

2024



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

ФАКУЛТЕТ „МЕДИЦИНА“

КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И КЛИНИЧНА ФАРМАКОЛОГИЯ И ТЕРАПИЯ

ЕЛИС РАФАИЛОВА ГАСАНЗАДЕЕВА

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

ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

За присъждане на образователна и научна степен

**“ДОКТОР”**

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

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

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

COX-2 – циклооксигеназа-2

MAO-A – моноаминооксидаза-A

HbA1c- гликиран хемоглобин

hASC – human adipose-derived stem cells

NO - азотен оксид

PGE2- простагландин E2

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

ИТМ- индекс на телесна маса

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

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

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

СК-МВ – МВ фракция на ензима креатинкиназа

РС1 – прохормон конвертаза 1

РОМС – проопиомеланокортин

AST – аспартат аминотрансфераза

ALT – аланин аминотрансфераза

AP – алкална фосфатаза

HbA1c – гликиран хемоглобин

SOD – супероксид дисмутаза

MDA-

TBARS – вещества, реагиращи с тиобарбитурова киселина

ГТТ - глюкозо-толерансен тест

СЗО – Световна здравна организация

VSG – вертикална ръкавна гастректомия

RYGB – стомашен байпас Roux-en-Y

## СЪДЪРЖАНИЕ

<b>I. ВЪВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>8</b>
<b>II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР.....</b>	<b>10</b>
1. Затлъстяване.....	10
1.1. Дефиниция на затлъстяването.....	10
1.2. Епидемиология на затлъстяването.....	10
1.3. Рискови фактори за развитие на затлъстяване .....	12
1.3.1. Влияние на околната среда.....	12
1.3.2. Заседнал начин на живот (COVID-19 пандемията).....	12
1.3.3. Генетични фактори.....	13
1.3.5. Нарушения в енергийната хомеостаза.....	14
1.3.6. Затлъстяване и хипоталамус.....	14
1.4. Затлъстяване и свързани заболявания.....	15
1.4.1. Затлъстяване и сърдечно-съдова система.....	15
1.4.2. Затлъстяване и храносмилателна система.....	16
1.4.3. Затлъстяване и отделителна система.....	18
1.4.4. Затлъстяване и централна нервна система.....	18
1.4.5. Затлъстяване и ендокринни нарушения.....	19
1.4.6. Затлъстяване и карцином.....	20
1.4.7. Затлъстяване и инфекциозни заболявания, включително COVID-19.....	21
1.5. Методи на лечение на затлъстяването.....	21
1.5.1. Фармакологично/медикаментозно лечение на затлъстяването.....	21
1.5.1.1. Phentermine.....	22
1.5.1.2. Phentermine/Topiramate.....	22
1.5.1.3. Orlistat.....	23
1.5.1.4. Lorcaserin.....	23
1.5.1.5. GLP-1 агонисти .....	23
1.5.1.6. Naltrexone/bupropion.....	24
1.5.2. Нефармакологично лечение на затлъстяването.....	25

1.5.2.1. Диети.....	25
1.5.2.2. Когнитивно-поведенчески интервенции.....	25
1.5.2.3. Транскраниална стимулация с постоянен ток.....	25
1.5.2.4. Повишена физическа активност.....	26
1.5.2.5. Трансплантация на фекална микробиота.....	26
1.5.2.6. Хирургическо лечение на затлъстяването.....	26
1.6. Затлъстяване и натурални продукти (монотерпени и етерични масла).....	28
1.6.1. Лимонен.....	28
1.6.2. Тимол.....	29
1.6.3. Цитрал.....	29
1.6.4. Евкалиптол.....	29
1.6.5. Анетол.....	30
1.6.6. Аураптен.....	30
1.6.7. Карвакрол.....	30
1.6.8. Паенифлорин.....	30
1.6.9. Иридоиди.....	31
1.6.10. Масло от черен пипер.....	31
1.6.11. Масло от индийско орехче.....	31
1.6.12. Етерично масло от <i>Menta spicata</i> .....	31
2. Анетол.....	31
2.1. Физико-химични характеристики.....	32
2.2. Фармакокинетика на анетол.....	32
2.3. Фармакологични ефекти на анетол.....	33
2.3.1. Ефекти на анетол върху ЦНС.....	33
2.3.2. Ефекти на анетол върху гастро-интестиналния тракт.....	35
2.3.3. Противовъзпалителна и аналгетична активност на анетол.....	35
2.3.4. Антиоксидантна активност на анетол.....	36
2.3.5. Ефект на анетол върху бъбречната функция.....	36
2.3.6. Противогъбичкова активност на анетол.....	36
2.3.7. Антиагрегантен ефект на анетол.....	37
2.3.8. Противотуморен ефект на анетол.....	37
2.3.9. Други ефекти на анетол.....	37

3. Експериментални методи и модели за индукция на затлъстяване.....	39
3.1. Диетични модели.....	39
3.2. Генетични модели.....	40
3.2.1. Моногенетичен модел.....	40
3.2.2. Полигенни модели.....	41
3.3. Хирургически методи за индукция на затлъстяване.....	41
3.4. Нови методи.....	42
<b>III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....</b>	<b>43</b>
<b>IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....</b>	<b>45</b>
1. Материали.....	45
1.1. Опитни животни.....	45
1.2. Анетол.....	45
2. Методи.....	45
2.1. Индуциране на затлъстяване и третиране.....	45
2.2. Изчисляване на калориен и флуиден прием и наддаване на телесно тегло....	46
2.3. Поведенчески методи.....	47
2.3.1. Тест открито поле (ТОП) .....	47
2.3.2. Тест за социално взаимодействие (ТСВ) .....	47
2.3.3. Тест за принудително плуване (ТПП) .....	48
2.3.4. Тест за разпознаване мястото на предмети (ТРМП).....	48
2.4. Фракциониране на тъкани и органи, и приготвяне на органни хомогенати...49	
2.4.1. Получаване на кръвен серум.....	49
2.4.2. Изолиране на органи.....	49
2.4.2. Приготвяне на тъканни хомогенати.....	49
2.5. Биохимични и клинично-лабораторни тестове.....	49
2.5.1. Глюкозо-толерантен тест (ГТТ) и определяне на нивата на глюкозата в кръвен серум.....	49
2.5.2. Изследване нивата на триглицериди .....	50
2.5.3. Изследване нивата на холестерол .....	50
2.5.4. Определяне на чернодробни ензими в серум.....	50

2.5.5. Определяне на вещества, реагиращи с тиобарбитуровата киселина в серум и тъканни хомогенати.....	51
2.5.6. Определяне на нивата на супероксид дисмутаза (СОД) в серум .....	52
2.5.7. Определяне на времето на кръвосъсирване.....	52
2.6. Определяне на тъканни индекси.....	52
2.6.1. Определяне на индекси на мезентериална, паранефрална, перигонадна, ретроперитонеална и обща мастна тъкан.....	52
2.6.2. Определяне на чернодробен индекс.....	52
2.7. Хистологични методи.....	52
2.8. Имунохистохимични методи.....	52
2.9. Индуциране на остро възпаление на задна лапа.....	53
2.10. Статистически методи.....	53
<b>V. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ .....</b>	<b>54</b>
1. Ефекти на анетол върху телесното тегло, приема на калории и течности.....	54
1.1. Резултати.....	54
1.2. Обсъждане.....	57
2. Ефекти на анетол върху поведението в модел на затлъстяване.....	59
2.1. Ефекти на анетол в тест открито поле.....	59
2.2. Ефекти на анетол в тест за социално взаимодействие.....	61
2.3. Ефекти на анетол в тест за принудително плуване.....	63
2.4. Ефекти на анетол в тест за разпознаване на мястото на предмети.....	64
2.5. Обсъждане.....	65
3. Ефект на анетол върху биохимични и клиничко-лабораторни показатели.....	68
3.1. Ефект на анетол върху показатели на метаболизма.....	68
3.1.1. Кръвна глюкоза в хода на глюкозо-толерантен тест.....	68
3.1.2. Липиден профил.....	72
3.1.3. Време на кръвосъсирване.....	73
3.1.4. Обсъждане.....	74
3.2. Ефекти на анетол върху показатели на антиоксидантната защита и оксидативния стрес.....	79

3.2.1. Серумни нива на супероксид дисмутаза (СОД) .....	79
3.2.2. Нива на вещества, реагиращи с тиобарбитурова киселина (TBARS) в серум и хомогенат от мозък.....	80
3.2.3. Обсъждане.....	82
4. Ефекти на анетол върху мастната тъкан.....	84
4.1. Мастнотъканни индекси.....	84
4.2. Хистология на ретроперитонеална мастна тъкан.....	84
4.3. Имунохистохимия на ретроперитонеална мастната тъкан.....	88
4.3.1. Експресия на VAX.....	89
4.3.2. Експресия на BCL-2.....	91
4.3.3. Съотношение VAX/BCL-2.....	93
4.3.4. Експресия на MAC387.....	94
4.4. Обсъждане.....	96
5. Ефекти на анетол върху миокард и коронарни съдове.....	101
5.1. Хистология на миокард.....	102
5.2. Хистология на коронарен съд.....	103
5.3. Ефекти на анетол върху нивата на вещества, реагиращи с тиобарбитурова киселина (TBARS) в тъканен хомогенат от сърце .....	103
5.4. Обсъждане.....	105
6. Ефекти на анетол върху черен дроб .....	105
6.1. Телго на черен дроб и чернодробен индекс.....	106
6.2. Ефекти на анетол върху нивата на вещества, реагиращи с тиобарбитурова киселина (TBARS) в тъканен хомогенат от черен дроб .....	107
6.3. Чернодробни ензими (AST, ALT, AP) .....	107
6.4. Хистология на черен дроб.....	109
6.5. Имунохистохимия на черен дроб.....	111
6.5.1. Експресия на VAX.....	111
6.5.2. Експресия на BCL-2.....	112
6.5.3. Съотношение VAX/BCL-2.....	115
6.5.4. Експресия на MAC387.....	116

6.6. Обсъждане.....	117
7. Ефекти на анетол върху карагенан-индуциран оток на задна лапа.....	121
7.1. Резултати.....	122
7.2. Обсъждане.....	122
<b>VI. ИЗВОДИ.....</b>	<b>126</b>
<b>VII. ПРИНОСИ.....</b>	<b>130</b>
<b>VIII. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ И УЧАСТИЯТА, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....</b>	<b>131</b>
<b>IX. БИБЛИОГРАФИЯ.....</b>	<b>135</b>



# 1. ВЪВЕДЕНИЕ

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

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

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

## II. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

### 1. Затлъстяване

#### 1.1. Дефиниция на затлъстяване

Затлъстяването се описва като състояние на излишък от мастна тъкан, което има отрицателно въздействие върху здравето. Тъй като директното измерване на мастната маса обикновено не се извършва в обикновената клинична практика, се използва индексът на телесна маса (ИТМ). Това се определя като тегло/височина<sup>2</sup> (в kg/m<sup>2</sup>). Затлъстяването и наднорменото тегло са дефинирани с помощта на ИТМ въз основа на връзки с различни заболявания и свързаната с тях смъртност (O’Rahilly et Farooqi. 2022). Световната здравна организация (СЗО) определя затлъстяването като ИТМ над 30 kg/m<sup>2</sup>, а стойности между 25 и 30 kg/m<sup>2</sup> се определят като наднормено тегло. Индексът на телесната маса може образно да надценява количеството на телесните мазнини при лица с изключително мускулест хабитус. При жените процентът на телесните мазнини е по-голям от този на мъжете при даден ИТМ (Heianza et Qi. 2019). Оценката на обиколката на талията е полезен метод за идентифициране на потенциалните опасности за здравето, свързани с наднорменото тегло или затлъстяването. По оценки на Световната здравна организация (СЗО) наднорменото тегло и затлъстяването са петата водеща причина за смъртност в световен мащаб, като водят до близо 2,8 милиона смъртни случая годишно (World Health Organization. Obesity and overweight, 2014).

#### 1.2. Епидемиология на затлъстяване

Затлъстяването е световно явление, което присъства във всички региони, с изключение на някои части в Субсахарска Азия и Африка, както и страни с ниски нива на затлъстяване като Шри Ланка, Индонезия, Судан, Сингапур, Джибути и други. Справянето с тези нарушения може да наложи допълнителна тежест върху системите на здравеопазване. Например, смята се, че тези, които са с наднормено тегло, понасят 30% по-големи медицински разходи в сравнение с тези с нормален индекс на телесна маса (ИТМ). Неотдавнашно проучване показва, че качеството и количеството на хранителните вещества в диетата имат по-голямо въздействие върху контрола на теглото и превенцията на заболяванията, отколкото специфичните хранителни източници. Разпространението на

наднорменото тегло и затлъстяването се увеличава, особено в метрополните региони, в страните с ниски и средни доходи (Lin et Li. 2021).

По данни на Световната здравна организация (СЗО) затлъстяването убива четири милиона души всяка година (World Health Organization. Obesity.). В световен мащаб от 1980 г. насам процентът на затлъстяване е увеличил почти двойно (Hassapidou et al., 2023). В света има над 1 милиард души със затлъстяване, от които 650 милиона възрастни, 340 милиона юноши и 39 милиона деца (World Obesity Day, World Health Organization. 2022). Според прогнозите до 2025 г. ще има 2,7 милиарда възрастни с наднормено тегло, над 1 милиард възрастни със затлъстяване и 177 милиона души, класифицирани като изключително затлъстели. Освен това се смята, че до 2030 г. близо 38% от възрастното население в света ще бъде с наднормено тегло, а още 20% ще бъдат със затлъстяване (Pati et al., 2023). Съществуват институции, които осигуряват непрекъснат отчет за разпространението на затлъстяването в САЩ. Данните за 2017-2018 г. сочат, че 42,4% от възрастните в САЩ на възраст 20 или повече години са били със затлъстяване, като забележими разлики в честотата по възрастови групи не се наблюдават (Hales et al., 2020). По време на пандемията COVID-19 процентът на затлъстяване в САЩ непрекъснато нараства, като между март 2020 г. и март 2021 г. се наблюдава увеличение с 3% (Adult Obesity Prevalence Increased During the First Year of the COVID-19 Pandemic. 2022). Рисковете от затлъстяване и проблемите, свързани с него, могат да се различават значимо сред хората, като цяло разпространението на затлъстяването е малко по-високо при жените, отколкото при мъжете, като при чернокожите жени то е най-високо (Ramachandram et al., 2020). Според СЗО до 2030 г. всяка пета жена и всеки седми мъж ще бъдат със затлъстяване (World Obesity. 2022). Затлъстяването е широко разпространен здравен проблем, тъй като вече превишава поднорменото тегло във всички региони на света, с изключение на Африка на юг от Сахара и Азия (World Health Organization. Obesity. 2022). Прогнозите са, че процентът на затлъстяване сред децата и юношите в Европейския регион ще се увеличи от 2020 до 2035 г. Смята се, че до 2035 г. 14% от момичетата и 21% от момчетата ще бъдат засегнати от затлъстяване. Прогнозите са, че до 2035 г. 35% от жените и 39% от мъжете ще бъдат засегнати от затлъстяване сред възрастното население. Очаква се до 2035 г.

прогнозираното годишно увеличение да надхвърли 800 милиарда щатски долара икономически последици от затлъстяването (World Obesity Atlas. 2023).



Фигура 1. Дефиниция на затлъстяване според ИТМ (модифициран от O’Rahilly S, Farooqi I. Pathobiology of Obesity. In: Loscalzo J, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J. eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 21e. McGraw Hill; 2022.)

### ***1.3. Рискови фактори за развитие на затлъстяване***

#### **1.3.1. Влияние на околната среда**

Установено е, че химическите замърсители притежават характеристики на ендокринни разрушители, които допринасят за развитието на наднормено тегло и затлъстяване. Тези химически замърсители, известни като “ендокринни разрушители”, са открити в опаковките на храните, козметиката, прахта от магистралите и домашните мебели. Те произхождат от агрохимикали, пластификатори, спрейове против горене и морски бои (Endocrine Society. 2020).

#### **1.3.2. Заседнал начин на живот**

Gortmaker et al. откриват връзка между времето, прекарано в гледане на телевизия всеки ден и степента на затлъстяване. Установено е, че при децата, които гледат телевизия повече от пет часа на ден, процентът на затлъстяване е пет пъти по-висок в сравнение с децата, които гледат телевизия по-малко от 2 часа. Тази зависимост предполага, че

прекомерното гледане на телевизия е значителен фактор за увеличаване на затлъстяването сред децата (Gortmaker et al., 1996). Наблюдава се съществена връзка между ниската физическа активност и затлъстяването, както и свързаните с него заболявания като хипертония и диабет сред хората, живеещи в бедните райони на Лахор (Kazmi et al. 2022).

### **1.3.3. Затлъстяване и заседнал начин на живот (COVID-19 пандемия)**

Мета-анализ на 38 изследвания, проведени в 17 държави по света, показва, че при възрастните и юношите (на възраст  $\geq 16$  години) се наблюдава средно увеличение на телесното тегло с около 1,5 kg по време на периодите на пълно карантиниране (Bakaloudi et al., 2022). Изследване на повече от 10 000 тийнейджъри и млади хора в Китай разкрива, че времето на самоизолиране по домовете в началото на 2020 г. е довело до увеличаване на процента на затлъстяване от 10 % на 12,5 % и на наднорменото тегло от 21 % на 25 % (Yang et al, 2020). В мета-анализ от 2021 г. на 12 проучвания, проведени в 8 държави, изследователите специално проучват въздействието на мерките за затваряне на заведенията върху нивата на затлъстяване сред по-малките деца. Анализът показва, че по време на периода на блокиране на достъпа до училището разпространението на затлъстяването се е увеличило от 22% на 25%, а разпространението на наднорменото тегло - от 25% на 28% (Chang et al., 2021).

### **1.3.4. Генетични фактори**

Многобройни проучвания показват, че съществува относително по-силна връзка между индекса на телесна маса (ИТМ) на потомството и ИТМ на родителите, като по-голямо значение има ИТМ на майката, отколкото на бащата. Това предполага наличието на вътреутробно влияние, импринтинг ефект, влияние на митохондриалните гени или ефект от възпитанието. Официалните генетични изследвания са установили, че високата степен на предсказуемост на родителския ИТМ се дължи предимно на генетични фактори, а не на фактори на околната среда (Hebebrand and Hinney. 2009). Предходни проучвания, които не са взели предвид теглото на родителите като фактор, са значимо погрешни. Например широко признатото откритие, че родителското negliжиране по отношение на хранителния режим в детството е предиктор за затлъстяване в млада възраст, не отчита влиянието на родителското затлъстяване (Lissau et al., 1994). Въздействието на

вътрематочната среда върху теглото при раждане е значимо. Широко признато е, че при монозиготните близнаци други антропометрични параметри като височината на тялото, проявяват по-слаба корелация по време на ранна детска възраст. След това генетичните променливи могат да окажат своето влияние, а при децата в училищна възраст вече има силна наследственост на ИТМ. Наследствеността на ИТМ е най-висока между късното детство и юношеството (Hebebrand and Hinney. 2009). Мутации в гените на лептина, лептиновия рецептор, прохормон конвертаза 1 (PC1) и проопиомеланокортин (POMC) могат да причинят автозомно-рецесивно затлъстяване при хората, като всички тези необичайни мутации водят до ранно затлъстяване, дължащо се на повишена консумация на енергия (Hebebrand and Hinney. 2009).

### **1.3.5. Нарушения в енергийна хомеостаза**

Лептинът, хормон, произвеждан от мастните клетки, е пряко свързан с нивата на телесните мазнини и има голямо влияние върху баланса на енергията в организма. Както хората, така и животните изпитват екстремна хиперфагия и затлъстяване, когато им липсват достатъчни нива на лептин (Schwartz et al., 2017).

### **1.3.6. Затлъстяване и хипоталамус**

Доказано е, че генетични дефекти на лептина или на неговия хипоталамичен рецептор (Clement et al., 1998) или на хипоталамичния меланокортин-4 рецептор (Vaisse et al., 2000) причиняват тежко затлъстяване. Това предполага, че хипоталамичната дисрегулация влияе на предаването на сигнали, свързани с енергийния баланс. При хората увреждането на хипоталамуса, причинено от тумор, операция или облъчване, често води до трайно увеличаване на теглото, което не може да се контролира чрез ограничаване на калориите или физическа активност (Bragy et al., 1975). След лечение на краниофарингиом се наблюдава доста висока честота на хипоталамичното затлъстяване, вариращо от 30 до 77% (Bakaloud et al., 2022). Въпреки това тези изследвания не дават окончателно обяснение дали увреждането на хипоталамуса е резултат от самия тумор, от хирургичната процедура или от неизбежното облъчване на хипоталамуса, на което са подложени тези пациенти.

#### **1.4. Затлъстяване и здравни последици**

Затлъстяването по настоящем е световен проблем, като не е само въпрос на външен вид. То е медицинско състояние, което увеличава податливостта към различни други заболявания и усложнения на здравето, засяга дори децата. Участието на този фактор в метаболитния синдром и свързаните с него здравословни проблеми е от съществено значение. Повишеният ИТМ колерира с намаляване продължителността на живот (Peeters et al., 2003), особено след 50-годишна възраст (Adams et al., 2006). Нискостепенното възпаление представлява ясна връзка между хроничните заболявания и затлъстяването (Khanna et al., 2022). Всъщност, заслужава да се отбележи, че около една трета от хората, които са с наднормено тегло, са метаболитно здрави (Primeau et al., 2011). Въпреки това е важно да се признае, че тези лица все още са изправени пред значителен риск от придобиване на незаразни болести (Livingston et al., 2020). Метаболитните нарушения са свързани с централното затлъстяване, което се определя от повишените нива на интраабдоминалната мастна тъкан. От друга страна, периферното затлъстяване или повишените нива на подкожна мастна тъкан, предимно в глутеофеморалните региони, е свързано с подобрена инсулинова чувствителност и намален риск от диабет тип 2, дислипидемия и атеросклероза. Оментектомията, или отстраняването на висцералната мазнина, понижава нивата на инсулин и глюкоза при хората, което подкрепя концепцията, че висцералната мастна тъкан притежава вредни метаболитни ефекти (Thörne et al., 2002). Въпреки това, липосукцията или отстраняването на подкожната мастна тъкан не подобрява нито един аспект на метаболитния синдром (Klein et al., 2004).

##### **1.4.1. Затлъстяване и сърдечно-съдова система**

Намалената физическа активност и прекомерното отлагане на мазнини с повишаване на теглото са силни предиктори за смъртност от карiovasкуларни заболявания (Hu et al., 2004). Съществува ясна връзка между повишените стойности на артериалното налягане (АН) и повишения ИТМ (Aneja et al., 2004). Мастната тъкан експресира различни компоненти на системата ренин-ангиотензин-алдостерон (Karlsson et al., 1998). В допълнение, системата ренин-ангиотензин-алдостерон може да бъде активирана от консумирането на висококалорична диета, което води до увеличаване на сърдечния дебит



(Zhang et al., 2000). Установено е, че намаляването на теглото увеличава екскрецията на натрий (Tuck et al., 1981). Хипертонията е по-разпространена сред хората със затлъстяване в сравнение с тези нормално телесно тегло (American Heart Association. 2009), като хората с наднормено тегло са 3,5 пъти по-склонни да имат хипертония и 60% от случаите на хипертония могат да бъдат приписани на увеличаване на мастната тъкан (Lambert et al., 2019). Освен това съществува пряка връзка между нивото на кръвното налягане и степента на затлъстяване. Съществува положителна корелация между повишения ИТМ и повишената сърдечна честота, обема на кръвта, както и повишеното систолично и диастолично кръвно налягане (Schunkert et al., 2013). Тези промени оказват влияние както върху морфологията и масата на сърцето, така и върху модификациите в коронарната васкулатура (Tuck et al., 1992). По отношение на риска от сърдечна недостатъчност, той се удвоява при хора с увеличен ИТМ (Kenchaiiah et al., 2002).

Мастната тъкан отделя значимо количество биоактивни медиатори, които могат да допринесат за метаболитните, хемодинамичните и хемостатичните аномалии. TNF- $\alpha$  има известни метаболитни ефекти като инхибиране на действието на липопротеин липаза и насърчаване на липолизата (Tangvarasittichai et al., 2016). В допълнение, TNF- $\alpha$  влияе отрицателно върху инсулиновия сигнален път (Yudkin et al., 1999). Наблюдават се промени в нивата на липидите, кръвното налягане, коагулацията, фибринолизата и възпалението. Тези промени в крайна сметка допринасят за ендотелната дисфункция и развитието на атеросклероза (Van Gaal et al., 2006). Последните проучвания показват, че метаболитно здравите затлъстели хора проявяват ендотелна дисфункция, макар и в по-малка степен в сравнение с индивидите с метаболитен синдром. Резултатите от това проучване показват, че има връзка между затлъстяването и съдовите увреждания, независимо от метаболитните аномалии, които са в основата на метаболитния синдром (Schinzari et al., 2015). Атеросклерозата, като важен сърдечносъдов рисков фактор, ускорява прогресията си при наличие на затлъстяване (Lakka et al., 2001).

#### **1.4.2. Затлъстяване и храносмилателна система**

Висцералното затлъстяване често е съпътствано с по-голямото натрупване на мазнини в черния дроб, което клинично се проявява като неалкохолната мастна чернодробна

болест (НАМЧБ) (Bertola et al., 2010). Епидемиологично НАМЧБ е най-разпространената сред хората със затлъстяване, следвайки тези с диабет и хиперлипидемия (Powell-Wiley et al., 2021). Инсулиновата резистентност като първичен метаболитен дефект е връзката между затлъстяване и НАМЧБ, причинявайки повишаване на свободните мастни киселини в черния дроб, които се освобождават от мастната тъкан. Това се случва поради факта, че инсулинът не може да изпълни функцията си да подтисне активността на хормон-чувствителната липаза (Атанасова, 2019). Синхронно с това, повишените, в следствие на инсулиновата резистентност, инсулинови нива способстват за непрекъснат синтез на триглицериди в черния дроб. В резултат натоварването на хепатоцитите с триглицериди се развива макровезикуларна чернодробна стеатоза. При НАМЧБ мастната тъкан допринася значимо за системните TNF- $\alpha$ , MCP1, IL6 и адипонектин, които променят чернодробната възпалителна/имунна система (Bertola et al., 2010).

Важен факт е, че проучвания, които изследват генетични варианти, предразполагащи към по-високо съдържание на мазнини в черния дроб, не са показали връзки със сърдечно-съдовата заболяемост, което води до заключението, че висцералното затлъстяване само по себе си е сърдечно-съдов фактор (Lauridsen et al., 2018).

Повишаването на интра- и перипанкреатичните мазнини, водещи до повишено възпаление и некроза, дава ясна връзка между затлъстяването и честотата на заболяванията на панкреаса. Съществена роля има инсулиновата резистентност, както и хиперинулинемията, повишените нива на инсулиноподобния растежен фактор-1, които водят до повишена клетъчна пролиферация и висок риск от карцином на панкреаса (Kim et al., 2012).

Пациентите с наднормено тегло са по-склонни да развият жлъчни заболявания и панкреатит, най-често, поради наличието на камъни в жлъчно-панкреатичните пътища. В резултат на това може да се развие рефлукс на жлъчката или повишаване на налягането в панкреатичния канал. Диета с високо съдържание на мазнини може да повиши вероятността от образуване на богати на холестерол кристали или камъни в жлъчката. Причината е увеличаване на броя или размера на кристалите на холестерола (Khatua et al., 2017).

### **1.4.3. Затлъстяване и отделителна система**

Повишеният бъбречен поток, гломерулното капилярно налягане и скоростта на гломерулна филтрация са сред хемодинамичните промени в бъбреците вследствие повишения ИТМ, които са свързани с развитието на микроалбинурия и бъбречно увреждане чрез неясен механизъм (De Jong et al., 2002; Zhang et al., 2000). Първоначалната причина за бъбречно увреждане при затлъстяване е гломерулната хиперфилтрация (Lambert et al., 2019). Други потенциални механизми за индуцирано от затлъстяването бъбречно заболяване са повишената тубулна реабсорбция на натрий, медирана от невронални мрежи или тубулна компресия от мастна инфилтрация (Hall, 2003). Диабетът и хипертонията, свързани със затлъстяването, са най-честите причини за бъбречна недостатъчност в краен стадий.

Затлъстяването често се съпровожда от симптоми на долните пикочни пътища като повишена честота на уриниране, непълно изпразване на пикочния мехур, прекъснат поток на урината, трудности при започване на уриниране, усилия за уриниране, слаба струя урина, събуждане през нощта за уриниране и силно желание за уриниране (Kim et al., 2021). Повишеният ИТМ също така засяга пикочния мехур, простатата и уретрата, което води до дисфункция на пикочния мехур и инконтиненция, като се наблюдава и по-голяма по размер простата при мъжете (Daneshgari et al., 2017). Опити със затлъстели мишки показват наличието на признаци на свръхактивен пикочен мехур, включително повишена честота на уриниране и контракции без вакуум. Наблюдаваните функционални промени може да се дължат на свръхекспресията на протеин киназа С, която води до повишен контрактилен отговор (Leiria et al., 2012).

### **1.4.4. Затлъстяване и централна нервна система**

Ранното възпаление на хипоталамуса осигурява ясна връзка между затлъстяването и мозъчните заболявания (Shefer et al., 2013). Адипокините, като интерлевкин (IL-6), тумор-некротизиращ фактор алфа (TNF- $\alpha$ ) и лептин, могат да преминат през кръвно-мозъчната бариера и да повлияят на мозъка (Sui et al., 2000). Наднорменото тегло допринася за повишен риск от невродегенерация и когнитивни увреждания в по-късен етап от живота (Ronan et al., 2016), като също така повлиява обема на мозъка и мозъчната функция (Al-Dalaeen et al., 2022). Освен това, затлъстяването е свързано с повишен риск за

болестта на Алцхаймер (Livingston et al., 2020). Редица изследвания ясно показват, че се намалява или уврежда менталното и / или интелектуалното функциониране. Невроизображения са установили връзка между затлъстяването и промените в структурата и функцията на мозъка. Най-надеждните и значими структурни находки при затлъстяване при възрастни са открили намаляване на дебелината на кората в темпоралния и фронталния мозък (Opel et al., 2021).

Възпалението, причинено от затлъстяването, е свързано и с промени в пропускливостта на кръвно-мозъчната бариера (Van Dyken et al., 2018). Провъзпалителните фактори могат да навлязат в мозъчния паренхим и да взаимодействат с микроглията (Salas-Venegas et al., 2018). Наблюдава се намаляване на експресията на 47 протеина в мозъчните микросъдове (Ouyang et al., 2014).

Индивиди с наднормено тегло показват повишено активиране и пролиферация на микроглия и астроцити (Salas-Venegas et al., 2018). Промените в обема на сивото вещество при хора със централен тип затлъстяване са забелязани (Pflanz et al., 2022).

#### **1.4.5. Затлъстяване и ендокринни нарушения**

Инсулиновата резистентност е важен фактор за развитието на много ендокринни нарушения, свързани със затлъстяването, и е тясно свързана с мастната тъкан. Състоянието на инсулинова резистентност води до повишени нива на липидите, кръвното налягане и серумната глюкоза. Повишава се вероятността от развитие на диабет тип 2 и сърдечносъдови заболявания (Fraun et al., 2021). Инсулиновата резистентност е резултат от прекомерното количество свободни мастни киселини, които се наблюдават при затлъстяване. Инсулинът се отделя в отговор на свободните мастни киселини, намиращи се в кръвта. Той улеснява усвояването на глюкозата от мускулите и черния дроб чрез действието на липопротеин липазата (Fraun et al., 2021).

Затлъстяването е значителен рисков фактор за хипогонадизъм, който може да повлияе на секрецията на гонадотропин релизинг хормон (GnRH) и да предизвика овулаторни проблеми при жени. Съществува връзка между затлъстяването и поликистозен синдром на яйчниците (ПКЯ), като 38%-88% от жените с ПКЯ са с наднормено тегло или затлъстяване, а по-голямата част от тях 50%-90% са с инсулинова резистентност.

Затлъстяването временно потиска отделянето на растежен хормон, поради повишените нива на свободни мастни киселини , но нивата на IGF-I в кръвта остават нормални или дори могат да се повишат, поради повишените нива на инсулин в порталната циркулация (Chen et al., 2022). Wagner et al. разкриват, че затлъстяването намалява количеството на Лайдинговите клетки и ускорява разрушаването на съществуващите Лайдинговите клетки чрез повишаване на нивата на провъзпалителни цитокини (Wagner et al., 2016).

Увеличаването на теглото и затлъстяването често водят до клинична и биохимична изява на ПКЯ при жени, които имат генетично предразположение към това състояние. Важни механизми, свързващи ПКЯ и затлъстяването са инсулиновата резистентност и производство на адипокини (Barber et al., 2019).

