от TNFα и IFNγ mRNA експресия на ICAM-1. ICAM-1 представлява трансмембранен протеин, експресирани от ендотелни и други клетки, служещ за свързване с левкоцитните интегрини и последваща левкоцитна миграция. Инхибицията на ICAM-1 е механизъм на действие на alicaforsen – наскоро въведено в употреба лекарство, прилагано под формата на енема за лечение на локализирано чревно възпаление при болест на Крон. Освен това анетол в същите концентрации инхибира обусловената от JAK-STAT сигналния път експресия на проинфламаторни цитокини и хемокини (Sung et al., 2012).

Перорално приложеният анетол не достига високи серумни концентрации, поради интензивен чернодробен метаболизъм (Kohlert et al., 2000). Метаболитите на анетол обаче, получени чрез хидроксилиране на двойната връзка в алиловата група, също проявяват противовъзпалителна активност, дори и по-силна от тази на анетол (Freire et al., 2005). При перорално приложение на анетол е възможно постигането на по-високи, потенциално терапевтични концентрации локално в чревната лигавица.

Анетол и неговите хидроксилирани метаболити упражняват и антиоксидантна активност, макар и по-слаба от тази на антиоксиданти като α-tocopherol и butylated hydroxytoluene, измерено чрез DPPH метод. Съществува корелация между антиоксидантната и противовъзпалителната активност на анетол и неговите метаболити (Freire et al., 2005). Като изява на

антиоксидантната активност на анетол се наблюдават намалени нива на TBARS при третираните с анетол животни в настоящия експеримент. Вероятно голяма част от наблюдаваните противовъзпалителни ефекти се дължат на способността на анетол да залавя свободните радикали, продуцирани при възпаление и по този начин да ограничава площта и степента на тъканна увреда. Освен това оксидативният стрес е един от механизмите за активиране на сигналния път на NF-κB и това води до допълнително производство на проинфламаторни медиатори (Chainy et al., 2000).

Освен противовъзпалителните ефекти на анетол, твърде вероятно е антибактериалните му ефекти да водят до промяна в състава на чревната бактериална флора при перорално приложение и да се стимулира развитието на полезни за чревната лигавица бактерии. За патогенезата на ВЧЗ и особено УК се предполага, че нарушената чревна бариерна функция е ключова за развитието на хроничен възпалителен отговор към коменсални бактерии в ГИТ (Antoni et al., 2014). Установено е, че оралното третиране с анетол води до сигнификантно увеличение в генната експресия на MUC2, което води до удебеляване на вътрешния мукусен слой, вероятно вследствие промяна в състава на коменсалната флора в посока на бутират-продуциращи, стимулиращи мукусната секреция бактерии. Мукусният слой на дебелочревната лигавица играе протективна роля срещу пенетрацията на бактерии и други агресивни фактори от чревния лумен (Wlodarska et al., 2015).

2. Ефект на евгенол върху модел на ТНБС-индуциран колит при плъхове

2.1. Експериментална постановка

Експериментът е проведен върху 72 мъжки Wistar плъха, разделени в 6 групи от по 12 животни: Контрола, ТНБС, Е1, Е5, Е25, Е125.

Осъществено е претретиране в продължение на 6 дни. При животните от групи Контрола и ТНБС ежедневно е прилагано интрагастрално чрез перорална сонда слънчогледово олио в обем от 10 ml/kg. Животните от групи Е1, Е5, Е25 и Е125 ежедневно са третирани по аналогичен начин с евгенол в дози от 1, 5, 25 и 125 mg/kg, разтворен в слънчогледово олио до обем от 10 ml/kg.

На 7-ми ден от експеримента при животните от групи ТНБС, Е1, Е5, Е25 и Е125 е индуциран експериментален колит чрез ректална апликация на ТНБС в доза от 10 mg на плъх, разтворен в 0.25 ml 50-процентен етанол. Преди апликацията плъховете са гладували в продължение на 24 часа, но са имали осигурен свободен достъп до питейна вода. Животните са анестезирани преди ректалната инстилация чрез интраперитонеално приложение на thiopental в доза от 40 mg/kg, а при липса на задоволителен ефект са прилагани допълнителни 20 mg/kg. ТНБС е въведен ректално с помощта на гъвкава канюла на дълбочина 8 см от ануса. При контролната група плъхове е приложен 50-процентен етанолов

разтвор вместо ТНБС-съдържащ етанолов разтвор. След апликацията плъховете са позиционирани с главата надолу в продължение на няколко минути, за да се предотврати ректалното изтичане на разтвора. След възстановяване от анестезията е осигурен непрекъснат, свободен достъп до храна и вода.

Последващото ежедневно орално третиране на животните чрез орогастрална канюла е започнато 24 часа след индукцията на колита и е продължило 5 дни. Групите Контрола и ТНБС са получавали само слънчогледово олио. Групите E1, E5, E25 и E125 са третирани с евгенол в дози от 1, 5, 25 и 125 mg/kg телесна маса, разтворен в слънчогледово олио до обем от 10 ml/kg телесна маса. Третирането на групите с експериментални животни е обобщено в Таблица 16.

Таблица 14. Ректална инстилация и перорално третиране на експерименталните животни от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25, E125

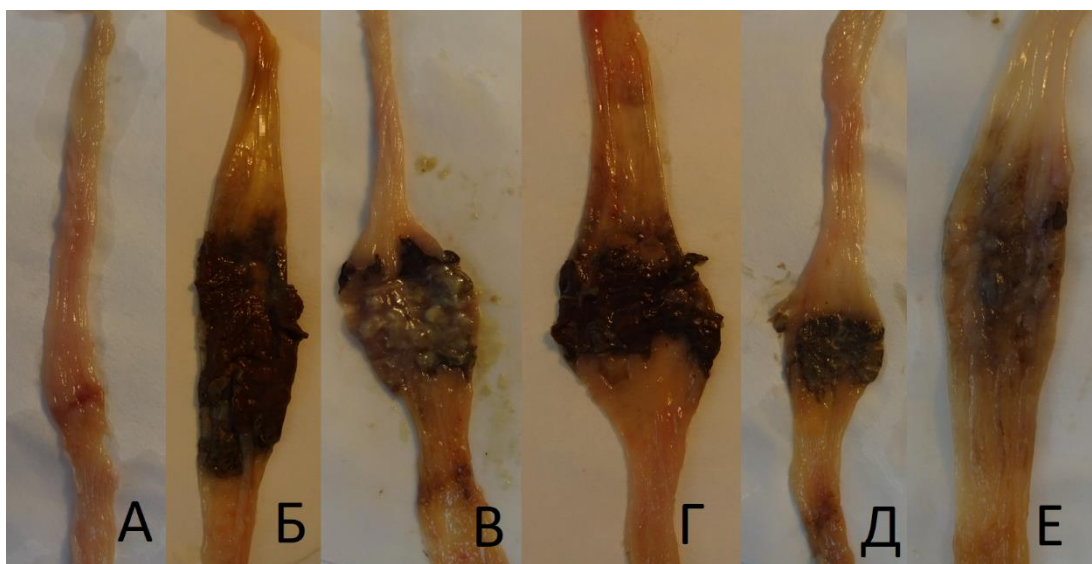
Група	Брой животни	Ректална апликация на:	6 дни претретиране и 5 дни последващо третиране, чрез интрагастрално приложение на:
Контрола	12	0.25 ml 50% етанол	Слънчогледово олио
ТНБС	12	10 mg ТНБС в 0.25 ml 50% етанол	Слънчогледово олио
E1	12	10 mg ТНБС в 0.25 ml 50% етанол	Евгенол в доза от 1 mg/kg телесно тегло, разтворен в слънчогледово олио
E5	12	10 mg ТНБС в 0.25 ml 50% етанол	Евгенол в доза от 5 mg/kg телесно тегло, разтворен в слънчогледово олио
E25	12	10 mg ТНБС в 0.25 ml 50% етанол	Евгенол в доза от 25 mg/kg телесно тегло, разтворен в слънчогледово олио
E125	12	10 mg ТНБС в 0.25 ml 50% етанол	Евгенол в доза от 125 mg/kg телесно тегло, разтворен в слънчогледово олио

Общото състояние и телесното тегло на животните са оценявани ежедневно. Едно денонощие преди приключването на експеримента е спрял свободният достъп до храна. На седми ден след индукцията на колита е измерено крайното тегло на животните. Оценена е промяната на теглото (прираст или редукция) спрямо началното. След това животните са анестезирани чрез инхалационно приложение на диетилов етер и са евтаназирани чрез декапитация. Взети са кръвни проби за получаване на серум за биохимични изследвания. Направена е аутопсия на животните с отваряне на коремната кухина и оценка на тежестта на колита според макроскопските критерии, представени в Таблица 17. Взети са и проби от тъкан от дебело черво за биохимични изследвания.

Таблица 15. Функционални и макроскопски критерии за оценка на тежестта на колита

Показател	Мерна единица
Диаричен синдром	условни единици
Прираст или редукция на тегло	грамове
Дължина на дебелото черво	сантиметри
Тегло на дебелото черво	грамове
Площ на увредата	квадратни милиметри
Адхезии към съседни органи	Скала: 0 – липса на адхезии, 1 – трудна дисекция, 2 – видими адхезии
Удебеляване на стената	Скала: 0 – няма разлика с нормално черво, 1 – дебелина 1-2 mm, 2 – дебелина над 2 mm

Типичният макроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25, E125 е представен на Фиг. 22. При група Контрола, третирана с 50-процентен етанолов разтвор, лигавицата на дебелото черво е с минимални морфологични промени, изразяващи се в оток и хиперемия. При групите, увредени от ТНБС, разтворен в 50% етанол, в зависимост от степента на увреда на чревната стена се наблюдават оток, хиперемия, хеморагии, както и епителни ерозии и язви. Повърхността на епителните дефекти е покрита с некротични материи. При животните, третирани с евгенол, се наблюдава частично подобрене по някои от тези показатели.



Фиг. 18. Типичен макроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

2.2. Функционална оценка

2.2.1. Ефект от третиране с евгенол върху диаричен синдром при плъхове, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

На 1-ви ден от увредата при групи ТНБС, E1, E5 и E25 се наблюдава статистически значимо увеличение в тежестта на диаричната симптоматика в сравнение с Контрола ($p < 0.001$). При групите, третирани с евгенол, се забелязва прогресивно подобрение във всяка следваща група с увеличаването на дозата, до степен да няма статистически значима разлика при група E125 в сравнение с Контрола. Освен това подобрението на диаричната симптоматика в група E125 достига статистическа значимост в сравнение с група ТНБС ($p < 0.05$) (Таблица 18 и Фиг. 23).

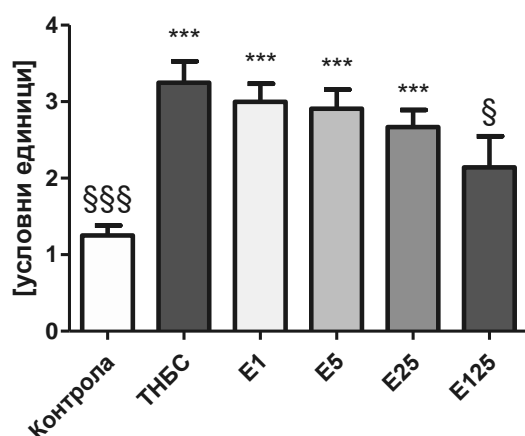
На 2-ри ден от увредата се наблюдава статистически значимо увеличение в тежестта на диаричната симптоматика при група ТНБС ($p < 0.001$) и в по-малка степен при групи E1 и E25 ($p < 0.05$) сравнено с Контрола. При групи E5 и E125 подобрението е до степен да няма статистически значима разлика с група Контрола. При групата с най-висока доза евгенол подобрението достига статистическа значимост в сравнение с група ТНБС ($p < 0.05$) (Таблица 18 и Фиг. 24).

На 3-ти ден от увредата все още има статистически значимо увеличение в тежестта на диаричната симптоматика при група ТНБС ($p < 0.05$), докато при всички останали групи, третирани с евгенол, не се наблюдава статистически значима разлика, сравнено с Контрола. Няма статистическа разлика при третираните с евгенол групи в сравнение с група ТНБС (Таблица 18 и Фиг. 25).

Таблица 16. Оценка на тежестта на диаричния синдром (в условни единици) след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125 в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

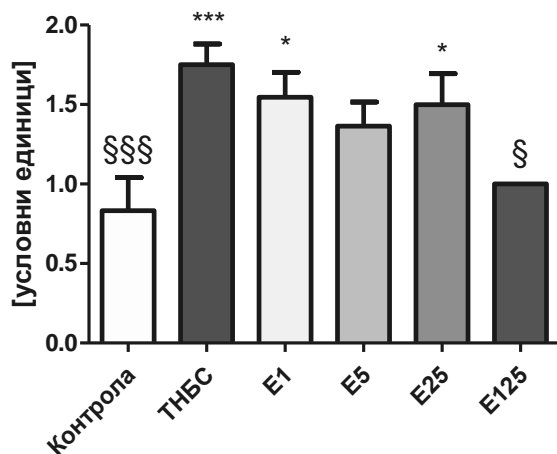
Група \ Показател	Контрола	ТНБС	E1	E5	E25	E125
Оценка на диаричен синдром. Ден 1 (Mean ± SEM)	1.25±0.13	3.25±0.28	3.00±0.23	2.91±0.25	2.67±0.22	2.14±0.40
Оценка на диаричен синдром. Ден 2 (Mean ± SEM)	0.83±0.21	1.75±0.13	1.55±0.16	1.36±0.15	1.50±0.19	1.00±0.00
Оценка на диаричен синдром. Ден 3 (Mean ± SEM)	0.67±0.14	1.42±0.15	0.91±0.21	0.82±0.18	1.00±0.25	1.00±0.00

Оценка на диаричен синдром. Ден 1



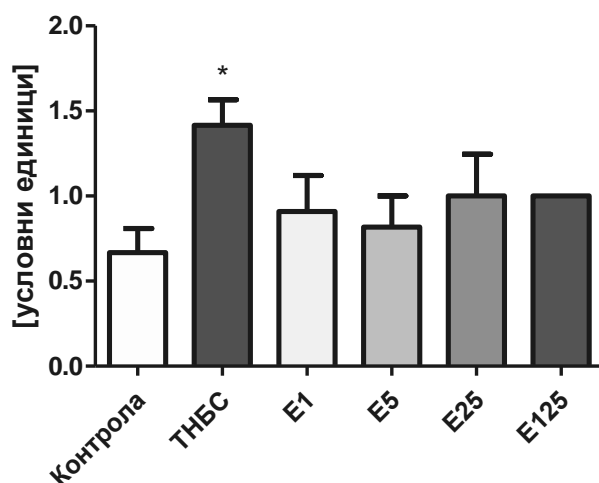
Фиг. 19. Оценка на тежестта на диаричен синдром 24 часа след индукция на колит при плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуцирано от ТНБС чревно възпаление; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола; § $p < 0.05$; §§§ $p < 0.001$ в сравнение с група ТНБС

Оценка на диаричен синдром. Ден 2



Фиг. 20. Оценка на тежестта на диаричен синдром 48 часа след индукция на колит при плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуцирано от ТНБС чревно възпаление; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола; § $p < 0.05$; §§§ $p < 0.001$ в сравнение с група ТНБС

Оценка на диаричен синдром. Ден 3



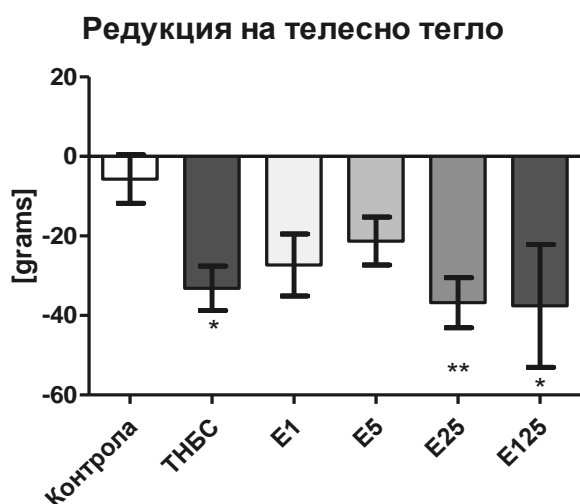
Фиг. 21. Оценка на тежестта на диаричен синдром 72 часа след индукция на колит при плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуцирано от ТНБС чревно възпаление; * $p < 0.05$ в сравнение с група ТНБС

2.2.2. Ефект от третиране с евгенол върху редуцията или наддаването на телесно тегло на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Резултатите са представени в Таблица 19 и Фиг. 26. Седем дни след индукция на колита се наблюдава редукция на телесна маса при всички групи животни. В най-малка степен е намалено телесното тегло при група Контрола, увредена с 50-процентен етанол. При сравняване с Контрола, се наблюдава статистически значима редукция на тегло при групи ТНБС и E125 ($p < 0.05$), както и при група E25 ($p < 0.01$). При групи E1 и E5 намалението на телесно тегло е по-слабо изразено и не достига статистически значимо отклонение спрямо Контрола. Редукцията на телесна маса не показва статистически достоверна разлика в нито една от изследваните групи в сравнение с група ТНБС.

