



**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**  
**МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ**

---

**„Роля на серотонинергичната система във  
фармакологично повлияване на метаболитни функции“**

**/ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД/**

**ЗА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР”,  
в докторска програма: Фармакология (вкл. фармакокинетика и химиотерапия)**

**НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:**

Проф. д-р Румен Николов, д.м.  
Проф. д-р Надка Бояджиева, д.м.н.

**ДОКТОРАНТ:**

д-р Ивайло Богомилов

София, 2023

## Съдържание:

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ .....	4
ВЪВЕДЕНИЕ .....	6
А. Периферният серотонин - нов хормон, регулиращ множество метаболитни функции .....	6
1. Периферният серотонин, като регулатор на функцията на панкреатичната b-клетка .....	9
2. Периферният серотонин секретирани от червата - промотор на глюконеогенезата и инхибитор на усвояването на глюкозата от хепатоцитите .....	11
3. Периферният серотонин - нов хормон, който регулира функциите на мастната тъкан .....	13
4. Действие на периферния серотонин върху имунните клетки - възможно участие в регулирането на метаболизма .....	16
5. Серотонинът, като хормон в други периферни органи .....	18
6. Периферния серотонин, като средство за лечение на метаболитни нарушения .....	18
Б. Мозъчният серотонин и връзката му със затлъстяването и метаболитните заболявания .....	21
1. Затлъстяването и метаболитните заболявания като епидемия .....	21
2. Невробиологично регулиране на приема на храни .....	24
3. Серотонинергична и допаминергична сигнална трансмисия .....	28
4. Затлъстяването и серотонин- и допаминергична система .....	29
5. Хранителни навици и затлъстяване .....	32
6. Серотонинът като регулатор на глюкозен метаболизъм .....	33
В. Обобщение на литературния обзор .....	38
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ .....	40
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ .....	42
1. Експериментален модел, изследващ ролята на периферния серотонин при затлъстели и диабетни плъхове порода Вистар (Wistar), с използване на периферен серотонинов инхибитор – LP533401 .....	42
2. Експериментален модел, изследващ ролята на мозъчния серотонин при затлъстели и диабетни плъхове Wistar, с използване на селективен централен серотонинов агонист – WAY163909 .....	45
3. Експериментален модел, изследващ ролята на мозъчния серотонин, при затлъстели и диабетни плъхове Wistar, с използване на селективен централен серотонинов агонист – Ro60-0175 .....	49
4. Биохимични методи .....	52
5. ELISA (Enzyme Immunosorbent Assay) .....	53
6. Статистически методи .....	54

РЕЗУЛТАТИ.....	56
1. Ефект върху телесното тегло, кръвната захар, имунореактивния инсулин, нивото на инсулинова резистентност, лептин, и грелин, при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	56
1.1. Ефект върху телесното тегло при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	56
1.2. Ефект върху кръвната захар при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	58
1.3. Ефект върху стойностите на имунореактивен инсулин и инсулинова резистентност, изчислена чрез НОМА-индекс при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	62
1.4. Ефект върху стойностите на лептин при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	65
1.5. Ефект върху стойностите на грелин при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	67
2. Ефект върху телесното тегло, кръвната захар, имунореактивния инсулин, нивото на инсулиновата резистентност при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	70
2.1. Ефект върху телесното тегло при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	70
2.2. Ефект върху кръвната захар при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	73
2.3. Ефект върху стойностите на имунореактивен инсулин и инсулинова резистентност, изчислена чрез НОМА-индекс при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909.....	77
3. Ефект върху телесното тегло, кръвната захар, имунореактивния инсулин, нивото на инсулинова резистентност, изчислено чрез НОМА- индекс при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro 60-0175 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	81
3.1. Ефект върху телесното тегло при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro 60-0175 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	81
3.2. Ефект върху кръвната захар при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro 60-0175 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	83
3.3. Ефект върху стойностите на имунореактивен инсулин и инсулинова резистентност, изчислена чрез НОМА- индекс при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro 60-0175 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	87
ДИСКУСИЯ.....	91
ИЗВОДИ.....	97
ПРИНОСИ.....	99

Публикации, свързани с дисертационния труд: .....	101
Участия в конгреси, свързани с дисертационния труд:.....	102
ЛИТЕРАТУРА .....	104

## **ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ**

### ***На кирилица:***

ЗД тип 2 - захарен диабет тип II

КЗ - кръвна захар

т.т. – телесно тегло

ИРИ - имунореактивен инсулин

ИТМ - индекс на телесната маса

СЗО - Световната Здравна Организация

ГИТ - гастроинтестинален тракт

ЯМР - Ядрено магнитен резонанс

ЦНС - централна нервна система

КЕНИМУС - Комисия по Етика на Научните изследвания при Медицински Университет

### ***На латиница:***

BMI - body mass index

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

GLP1 - glucagon-like peptide 1

НОМА - homeostatic model assessment

5-НТ - 5-хидрокситриптамин, серотонин

ТРН - триптофан хидроксилазата

Trh - триптофан хидроксилаза

AADC - декарбоксилаза на ароматна киселина

5-НТ1-7 - хидрокситриптаминови рецептори подтип от 1 до 7

SERT - серотонинови транспортери

cAMP - цикличен аденозин монофосфат,

cADPR - цикличен аденозин дифосфат рибоза

IP3 - инозитол трифосфат.