Растежният хормон, който зависи от инсулиноподобния растежен фактор-I (GF-I), притежава анаболен ефект върху протеините и също така директен ефект върху липолизата. Затлъстяването временно потиска отделянето на растежен хормон, поради повишените нива на свободни мастни киселини , но нивата на IGF-I в кръвта остават нормални (Hjelholt et al., 2020).

#### **1.4.7. Затлъстяване и карцином**

Връзката между затлъстяването и карцинома се счита за сложна, въпреки че точният механизъм остава непълно разбран (Pati et al., 2023). Изследванията показват, че затлъстяването води до увеличаване на размера на множество органи, което от своя страна повишава вероятността от развитие на тумори (Grant et al., 2020). Друг познат механизъм е нарушаването на регулацията и правилното функциониране на мастната тъкан, което води до повишени нива на кръвната захар, абнормни нива на липидите и възпаление. От особена важност са геномната нестабилност, постоянното увреждане на ДНК и ускореното стареене на генома при индивиди със затлъстяване (Usman et al., 2018). Мастната тъкан може да доведат до по-бързо стареене на генома и да допринесе за развитието на неоплазма. Наличието на оксидативен стрес при затлъстяване представлява значителен риск за стабилността и целостта на ДНК, открита е пряка връзка между маркерите за оксидативно увреждане на ДНК и по-високите нива на телесните мазнини. Тези връзки

пораждат притеснения, че мастната тъкан може да доведат до по-бързо стареене на генома и да допринесе за развитието на неоплазма (Pati et al., 2023).

#### **1.4.8. Затлъстяване и инфекциозни заболявания, включително COVID-19**

Затлъстяването обикновено е свързано с по-висока уязвимост и сериозност на инфекциозните заболявания на дихателните пътища, свързано с по-тежко протичане и незадоволителни терапевтични резултати. Повишеният ИТМ е идентифициран като значителен рисков фактор за тежко заболяване и по-висока смъртност, както по време на пандемията H1N1 през 2009 г., така и по време на скорошната пандемия от SARS-CoV-2 (COVID-19) (Aziz et al., 2023). Затлъстяването е идентифицирано като отделен рисков фактор за тежка инфекция, по-голяма вероятност да бъде приет в интензивното отделение и по-висока смъртност при пациенти с COVID-19 (Sawadogo et al., 2022).

Конкретните механизми, които правят пациентите със затлъстяване по-податливи на инфекциозни заболявания в сравнение с лицата с ИТМ под 25, не са напълно изяснени (Mancuso et al., 2019). Най-общо промени в имунната система на гостоприемника оказват съществено влияние (Aziz et al., 2023). Други проучвания смятат, че повишената уязвимост към вирусни заболявания при хората със затлъстяване се дължи и на дефицита на витамин D (Pugliese et al., 2022).

#### **1.5. Методи на лечение на затлъстяването**

Използването на фармакотерапия заедно с корекциите в начина на живот води до допълнително, макар и ограничено, намаляване на телесното тегло. Ползите срещу затлъстяването от одобрените от FDA (агенция за контрол на храните и лекарствата) лекарства и иновативните терапии, които сега се проучват в предклинични и клинични изпитвания, се постигат чрез един или повече от следните механизми и стратегии: 1) Намаляване на апетита и консумацията на калории, 2) Повишаване на разхода на енергия и 3) Намаляване на абсорбцията на мазнини (Derosa et al., 2012; Li et al., 2009).

##### **1.5.1. Фармакологично лечение на затлъстяването**

Понастоящем има ограничен брой лекарства, които са разрешени за намаляване на телесното тегло. Динитрофенолът е първото лекарство за отслабване. Когато през 30-те

години на миналия век е въведен за лечение на затлъстяване, амфетамините, които водят до потискане на глада, бързо го заместват. Скоро амфетамините го изместват, но поради тежките им странични ефекти, FDA ги забранява. Подобно на своите предшественици, римонабант, който блокира канабиноидните рецептори тип 1 (CB1) в нервната система и води до намален прием на храна, е одобрен за употреба през 2006 в Европа, но скоро е спрял, поради психични проблеми (Bray et al., 2022).

#### *1.5.1.1. Phentermine*

Phentermine е най-често изписваният орален норадренергичен агонист, известен със способността си да потиска апетита селективно. Употребата му е ограничена до 12 седмици. Медикаментът увеличава освобождаването на норепинефрин, както и серотонин и допамин в централната нервна система. Централната нервна система (ЦНС) както при плъхове, така и при хора съдържа разпределение на адренергични, серотонинергични и допаминергични неврони. Въз основа на изследванията на гризачите се предполага, че Phentermine действа върху хипоталамуса и свързания с възнаграждението nucleus accumbens (Hong et al., 2016; James et al., 2018).

#### *1.5.1.2. Phentermine/Topiramate*

Phentermine/Topiramate е предназначен като допълнително лечение на нискокалорична диета, във връзка с повишена физическа активност, за лица ИТМ над 30 kg/m<sup>2</sup> или ИТМ над 27 kg/m<sup>2</sup> със свързана със затлъстяването коморбидност като хипертония, дислипидемия, диабет или преддиабет, или абдоминално затлъстяване (Jordan et al., 2014). Химическото наименование на Phentermine, централно действащо апетитопотискащо лекарство, е  $\alpha$ - $\alpha$ -диметилфенетиламин HCl (Garvey. 2013). Topiramate е антиепилептичният агент (Jordan et al., 2014). Точният механизъм, по който Phentermine предизвиква загуба на тегло, не е ясно обяснен в брифинга на Агенцията за контрол на храни и лекарства (FDA). Въпреки това, въз основа на информацията, предоставена в листовката, може да се заключи, че Phentermine функционира като симпатикомиметично лекарство, потенциално потискащо апетита и подобряващо метаболизма (Garvey. 2013). Точният механизъм, който стои в основата на ефектите на Topiramate за отслабване, остава неизвестен. Предложените механизми за отслабване, свързани с Topiramate, включват

потискане на глада чрез невротрансмитерна активност и повишаване на ситостта (Jordan et al., 2014).

#### *1.5.1.3. Orlistat*

Orlistat 120 mg навлиза на пазара в САЩ от 2007 г. и в Европа от 2010 г. насам. Чрез инхибиране на стомашно-чревната и панкреатичната липаза, това лекарство предотвратява разграждането на триглицериди и намалява абсорбцията на мастни киселини. Доказано, че около 33% от мастните киселини, погълнати по време на хранене, не се абсорбират (Pilitsi et al., 2019).

#### *1.5.1.4. Lorcaserin*

През 2012 г. FDA издаде одобрение за употребата на Lorcaserin, селективен 5-HT<sub>2C</sub> рецепторен агонист. Проведени са няколко експериментални процедури за изследване на въздействието на Lorcaserin върху консумацията на храна. Lorcaserin намалява консумацията на храна при плъхове по време на тестове за хранене по график, базирано на фактори като общ достъп, лишения или вкус. Изследванията показват, че 5-HT<sub>2C</sub> рецепторните антагонисти ефективно инхибират активността на Lorcaserin, което потвърждава, че Lorcaserin ефективно намалява поведението на хранене чрез ефекти върху 5-HT<sub>2C</sub> рецептори. В модел на затлъстяване при плъхове, се наблюдава приблизително 12% редукция в наддаването на телесното тегло при приложение на Lorcaserin в дози 9-18 mg/kg в продължение на 28 дни. Няколко изследвания показват, че Lorcaserin променя поведението, свързано с лекарствена зависимост при плъхове и примати. Това включва спиране на тютюнопушене, алкохол, опиати, психостимуланти. Установено е, че Lorcaserin има потенциални клинично значими ефекти при модели на болка и гърчове, както и въздействие върху различни други поведения и физиологични системи (Higgins et al., 2020).

#### *1.4.1.5. GLP-1 агонисти*

Понастоящем човешките GLP-1(глюкагон-подобен пептид) рецепторни агонисти се очертават като най-обещаващият метод за лечение на затлъстяването (Anam et al., 2022). Blundell et al. провеждат проучване, за да изследват ефектите от 12-седмично лечение с подкожен Semaglutide веднъж седмично при 30 участници със затлъстяване. Дизайнът на



проучването включва рандомизирани, двойно слепи, плацебо-контролирани, кръстосани проучвания (Blundell et al., 2017). Участниците са разпределени на случаен принцип в групата със Semaglutide и плацебо или в групата с плацебо и Semaglutide. Намалването на теглото, предизвикано от Semaglutide, се дължи предимно на по-голямото намаляване на телесните мазнини в сравнение с чистата телесна маса. Това се постига чрез намаляване на енергийния прием, чрез намаляване на апетита, подобряване на контрола върху храненето, намаляване на желанието за храна и намаляване на предпочитанията към мазни и високоенергийни храни. Важно е да се отбележи, че загубата на тегло не е в резултат на увеличен разход на енергия (Blundell et al., 2017).

Liraglutide е друг аналог на GLP-1 и функционира като агонист на GLP-1 рецепторите, със сходство от 97% (Vode B. 2011). Наред с подходяща диета и упражнения, редовната употреба на Liraglutide води до загуба на тегло от 4 до 6 кг. По-висок процент от пациентите са успели да постигнат загуба на тегло от поне 5% и 10% в сравнение с тези, които са приемали плацебо. Повечето странични ефекти са стомашно-чревни по характер и се проявяват предимно в началото на терапевтичния режим. Сравнителните изследвания показват, че количеството намаляване на теглото, постигнато с Liraglutide, е по-високо от това, наблюдавано при Orlistat или Lorcaserin, но малко по-ниско от това, наблюдавано при Phentermine/Topiramate (Mehta et al., 2017). Лечението с Liraglutide 3,0 mg също води до намаляване на обиколката на талията, серумните триглицериди, инсулиновата резистентност и кръвното налягане, както и повишаване на холестерола с висока плътност HDL.

#### *1.5.1.6. Naltrexone/bupropion*

Naltrexone/bupropion е лекарство, което комбинира две лекарства във фиксирана доза. Използва се за лечение на възрастни, които са със затлъстяване или наднормено тегло и имат поне едно здравословно състояние, вследствие повишеното телесно тегло. Използва се в допълнение към диетичен режим и начин на живот. Точният неврохимичен механизъм, който е в основата на ефекта на комбинацията от Naltrexone/bupropion за намаляване на теглото, все още не е напълно изяснен. Въз основа на резултатите от предклинични проучвания се предполага, че комбинацията от тези вещества има

синергичен ефект в хипоталамуса и мезолимбичната допаминова система. Смята се, че този ефект предизвиква усещане за ситост, намалява приема на храна и увеличава разхода на енергия (Sherman et al., 2016).

## **1.5.2. Нефармакологично лечение на затлъстяването**

### *1.5.2.1. Диети*

Стратегиите за лечение на затлъстяването са фокусирани върху значителни промени в начина на живот, включително диети. В това отношение диетите, обогатени с консумация на зеленчуци и плодове за дълъг период от време, са положителен резултат по отношение на ползите за здравето. Въпреки това няколко диети за регулиране на теглото имат ограничени положителни резултати (Pem et al., 2015)

### *1.5.2.2. Когнитивно-поведенчески интервенции срещу затлъстяването*

Въпреки че широко се приема, че затлъстяването може да бъде преодоляно чрез основи на здравословно поведение, насоките за здравословно хранене в повечето случаи са непознати за населението. Както може да се предположи, стремежът към разбиране на основите на развитието на нездравословно поведение ще осигури безценна подкрепа за поведенческите интервенции. Чрез насърчаване на здравословното поведение, като например избора на плодове и зеленчуци пред преработените храни, може да се постигне значителен напредък в промените в поведението. Няколко поведенчески подхода са ефективни за лечение на здравни проблеми, например Теорията за планираното поведение (Castelnuovo et al., 2017).

### *1.5.2.3. Транскраниална стимулация с постоянен ток*

Смята се, че потенциалните терапевтични ефекти на интервенцията транскраниална стимулация с постоянен ток при затлъстяване се дължат на способността ѝ да регулира нарушения контрол, упражняван от префронталната кора (PFC), и обработката на възнагражденията в подкоровите лимбични структури, по-специално във вентралния стриатум. Скорешни изследвания, използвайки невроизображения и когнитивните тестове, доказаха наличието на връзка между нарушените процеси в префронталните области, а именно дорсолатералната префронтална кора (DLPFC) и глада, предизвикан от хранителни

сигнали, особено при хора със затлъстяване. Транскраниална стимулация с постоянен ток може да се прилага чрез стимулатор, захранван с батерия (Ghobadi-Azbari et al., 2021).

#### *1.5.2.4. Повишена физическа активност*

Последните открития сочат, че физическите упражнения имат значителен ефект както върху физическото, така и върху психологическото здраве. В тази връзка физическите упражнения, които се правят доброволно или по лекарско предписание, могат да се използват като средство за лечение на затлъстяването (Pojednic et al., 2022). Общата цел на физическите упражнения при лечението или профилактиката на затлъстяването е намаляване на теглото.

#### *1.5.2.5. Трансплантация на фекална микробиота*

Тази интервенция наскоро привлече значителен изследователски интерес към лечението на затлъстяването. Има обещаващи индикации, че трансплантацията на микроби от здрави индивиди в пациенти със затлъстяване може да доведе на загуба на телесно тегло. В новаторско ключово проучване, трансплантират фекални суспензии от хора със и без затлъстяване, в мишки без микроби. Мишките с микробиота на затлъстели индивиди успешно развиват затлъстяване, докато тези с микробиота на здрави индивиди остават слаби. Резултатите от секвенирането на проби от изпражнения след процедурата при мишки показват, че човешките микробиоми могат да бъдат успешно трансплантирани (Zhang et al., 2019).

#### *1.5.2.6. Хирургическо лечение на затлъстяването*

Бариатричните операции са медицински процедури, извършвани за постигане на загуба на тегло. Хирургията е единствената ефективна терапевтична възможност за постигане и поддържане на дългосрочна загуба на тегло при хора с тежко затлъстяване. Не съществува универсална процедура, която да е ефикасна за всеки пациент (Fobi. 2004). Три хирургични процедури преобладават в по-голямата част от бариатричните операции. Процедурите, които се предлагат за операция за отслабване, са вертикална ръкавна гастректомия (VSG), стомашен байпас Roux-en-Y (RYGB) и регулируем стомашен бандинг (AGB). Вертикалната ръкавна гастректомия (VSG) е преобладаващата бариатрична

процедура в световен мащаб и се смята, че включва около 50 % от всички операции. При тази хирургична процедура с помощта на тъканен телбод се създава дълъг стомашен ръкав с форма на тръба. Тази процедура премахва трайно голямата кривина на стомаха. Голямата кривина на стомаха е място за секреция на грелин и други стомашно-чревни хормони (Albaugh and Abumrad. 2018).

Процедурата RYGB е втората по честота бариатрична операция, представлява около 40% от всички бариатрични операции. От хирургична гледна точка RYGB е по-сложна операция, тъй като изисква създаването на малка стомашна “торбичка”, обикновено с обем около 30 ml, която след това се прикрепя към края на тънките черва, а именно към йеюнума. Тази връзка образува крайник “Roux” с дължина около 100-150 см. Крайникът “Roux” е известен още като алиментарен крайник, тъй като това е пътят, по който храната се придвижва, след като премине през стомашната торбичка. За да се възстанови нормалният поток на храносмилателни секрети от черния дроб и панкреаса, заобиколеният преди това участък от червата се свързва по-надолу, за да се срещне с крайника “Roux”. През жлъчно-панкреасния крайник с дължина около 50-75 см се транспортира жлъчката и панкреатичните ензими. Сближаването на крайниците на Roux и на жлъчно-панкреасния става в областта на йеюностомията и създава Y-образна форма. Двата крайника се събират на това място, като останалото дистално тънко черво се нарича общ канал. Общият канал е изключителното място, където храносмилателните ензими/секрети от жлъчно-панкреасния крайник взаимодействат с храната от крайника на “Roux”. Процедурата VSG включва създаването на една дълга линия със скоби, за да се изгради стомах, подобен на ръкав, докато процедурата RYGB включва създаването на две анастомози по време на операцията, както остатъка от стомаха се позиционира на място, подходящо за отвеждане на стомашните секрети в жлъчно-панкреатичния крайник (Albaugh and Abumrad. 2018).

Процедура, която е станала по-малко популярна за справяне със затлъстяването, е регулируемият стомашен бандинг (AGB), около 7% от бариатричните операции. Процедурата по поставяне на бандинг включва поставяне на външно компресиращо устройство в горната част на стомаха. Това устройство може да се надува или изпуска с помощта на подкожен порт, което позволява да се регулира нивото на стомашна

компресия. Тази компресия служи за ограничаване на раздуването на стомаха и за контрол на приема на храна (Albaugh and Abumrad. 2018).

Критерии за оценка на ефекта от приложението на бариатрични процедури: редукция на телесното тегло с >15%; ниво на HbA1c < 6% без хипогликемии; общ холестерол <4 mmol/l, LDL-холестерол <2 mmol/l; триглицериди <2,2 mmol/l; артериално налягане <135/85 mmHg (Българско дружество по ендокринология. 2019).

### ***1.6. Затлъстяване и натурални продукти (монотерпени и етерични масла)***

Световната здравна организация твърди, че лечебните растения са незаменими в развиващите се страни. Насърчава се използването на природни продукти, тъй като синтетичните лекарства за борба със затлъстяването имат сериозни странични ефекти. Интегрирането на различни фармацевтични подходи дава възможност за идентифициране на нови природни съединения и пътища (Marrelli et al., 2016).

Монотерпените се синтезират по мевалоноватния път. В природата се намират основно под формата на етерични масла (Habtariam, 2017). Използват в хранителната промишленост за консервиране на храни, но също така намират и терапевтично приложение поради антимикробното, аналгетичното и противовъзпалителното им действие (de Alvarenga et al, 2021; Habtariam, 2017). Експерименталното вещество в текущото проучване също е монотерпен. Някои монотерпени имат изразен антиобезен ефект.

#### **1.6.1. Лимонен**

Ниски дози лимонен влияят върху сигналния път на 5'-аденозин монофосфат-активирана протеин киназа (AMPK) в 3T3-L1 адипоцитна клетъчна култура, докато по-големи дози инхибират натрупването на липиди в 3T3-L1 адипоцити. Приложен в дози 154 mg/kg и 1000 mg/kg при плъхове на висококалорична диета в продължение на 16 седмици също има благоприятни ефекти. Тези ефекти се постигат най-вероятно чрез активиране на AMPK сигналния път (Modak et al., 2011). Сигналният път на AMPK е важна цел за лечение на затлъстяването (Fryer et al., 2005). Инхалации на етерично масло от грейпфрут (*Citrus paradisi*) и основното му съединение лимонен значимо намалява консумацията на храна и телесното тегло при плъхове (Shen et al., 2005). Използването на микрочастици,

съдържащи есенцилни масла от сладък портокал (97% лимонен) при мъжки плъхове, подложени на диета с високо съдържание на мазнини, намалява наддаването на телесно тегло със 70%, също така и процента на мазнините с 33.8% (Li et al., 2018). Добавянето на лимонен към диетата води до по-ниско наддаване на тегло и по-малко натрупване на мазнини (Rinaldi de Alvarenga et al., 2022).

### **1.6.2. Тимол**

Този монотерпен предотвратява индуцираното от висококалорична диета затлъстяване при мишки като: потиска на натрупването на висцерални мазнини, понижава на липидите, подобрява на чувствителността към инсулин и лептин, като също така проявява и антиоксидантен потенциал. Тимолът спомага за намаляване наддаването на телесно тегло, теглото на висцералните мазнини и липидите. Чернодробните ензими ALT (аланин трансфераза) и AST (аспартат аминитрансфераза) също са намалени, докато нивата на антиоксиданти са повишени (Haque et al., 2014). Пероралното приложение на хранителна добавка *Arq Zeera*, чието основно съединение е тимол, значимо намалява приема на храна и наддаването на телесно тегло при плъхове на висококалорична диета. Тези ефекти се дължат на хиполипидемично, хипогликемично, хиполептинемично и инхибиращо панкреатичната липаза действие (Haque et al., 2018).

### **1.6.3. Цитрал**

Цитрал значимо намалява нивата на триглицериди по доза-зависим начин. Механизъм, отговорен за следния ефект, е потискането експресията на PI3K/АКТ, PPAR $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6. Цитрал инхибира адипогенезата в 3T3-L1 адипоцити като модулира адипогенните транскрипционни фактори и възпалителните маркери (Sri Devi et al., 2018). Активирането на сигналният път на фосфатидилинозитол 3 киназата (PI3K/АКТ) е ключов за диференциацията, възпалението, пролиферацията и регулирането на глюкозните транспортери (Jing et al., 2013).

### **1.6.4. Евкалиптол**

Евкалиптолът показва инхибиторна активност спрямо  $\alpha$ -амилазата и панкреатичната липаза, като този ефект е по-силно изразен в сравнение с акарбоза и Орлистат. Като възможен таргет на евкалиптола се смята ензимът цитохром p450 19A1

ароматаза, като повлияването му би намерило приложение като потенциална терапия при лечението на затлъстяването (Hegazi et al., 2022). Значително намалена е консумацията на храна при западните сиви кенгурута при третиране с евкалиптол и етерично масло от бор (съдържащо редица терпени) (Rafferty et al., 2021). Също така има данни евкалиптолът да инхибира храносмилателните ензими при проучване с птици (Kohl et al., 2015).

#### **1.6.5. Анетол**

Етаноловият екстракт от семена на копър (съдържащ предимно анетол) намалява телесното тегло на плъхове с 12%, докато третирането с Орлистат - с 6.4%. Нивото на триглицеридите не е повлияно от Орлистата и растителния екстракт. Екстрактът от семената на копър не само поддържа липидния профил, но и намалява телесното тегло (Ghinny et al., 2019). Консумацията на храна е намалена при орално третиране с етерично масло от *Croton zehntneri* (250 mg/kg) или на неговия компонент транс-анетол в продължение на 10 седмици, без това да води до промени в телесното тегло при плъхове (Coelho-de-Souza et al., 2019).

#### **1.6.6. Аураптен**

Аураптен засилва липолизата в черния дроб на затлъстели плъхове, като по този начин предотвратява натрупването на триглицериди и затлъстяването (Nagaо et al., 2010).

#### **1.6.7. Карвакрол**

При затлъстели мишки, хранени с карвакрол, се наблюдава значимо намаляване на наддаването на телесно тегло, теглото на висцералните мазнини и нивата на плазмените липиди, вероятно чрез потискане на костния морфогенен протеин и фибробластния растежен фактор (Cho et al., 2018).

#### **1.6.8. Паеонифлорин**

Паеонифлорин показва благоприятен ефект върху адипоцитите, предотвратявайки TNF $\alpha$ -индуцираната инсулинова резистентност и възпалителното освобождаване на адипокини, които имат важна роля при затлъстяването. Паеонифлорин предотвратява TNF $\alpha$ -индуцираната дисфункция на адипоцитите, което би било полезно за изясняване на потенциалната му роля при лечението на затлъстяването (Kong et al., 2013).

### **1.6.9. Иридоиди**

Guan et al. показват, че генипинът предизвиква цялостно намаляване на телесното тегло и общото количество мазнини, като намалява и хипертрофията на адипоцитите (Guan et al., 2018). Подобни резултати са докладвани от Zhong et al., където генипинът намалява хиперлипидемията и чернодробната стеатоза при мишки (Zhong et al., 2018). Проучванията показват, че генипозид намалява количеството на висцералната мастна тъкан и телесното тегло, и подобрява липидния метаболизъм при мишки (Kojima et al., 2011).

### **1.6.10. Масло от черен пипер**

Основните компоненти, които често се споменават в маслата от черен пипер, са  $\beta$ -кариофилен, лимонен,  $\beta$ -пинен,  $\alpha$ -пинен,  $\delta$ -3-карен, сабинен и мирцен с големи вариации в техните проценти. Наблюдава се значимо намаляване на приема на храна, телесното тегло, теглото на органите, триглицеридите и LDL-холестерола при плъхове, хранени с висококалорична диета и третирани с *Piper longum* (съдържа сесквитерпени, намалено съдържание на монотерпени) и други терпени в сравнение с групата, приемащата Орлистат 45 мг/кг (Rai et al., 2015).

### **1.6.11. Етерично масло от индийско орехче**

Маслото от индийско орехче е богато предимно на монотерпени като сабинен (58,51%),  $\alpha$ -пинен,  $\beta$ -мирцен и  $\beta$ -терпинен (Kazlauskaitė, et al., 2023). Активаторите на ацетил-КоА карбоксилазата (АСС) и АМР-активираната протеин киназа (АМРК) са важни фактори, които регулират съхранението и управлението на енергията в тялото. Сигналният път АМРК е активиран от индийско орехче, на което се дължи антиобезния му ефект (Nguyen et al., 2010).

### **1.6.12. Етерично масло от *Mentha spicata***

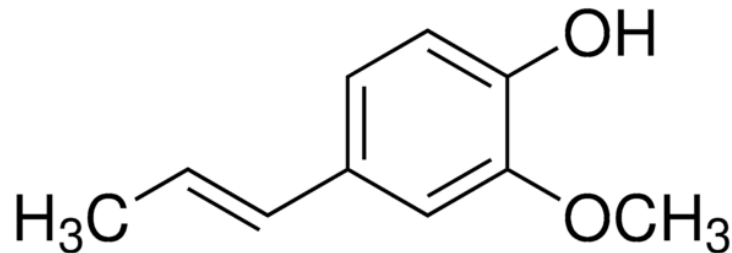
Етеричното масло съдържа оксигенирани монотерпени в 90% от състава си. *Mentha spicata* притежава благоприятно действие при състояния, свързани с наднормено тегло. Като подлежащ механизъм се смята действие върху панкреатична липаза (Ali-Shtayeh et al., 2019).

## **2. Анетол**



## 2.1. Физико-химични характеристики

Анетолът е бистра, безцветна до кехлибарена течност със сладък анасонов аромат. Високо разтворим в етанол и слабо разтворимо във вода (Marinov and Valcheva-Kuzmanova, 2015). Класификационно принадлежи към монотерпените, химическата структура е представена на **Фигура 2** (<http://en.wikipedia.org/wiki/Anethole>).



**Фигура 2.** Химическа структура на анетол

Анетолът е важен компонент, който се съдържа в етеричните масла от анасон, карамфил, канела и мащерка (Castro et al., 2022). Анетолът проявява два изомера - цис- и транс-анетол, поради наличието на двойна връзка. И двата изомера имат различни физически характеристики (Castro et al., 2022). Естественият изомер на анетола е транс-анетолът, който представлява приблизително 90 % от общото количество анетол, срещано в природата (Jurado et al., 2006). Цис-анетолът се счита за потенциално вреден за хората (Vendramin et al., 2021), но въпреки това се намира се в анасонови напитки в ниски нива.. Известно е, че химическата стабилност на транс-анетолите може да бъде повлияна от дължината на вълната на ултравиолетовата (UV) и видимата (VIS) светлина, атмосферния кислород и температурата (Vendramin et al., 2021). По този начин цис-анетолът се произвежда от транс-анетол чрез излагане на ултравиолетова радиация или повишена температура (Vendramin et al., 2021), притежава неприятна миризма и вкус (Castro et al., 2010). При високи дози обаче метаболитите на анетола проявяват нежелани ефекти (Vendramin et al., 2021).

## 2.2. Факмакокинетика на анетол

Анетол има добра перорална резорбция (Marinov and Valcheva-Kuzmanova, 2014).

Анетол притежава и добра резорбция през кожата. При локално третиране етеричното масло от копър, съдържащо около 70% анетол, бързо навлиза в кръвообращението, поради многото кръвоносни съдове на плъховете и тънката им кожна обвивка. Ето защо локалното приложение е най-добрият подход за прилагане на разнообразни летливи химикали. Също така се установява само незначителни разлики в резултатите между групата, на която се прилага етерично масло от копър перорално, и групата, на която се прилага локално лечение. Тези данни показват, че благоприятното въздействие на етеричното масло от копър може да се постигне чрез локално приложение със сравнима ефективност с оралната консумация. Този начин на приложение намалява вероятността от нежелани ефекти, които могат да възникнат след перорално лечение (Vendramin et al., 2021).

Анетол претърпява пълен чернодробен метаболизъм, в резултат на който се образуват метаболити, които впоследствие се конюгират и до голяма степен се елиминират с урината. В издишания въздух се отделя и известно количество въглероден диоксид (CO<sub>2</sub>) (Marinov and Valcheva-Kuzmanova, 2014). Основният начин на метаболизъм на транс-анетола при гризачите е чрез окислително О-деметиране. Значението на този път намалява с увеличаване на дозата, като при плъхове и мишки 56% -72% от дозата се метаболизира по този път при доза 0,05 mg/kg, докато при доза 1500 mg/kg, пътят е важен за около 35% от метаболизма. Анетолът проявява региоселективност при окислението на страничната си верига, което е негова характерно черта. При плъхове превалира пътят на епоксидиране, което води до отделянето на два изомера на 1-(4'-метоксифенил)пропан-1,2-диол в урината. От друга страна, при мишките в по-голямо съотношение е ω-окислението, което води до производството на канелени съединения и 4-метоксибензоена и 4-метоксихипурова киселина (Sangster et al., 1984). При изследване на здрави доброволци е установено, че основният метаболит на транс-анетола е 4-метоксихипуровата киселина, която представлява 56% от метаболизма на приложената доза (Sangster et al., 1987).

### **2.3. Фармакологични ефекти на анетол**

#### **2.3.1. Ефекти на анетол върху ЦНС**

Анетол преминава през кръвно-мозъчната бариера и притежава ефекти в ЦНС. Проучвания сочат, че притежава потенциала да предотврати нарушаването на кръвно-мозъчната бариера (Moradi Vastegani et al., 2023a).

Сигналният път PI3K/Akt/mTOR играе ключова роля в невrogenезата, синаптогенезата и невронната пластичност (Yadollahi-Farsan et al., 2024). PI3K има значима роля в синаптичната пластичност, ученето и паметта, а също така е замесен в патофизиологията на психиатричните заболявания (Yadollahi-Farsan et al., 2024). Анетолът подобрява дългосрочната памет при теста shuttle box, намалява агресивното поведение и подобрява социалното поведение при мишки тип NMRI (Naval Medical Research Institute), които проявяват подобни на аутизъм симптоми. Различните споменати ефекти се постигат благодарение на способността на анетола да повишава генната експресия на PI3K, АКТ и mTOR в хипокампуса (Yadollahi-Farsan et al., 2024). Прилагането на анетол води до намаляване на нивата на възпалителните цитокини тумор некротизиращ фактор  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) и интерлевкин 6 (IL-6) и до повишаване на нивата на противовъзпалителния цитокин IL-4 в стриатума на плъхове с предизвикана от ротенон болест на Паркинсон. Хистологичното изследване на стриатума на микроскопско ниво показва, че третирането с анетол води до увеличаване на жизнеспособността на невроните (Moradi Vastegani et al., 2023b).

Анетоледитиолетионът, синтетично производно на анетола, допринася за разработването на невропротективни лекарства за болестта на Паркинсон, поради антиоксидантното си и инхибиращо MAO-B действие (Moradi Vastegani et al., 2023b). Въпреки това, приложението на ниските дози от 62,5 mg/kg не е имало ефект върху нивата на SOD и MDA (Moradi Vastegani et al., 2023b). Alpha-syn ( $\alpha$ -syn), протеин, открит в пресинаптичните неврони, играе решаваща роля в образуването на телцата на Lewy, които са патогномичен белег, свързан с болестта на Паркинсон. MAO-B метаболизира допамина и генерира свободни радикали като страничен продукт. Прилагането на анетол при плъхове води до намаляване на експресията на  $\alpha$ -syn и MAO-B в стриатума, което впоследствие води до намаляване на невропатологичните симптоми. Инхибирането на MAO-B може да се дължи или на химичната му структура, или на антиоксидантните му свойства. Въпреки че механизмите, по които анетолът намалява експресията на  $\alpha$ -syn, все

още не са напълно изяснени, доказано е, че антиоксидантните съединения могат да блокират процеса на агрегация (Moradi et al., 2023).

Транс-анетолът предизвиква значителна антидепресивна активност при опитни животни, за вероятен механизъм на действие се смята инхибицията на мозъчната моноаминоксидаза-А и намаляване на оксидативния стрес (Dhingra et al., 2019).

Монотерпенът притежава и седативна активност. Времето за сън, предизвикано от пентобарбитал, на мишки се увеличава с 93,5% след едновременното интраперитонеално приложение на етерично масло в концентрация 50 mg/kg; транс-анетолът дава подобни резултати (Alessandra et al., 2014).

