ЕФЕКТ НА АНЕТОЛА ВЪРХУ ВИСЦЕРАЛНОТО ЗАТЛЪСТЯВАНЕ И СЕРУМНИТЕ НИВА НА ТРИГЛИЦЕРИДИ И ХОЛЕСТЕРОЛ ПРИ ПЛЪХОВЕ НА ВИСОКОКАЛОРИЧНА ДИЕТА

Елис Рафаилова, Силвия Ганчева, Мирослав Ефтимов, Мехмед Рейзов, Клементина Монева, Милена Тодорова, Мария Желязкова-Савова, Стефка Вълчева-Кузманова

Катедра по фармакология и клинична фармакология и терапия, Медицински университет - Варна

EFFECT OF ANETHOLE ON VISCERAL OBESITY AND SERUM TRIGLYCERIDES AND CHOLESTEROL LEVELS IN RATS ON A HIGH-CALORIE DIET

Elis Rafailova, Silvia Gancheva, Miroslav Eftimov, Mehmed Reyzov, Klementina Moneva, Milena Todorova, Maria Savova-Zhelyazkova, Stefka Valcheva-Kuzmanova

Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Затлъстяването е нарушение с висока честота и социална значимост. Анетолът е ароматно съединение, което се открива в състава на етеричните масла от анасон и копър. Той притежава антиоксидантни, противовъзпалителни и други благоприятни ефекти.

Целта на изследването е да се оцени ефектът на анетола, прилаган в нарастващи концентрации, върху висцералното затлъстяване и серумните липиди при плъхове на висококалорична диета (ВКД).

Изследването е проведено върху 50 мъжки Wistar плъха, разпределени в 5 групи: контрола, ВКД, ВКД+62.5А, ВКД+125А, ВКД+250А. ВКД групите са приемали висококалорична диета и 10%-ен разтвор на фруктоза, а контролната група – стандартна лабораторна диета и питейна вода. Групи ВКД+62.5А, ВКД+125А и ВКД+250А са третирани всекидневно перорално с анетол, разтворен в слънчогледово олио в обем 3 ml/kg, в дози съответно 62.5 mg/kg, 125 mg/kg и 250 mg/kg. Групи контрола и ВКД са получавали разтворителя в същия обем и път на приложение. Продължителността на експеримента е 10 седмици, след

ABSTRACT

Obesity is a disorder of high prevalence and social significance. Anethole is an aromatic compound found in anise and fennel essential oils. It produces antioxidant, anti-inflammatory and other beneficial effects.

The aim of this study was to evaluate the effect of anethole, administered in increasing concentrations, on visceral adiposity and serum lipids in rats on a high-calorie diet (HCD).

Fifty male Wistar rats were allocated into 5 groups: control, HCD, HCD+62.5A, HCD+125A, and HCD+250A. The HCD groups received a high-fat high-fructose diet and 10% fructose solution, and the control group received a standard laboratory diet and tap water. The HCD+62.5A, HCD+125A, and HCD+250A groups were treated daily orally with anethole dissolved in sunflower oil in a volume of 3 mL/kg at doses of 62.5 mg/kg, 125 mg/kg, and 250 mg/kg, respectively. The control and HCD groups received the solvent in the same volume and route of administration. The duration of the experiment was 10 weeks. At its end, blood samples were taken for biochemical tests and visceral adipose tissue was weighed. The results were analyzed by one-way ANOVA followed by Dun-

което е взета кръв за биохимични изследвания и е претеглена висцералната мастна тъкан. Резултатите са анализирани с еднофакторен вариационен анализ (One-way ANOVA), последван от пост тест на Dunnett със статистическата програма GraphPad Prism 5.0.

Вариационният анализ установява, че индексът на висцералната мастна тъкан е значимо повишен ($p<0.05$) във всички групи, получаващи ВКД с изключение на ВКД+250А. В група ВКД няма значимо повишаване на плазмените триглицериди и холестерол спрямо контролата. Третирането с анетол не променя значимо нивата на триглицеридите и холестерола в сравнение с тези на група ВКД.

Третирането с анетол повлиява благоприятно висцералното затлъстяване и няма значим ефект върху серумните нива на триглицеридите и холестерола при плъхове, получаващи висококалорична диета.

Ключови думи: *анетол, висококалорична диета, висцерално затлъстяване, триглицериди, холестерол*

nett's post-test with the statistical program GraphPad Prism 5.0.

The visceral obesity index was significantly increased ($p<0.05$) in all groups receiving HCD except for HCD+250A. There was no significant increase in plasma triglycerides and cholesterol in the HCD group compared to the control one. Anethole treatment did not change significantly the triglyceride and cholesterol levels compared to these of the HCD group.