PEPCK - фосфоенолпируват карбоксикиназа

PFK - фосфофруктокиназа  
GDS - gut-derived serotonin - серотонин, получен в червата  
G6Pase - глюкозо-6-фосфатаза  
FBPase - фруктоза 1,6-бисфосфатаза  
GLUT 1-14 - глюкозени транспортери подтип от 1 до 14  
FFA - на свободни мастни киселини  
HSL - хормон чувствителната липаза  
IRS-1 - субстрат-1 на инсулиновия рецептор  
PPAR- $\gamma$  - пероксизомен пролифератор-активиран рецептор гама  
Ucp-1 - разцепващ протеин 1  
LPS - липополизахарид  
SSRI - инхибитори на обратното захващане на серотонина  
NASH - неалкохолен стеатохепатит  
ARC - хипоталамусното аркуатно ядро или инфундибуларно ядро (IFN).  
VMH - вентромедиалното ядро  
DMH - дорзомедиалното ядро  
LH - латералните хипоталамусно ядра  
HTC - tractus solitaire  
PYY - пептид YY  
MSH -  $\alpha$  - меланоцит стимулиращ хормон  
POMC - проопиомеланокортин  
GABA -  $\gamma$ -аминомаслена киселина  
NPY - Невропептид Y  
AgRP - пептид, свързан с агути  
MC4R - меланокортин, 4 рецептор  
MSH - меланокортикотропен хормон.  
VTA - средния мозък  
NAc - striatal nucleus accumbens  
DA - допамин  
NAc - nucleus accumbens  
DAT - допаминов транспортер