### **2.3.2. Ефекти на анетол върху гастро-интестиналния тракт**

Гастропротективни ефекти на етерични масла от *F. vulgare* масло и анетол в дози 50 и 100 mg/kg са изследвани при улцерогенеза, предизвикана от етанол (90%, 1 ml) при плъхове. Маслото от копър и анетолът проявяват значителна гастропротективна активност срещу ерозивни увреждания, предизвикани от етанол. Противоязвената дейност може да се дължи на поддържането на достатъчно кръвоснабдяване на стомашната лигавица чрез антитромбоцитни и вазорелаксиращи ефекти. Всъщност, те могат да предотвратят смущенията в стомашната кръвообращение, предизвикано от етанола, което причинява локална вазоконгестия със съдов застой и лигавичен увреждания, свързани със свръхпроизводството на свободни радикали, получени от кислорода (Massimiliano et al., 2007). Третиране с анетол (30 и 300 mg/kg) значимо увеличава слюзта от стомашната лигавица при модел на язва, предизвикана от етанол (Coelho-de-Souza et al., 2017).

### **2.3.3. Противовъзпалителна и аналгетична активност на анетол**

Инкубация на клетки ML1a (линия на човешки клетки на миелобластна левкемия) с анетол за 2 часа води до намаляване на отговорите на тези клетки към възпаление (Chainy et al., 2000).

Нивото на TNF- $\alpha$  при модел на плъхове на липополизахарид- индуцирано възпаление е изследвано в сравнение с кетопрофен. Прилагането на транс-анетол (10 или 50 mg/kg, i.p.) или кетопрофен (10 mg/kg, i.p.) води до подобно потискане на производството на IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  (Janet et al., 2014). Перорално приложение на анетол в

доза 250 и 500 mg/kg намалява обема на плевралните ексудати и броя на мигриралите левкоцити (Domiciano et al., 2013). Нивата на азотния оксид (NO) и простагландините (PGE2) във възпалителния ексудат са намалени при третиране с анетол, но нивата на IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  не се променят значимо.

Анетолът показва обещаващи резултати в антиедематогенни и антихиперноцицептивни проучвания (Ponte et al., 2012). Монотерпенът се представя с антиноцицептивно действие при модел на гърч, предизвикан от интраперитонеално приложение на оцетна киселина. Ефектът му при модели на болка може да се дължи на намаляване на производството/освобождането на възпалителни медиатори (Alessandra et al., 2014).

#### **2.3.4. Антиоксидантна активност на анетол**

Маслото от копър демонстрира антиоксидантен капацитет, сравним с тази на референтните антиоксиданти  $\alpha$ -токоферол и бутилиран хидрокситолуен. Водни и етанолови екстракти на семена от копър показват 99,1 и 77,5% инхибиране на пероксидация в системата на линолова киселина, по-голяма от същата доза  $\alpha$ -токоферол (36,1%) (Oktay et al., 2003).

#### **2.3.5. Ефект на анетол върху бъбречната функция**

Гломерулите и тубулите на плъхове със синдром на поликистозни яйчници са повлияни положително от транс-анетол, който успешно намалява възпалителните характеристики в бъбреците на групите, приемащи монотерпена. Резултатите показват, че транс-анетолът може да смекчи негативните ефекти на повишения тестостерон върху бъбречната тъкан (Moradi Negahdari, 2022). Установено е, че воден екстракт от семена на копър оказва положително въздействие върху бъбречната функция при плъхове със синдром на поликистозните яйчници, особено когато се прилага в доза 150 mg/kg телесна маса. (Sadrefozalayi et al., 2014).

#### **2.3.6. Противогъбичкова активност на анетол**

Транс-анетолът има способността да възпрепятства растежа на мицела на *Aspergillus flavus*, като пречи на изграждането на клетъчната стена, възпрепятства преноса

на някои лекарства, нарушава цикъла на лимонената киселина и предизвиква апоптоза. Това проучване предлага нови идеи за инхибиторния механизъм на транс-анетола върху мицела на *Aspergillus flavus* и ще подпомогне развитието на природните фунгициди (Lei et al., 2023).

### **2.3.7. Антиагрегантен ефект на анетол**

Проучването идентифицира етерични масла, богати на фенилпропаноиди (*A. dracunculus*, *F. vulgare*, *O. quixos*, *O. basilicum*) като най-ефективни при инхибиране на тромбоцитната агрегация. Това предполага корелация между тези химични компоненти на етеричните масла и способността им да инхибират тази биологична активност. Следователно можем да предположим, че антитромбоцитната активност на копър и може да се дължи на неговата фенилпропаноидна част, която се състои предимно от анетол (Tognolini et al., 2006).

### **2.3.8. Противотуморен ефект на анетол**

При рак на стомаха лечението с анетол води до намаляване на броя на аденокарциномните клетки чрез инхибиране на клетъчния цикъл по митохондриален път, понижаване на регулацията на някои онкогени и активиране на апоптозата (Carrillo et al., 2019). Циклин D (онкопротеин) се дестабилизира от анетол, което е от решаващо значение за лечението на рак на устната кухина, и също така се задейства автофагията (Contant et al., 2021). Наблюдава се синергичен ефект при комбинацията от анетол и доксорубицин за предизвикване на клетъчна смърт при тройно негативен рак на гърдата (Shahbazian et al., 2015). Монотерпенът оказва влияние върху раковите клетки на простата, като потиска растежа на PC-3, получени от ракови стволни клетки, активира каспаза-3 и 9 и повишава съотношението на протеините BAX/Bcl-2 (Elkady, 2018) Проапоптотичният потенциал на анетола при рак на белия дроб се доказва от намаляването на ключовите протеини в сигналните пътища PI3K-AKT и STAT3, както и от експресията на Ki67 и намалените обилни ДНК фрагменти (Kumar and Venkateswarulu, 2023).

### **2.3.9. Други ефекти на анетол**

Установено е, че транс-анетолът блокира хипоталамичните пътища на стреса, по-специално CRH и CGRP, и води до облекчаване на стресиращото поведение при модел на стрес при плъхове. Това предполага, че транс-анетолът може потенциално да служи като ефективен антистрес агент (Bahari et al., 2023).

Анетолът оказва двоен ефект, като намалява експресията на аквапорин 1 (AQP1) и стимулира активността на протеин киназата (PKA) в синовиоцитите. Този сигнален механизъм ефикасно потиска клетъчното възпаление и апоптозата в модел на възпаление, генерирано от H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и би могло да намери приложение като антиревматоидно лекарство (Huang et al., 2024).

Други проучванията върху животни и проби от органи показват, че монотерпенът е ефективен срещу спазми и отпуска както гладката, така и скелетната мускулатура (Lima, 2020).

Доказано е, че използването му като антитромбозно и антихипертензивно средство е ефективно (Tognolini et al., 2007; de Siqueira et al., 2006).

Когато анетолът се включва в клетъчна културата на говежди ембриони по време на *in vitro* матурацията и развитие на ембриона *in vitro*, той повишава скоростта на образуване на бластоцисти (Anjos et al., 2019).

Soares et al. демонстрират, че анетолът предизвиква в изолирана от плъхове торакална аорта вазоконтракция при по-ниски концентрации чрез отваряне на волтаж-зависими Ca<sup>2+</sup>-канални, докато при по-високи концентрации предизвиква вазорелаксация. Тази релаксация не зависи от производството на азотен оксид, тъй като не се инхибира от блокер на азотния оксид синтаза (Soares et al., 2007). От друга страна, Tognolini et al. разкриват, че вазорелаксантият ефект на анетол при аорта без ендотел е независим от азотния оксид, вероятно не е свързан с блокирането на  $\alpha$ -адренорецепторите (Tognolini et al., 2007).

Транс-анетолът е също толкова ефективен, колкото аеробните упражнения и нифедипин за предотвратяване на хипертония, предизвикана от хронично излагане на ограничителен стрес и никотин при плъхове, както и за подобряване на регулирането на съдовия тонус. Без да показва необичайно понижаване на кръвното налягане в сравнение с нормотензивни плъхове (Seo et al., 2018).

### **3. Експериментални методи и модели за индукция на затлъстяване**

#### ***3.1. Диетични модели***

Тези модели се характеризират с фенотипи на затлъстяване, при които телесните мазнини се натрупват за относително дълъг период от време, въпреки че вредните метаболитни последици от диета с високо съдържание на мазнини се проявяват в рамките на няколко дни (Williams. 2014). В сравнение с моногенните модели, времевата рамка за развитие на диетично-индуцирано затлъстяване по-точно наподобява постепенното наддаване на тегло, което се наблюдава при голяма част от човешката популация в резултат на незначимо положителен енергиен баланс в продължение на много години; в това състояние приемът на калории обичайно надвишава разхода на калории, дори и само с малка част (Williams. 2014)

Диетите с високо съдържание на мазнини обикновено се използват за предизвикване на затлъстяване при животни (Williams. 2014). Диетите с високо съдържание на мазнини за предизвикване на затлъстяването. Като количествено съдържание на калории варират от 41 до 60%. Диетично-индуцираните модели обикновено осигуряват между 45 и 60% от калориите от мазнини; Консумацията на диети, богати на мазнини, може да доведе до развитие на затлъстяване, подобно на човешкото, тъй като увеличава телесната мастна тъкан и лептина.

Диетата с високо съдържание на захар (ДВЗ) също допринася за развитието на затлъстяване при лабораторните животни. В експерименталните модели захарозата се дава отделно от стандартната лабораторна храна, като допълнителна добавка или смесена с питейна вода (Witek et al., 2022). ДВЗ оказва отрицателно влияние върху гликемичния контрол при гризачи. Тези ефекти са сходни с наблюдаваните след хранене с диетите с високо съдържание на мазнини (ДВМ). Въпреки това наддаването на телесно тегло и мастната тъкан при животните, хранени с ДВЗ, са по-малки, отколкото след хранене с ДВМ.

Кафетерийната диета обикновено предлага на гризачите комбинация от сладки и солени, висококалорични и/или богати на захар храни, взети от човешката кухня, заедно с лабораторната храна. Диетата е сравнително стабилна алтернатива на храненето с



пречистени диети с високо съдържание на мазнини за предизвикване на затлъстяване, тъй като предотвратява използването на много висок прием на определен вид мазнини, като същевременно предизвиква непрекъсната хиперфагия и повишен прием на енергия. Опасенията при тази диета са липсата на стандартизация и вариациите в избраната диета, трудности при изчисляването на енергийния и макронутриентен прием (Buyukdere et al., 2019).

При диетата "junk food" са налични различни преработени храни и закуски в допълнение към сместа от свинска мас и лабораторна храна. Диетата с нездравословни храни води до увеличаване на мастната маса във всички тествани групи. Перинаталната експозиция на потомството на висококалорични диети с високо съдържание на захар увеличава приема на мазнини от момента на отбиване. Тази хранителна манипулация също така повлиява експресията на гените в мезолимбичната система за възнаграждение (Ong and Muhlhausler, 2011).

## **3.2. Генетични модели**

### **3.2.1. Моногенетичен модел**

Моногенните животински модели са животни с дефект в един от гените. Те са надеждни и ефективни, широко използвани за изследване на затлъстяването. Въпреки че тези модели се различават с човешките по начина, по който се разпределя енергията и се отлагат мазнини. Това ги прави не толкова подходящи за изследване на човешките заболявания. Въпреки че е доказано, че една манипулация на почти 250 гена може да предизвика затлъстяване при мишки, моногенните модели са резултат главно от мутация(и) в пътя на лептина (Barrett et al., 2016; Berger et al., 2021). Лептинът е адипоцитен хормон, чиято основна функция е свързана с потискането на приема на храна, метаболизма и репродукцията чрез взаимодействие с централната нервна система, главно с хипоталамуса (Zhang et al., 2014).

При ob/ob модела, който се използва широко, тъй като при него се наблюдава ранно начало на затлъстяването, мутацията предотвратява секрецията на биоактивен лептин чрез позиционно клониране, което води до преждевременно прекратяване на синтеза му (Berger et al., 2021).

Моделът db/db (db означава диабет) е друга възможност за изучаване на молекулярната основа на затлъстяването, но обикновено се използва за изследване на диабет тип 2 (Guest et al., 2019). Опитни животни с db/db мутация са фенотипно сходни с модела ob/ob. При тях се наблюдава мутация в гена на лептиновия рецептор, автозомно-рецесивен признак, който кодира точкова мутация, водеща до дефектна лептинова сигнализация (Bahary et al., 1990; Suriano et al., 2021).

Моделът s/s е разработен с цел да се изследва ролята на отделните лептинови сигнали, като се нарушава пътят на STAT3, въпреки факта, че той се експресира обикновено на клетъчната повърхност и може да медира други лептинови сигнали. При този модел дългите сигнални пътища на лептина са нарушени (Martins et al., 2022). Опитните животни с s/s модел са хиперфагични и затлъстели, имат нормална дължина на тялото и за разлика от моделите ob/ob или db/db са фертилни (Martins et al., 2022).

### **3.2.2. Полигенни модели**

При изучаването на затлъстяването полигенните модели предоставят по-точна информация за биологията на затлъстяването в сравнение с моногенните модели, тъй като човешкото затлъстяване се медира от множество гени (Zhang et al., 1994). Тези модели са едни от най-използваните и се считат за по-реалистични модели за изследване на човешкото затлъстяване.

Щамът на новозеландските затлъстели мишки (NZO) е полигенен модел, който развива затлъстяване и диабет тип 2 само при мъжките гризачи. Тези животни показват най-високи нива на затлъстяване сред полигенните модели. Те споделят и други характеристики, които са сходни с човешкия диабет тип 2, като например инсулинова резистентност в кафявата мастна тъкан и скелетните мускули на 4-5-седмична възраст, която преминава в диабет. При тях се наблюдава хиперхолестеролемия и хипертония, умерена хиперфагия и намален разход на енергия и волева активност (Kluge et al., 2012).

### *3.3. Хирургически методи за индукция на затлъстяване*

Широко известно е, че двустранните лезии или деаферентацията на вентромедиалния хипоталамус при плъхове предизвикват хиперфагия и неконтролируемо

наддаване на тегло - състояние, наричано "хипоталамично затлъстяване" (Sato et al., 1997).

#### *3.4. Нови методи*

Интересна нова разработка е използването на електромагнитно лъчение (радиовълни или магнитни полета) за активиране или инхибиране на йонни канали за контрол на храненето и глюкозното усещане в хипоталамуса (Stanley et al., 2016).

### **III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

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

За изпълнението на тази цел си поставихме следните ЗАДАЧИ:

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

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

## **IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

### **1. Материали**

#### ***1.1. Опитни животни***

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

#### ***1.2. Анетол***

В настоящия експеримент опитните животни са третирани с експерименталното вещество: Анетол (Sigma-Aldrich, Germany), който представлява бистра, безцветна до кехлибарена течност със специфичен анасонов аромат сладък и вкус. Плътноста на анетол е 0.99 g/cm<sup>3</sup> при 20 °C, а молекулно тегло - 148.21 g/mol. Експерименталното вещество е високо разтворимо в етанол и слабо разтворимо във вода. Като разтворител в настоящия експеримент се използва слънчогледово олио.

### **2. Методи**

#### ***2.1. Индуциране на затлъстяване и третиране***

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **2.3. Поведенчески методи**

#### **2.3.1. Тест открито поле (ТОП)**

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

#### **2.3.2. Тест за социално взаимодействие (ТСВ)**

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



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

### **2.3.3. Тест за принудително плуване (ТПП)**

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

### **2.3.4. Тест за разпознаване мястото на предмети (ТРМП)**

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

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

## **2.4. Фракционирание на тъкани и органи, и приготвяне на органни хомогенати**

### **2.4.1. Получаване на кръвен серум**

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

### **2.4.2. Изолиране на органи**

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

### **2.4.3. Приготвяне на тъканни хомогенати**

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

## **2.5. Биохимични и клинично-лабораторни тестове**

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

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

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

### **2.5.2. Изследване нивата на триглицериди**

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

### **2.5.3. Изследване нивата на холестерол**

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

### **2.5.4. Определяне на чернодробни ензими в серум**

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

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

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

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

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

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

#### **2.5.7. Определяне на времето на кръвосъсирване**

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

### **2.6. Определяне на тъканни индекси**

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

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

### **2.6.2. Определяне на чернодробен индекс**

Чернодробният индекс е изчислен по формулата: тегло черен дроб (г) / общо телесно тегло (г) × 100.

### **2.7. Хистологични методи**

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

### **2.8. Имунохистохимични методи**

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

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

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

### **2.9. Индуциране на остро възпаление на задна лапа**

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

### **2.10. Статистически методи**

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

## V. СОБСТВЕНИ РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

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

#### 1.1. Резултати

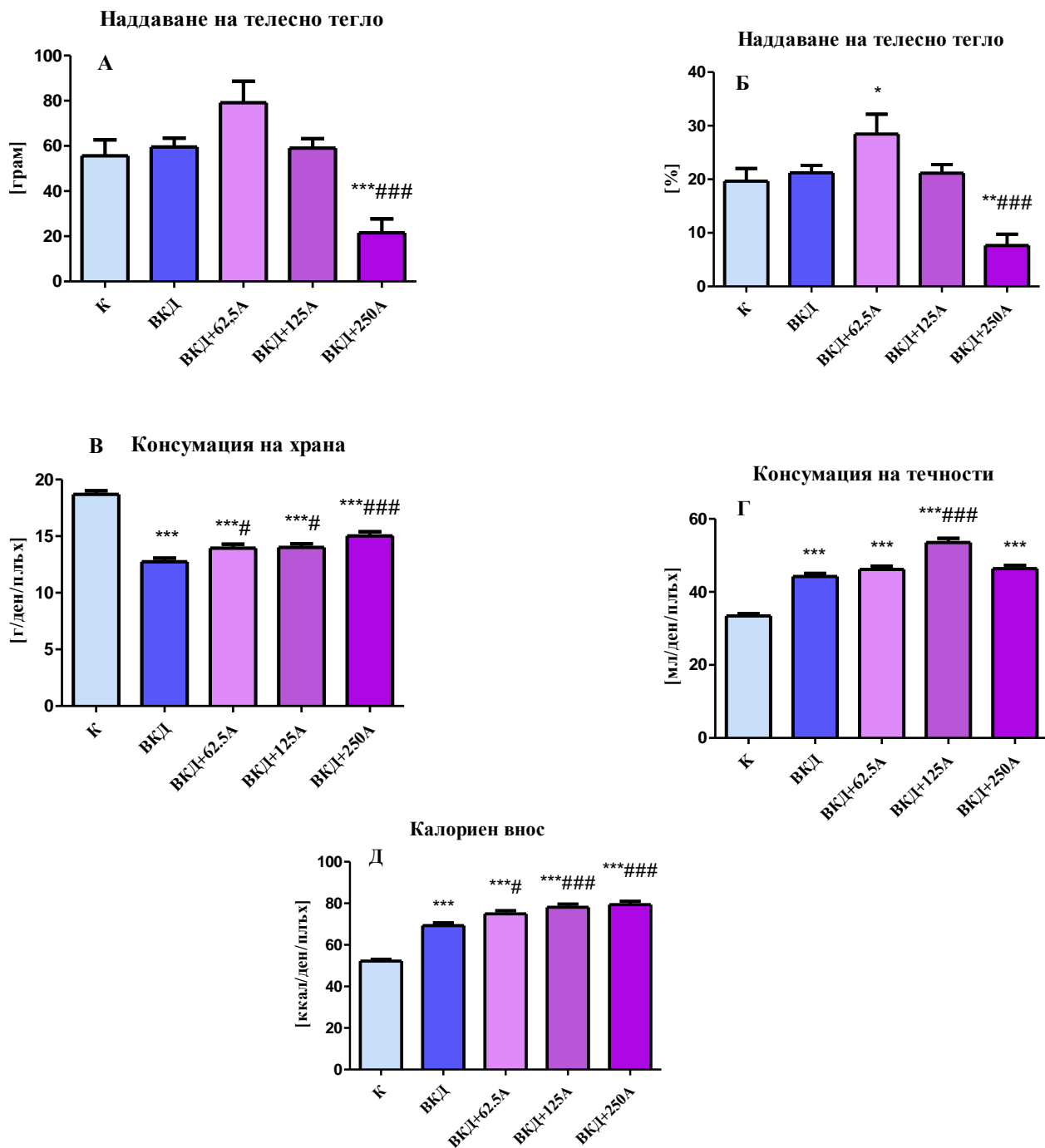
Резултатите са представени на Таблица 2 и Фигури 3 и 4.

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

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

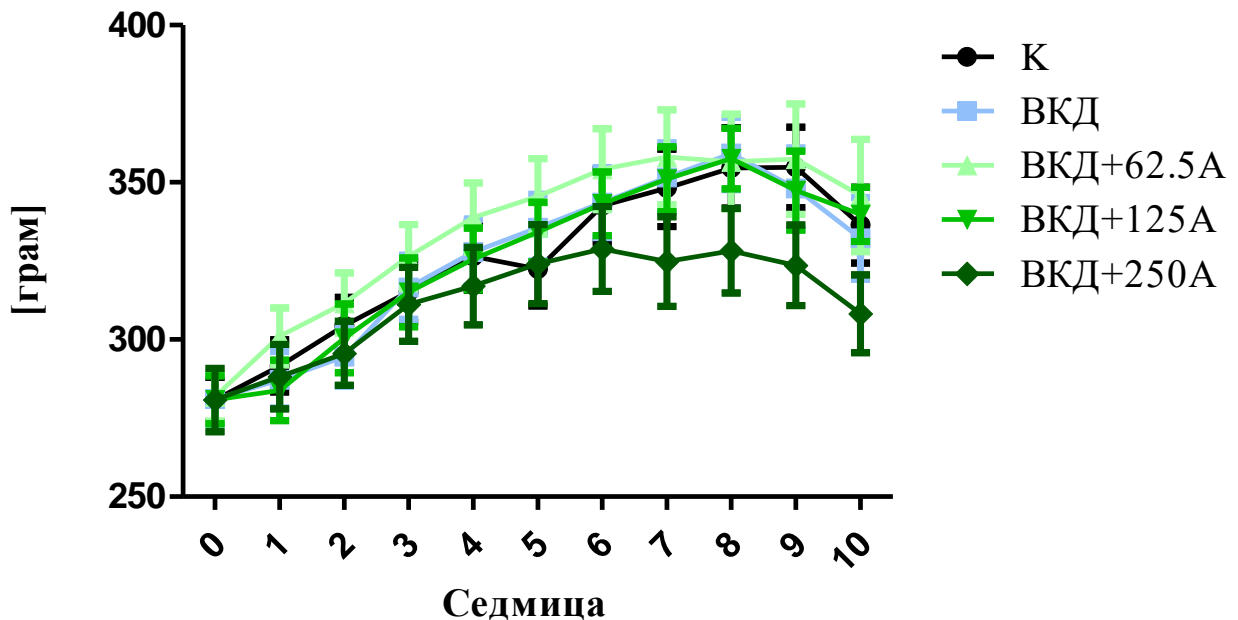
Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Изходно телесно тегло (г)	280.8 $\pm$ 7.2	281.0 $\pm$ 7.9	281.8 $\pm$ 7.7	280.8 $\pm$ 7.6	280.8 $\pm$ 10.1
Крайно телесно тегло (г)	336.4 $\pm$ 12.0	332.2 $\pm$ 13.0	360.0 $\pm$ 12.1	339.8 $\pm$ 8.6	308.2 $\pm$ 12.4
Надаване на телесно тегло (г)	55.6 $\pm$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





**Фигура 3.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху надаването на телесното тегло (измерено в грамове и като процентно съотношение (А и Б), консумацията на храна (В), течности (Г) и калориен внос (Д); \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$  спрямо контролната група (К); # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  спрямо ВКД

## Телесно тегло



**Фигура 4.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху промяната на телесната маса по седмици.

### 1.2. Обсъждане

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

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

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

Дехидратацията води до заболявания като топлинен удар, но също така повишава вероятността от развитие на камъни в бъбреците, хронично бъбречно заболяване, инфекции на пикочните пътища, сърдечно-съдови нарушения и метаболитни заболявания. Умерената дехидратация оказва влияние както върху настроението, така и върху когнитивните способности (Nakamura Y, 2020). В настоящия експеримент анетол в средни дози повишава приема на течности, без това да повлиява на общото телесно тегло. Анетол повишава консумацията на храна и количеството приети калории в текущото проучване. Същият резултат се наблюдава и при инхалацията на вещества, съдържащи фенилпропаноидни структури. Етерично масло от кърпи или отделни негови съставки (трансцинамалдеhid, евгенол и транс-анетол) увеличават апетита и количеството консумирана храна при мишки (Ogawa et al., 2016). Според Hur et al. при плъхове инхалацията на етерично масло от копър не повлиява нито наддаването на телесно тегло, нито количеството на приемана храна (Hur et al, 2006). Според Вае et al., разглеждащи ефекта на копъра върху апетита при жени с наднормено тегло, приемът на чай от копър преди хранене потиска субективното чувство за глад и увеличава усещането за ситост, макар че не променя количеството на консумирана храна (Вае et al., 2018). Подобно потискане на апетита е установено и от Kim et al. (2005) като подлагат жени със затлъстяване на ароматерапия с етерично масло от копър (11).

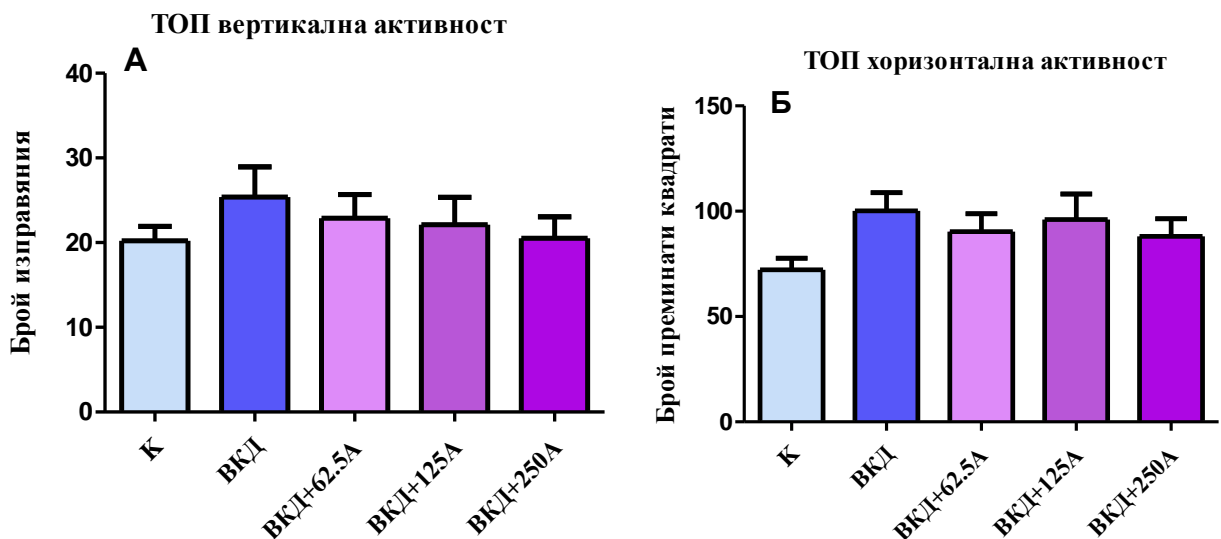
## **2. Ефект на анетол върху поведението в модел на затлъстяване**

### **2.1. Тест открито поле (ТОП)**

**Фигура 5** и **Таблица 3** представят промените в броя прекосени квадрати в арената при ТОП, използвани за оценка на хоризонталната двигателна активност и промените в броя на изправянията на гризачите, даващи информация за верикалната активност. Еднофакторният вариационен анализ не показва значим ефект на третирането върху хоризонталната активност:  $F(4,43) = 1.342$ ,  $P = 0.2701$ . Не се установява статистически значима промяна и при вертикалната двигателна активност след третирането с анетол на опитните животни:  $F(4,45) = 0.5457$ ,  $P = 0.7030$ .

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

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



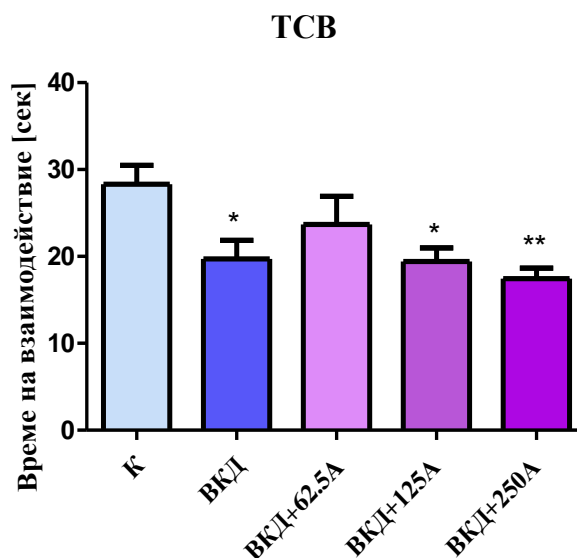
**Фигура 5.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху вертикалните (А) и хоризонталните (Б) движения в тест открито поле (ТОП).

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

Както е показано на **Фигура 6** и **Таблица 4**, висококалоричната диета намалява времето на взаимодействие между плъховете ( $19.71 \pm 2.15$  сек) в сравнение с контролата ( $28.32 \pm 2.18$  сек) при статистическа значимост  $p < 0.05$ . Ниската доза анетол 62.5 mg/kg предотвратява този ефект, като времето на взаимодействие между плъховете от група ВКД+62.5А не се различава значимо от това на контролата ( $23.69 \pm 3.22$  сек). Времето на взаимодействие между плъховете от група ВКД+125А е  $19.41 \pm 1.57$  сек, а това на група ВКД+250А е  $17.44 \pm 1.19$  сек. Така времето на социално взаимодействие в тези групи не се различава значимо от това на група ВКД и остава значимо по-ниско от това на контролата ( $p < 0.05$  за група ВКД+125А и  $p < 0.01$  за група ВКД+250А).

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

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



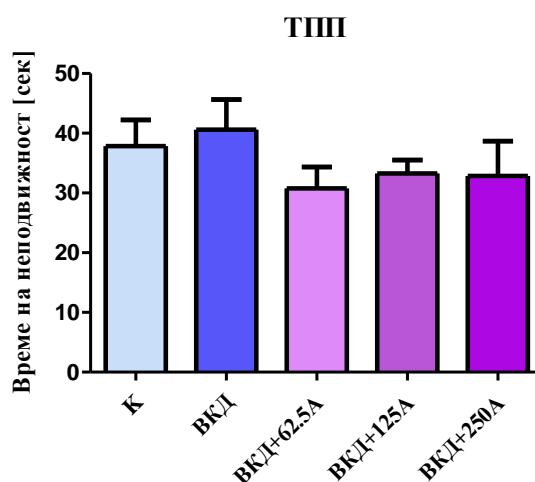
**Фигура 6.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху времето за взаимодействие между животните в тест за социално взаимодействие (ТСВ); \* $p < 0.05$  спрямо контролата (К); \*\* $p < 0.01$  спрямо контролата (К)

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

Данните на **Фигура 7** и **Таблица 5** за ТПП, които са анализирани чрез one-way ANOVA, разкриват тенденция за намаляване продължителността на неподвижост при анетол-третираните групи, без статистическа значимост [ $F(4,42)= 0.7794$ ,  $P= 0.5449$ ]. Тази тенденция вероятно не се дължи на намалена двигателна активност, тъй като в ТОП не се наблюдава такава. Следователно тенденцията за намаляване на времето на неподвижност може да се счита за проява на антидепресивен ефект.