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

Keywords: *anethole, high-calorie diet, visceral obesity, triglycerides, cholesterol*

ВЪВЕДЕНИЕ

Затлъстяването е нарушение на енергийния метаболизъм с непрекъснато повишаваща се през последните десетилетия честота, засягащо всяка възраст, пол и раса (19). Социалната му значимост се дължи на факта, че повишава риска от развитие на редица хронични заболявания като диабет, някои форми на карцином, сърдечносъдови и мускулно-скелетни разстройства (2). Основните причини, водещи до затлъстяване, са повишеният калориен внос чрез прием на високоенергийни храни, съдържащи животински мазнини и прости въглехидрати, както и ниската физическа активност (18). Нерационалното хранене и висцералното затлъстяване водят до повишаване нивата на оксидативен стрес и развитие на хронично нискостепенно възпаление, които са патогенетично свързани с появата и прогресията на споменатите хронични социалнозначими заболявания (13). Дислипидемията е едно от най-честите биохимични отклонения при хората с висцерално затлъстяване. Повишените нива на холестерол и триглицериди са пряко свързани с развитието на ендотелна дисфункция и атеросклеротични плаки (4). Нивата на серумните липиди се използват в клиничната практика за оценка на риска от развитие на сърдечносъдови заболявания (4).

Анетолът е натурален монотерпен, откриващ се в някои етеричните масла като тези на анасона и копъра. Използва се широко в хранително-вкусовата индустрия поради силно изразения си сладникав вкус и специфичен аромат (12,15). Намира приложение в производството на алкохолни напитки (мастика, узо) и сладкиши, включва се и в козметични продукти (сапуни, паста за зъби) (12). Редица експериментални изследвания показват, че анетолът притежава разнообразни фармакологични ефекти, включително антиоксидантен (12) и противовъзпалителен (10). Тези свойства на анетола биха могли да повлияят благоприятно протичането на заболявания, свързани с повишени нива на оксидативен стрес и хронично възпаление, каквито са нарушенията на енергийния метаболизъм. Ефектът на анетола върху акумулацията на висцерална мастна тъкан и асоциираната с нея дислипидемия при опитни животни с диета-индуцирано затлъстяване е все още неизследван.

ЦЕЛ

Целта на настоящото изследването е да се оцени ефектът на анетол, прилаган в нарастващи концентрации, върху висцералното затлъстяване и серумните липиди при плъхове на висококалорична диета (ВКД).

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Опитни животни

Експериментът е проведен върху 50 мъжки плъха, порода Wistar, с начално тегло 250-310 g. Животните са отглеждани във вивариума на Медицинския университет във Варна при стандартни лабораторни условия, във вентилирани помещения със стайна температура 20-25°C и 12-часов цикъл светлина-тъмнина, при свободен достъп до храна и питейна вода, настанени в стандартни пластмасови клетки. Животните са разпределени в 5 групи по 10 на брой: контрола, ВКД, ВКД+62.5А, ВКД+125А и ВКД+250А. По време на целия експеримент 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 добавяне на свинска мас и фруктоза към стандартните гранули. Освен това животните от ВКД групите са получавали и 10%-ен разтвор на фруктоза вместо питейна вода (6). 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, 125mg/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. Контролната и ВКД групата са сондирани всекидневно с разтворителя, прилаган в същия обем. Експериментът е с продължителност 10 седмици.

24 часа след последното третиране опитните животни са евтаназирани под обща етерна анестезия. Взети са кръвни проби от подезичната вена за биохимични изследвания. За оценка на висцералното затлъстяване са отпрепарирани и претеглени ретроперитонеалната, мезентериалната, паранефралната и перигонадната мастна тъкан. Изчислен е индексът на висцералната мастна тъкан по формулата: общо тегло на отпрепарираната мастна тъкан/телесното тегло x 100.

Изследването е проведено в съгласие с националната политика и международните изисквания, основаващи се на Европейската директива за хуманно отношение към опитните животни (2010/63/EU), и е етично одобрено от Българската агенция по безопасност на храните (Разрешително № 177/07.07.2017 г).

Биохимични изследвания

Събраните кръвни проби са центрофугирани при 2000 оборота за 10 min. Отделеният серум е съхраняван при минус 20 °C до момента на анализа.