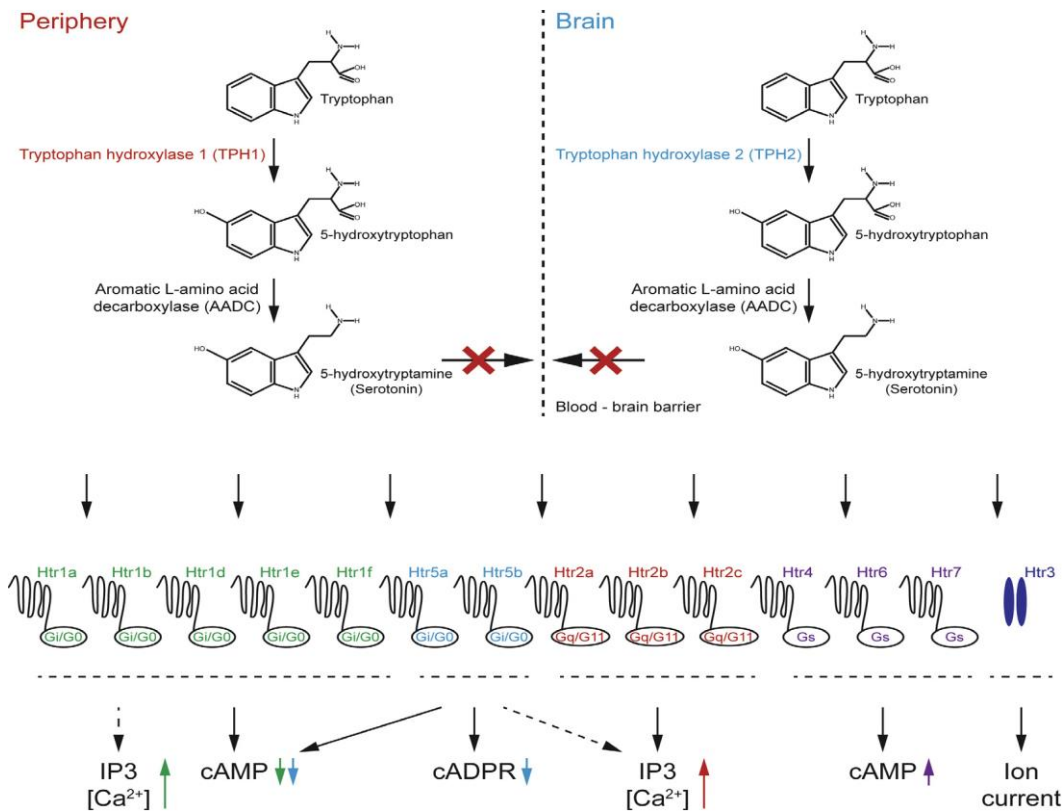
# ВЪВЕДЕНИЕ

## А. Периферният серотонин - нов хормон, регулиращ множество метаболитни функции

Серотонинът (5-хидрокситриптамин, 5-НТ) е биоамин, получен от аминокиселината триптофан. В клетките, продуциращи серотонин, триптофанът се хидроксилира от ензима, ограничаващ скоростта - триптофан хидроксилазата (ТРН) и впоследствие се декарбоксилира чрез декарбоксилаза на ароматна киселина (AADC) [1]. Серотонинът е открит в различни организми, включително гъбички, растения и безгръбначни [2-4]. При гръбначните животни могат да се разграничат две големи групи серотонин: мозъчен серотонин, синтезиран главно в мозъчния ствол, и периферен серотонин. Синтезът на серотонин в двете места се основава на ензима триптофан хидроксилаза, който се кодира от два различни гена, триптофан хидроксилаза 1 (Трh1) и триптофан хидроксилаза 2 (Трh2), експресирани съответно в периферията и в мозъка. Серотонинът не преминава кръвно-мозъчната бариера и по този начин всяка група от тази молекула има своите различни функции [5] (Фигура 1). В мозъка серотонинът служи като невротрансмитер, като регулира множество физиологични аспекти, включително: поведение, учене, апетит и глюкозна хомеостаза, които са подробно разгледани [6-8]. Все пак мозъчният серотонин представлява само около 5% от общия телесен серотонин [5]. Останалите 95% от серотонина се произвеждат в периферните органи и през последните години стана ясно, че той регулира множество функции и важни физиологични аспекти на организма.

В периферията голямото количество серотонин се получава от ентохромафинните клетки на червата. Серотонинът, получен от червата, може да действа локално в гастроинтестинален тракт (ГИТ) или да влезе в кръвообращението. В кръвта, серотонинът се приема и се съхранява от тромбоцитите и се освобождава по време на кръвосъсирването. Приблизително само 2% от серотонина в кръвта е свободен и може да действа директно като хормон [5] (Фигура 2). Интересно е, че множество други периферни клетъчни типове, включително панкреатични  $\beta$ -клетки [9,10], адипоцити [11] и остеокласти [12] могат да произвеждат серотонин. Така наличието на серотонин в периферните тъкани се определя както от местното производство, така и от концентрацията на свободния хормон в кръвта.

Серотонин-медираното сигнализиране в прицелните клетки допълнително се усложнява от съществуването на най-малко на четиринадесет различни рецептори за този хормон. Засега са идентифицирани седем класа серотонинови рецептори (5-хидрокситриптамин рецептори – 5-НТ) (от 5-НТ1 до 5-НТ7). Сред тях, 5-НТ3 е единственият рецептор за йонен канал, съдържащ лиганд за серотонин. Всички останали серотонинови рецептори принадлежат към суперсемейството на рецепторите, свързани с G-протеин. Въпреки това, различни класове от Htrs са свързани с различни G-протеини и предизвикват отделни вътреклетъчни сигнални каскади [5,13] (Фигура 1). Освен това, извънклетъчният серотонин може да бъде усвояван от различни клетъчни типове чрез серотонинови транспортери (SERT), впоследствие метаболизиран и разграждан. Важно е, че вътреклетъчните метаболити на серотонина също могат да действат като сигнализиращи молекули [14]. Затова е важно обобщаването на различните аспекти на авто-, пара- и ендокринните действия на серотонина, произвеждан в периферията, върху регулирането на глюкозната и липидната хомеостаза.



**Фигура 1. Серотонинов синтез и сигнализиране в мозъка и в периферията** (по R. El-Merahbi et al., 2015). Аминокиселината триптофан се хидроксилира чрез ограничаващия скоростта ензим триптофан хидроксилаза (Trh) и след това се декарбоксилира с декарбоксилаза на ароматна киселина (AADC). В гръбначните животни могат да се разграничат две форми на ТРН, кодирани от два различни гена: ТРН1, която се експресира в периферията, и Trh2, главно се намира в мозъка. Тъй като серотонинът не може да пресече кръвно-мозъчната бариера, тази молекула проявява различни функции в двете места. Серотонинът упражнява ефектите си в прицелните клетки чрез най-малко четиринадесет рецептора. Тринадесет от тях принадлежат към суперфамилията на G-протеин, свързаните рецепторите (GPCR). Сред тях се разграничават четири подфамилии, въз основа на тяхното свързване с различни G-протеини и използване на различни вторични посланици. 5-HT<sub>3</sub> е единственият рецептор - йонен канал за серотонин. На фигурата: cAMP - цикличен аденозин монофосфат, cADPR - цикличен аденозин дифосфат рибоза, IP<sub>3</sub> - инозитол трифосфат.

## **1. Периферният серотонин, като регулатор на функцията на панкреатичната $\beta$ -клетка**

Инсулин-произвеждащите панкреатични бета-клетки ( $\beta$ -клетки) са основният клетъчен тип, регулиращ глюкозата и липидната хомеостаза в организма. Инсулинът, като хормон, вкарва глюкозата в соматичните клетки, стимулира синтеза на гликоген и протеини, както и *de novo* липогенезата. В същото време инсулинът подтиска образуването на глюкоза в черния дроб (глюконеогенеза) и освобождаването на триглицериди, съхранявани в мастната тъкан (липолиза). Тъй като инсулинът регулира основните аспекти на хормоналната хомеостаза, неговото производство и секреция от панкреатичните  $\beta$ -клетки трябва да бъдат строго регулирани, за да отговорят на различни физиологични предизвикателства и на факторите на външната среда. Следователно, производството на инсулин, както и секрецията му от панкреатичната  $\beta$ -клетка се контролират не само от хранителните вещества (предимно храни богати на глюкоза), но и от нервната система и различни хормони.