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

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



**Фигура 7.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху времето на неподвижност в тест за принудително плуване (ТПП)

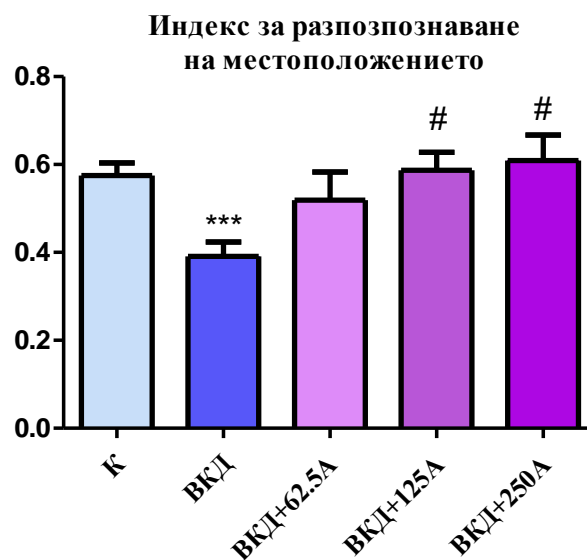


#### 2.4. Ефект на анетол в тест за разпознаване на мястото на предмети

Students's t-test показва значимо намаление ( $p < 0.001$ ) на индекса на разпознаване в групата на ВКД ( $0.39 \pm 0.033$ ) в сравнение с контролната група ( $0.57 \pm 0.028$ ), представен на **Таблица 6** и **Фигура 8**. Значителен ефект от третирането с анетол върху пространствената памет е показан чрез ANOVA ( $F = 3.802$ ,  $P = 0.0182$ ). Пост-тестът на Dunnett показва значимо по-висок индекс на разпознаване на местоположението в групите ВКД+125А ( $0.59 \pm 0.041$ ) и ВКД+250А ( $0.61 \pm 0.058$ ) в сравнение с групата на ВКД ( $0.39 \pm 0.033$ ),  $p < 0.05$ . Пост-тестът за линеарен тренд установява значим зависим от концентрацията ефект на анетола ( $P = 0,0028$ ). Индексът на разпознаване на местоположението при всички групи, третирани с анетол, не се различава значимо от този на контролната група (ANOVA:  $F = 0,5806$ ,  $P = 0,6318$ ).

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

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



**Фигура 8.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (БКД) в дози 62.5 mg/kg (БКД+62.5А), 125 mg/kg (БКД+125А) и 250 mg/kg (БКД+250А) върху индекса за разпознаване на местоположението в тест за разпознаване на мястото на обекта. \*\*\* $p < 0.001$  спрямо контролната група (К); # $p < 0.05$  спрямо БКД.

## 2.5. Обсъждане

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### ***3.1. Ефект на анетол върху показатели на метаболизма***

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

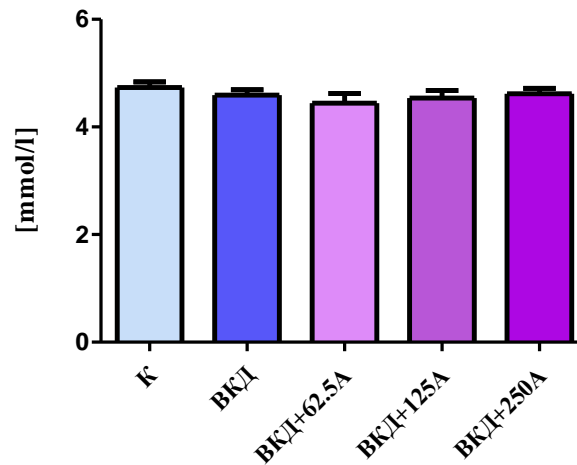
**Фигура 9** представя плазмените нива на кръвната глюкоза на гладно, представени като mmol/l, при контролните и експерименталните животни. Не се открива статистическа значимост между различните групи.

Резултатите от ГТТ са показани на **Фигура 10** и **Таблица 7** представени като mmol/l в съответните времеви интервали. Приемът на ВКД води до повишаване нивата на кръвна глюкоза на 30-та минута. Анализът two-way ANOVA, последван от Bonferroni пост тест разкрива, че на 30-та минута глюкозните нива са значимо повишени в сравнение с контролната група при анетол-третираните групи с изключение на ВКД+250А. За групи ВКД+65А и ВКД+125 значимостта е  $p < 0,001$  спрямо контролата, като при група ВКД+125 се наблюдава значимо повишаване на стойностите и спрямо група ВКД ( $p < 0,01$ ). На 60-та и 90-та минута не се установяват достоверни разлики в нивата на кръвна глюкоза между групите. Площта под кривата (AUC), изчислена за количественото общо увеличение на кръвната глюкоза по време на ГТТ (**Фигура 11** и **Таблица 8**), също разкрива влошаване на глюкозния толеранс от консумацията на ВКД ( $p < 0,05$ ). Третирането с анетол в дози 62.5 и 125 mg/kg не предотвратява тази промяна (съответно  $p < 0,01$  и  $p < 0,001$  спрямо контролата). В групата, получаваща най-висока доза анетол 250 mg/kg, стойността за площта под кривата на глюкозните нива не се различава значимо от тази на контролната група.

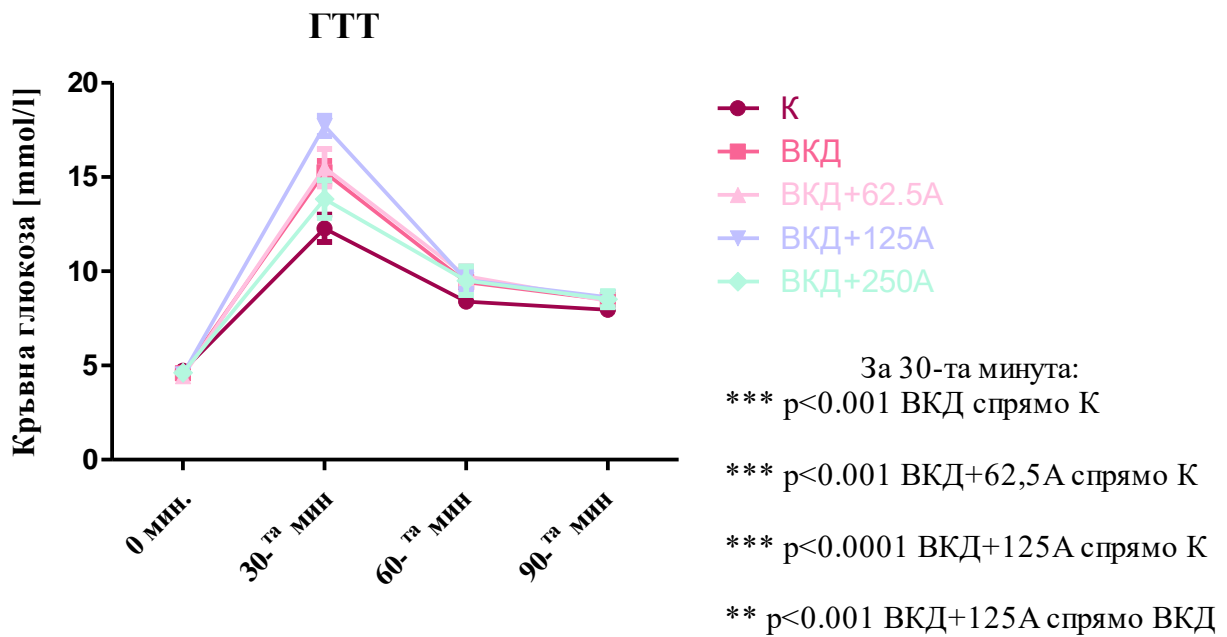
**Таблица 7.** Стойности на кръвната глюкоза в хода на глюкозо-толерантен тест, представена като абсолютни стойности (mmol/l) и процент (%) от изходната стойност на 30-та, 60-та и 90-та мин при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози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

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

### Кръвна глюкоза на гладно



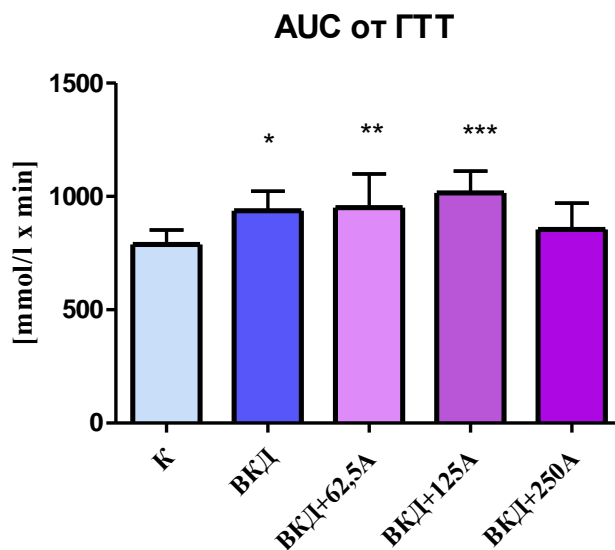
**Фигура 9.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху кръвната глюкоза на гладно



**Фигура 10.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху кръвната глюкоза в хода на глюкозо-толерантен тест

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

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



**Фигура 11.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху площта под кривата (AUC) в хода на глюкозо-толерантен тест; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 спрямо контролната група (К)



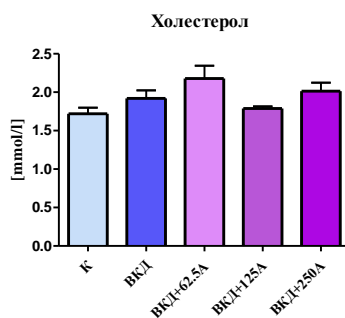
### 3.1.2. Ефект на анетол върху липидния профил

Нивата на серумните триглицериди са представени на **Фигура 12** и **Таблица 9**. В група ВКД няма значима промяна в този показател в сравнение с контролната група. Третирането с анетол на опитните животни не води до статистически значима промяна на серумните триглицериди в сравнение с група ВКД.

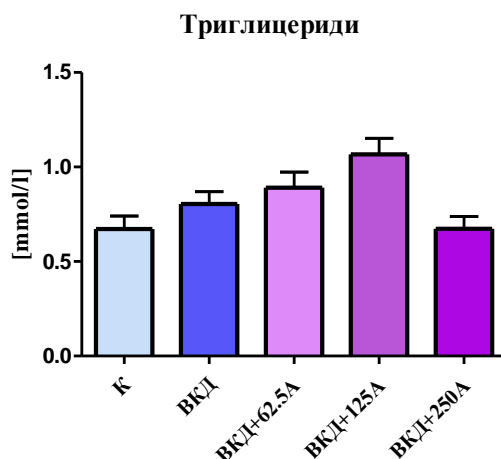
Нивата на серумния холестерол са представени на **Фигура 13** и **Таблица 9**. Резултатите от статистическия анализ са подобни на триглицеридите. Липсва значим ефект както от ВКД, така и от третирането с анетол.

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

Група	Липиден профил	
	Серумни триглицериди	Общ холестерол
К	0,67 $\pm$ 0,70	1,72 $\pm$ 0,08
ВКД	0,80 $\pm$ 0,06	1,92 $\pm$ 0,10
ВКД+62.5А	0,89 $\pm$ 0,08	2,18 $\pm$ 0,17
ВКД+125А	1,07 $\pm$ 0,08	1,79 $\pm$ 0,03
ВКД+250А	0,6730 $\pm$ 0,07	2,01 $\pm$ 0,11



**Фигура 12.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху серумния холестерол



**Фигура 13.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху серумните триглицериди

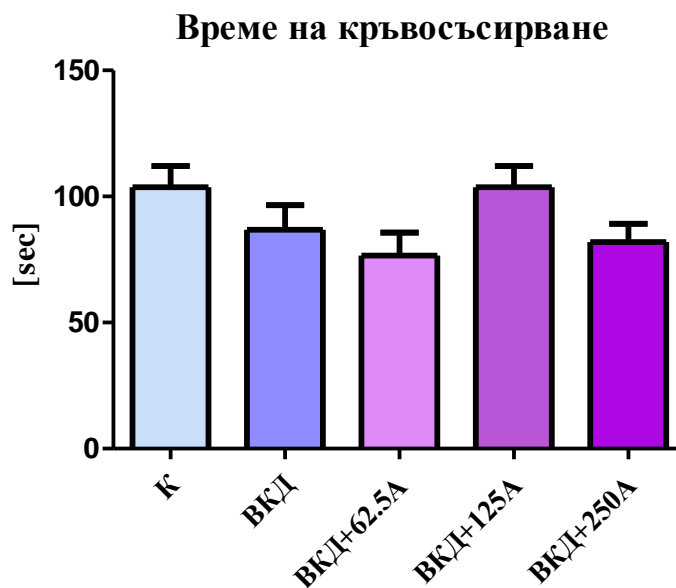
### 3.1.3. Ефект на анетол върху времето на кръвосъсирване

Измерените стойности на времето на кръвосъсирване са представени на **Таблица 10** и **Фигура 14**.

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

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

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



**Фигура 14.** Ефект на анетол (A), прилаган при плъхове на висококалорична диета (VKD) в дози 62.5 mg/kg (VKD+62.5A), 125 mg/kg (VKD+125A) и 250 mg/kg (VKD+250A), върху времето на кръвосъсирване;

### 3.1.4. Обсъждане

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

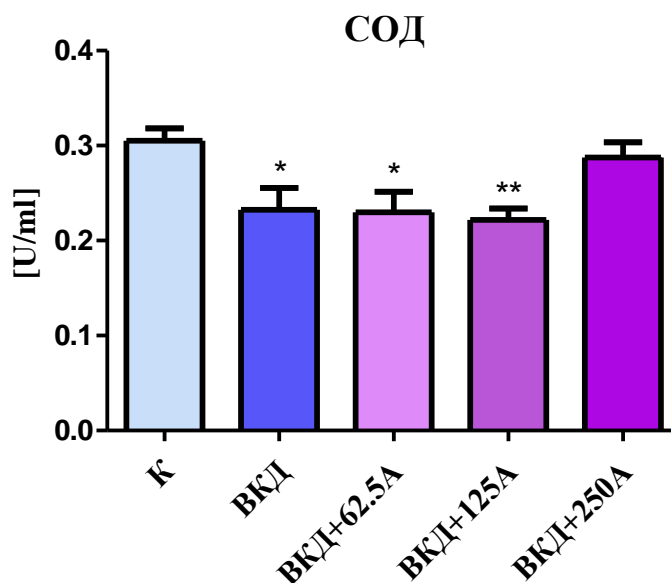
#### 3.2.1. Ефекти на анетол върху серумните нива на супероксид дисмутаза (СОД)

Както е показано на **Фигура 15** и **Таблица 11**, активността на серумната супероксид дисмутаза (СОД) в групата ВКД ( $0,23 \pm 0,02$  U/ml) е значимо по-ниска ( $p < 0,05$ ) в сравнение с контролното ниво ( $0,31 \pm 0,01$  U/ml). Нивата на антиоксидантния ензим остават ниски в групите ВКД+62.5А ( $0,23 \pm 0,02$  U/ml) и ВКД+125А ( $0,22 \pm 0,01$  U/ml). Активността на СОД в групата на ВКД+250А ( $0,29 \pm 0,02$  U/ml) не показва статистически значима разлика в сравнение с контролната група.

**Таблица 11.** Серумни нива на супероксид дисмутаза (СОД) при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  S.E.M; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  спрямо контролната група (К)

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





**Фигура 15.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху серумната супероксид димутаза СОД; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  спрямо контролната група (К)

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

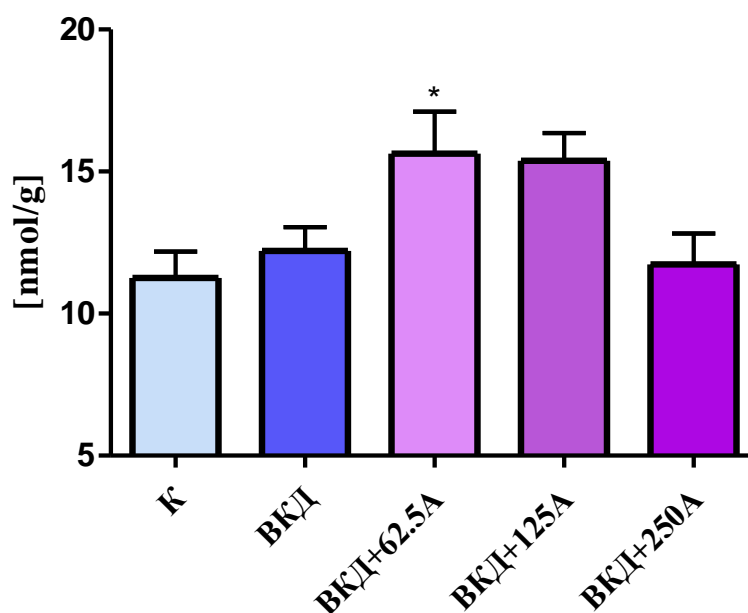
Стойностите на TBARS в серум са поазани на **Фигура 16** и Таблица..... Серумните нива на TBARS в групата на ВКД+62.5 ( $15.64 \pm 1.47$  nmol/g) са повишени ( $p < 0.05$ ) в сравнение с контролното ниво ( $11.26 \pm 0.92$  nmol/g). Нивата на TBARS в група ВКД+250А ( $11.73 \pm 1.09$  nmol/g) не показва статистически значима разлика в сравнение с контролната група.

**Фигура 17** и **Таблица 12** показват нивата на мозъчните TBARS. Консумацията на ВКД води до значимо повишаване на нивата на TBARS в мозъка със стойности  $13.78 \pm 1.05$  nmol/g, в сравнение с контролното ниво от  $9.91 \pm 0.89$  nmol/g ( $p < 0.05$ , t-тест на Student). Прилагането на анетол води до намаляване на нивата на TBARS в мозъчния хомогенат. Измерените нивата на TBARS в мозъка са:  $11.52 \pm 1.53$  nmol/g за група ВКД+62.5А,  $11.61 \pm 1.05$  nmol/g за група ВКД+125А и  $11.32 \pm 1.26$  nmol/g за група ВКД+250А, като посочените стойности не показват значима разлика в сравнение с контролната група (ANOVA:  $F = 0,4218$ ,  $P = 0,7386$ ).

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

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

### TBARS в серум

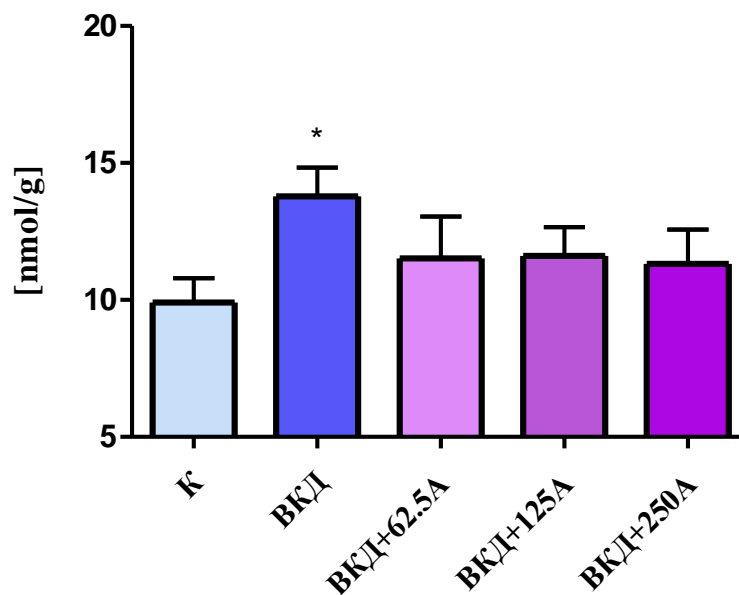


**Фигура 16.** Ефект на анетол, прилаган при плъхове на висококалорична диета (BKД) в дози 62.5 mg/kg (БКД+62.5А), 125 mg/kg (БКД+125А) и 250 mg/kg (БКД+250А), върху серумните нива на TBARS; \*p<0.05 спрямо контролната група (К)

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

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

### TBARS в мозъчен хомогенат



**Фигура 17.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (BKД) в дози 62.5 mg/kg (БКД+62.5А), 125 mg/kg (БКД+125А) и 250 mg/kg (БКД+250А), върху нивата на TBARS в тъканен хомогенат от мозък; \* $p < 0.05$  спрямо контролната група (К)

### 3.2.3. Обсъждане

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

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

## **4. Ефекти на анетол върху мастната тъкан**

### **4.1. Мастнотъканни индекси**

Индексите на различните видове мастната тъкан са представени на **Таблица 14** и **Фигура 18**.

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

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

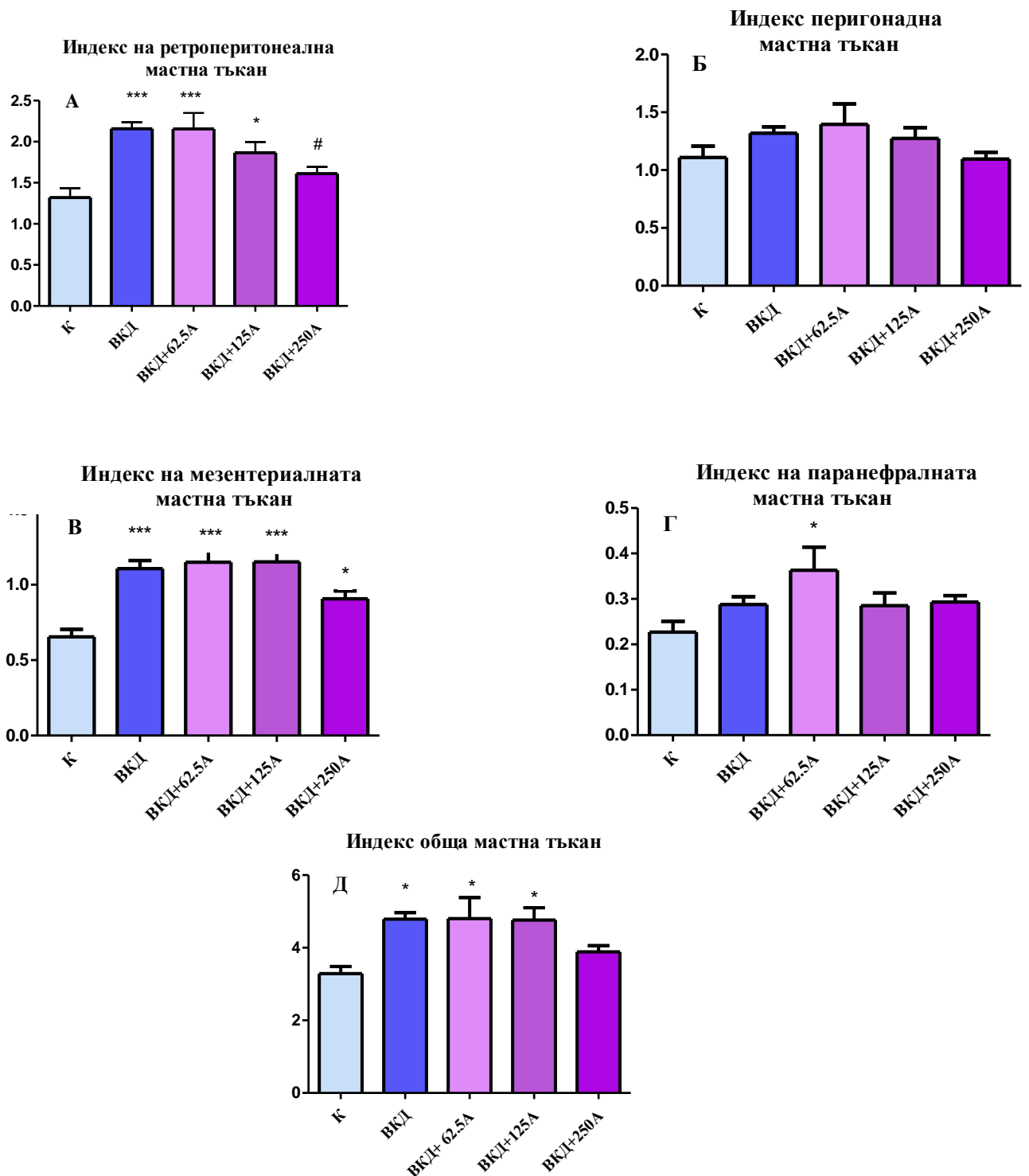
Резултатите от анализа на индекса на мезентериалната мастна тъкан показват, че консумацията на ВКД води до значимо повишаване на индекса със стойности  $1.10 \pm 0.05$ , в сравнение с контролното ниво от  $0.65 \pm 0.05$  ( $p < 0.001$ ). Прилагането на анетол не води до намаляване на индекса, като той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

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

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

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

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



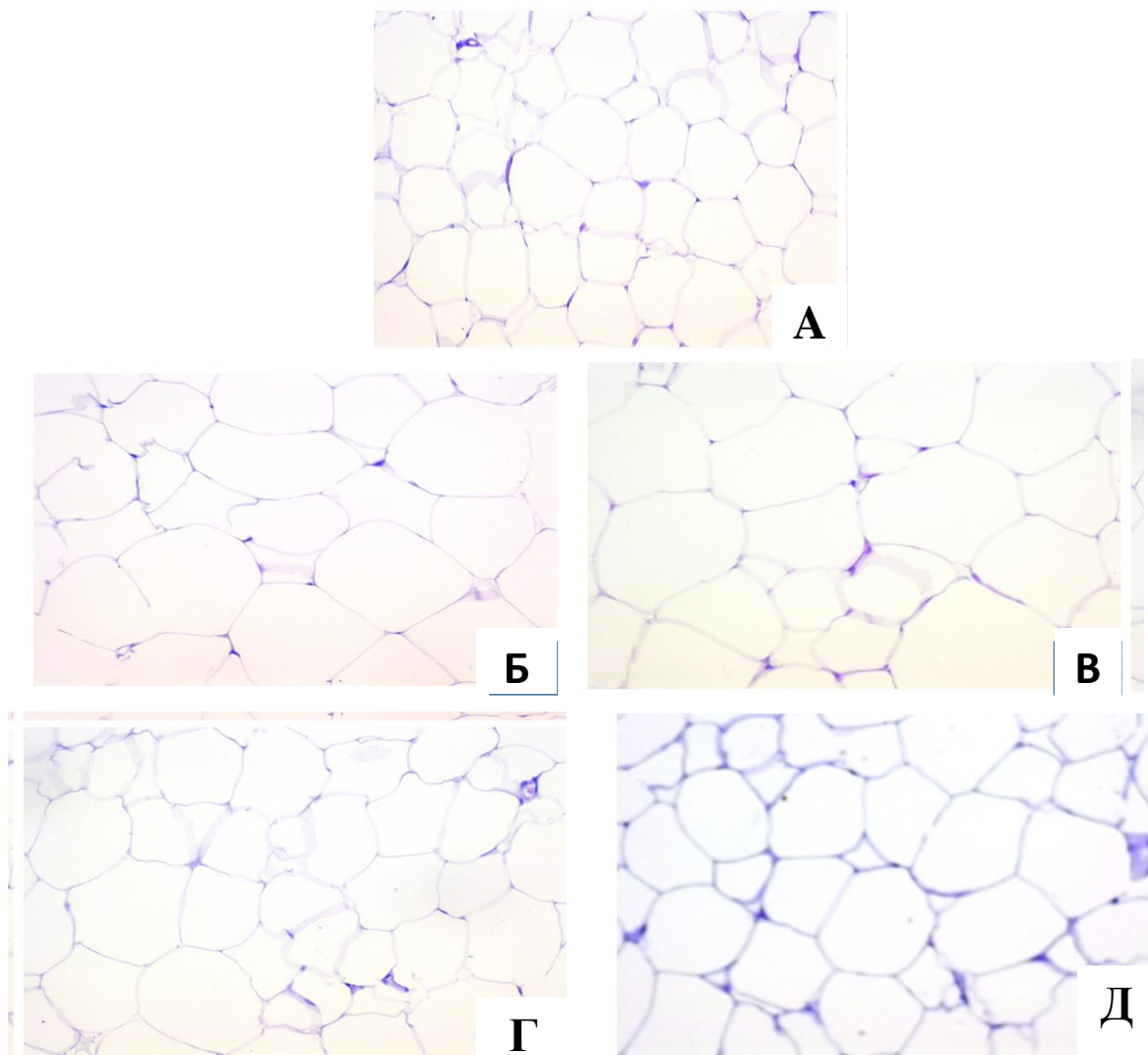
**Фигура 18.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (БКД) в дози 62.5 mg/kg (БКД+62.5A), 125 mg/kg (БКД+125A) и 250 mg/kg (БКД+250A) върху индексите на ретроперитонеалната (А), перигонадната (Б), мезентериалната (B), паранефралната (Г) и общата мастна тъкан (Д); \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$  спрямо контролната група (К); # $p < 0.05$  спрямо БКД



#### **4.2. Хистология на ретроперитонеална мастна тъкан**

Хистологичните резултати за ретроперитонеална мастна тъкан са представени на **Фигура 19**.

В контролната група животни преобладават адипоцити със средни размери и овална или полигонална форма с периферно разположено ядро (**Фигура 19**, панел А). В ретроперитонеалната мастна тъкан на плъховете от групата със затлъстяване преобладават адипоцити с големи размери (**Фигура 19**, панел Б). В ретроперитонеалната мастна тъкан на животните от група ВКД+62.5А са представени адипоцити със средни до големи размери с преобладаване на адипоцитите с големите размери (**Фигура 19**, панел В), което не ги различава от група ВКД. В група ВКД+125А размерът на адипоцитите намалява, наблюдават се мастни лобули с адипоцити със средни и големи размери, на места и тъкан с възпалителни промени (**Фигура 19**, панел Г). При групата, третирана с най-високата доза анетол (ВКД+250А) размерът на адипоцитите е подобен на този при контролната група, наблюдават се средни и големи по размери адипоцити (**Фигура 19**, панел Д).