Таблица 17. Редукцията или наддаване на телесно тегло 7 дни след индукция на колит при плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	E1	E5	E25	E125
Редукцията на телесно тегло на седми ден (Mean \pm SEM)	-5.7 \pm 6.1	-33.2 \pm 5.6	-27.3 \pm 7.8	-21.3 \pm 6.0	-36.8 \pm 6.3	-37.6 \pm 15.4



Фиг. 22. Редукция на телесното тегло на 7-ми ден след увредата при плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25, E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ в сравнение с Контрола

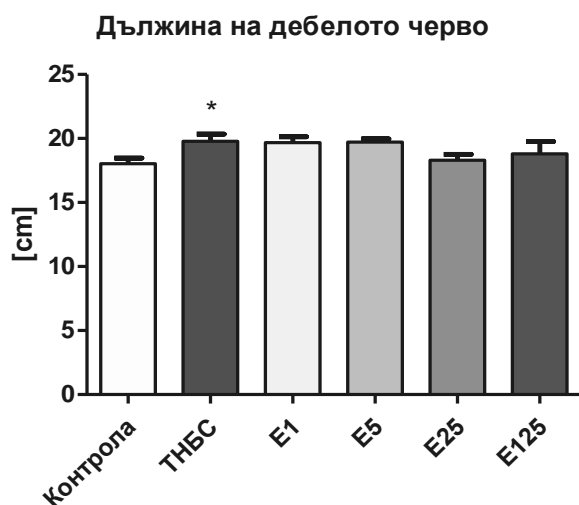
2.3.Макроскопска оценка

2.3.1. Ефект от третиране с евгенол върху дължина на дебелото черво при плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Резултатите са представени в Таблица 20 и Фиг. 27. При животните с увреда индуцирана от ТНБС и етанол, се наблюдава статистически значимо ($p < 0.05$) удължаване на дебелото черво спрямо група Контрола, увредени само с етанол. При групите, третирани с евгенол няма сигнификантни разлики в сравнение с групи Контрола и ТНБС.

Таблица 18. Дължина на дебелото черво в сантиметри след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	E1	E5	E25	E125
Показател						
Дължина на дебелото черво (Mean \pm SEM)	18.0 \pm 0.4	19.8 \pm 0.6	19.7 \pm 0.5	19.7 \pm 0.2	18.3 \pm 0.5	18.8 \pm 1.0



Фиг. 23. Дължина на дебелото черво в сантиметри след третиране с евгенол на плъхове с ТНБС-индуциран колит от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125; * $p < 0.05$ в сравнение с Контрола

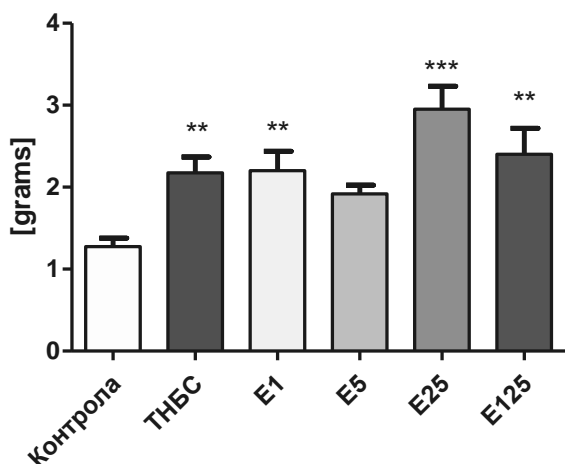
2.3.2. Ефект от третиране с евгенол върху тегло на дисталните 10 см от дебелото черво на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Резултатите са представени в Таблица 21 и на Фиг. 28. Налице е увеличаване на теглото на дисталните 10 см дебелото черво при увредените с ТНБС групи. Най-силно е увеличението при група E25 ($p < 0.001$) и групи E25, E1 и ТНБС ($p < 0.01$). При група E5 теглото на органа не е увеличено в статистически значима степен в сравнение с Контрола. Няма съществени разлики между групите третирани с евгенол, в сравнение с група ТНБС.

Таблица 19. Тегло на дисталните 10 см от дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	E1	E5	E25	E125
Показател						
Тегло на дисталните 10 см от дебело черво (Mean \pm SEM)	1.28 \pm 0.10	2.18 \pm 0.19	2.20 \pm 0.24	1.92 \pm 0.11	2.95 \pm 0.28	2.40 \pm 0.32

Тегло на дебело черво (дисталните 10 см)



Фиг. 24. Тегло на дисталните 10 см от дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

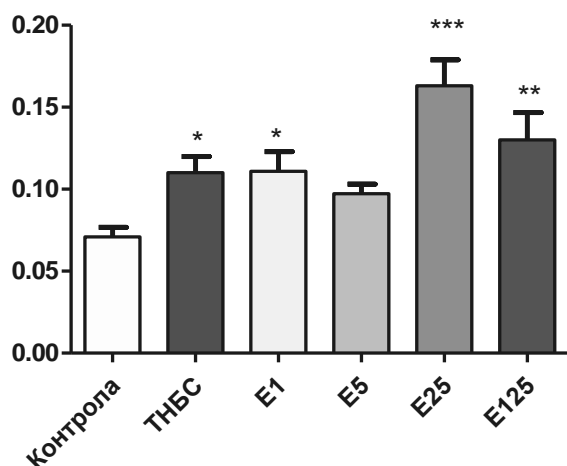
2.3.3. Ефект от третиране с евгенол върху съотношението на теглото на дисталните 10 см към общата дължина на дебелото черво на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Резултатите са представени в Таблица 22 и Фиг. 29. Приложението на ТНБС води до статистически значимо увеличение на съотношението между тегло и дължина на дебело черво в сравнение с Контрола. Подобно увеличение на това съотношение се наблюдава и при третираните с евгенол групи животни. Не се наблюдават статистически разлики между третираните с евгенол групи и група ТНБС.

Таблица 20. Съотношение на теглото на дисталните 10 см към общата дължина на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	E1	E5	E25	E125
Показател						
Съотношение тегло/дължина (Mean ± SEM)	0.07±0.01	0.11±0.01	0.11±0.01	0.10±0.01	0.16±0.02	0.13±0.02

Тегло/Дължина на дебело черво



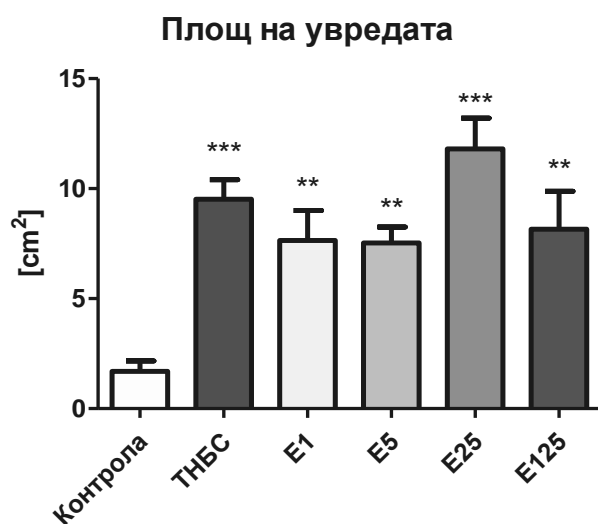
Фиг. 25. Съотношение на теглото на дисталните 10 см към общата дължина на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

2.3.4. Ефект от третиране с евгенол върху площта на увреда на лигавицата на дебелото черво на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Резултатите (в квадратни сантиметри) са представени в Таблица 23 и на Фиг. 30. Ректалната апликация на ТНБС и етанол води до деструктивна увреда, чиято площ е по-голяма от етаноловата увреда при група Контрола. Най-голяма е площта на увредата при групи E25 и ТНБС ($p < 0.001$) и в по-малка степен при групи E125, E1 и E5 ($p < 0.01$) спрямо Контрола. Тенденцията към намаляване на площта на увреда при третираните с евгенол групи не достига статистическа значимост спрямо ТНБС.

Таблица 21. Площ на увредата на лигавицата на дебелото черво в cm^2 след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	E1	E5	E25	E125
Показател						
Площ на увреда (Mean \pm SEM)	1.69 \pm 0.48	9.52 \pm 0.88	7.64 \pm 1.36	7.53 \pm 0.73	11.80 \pm 1.41	8.16 \pm 1.72



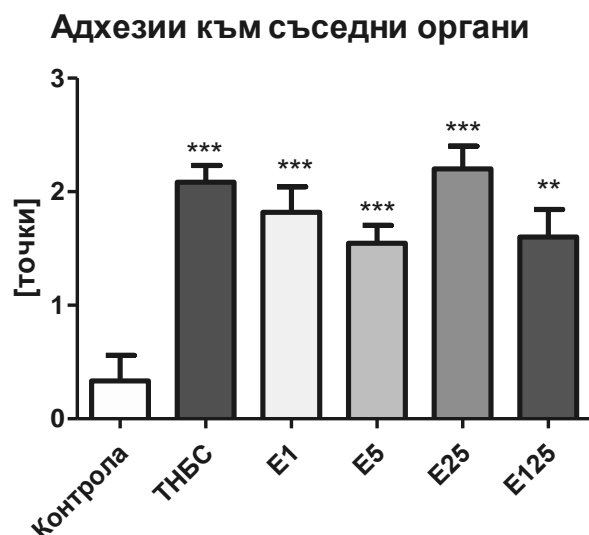
Фиг. 26. Площ на увредата на лигавицата на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

2.3.5. Ефект от третиране с евгенол върху наличието на адхезии към съседни на дебелото черво органи в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите (в точкова скала) са представени в Таблица 24 и на Фиг. 31. Индукцията на колит води до сигнификантно увеличение на степента на изразеност на интраабдоминални адхезии при група ТНБС ($p < 0.001$) спрямо Контрола. Сходно увеличение по отношение на този показател се наблюдава и при групи E1, E5, E25 ($p < 0.001$) и група E125 ($p < 0.01$). Не се наблюдават статистически разлики между третираните с евгенол групи и група ТНБС.

Таблица 22. Макроскопска оценка на степента на изразеност на адхезии към съседни на дебелото черво органи след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	E1	E5	E25	E125
Показател						
Адхезии към съседни органи (Mean \pm SEM)	0.33 \pm 0.22	2.08 \pm 0.15	1.82 \pm 0.23	1.55 \pm 0.16	2.20 \pm 0.20	1.60 \pm 0.24



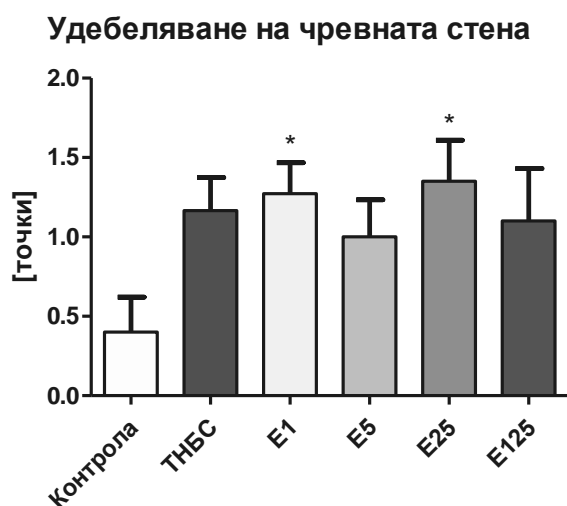
Фиг. 27. Макроскопска оценка на степента на изразеност на адхезии към съседни на дебелото черво органи след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

2.3.6. Ефект от третиране с евгенол върху удебеляване на стената на дебелото черво на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Резултатите (в точкова скала) са представени в Таблица 25 и на Фиг. 32. При група ТНБС се наблюдава удебеляване на чревната стена, което обаче не е статистически значимо спрямо Контрола. При третираните с евгенол групи също се забелязва увеличение по този показател, като при групи E1 и E25 е сигнификантно увеличено ($p < 0.05$) спрямо Контрола. Разликите при третираните с евгенол групи не достигат статистическа значимост спрямо група ТНБС.