Панкреатичните  $\beta$ -клетки имат общи черти на развитието с невроните, продуциращи серотонин от ромбенцефелона [17]. Всъщност, редица изследвания потвърждават, че ензимите, необходими за серотониновата синтеза и секрецията, също се експресират от  $\beta$ -клетките. Интересното е, че  $\beta$ -клетките експресират мозъчно и периферно специфични ограничаващи скоростта ензими за серотонинов синтез (Tph1 и Tph2) [9,10,17-19]. Следователно и локално произвеждания серотонин може да повлиява на функцията на панкреасните  $\beta$ -клетки.

Мишки с дефект в Tph1 (Tph1<sup>-/-</sup>) имат глюкозен интолеранс и развиват лека форма на диабет [10,20] поради нарушена инсулинова секреция от  $\beta$ -клетките [10]. Полман и съавтори демонстрират, как вътреклетъчната концентрация на серотонин корелира позитивно с инсулиновата секреция. Техните експерименти, проведени върху клетъчната линия INS1 с инсулином при плъхове, предполагат също, че извънклетъчният серотонин може да подтисне инсулиновата секреция [10]. Съответно, изолираните Tph1-дефектни  $\beta$ -клетки показват увреждане при екзоцитозата на инсулиновата гранула. Същото проучване показва, че междуклетъчният серотонин ковалентно свързва специфични малки GTP-ази (Rab3a и Rab27a), за да ги активира, което от своя страна стимулира глюкозо-медираната

инсулинова гранулна екзоцитоза. При Trh1 / мишки морфологията на панкреатичните острови, броя и размерите не са засегнати [10]. Взети заедно тези проучвания предполага, че серотонинът стимулира екзоцитозата на инсулиновите гранули от  $\beta$ -клетките по автокринен, независим от рецептора, начин. Трябва да се отбележи, че намаляването на нивата на серотонин в кръвообращението (чрез премахване на Trh1 в ентохромафинните клетки на червата) не повлиява на нивата на инсулина при мишки [20]. При премахване обаче на специфичната за панкреатичните  $\beta$ -клетъчна Trh1 се стига до понижена секреция на инсулин и на циркулиращите нива на инсулина в кръвта, както и до нарушен толеранс към глюкозата при диабетни мишки [21]. Същите автори показват, че промените в лиганд-зависимия йон-канален серотонинов рецептор Htr3a в панкреатичните  $\beta$ -клетки също води до нарушена секреция на инсулин и глюкозен нетолеранс, но само при мишки с диабет.

Общо, тези открития показват, че само локално произвежданият серотонин промотира панкреатичните  $\beta$ -клетки, функциониращи по зависимо и/или независим от рецептора (5-НТ3а) начин.

Панкреатичната  $\beta$ -клетъчна маса и инсулиновата секреция се увеличават по време на повишеното търсене на инсулин в периферията. Тези състояния се появяват по време на бременност. Експресията на Trh1, Trh2 и продуцирането на серотонин от  $\beta$ -клетките са значително повишени още 6 дни след зачеването [9]. Всъщност серотониновото сигнализиране по време на бременност се явява като адаптивна пролиферация на  $\beta$ -клетките. Серотонинът индуцира  $\beta$ -клетъчна пролиферация, която се осъществява чрез действие на G $\alpha$ q-свързан 5-НТ2b рецептор. Мишките с дефицит на 5-НТ2b, пък развиват гестационен диабет.

По време на бременността се наблюдава не само повишаване на масата на панкреатичните  $\beta$ -клетки, но и повишената им реакция към глюкозата. Неотдавнашно проучване на Охара-Имайзуми и колеги показва, че серотонинът също така насърчава този аспект на адаптацията на  $\beta$ -клетките към бременността [19]. Проуването показва, че серотонинът действа чрез Htr3a на Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup> -селективни йонни канални рецептори. Стимулацията на Htr3a активира вътрешния ток и деполяризира  $\beta$ -клетъчната мембрана, което води до намаляване на мембрания потенциал и по този начин до намаляване на глюкозния праг, от потенциал зависимите Ca<sup>2+</sup> каналчета, като се стимулира инсулиновата

екзоцитоза [19]. Като следствие от намалената секреция на инсулин, мишките с недостиг на 5-НТ3а рецептор развиват глюкозна нетолератност по време на бременност [19]. Въпреки че делецията на 5-НТ3а рецептора в  $\beta$ -клетките намалява тяхната адаптация към повишеното инсулиново потребление по време на бременност или състояние на периферната инсулинова резистентност, нейното заличаване не повлиява нивата на инсулина или глюкозния нетолеранс при здрави мишки. Серотонинът също може да допринесе за развитие на панкреатична  $\beta$ -клетъчна дисфункция при тежко затлъстяване и периферна инсулинова резистентност. В панкреатични острови, изолирани от мишки с диабет, експресията на серотониновия рецептор 5-НТ2с е повишена. Това свръхекспресиране на 5-НТ2с инхибира инсулиновата секреция при мишки с диабет.