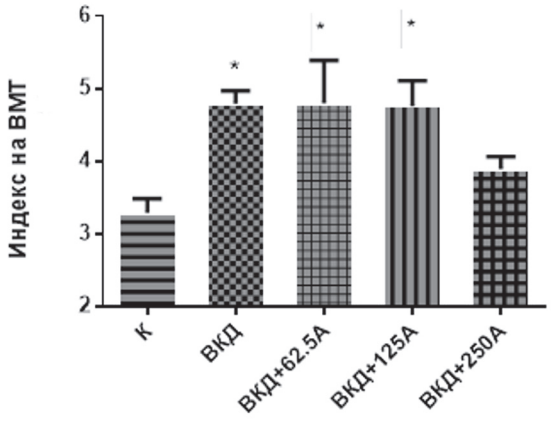
Измерени са серумните нива на холестерол и триглицериди спектрофотометрично при дължина на вълната 500 nm чрез колориметрични китове на BioMaxima S.A., Полша, като са спазвани стриктно инструкциите на производителя.

Статистически анализ

Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка на средната стойност (SEM) и са анализирани чрез еднофакторен вариационен анализ (One-way ANOVA), последван от пост тест на Dunnett. Ниво на $p < 0.05$ е считано за значимо. Използван е статистически софтуер GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., CA, USA)

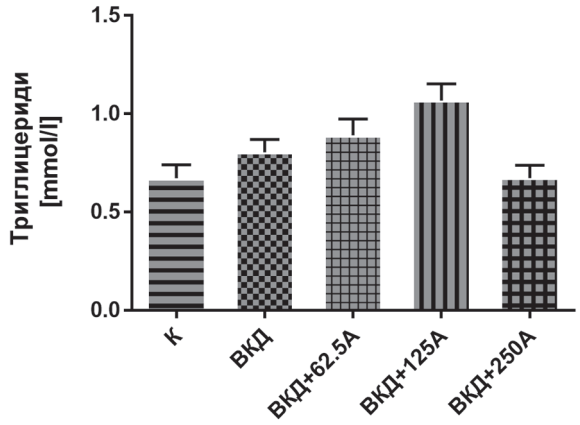
РЕЗУЛТАТИ

Фиг. 1 представя промените в индекса на висцералната мастна тъкан, използван 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 Dunnett 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 групата ВК-

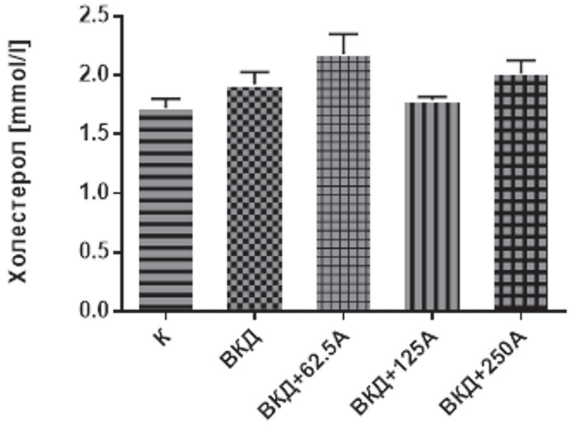


Фиг. 1. Индекс на висцералната мастна тъкан (ВМТ)

К – контролна група; ВКД – животни на висококалорична диета; ВКД+62.5А – животни на ВКД, третирани с анетол в доза 62,5 mg/kg; ВКД+125А – животни на ВКД, третирани с анетол в доза 125 mg/kg; ВКД+250А – животни на ВКД, третирани с анетол в доза 250 mg/kg
**p<0.05 спрямо К*



Фиг. 2. Серумни триглицериди
К – контролна група; ВКД – животни на висококалорична диета; ВКД+62.5А – животни на ВКД, третирани с анетол в доза 62,5 mg/kg; ВКД+125А – животни на ВКД, третирани с анетол в доза 125 mg/kg; ВКД+250А – животни на ВКД, третирани с анетол в доза 250 mg/kg



Фиг. 3. Серумен холестерол
К – контролна група; ВКД – животни на висококалорична диета; ВКД+62.5А – животни на ВКД, третирани с анетол в доза 62,5 mg/kg; ВКД+125А – животни на ВКД, третирани с анетол в доза 125 mg/kg; ВКД+250А – животни на ВКД, третирани с анетол в доза 250 mg/kg

Д+250А, получаваща най-високата доза анетол, индексът на висцералната мастна тъкан не се отличава значимо от този на контролните животни.

Нивата на серумните триглицериди са представени на фигура 2. В група ВКД няма значима промяна в този показател в сравнение с контролната група. Третирането с анетол на опитните животни също не води до статистически значима промяна при сравнение с група ВКД.

Нивата на серумния холестерол са представени на фигура 3. Резултатите от статистическия анализ са подобни. Липсва значим ефект както от ВКД, така и от третирането с анетол.