Таблица 23. Удебеляване на стената на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	E1	E5	E25	E125
Показател						
Удебеляване на стената на дебело черво (Mean \pm SEM)	0.40 \pm 0.22	1.17 \pm 0.21	1.27 \pm 0.20	1.00 \pm 0.23	1.35 \pm 0.26	1.10 \pm 0.33

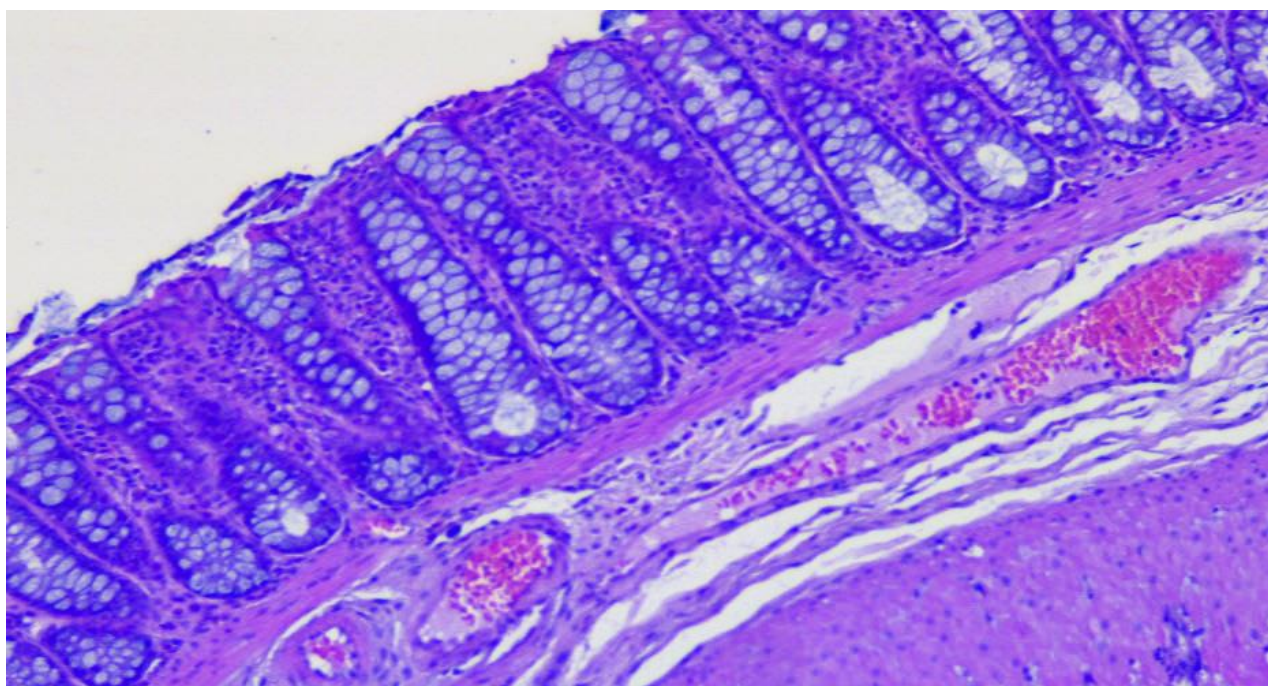


Фиг. 28. Удебеляване на стената на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; * $p < 0.05$ в сравнение с Контрола

2.4. Хистопатологична оценка

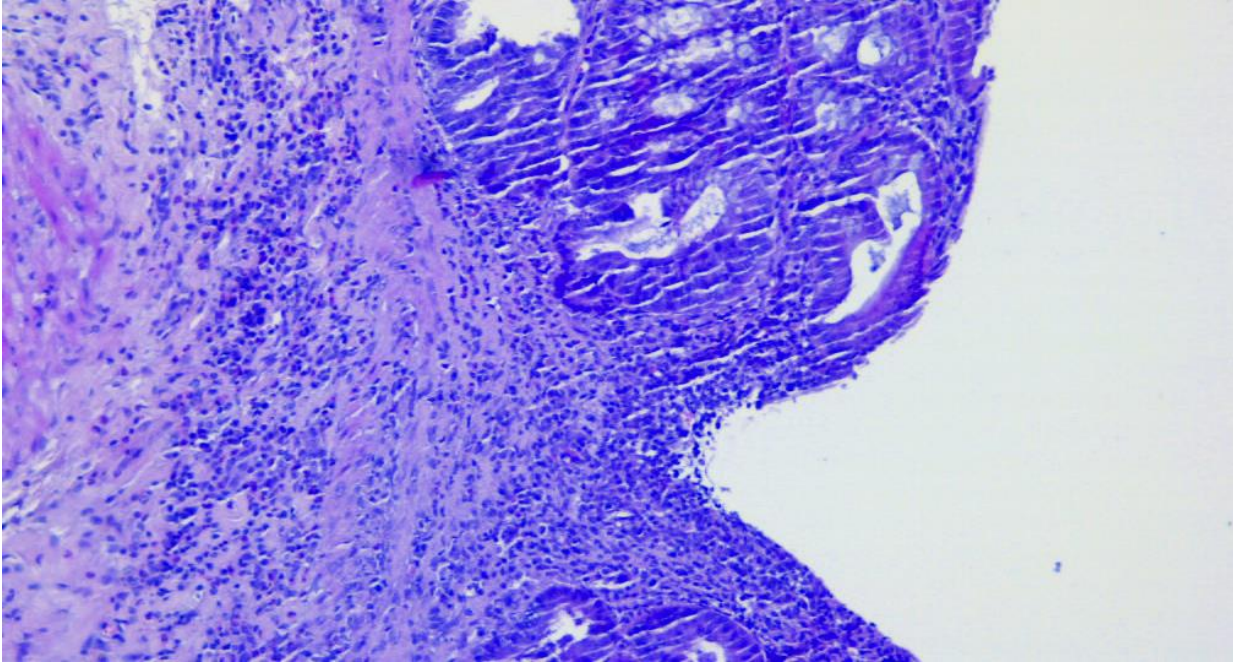
2.4.1. Микроскопски изглед

При хистологичното изследване при плъхове от група Контрола се наблюдава близка до нормалната морфология на епителния слой на лигавицата. Криптите са дълбоки и отворите им са тесни. Ламина проприя и субмукоза съдържат неголямо количество равномерно разпределени клетъчни елементи: фиброцити, фибробласти, лимфоцити и единични хистиоцити. Гоблетовите клетки са изобилни. При отделни животни се наблюдават малки промени, като нарушена архитектурна организация, повърхностни улцерации и слабо изразена клетъчна инфилтрация в ламина проприя и субмукоза. Типичният микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от група Контрола е представен на Фиг. 33.



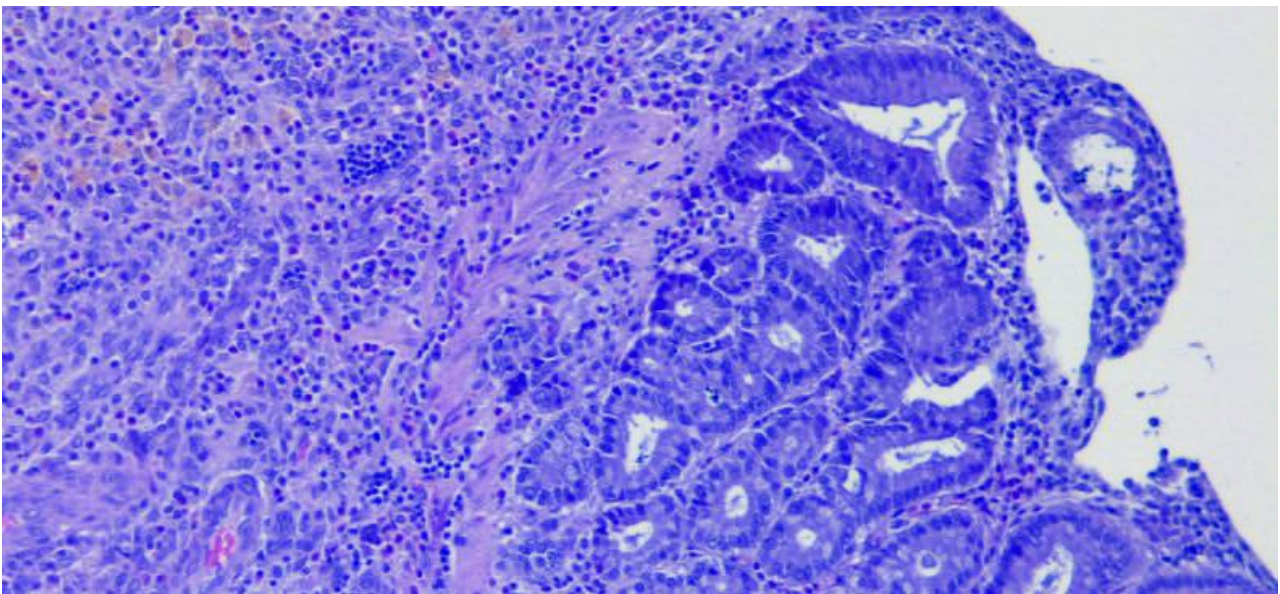
Фиг. 29. Типичен микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от група Контрола. Оцветяване с ХЕ, увеличение $\times 100$

Типичният микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от група ТНБС е представен на Фиг. 34. Наблюдават се лигавични ерозии и обширни язви, навлизащи в дълбочина до мускулния слой. Епителните дефекти са покрити от грануляционна тъкан с изобилие на фибробласти, фиброцити, лимфоцити, неутрофили и макрофаги. В участъците със сравнително запазен епител е намален броят на чашковидните клетки. По ръба на язвата може да се наблюдават признаци на реепителизация. В ламина проприя, както и в субмукоза, присъства изразена възпалителна инфилтрация от лимфоцити, неутрофили, единични макрофаги и плазмоцити.



Фиг. 30. Типичен микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от група ТНБС. Оцветяване с ХЕ, увеличение x100

При групи E1, E5, E25 и E125, хистопатологичната находка варира, като в някои от групите се наблюдава подобрение по отношение на деструкцията на чревния епител и възпалително-клетъчната инфилтрация, както и намалено засягане в дълбочина на чревната стена. Характерният микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от група E125 е представен на Фиг. 35.



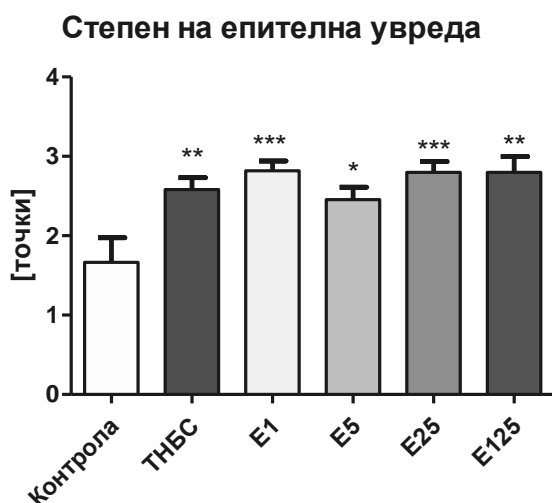
Фиг. 31. Типичен микроскопски изглед на лигавицата на дебело черво на животни от група E125. Оцветяване с ХЕ, увеличение x100

2.4.2. Ефект от третиране с евгенол върху хистопатологичната оценка на степента на мукозна епителна увреда в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите (в точкова скала) са представени в Таблица 26 и на Фиг. 36. Предизвикването на колит чрез ректална апликация на ТНБС води до изразена епителна увреда на лигавицата и при група ТНБС се наблюдава статистически значима разлика ($p < 0.01$) в сравнение с Контрола, увредени само чрез етанол. При групите, третирани с евгенол, подобрение има единствено при група Е5 ($p < 0.05$) в сравнение с Контрола. При сравняване с група ТНБС не се забелязват значими разлики при останалите третирани с евгенол групи.

Таблица 24. Хистопатологична оценка на степента на епителна увреда на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, Е1, Е5, Е25 и Е125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	Е1	Е5	Е25	Е125
Показател						
Хистопатологична оценка (в точки) на степента на епителна увреда (Mean \pm SEM)	1.67 \pm 0.31	2.58 \pm 0.15	2.82 \pm 0.12	2.46 \pm 0.16	2.80 \pm 0.13	2.80 \pm 0.20



Фиг. 32. Хистопатологична оценка на степента на епителната увреда на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, Е1, Е5, Е25 и Е125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

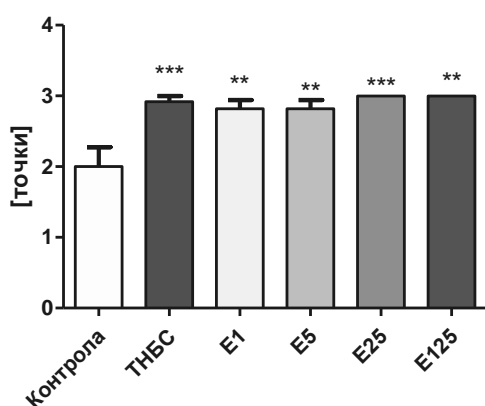
2.4.2. Ефект от третиране с евгенол върху хистопатологичната оценка на възпалително-клетъчната инфилтрация в стена на дебелото черво в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите (в точкова скала) са представени в Таблица 27 и на Фиг. 37. Предизвикването на колит чрез ректална апликация на ТНБС води до изразена възпалително-клетъчната инфилтрация в стената на дебело черво и при група ТНБС се наблюдава статистически значима разлика ($p < 0.001$) в сравнение с Контрола, увредени само чрез етанол. При групите, третирани с евгенол подобрене има при групи E1, E5 и E125 ($p < 0.01$) в сравнение с Контрола. При сравняване с група ТНБС не се забелязват значими разлики при третираните с евгенол групи.

Таблица 25. Хистопатологична оценка на възпалително-клетъчната инфилтрация в стената на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	E1	E5	E25	E125
Хистопатологична оценка) на степента на възпалително-клетъчна инфилтрация (Mean \pm SEM)	2.00 \pm 0.28	2.92 \pm 0.08	2.82 \pm 0.12	2.82 \pm 0.12	3.00 \pm 0.00	3.00 \pm 0.00

Възпалително-клетъчна инфилтрация



Фиг. 33. Хистопатологичната оценка на възпалително-клетъчната инфилтрация в стената на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

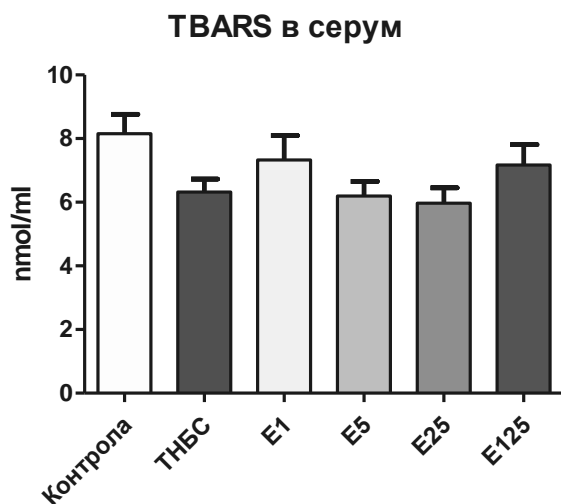
2.5. Биохимични резултати

2.5.1. Ефект от третиране с евгенол върху нивата на оксидативен стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в кръвен серум и в хомогенат от дебело черво в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите са представени в Таблица 28 и на Фиг. 38. Не се забелязва повишение в нивата на TBARS в кръвен серум при увредените с ТНБС групи в сравнение с контрола. Не се отчита статистически значима разлика по отношение на този показател между отделните групи.

Таблица 26. Ефект от третиране с евгенол върху нивата на оксидативен стрес, определени чрез серумната концентрацията на TBARS в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Група	Контрола	ТНБС	Е1	Е5	Е25	Е125
Показател						
Концентрация на TBARS в кръвен серум (Mean \pm SEM)	8.15 \pm 0.61	6.32 \pm 0.41	7.33 \pm 0.76	6.20 \pm 0.46	5.97 \pm 0.48	7.17 \pm 0.65



Фиг. 34. Ефект от третиране с евгенол върху нивата на оксидативен стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в кръвен серум в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове от групи Контрола, ТНБС, Е1, Е5, Е25 и Е125

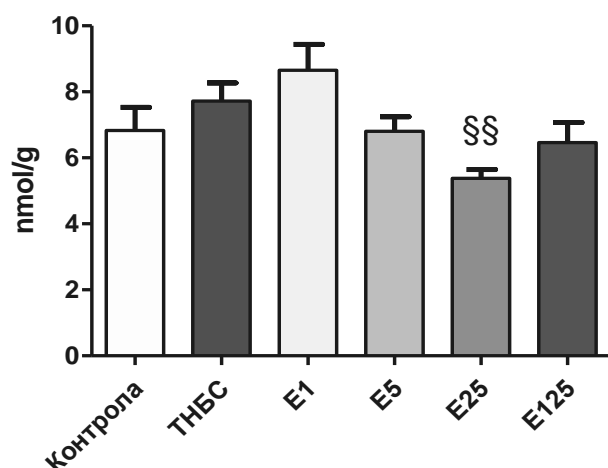
1.5.2. Ефект от третиране с евгенол върху нивата на оксидативния стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в хомогенат от дебело черво и в кръвен серум в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите са представени в Таблица 29 и на Фиг. 39. Очаква се възпалителната реакция в модел на ТНБС-индуциран колит да доведе до оксидативен стрес, изразяващ се чрез повишаване на нивата на TBARS в хомогенат от стената на дебело черво. По този показател не беше наблюдавана статистически значима разлика между групи ТНБС и Контрола. Сигнификантно подобрение се забелязва при група E25 ($p < 0.01$) в сравнение с група ТНБС.