Взети заедно изследванията показват, че локално произвежданият серотонин действа върху панкреасните  $\beta$ -клетки, за да се стимулира инсулиновата секреция, за да може да се адаптира организма към бременност или при периферна инсулинова резистентност. Въпреки това, серотонинът може също да промотира изчерпване и деструкция на  $\beta$ -клетките при наличие на диабет, но точните молекулни механизми остават да бъдат изследвани.

## **2. Периферният серотонин секретирани от червата - промотор на глюконеогенезата и инхибитор на усвояването на глюкозата от хепатоцитите**

Черният дроб играе централна роля в регулирането на нивата на кръвната захар. Когато хранителните вещества се намират в излишък, хепатоцитите абсорбират глюкозата и я съхраняват под формата на полизахариден гликоген. По време на ограничен хранителен прием, черният дроб първоначално поддържа нивата на глюкозата в циркулацията чрез дегранулирането на гликоген и по време на продължително гладуване чрез *de novo* глюкозен синтез (глюконеогенеза) от глицерол и аминокиселини. Черният дроб също е и главният орган, контролиращ кръвните триглицериди и нивата на холестерола. Инсулинът и глюкагонът са основните хормони, контролиращи метаболизма на хепатоцитите [23].

Няколко линии на доказателства показват, че периферният серотонин действа директно върху хепатоцитите. Периферният серотонин стимулира регенерацията на черния дроб след увреждане, като действа чрез *Htr2b* рецептора на хепатоцитите, за да стимулира тяхната пролиферация [24]. Освен това, активирането на *Htr2b* рецептора стимулира

пролиферацията и инхибира апоптозата на хепатоцелуларните ракови клетки, което трябва да се има в предвид [25].

Редица изследвания *in vitro* и *in vivo* показват, че периферният серотонин може също да регулира чернодробния глюкозен и липиден метаболизъм. Приложението на серотонин при плъхове води до повишена експресия на фосфоенолпируват карбоксикиназа (PEPCK) в черния дроб, което предполага, че серотонинът повишава чернодробната глюконеогенеза [26]. От друга страна, стимулирането на мишата чернодробна тъкан със серотонин води до повишена активност на фосфофруктокиназа (PFK), което показва, че серотонинът по-скоро провокира гликолизата в хепатоцитите [27]. В допълнение, *in vitro* експериментите показват, че в зависимост от концентрацията, серотонинът може да стимулира или инхибира синтеза на гликоген [28]. В проучването са изпитвани мишки, които имат недостиг на серотонин, получен в червата (Trh1-специфични knockout мишки), за да се проучи специфичния му ефект върху регулирането на чернодробната глюкоза. Резултатите показват, че мишките с недостиг на GDS (gut-derived serotonin - серотонин, получен в червата) показват по-добро периферно освобождаване на глюкозата и намалено производство на глюкоза в черния дроб. Важно е, че мишки с недостиг на Htr2b в хепатоцитите проявяват същия фенотип, което предполага, че серотонинът регулира метаболизма на глюкозата в черния дроб главно чрез този рецептор. Освен това, серотонинът повишава глюконеогенезата чрез повишаване на активността на два ензими, ограничаващи скоростта, необходими за този процес, глюкозо-6-фосфатаза (G6Pase) и фруктоза 1,6-бисфосфатаза (FBPase). В същото време, делецията на Htr2b рецептора, специфично в хепатоцитите, повишава усвояването на чернодробна глюкоза чрез предотвратяване на серотонин-медираното разграждане на глюкозния транспортер 2 (Glut2) [20]. Друго проучване, проведено при кучета (в рамките на 42-часа, през които животните са били държани будни), показва, че приложението на серотонин при животни, при които предварително е направена инфузия с инсулин, глюкагон и соматостатин, т.нар. *mic-euglycemic clamp*, води до нетно увеличаване на погълнатата от черния дроб глюкоза [29]. В работата на Watanabe et al., обаче, инжектирането на серотонин при гладни мишки води до повишени нива на глюкоза в кръвообращението и не повлиява значително на поемането на 2-дезоксиглюкоза в черния дроб [30]. Същото проучване съобщава, че серотонинът също може да намали нивата на триглицеридите и холестерола в

кръвообращението, което показва, че този хормон може да участва и в регулирането и лечението на дислипидемии и чернодробна стеатоза [30].

Взети заедно, генетичните изследвания показват, че GDS сигнализирането в хепатоцитите стимулира глюконеогенезата и потиска поглъщането на чернодробна глюкоза. Експериментите, базирани на инжектиране на серотонин с еднократна приложение на инжекцията, показват, че този биоамин може да окаже различни ефекти върху чернодробния метаболизъм на глюкозата в зависимост от вида, както и от хормоналния и физиологичния контекст.