**Фигура 19.** Хистология на ретроперитонеална мастна тъкан при плъхове на висококалорична диета (панел Б), третирани с анетол в дози 62.5 mg/kg (панел В), 125 mg/kg (панел Г) и 250 mg/kg (панел Д); контролна група (панел А); оцветяване с хематоксилин еозин; увеличение x 200

### **4.3. Имунохистохимия на ретроперитонеална мастната тъкан**

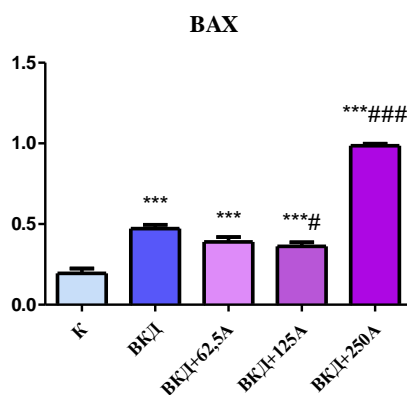
#### **4.3.1. Експресия на VAX**

**Фигури 20 и 21 и Таблица 15** показват експресията на VAX в ретроперитонеална мастна тъкан. Експресията на VAX е значимо повишена при група ВКД със стойности  $0,47 \pm 0,02$  в сравнение с контролното ниво от  $0,19 \pm 0,03$  ( $p < 0,001$ ). Приложението на анетол в доза 125 mg/kg антагонизира индуцирания от диетата ефект, което се изразява чрез

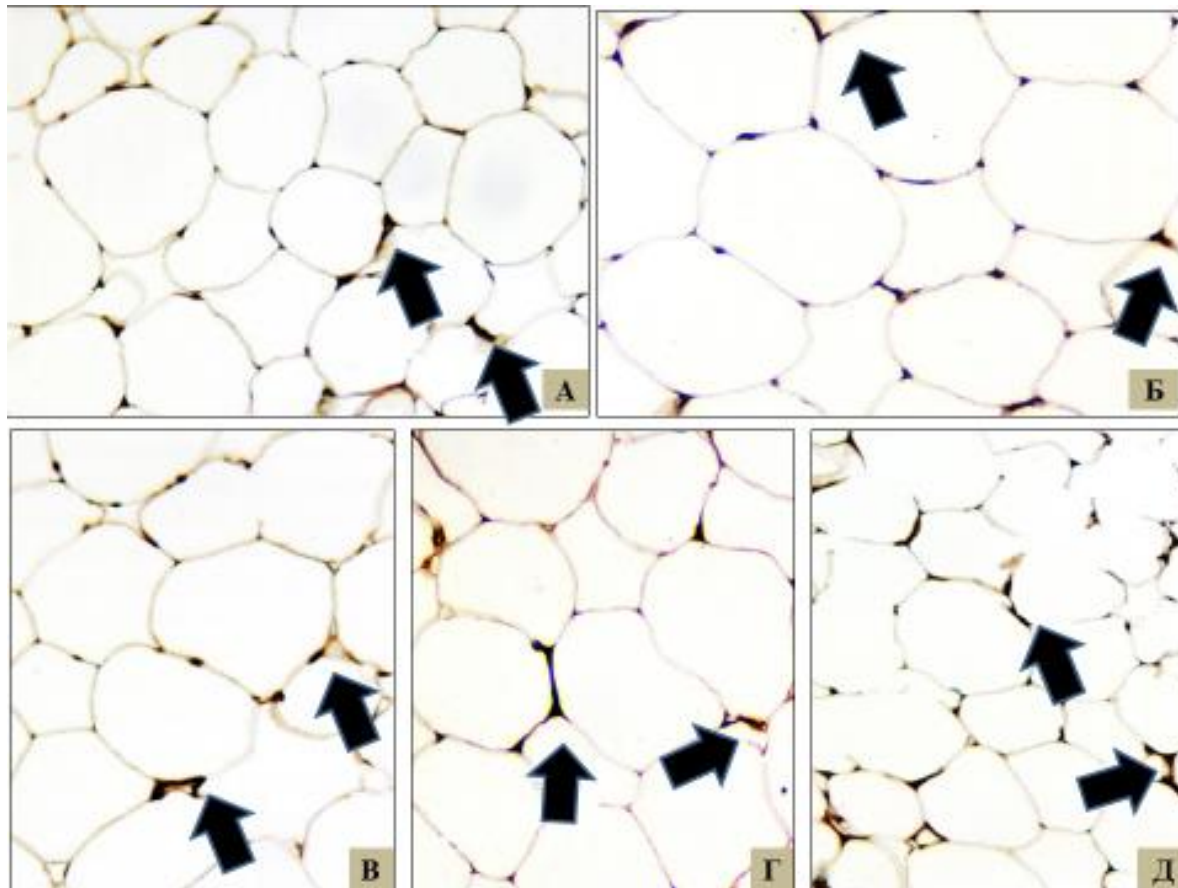
значимо намаляване на нивата на показателя спрямо ВКД групата:  $0,39 \pm 0,03$  ( $p < 0,05$ ), въпреки това, този показател остава висок спрямо контролната група ( $p < 0,001$ ). Приложението на анетол в доза  $250 \text{ mg/kg}$  от своя страна показва противоположен ефект-експресията на ВАХ е повишена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

**Таблица 15.** Експресия на апоптотичния маркер ВАХ в ретроперитонеална мастна тъкан при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третирани с анетол (А) в дози  $62,5$ ,  $125$  и  $250 \text{ mg/kg}$ . Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  S.E.M; \*\*\* $p < 0,001$  спрямо контролната група (К); # $p < 0,05$  спрямо ВКД, ### $p < 0,001$  спрямо ВКД

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



**Фигура 20.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози  $62,5 \text{ mg/kg}$  (ВКД+62.5А),  $125 \text{ mg/kg}$  (ВКД+125А) и  $250 \text{ mg/kg}$  (ВКД+250А) върху експресия на апоптотичния маркер ВАХ в ретроперитонеална мастна тъкан; \*\*\* $p < 0,001$  спрямо контролната група (К); # $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$  спрямо ВКД



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

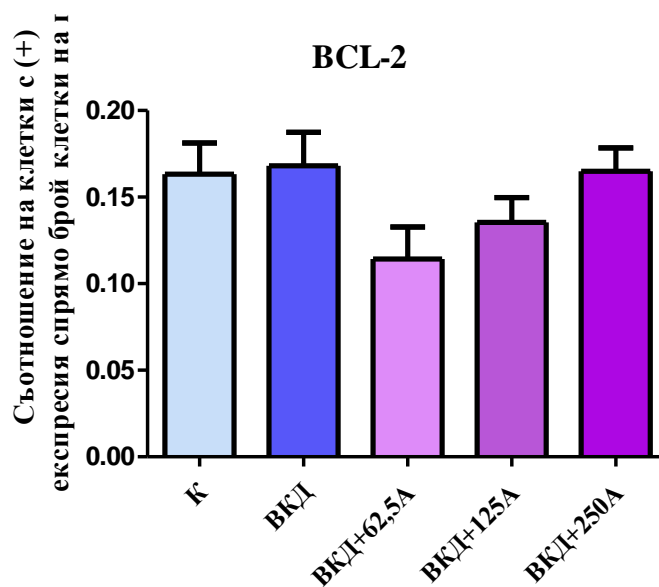
#### 4.3.1. Експресия на BCL-2

**Фигури 22 и 23 и Таблица 16** показват експресията на BCL-2 в ретроперитонеална мастна тъкан.

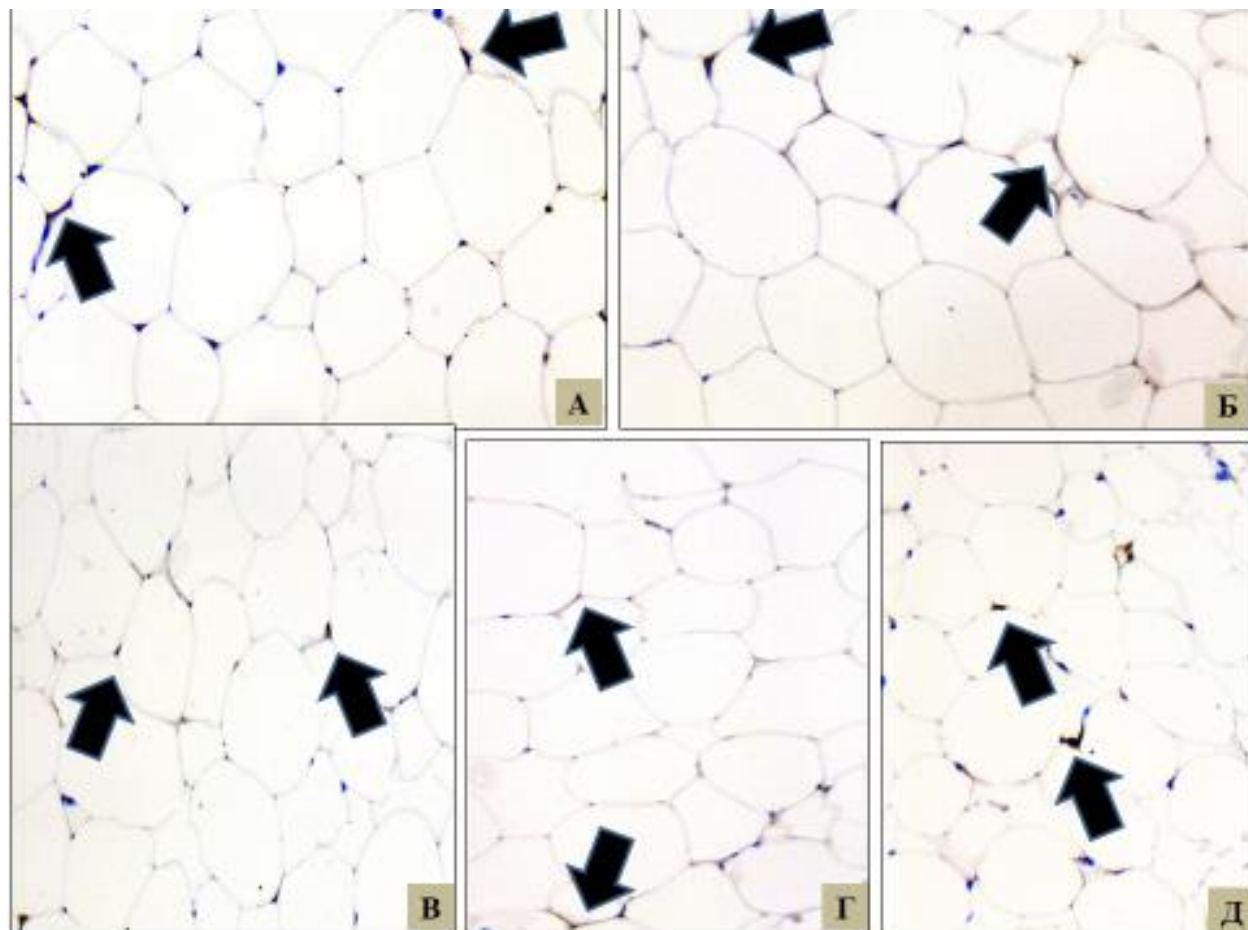
Липсва значимост между нивата на BCL-2 в група ВКД и контролната. Установява се тенденция за намаляване стойностите на показателя от третирането с анетол без статистическа значимост (ANOVA:  $F = 1.883$ ,  $P = 0.1261$ ).

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

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



**Фигура 22.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (BKД) в дози 62.5 mg/kg (BKД+62.5А), 125 mg/kg (BKД+125А) и 250 mg/kg (BKД+250А) върху експресия на апоптотичния маркер BCL-2 в ретроперитонеална мастна тъкан



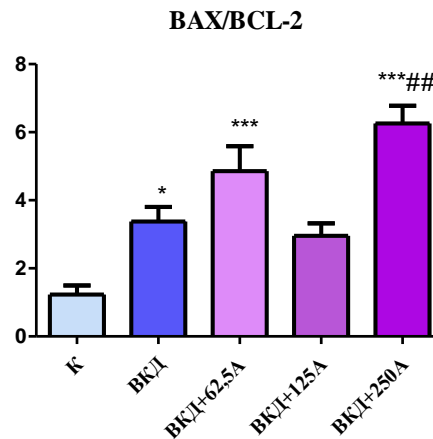
**Фигура 23.** Експресия на антиапоптотичния маркер BCL-2 в мастна тъкан при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (панел Б), третирани с анетол в дози 62.5 mg/kg (панел В), 125 mg/kg (панел Г) и 250 mg/kg (панел Д); контролна група (панел А); черна стрелка – цитоплазма на адипоцити; увеличение x 320

#### 4.3.3. Съотношение BAX/BCL-2

One-way ANOVA анализът разкрива, че съотношението BAX/BCL-2 е значимо по-високо при група ВКД в сравнение с контролната група ( $p < 0.05$ ),  $F = 12.98$ ,  $P < 0.0001$ . Третирването с анетол в дози 62,5 и 250 mg/kg повишава показателя спрямо контролата ( $p < 0.001$ ), като съотношението при доза 250 mg/kg остава високо и спрямо група ВКД ( $p < 0.01$ ). Не се открива статистическа разлика между стойностите на ВКД+125А и контролата. Резултатите са представени на **Таблица 17** и **Фигура 24**.

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

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



**Фигура 24.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А) върху съотношението ВАХ/ ВСL-2 в ретроперитонеална мастна тъкан; \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  спрямо контролната група (К); ## $p < 0.01$  спрямо ВКД

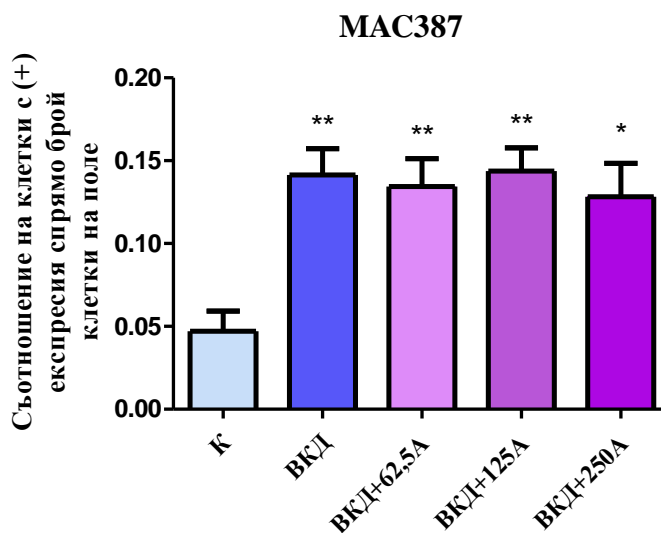
#### 4.3.4. Експресия на МАС387 в ретроперитонеална мастна тъкан

One-way ANOVA анализът отчита статистическа разлика между групите, като пост тест на Dunnett показва повишаване на експресия на маркера МАС387 от консумацията на висококалорична диета ( $p < 0.05$ ). Вследствие третирането с анетол експресията на МАС387 не се различава с тази на ВКД групата, като същевременно остава повишена спрямо

контролата:  $p < 0.05$  за ВКД+250А и  $p < 0.01$  за ВКД+62,5А и ВКД+125А (Таблица 18 и Фигури 25 и 26).

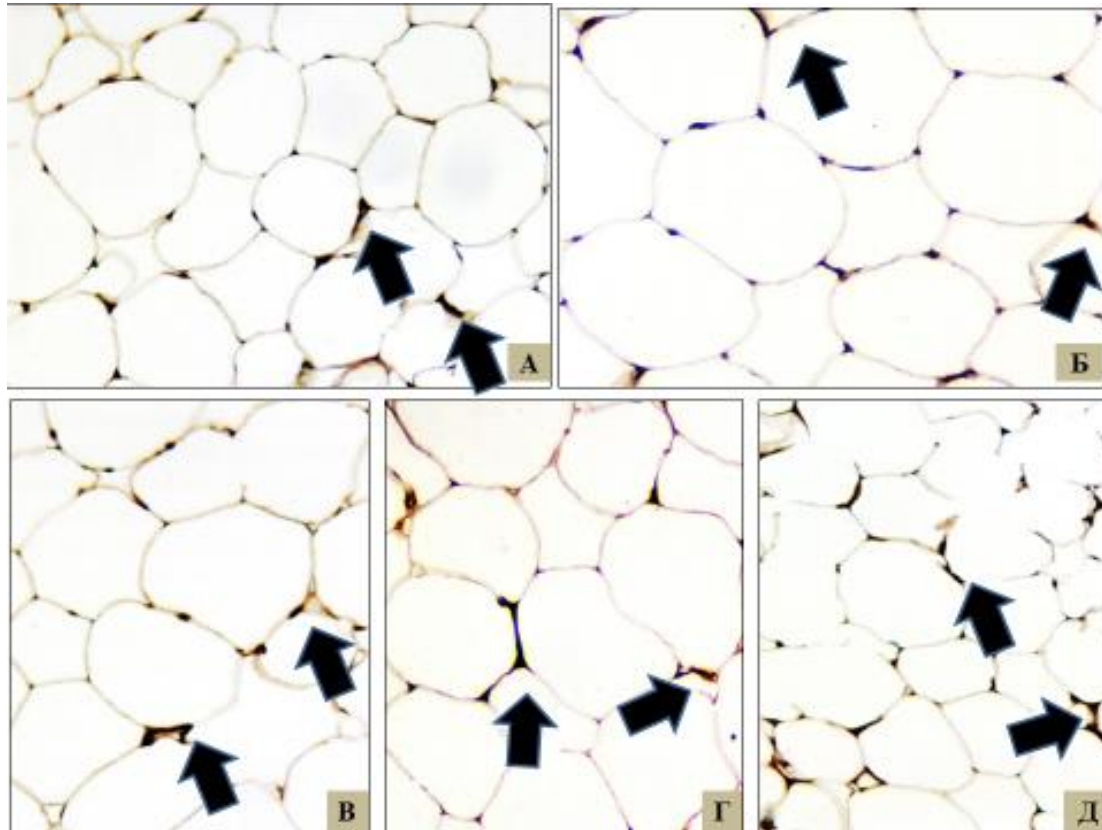
**Таблица 18.** Експресията на МАС387 в ретроперитонеална мастна тъкан при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (ВКД), третиран с анетол (А) в дози 62.5, 125 и 250 mg/kg. Резултатите са представени като средна стойност  $\pm$  S.E.M; \* $p < 0.05$  , \*\* $p < 0.01$ 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

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



**Фигура 25.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А) върху експресията на МАС387 в ретроперитонеална мастна тъкан; \* $p < 0.05$  , \*\* $p < 0.01$  спрямо контролната група (К)





**Фигура 26.** Експресия на провъзпалителния маркер MAC387 в ретроперитонеална мастна тъкан при плъхове с диетично индуцирано затлъстяване чрез висококалорична диета (панел Б), третирани с анетол в дози 62.5 mg/kg (панел В), 125 mg/kg (панел Г) и 250 mg/kg (панел Д); контролна група (панел А); черна стрелка – цитоплазма на адипоцити; увеличение x 320

#### **4.4. Обсъждане**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

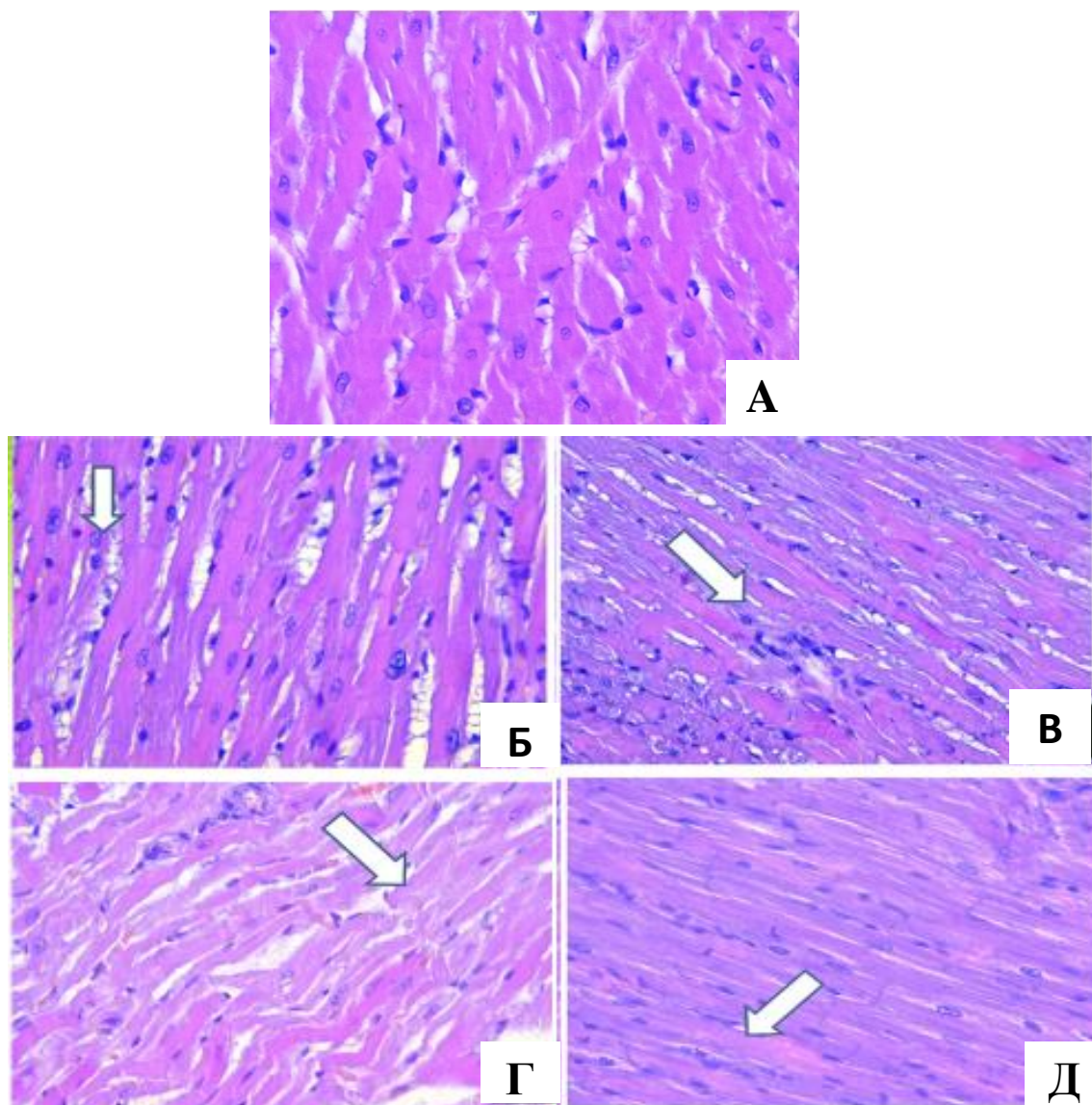
Хипергликемията е свързана с четирикратно увеличение на образуването на реактивни кислородни видове (ROS) в адипоцитите, което от своя страна насърчава възпалението (Lin et al., 2005).

## **5. Ефекти на анетол върху миокард и коронарни съдове**

### ***5.1. Хистология на миокард***

Хистологичните резултати са показани на **Фигура 27**.

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

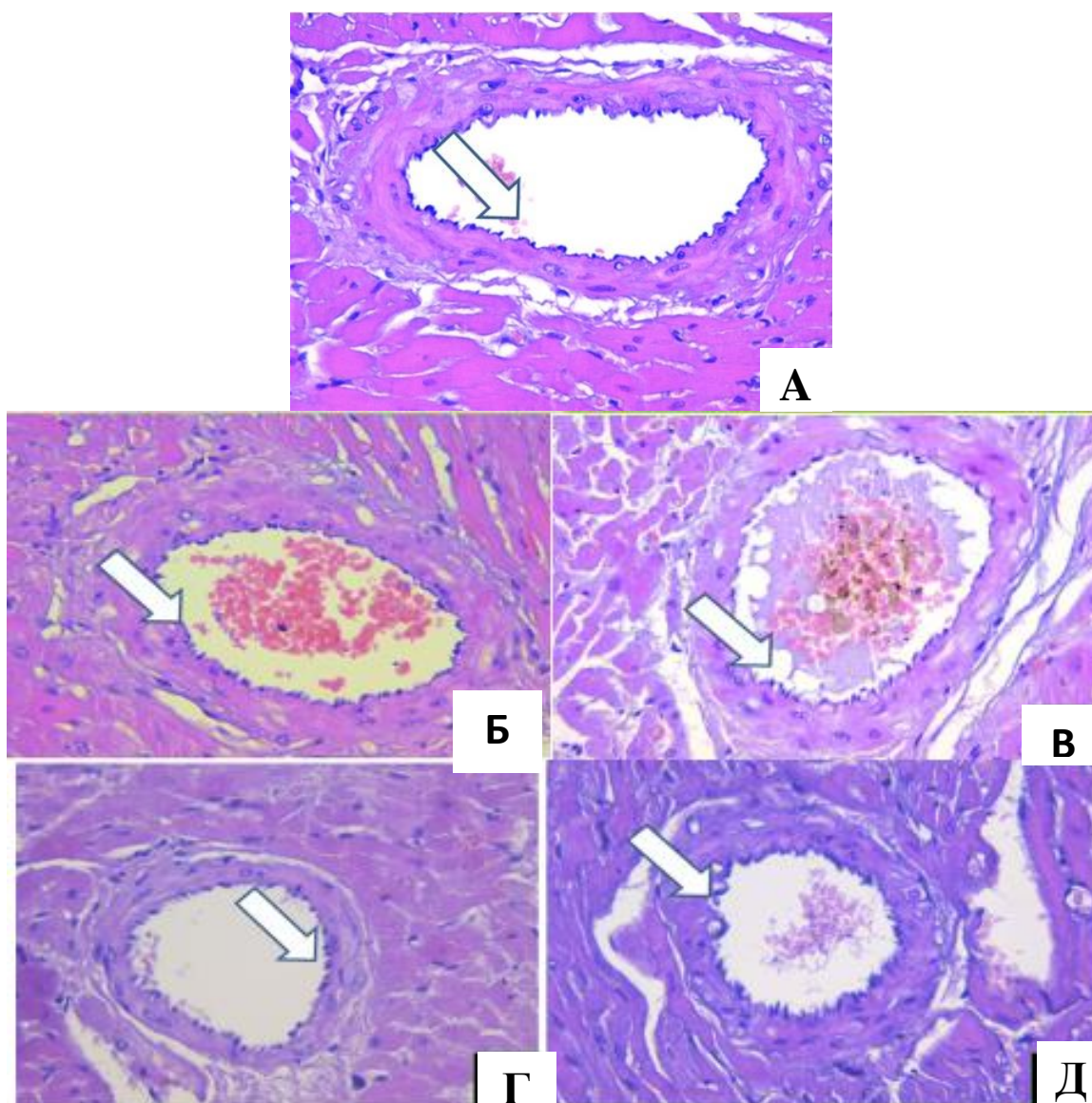


**Фигура 27.** Хистология на миокард при плъхове на висококалорична диета (панел Б), третиран с анетол в дози 62.5 mg/kg (панел В), 125 mg/kg (панел Г) и 250 mg/kg (панел Д); контролна група (панел А); оцветяване хематоксилин еозин; увеличение x 200

### **5.2. Хистология на коронарен съд**

Хистологияните резултати са представени на **Фигура 28**.

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



**Фигура 28.** Хистология на коронарен съд при плъхове на висококалорична диета (панел Б), третирани с анетол в дози 62.5 mg/kg (панел В), 125 mg/kg (панел Г) и 250 mg/kg (панел Д); контролна група (панел А); оцветяване хематоксилин еозин; увеличение x 200

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

Фигура 29 и Таблица 19 показват нивата на TBARS в тъканен хомогенат от сърце. Консумацията на ВКД води до леко повишаване на нивата на TBARS със стойности 25.17

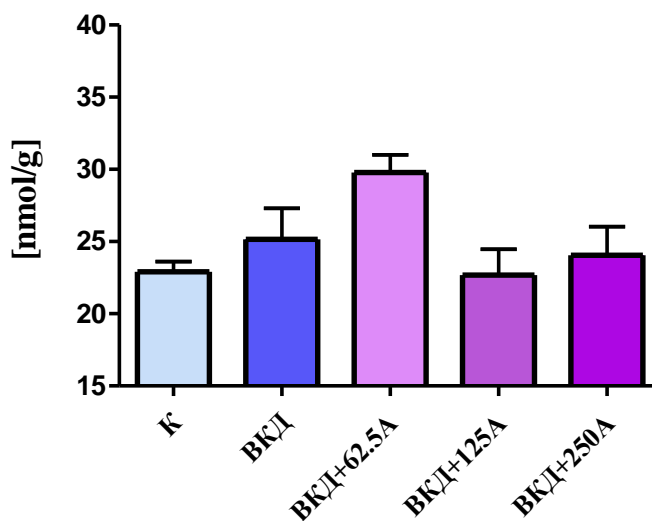


$\pm 2.14$  nmol/g, в сравнение с контролното ниво от  $22.90 \pm 0.72$  nmol/g. Прилагането на анетол не променя нивата на TBARS в сърдечния хомогенат, въпреки че нивата на показателя са повишени при групата с доза 62.5 mg/kg анетол, като тази промяна е статистически незначима. Стойностите на TBARS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

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

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

#### ТBARS в миокард



**Фигура 29.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху нивата на TBARS в тъканен хомогенат от сърце

#### **5.4. Обсъждане**

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

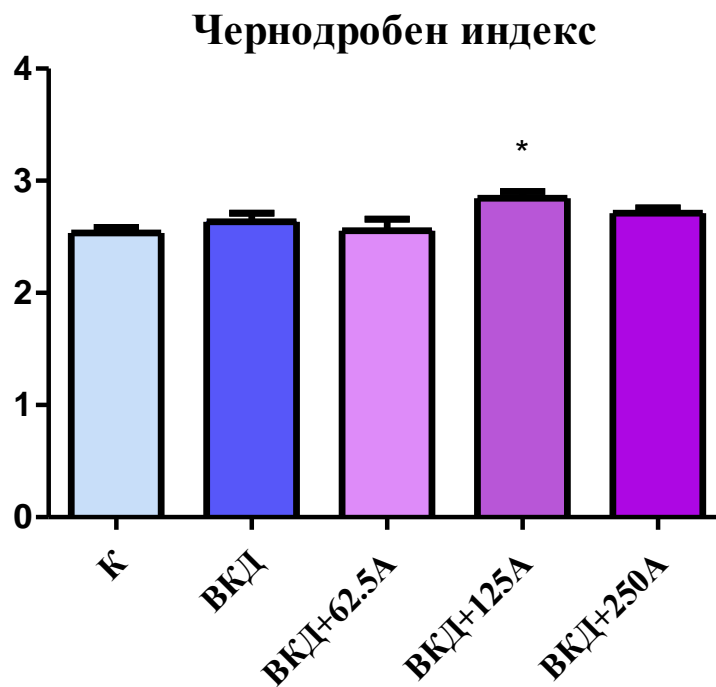
ВКД в текущото проучване уврежда миокарда и ендотела на съдовете, като биохимично не се наблюдава повишаване на липидната пероскидация в миокарда. Хистологично, анетолът не осъществява протективен ефект спрямо индуцираните от диетата промени. Биохимично, нивата на TBARS не се повлияват значително от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

#### **6. Ефекти на анетол върху черен дроб**

### 6.1. Тегло на черен дроб и чернодробен индекс

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

Стойностите на чернодробния индекс не се повишават от консумацията на ВКД. Пост тестът на Dunnett показва, че индексът е повишен при група ВКД+125А ( $p < 0.05$ ) спрямо контролната група, докато при останалите третирани с анетол групи стойностите не се различават от тези на ВКД и контролата (**Таблица 20** и **Фигура 30**).