Таблица 27. Ефект от третиране с евгенол върху нивата на оксидативен стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в хомогенат от дебело черво в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Група	Контрола	ТНБС	E1	E5	E25	E125
Показател						
Концентрация на TBARS в хомогенат от дебело черво (Mean \pm SEM)	6.83 \pm 0.69	7.73 \pm 0.55	8.66 \pm 0.79	6.80 \pm 0.44	5.38 \pm 0.27	6.47 \pm 0.60

TBARS в хомогенат от дебело черво



Фиг. 35. Ефект от третиране с евгенол върху нивата на оксидативен стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в хомогенат от дебело черво в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове от групи Контрола, ТНБС, E1, E5, E25 и E125; §§ $p < 0.01$ в сравнение с група ТНБС

2.6. Обсъждане

Редукция в теглото на животните е наблюдавана при всички увредени групи, което се обяснява със системната възпалителна реакция и действието на проинфламаторните цитокини TNF α , IL-1 и IL-6. При третираните с ниски дози евгенол групи (1 и 5 mg/kg) е наблюдавано подобрене по отношение на този показател. Дози от 25 и 125 mg/kg водят до редукция на теглото, съизмерима с група ТНБС. Тези резултати са в съответствие с описаните в литературата дози от 300 mg/kg, при които не се наблюдават странични ефекти, с изключение на слаб анорексигенен ефект (National Toxicology Program, 1983). Вероятно наблюдаваната редукция на тегло при животните от групите, третирани с по-високи дози евгенол, е резултат на влошени вкусови качества на храната и на анорексигенен ефект на експерименталното вещество.

Тъй като няма данни за генотоксичност или канцерогенност, евгенол е разрешен за употреба в хранително-вкусовата промишленост, като допустимият дневен прием при хора е определен на до 1 mg/kg телесна маса (European Food Safety Authority, 2012).

След резорбция в ГИТ евгенол, подобно на анетол, претърпява интензивен чернодробен метаболизъм на първо преминаване и в много малък процент достига до системното кръвообращение в непроменен вид. След перорални дози на евгенол от 3 mg/kg телесна маса, приложени при доброволци, не се измерват серумни концентрации от над 10 ng/ml. Над 95% от перорално приетата доза се екскретира чрез урината под формата на водоразтворими фенолни конюгати, основно глюкуронид и сулфат (Fischer et al., 1990).

Третирането с евгенол в настоящия експеримент води до доза-зависима редукция на диаричната симптоматика при всички третирани групи. Антидиаричният ефект на евгенол-съдържащи екстракти от лечебни растения е добре известен от употребата им в традиционната медицина (Li et al., 2013).

Терапевтичните механизми на евгенол при диария са проучени до голяма степен. Знае се, че увеличеният обем на изпражненията при диаричен синдром се дължи основно на секрецията на хлорни йони чрез канали, разположени върху апикалната мембрана на ентероцитите. TMEM16A (ANO1) е калций-зависим хлорен канал, имащ отношение към чревната епителна секреция, контракцията на гладката мускулатура и перисталтиката. При изследване на традиционен тайландски антидиаричен препарат от растителен произход евгенол е бил идентифициран като активното вещество и е била установена инхибираща активност по отношение на TMEM16A. В клетъчна култура от човешки колоноцити 50-процентна инхибиция на активността на TMEM16A се постига при концентрация на евгенол от около 150 μ M (25 μ g/ml) (Yao et al., 2012).

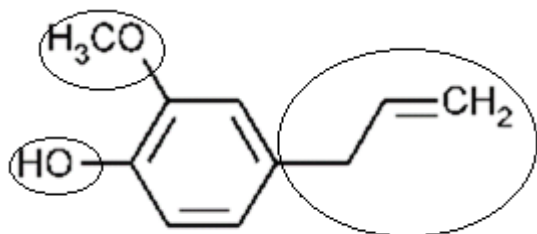
TMEM16A е експресиран и от интерстициалните клетки на Кахал (Cajal), които са пейсмейкърните клетки по отношение на чревната перисталтика (Hwang et al., 2009). Евгенол инхибира честотата на спонтанните чревни контракции, но

най-вече е ефективен по отношение на редуцията на чревния мускулния тонус както при покой, така и при съкращение (Yao et al., 2012).

Освен по отношение на калций-зависимите хлорни канали, евгенол притежава инхибираща активност и спрямо редица други катионни канали в неврони, мускулни и епителни клетки. Вероятно добре известните в стоматологията аналгетични ефекти на прилагания локално евгенол се дължат на инхибиция на натриеви, калиеви и калциеви канали (Park et al., 2009; Li et al., 2007; Lee et al., 2005). Описаните концентрации за постигане на 50-процентна инхибиция на активността на йонните канали са от порядъка на 150 до 600 μM (25-100 $\mu\text{g/ml}$) (Cho et al., 2008). Тези концентрации очевидно не могат да бъдат достигнати в серума след перорален прием на евгенол поради интензивния чернодробен метаболизъм на първо преминаване. Дори перорални дози от 40 mg/kg, приложени при плъхове, не водят до серумни концентрации над 1 μM (164 ng/ml) (Lionnet et al., 2010). Но локално приложен в интестиналния тракт, поради добрата си липоразтворимост евгенол би могъл да достигне достатъчно високи концентрации в чревния епител и клетките на Кахал и да инхибира съответните хлорни канали.

Голяма част от наблюдаваните противовъзпалителни ефекти в настоящия експеримент биха могли да бъдат обяснени с мощната антиоксидантна активност на евгенол и съответна редуция на предизвиканите от възпалението оксидативен стрес и тъканна увреда. Евгенол има голям афинитет за свързване към реактивни кислородни съединения и по този начин би могъл да предпази биологичните структури от липидна пероксидация. Тъй като е липоразтворим може да се очаква, че тази му активност ще е предимно по отношение на клетъчните мембрани (Leem et al., 2011). Доказано е, че веществата с антиоксидантна активност имат полезно действие в модели на ТНБС-индуциран експериментален колит (Valcheva-Kuzmanova et al., 2018).

Евгенол притежава 3 функционални групи – хидроксилна, метокси и алилова, прикрепени към бензенов пръстен (Фиг. 40).



Фиг. 36. Химична структура на евгенол

Антиоксидантната активност на фенолните съединения се дължи основно на хидроксилните им групи. Поради влиянието на бензеновото ядро връзката O-

Н е слаба и позволява отдаването на водороден атом например към пероксилния радикал $RO_2\bullet$, което води до неутрализация на свободните радикали. Освен това евгенол (подобно на резвератрол, салицилати и други фенолни съединения със свободна орто позиция) може да неутрализира хидроксилния радикал ($OH\bullet$) чрез ароматно хидроксилране в орто позиция (Lipinski, 2011). За утвърдени лекарствени средства като аминосалицилатите също се предполага, че осъществяват полезното си действие и чрез неутрализация на свободните радикали, продуцирани при възпаление (Ahnfelt-Rønne et al., 1990).

Евгенол е един от най-мощните естествени антиоксиданти, по-мощен от анетол и сравним по ефективност с утвърдени липофилни антиоксиданти като α -tocopherol и ВНТ (Lee et al., 2005). Евгенол е липофилно вещество и поради това основното му място на клетъчно действие е в мембраните, където се интегрира и ги предпазва от липидна пероксидация. Евгенол (и в по-малка степен съдържащото го карамфилово масло) е демонстрирал най-висока антиоксидантна активност в сравнение с 15 други разпространени етерични масла или чисти субстанции, като карвакрол и тимол. Антиоксидантната активност, измерена чрез DPPH-метода, е сходна с тази на кверцетин (Pérez-Rosés et al., 2016). Антиоксидантната активност на евгенол вероятно е свързана не само с неутрализация на свободните радикали, но и с инхибиция на активността или експресията на продуциращите ги ензими или съответните транскрипционни фактори. Евгенол е сред компонентите на етерични масла, притежаващи силна инхибираща активност по отношение на ензима миелопероксидаза и съответно потиска продукцията на реактивни кислородни и азотни съединения от активираните левкоцити (Pérez-Rosés et al., 2016).

Евгенол притежава антиоксидантен потенциал и по отношение на оксидативния стрес в клетъчния цитозол. Приложен при опитни животни в интраперитонеални дози от 10 mg/kg, евгенол сигнификантно увеличава нивата на редуцирания вътреклетъчен глутатион и потиска образуването на оксидативни продукти от липиди и протеини (малондиалдехид и карбонилни съединения) в условията на възпаление. Серумните нива на антиинфламаторния цитокин IL-10 също се увеличават вследствие на третирането с евгенол (Mateen et al., 2019).

Установено е, че евгенол в ниски концентрации (до 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) усилва в минимална степен спонтанната продукция на $TNF\alpha$ от неактивирани макрофаги. Стимулация с бактериални LPS води до рязко увеличена продукция на проинфламаторните цитокини $TNF\alpha$ и IL-1 β от макрофагите. Тази стимулация се потиска доза-зависимо от евгенол в дози над 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, при това без да се наблюдава цитотоксично действие. Счита се, че тези ефекти се осъществяват чрез инхибиране на транскрипционния път на NF- κB , ключов регулатор на възпалителния отговор (Liu et al., 2012; Huang et al., 2015). Детайлният механизъм на инхибиция вероятно е свързан с down-регулация или инхибиция на ензимната активност на киназата, фосфорилираща I κB и по този начин се блокира сигналната каскада на NF- κB (Manikandan et al., 2011).

Инфилтрацията на тъканите с възпалителни клетки е един от микроскопските признаци за възпаление. В настоящия експеримент е демонстрирано хистопатологично, че евгенол в дози 1 и 5 mg/kg води до редуция в броя на мигриралите в засегнатия участък от чревната стена бели кръвни клетки. Това би могло да се дължи на описаните в литературата потискащи ефекти на евгенол по отношение на адхезията на левкоцити към съдовия ендотел и последващата им миграция в тъканите. Евгенол потиска ефектите на мощните левкоцитни хемоатрактанти fMLF и LTB₄, стимулиращи хемотаксиса най-вече на полиморфонуклеарни гранулоцити (Estevão-Silva et al., 2014).

Евгенол в концентрация от 10 µg/ml селективно инхибира генната експресия и активността на индуцируемия в условията на възпаление ензим COX-2 и по този начин редуцира синтеза на PGE₂ (един от главните медиатори на болка и възпаление) (Kim et al., 2003). Но тъй като PGE₂ осъществява и протективни функции по отношение на ГИТ, вероятно инхибицията на производството на простагландини не е основният противовъзпалителен механизъм по отношение на чревното възпаление. Клиничните данни също демонстрират, че неселективните COX инхибитори всъщност влошават протичането на ВЧЗ. Селективните инхибитори на COX-2 са по-безопасни и са предпочитани, когато се налага употребата на НСПВЛ при пациенти с ВЧЗ (Kvasnovsky et al., 2014). Поради селективното си действие спрямо индуцируемия при възпаление ензим COX-2 евгенол не нарушава протективната роля на простагландините по отношение на лигавицата на гастроинтестиналния тракт.

В условията на възпаление се индуцира експресията не само на COX-2, но и на 5-LOX в полиморфонуклеарните и други левкоцити. Ензимът 5-LOX е отговорен за производството на LTB₄ и LTC₄, инфламаторни медиатори, играещи роля за хемотаксиса и хронифицирането на възпалителния процес при ВЧЗ. Поради това потискането на левкотриеновата продукция от мигриралите на мястото на възпаление полиморфонуклеарни клетки би могло да е потенциална терапевтична цел. Установено е, че евгенол инхибира активността на ензима 5-LOX и производството на LTC₄ в полиморфонуклеарните клетки по неконкурентен и обратим механизъм, като IC₅₀ се наблюдава при концентрация на евгенол от около 30 µM (Raghavenra et al., 2006). LTC₄ индуцира гладкомускулна контракция и увеличен пермеабилитет на кръвоносните съдове (Wertz et al., 2006). Поради това потиснатото му производство би могло да играе роля за наблюдаваното в експеримента подобрене по отношение на удебеляване на стената на дебелото черво в дози 5 и 125 mg/kg. Индуцираната от евгенол редуция в производството на LTB₄ (мощен полиморфонуклеарен хемоатрактант) би могла да обясни наблюдаваното хистологично подобрене по отношение на инфилтрацията с възпалителни клетки в стената на дебелото черво при дози 1 и 5 mg/kg (Estevão-Silva et al., 2014).

Известно е, че евгенол притежава и антибактериални свойства, по-силно изразени спрямо Грам-положителните бактерии (Leem et al., 2011). Поради това е логично да се предположи, че пероралното му приложение би могло да повлияе на състава на чревната флора. Присъствието на някои интестинални бактерии (като *Bacteroides*, *Clostridiaceae*, *Peptostreptococcaceae* и други) е протективно при чревно възпаление, тъй като се стимулира нормалната дебелочревна продукция на мукус (Vital et al., 2017; Burger-van Raassen et al., 2009). Дебелината на мукусния слой на дебелочревната лигавица корелира пряко с протективната му функция спрямо агресивни фактори. За патогенезата на ВЧЗ и особено УК се знае, че изтъненият мукусен слой предразполага към нарушена бариерна функция и провокиране на хроничен имунен отговор към коменсални бактерии в ГИТ (Antoni et al., 2014).

Установено е, че перорално третиране с ниски дози евгенол (13.3 mg/L в питейната вода) сигнификантно увеличава не само чревната продукция на муцин, но и на антимикробни пептиди при опитни животни. Тези ефекти са асоциирани отново с увеличено присъствие на бактериалните фамилии *Clostridiaceae* и *Peptostreptococcaceae* (Wlodarska et al., 2015). В настоящия експеримент наблюдавахме признаци на намалена увреда предимно при групите, третирани с ниски дози евгенол. Възможно е полезното действие на евгенол при чревно възпаление да се дължи не само на доза-зависимите противовъзпалителни и антиоксидантни ефекти, но и на промяна в състава на бактериалната флора в посока на редуциращи възпалителния отговор микроорганизми при приложение в ниски перорални дози. В по-високи дози евгенол би могъл неселективно да потиска по-широк спектър от микроорганизми и вследствие на това да се редуцират тези полезни ефекти.

3. Ефект на галова киселина върху модел на ТНБС-индуциран колит при плъхове

3.1. Експериментална постановка

Експериментът е проведен върху 60 мъжки Wistar плъха, разделени в 5 групи от по 12 животни: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40, ГК80.

На 1-ви ден от експеримента при животните от групи ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80 е индуциран експериментален колит чрез ректална апликация на ТНБС в доза от 10 mg на плъх, разтворен в 0.25 ml 50-процентен етанол. Преди апликацията плъховете са гладували в продължение на 24 часа, но са имали осигурен свободен достъп до питейна вода. Животните са анестезирани преди ректалната инстилация чрез интраперитонеално приложение на *thiopental* в доза от 40 mg/kg. ТНБС е въведен ректално с помощта на гъвкава канюла на дълбочина 8 cm от ануса. При контролната група плъхове е приложен 50-процентен етанолов разтвор вместо ТНБС-съдържащ етанолов разтвор. След апликацията плъховете са позиционирани с главата надолу в продължение на

няколко минути. След възстановяване от анестезията е осигурен непрекъснат, свободен достъп до храна и вода.

Последващото ежедневно орално третиране на животните чрез орогастрална канюла е започнато 24 часа след индукцията на колита и е осъществявано в продължение на 5 дни. Групите Контрола и ТНБС са получавали само дестилирана вода. Групите ГК20, ГК40 и ГК80 са третирани с галова киселина (ГК) в дози от 20, 40 и 80 mg/kg телесна маса, разтворен в дестилирана вода до обем от 10 ml/kg телесна маса. Третирането на групите с експериментални животни е обобщено в Таблица 30.