### **3. Периферният серотонин - нов хормон, който регулира функциите на мастната тъкан**

Мастната тъкан или мазнина са специализирани в съхраняването на големи количества хранителни вещества. Два основни функционално различни типа мастна тъкан са разграничаваха доскоро - бяла и кафява мастна тъкан. Напоследък се идентифицира друг функционално значим подтип на мастната тъкан, наречен бежова или светла адипозна (мастна) тъкан. Бялата мастна тъкан действа като основно като съхранява енергия в организма. По време на хранене, адипоцитите абсорбират излишъка от липиди и захари, за да предпазят другите периферни органи от техните токсични ефекти. Адипоцитите отговарят на недостига на хранителни вещества чрез индуциране на липолиза -процес, който води до мобилизиране и освобождаване на свободни мастни киселини (FFA) и глицерол, чрез катаболизма на съхранените триглицериди. Кафявите и бежовите адипоцити в допълнение към капацитета си за съхранение на липиди също могат да разсейват енергията, за да провокират топлината и да поддържат оптимална телесна температура. В допълнение, всички видове адипоцити отделят множество хормони (адипокини), които регулират метаболизма на други органи [34]. Важно е, че неоптималния клирънс на хранителните вещества и повишеното продуциране на липиди от адипоцитите, както и намалената термогенеза и нарушенията в производството на адипокин, допринасят за развитието на метаболитни заболявания, като затлъстяване и диабет тип 2 (ЗД тип 2) [35].

Първите наблюдения, показващи, че периферният серотонин може да участва в регулирането на функцията на адипоцитите, са направени още през 1967 г. Инжектирането на серотонин върху здрави хора повишава нивата на свободни мастни киселини (FFA) и

глицерол в кръвта, което показва индуциране на липолизата. Освен това серотониновото стимулиране на човешка подкожна бяла мастна тъкан от биопсии и на експланти на бяла мастна тъкан от лабораторни плъхове увеличава освобождаването на глицерол [36]. Наскоро излязоха данни, че инжектирането на серотонин при мишки на гладно (което увеличава плазмените му нива над 70 пъти) води до намалени нива на FFA [30]. Това предполага, че високото повишаване на нивата на серотонина в кръвта може да има противоположни ефекти, сравнено с умереното повишаване на концентрацията на хормона. Нивата на GDS се индуцират в кръвта при лишаване от храна. Използвайки мишки, с дефект на Trh1 в стомашно-чревния тракт, GDS е необходим за максимално активиране на липолизата по време на гладуване. Допълнителни анализи показват, че серотонинът стимулира липолизата в белите адипоцити чрез въздействие върху неговия рецептор 5-HT2b, за да активира хормон чувствителната липаза (HSL). В съответствие с това наблюдение, при специфична за адипоцитите аблация на 5-HT2b води до редуциране на FFAs и глицеролови нива в кръвта на гладни мишки [20]. Освен това, стимулирането на Htr2b рецептора чрез GDS може също да потисне липогенезата [37]. Серотониновото стимулиране на белите адипоцити води до нарушено инсулиново действие, разграждане на субстрат-1 на инсулиновия рецептор (IRS-1) и намалено усвояване на глюкоза [38]. Въпреки, че 5-HT2b изглежда необходим за правилното манипулиране на липидите от белите адипоцити, 5-HT2a и 5-HT2c рецепторите също се експресират в тези клетки. Адипоцитите изглежда експресират Trh1 и серотонинов транспортер (SERT) и поради това функцията на тези клетки могат също да бъдат регулирани от серотонина по автокринен начин [11]. Всъщност, делецията на Trh1 в преадипоцитната клетъчна линия 3T3-L1 води до дефект при диференциране на тези клетки към адипоцитите и до намалена експресия на ключов транскрипционен фактор, необходим за адипоцитна диференциация - пероксизомен пролифератор-активиран рецептор гама (PPAR- $\gamma$ ) [39,40]. Инжектирането на Trh1-дефицитните 3T3-L1 клетки със серотонин води до диференцирането на тези клетки в адипоцити, което предполага автокринно действие на серотонин, продуциран от преадипоцити. Локално продуцираният серотонин промотира диференциацията на адипоцитите поне частично, действайки чрез 5-HT2a и 5-HT2c рецепторите, както се вижда от тяхното фармакологично инхибиране. Въпреки това, серотонинът може да стимулира диференциацията на адипоцитите по независим от рецептора начин. Последните проучвания показват, че SERT-медираното поемане и

последващото разграждане на серотонина в преадипоцитите води до генерирането на 5-хидроксииндол ацетат и 5-метоксииндолацетат, които могат да действат като PPAR- $\gamma$  агонисти, за да подпомогнат диференциацията на адипоцитите [14]. В допълнение, сигналите предавани чрез 5-HT<sub>2a</sub> рецептор потискат експресията на адипонектин [41], който подпомага периферната инсулинова чувствителност [31], но в същото време стимулира липогенезата в тези клетки [42].