**Фигура 30.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху чернодробния индекс; \* $p < 0.05$  спрямо контролната група (К)

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

Група \ Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Тегло на черен дроб (г)	8.53 $\pm$ 0,4	8.98 $\pm$ 0.3	9.18 $\pm$ 0.4	9.67 $\pm$ 0.3	8.340 $\pm$ 0.3
Стойности на чернодробния индекс	2.54 $\pm$ 0.1	2.63 $\pm$ 0.08	2.56 $\pm$ 0.1	2.84 $\pm$ 0.06 *	2.71 $\pm$ 0.1
Нива на TBARS в хомогенат от черен дроб (nmol/g)	54.29 $\pm$ 3.7	56.48 $\pm$ 3.8	47.35 $\pm$ 2.0	49.32 $\pm$ 2.7	51.01 $\pm$ 2.2

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

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

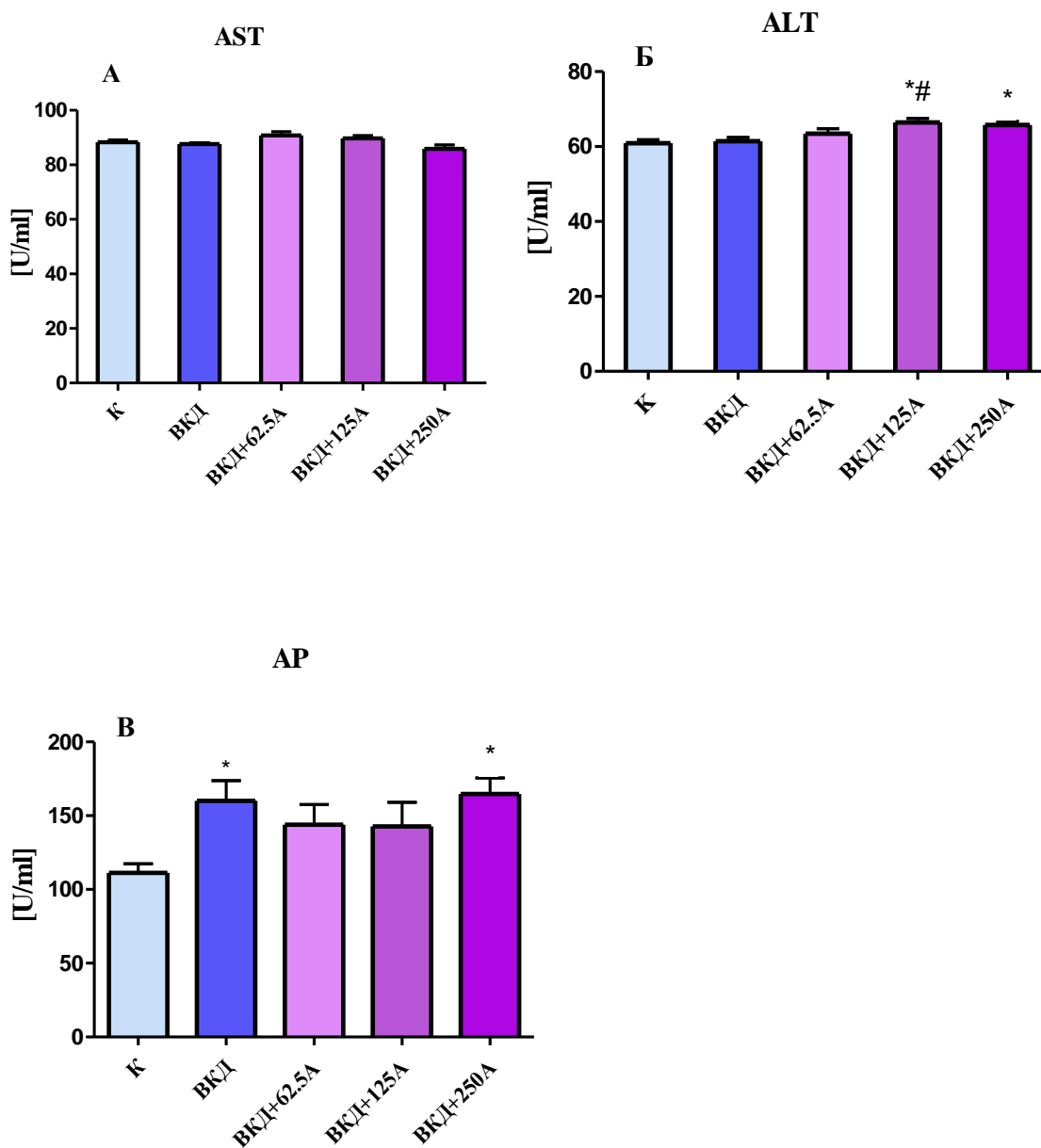
### **6.3. Чернодробни ензими- аспартат аминотрансфераза (AST), аланин аминотрансфераза (ALT), алкална фосфатаза (AP)**

Стойностите на серумната концентрация на AST, ALT, AP са показани на **Фигура 31** и **Таблица 21**. Нивата на ALT не се индуцират от приема на ВКД. ANOVA анализът показва статистически значими разлики между експерименталните групи при серумните нива на ALT:  $F = 4.811$ ,  $P = 0.0033$ . Пост тестът на Dunnett показва статистически значимо

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

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

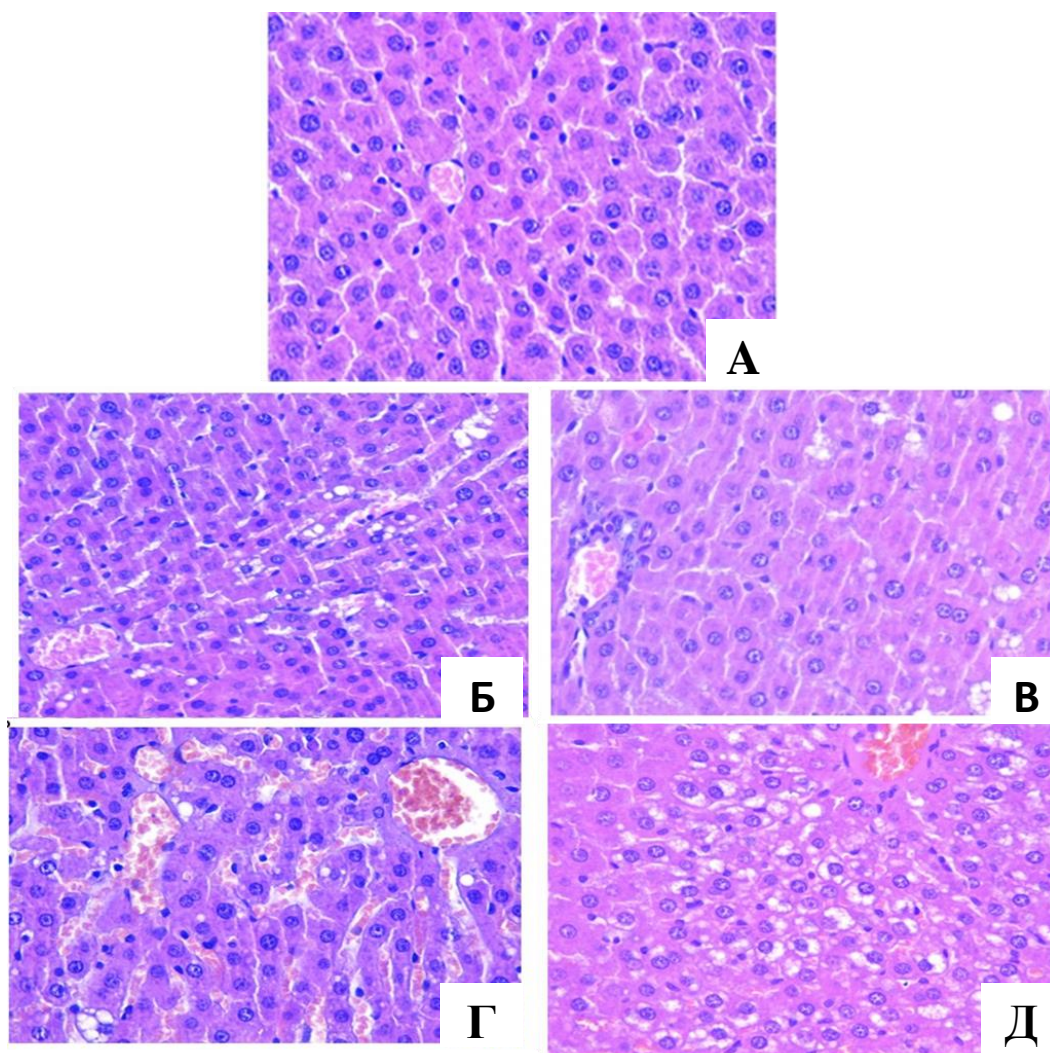
Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
АСТ	$88.26 \pm 0.88$	$87.60 \pm 0.54$	$90.80 \pm 1.33$	$89.74 \pm 0.96$	$85.87 \pm 1.41$
АЛТ	$60.92 \pm 0.90$	$61.40 \pm 1.07$	$63.40 \pm 1.38$	$66.40 \pm 1.10$ *#	$65.79 \pm 0.93$ *
АР	$111.3 \pm 6.17$	$160.1 \pm 13.63$ *	$143.9 \pm 13.6$	$142.7 \pm 16.44$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



**Фигура 31.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (БКД) в дози 62.5 mg/kg (БКД+62.5А), 125 mg/kg (БКД+125А) и 250 mg/kg (БКД+250А), върху нивата на AST (Панел А), ALT (Панел Б) AP (Панел В); \* $p < 0.05$  спрямо контролната група (К); # $p < 0.05$  спрямо група БКД

#### 6.4. Хистология на черен дроб

Хепатоцитите на гризачите от контролната група са със запазена архитектурника, като добре личат чернодробните гредички. При затлъстяване се развива дребнокапчеста стеатоза, която обхваща всички зони на чернодробното делче, но промените са най-изразени около *v. centralis*. Тежестта на промените в група, третирана с ниска доза анетол, не се различават от тези в група ВКД. По-високите дози на анетола също не променят съществено структурните промени на черния дроб. Наблюдават се хепатоцити с дегенеративни и възпалителни промени (**Фигура 32**).

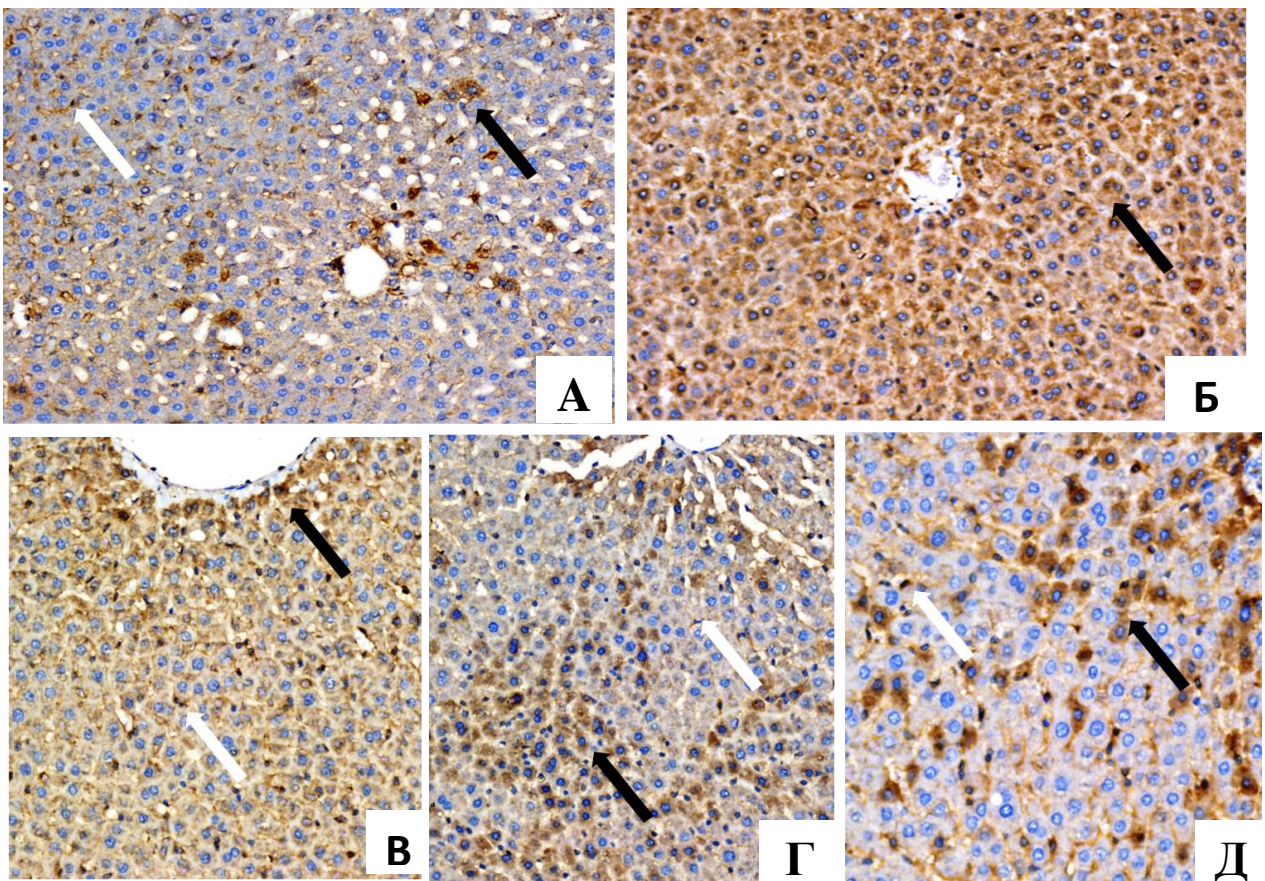


**Фигура 32.** Хистология на черен дроб при плъхове на висококалорична диета (панел Б), третирани с анетол в дози 62.5 mg/kg (панел В), 125 mg/kg (панел Г) и 250 mg/kg (панел Д); контролна група (панел А); оцветяване хематоксилин еозин; увеличение x 200

## 6.5. Имунохистохимия на черен дроб

### 6.5.1. Експресия на ВАХ в черен дроб

Маркерът ВАХ в контролната група се експресира в синусоиди и в отделни хепатоцити ( **Фигури 33 и 34, Таблица 22**). Консумацията на ВКД води до значимо повишаване на ВАХ апоптотичен протеин в хепатоцитите ( $p < 0.001$  спрямо контрола). Експресията на ВАХ в групите ВКД+62.5А и ВКД+125А е в хепатоцити и синусоиди, като остава близка до група ВКД, докато в група ВКД+250А е значимо намалена ( $p < 0.001$  в сравнение с ВКД), но остава по-висока от контролното ниво ( $p < 0.001$ ).

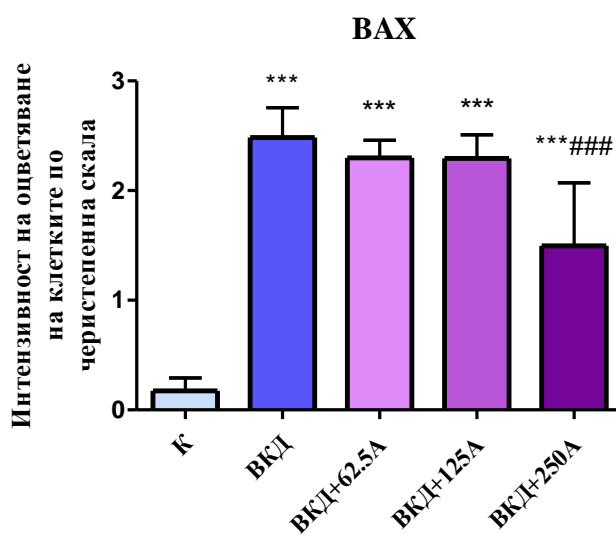


**Фигура 33.** Експресия на апоптотичния маркер ВАХ в черен дроб при плъхове на висококалорична диета (панел Б), третирани с анетол в дози 62.5 mg/kg в панел В (ВКД+62.5А), 125 mg/kg в панел Г (ВКД+125А) и 250 mg/kg в панел Д (ВКД+250А); контролна група (панел А); бяла стрелка – синусоидални клетки,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



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

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

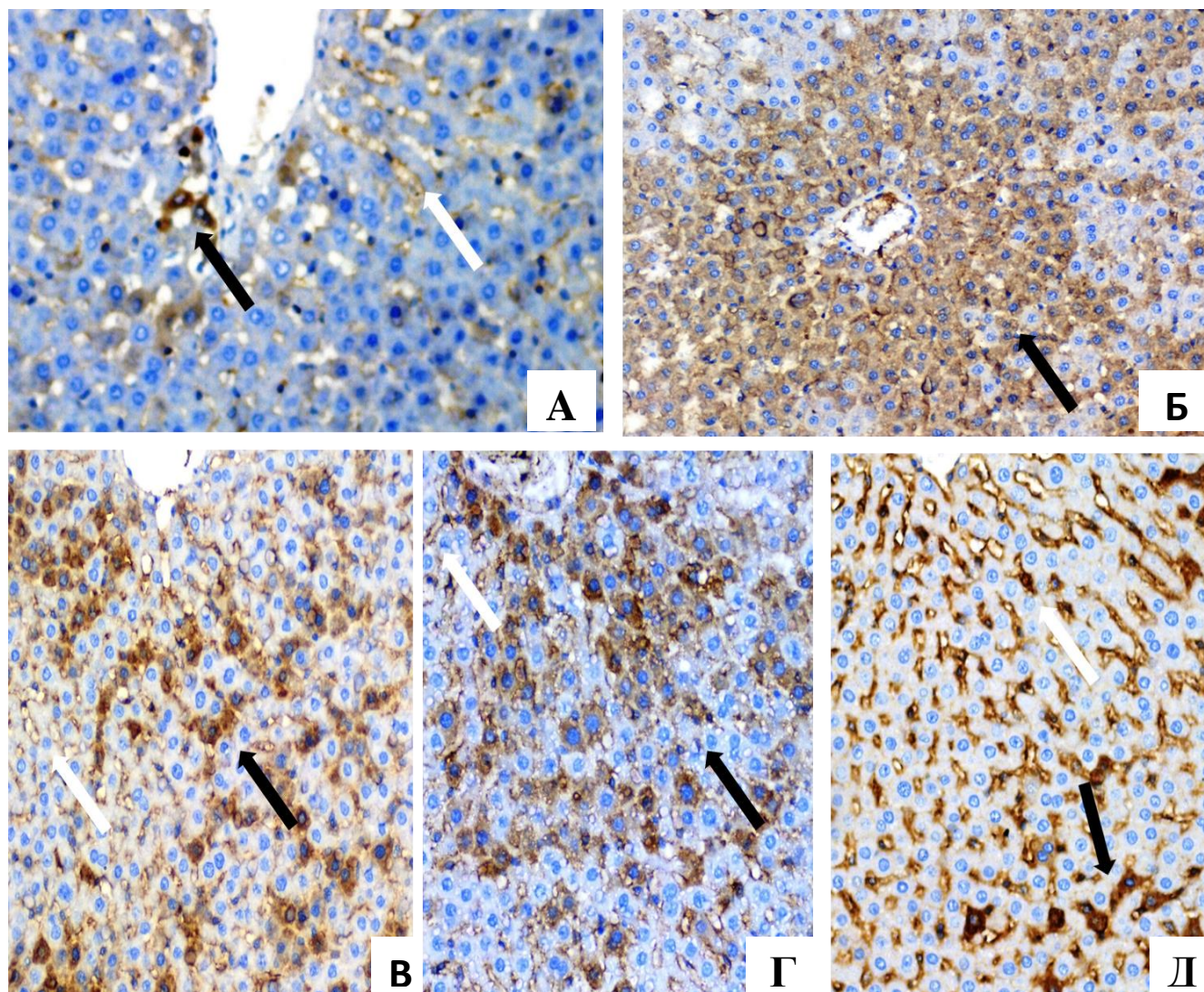


**Фигура 34.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху апоптотичния маркер ВАХ в черен дроб; \*\*\* $p < 0.001$  спрямо контролната група (К), ### $p < 0.001$  спрямо ВКД група

### 6.5.2. Експресия на BCL-2 в черен дроб

Експресия на BCL-2 в чернодробния паренхим на контролната група се открива предимно в синусоиди и в отделни хепатоцити (Фигури 35 и 36, Таблица 23). Според

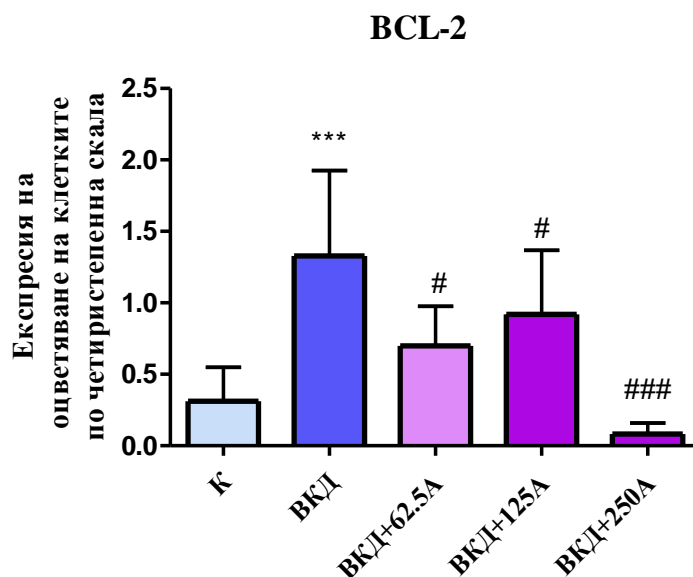
One-way ANOVA антиапоптоичният протеин BCL-2 е значимо повишен ( $p < 0,001$  спрямо контролата) в група ВКД, като се експресира предимно в хепатоцитите. Приложението на анетол намалява експресията на BCL-2 в сравнение с ВКД: при групи ВКД+62.5А и ВКД+125А със значимост  $p < 0.05$  и при ВКД+250А –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



**Фигура 35.** Експресия на антиапоптоичния маркер BCL-2 в черен дроб при плъхове на висококалорична диета (панел Б), третирани с анетол в дози 62.5 mg/kg в панел В (ВКД+62.5А), 125 mg/kg в панел Г (ВКД+125А) и 250 mg/kg в панел Д (ВКД+250А); контролна група (панел А); бяла стрелка – синусоидални клетки, черна стрелка – хепатоцити; увеличение x 200

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

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



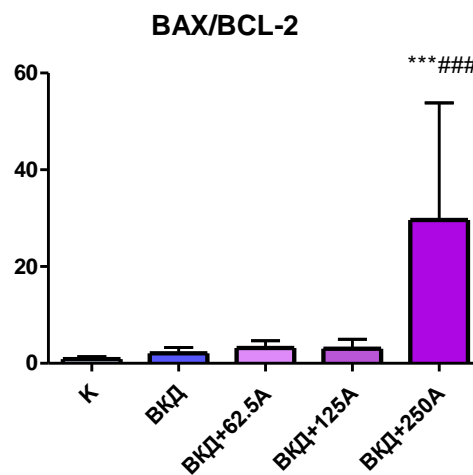
**Фигура 36.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху антиапоптоичния маркер BCL-2 в черен дроб; \*\*\* $p$ <0.001 спрямо контролната група (К); # $p$ <0.05, ### $p$ <0.001 спрямо ВКД група

### 6.5.3. Съотношение ВАХ/ВСL-2

Dunnet's multiple comparison post-hoc test не показва значимо повишаване на съотношението ВАХ/ВСL-2 в група ВКД. Няма значими разлики в съотношението ВАХ/ВСL-2 между анетол-третираните групи, с изключение на групата с ВКД+250А, за която съотношението е значимо повишено ( $p < 0,001$ ) в сравнение както с контролната, така и с ВКД групата (Таблица 24 и Фигура 37).

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

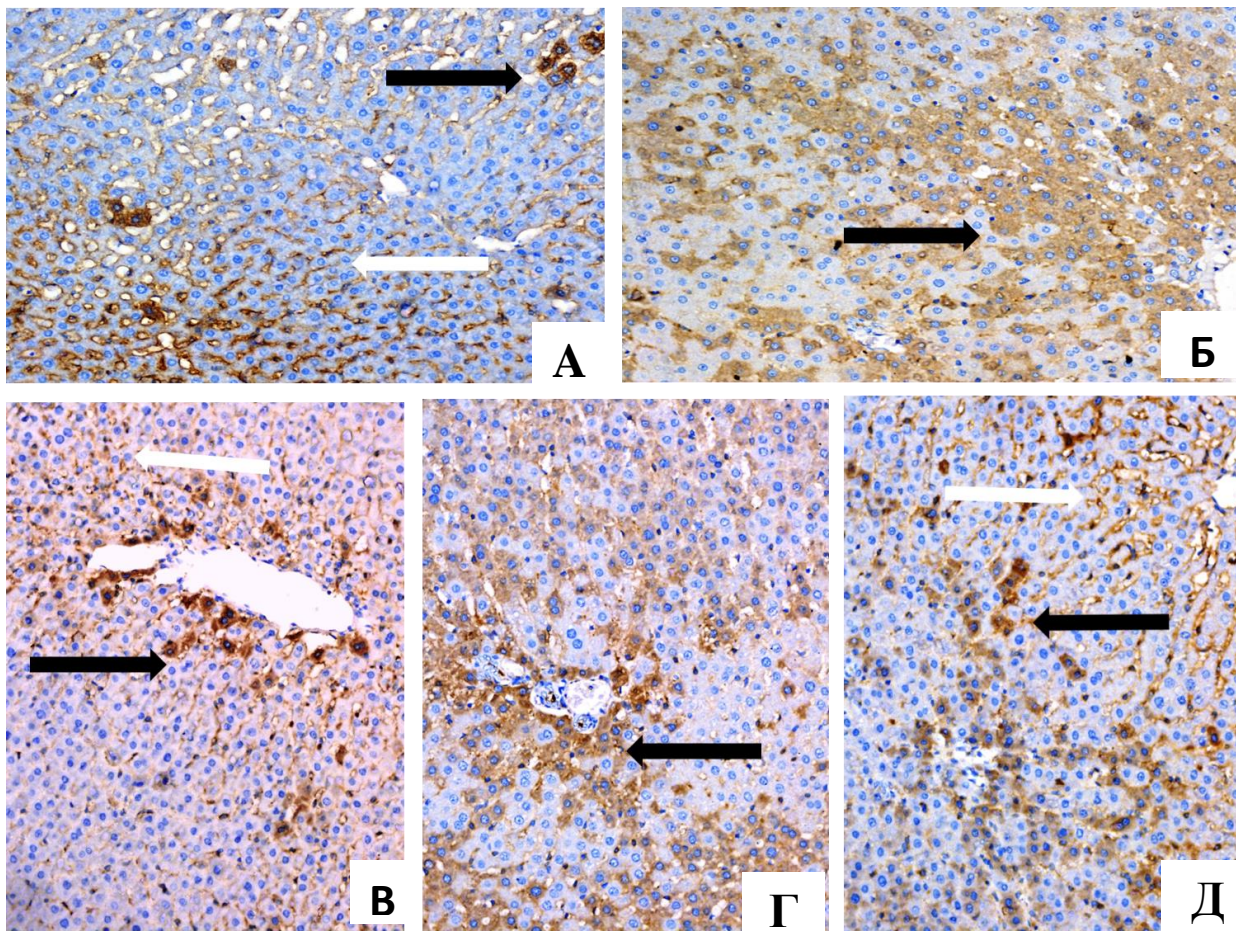
Показател	К	ВКД	ВКД+62.5А	ВКД+125А	ВКД+250А
Съотношение ВАХ /ВСL-2	0.86 $\pm$ 0.20	2.10 $\pm$ 0.45	3.16 $\pm$ 0.69	3.00 $\pm$ 0.56	29.62 $\pm$ 6.72 ***###



**Фигура 37.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху съотношение ВАХ /ВСL-2 в черен дроб; \* $p < 0.05$  спрямо контролната група; ### $p < 0.001$  спрямо ВКД група

#### 6.5.4. Експресия на МАС387

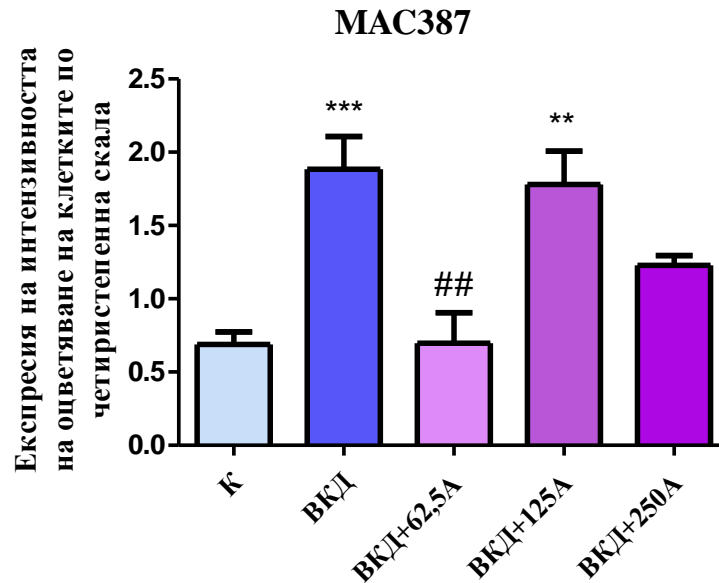
Както е показано на Таблица 25 и Фигури 38 и 39, МАС387 в контролната група се експресира в синусоидални клетки (бяла стрелка) и в отделни хепатоцити (черна стрелка). Висококалоричната диета индуцира повишаване експресията на МАС387 спрямо контролата ( $p < 0.001$ ). Третирането с анетол в дози 62.5 mg/kg предотвратява индуцираните промени ( $p < 0.01$ ), като маркерът се експресира в синусоидални клетки и единични хепатоцити. Стойностите на високата доза на анетол 250 mg/kg остават близки до тези на контролата с експресия на маркера в синусоидални клетки и хепатоцити.



**Фигура 38.** Експресия на провъзпалителния маркер МАС387 в черен дроб при плъхове на висококалорична диета (панел Б), третирани с анетол в дози 62.5 mg/kg в панел В (ВКД+62.5А), 125 mg/kg в панел Г (ВКД+125А) и 250 mg/kg в панел Д (ВКД+250А); контролна група (панел А); бяла стрелка – синусоидални клетки, черна стрелка – хепатоцити

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

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



**Фигура 39.** Ефект на анетол (А), прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху експресия на MAC387 в черен дроб; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  спрямо контролната група (К); ## $p < 0.01$  спрямо ВКД

### 6.6. Обсъждане

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

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

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

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

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

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

Нивата на AST, ALT и AP в кръвта са значимо намалени ( $p \leq .05$ ) при плъхове на високомастна диета, допълнена с анетол 20 mg/kg (Noreen et al., 2023). Транс-анетолът повлиява чернодробното увреждане, предизвикано от CCl<sub>4</sub>, като намалява активността на AST, ALT и AP в дози от 160 mg/kg телесно тегло. Този ефект се наблюдава при 4-седмично третиране (Pandit et al., 2022). Претретирането с хидроалкохолен екстракт от семена на *Foeniculum vulgare* (копър) понижава нивата на ALT, AL и AST в серума на зайци при парацетамол-индуцирана хепатотоксичност (Nazir et al., 2020).

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

### **7.1. Резултати**

Резултатите по отношение на обема на отока на задна лапа на експерименталните животни са представени в **Таблицы 26 и 27** и **Фигура 40**.

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

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

Група	Обем на отока на 30-та минута	Обем на отока на 1-ви час	Обем на отока на 2-ри час	Обем на отока на 3ти час	Обем на отока на 4-ти час	Обем на отока на 5ти час
<b>ВКД</b>	0.16 $\pm$ 0.05	0,21 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.03	0.72 $\pm$ 0.04	0.84 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.04
<b>ВКД+62.5А</b>	0.11 $\pm$ 0.03	0,20 $\pm$ 0.05	0.34 $\pm$ 0.06	0.70 $\pm$ 0.04	0.84 $\pm$ 0.05	0.90 $\pm$ 0.06
<b>ВКД+125А</b>	0.20 $\pm$ 0.03	0,22 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.14	0.69 $\pm$ 0.06	0.83 $\pm$ 0.07	0.97 $\pm$ 0.06
<b>ВКД+250А</b>	0.15 $\pm$ 0.05	0,23 $\pm$ 0.05	0.35 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.05	0.76 $\pm$ 0.06	0.79 $\pm$ 0.05

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

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

### 7.1. Обсъждане

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

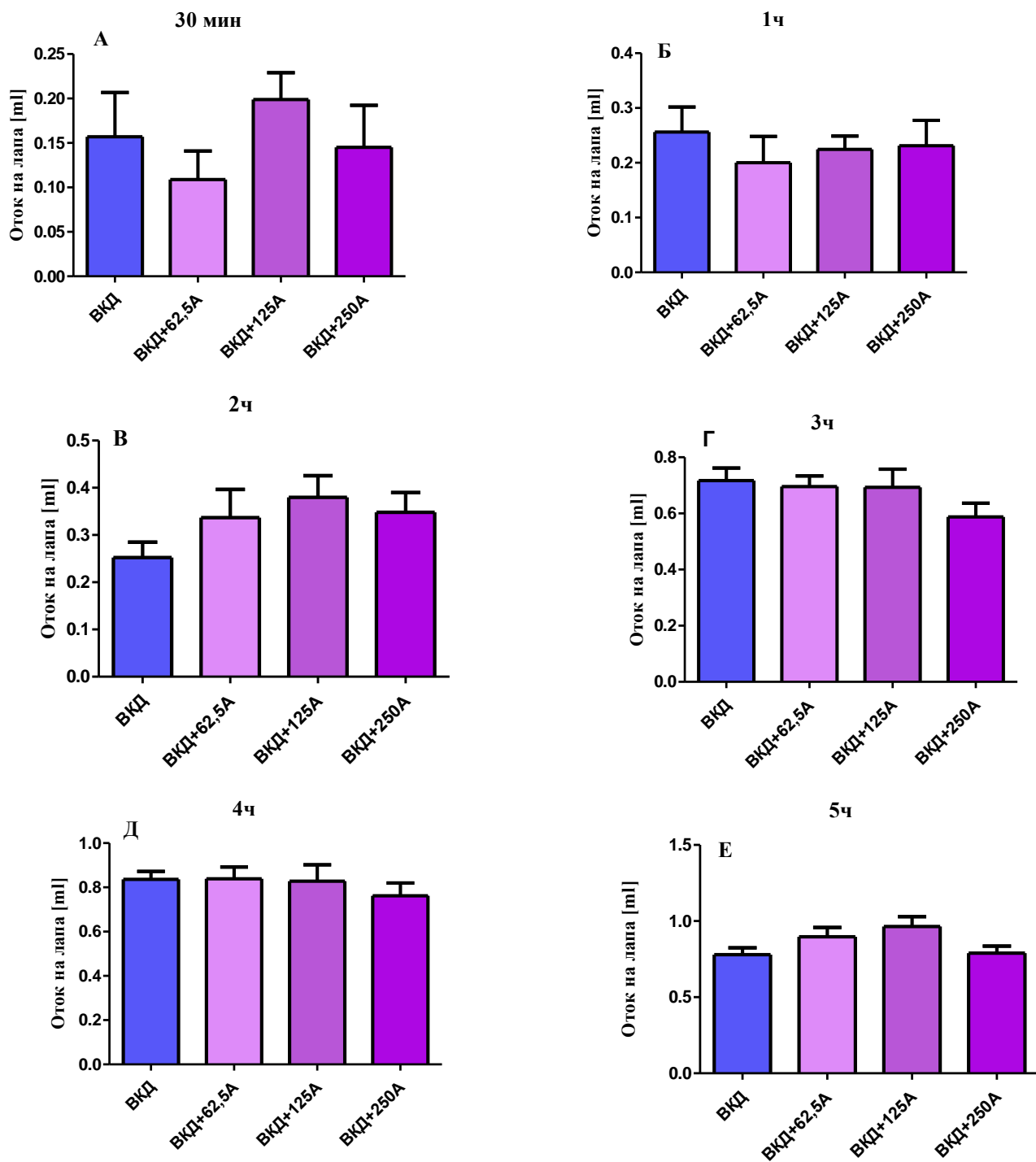
Неутрофилите претърпяват миграция и агрегация на мястото на възпалението, като част от забавения възпалителен отговор. По време на този процес неутрофилите освобождават реактивни кислородни видове, протеолитични ензими и други медиатори.

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

Редица проучвания доказват противовъзпалителния ефект на анетол. Анетолът води до намаляване на количеството провъзпалителни макрофаги и неутрофили, както и на провъзпалителните медиатори (Marinov and Valcheva-Kuzmanova, 2015). Освен това, изследване на анетол при модел на болка показва намаляване на освобождаването на възпалителни медиатори (Alessandra et al., 2014.). Установено е, че анетолът притежава инхибиращи свойства по отношение на генерирането на NO и PGE2, които участват в регулирането на неимунни остри възпалителни заболявания. Намалени са обемът на плевралния ексудат и броят на левкоцитите (Domiciano et al., 2015). Модулира възпалителните цитокини (TNF-alpha, IL-6, IL-1 beta), ядрения фактор kappa B (NF-kappa B) и апоптотичното състояние в мозъчния хомогенат и серум. Анетолът намалява експресията на аквапорин 1 (AQP1) и стимулира активността на протеин киназа A (PKA). Сигнален път, свързан със синовиоцитите, който ефективно потиска клетъчното възпаление и смърт в модел на възпаление, предизвикано от H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Huang et al., 2024). Въпреки факта, че тези ефекти безспорно се предизвикват от анетол, възможно е те да се предизвикват от фармакологично активни чернодробни метаболити на самото вещество (Domiciano et al., 2013). Анетолът оказва противовъзпалително действие при перидонтит чрез потискане на провъзпалителните молекули, включително IL-1β и TNF-α, като този ефект е сравним с ефектите, наблюдавани при кетопрофен. (Moradi et al., 2014).