ДИСКУСИЯ

В достъпната литература се откриват единични експериментални изследвания, разглеждащи потенциално благоприятно повлияване на затлъстяване от анетол. Доколкото ни е известно, нашето проучване е първото, търсещо ефектите на анетол, прилаган в нарастващи концентрации, върху висцералното затлъстяване и серумните липиди при плъхове, получаващи висококалорична диета. 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 и съавт., които прилагат транс-анетол на мишки, третирани с диета богата на мазнини (9). Според авторите на това изследване транс-анетолът стимулира превръщането на бялата мастна тъкан в кафява, активира кафевите адипоцити и промотира липидния катаболизъм, повлиявайки генната експресия в мастните клетки, като по този комплексен механизъм е в състояние да предотврати развитието на затлъстяване (9). Подобни ефекти върху генната експресия са установени върху чернодробна клетъчна линия от Song и съавт., според които транс-анетолът увеличава експресията на липолитичните гени и намалява тази на липогенните (17).

В настоящото проучване 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 и съавт. при плъхове със стрептозотоцин-индуциран диабет (16). 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 (7). Суплементацията с транс-анетол подобрява липидния профил и при изследване, проведено върху здрави мъжки бройлери (5). 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 (14).

При хора ефектът на анетол върху енергийния метаболизъм и висцералното затлъстяване не е изследван. Все пак има клинични проучвания, разглеждащи влиянието на консумация-

та на копър. Двойно-сляпо рандомизирано плацебо-контролирано проучване, проведено върху постменопаузални жени, показва, че приемът на копър не води до значими разлики в липидния профил между изследваните групи – резултат, подобен на наблюдавания в нашия експеримент. Все пак при жените, суплементирани с копър, се наблюдава известно подобряване на нивата на HDL-холестерола в края на изследването в сравнение с изходните стойности (1). Според Bae и съавт., 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 (3). Подобно потискане на апетита е установено и от Kim и съавт., които подлагат жени със затлъстяване на ароматерапия с етерично масло от копър (11). Според Hur и съавт. при плъхове инхалацията на етерично масло от копър не повлиява нито наддаването на телесно тегло, нито количеството на приемана храна (8).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящото експериментално изследване показва, че третирането с анетол повлиява благоприятно висцералното затлъстяване, без да води до значимо повлияване на серумните нива на триглицеридите и холестерола при плъхове, получаващи висококалорична диета.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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, 24(1), 2018; 29–33.
2. Ahmed H. Kissebah, David S. Freedman, Alan N. Peiris. Health Risks of Obesity. Medical Clinics of North America,Volume 73, 1,1989; 111-138
3. Bae, JiYoung et al. Fennel (Foeniculum vulgare) and Fenugreek (Trigonella foenum-graecum) Tea Drinking Suppresses Subjective Short-term Appetite in Overweight Women.. Clinical nutrition research vol. 4,3. 2015; 168-74.
4. Bandyopadhyay, Dhrubajyoti et al. Safety and Efficacy of Extremely Low LDL-Cholesterol Levels and Its Prospects in Hyperlipidemia Management. Journal of lipids vol. 2018;8598054.
5. Caiyun Yu, Jiaqi Zhang, Qiming Li, Xiaoe Xiang, Zaibin Yang, Tian Wang,
6. 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
7. Gancheva S, Zhelyazkova-Savova M, Galunska B, Chervenkov T. Experimental models of metabolic syndrome in rats. Scripta Scientifica Medica, 2015, 47(2), 14-21.
8. 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.
9. 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 Apr; 36(2):236-43.
10. 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
11. 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
12. 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.
13. Marinov V, Vulcheva-Kuzmanova S. Review on the pharmacological activities of anethole. Scripta Scientifica Pharmaceutica, [S.l.], v. 2, n. 2, 2015; 14-19
14. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, Gitto E, Arrigo T. Oxidative stress in obesity: a critical component in human diseases. Int J Mol Sci. 2014, 26;16(1):378-400
15. 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.
16. Ponte EL, Sousa PL, Rocha MV, Soares PM, Coelho-de-Souza AN, Leal-Cardoso JH, Assreuy AM. Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. Pharmacol Rep. 2012;64(4):984-90
17. Samadi-Noshahr Z, Hadjzadeh M-A, Moradi-Marjaneh 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.

18. Song A, Park Y, Kim B, Lee SG. Modulation of Lipid Metabolism by Trans-Anethole in Hepatocytes. Molecules. 2020;25(21):4946

19. Walker S.Carlos Poston, John P. Foreyt,Obesity is an environmental issue,Atherosclerosis,Volume 146, 2,1999;201-209

20. Wright, SM, Aronne LJ. Causes of obesity. Abdom Radiol 37, 2012; 730–732

Адрес за кореспонденция:
Елис Рафаилова
Катедра по фармакология и клинична фармакология и терапия
ул. „Проф. Марин Дринов“ 55
Варна, 9000
e-mail: Elis.Rafailova@mu-varna.bg