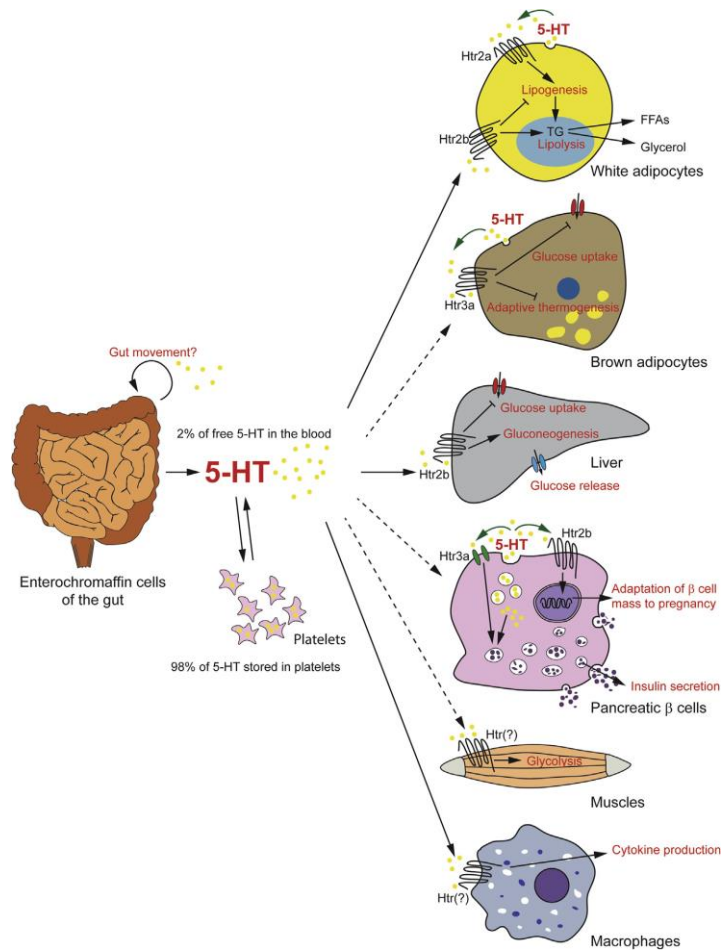
Последните проучвания показват, че серотонинът действа и върху кафявите и върху бежавите адипоцити. При затлъстели мишки локалната концентрация на серотонин в кафявата мастна тъкан е значително повишена [43]. Серотониновото стимулиране на кафявите адипоцити блокира катехоламин - (адренергичното) индуцираното сигнализиране и следователно експресията на термогенезата, стимулираща ключовия фактор - разцепващ протеин 1 (Ucp-1). Това води до намаляване на термогенезата и намалено разсейване на енергията от кафяви адипоцити [43]. В съответствие с това мишките с заличаване на Trp1 гена (Trp1 / мишки), хранени с диета с високо съдържание на мазнини, показват повишена термогенеза и изразходване на енергия и са резистентни към затлъстяване [43]. Трябва да се отбележи, че както при белите адипоцити, серотониновото стимулиране на кафявите адипоцити блокира усвояването на глюкоза [43]. Друга изследователска група открива, че серотонинът, продуциран локално от адипоцитите, е отговорен за потискането на адаптивната термогенеза в кафявите и бежавите адипоцити. Всъщност, премахването на Trp1 само в адипоцитите води до повишено експресия на Ucp-1 и изразходване на енергия, както и до резистентност към затлъстяване, причинено от преяждане. Освен това същата изследователска група показва, че серотонинът действа върху кафяво-бежавите адипоцити чрез рецептора 5-HT<sub>3a</sub> [42].

В заключение, серотониновото сигнализиране в белите адипоцити повишава липолизата и инсулиновата резистентност и потиска усвояването на глюкоза и производството на адипонектин. Освен това стимулирането на 5-HT<sub>2b</sub> рецептора може да потисне липогенезата. Серотонинът, произвеждан локално от белите адипоцитите, действа върху кафявите адипоцити като потиска термогенезата.

#### **4. Действие на периферния серотонин върху имунните клетки - възможно участие в регулирането на метаболизма**

Докато периферният серотонин директно регулира метаболизма на панкреасните  $\beta$ -клетки, черния дроб и адипоцитите, той действа и върху различни видове имунни клетки, които могат да повлияят на функцията на органите, регулиращи глюкозата и липидната хомеостаза. Добре е установено, че хронично нискостепенно възпаление при пациенти със затлъстяване, свързани с повишени нива на провъзпалителни цитокини, допринася за периферната инсулинова резистентност и панкреатичната  $\beta$ -клетъчна недостатъчност.