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

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



**Фигура 40.** Ефект на анетол, прилаган при плъхове на висококалорична диета (ВКД) в дози 62.5 mg/kg (ВКД+62.5А), 125 mg/kg (ВКД+125А) и 250 mg/kg (ВКД+250А), върху карагенан-индуциран оток на 30-та мин (А), 1-ви час (Б), 2-ри час (В), 3-ти час (Г), 4-ти час (Д) и 5-ти час (Е)

## VI. ИЗВОДИ

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

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



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

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

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

2.7.1.4. Експресията на MAC387 не е променена от анетола.

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

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

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

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

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

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

## VI. ПРИНОСИ

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

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

### Списък на публикациите:

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

### Списък на участията:

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

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

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

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

Награди от Конференции:

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

## IX. БИБЛИОГРАФИЯ

- (1) Aazza S, Lyoussi B, Miguel MG. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules*. 2011;16(9):7672-7690.
- (2) Abbasi-Maleki S, Maleki S. Antidepressant-like effects of foeniculum vulgare essential oil and potential involvement of dopaminergic and serotonergic systems on mice in the forced swim test. *PharmaNutrition*. 2021;15:100241.
- (3) Abdullah M, El-Desouky M, Matboly MA, Elhakim H, Mahran N. Anti-inflammatory Influence of Trans-anethole on the cardiac regenerative capacity in myocardial ischemia/reperfusion injuries. *Egyptian Journal of Chemistry*. 2024; 67(3): 309-321.
- (4) Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, Kipnis V, Mouw T, Ballard-Barbash R, Hollenbeck A, Leitzmann MF. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med*. 2006 ;355(8):763-78.
- (5) Adult Obesity Prevalence Increased During the First Year of the COVID-19 Pandemic. U.S. Department of Agriculture. Economic Research Service. Accessed 12/20/2022.
- (6) Adult obesity prevalence increased during the first year of the COVID-19 pandemic. 2022. Available online : <https://www.ers.usda.gov/amber-waves/2022/july/adult-obesity-prevalence-increased-during-the-first-year-of-the-covid-19-pandemic/>
- (7) Afiat M, Amini E, Ghazanfarpour M, Nouri B, Mousavi MS, Babakhanian M, Rakhshandeh H. The effect of short-term treatment with fennel on lipid profile in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Journal of menopausal medicine*. 2018;24(1):29–33.
- (8) Al-Amoudi WM. Protective effects of fennel oil extract against sodium valproate-induced hepatorenal damage in albino rats. *Saudi J Biol Sci*. 2017;24(4):915-924.
- (9) Albaugh VL, Abumrad NN. Surgical treatment of obesity. *F1000Res*. 2018;7:F1000 Faculty Rev-617. PMID: 29904577.
- (10) Albuquerque AA, Sorenson AL, Leal-Cardoso JH. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. *J. Ethnopharmacol*. 1995;49:41–49.
- (11) Al-Dalaeen A, Al-Domi H. Does obesity put your brain at risk? *Diabetes Metab Syndr*. 2022;16(3):102444.
- (12) Alessandra M, Fernando O, Franciele Q, Rubia M. Effect of anethole in nociception experimental models. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. 2014;345829:7.
- (13) Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., Abu-Zaitoun, et al. Biological properties and bioactive components of mentha spicata L. essential oil: Focus on potential benefits in the treatment of obesity, alzheimer's disease, dermatophytosis, and drug-resistant infections. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2019.
- (14) American Heart Association. Overweight and Obesity Statistics—2009 Update. Dallas, Tex, USA: American Heart Association; 2009.



- (15) Ames F, Bracht L, Schneider L, et al. Anti-inflammatory effect of low-dose anethole and ibuprofen combination is accompanied by partial prevention of hepatic metabolic changes in arthritic rats. *Inflammation*. 2020; 43:1680–1691.
- (16) Ames, BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis* 2001;475(1-2):7-20.
- (17) Anam M, Maharjan S, Amjad Z, Abaza A, Vasavada AM, Sadhu A, Valencia C, Fatima H, Nwankwo I. Efficacy of Semaglutide in Treating Obesity: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials (RCTs). *Cureus*. 2022;16;14(12):e32610.
- (18) Anam M, Maharjan S, Amjad Z, Abaza A, Vasavada AM, Sadhu A, Valencia C, Fatima H, Nwankwo I. Efficacy of Semaglutide in Treating Obesity: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials (RCTs). *Cureus*. 2022;14(12):e32610.
- (19) Aneja A, El-Atat F, McFarlane SI, Sowers JR. Hypertension and obesity. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:169-205.
- (20) Anjos JC, Aguiar FLN, Sá NAR, et al. Anethole improves blastocysts rates together with antioxidant capacity when added during bovine embryo culture rather than in the in vitro maturation medium. *Zygote*. 2019;27(6):382-385.
- (21) Ayoughi, F, Sahari MA, Naghdibadi H. Chemical compositions of Essential oils of *Artemisiadracunculus L.* and an Evaluation of their Antioxidative Effects. *Agricultural. Sci. Tech*. 2011;13: 79-88.
- (22) Aziz R, Sherwani AY, Al Mahri S, Malik SS, Mohammad S. Why Are Obese People Predisposed to Severe Disease in Viral Respiratory Infections? *Obesities*. 2023; 3(1):46-58.
- (23) Bae, JiYoung et al. Fennel (*Foeniculum vulgare*) and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) tea drinking suppresses subjective shortterm appetite in overweight women. *Clinical nutrition research*. 2015; 4(3):168-74.
- (24) Bahari N, Mahmoudi F, Haghghat K, Khazali, H. The Effects of trans-anethole on the hypothalamic cgrp and crh gene expression in rat model of stress. *Archives of Advances in Biosciences*. 2023;14(1), 1–7.
- (25) Bahary N, Leibel RL, Joseph L, Friedman JM. Molecular mapping of the mouse db mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(21):8642-8646.
- (26) Bakaloudi DR et al. Impact of the first COVID-19 lockdown on body weight: A combined systematic review and a meta-analysis. *Clin Nutr*. 2022;41(12): 3046–3054.
- (27) Barber TM, Hanson P, Weickert MO, Franks S. Obesity and Polycystic Ovary Syndrome: Implications for Pathogenesis and Novel Management Strategies. *Clin Med Insights Reprod Health*. 2019;13:1179558119874042.
- (28) Barrett P, Mercer JG, Morgan PJ. Preclinical models for obesity research. *Disease models & mechanisms*, 2016;9(11):1245–1255.
- (29) Belovicova K, Bogi E, Csatlosova K, Dubovicky M. Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdiscip Toxicol*. 2017; 10(1):40-43.

- (30) Berge C, Heyne, HO, Heiland T, Dommel S, Höfling C, Guiu-Jurado E, Lorenz J, Roßner S, Dannemann M, Kelso J, Kovacs P, Blüher M, Klöting N. A novel compound heterozygous leptin receptor mutation causes more severe obesity than in *Lepr<sup>db/db</sup>* mice. *Journal of lipid research*. 2021;62, 100105.
- (31) Berk M, Kapczynski F, Andreazza A et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: Focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(3):804–17.
- (32) Bertola A, Bonnafous S, Anty R, Patouraux S, Saint-Paul MC, Iannelli A, Gugenheim J, Barr J, Mato JM, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Gual P. Hepatic expression patterns of inflammatory and immune response genes associated with obesity and NASH in morbidly obese patients. *PLoS One*. 2010;5(10):e13577.
- (33) Blundell J, Finlayson G, Axelsen M, Flint A, Gibbons C, Kvist T, Hjerpsted JB. Effects of once-weekly semaglutide on appetite, energy intake, control of eating, food preference and body weight in subjects with obesity. *Diabetes Obes Metab*. 2017;19(9):1242-1251.
- (34) Blundell J, Finlayson G, Axelsen M, Flint A, Gibbons C, Kvist T, Hjerpsted JB. Effects of once-weekly semaglutide on appetite, energy intake, control of eating, food preference and body weight in subjects with obesity. *Diabetes Obes Metab*. 2017;19(9):1242-1251.
- (35) Bode B. Liraglutide: a review of the first once-daily GLP-1 receptor agonist. *Am J Manag Care*. 2011;17(2 Suppl):S59-70. PMID: 21517658.
- (36) Bovera F, Moniello G, de Riu N, Di Meo C, Pinna W, Nizza A. Effect of diet on the metabolic profile of ostriches (*Struthio camelus* var. *domesticus*). *Trop. Anim. Health Prod*. 2007;39:265–270.
- (37) Bray GA, Gallagher TF: Manifestations of hypothalamic obesity in man: a comprehensive investigation of eight patients and a review of the literature. *Medicine* 1975; 54: 301–33.
- (38) Bray GA, Purnell JQ. An Historical Review of Steps and Missteps in the Discovery of Anti-Obesity Drugs. 2022 In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, New M, Purnell J, Sahay R, Shah AS, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trencle DL, Wilson DP, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText. 2000; PMID: 35834619.
- (39) Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "Obesity". *Encyclopedia Britannica*. 2024. Available online : <https://www.britannica.com/science/obesity>.
- (40) Britannica. The Editors of Encyclopaedia. "Obesity". *Encyclopedia Britannica*, 2024, <https://www.britannica.com/science/obesity>. Accessed 14 April 2024.
- (41) Buyukdere Y, Gulec A, Akyol A. Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats. *PeerJ*. 2019.

- (42) Canbay A, Feldstein A, Baskin-Bey E, Bronk SF, Gores GJ. The caspase inhibitor IDN-6556 attenuates hepatic injury and fibrosis in the bile duct ligated mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308(3):1191-6. PMID: 14617689.
- (43) Carrillo E, Ramírez-Rivera S, Bernal G, Aquea G, Tessini C, Thomet FA. Water-soluble Ru(II)-anethole compounds with promising cytotoxicity toward the human gastric cancer cell line AGS. *Life Sci.* 2019;217:193-201
- (44) Castelnuovo G, Pietrabissa G, Manzoni GM, Cattivelli R, Rossi A, Novelli M, Varallo G, Molinari E. Cognitive behavioral therapy to aid weight loss in obese patients: current perspectives. *Psychol Res Behav Manag.* 2017;10:165-173. PMID: 28652832.
- (45) Castro HT, Martínez JR, Stashenko E. anethole isomerization and dimerization induced by acid sites or uv irradiation. *molecules.* 2010; 15(7):5012-5030.
- (46) Ceriello A. Postprandial hyperglycemia and diabetes complications: is it time to treat? *Diabetes.* 2005;54 :1-7.
- (47) Chainy GB, Manna SK, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF- $\kappa$ B, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. *Oncogene.*; 2000;19(25):2943-2950.
- (48) Chang et al. Weight gain associated with COVID-19 lockdown in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* 2021;13(10): 3668.
- (49) Chang W, An J, Seol GH, Han SH, Yee J, Min SS. Trans-anethole alleviates trimethyltin chloride-induced impairments in long-term potentiation. *Pharmaceutics.* 2022;14(7):1422.
- (50) Charlotte F, L'Herminé A, Martin N, et al. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *Am J Pathol.* 1994;144(3):460-465.
- (51) Chen X, Xiao Z, Cai Y, Huang L, Chen C. Hypothalamic mechanisms of obesity-associated disturbance of hypothalamic-pituitary-ovarian axis. *Trends Endocrinol Metab.* 2022;33(3):206-217.
- (52) Cho S, Choi Y, Park S, et al. Carvacrol prevents diet-induced obesity by modulating gene expressions involved in adipogenesis and inflammation in mice fed with high-fat diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 2012;23 (2): 192-201.
- (53) Choi E, Hwang J, Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia.* 2004;75(6): 557-565.
- (54) Chouksey D, Upmanyu N, Pawar RS. Central nervous system activity of illicium verum fruit extracts. *Asian Pac J Trop Med .* 2013;6(11):869–75.
- (55) Clement K, Vaisse C, Lahlou N, et al.: A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature.* 1998; 392: 398–401.
- (56) Coelho-de-Souza A, Rocha M, Oliveira K et al. Volatile oil of *Croton zehntneri* per oral sub-acute treatment offers small toxicity: perspective of therapeutic use. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2019. 29, 228–233.

- (57) Contant C, Rouabhia M, Loubaki L, Chandad F, Semlali A. Anethole induces anti-oral cancer activity by triggering apoptosis, autophagy and oxidative stress and by modulation of multiple signaling pathways. *Sci Rep.* 2021; 11(1):13087.
- (58) Craig, W. J. Health-promoting properties of common herbs. *American Journal of Clinical Nutrition.* 1999; 70 (suppl), 491-499.
- (59) Crusio W. Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. *Behav Brain Res.* 2001;125(1-2):127–132.
- (60) Cuzzocrea S, Zingarelli B, Hake P, Salzman A.L, Szabo C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan-induced models of inflammation. *Free Radical Biology and Medicine.* 1998;24(3):450-459.
- (61) da Rocha B, Ritter A, Ames F, Gonçalves O, Leimann F, Bracht L, Natali M, Cuman R, BersaniAmado C, Acetaminophen-induced hepatotoxicity: Preventive effect of trans anethole. *Biomed Pharmacother.* 2017;86, 213-220.
- (62) Daneshgari F, Liu G, Hanna-Mitchell AT. Path of translational discovery of urological complications of obesity and diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;312(5):F887-F896.
- (63) de Alvarenga, JFR, Genaro B, Costa, B.L, et al. Monoterpenes: Current knowledge on knowledge food source, metabolism, and health effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2021: 1–38.
- (64) De Jong PE, Verhave JC, Pinto-Sietsma SJ, Hillege HL. Obesity and target organ damage: the kidney. *International Journal of Obesity.* 2002;26(4), S21-S24.
- (65) de Siqueira R.J.B, Magalhães PJC, Leal-Cardoso JH, Duarte GP, Lahlou S. Cardiovascular effects of the essential oil of *Croton zehntneri* leaves and its main constituents, anethole and estragole, in normotensive conscious rats. *Life Sci.* 2006;78,2365–2372.
- (66) Derosa G, Maffioli P. Anti-obesity drugs: A review about their effects and their safety. *Expert Opin. Drug Saf.* 2012;11:459–471.
- (67) Dhingra D, Sudha. Antidepressant-like activity of trans-anethole in unstressed mice and stressed mice. *Asian J Pharm Clin Res.* 2019;12 (12): 121-127.
- (68) Diabetes control and complications trial research group, Nathan DM, Genuth S, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993;329(14):977-986.
- (69) Dikme TG. Use of medicinal and aromatic plants in food. *Eu Clin Anal Med* 2023;11(1):6-10.
- (70) Domiciano TP, Dalalio MM, Silva EL, Ritter AM, Estevão-Silva CF, Ramos FS, Caparroz-Assef SM, Cuman RK, Bersani-Amado CA. Inhibitory effect of anethole in nonimmune acute inflammation. *Arch. Pharmacol.* 2013;386(4):331–338.

- (71) Elkady AI. Anethole inhibits the proliferation of human prostate cancer cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis. *Anticancer Agents Med. Chem.* 2018;18:216–236.
- (72) Emami SR, Jafari M, Haghshenas R, Ravasi A. Impact of eight weeks endurance training on biochemical parameters and obesity-induced oxidative stress in high fat diet-fed rats. *J Exerc Nutrition Biochem.* 2016;20(1):29-35.
- (73) Endocrine Society, 2020. Plastics, EDCs & Health. Endocrine Society (ed. Flaws et al), Endocrine Society (USA), Washington DC.
- (74) Engelmann G. Biomarkers in focus: alanine aminotransferase. biomarkers in liver disease. *Biomarkers in Disease.* 2017;267-280.
- (75) Esteghamati A, Mazaheri T, Vahidi Rad M, Noshad, S. Complementary and alternative medicine for the treatment of obesity: a critical review. *International journal of endocrinology and metabolism.* 2015;13(2): e19678.
- (76) Esteghamati A, Mazaheri T, Vahidi Rad M, Noshad S. Complementary and alternative medicine for the treatment of obesity: a critical review. *International journal of endocrinology and metabolism.* 2015;13(2): e19678.
- (77) Even PC, Gehring J, Tomé D . What does self-selection of dietary proteins in rats tell us about protein requirements and body weight control?. 2021; 22: e13194.
- (78) File S, Hyde JRG. Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol.* 1978;62(1):19–24.
- (79) Flutterm M, Dalm S, Oitzl MS. A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats. *Lab Anim.* 2000;34(4):372-8.
- (80) Fobi MA. Surgical treatment of obesity: a review. *J Natl Med Assoc.* 2004;96(1):61-75.
- (81) Frayn K. Adipose Tissue and the insulin resistance syndrome. Proceedings of the nutrition society. 2001. 60,375-380
- (82) Fryer LGD, Carling D. AMP-activated protein kinase and the metabolic syndrome. *Biochem. Soc. Trans.* 2005;33, 362–366.
- (83) Fulton S, Décarie-Spain L, Fioramonti X, Guiard B, Nakajima S. The menace of obesity to depression and anxiety prevalence. *Trends Endocrinol Metab.* 2022;33(1):18-35.
- (84) Gancheva S, Galunska B, Zhleyazkova-Savova M. Osteocalcin in a rat model of metabolic syndrome. *Adipobiology.* 2015a;7:31-36.
- (85) Gancheva S, Zhelyazkova-Savova M, Galunska B, Chervenkov T. Experimental models of metabolic syndrome in rats. *Scr Sci Med.* 2015b;47(2):14-21.
- (86) Garvey WT. Phentermine and topiramate extended-release: a new treatment for obesity and its role in a complications-centric approach to obesity medical management. *Expert Opin Drug Saf.* 2013. PMID: 23738843;
- (87) Ghazanfarpour M, Mohammadzadeh F, Shokrollahi P. Effect of foeniculum vulgare (fennel) on symptoms of depression and anxiety in postmenopausal women: A double-blind randomised controlled trial. *J Obstet Gynaecol.* 2017;38(1):121–6.

- (88) Ghinny DA, Alsafi MY, Al-Bashir RM, et al. Investigation of anti-obesity activity of ethanolic extract of *Foeniculum vulgare* seeds, in vivo and in silico model. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2019;8 (11):111.
- (89) Ghobadi-Azbari P, Jamil A, Yavari F, Esmailpour Z, Malmir N, MahdaviFar-Khayati R, Soleimani G, Cha YH, Shereen AD, Nitsche MA, Bikson M, Ekhtiari H. fMRI and transcranial electrical stimulation (tES): a systematic review of parameter space and outcomes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2021;107:110149. PMID: 33096158.
- (90) Gong R, Jiang Z, Zagidullin N, Liu T, Cai B. Regulation of cardiomyocyte fate plasticity: a key strategy for cardiac regeneration. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):31. PMID: 33500391.
- (91) Gortmaker SL, Must A, Sobol AM, et al. Television viewing as a cause of increasing obesity among children in the United States, 1986–1990. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1996;150(4):356–62.
- (92) Grant H, Zhang Y, Li L, Wang Y, Kawamoto S, et al. Larger organ size caused by obesity is a mechanism for higher cancer risk. 2023.
- (93) Grau M., et al. Pharmacology of the potent new non-steroidal anti-inflammatory agent aceclofenac. *Arzneimittelforschung*. 1991;41.12: 1265-76.
- (94) Guan L, Gong D, Yang S, et al. Genipin ameliorates diet-induced obesity via promoting lipid mobilization and browning of white adipose tissue in rats. *Phytother. Res. PTR*. 2018;32,:723–732.
- (95) Guest PC, Rahmoune H. Characterization of the db/db Mouse Model of Type 2 Diabetes. *Methods Mol Biol*. 2019;1916:195-201.
- (96) Habtemariam S. Antidiabetic Potential of monoterpenes: a case of small molecules punching above their weight. *Int. J. Mol. Sci*. 2017; 19: 4.
- (97) Hales CM, Carroll MD, Fryar CD, Ogden CL. Prevalence of obesity and severe obesity among adults: United States, 2017–2018. NCHS Data Brief, no 360. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. 2020.
- (98) Hall JE. The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension*. 2003;41(3Pt2):625–633.
- (99) Haque MR, Ansari HS. Anti-obesity effect of Arq Zeera and its main components thymol and cuminaldehyde in high fat diet induced obese rats. *Drug. Res*. 2018; 68: 637–647.
- (100) Haque MR, Ansari SH, Najmi AK, et al. Monoterpene phenolic compound thymol prevents high fat diet induced obesity in murine model. *Toxicol Mech Methods*. 2014;24 (2):116-23.
- (101) Hardie D. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int J Obes*. 2008;32 (4): S7–S12.
- (102) Hassanzadeh SA, Abbasi-Maleki S, Mousavi Z. Anti-depressive-like effect of monoterpene trans-anethole via monoaminergic pathways. *Saudi J Biol Sci*. 2022;29(5):3255–3261.

- (103) Hassapidou M, Vlassopoulos A, Kalliostra M, Govers E, Mulrooney H, Ells L, Salas XR, Muscogiuri G, Darleska TH, Busetto L, Yumuk VD, Dicker D, Halford J, Woodward E, Douglas P, Brown J, Brown T. European Association for the study of obesity position statement on medical nutrition therapy for the management of overweight and obesity in adults developed in collaboration with the European Federation of the Associations of Dietitians. *Obes Facts*. 2023;16(1):11-28.
- (104) Hebebrand J, Hinney A. Environmental and genetic risk factors in obesity, child and adolescent psychiatric clinics of north america. 2009; 18, (1): 83-94
- (105) Hegazi N, Tantawy M, Emam M, et al. Headspace gas chromatography/mass spectrometry analysis endorses melaleuca species as abundant source of medicinal eucalyptol and its proposed anti-obesity activity. *Egyptian Journal of Chemistry*. 2022;65 (1): 607-618.
- (106) Heianza Y, Qi L. Chapter 14 - Genetics of Central Obesity and Body Fat, Editor(s): Ronald Ross Watson, Nutrition in the Prevention and Treatment of Abdominal Obesity (Second Edition), Academic Press. 2019:153-174.
- (107) Helal E, Abdelaziz M, Ahmed SS. Effect of Anise (*Pimpinella Anisum* L.) as Phytoestrogen on Some Sex Hormones and Biochemical Parameters. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 2019;75:1918-1922.
- (108) Heyward FD, Gilliam D, Coleman MA, Gavin CF, Wang J, Kaas G, Trieu R, Lewis J, Moulden J, Sweatt JD. Obesity weighs down memory through a mechanism involving the neuroepigenetic dysregulation of sirt1. *J Neurosci*. 2016;27;36(4):1324-1335.
- (109) Higgins GA, Fletcher PJ, Shanahan WR. Lorcaserin: A review of its preclinical and clinical pharmacology and therapeutic potential. *Pharmacol Ther*. 2020;205:107417.
- (110) Higuchi M, Dusting GJ, Peshavariya H, Jiang F, Hsiao ST, Chan EC, Liu GS. Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and Forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem Cells Dev*. 2013;22(6):878-88.
- (111) Hjelholt A, Høgild M, Bak AM, Arlien-Søborg MC, Bæk A, Jessen N, Richelsen B, Pedersen SB, Møller N, Lunde Jørgensen JO. Growth Hormone and Obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2020;49(2):239-250.
- (112) Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(16):6961-6965.
- (113) Hong S-I, Kim M-J, You I-J, Kwon S-H, Ma S-X, Hwang J-Y, Seo J-Y, Ko Y-H, Lee B R, Lee S-Y, Jang C-G. Phentermine induces conditioned rewarding effects via activation of the PI3K/Akt signaling pathway in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology*. 2016; 233(8), 1405+

- (114) Hossein N, Zahra Z, Abolfazl M, Mahdi S, Ali K. Effect of Cinnamon zeylanicum essence and distillate on the clotting time. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2013;7(19):1339-1343.
- (115) Hosseinzadeh Z, P. Farhoomand The effects of *Artemisia dracuncululus*' powders different levels on blood parameters and internal organs weight broiler chickens. *Inter. J. Adv. Biol. Biomed. Res.* 2014;2:661-668.
- (116) <http://en.wikipedia.org/wiki/Anethole>
- (117) Hu FB, Willett WC, Li T, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE. Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *N Engl J Med*. 2004; 351(26):2694-703.
- (118) Huang T-L, Chang Y-C, Tsai BC-K, et al. Anethole mitigates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced inflammation in HIG-82 synoviocytes by suppressing the aquaporin 1 expression and activating the protein kinase A pathway. *Environmental Toxicology*. 2024; 39(2): 965-978.
- (119) Hur MH, Kim C, Kim CH, Ahn HC, Ahn HY. The effects of inhalation of essential oils on the body weight, food efficiency rate and serum leptin of growing SD rats. *Taehan Kanho Hakhoe Chi*. 2006; 36(2):236-43.
- (120) Imbabi T, Sabeq I, Osman A, Mahmoud K, Amer SA, Hassan AM, Kostomakhin N, Habashy W, Easa AA. Impact of Fennel Essential Oil as an Antibiotic alternative in rabbit diet on antioxidant enzymes levels, growth performance, and meat quality. *Antioxidants*. 2021; 10(11):1797.
- (121) James P. Nicolai, Junelle H. Lupiani, Andrew J. Wolf, Chapter 37 - An Integrative Approach to Obesity, Editor(s): David Rakel, Integrative Medicine (Fourth Edition), Elsevier, 2018, Pages 382-394
- (122) Janet M, Fatemeh A, Jalal Z. Anethole, a medicinal plant compound, decreases the production of pro-inflammatory TNF- $\alpha$  and IL-1s in a Rat Model of LPS-induced periodontitis. *Iran J Pharm Res*. 2014;13(4):1319-1325.
- (123) Ji Seyedd. induces apoptosis in fetal hepatocytes in culture. *Exp Toxicol Pathol*. 2005;56:369–376.
- (124) Jin S, Dai CL. Attenuation of reperfusion-induced hepatocyte apoptosis is associated with reversed bcl-2/bax ratio in hemi-hepatic artery-preserved portal occlusion. *J Surg Res*. 2012;174(2):298-304 .
- (125) Jing L, Zhang Y, Fan S, Gu M, Guan Y, Lu X, Huang C, Zhou Z. Preventive and ameliorating effects of citrus d-limonene on dyslipidemia and hyperglycemia in mice with high-fat diet-induced obesity. *Eur. J. Pharmacol*. 2013; 715 : 46-55.
- (126) Jordan J, Astrup A, Engeli S, Narkiewicz K, Day WW, Finer N. Cardiovascular effects of phentermine and topiramate: a new drug combination for the treatment of obesity. *J Hypertens*. 2014;32(6):1178-88.
- (127) Jurado JM, Alcázar A, Pablos F, Martín MJ. LC determination of anethole in aniseed drinks. *Chromatographia*. 2006;64:223–226.



- (128) Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ.* 2018;25(1):46-55.
- (129) Kang NH, Mukherjee S, Min T, Kang SC, Yun JW. Trans-anethole ameliorates obesity via induction of browning in white adipocytes and activation of brown adipocytes. *Biochimie.* 2018;151:1-13.
- (130) Kang P, Kim KY, Lee HS, Min SS, Seol GH. Anti-inflammatory effects of anethole in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Life Sci.* 2013;93(24):955-61
- (131) Karlsson C, Lindell K, Ottosson M, Sjöström L, Carlsson B, Carlsson LM. Human adipose tissue expresses angiotensinogen and enzymes required for its conversion to angiotensin II. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(11):3925-9.
- (132) Kazlauskaite JA, Matulyte I, Marksa M, et al. Nutmeg essential oil, red clover, and liquorice extracts microencapsulation method selection for the release of active compounds from gel tablets of different bases. *Pharmaceutics.* 2023;5 (3):949.
- (133) Kazmi T, Nagi LF, Iqbal SP, Razzaq S, Hassnain S, Khan S, Shahid N. Relationship Between Physical Inactivity and Obesity in the Urban Slums of Lahore. *Cureus.* 2022;14(4):e23719.
- (134) Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med.* 2002; 347(5):305-13.
- (135) Khanna D, Welch BS., Rehman A. Pathophysiology of Obesity. 2022. PMID:34283442.
- (136) Khatua B, El-Kurdi B, Singh VP. Obesity and pancreatitis. *Curr Opin Gastroenterol.* 2017;33(5):374-382.
- (137) Kim D, Touros A, Kim W, Nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Clin Liver Dis.* 2018;22(1):133-140.
- (138) Kim HG , Han J. Obesity and pancreatic diseases. *The Korean Journal of Gastroenterology.* 2012; 59, (1):35–39.
- (139) Kim JK, Lee Y.G, Han K et al. Obesity, metabolic health, and urological disorders in adults: a nationwide population-based study. *Sci Rep.* 2021;11: 8687.
- (140) Kim SJ, Kim KS, Shin SU, Choi YM, Kang BG, Yoon YS et al. A clinical study of decrease appetite effects by aromatherapy using foeniculum vulgare mill (fennel) to female obese patients. *J Korean Orient Assoc Stud Obes.* 2005;5:9–20.
- (141) Klein, S., Fontana, L., Young, V. L., Coggan, A. R., Kilo, C., Patterson, B. W., & Mohammed BS. Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2004 ;350:2549-2565.
- (142) Kluge R, Scherneck S, Schürmann A, Joost HG. Pathophysiology and genetics of obesity and diabetes in the New Zealand obese mouse: a model of the human metabolic syndrome. *Methods Mol Biol.* 2012;933:59-73.