Таблица 28. Ректална инстилация и перорално третиране на експерименталните животни от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 И ГК80

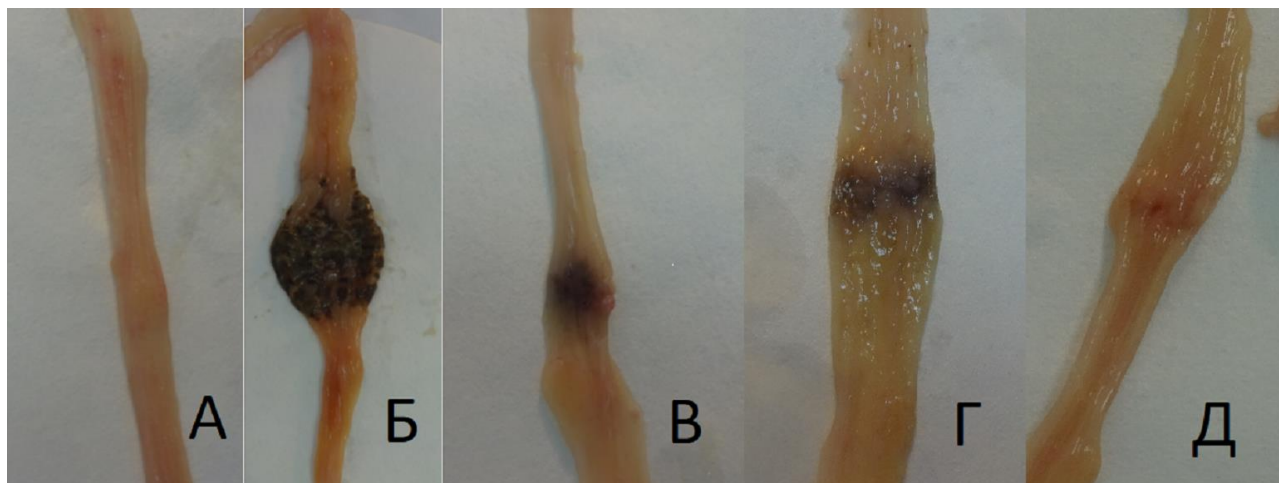
Група:	Брой животни	Ректална апликация на:	8 дни интрагастрално третиране с:
Контрола	12	0.25 ml 50-процентен етанол	Дестилирана вода
ТНБС	12	10 mg ТНБС в 0.25 ml 50% етанол	Дестилирана вода
ГК20	12	10 mg ТНБС в 0.25 ml 50% етанол	ГК в доза от 20 mg/kg телесно тегло
ГК40	12	10 mg ТНБС в 0.25 ml 50% етанол	ГК в доза от 40 mg/kg телесно тегло
ГК80	12	10 mg ТНБС в 0.25 ml 50% етанол	ГК в доза от 80 mg/kg телесно тегло

Общото състояние и телесното тегло на животните са оценявани ежедневно. Едно денонощие преди приключването на експеримента е спрял свободният достъп до храна. На десети ден от индукцията на колита е измерено крайното тегло на животните. Оценена е промяната на теглото (прираст или редукция) спрямо началното. След това животните са анестезирани чрез инхалационно приложение на диетилов етер и са евтаназирани чрез декапитация. Взети са кръвни проби за получаване на серум за биохимични изследвания. Направена е аутопсия на животните с отваряне на коремната кухина и оценка на тежестта на колита според макроскопските критерии, представени в Таблица 31. Взети са и проби от тъкан от дебело черво за биохимични изследвания.

Таблица 29. Функционални и макроскопски критерии за оценка на тежестта на колита

Показател	Мерна единица
Диаричен синдром	условни единици
Прираст или редукция на тегло	грамове
Дължина на дебелото черво	сантиметри
Тегло на дебелото черво	грамове
Площ на увредата	квадратни милиметри
Адхезии към съседни органи	Скала: 0 – липса на адхезии, 1 – трудна дисекция, 2 – видими адхезии.
Удебеляване на стената	Скала: 0 – няма разлика с нормално черво, 1 – удебеляване с 1-2 mm, 2 – удебеляване над 2 mm.

Типичният макроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 И ГК80 е представен на Фиг. 41. При животните от група Контрола, третирани с 50-процентен етанолов разтвор, лигавицата на дебелото черво типично е без промени или с леки промени като оток и хиперемия. При групите, увредени от ТНБС, разтворен в 50% етанол, чревната лигавица е с видими възпалителни промени – оток, хиперемия и хеморагично-некротични деструкции. При животните, третирани с ГК, се наблюдава частично подобрение по отношение на тези показатели.



Фиг. 37. Типичен макроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от групи: Контрола (А), ТНБС (Б), ГК20 (В), ГК40 (Г) и ГК80 (Д) в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

3.2. Функционална оценка

3.2.1. Ефект от третиране с ГК върху диаричен синдром при плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

На 1-ви ден от увредата при група ТНБС се наблюдава статистически значимо увеличение в тежестта на диаричната симптоматика ($p < 0.001$) в сравнение с Контрола. Подобна разлика се наблюдава и при група ГК40 ($p < 0.001$), както и в по-малка степен при ГК80 ($p < 0.01$) и ГК20 ($p < 0.05$) в сравнение с Контрола. Подобрението на диаричната симптоматика в третираните с ГК групи не достига статистическа значимост в сравнение с група ТНБС (Таблица 32 и Фиг. 42).

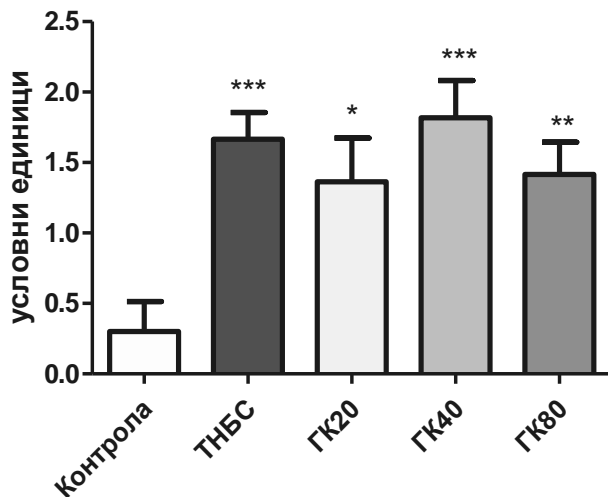
На 2-ри ден от увредата се наблюдава статистически значимо увеличение в тежестта на диаричната симптоматика при група ТНБС ($p < 0.05$) в сравнение с Контрола. При групи ГК20 и ГК40 има подобрение, но все още се наблюдава статистическа разлика ($p < 0.05$) спрямо Контрола. В група ГК80 подобрението на диаричната симптоматика е най-голямо и няма отклонение спрямо Контрола (Таблица 32 и Фиг. 43). Не се наблюдава статистически значима разлика между третираните с ГК групи и ТНБС.

На 3-ти ден от увредата все още има статистически значимо увеличение в тежестта на диаричната симптоматика при група ТНБС ($p < 0.05$), докато при всички останали групи, третирани с ГК, се отчита подобрение и не се наблюдава статистически значима разлика, сравнено с Контрола. При сравнение с група ТНБС се забелязва статистически значимо подобрение в групата с най-висока доза ГК80 ($p < 0.05$) (Таблица 32 и Фиг. 44).

Таблица 30. Оценка на тежестта на диаричния синдром (в условни единици) след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

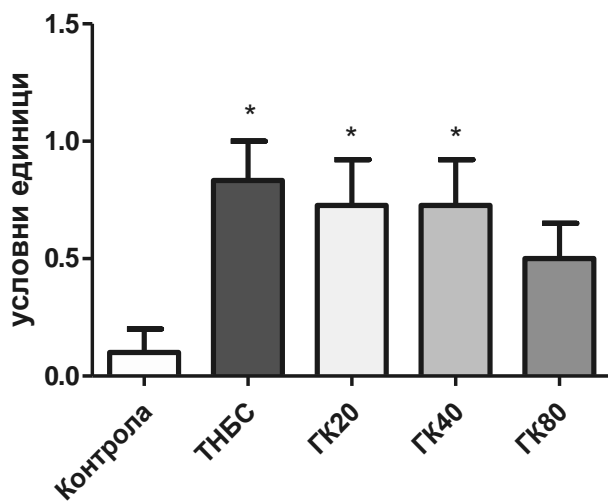
Група	Контрола	ТНБС	ГК20	ГК40	ГК80
Оценка на диаричен синдром. Ден 1 (Mean \pm SEM)	0.30 \pm 0.21	1.67 \pm 0.19	1.36 \pm 0.31	1.82 \pm 0.87	1.42 \pm 0.23
Оценка на диаричен синдром. Ден 2 (Mean \pm SEM)	0.10 \pm 0.10	0.83 \pm 0.17	0.73 \pm 0.20	0.73 \pm 0.20	0.50 \pm 0.15
Оценка на диаричен синдром. Ден 3 (Mean \pm SEM)	0.30 \pm 0.15	0.92 \pm 0.19	0.36 \pm 0.15	0.55 \pm 0.16	0.25 \pm 0.18

Оценка на диаричен синдром. Ден 1



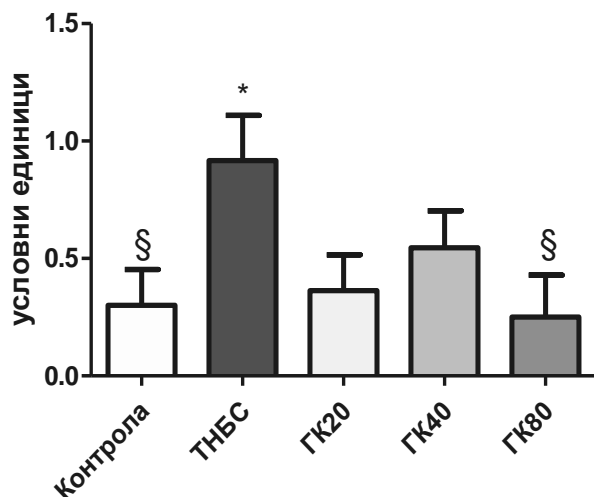
Фиг. 38. Оценка на тежестта на диаричен синдром 24 часа след индукция на колит при плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуцирано от ТНБС чревно възпаление; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

Оценка на диаричен синдром. Ден 2



Фиг. 39. Оценка на тежестта на диаричен синдром 48 часа след индукция на колит при плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуцирано от ТНБС чревно възпаление; * $p < 0.05$ в сравнение с Контрола

Оценка на диаричен синдром. Ден 3



Фиг. 40. Оценка на тежестта на диаричен синдром 72 часа след индукция на колит при плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуцирано от ТНБС чревно възпаление; * $p < 0.05$ в сравнение с Контрола; § $p < 0.05$ в сравнение с група ТНБС

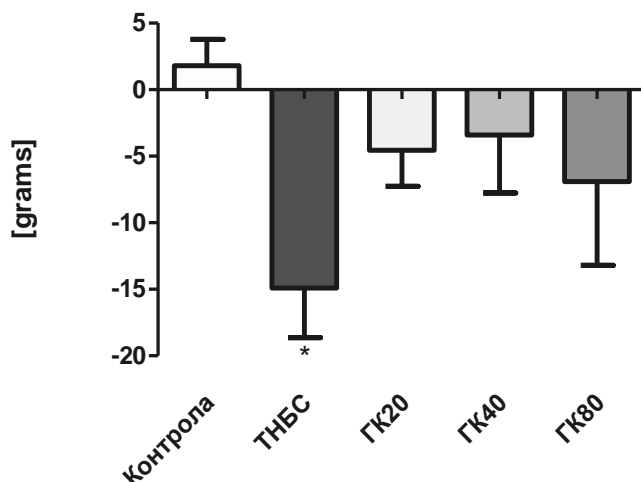
3.2.2. Ефект от третиране с ГК върху редуцията или наддаването на телесно тегло на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Резултатите са представени в Таблица 33 и Фиг. 45. На 7-ми ден след увредата се наблюдава редуция на теглата на животните от всички групи, с изключение на група Контрола, при които има малък прираст. При група ТНБС редуцията на телесна маса е най-изразена и достига статистическа значимост в сравнение с Контрола ($p < 0.05$). Приложението на ГК води до подобрене при всички третирани групи. Редуцията на телесна маса при тях не е изразена в толкова голяма степен и няма статистическа значимост спрямо Контрола. В сравнение с група ТНБС не се открива статистически достоверна разлика при групите, третирани с ГК.

Таблица 31. Редуцията или наддаване на телесно тегло 7 дни след индукция на колит при плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	ГК20	ГК40	ГК80
Показател					
Редуцията на телесно тегло на седми ден (Mean ± SEM)	1.8±2.0	-14.9±3.7	-4.5±2.7	-3.4±4.4	-6.9±6.3

Редукция или наддаване на телесно тегло



Фиг. 41. Редукция на телесното тегло на 7-ми ден след увредата при плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40, ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; * $p < 0.05$ в сравнение с Контрола

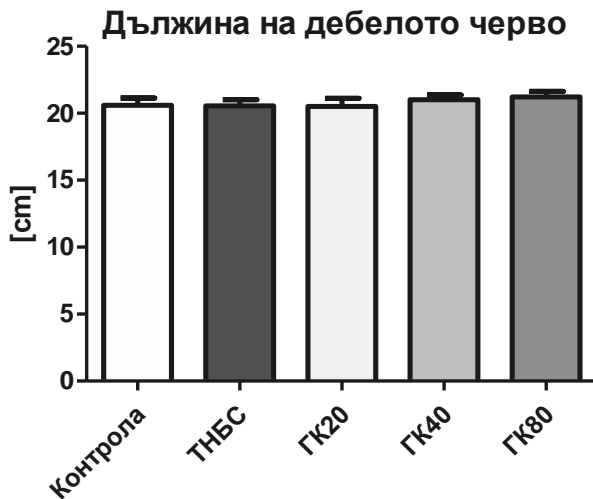
3.3.Макроскопска оценка

3.3.1. Ефект от третиране с ГК върху дължина на дебелото черво при плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Не се наблюдава статистически значима разлика в дължината на дебело черво между групите увредени с етанол и групите, увредени с ТНБС, разтворен в етанол (Таблица 34 и Фиг. 46). С увеличаване на прилаганите дози при третираните с ГК групи се наблюдава тенденция към удължаване на дебелото черво, спрямо Контрола и ТНБС, но разликите не са статистически значими.

Таблица 32. Дължина на дебелото черво в сантиметри след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	ГК20	ГК40	ГК80
Показател					
Дължина на дебелото черво (Mean \pm SEM)	20.60 \pm 0.53	20.55 \pm 0.45	20.50 \pm 0.62	21.00 \pm 0.36	21.23 \pm 0.42



Фиг. 42. Дължина на дебелото черво в сантиметри след третиране с ГК на плъхове с ТНБС-индуциран колит от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80

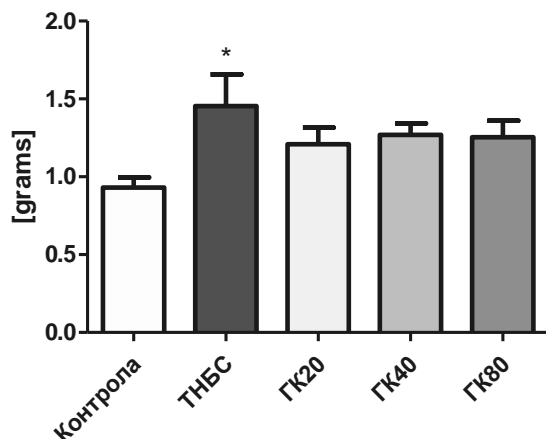
3.3.2. Ефект от третиране с ГК върху тегло на дисталните 10 см от дебелото черво на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

При група ТНБС се наблюдава статистически значимо повишение ($p < 0.05$) по отношение на тегло на увредената част от дебело черво в сравнение с Контрола (Таблица 35 и Фиг. 47). При всички останали групи, увредени с ТНБС, но лекувани с ГК, се наблюдава подобрене в този показател до степен да няма статистическа разлика спрямо Контрола.

Таблица 33. Тегло на дисталните 10 см от дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	ГК20	ГК40	ГК80
Показател					
Тегло на дисталните 10 см от дебело черво (Mean \pm SEM)	0.93 \pm 0.07	1.46 \pm 0.20	1.21 \pm 0.11	1.27 \pm 0.07	1.26 \pm 0.11

Тегло на дебело черво (дисталните 10 см)



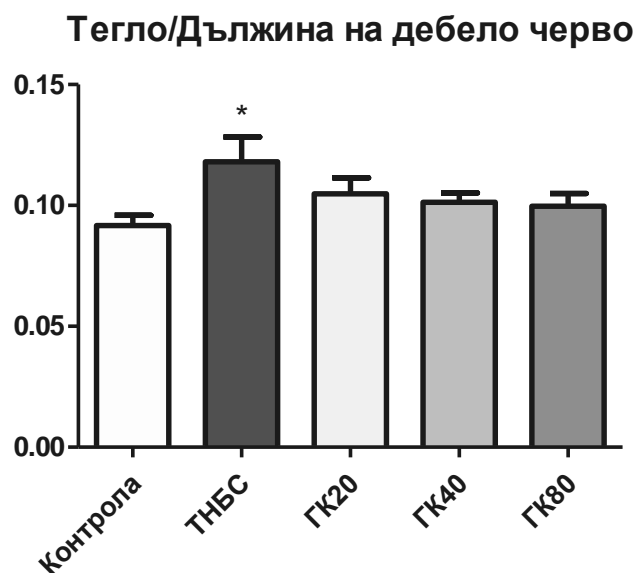
Фиг. 43. Тегло на дисталните 10 см от дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; * $p < 0.05$ в сравнение с Контрола

3.3.3. Ефект от третиране с ГК върху съотношението на теглото на дисталните 10 см към общата дължина на дебелото черво на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Резултатите са представени в Таблица 36 и на Фиг. 48. Увредата с ТНБС сигнификантно увеличава съотношението между тегло и дължина на дебело черво ($p < 0.05$) спрямо Контрола. При групите, третирани с ГК, се наблюдава доза-зависимо подобрение в този показател, но не се достига до статистически значима разлика спрямо ТНБС.

Таблица 34. Съотношение на теглото на дисталните 10 см към общата дължина на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	ГК20	ГК40	ГК80
Показател					
Съотношение тегло/дължина (Mean \pm SEM)	0.09 \pm 0.00	0.12 \pm 0.01	0.10 \pm 0.01	0.10 \pm 0.00	0.10 \pm 0.01



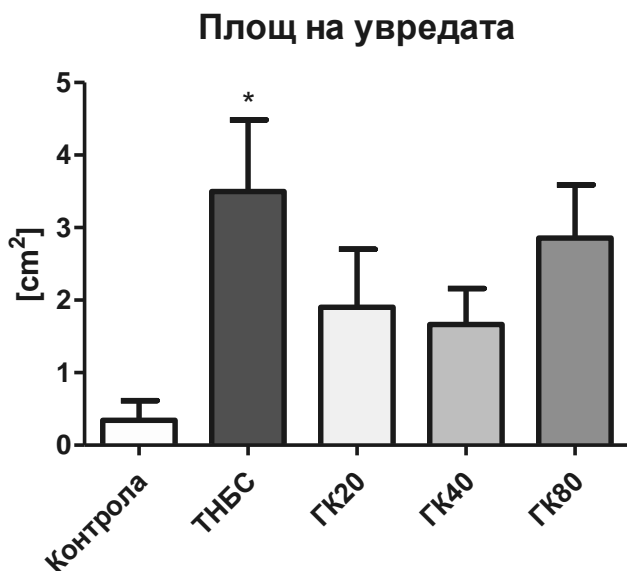
Фиг. 44. Съотношение на теглото на дисталните 10 см към общата дължина на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80 и С, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; * $p < 0.05$ в сравнение с Контрола

3.3.4. Ефект от третиране с ГК върху площта на увреда на лигавицата на дебелото черво на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Резултатите (в квадратни сантиметри) са представени в Таблица 37 и на Фиг. 49. ТНБС води до сигнификантно увеличение на площта на засегнатия участък при група ТНБС ($p < 0.05$) в сравнение с Контрола. Третирането с ГК във всички дози предизвиква намаление на площта на увредата, като при съответните групи не се наблюдават сигнификантни разлики спрямо Контрола. При сравнение между третираните с ГК групи и група ТНБС не се установява статистическа значимост.

Таблица 35. Площ на увредата на лигавицата на дебелото черво в cm^2 след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	ГК20	ГК40	ГК80
Показател					
Площ на увреда (Mean \pm SEM)	0.35 \pm 0.27	3.50 \pm 0.99	1.90 \pm 0.80	1.66 \pm 0.49	2.86 \pm 0.73



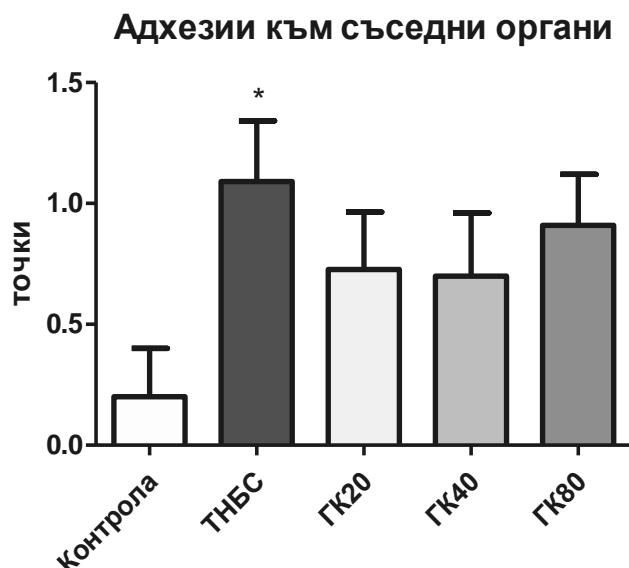
Фиг. 45. Площ на увредата на лигавицата на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; * $p < 0.05$ в сравнение с Контрола

3.3.5. Ефект от третиране с ГК върху наличието на адхезии към съседни на дебелото черво органи в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите (в точкова скала) са представени в Таблица 38 и на Фиг. 50. Индукцията на колит води до сигнификантно увеличение на степента на изразеност на интраабдоминални адхезии при група ТНБС ($p < 0.05$) спрямо Контрола. При групите, третирани с ГК, наличието на адхезии е по-слабо изразено и не се наблюдава статистически значима разлика в сравнение с Контрола. Не се наблюдават статистически разлики между третираните с ГК групи и група ТНБС.

Таблица 36. Макроскопска оценка на степента на изразеност на адхезии към съседни на дебелото черво органи след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	ГК20	ГК40	ГК80
Показател					
Адхезии към съседни органи (Mean \pm SEM)	0.20 \pm 0.20	1.09 \pm 0.25	0.73 \pm 0.24	0.70 \pm 0.26	0.91 \pm 0.21



Фиг. 46. Макроскопска оценка на степента на изразеност на адхезии към съседни на дебелото черво органи след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; * $p < 0.05$ в сравнение с Контрола

3.3.6. Ефект от третиране с ГК върху удебеляване на стената на дебелото черво на плъхове в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Резултатите (в точкова скала) са представени в Таблица 39 и на Фиг. 51. ТНБС-индуцираното възпаление предизвиква удебеляване на стената на дебелото черво, което не е статистически значимо спрямо контрола. Третирането с ГК в дози 40 и 80 mg/kg води до подобрение по отношение на този показател. Не се наблюдава статистическа значимост спрямо Контрола и спрямо ТНБС.

Таблица 37. Удебеляване на стената на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	ГК20	ГК40	ГК80
Показател					
Удебеляване на стената на дебело черво (Mean ± SEM)	0.10±0.10	0.59±0.19	0.59±0.22	0.35±0.18	0.27±0.14

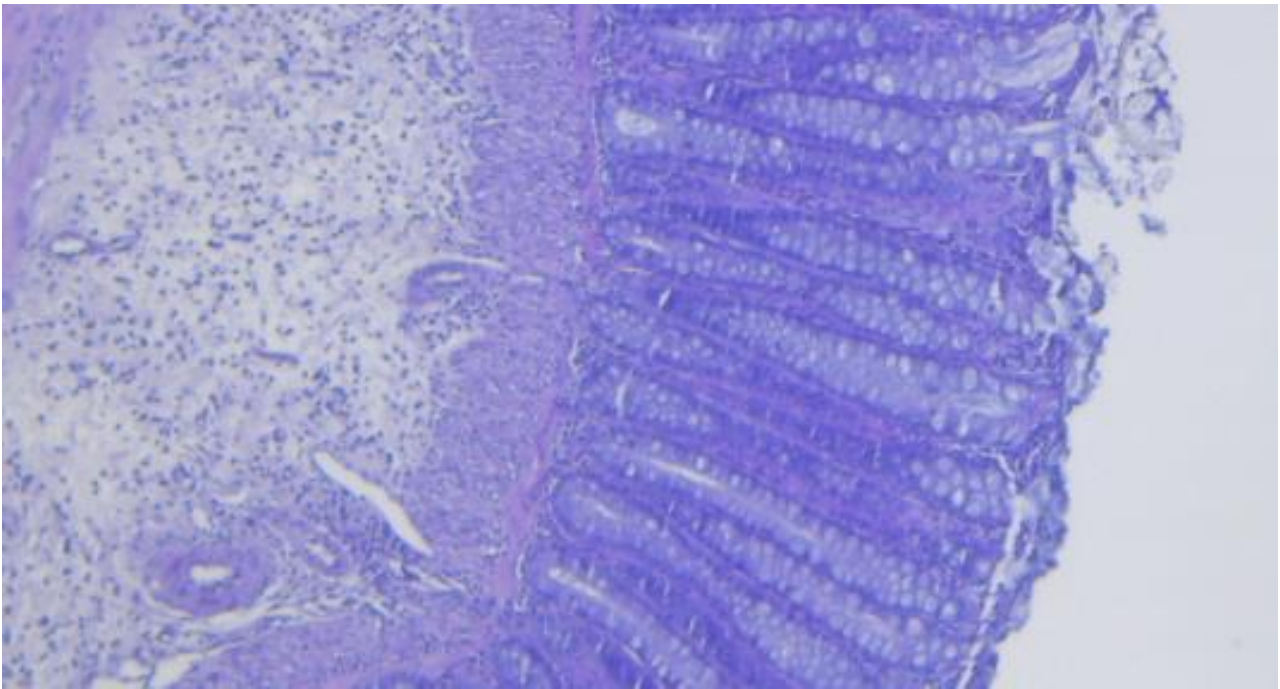


Фиг. 47. Удебеляване на стената на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

3.4. Хистопатологична оценка

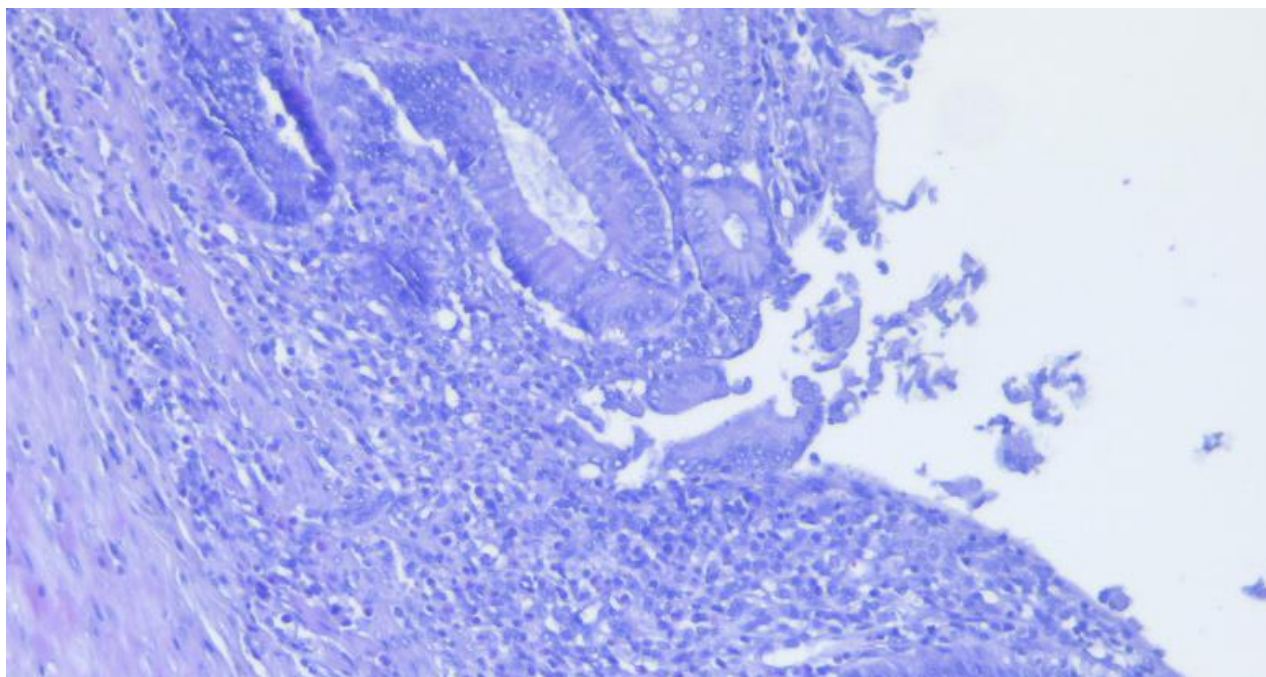
1.4.1. Микроскопски изглед

При хистологичното изследване при плъхове от група Контрола се наблюдава близка до нормалната морфология на епителния слой на лигавицата. Криптите са дълбоки и отворите им са тесни. Ламина проприя и субмукоза съдържат неголямо количество равномерно разпределени клетъчни елементи: фиброцити, фибробласти, лимфоцити и единични хистиоцити. Гоблетовите клетки са изобилни. При отделни животни се наблюдават малки промени, като нарушена архитектура, повърхностни улцерации и леко увеличение на клетъчната инфилтрация в ламина проприя и субмукоза. Типичният микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от група Контрола е представен на Фиг. 52.