- (143) Kohl KD, Pitman E, Robb BC et al. Monoterpenes as inhibitors of digestive enzymes and counter-adaptations in a specialist avian herbivore. *J Comp Physiol B*. 2015; 185:425–443.
- (144) Kojima K, Shimada T, Nagareda Y, et al. Preventive effect of geniposide on metabolic disease status in spontaneously obese type 2 diabetic mice and free fatty acid-treated HepG2 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2011;34:1613–1618.
- (145) Kong P, Chi R, Zhang L, et al. Effects of paeoniflorin on tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance and changes of adipokines in 3T3-L1 adipocytes. *Fitoterapia*. 2013; 91:44–50.
- (146) Kumar V, Venkateswarulu M. Anethole attenuates lung cancer progression by regulating the proliferation and apoptosis through AKT and STAT3 signaling. *STEMedicine*, 2023; 4(1).
- (147) Lakka TA, Lakka HM, Salonen R, Kaplan GA, Salonen JT. Abdominal obesity is associated with accelerated progression of carotid atherosclerosis in men. *Atherosclerosis*. 2001;154(2):497-504.
- (148) Lambert EA, Esler MD, Schlaich MP, Dixon J, Eikelis N, Lambert GW. Obesity-Associated Organ Damage and Sympathetic Nervous Activity. *Hypertension*. 2019;73(6):1150-1159.
- (149) Lauridsen BK, Stender S, Kristensen TS, Kofoed KF, Køber L, Nordestgaard BG, Tybjaerg-Hansen A. Liver fat content, non-alcoholic fatty liver disease, and ischaemic heart disease: Mendelian randomization and meta-analysis of 279 013 individuals. *Eur Heart J*. 2018; 39:385–393.
- (150) Lazzerini PE, Hamilton RM, Boutjdir M. Editorial: Cardioimmunology: Inflammation and immunity in cardiovascular disease. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:181. PMID: 31850376.
- (151) Lee YH, Mottilo EP, Granneman JG. Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between *Biochem. Biophys. Acta*. 2014;1842: 358-369.
- (152) Lei JD, Li Q, Zhang SB et al. Transcriptomic and biochemical analyses revealed antifungal mechanism of trans-anethole on *Aspergillus flavus* growth. *Appl Microbiol Biotechnol* . 2023;107:7213–7230.
- (153) Leiria LO, Sollon C, Calixto MC, Lintomen L, Mónica FZ, Anhê GF, De Nucci G, Zanesco A, Grant AD, Antunes E. Role of PKC and CaV1.2 in detrusor overactivity in a model of obesity associated with insulin resistance in mice. *PLoS One*. 2013;7:e48507.
- (154) Li D, Wu H, Dou H. Microcapsule of sweet orange essential oil changes gut microbiota in diet-induced obese rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018; 505 (4): 991-995.
- (155) Li M, Cheung BM. Pharmacotherapy for obesity. *Br J Clin Pharmacol*. 2009;68(6):804-10.
- (156) Lima CC, de Holanda-Angelin-Alves CM, Pereira-Gonçalves Á, Kennedy-Feitosa, E.; Evangelista-Costa, E.; Bezerra, M.A.C.;Coelho-de-Souza, A.N.; Leal-

- Cardoso JH. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton zehnteneri*, anethole, and estragole, on tracheal smooth muscle. *Heliyon* 2020; 6:e05445.
- (157) Lin X, Li H. Obesity: epidemiology, pathophysiology, and therapeutics. *frontiers in endocrinology*. 2021;12:706978.
- (158) Lin X, Li H. Obesity: Epidemiology, pathophysiology, and therapeutics. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:706978. PMID: 34552557.
- (159) Lin Y, Berg AH, Iyengar P, et al. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4617-4626.
- (160) Lissau I, Soerensen TIA. Parental neglect during childhood and increased risk of obesity in young adulthood. *Lancet* 1994;343(8893):324–7.
- (161) Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Brayne C, Burns A, Cohen-Mansfield J, Cooper C, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet*. 2020;396:413–446.
- (162) Loh K, Deng H, Fukushima A, Cai X, Boivin B, Galic S., Bruce C, Shields BJ, Skiba B, Ooms LM, et al. Reactive oxygenspecies enhance insulin sensitivity. *Cell Metab*. 2009;10:260–272 .
- (163) Maciejczyk M, Żebrowska E, Zalewska A, Chabowski A. Redox balance, antioxidant defense, and oxidative damage in the hypothalamus and cerebral cortex of rats with high fat diet-induced insulin resistance. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; ID6940515:11pp.
- (164) Mancuso P. Obesity and Respiratory Infections: Does excess adiposity weigh down host defense? *Pulm. Pharmacol. Ther*. 2013;26:412–419.
- (165) Mansouri E, Kooti W, Bazvand M, Ghasemi Boroon M, Amirzargar A, Afrisham R, Afzalzadeh MR, Ashtary-Larky D, Jalali N. The effect of hydro-alcoholic extract of foeniculum vulgare mill on leukocytes and hematological tests in male rats. *Jundishapur journal of natural pharmaceutical products*. 2015; 10(1): e18396.
- (166) Marinov V, Valcheva-Kuzmanova S. Review on the pharmacological activities of anethole. *Scr Sci Pharm*. 2015;2(2):14-19.
- (167) Marrelli M, Conforti F, Araniti F, Statti GA. effects of saponins on lipid metabolism: a review of potential health benefits in the treatment of obesity. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2016;21(10):1404.
- (168) Martins T, Castro-Ribeiro C, Lemos S, Ferreira T, Nascimento-Gonçalves E, Rosa E, Oliveira PA, Antunes LM. Murine Models of Obesity. *Obesities*. 2022; 2(2):127-147.
- (169) Mas-bargues C, Escrivá C, Dromant D, Borrás C, Viña J. Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. *Arch. Biochem. Biophys*. 2021;709:108941.
- (170) Masoudzadeh SH, Mohammadreza Mohammadabadi, Amin Khezri, Ruslana Volodymyrivna Stavetska, Valentyna Petrivna Oleshko, Olena Ivanivna Babenko, Zoya Yemets, Oleksandr Mikolayovich Kalashnik, Effects of diets with different levels of

fennel (*Foeniculum vulgare*) seed powder on DLK1 gene expression in brain, adipose tissue, femur muscle and rumen of Kermani lambs. *Small Ruminant Research*. 2020;193.

- (171) Massimiliano T, Vigilio B, Simona B, Renato B, Mariannina I, Elisabetta B. Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. *Pharmacol Res*. 2007;56(3):254-260.
- (172) Matboli M, Hasanin AH, Hamady S, Khairy E, Mohamed RH, Aboul-Ela YM, Raafat MH, Elsebay SAG, Emam HY, Shamekh RS, Agwa SHA. Anti-inflammatory effect of trans-anethol in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biomed Pharmacother*. 2022 Jun;150:113070. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113070. Epub 2022 May 6. PMID: 35658236.
- (173) Mehta A, Marso SP, Neeland IJ. Liraglutide for weight management: a critical review of the evidence. *Obes Sci Pract*. 2017;3(1):3-14. PMID: 28392927..
- (174) Modak T, Mukhopadhya A. Effects of citral, a naturally occurring antiadipogenic molecule, on an energy-intense diet model of obesity. *Ind J Pharmacol*. 2011;43, 300–305.
- (175) Mohamad RH, El-Bastawesy AM, Abdel-Monem MG, Noor AM, Al-Mehdar HA, Sharawy SM, El-Merzabani MM. Antioxidant and anticarcinogenic effects of methanolic extract and volatile oil of fennel seeds (*Foeniculum vulgare*). *J Med Food*. 2011;14(9):986-1001.
- (176) Moradi J, Abbasipour F, Zaringhalam J, Maleki B, Ziaee N, Khodadoustan A, Janahmadi M. Anethole, a medicinal plant compound, decreases the production of pro-inflammatory TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in a rat model of LPS-induced periodontitis. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. 2014;13(4):1319.
- (177) Moradi Negahdari F, Hadjzadeh M, Gholamnezhad Z, Sohrabi F, Samadi Noshahr Z. The Protective effects of trans-anethole against polycystic ovary syndrome induced histopathological and metabolic changes in rat. *International Journal of Fertility and Sterility*,. 2022;16(3):192-199.
- (178) Moradi Vastegani S, Khoshnam SE, Ghafouri S, Bakhtiari N, Farbood Y, Sarkaki A. Anethole attenuates motor dysfunctions, striatal neuronal activity deficiency and blood brain barrier permeability by decreasing striatal  $\alpha$ -synuclein and oxidative stress in rotenone-induced Parkinson's disease of male rats. *PLoS One*. 2023a;16;18(11):e0294612.
- (179) Moradi Vastegani S, Khoshnam SE, Mansouri E, et al. Anti-inflammatory, anti-apoptotic, and neuroprotective potentials of anethole in Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms induced by rotenone in rats. *Metab Brain Dis*. 2023b;38(6):2159-2174
- (180) Nagao K, Yamano N, Shirouchi B, et al. Effects of Citrus auraptene (7-geranyloxycoumarin) on hepatic lipid metabolism in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem*. 2010;5:9028–9032.

- (181) Nawal A. Elghazaly, Eman H. Radwan, Hala H. Zaatout, Mohamed M. Elghazaly, Nour El din Allam. Beneficial effects of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) in treating obesity in rats. *Journal of Obesity Management* . 2019; 1(2):16-33.
- (182) Nazir T, Shakir L, Rahman Z-U, Najam, K, Choudhary A, Saeed N, Rasheed H-U, Nazir A, Aslam S, Khanum AB. Hepatoprotective activity of *Foeniculum Vulgare* against paracetamol induced hepatotoxicity in rabbit. *J. Appl. Pharm.* 2020;12.
- (183) Nguyen PH, Le TVT, Kang HW, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) activators from *Myristica fragrans* (nutmeg) and their anti-obesity effect. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2010; 20 (14): 4128–4131.
- (184) Niksokhan M, Hedarieh N, Najafifard M et al. Effect of hydro-alcoholic extract of *Pimpinella anisum* seed on anxiety in male rat. *J Gorgan Uni Med Sci*. 2015;16 (4): 28-33
- (185) Noreen S, Rehman H-u, Tufail T, Badar Ul Ain H, Awuchi CG. Secoisolariciresinol diglucoside and anethole ameliorate lipid abnormalities, oxidative injury, hypercholesterolemia, heart, and liver conditions. *Food Science & Nutrition*. 2023;11:2620–2630.
- (186) O’Rahilly S, Farooqi I. Pathobiology of Obesity. In: Loscalzo J, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J. eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 21e. McGraw Hill; 2022.
- (187) Ogawa K, Ito M. Appetite-Enhancing Effects of Curry Oil. *Biol. Pharm. Bull.* 2016;39:1559–1563.
- (188) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid per-oxides in animal tissues by thiobarbituric acidreaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351-358.
- (189) Oktay M, Gulcin I, Kufrevioglu O. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Lebensm Wiss Technol*. 2003;36:263-271.
- (190) Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int. J. Obes*. 2002;26:1159–1164 .
- (191) Ong ZY, Muhlhausler BS. Maternal "junk-food" feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB J*. 2011;25(7):2167-79. PMID: 21427213.
- (192) Opel N, Thalamuthu A, Milaneschi Y et al. Brain structural abnormalities in obesity: relation to age, genetic risk, and common psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*. 2021; 26, 4839–4852.
- (193) Ouyang S, Hsuchou H, Kastin A J, Wang Y, Yu C, Pan W. Diet-induced obesity suppresses expression of many proteins at the blood–brain barrier. *J. Cerebral Blood Flow Metabol*. 2014;34, 43–51.
- (194) Pandit K, Kumar A, Kaur S. et al. Amelioration of oxidative stress by trans-Anethole via modulating phase I and phase II enzymes against hepatic damage induced by CCl4 in male Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res* . 2022;29: 6317–6333.

- (195) Pati, S., Irfan, W., Jameel, A., Ahmed, S., & Shahid, R. K. Obesity and Cancer: A current overview of epidemiology, pathogenesis, outcomes, and management. *Cancers*. 2023;15(2), 485.
- (196) Paunovic M, Vucic V, Milosevic M, Ristic-Medic D, Arsic A, Kojadinovic M, Petrovic S. Use of high-fat high-fructose diet for a model of metabolic syndrome in Wistar rats: challenges remain. *Acta Vet. Brno* 2023;92: 389-396.
- (197) Peeters A, Barendregt JJ, Willekens F, Mackenbach JP, Al Mamun A, Bonneux L; NEDCOM, the Netherlands Epidemiology and Demography Compression of Morbidity Research Group. Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann Intern Med*. 2003;7;138(1):24-32.
- (198) Pem D, Jeewon R. Fruit and vegetable intake: benefits and progress of nutrition education interventions- narrative review article. *Iran J Public Health*. 2015;44(10):1309-21. PMID: 26576343.
- (199) Perveen T, Emad S, Ahmad S et al. Fennel oil treatment mimics the anti-depressive and anxiolytic effects of fluoxetine without altering the serum cholesterol levels in rats. *Pakistan J Zool*. 2017;49(6).
- (200) Petersen MC, Vatner DF, Shulman GI. Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2017;13(10):572-587. PMID: 28731034.
- (201) Pflanz CP, Tozer DJ, Harshfield EL et al. Central obesity is selectively associated with cerebral gray matter atrophy in 15,634 subjects in the UK Biobank. *Int J Obes* . 2022;46:1059–1067.
- (202) Pieri BL da S, Rodrigues MS, Farias HR., Silveira G. de B, Ribeiro V de SG da C, Silveira PCL, De Souza CT. Role of Oxidative Stress on Insulin Resistance in Diet-Induced Obesity Mice. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24:12088.
- (203) Pilitsi E, Farr OM, Polyzos SA, Perakakis N, Nolen-Doerr E, Papatheanasiou AE, Mantzoros CS. Pharmacotherapy of obesity: Available medications and drugs under investigation. *Metabolism*. 2019; 92:170-19.
- (204) Pojednic R, D'Arpino E, Halliday I, Bantham A. The benefits of physical activity for people with obesity, independent of weight loss: a systematic review. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(9):4981. PMID: 35564376.
- (205) Ponte E, Sousa P, Rocha M, Soares P, Coelho-de-Souza A, Leal-Cardoso J, Assreuy A, Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. *Pharmacol Rep.*, 2012, 64(4), 984-90.
- (206) Powell-Wiley TM, Poirier P, Burke LE, Després JP, Gordon-Larsen P, Lavie CJ, Lear SA, Ndumele CE, Neeland IJ, Sanders P, St-Onge MP; American Heart Association Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Clinical Cardiology; Council on Epidemiology and Prevention; and Stroke Council. Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2021 May 25;143(21):e984-e1010.

- (207) Primeau V, Coderre L, Karelis AD, Brochu M, Lavoie M-E, Messier V, Sladek R, Rabasa-Lhoret R. Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *Int. J. Obes.* 2011;35:971–981.
- (208) Prins JB, Walkerlin NI, Winterford CM, Cameron DP. Apoptosis of human adipocytes in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1994;202:500–507.
- (209) Pugliese G, Liccardi A, Graziadio, C. et al. Obesity and infectious diseases: pathophysiology and epidemiology of a double pandemic condition. *Int J Obes.* 2022;46:449–465.
- (210) Purum K, Ka YK, Hui SL, Sun SM, Geun HS. Anti-inflammatory effects of anethole in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Life Sci.* 2013;93:955–961.
- (211) Qu YJ, Zhen RR, Zhang LM, Gu C, Chen L, Peng X, Hu B, An HM.. Uncovering the active compounds and effective mechanisms of the dried mature sarcocarp of *Cornus officinalis* Sieb. Et Zucc. for the treatment of Alzheimer's disease through a network pharmacology approach. *BMC Complement Med Ther.* 2020;20(1):157.
- (212) R.H. Unger Lipotoxic diseases *Annu. Rev. Med.*, 53 (2002), pp. 319-336
- (213) Rafferty C, Lamont BB. Plant Tannins and essential oils have an additive deterrent effect on diet choice Kangaroos. *Forests.* 2021;12: 1639.
- (214) Rai PD, Dambal A.A, Khatri S, et al. Development of an anti-obesity polyherbal formulation containing *Terminalia arjuna*, *Lagenaria siceraria* and *Piper nigrum*. *The Pharma Innovation.* 2015;3 (11), 33–37.
- (215) Rajan PD, Sharma P, Parihar L. Protective activity of alpha-pinene and trans-anethole against 3-nitro propionic acid induced neurotoxicity in animal model of Huntington's disease. *Int Res J Pharm.* 2020;11(6), 32–38.
- (216) Ramachandran D, Gill T. Impact of COVID-19 lockdown on self-managed weight loss journeys. *Obes Res Clin Pract.* 2020;14(4):386-387. PMID: 32819875.
- (217) Raman S, Asle-Rousta M, Rahnema M. Protective effect of fennel, and its major component trans-anethole against social isolation induced behavioral deficits in rats. *Physiol Int.* 2020;107(1):30-39.
- (218) Reysov M., Todorova M., Gancheva S., Eftimov M., Valcheva-Kuzmanova S., Zhelyazkova-Savova M. Diet-induced metabolic syndrome in rats is associated with anxiety and impairment of spatial memory. *J Biomed Clin Res.* 2019;12(1), 2:122.
- (219) Rhee YH, Ahn JC. Melatonin attenuated adipogenesis through reduction of the CCAAT/enhancer binding protein beta by regulating the glycogen synthase 3 beta in human mesenchymal stem cells. *J Physiol Biochem.* 2016;72(2):145–55.
- (220) Rhee YH, Moon J.H, Mo JH. et al. mTOR and ROS regulation by anethole on adipogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. *BMC Cell Biol.* 2018;19:12

- (221) Rinaldi de Alvarenga, JF, Lei Preti C, Santos Martins L, et al. Identification of D-Limonene Metabolites by LC-HRMS: An Exploratory metabolic switching approach in a mouse model of diet-induced obesity. *Metabolites*. 2022;12 (12):1246.
- (222) Ritter A, Domiciano T, Verri W, Zarpelon A, da Silva L, Barbosa C, Natali M, Cuman R, BersaniAmado C, Antihypernociceptive activity of anethole in experimental inflammatory pain. *Inflammopharmacology*, 2013, 21(2), 187-97.
- (223) Ritter A.M, Ames FQ, Otani F, de Oliveira RM, Cuman RK, Bersani-Amado CA. Effects of anethole in nociception experimental models. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:345829.
- (224) Ronan L, Alexander-Bloch AF, Wagstyl K, Farooqi S, Brayne C, Tyler LK, Cam-CAN, Fletcher PC. Obesity associated with increased brain age from midlife. *Neurobiology of aging*. 2016; 47: 63–70.
- (225) Ryu S, Seol GH, Park H, Choi IY. Trans-anethole protects cortical neuronal cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation. *Neurol. Sci*. 2014;10.1007/s10072-014-1791-8
- (226) S. Ryu, G.H. Seol, H. Park, I.Y. Choi. Trans-anethole protects cortical neuronal cells against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation. *Neurol. Sci*. (2014), 10.1007/s10072-014-1791-8
- (227) Sá NAR, Bruno JB, Guerreiro DD, Cadenas J, Alves BG, Cibin FWS, Leal-Cardoso JH, Gastal EL, Figueiredo JR. Anethole reduces oxidative stress and improves in vitro survival and activation of primordial follicles. *Braz J Med Biol Res*. 2018;51(8):e7129.
- (228) Sadrefozalayi S, Farokhi F. Effect of the aqueous extract of *Foeniculum vulgare* (fennel) on the kidney in experimental PCOS female rats. *Avicenna J Phytomed*. 2014;4(2):110-117.
- (229) Salas-Venegas V, Flores-Torres RP, Rodríguez-Cortés YM, Rodríguez-Retana D, Ramírez-Carretero RJ, Concepción-Carrillo LE, Pérez-Flores LJ, Alarcón-Aguilar A, López-Díazguerrero NE, Gómez-González B, Chavarría A, Königsberg M. The Obese Brain: Mechanisms of systemic and local inflammation, and interventions to reverse the cognitive deficit. *Front Integr Neurosci*. 2022;16:798995.
- (230) Saldarriaga OA, Freiberg B, Krishnan S, Rao, Arvind, Burks J, Booth AL, Dye B, Utay N, Ferguson M, Akil A, Yi M, Beretta L, Stevenson, HL. Multispectral imaging enables characterization of intrahepatic macrophages in patients with chronic liver disease. *Hepatology Communications*. 2020;4(5): 708-723.
- (231) Salimian S., Habibiyan-Dehkordi S., Kaboutari J., Amini-Khoei H., Barkhordari M. Anethole exerted anticonvulsant effect in pentylenetetrazole model of seizure in male mice: Possible antioxidant effects. *Future Nat Prod*. 2022;8(1): 2-6.
- (232) Samadi-Noshahr Z, Hadjzadeh M-A, MoradiMarjaneh R, Khajavi-Rad A. The hepatoprotective effects of fennel seeds extract and trans-anethole in streptozotocin-induced liver injury in rats. *Food Sci Nutr*. 2021; 9: 1121–1131.



- (233) Samyal LM, Hitesh K, Bharat P. Evaluation anti diabetic and anti hyperlipidemic effects of extract of artemisia dracunculus L in streptozotocin– induced–diabetic rats. *Pharmacologyonline*. 2011;2: 1230-1237.
- (234) Sangster SA, Caldwell J, Hutt AJ, Anthony A, Smith RL. The metabolic disposition of [methoxy-14C]-labelled trans-anethole, estragole and p-propylanisole in human volunteers. *Xenobiotica*. 1987;7(10):1223-32. PMID: 3424869.
- (235) Sangster SA, Caldwell J, Smith RL. Metabolism of anethole. II. Influence of dose size on the route of metabolism of trans-anethole in the rat and mouse. *Food Chem Toxicol*. 1984;22(9):707-13.
- (236) Satoh N, Ogawa Y, Katsura G, et al.: Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. *Endocrinol* 1997; 138: 947–54.
- (237) Sawadogo W, Tsegaye M, Gizaw A, Adera T. Overweight and obesity as risk factors for COVID-19-associated hospitalisations and death: systematic review and meta-analysis. *BMJ Nutr. Prev. Health*. 2022; 5: 10–18.
- (238) Schinzari F, Iantorno M, Campia U, Mores N, Rovella V, Tesauro M, Di Daniele N, Cardillo C. Vasodilator responses and endothelin-dependent vasoconstriction in metabolically healthy obesity and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2015; 309:E787–E792.
- (239) Schunkert H. Obesity and target organ damage: the heart. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26(4):S15-20.
- (240) Schwartz MW, Seeley R J, Zeltser LM, Drewnowski A, Ravussin E, Redman L. M, Leibel, R. L. Obesity Pathogenesis: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine reviews*. 2017;38(4): 267–296.
- (241) Sedláková J, Kocourková B, Lojková L, Kubáň V. The essential oil content in caraway species (*Carum carvi* L.). *Hortic. Sci*. 2003;30,:73–79.
- (242) Seki S, Kitada T, Sakaguchi H. Clinicopathological significance of oxidative cellular damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *Hepatol Res*. 2005;33:132–134.
- (243) Seo E, Kang P, Seol GH. Trans-anethole prevents hypertension induced by chronic exposure to both restraint stress and nicotine in rats. *Biomed Pharmacother*. 2018;102:249-253. PMID: 29567537.
- (244) Shahbazian S., Akbarzadeh A., Torabi S., Omid M. Anti-cancer activity of pegylated liposomal trans-anethole on breast cancer cell lines MCF-7 and T47D. *Biotechnol. Lett*. 2015;37:1355–1359.
- (245) Shefer G., Marcus Y., Stern N. Is obesity a brain disease? *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(10):2489-2503.
- (246) Sheikh B, Pari L, Rathinam A, Chandramohan R. Trans-anethole, a terpenoid ameliorates hyperglycemia by regulating key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Biochim*. 2015;112:57–65.

- (247) Shen J, Nijjima A, Tanida M, et al. Olfactory stimulation with scent of grapefruit oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats. *Neurosci. Lett.* 2005;380:289–294.
- (248) Sherman MM, Ungureanu S, Rey JA. Naltrexone/Bupropion ER (Contrave): Newly approved treatment option for chronic weight management in obese adults. *P T.* 2016;41(3):164-72. PMID: 26957883.
- (249) Shin SC, Lee DU. Ameliorating effect of new constituents from the hooks of *Uncaria rhynchophylla* on scopolamine-induced memory impairment. *Chin J Nat Med.* 2013;11(4):391-395.
- (250) Shoelson SE, Lee J, Yuan M. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2003; 3:49–52.
- (251) Shri R. Anxiety: causes and management. *J Behav Sci.* 2010;5:100–118.
- (252) Slattery D, Cryan J. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc.* 2012;7(6):1009–14.
- (253) Soares PM, Lima RF, de Freitas Pires A, Souza EP, Assreuy AM, Criddle DN. Effects of anethole and structural analogues on the contractility of rat isolated aorta: Involvement of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-channels. *Life Sci.* 2007;81(13):1085-93.
- (254) Soltan MA, Shewita RS, El-Katcha MI. Effect of dietary anise seeds supplementation on growth performance, immune response, carcass traits and some blood parameters of broiler chickens. *Int.J. Poult. Sci.* 2018;7: 1078-1088.
- (255) Song A, Park Y, Kim B, Lee SG. Modulation of Lipid Metabolism by Trans-Anethole in hepatocytes. *Molecules.* 2020;25(21):4946.
- (256) Sookoian S, Pirola C. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: from systems biology to the personalized medicine. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(3):711-725.
- (257) Soumya SJ, Binu S, Helen A, Reddanna P, Sudhakaran PR. 15(S)-HETE-induced angiogenesis in adipose tissue is mediated through activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Biochem Cell Biol.* 2013;91(6):498–505.
- (258) Sri Devi S, Ashokkumar N. Citral, a Monoterpene Inhibits adipogenesis through modulation of adipogenic transcription factors in 3T3-L1 cells. *Indian J Clin Biochem.* 2018; 33 (4): 414-421.
- (259) Stanley SA, Kelly L, Latcha KN, Schmidt SF, Yu X, Nectow AR, Sauer J, Dyke JP, Satoh Dordick JS, Friedman JM. Bidirectional electromagnetic control of the hypothalamus regulates feeding and metabolism. *Nature.* 2016;531:647-650.
- (260) Stohs SJ, Lawson TA, Anderson L, Bueding E. Effects of oltipraz, BHA, ADT and cabbage on glutathione metabolism, DNA damage and lipid peroxidation in old mice. *Mech Ageing Dev.* 1986;37(2):137–45.
- (261) Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, Mattson MP. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus.* 2008;18(11):1085–1088.

- (262) Sui SX, Pasco JA. Obesity and Brain Function: The Brain-Body Crosstalk. *Medicina (Kaunas)*. 2020;56(10):49926.
- (263) Suriano, F., Vieira-Silva, S., Falony, G. *et al.* Novel insights into the genetically obese (*ob/ob*) and diabetic (*db/db*) mice: two sides of the same coin. *Microbiome*. 2022;9:147.
- (264) Tang X, Zhao W, Lu M, Zhang X, Zhang P, Xin Z, Sun R, Tian W, Cardoso MA., Yang J, Simó R, Zhou JB, Stehouwer CDA. Relationship between central obesity and the incidence of cognitive impairment and dementia from cohort studies involving 5,060,687 participants. *Neurosci Biobehav Rev*. 2021;130:301-313.
- (265) Tangvarasittichai S, Pongthaisong S, Tangvarasittichai O. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin-6, C-Reactive Protein Levels and Insulin Resistance Associated with Type 2 Diabetes in Abdominal Obesity Women. *Indian J Clin Biochem*. 2016;31(1):68-74.
- (266) Thörne A, Lönnqvist F, Apelman J, Hellers G, Arner P. A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26(2):193-9.
- (267) Tognolini M, Ballabeni V, Bertoni S, Bruni R, Impicciatore M, Barocelli E. Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. *Pharmacol. Res*. 2007;56, 254–260.
- (268) Tognolini M, Barocelli E, Ballabeni V, et al. Comparative screening of plant essential oils: phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sci*. 2006;78(13):1419-1432.
- (269) Tong Y, Yu C, Xie Z, Zhang X, Yang Z, Wang T. Trans-anethole ameliorates lipopolysaccharide-induced acute liver inflammation in broilers via inhibiting NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Poult Sci*. 2022;101(8):101962.
- (270) Trayhurn P, Beattie J. Physiological role of adipose tissue: White adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2001;60(3):329-339.
- (271) Truhaut R, Le Bourhis B, Attia M, Glomot R, Newman J, Caldwell J. Chronic toxicity/carcinogenicity study of trans-anethole in rats. *Food Chem Toxicol*. 1989;7(1):11-20. PMID: 2703189.
- (272) Tuck ML, Sowers J, Dornfeld L, Kledzik G, Maxwell M. The effect of weight reduction on blood pressure, plasma renin activity, and plasma aldosterone levels in obese patients. *N Engl J Med*. 1981; 304(16):930-3.
- (273) Tuck ML. Obesity, the sympathetic nervous system, and essential hypertension. *Hypertension*. 1992;19(1 Suppl):I67-77.
- (274) Unger RP. Scherer Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity Trends in endocrinology and metabolism: *TEM*. 2010;21:345-352.
- (275) Usman M, Volpi EV. DNA damage in obesity: Initiator, promoter and predictor of cancer. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*. 2018; 778:23-37.

- (276) Vaisse C, Clement K, Durand E, et al.: Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest*. 2000;106:253–62.
- (277) Van Dyken P, Lacoste B. Impact of metabolic syndrome on neuroinflammation and the blood–brain barrier. *Front. Neurosci*. 2018;12:930.
- (278) Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006;444(7121):875-80.
- (279) Vastegani S.M., Khoshnam SE., Mansouri E, Hajipour S, Ghafouri S, Bakhtiari N, Sarkaki A, Farbood Y. Neuroprotective effect of anethole against rotenone induced non-motor deficits and oxidative stress in rat model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*. 2023;2;437:114100; Epub 5;447:114412.
- (280) Vellapandian CRR, Ramachandram DS. Renoprotective activity of anethole- rich fraction from aromatic herbs on junk food induced diabetic nephropathy in rats. *J Diabetes Metab Disord*. 2022;21:1557–1567.
- (281) Vendramin V, Pesce A, Vincenzi S. Anethole Stability in Aniseed Spirits: Storage condition repercussions on commercial products. *Beverages*. 2021;7:73.
- (282) Vogel-Ciernia A, Wood MA. Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr Protoc Neurosci*, 2014;69: 8.31.1-8.31.17.
- (283) Wagner IV, Kloting N, Atanassova N, Savchuk I, Sprote C, Kiess W, Soder O, Svechnikov K. Prepubertal onset of obesity negatively impacts on testicular steroidogenesis in rats. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;437:154–162.
- (284) Wang R, Zhang H, Wang Y, Song F, Yuan Y. Inhibitory effects of quercetin on the progression of liver fibrosis through the regulation of NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ , p38 MAPK, and Bcl-2/Bax signaling. *Int Immunopharmacol*. 2017;47:126-133.
- (285) Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat protoc*. 2010;5(1), 51–66.
- (286) Williams TD, Chambers JB, Roberts LM, Henderson RP, Overton JM. Diet-induced obesity and cardiovascular regulation in C57BL/6J mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30(10):769-78.
- (287) Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962;111:544-547.
- (288) Wisniewski ES, da Rocha BA, Loth E A, Ribeiro LDFC, Costa RM, Gandra RF, Amado CAB. Effect of anethole and anethole+ itraconazole association on experimental arthritis induced by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Research, Society and Development* 2024;13(3): e11013345343-e11013345343.
- (289) Witek K, Wydra K, Filip M. A High-Sugar Diet Consumption, Metabolism and Health Impacts with a focus on the development of substance use disorder: a narrative review. *Nutrients*. 2022;14(14):2940.
- (290) Wojtunik-Kulesza K.A. Toxicity of selected monoterpenes and essential oils rich in these compounds. *Molecules*. 2022; 27 (5):1716.
- (291) World Health Organization. Obesity. Available online: <https://www.who.int/topics/obesity/en/>.

- (292) World Health Organization. World Health Organization; 2014. Fact Sheet. 311. Obesity and overweight. Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/>.
- (293) World Obesity Atlas 2023, p.18
- (294) World Obesity Day 2022. Accelerating action to stop obesity. World Health Organization. Available online: <https://www.who.int/news/item/04-03-2022-world-obesity-day-2022-accelerating-action-to-stop-obesity>. Accessed 12/20/2022.
- (295) Wright SM, Aronne LJ. Causes of obesity. *Abdom Radiol*. 2012;37: 730–732.
- (296) Xiong Z, Sperelakis N. Regulation of L-type calcium channels of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27(1):75–91.
- (297) Yadollahi-Farsani Y, Vanani V, Lorigooini Z, Farahzad A, Amini-Khoei H. Anethole via increase in the gene expression of PI3K/AKT/mTOR mitigates the autistic-like behaviors induced by maternal separation stress in mice. *IBRO Neuroscience Reports*. 2024;16:1-7.
- (298) Yang S et al. Obesity and activity patterns before and during COVID-19 lockdown among youths in China. *Clin Obes*. 2020;10(6): e12416.
- (299) Yea SS, Jeong HS, Choi CY, Park KR, Oh S, Shin JG, Yun CH. Inhibitory effect of anethole on T-lymphocyte proliferation and interleukin-2 production through down-regulation of the NF-AT and AP-1. *Toxicology in vitro*. 2006;20(7):1098-1105.
- (300) Yu C, Zhang J, Li Q, Xiang X, Yang Z, Wang T, Effects of trans-anethole supplementation on serum lipid metabolism parameters, carcass characteristics, meat quality, fatty acid and amino acid profiles of breast muscle in broiler chickens. *Poultry Science*. 2021;101484.
- (301) Yu CY, Zhang JF, Zhang H, Chen YN, Wang C, Zhang LL, Ding LR, Wang T, Yang ZB. Influence of trans-anethole on the nutrient digestibility and intestinal barrier function in broilers. *Poult Sci*. 2021;100(12):101489.
- (302) Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19(4):972-978.
- (303) Zhang R, Reisin E. Obesity-hypertension: the effects on cardiovascular and renal systems. *Am J Hypertens*. 2000;13(12):1308-14.
- (304) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425–432.
- (305) Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L. and Friedman J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* . 1994;372: 425-432.
- (306) Zhang Z, Mocanu V, Cai C, Dang J, Slater L, Deehan EC, Walter J, Madsen KL. Impact of fecal microbiota transplantation on obesity and metabolic syndrome-a systematic review. *Nutrients*. 2019;11(10):2291. PMID: 31557953.

- (307) Zhao L, Ha JH, Okla M, Chung S. Activation of autophagy and AMPK by gamma-tocotrienol suppresses the adipogenesis in human adipose derived stem cells. *Mol Nutr Food Res*. 2014;58(3):569–79.
- (308) Zhong H, Chen K, Feng M, et al. Genipin alleviates high-fat diet-induced hyperlipidemia and hepatic lipid accumulation in mice via miR-142a-5p/SREBP-1c axis. *Febs J*. 2019;285: 501–517.
- (309) Zhu L, Han MB, Gao Y, et al. Curcumin triggers apoptosis via upregulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase activation in SW872 human adipocytes. *Mol Med Rep*. 2015;12(1):1151-1156.
- (310) Атанасова М. Неалкохолна мастна чернодробна болест. *Sanamedic*. 2019. Available on: <https://www.mc-sanamedic.com/liver-steatosis/>
- (311) Българско дружество по ендокринология. Препоръки за добра клинична практика при затлъстяване. София, 2019 година.