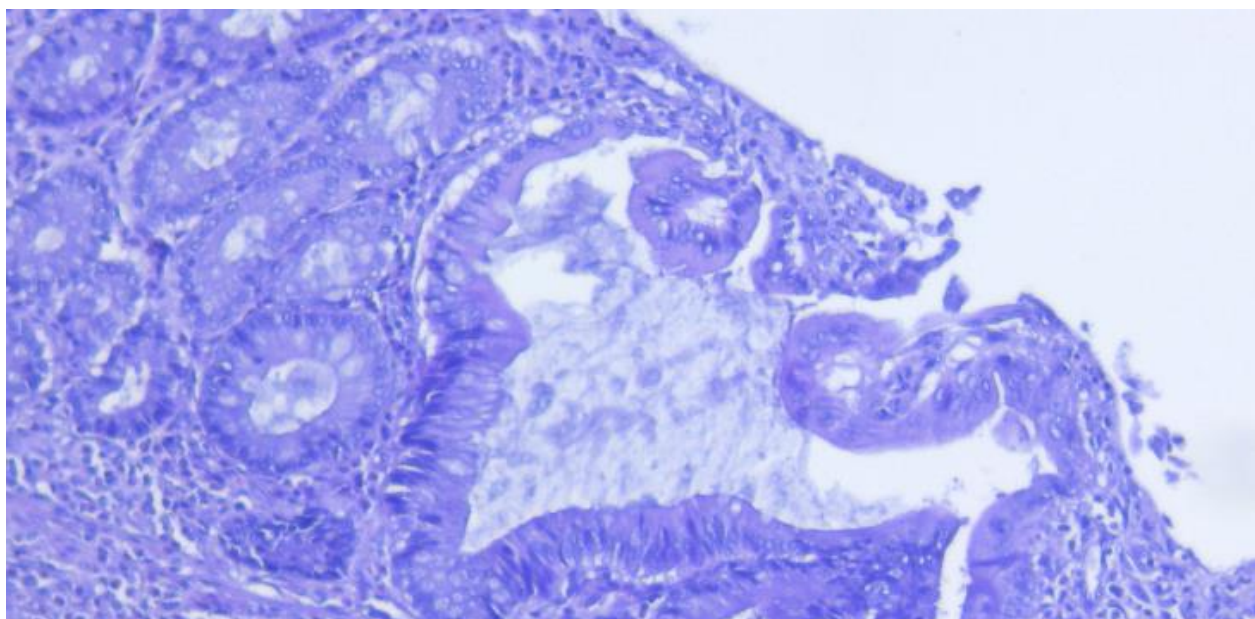
Фиг. 48. Типичен микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от група Контрола. Оцветяване с ХЕ, увеличение $\times 100$

Типичният микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от групи: ТНБС е представен на Фиг. 53. Увредата, причинена от ТНБС води до дифузна или зонална деструкция на чревната стена и възпалително-клетъчна инфилтрация, достигаща мускуларис мукозе, субмукоза или мускуларис проприя. Наблюдава се и нарушена архитектура на чревните крипти. Възпалителната инфилтрация е представена от лимфоцити, неутрофилни гранулоцити, единични макрофаги и плазмоцити.



Фиг. 49. Типичен микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от група ТНБС. Оцветяване с ХЕ, увеличение $\times 100$

При плъховете от групи: ГК20, ГК40 И ГК80, все още се наблюдават хистологични признаци на увреда като нарушена архитектоника, улцерации и язви, покрити с грануляционна тъкан. Забелязва се подобрене по отношение на деструкцията на чревната стена, както и в по-малка степен е изразена възпалително-клетъчната инфилтрация. Характерният микроскопски изглед на лигавицата на дебелото черво на плъхове от група ГК80 е представен на Фиг. 54.



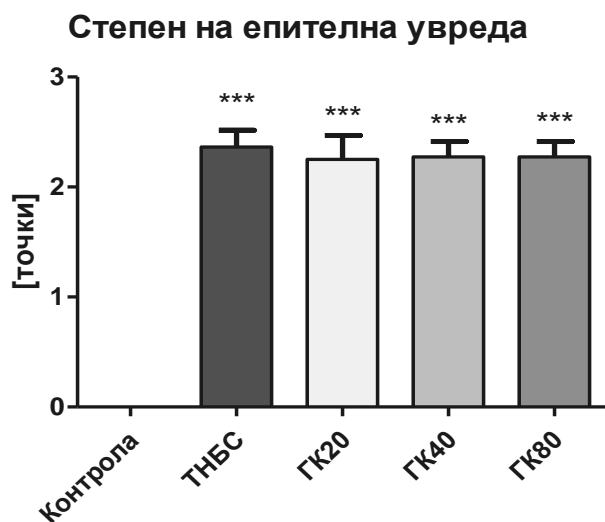
Фиг. 50. Типичен микроскопски изглед на лигавицата на дебело черво на животни от група ГК80. Оцветяване с ХЕ, увеличение $\times 100$

3.4.2. Ефект от третиране с ГК върху хистопатологичната оценка на степента на мукозна епителна увреда в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите (в точкова скала) са представени в Таблица 40 и на Фиг. 55. Предизвикването на колит чрез ректална апликация на ТНБС води до изразена епителна увреда на лигавицата и статистически значима разлика при всички увредени с ТНБС групи ($p < 0.001$) в сравнение с Контрола. Третирането с различни дози ГК води до известно подобрене по отношение на този показател, но без да се достига статистическа значимост в сравнение с група ТНБС.

Таблица 38. Хистопатологична оценка на степента на епителна увреда на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	ГК20	ГК40	ГК80
Показател					
Хистопатологична оценка (в точки) на степента на епителната увреда (Mean \pm SEM)	0.00 \pm 0.00	2.36 \pm 0.15	2.25 \pm 0.22	2.27 \pm 0.14	2.27 \pm 0.14



Фиг. 51. Хистопатологична оценка на степента на епителната увреда на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

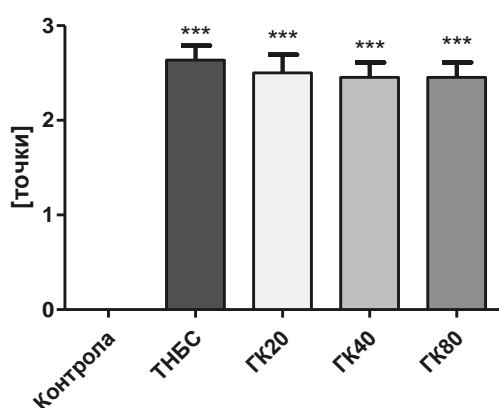
3.4.3. Ефект от третиране с ГК върху хистопатологичната оценка на възпалително-клетъчната инфилтрация в стена на дебелото черво в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите (в точкова скала) са представени в Таблица 41 и на Фиг. 56. Предизвикването на колит чрез ректална апликация на ТНБС води до изразена възпалително-клетъчната инфилтрация в стената на дебело черво. По този показател всички увредени с ТНБС групи показват статистически значима разлика ($p < 0.001$) в сравнение с Контрола. Третирането с различни дози ГК води до известно подобрение по отношение на този показател, но без да се наблюдава статистическа значимост в сравнение с група ТНБС.

Таблица 39. Хистопатологична оценка на възпалително-клетъчната инфилтрация в стената на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	ГК20	ГК40	ГК80
Показател					
Хистопатологична оценка (в точки) на степента на възпалително-клетъчна инфилтрация (Mean \pm SEM)	0.00 \pm 0.00	2.64 \pm 0.15	2.50 \pm 0.19	2.46 \pm 0.16	2.46 \pm 0.16

Възпалително-клетъчна инфилтрация



Фиг. 52. Хистопатологична оценка на възпалително-клетъчната инфилтрация в стената на дебелото черво след третиране на плъхове от групи: Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит; *** $p < 0.001$ в сравнение с Контрола

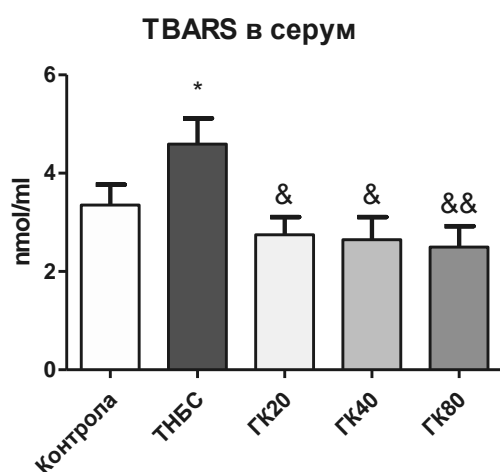
3.5. Биохимични резултати

3.5.1. Ефект от третиране с ГК върху нивата на оксидативен стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в кръвен серум в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите са представени в Таблица 42 и на Фиг. 57. Възпалителната реакция в модел на ТНБС-индуциран колит води до оксидативен стрес, изразяващ се чрез повишаване на нивата на TBARS в кръвен серум в статистически значима степен ($p < 0.05$) в сравнение с група Контрола. ГК във всички групи води до доза-зависимо понижение на този показател до сходни стойности в сравнение с Контрола. При сравнение с група ТНБС се отчита статистически значимо понижение най-вече при най-високата доза – ГК80 ($p < 0.01$), както и при ГК40 и ГК20 ($p < 0.05$).

Таблица 40. Ефект от третиране с ГК върху нивата на оксидативен стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в кръвен серум на плъхове от групи Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	ГК20	ГК40	ГК80
Показател					
Концентрация на TBARS в кръвен серум (Mean \pm SEM)	3.14 \pm 0.39	4.84 \pm 0.51	2.75 \pm 0.36	2.65 \pm 0.46	2.50 \pm 0.43



Фиг. 53. Ефект от третиране с ГК върху нивата на оксидативен стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в кръвен серум на плъхове от групи Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от

ТНБС колит; * $p < 0.05$ в сравнение с Контрола; $\xi p < 0.05$; $\xi\xi p < 0.01$ в сравнение с група ТНБС

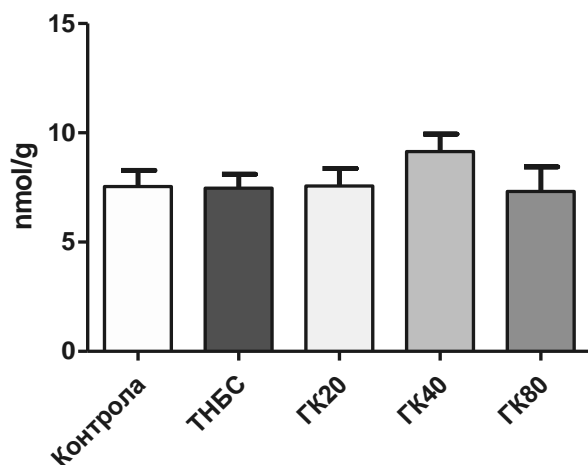
3.5.2. Ефект от третиране с ГК върху нивата на оксидативния стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в хомогенат от дебело черво в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит при плъхове

Резултатите са представени в Таблица 43 и на Фиг. 58. При група ТНБС не е установено статистически значимо повишаване на нивата на TBARS в хомогенат от стената на дебело черво в сравнение с група Контрола. При третираните с ГК групи не е отчетена сигнификантна степен на промяна в концентрациите на TBARS в сравнение с група ТНБС.

Таблица 41. Ефект от третиране с ГК върху нивата на оксидативен стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в хомогенат от дебело черво на плъхове от групи Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

Група	Контрола	ТНБС	ГК20	ГК40	ГК80
Показател					
Концентрация на TBARS в хомогенат от дебело черво (Mean \pm SEM)	7.55 \pm 0.74	7.47 \pm 0.64	7.58 \pm 0.79	9.14 \pm 0.80	7.31 \pm 1.13

TBARS в хомогенат от дебело черво



Фиг. 54. Ефект от третиране с ГК върху нивата на оксидативен стрес, определени чрез концентрацията на TBARS в хомогенат от дебело черво на

плъхове от групи Контрола, ТНБС, ГК20, ГК40 и ГК80, в експериментален модел на индуциран от ТНБС колит

3.6.Обсъждане

Редукция в теглото на животните е наблюдавана при всички увредени групи поради тежкото чревно възпаление и системното действие на проинфламаторните цитокини TNF α , IL-1 и IL-6. При третираниите с ГК животни се отчете подобрене по отношение на този показател в сравнение с група ТНБС. Това вероятно не се дължи на увеличен апетит при опитните животни, тъй като за ГК няма данни да увеличава апетита, а точно обратното – наблюдавана е редукция в консумацията на храна при зайци, както при перорално така и при парентерално приложение (Glick, 1981). Следователно ефектите върху теглото е по-вероятно да се дължат на противовъзпалителното действие на ГК по отношение на чревната инфламаторна увреда и съответно подобрене в общото състояние на животното.

Полифенолните съединения, хидролизуемите танини и изграждащите ги фенолни киселини имат множество биологични активности и са съставка на повечето от лечебните фитопрепарати, използвани от векове в народната медицина. Съществуват редица данни за полезни активности на полифенолните съединения при възпалителни състояния, включително и в животински модели на ВЧЗ (Salaritabar et al., 2017; Valcheva-Kuzmanova et al., 2018).

В настоящия експеримент се наблюдава изразен терапевтичен ефект на ГК по отношение редукцията на диаричната симптоматика в сравнение с група ТНБС, особено добре проявен на втори и трети ден след индукцията на колита. При това подобренето по отношение на този показател е по-изявено при приложението на по-високи дози ГК. Възможно обяснение на този ефект е, че фенолните киселини и в частност ГК са подобни на танините по функционални свойства и притежават адстрингентни (стипчиви) свойства (Piccolella et al., 2015; Robichaud et al., 1990).

Адстрингентните вещества коагулират протеини на повърхността на лигавиците на ГИТ. Това засилва мукозната бариерна функция, намалява секрецията и образува преграда срещу агресивни агенти, увреждащи подлежащия епителен слой. При наличието на лигавични язви протеините на повърхността им също се коагулират и се образува водонеразтворим слой, намаляващ кръвенето и секрецията и защитаващ подлежащите епителни клетки (Bonelli et al., 2018).

Ефикасността и безопасността на клиничното приложение на танини при лечението на диария е демонстрирана при множество клинични проучвания. Особено изразени са ефектите по отношение на честота на изхожданията и редукция на телесно тегло (Loeb et al., 1989; Asgari et al., 2012). Ефектът на танините е изследван и при пациенти с БК с диаричната симптоматика. При

приложението на съдържащи ги препарати е отчетена сигнификантна редуция в честотата на диаричните изхождания, наличието на кръв и слуз и консистенцията на изпражненията (Plein et al., 1993; Russo et al., 2018).

ГК притежава антимикробни, както и по-слаби противогъбичкови свойства. Действието на ГК е изследвано по отношение на различни патогени, като по-изразена активност проявява спрямо Грам-отрицателни бактерии като *P. aeruginosa* и *E. coli*, при които минималните инхибиращи концентрации са от порядъка на 500-1500 µg/mL (Borges et al., 2013). Антимикробната активност вероятно се дължи на свързване с бактериални мембранны протеини, чиято изменена функция води до необратими промени в пермеабилитета и заряда на клетъчните мембрани. Системните бактериостатични концентрации са трудно приложими, но ГК би могла да влияе на състава на бактериалната флора в ГИТ при перорално приложение (Borges et al., 2013). Известно е, че присъствието на агресивни спрямо чревната лигавица бактерии влошава протичането на чревното възпаление както в модели на колит, така и клинично (Burgmann et al., 2006). Поради това инхибиращата активност на ГК спрямо проинфламаторни Грам-отрицателни бактерии би могла да има роля за наблюдаваните противовъзпалителни ефекти в настоящия модел на експериментален колит.

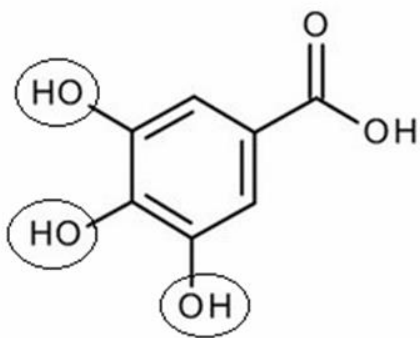
Приложението на ГК намалява тежестта и обширността на видимите макроскопски увреди върху чревната лигавица, намалява редуцията на телесно тегло и подобрява състоянието по другите изследвани показатели като тегло на увредения участък и наличието на интраабдоминални адхезии. Отбелязва се и тенденция за подобрене по отношение на микроскопските морфологични признаци на епителна структурна увреда, както и по отношение на степента на инфилтрация на възпалителни клетки в увредените тъкани. Обяснението на наблюдаваните ефекти вероятно е свързано с описаните в литературата антиинфламаторни и антиоксидантни активности на ГК. Така например ГК, изолирана от плод от нар, е демонстрирала способност да блокира LPS-индуцирания възпалителен отговор на макрофаги в *in vitro* концентрации от 50 до 200 µg/mL. По-специално отчетена е сигнификантна доза-зависима редуция в производството на IL-6, PGE1 и NO в сравнение с нетретираната група, до степен стойностите да се сходни с тези при групата без LPS стимулация. При това ефектът на ГК по отношение на тези проинфламаторни медиатори е посилен отколкото на други фенолни съединения като елагова киселина и пуникалагин (BenSaad et al., 2017).

Много е вероятно наблюдаваните благоприятни ефекти на ГК в настоящия експеримент да се дължат основно на инхибиция на NF-κB – протеинов комплекс, ключов за регулацията на генната транскрипция на проинфламаторни ензими и цитокини. За природните полифеноли се знае, че антиоксидантното им действие корелира с упражняваните антиинфламаторни ефекти, а конкретният механизъм включва инхибиция на активацията на NF-κB (Pandurangan et al., 2015; Ganapasam et al., 2014). Подобни данни има и за ГК, която също е мощен природен антиоксидант. Установено е, че в модел на LPS-активирани миши

макрофаги тя потиска експресията на p65-субединицата на NF-κB (Hsiang et al., 2013). От решаващо значение за активацията на NF-κB е освобождаването му от инхибиращата го субединица IκB-α, което изисква нейното фосфорилиране. Фосфорилираният IκB-α бързо претърпява убиквитирилиране и се подлага на деградация в протеазомите. Вследствие на това се получава свободен NF-κB, който впоследствие се транслоцира в ядрото и регулира транскрипцията на таргетни гени за производството на проинфламаторни цитокини като TNFα, IL-1β, IFN-γ, IL-6, and IL-17 (Pandurangan et al., 2015). Установено е, че ГК, приложена в перорални дози от 10 mg/kg, потиска фосфорилирането на IκB-α, което е възможен механизъм за възпрепятстване на NF-κB активацията в модел на чревно възпаление (Pandurangan et al., 2015).

Активацията на NF-κB води до увеличена експресия на индуцируемите при възпаление ензими COX-2 и iNOS (Gilmore, 2006). COX-2 присъства в организма и без наличието на патология, но тъканното му производство се увеличава силно при възпаление, което води до стимулация на простагландиновата продукция (Ghatule et al., 2014). iNOS също е индуцируем при възпаление ензим, произвеждащ реактивния азотен радикал азотен оксид (NO•). NO чрез нитриране на протеини допринася за тъканната увреда при възпаление. За експресията и активността на iNOS и COX-2 се знае, че са увеличени при ВЧЗ и корелират с активността на възпалението (Yang et al., 2012). Природните полифенолни антиоксиданти имат способността не само индиректно (чрез NF-κB), но и директно да инхибират активността на ензимите COX-2 и iNOS и по този начин да намалят продукцията на простагландини и NO (Yang et al., 2012).

Приложението на ГК в настоящия експеримент води до подобрене на биохимичните показатели за оксидативен стрес – серумни и тъканни нива на TBARS. ГК, подобно на други фенолни съединения, притежава способността да залавя свободни радикали. При това е установено, че ГК проявява най-висока антиоксидантна активност сред редица други фенолни киселини (хлорогенова, протокатехуична и ванилова), тествани чрез DPPH анализ. Активността на ГК е била с около 40% по-висока от следващото най-активно съединение – хлорогенова киселина. Трите хидроксилни групи в молекулата на ГК не само допринасят за голяма част от антиоксидантната активност, но и осигуряват по-голяма стабилност на молекулата поради водородните връзки между тези групи (Фиг. 59) (Hugo et al., 2012).



Фиг. 55. Химична структура на галова киселина

Способността за неутрализиране на свободни радикали е възможно да допринася за голяма част от наблюдаваните благоприятни ефекти на ГК в настоящия експеримент. В модел на медикаментозно-индуцирана чернодробна увреда антиоксидантната активност на ГК е посочена като вероятно обяснение на наблюдаваните полезни ефекти. Установено е, че ГК в перорални дози от над 100 мг/кг демонстрира по-силен ефект от *silymarin* по отношение на редуция на серумните нива и тъканната експресия на TNF α (Karimi-Khouzani et al., 2017).

Индуцирано от ГК намаление в производството на TNF α е демонстрирано и при *in vitro* експерименти с LPS-активирани миши макрофаги (Seo et al., 2016). Както е известно TNF α е основният медиатор и терапевтичен таргет в лечението на ВЧЗ, чиято експресия се увеличава след активация на NF- κ B. Поради това инхибиращото действие на ГК по отношение на производството на TNF α , опосредствано от NF- κ B, може да играе основна роля в настоящия модел на чревно възпаление.

За ГК е описана противовъзпалителна активност и при модел на индуциран от зимозан оток на лапичката при мишки. При това по-детайлни *in vitro* проучвания относно механизма на действие показват, че ГК нарушава функцията и прикрепването на полиморфонуклеарните левкоцити. Изследването на сходни химични съединения е довело до извода, че наличието в молекулата на две съседни хидроксилни групи е ключово за *in vitro* инхибиторната активност спрямо левкоцитната адхезия (Kroes et al., 1992). За ГК и нейните естери е установено, че инхибират експресията на адхезионни молекули за левкоцитно прикрепване, като ICAM-1 (Murase et al., 1999). Освен това в модели на колит ГК редуцира експресията на миелопероксидаза – ензим, чиято тъканна активност е увеличена в резултат на неутрофилна инфилтрация в условията на остро възпаление. Инхибицията на ICAM-1 очевидно е ефективен способ за потискане на чревното възпаление, тъй като по същия механизъм действа *alicafor*sen – наскоро одобрено за употреба лекарство, прилагано под формата на енема за лечение на локализиран колит (Liu et al., 2013). Инхибицията на ICAM-1 би могла да допринася за наблюдаваната в настоящия експеримент редуция в степента на възпалително-клетъчна инфилтрация, както и макроскопските изяви на остро чревно възпаление.

V. ИЗВОДИ

- I. Ректалното третиране на мъжки плъхове порода Wistar с 10 mg ТНБС, разтворен в 0.25 ml 50-процентен водно-етанолов разтвор, предизвиква химически-индуциран модел на хронично чревно възпаление.
 1. При опитните животни се наблюдават функционални промени, признаци на остро чревно увреждане – редукция на телесната маса и диарични изхождания с примеси на слуз и кръв.
 2. Настъпват макроскопски морфологични промени – скъсяване на дебелото черво, увеличаване на теглото на засегнатата част от органа, видима увреда на лигавицата, удебеляване на стената на червото и поява на интраабдоминални адхезии.
 3. Хистопатологично се наблюдават епителни дефекти, покрити с грануляционна тъкан, както и клетъчна инфилтрация, ангажираща ламина проприя и субмукоза, представена предимно от лимфоцити и неутрофилни гранулоцити.
 4. Настъпват биохимични промени, признаци на оксидативен стрес вследствие на остро чревно възпаление – повишени нива на TBARS в серум и стената на дебелото черво.
- II. Пероралното третиране с анетол (62.5, 125 и 250 mg/kg) на опитните животни с ТНБС-индуциран колит води до подобрене по отношение на болшинството от изследваните макроскопски, микроскопски и биохимични показатели.
 1. Анетолът:
 - в доза 62.5 mg/kg редуцира площта на чревното увреждане, като ефектът е съизмерим с този на sulphasalazine,
 - във всички използвани дози води намаление на интраабдоминалните адхезии, като ефектът е по-голям от този на sulphasalazine.
 2. Анетолът предизвиква слаба тенденция към намаляване на:
 - скъсяването на червото,
 - теглото на възпалително променения участък от дебелото черво, както и съотношението тегло/дължина на органа,
 - удебеляването на чревна стена,
 - хистопатологичните показатели за епително увреждане и възпалително-клетъчна инфилтрация.
 3. Анетолът във всички използвани дози намалява оксидативния стрес в хомогенат от дебело черво, като ефектът е сравним с този на sulphasalazine.

- III. Пероралното третиране с евгенол (в дози 1, 5, 25 и 125 mg/kg) на опитните животни с ТНБС-индуциран колит води до подобрене по отношение на някои от изследваните функционални, макроскопски, микроскопски и биохимични показатели.
1. Евгенолът:
 - във всички използвани дози подобрява диаричната симптоматика,
 - в дози 1 и 5 mg/kg намалява ТНБС-индуцираната редукция на телесната маса.
 2. Евгенолът в доза 5 mg/kg намалява теглото на възпалително променения участък от дебелото черво, както и съотношението тегло/дължина на органа.
 3. Евгенолът предизвиква слаба тенденция към намаляване на:
 - площта на чревното увреждане,
 - интраабдоминалните адхезии,
 - хистопатологично изследваната възпалително-клетъчната инфилтрация.
 4. Евгенолът в доза 25 mg/kg намалява оксидативния стрес в хомогенат от дебело черво.
- IV. Пероралното третиране с галова киселина (в дози 20, 40 и 80 mg/kg) на опитните животни с ТНБС-индуциран колит води до подобрене по отношение на болшинството от изследваните функционални, макроскопски, микроскопски и биохимични показатели.
1. Галовата киселина във всички използвани дози:
 - подобрява диаричната симптоматика,
 - намалява ТНБС-индуцираната редукция на телесната маса.
 2. Галовата киселина във всички използвани дози намалява:
 - теглото на възпалително променения участък от органа, както и съотношението тегло/дължина на дебелото черво,
 - площта на чревното увреждане,
 - интраабдоминалните адхезии.
 3. Галовата киселина предизвиква слаба тенденция за намаление на хистопатологичните показатели на епително увреждане и възпалително-клетъчна инфилтрация.
 4. Галовата киселина във всички използвани дози намалява оксидативния стрес в серума.

VI. ПРИНОСИ

1. За първи път са изследвани ефектите на анетол в експериментален модел на ТНБС-индуциран колит, като е установено, че анетолът понижава макроскопските белези на възпаление и деструкция, както и оксидативния стрес в чревната стена.
2. За първи път са изследвани ефектите на евгенол в експериментален модел на ТНБС-индуциран колит, като е установено, че евгенолът подобрява функционалното състояние на животните и намалява оксидативния стрес в чревната стена, както и предизвиква тенденция за понижение на чревното възпаление и деструкция.
3. За първи път са изследвани ефектите на галова киселина в експериментален модел на ТНБС-индуциран колит, като е установено, че галовата киселина подобрява функционалното състояние на животните, намалява макроскопските белези на възпаление и деструкция в чревната стена и понижава оксидативния стрес в серума.

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

I. Списък на публикациите

1. **Marinov V**, Valcheva-Kuzmanova S. Review on the pharmacological activities of anethole. *Scripta Scientifica Pharmaceutica*. 2015; 2(2): 14-19
2. **Marinov V**, Eftimov M, Tzaneva M, Zhelyazkova M, Valcheva-Kuzmanova S. Investigation of two models of trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. *Trakia Journal of Sciences*. 2015; 13 (2): 49-54
3. **Маринов В**, Желязкова-Савова М, Ганчева С, Вълчева-Кузманова С. Макроскопска и функционална оценка на ефектите на евгенол в ТНБС-индуциран модел на колит при плъхове. Сборник статии от Национална научна конференция „15 години фармация в МУ – Пловдив“. 1-3 юни 2018 г. Стр. 99-105
4. **V. P. Marinov**, M. A. Tzaneva, M. D. Zhelyazkova-Savova, S. Gancheva and S. V. Valcheva-Kuzmanova. Effects of gallic acid in a rat model of inflammatory bowel disease induced by trinitrobenzenesulfonic acid. *Bulgarian Chemical Communications*. 2019; 51, Special Issue A: 22-28). (**IF 2017 - 0.238**)

II. Списък на участията в научни форуми

1. **Marinov V**, Eftimov M, Tzaneva M, Zhelyazkova M, Valcheva-Kuzmanova S. Investigation of two models of trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. Anniversary Scientific Conference 20 Years Trakia University 19-20 May 2015, Stara Zagora, Bulgaria
2. Valcheva-Kuzmanova S, Zhelyazkova M., Eftimov M., **Marinov V.**, Tzaneva M. Investigation of biochemical markers in two models of trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. Eleventh Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products, 14-16 December 2016, Sofia, Bulgaria. Abstract: Proceedings of the Eleventh Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products, p. 33
3. Valcheva-Kuzmanova S, Zhelyazkova M, Eftimov M, **Marinov V**, Tzaneva M. Macroscopic evaluation of the effect of anethole in a model of trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. Eleventh Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products,

14-16 December 2016, Sofia, Bulgaria. Abstract: Proceedings of the Eleventh Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products, p. 32

4. **Marinov V**, Tzaneva M, Zhelyazkova M, Eftimov M, Valcheva-Kuzmanova S. Microscopic evaluation of the effect of anethole in a model of trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. Fourth Pharmaceutical Business Forum and Scientific and Practical Conference “Innovation and Prospects in Pharmaceutical Practice”, 27-29 October 2017, Varna, Bulgaria. Scripta Scientifica Pharmaceutica 2017; 4 (2): 73
5. **Маринов В**, Желязкова-Савова М, Ганчева С, Вълчева-Кузманова С. Макроскопска и функционална оценка на ефектите на евгенол в ТНБС-индуциран модел на колит при плъхове. Национална научна конференция „15 години фармация в Медицински университет – Пловдив“, 1-3 юни 2018, Девин, България. Сборник резюмета: 21-22
6. Valcheva-Kuzmanova S, **Marinov V**, Zhelyazkova-Savova M, Gancheva S, Tzaneva M. Histopathological evaluation of the effect of eugenol in a model of trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. Тринадесета работна среща с международно електронно участие “Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти”. София, 19-21 ноември 2018 г., Abstract: Proceedings of the Thirteenth Workshop with international participation on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products, November 19-21, 2018, Sofia, Bulgaria, p. 14-15
7. **Marinov V**, Zhelyazkova-Savova M, Gancheva S, Valcheva-Kuzmanova S. Macroscopic and functional evaluation of the effects of gallic acid in TNBS-induced IBD model in rats. 2nd International Conference on Bio-antioxidants, Varna, Bulgaria, 07-10 September 2018. Abstract: Book of Abstracts: p. 86
8. **Marinov V**, Tzaneva M, Zhelyazkova-Savova M, Gancheva S, Valcheva-Kuzmanova S. Microscopic evaluation of the effect of gallic acid in a model of trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. Fifth Pharmaceutical Business Forum and Scientific and Practical Conference “The future of pharmacy: traditions, researches and discoveries”, 26-28 October 2018, Varna, Bulgaria. Scripta Scientifica Pharmaceutica 2018; 5 (1): 36
9. Valcheva-Kuzmanova S, **Marinov V**, Zhelyazkova-Savova M, Gancheva S, Tzaneva M. Histopathological evaluation of the effect of eugenol in a model of trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis in rats. Тринадесета работна среща с международно електронно участие “Биологична активност на метали, синтетични съединения и природни продукти”, София, 19-21 ноември 2018 г. Abstract: Proceedings of the Thirteenth Workshop on Biological Activity of Metals, Synthetic Compounds and Natural Products