Периферният серотонин действа върху няколко възпалителни клетъчни типа. Той насърчава неутрофилната миграция до мястото на възпаление [45]. Изследванията, използващи мишки с дефицит на Trh1, показват, че периферният серотонин изостря развитието на възпалителни заболявания, например колит, като стимулира макрофагите и отделянето на възпалителни цитокини [46]. От друга страна, експериментите върху изолирани макрофаги предполагат, че периферният серотонин може по-скоро да инхибира секрецията на възпалителни цитокини, индуцирана от липополизахарид (LPS) [47]. Периферното действие на серотонин в макрофаги и други имунни клетки върху регулирането на метаболизма на глюкозата и липидите остава слабо проучено.



Фигура 2. Регулация на метаболизма от периферния серотонин (по R. El- Merahbi et al., 2015). По-голямата част от серотонина се произвежда от ентохромафинови клетки на червата (GDS), където може да действа локално или може да влезе в общото кръвообращение. В кръвта серотонинът се приема и съхранява от тромбоцитите. Само около 2% от серотонина в кръвта е свободен в плазмата и може директно да действа като хормон. Серотонинът от GDS действа в бели адипоцити главно чрез 5-HT<sub>2b</sub> рецептор. Той насърчава липолизата и следователно секрецията на свободни мастни киселини (FFAs) и глицерол. Серотонинът може също да се произвежда от адипоцити и да регулира липогенезата чрез 5-HT<sub>2a</sub> и 5-HT<sub>2b</sub> рецептори. В кафявите адипоцити серотонинът потиска адаптивната термогенеза и усвояване на глюкоза чрез действието си върху 5-HT<sub>3a</sub>. В черния дроб серотонинът от GDS насърчава глюконеогенезата и инхибира поглъщането на глюкоза, като действа чрез 5-HT<sub>2b</sub> рецептор. Серотонинът също може да бъде произведен от панкреатични  $\beta$ -клетки. Локално произвеният серотонин насърчава секрецията на инсулин от  $\beta$ -клетките на панкреаса, като действа чрез Htr<sub>3a</sub> рецептора или действайки на вътреклетъчни ефекторни протеини директно. Нещо повече, той насърчава полиферацията на  $\beta$ -клетките на панкреаса по време на бременност чрез подаване на сигнал през 5-HT<sub>2b</sub> рецептора. Периферният серотонин може също да насърчи гликолизата в скелетните мускули и да модулира производството на цитокини при възпаление, което може да повлияе на периферната чувствителност към инсулин.

## **5. Серотонинът, като хормон в други периферни органи**

Наличните *in vitro* експерименти предполагат, че периферният серотонин може също да повлияе на глюкозната хомеостаза в скелетните мускули. Серотониновият рецептор 5-HT<sub>2a</sub> е открит както в гладките, така и в напречно набразнените мускулни влакна [48]. Други експерименти показват, че серотонинът стимулира активността на скелетната мускулатура и по този начин увеличава консумацията на глюкоза в мускулите чрез стимулиране на гликогенолизата [49,50]. Въпреки това, в този момент липсва генетичен анализ *in vivo* на тези процеси.

По-голямата част от серотонина се продуцира в стомашно-чревния тракт от ентохромафинови клетки. Само малка част от серотонина обаче влиза в общата циркулация [5]. Поради това е разумно да се предположи, че серотонинът действа и локално в стомашно-чревния тракт. Всъщност, GDS медира възпалителни процеси в червата, което беше разгледано подробно [51]. Също така се предполага, че серотонинът регулира чревния мотилитет [51]. Скоростно проучване показва, че мишките с дефицит на Trp1 показват нормално общото време за преминаване на храната през ГИТ [52] и съответно не се наблюдават промени в телесното тегло при мишки с дефицит на Trp1 в червата. Също така тези животни показват нормален прием на храна и общ разход на енергия [20]. По този начин, действието на GDS в стомашно-чревния тракт може индиректно да повлияе на метаболитната хомеостаза.

## **6. Периферният серотонин, като средство за лечение на метаболитни нарушения**

Нарушения в метаболизма на глюкозата и липидите може да доведе до развитието на множество метаболитни заболявания, включително диабет. Хипергликемията и хиперлипидемията са отличителните белези на захарен диабет, които се дължат на периферната инсулинова резистентност в комбинация с неспособността на панкреасните  $\beta$ -клетки да произвеждат инсулин в достатъчни количества.

Инхибитори на обратното захващане на серотонин (SSR - инхибитори), които увеличават серотонина в централната нервна система, често се използват за лечение на психични разстройства [6]. Въпреки това, терапевтичният потенциал на серотониновата система в периферията все още не е напълно проучен досега. Тъй като серотонинът не

преминава кръвно-мозъчната бариера и по-голямата част от клетките, продуциращи серотонин в периферията, се намират в стомашно-чревния тракт, именно продукцията му там би била от най-важна роля, в бъдещи проучвания и търсене на неговото приложение при лечение на различни метаболитни нарушения. Метаболитните анализи на серума при затлъстели мишки, с инсулинова резистентност, показват по-голямо от 7-кратно увеличение на концентрацията на серотонин в сравнение с това при незатлъстели мишки без инсулинова резистентност [53]. Освен това, като се има предвид, че намаляването на серотониновия синтез в периферията води до понижена липолиза и чернодробна глюконеогенеза в комбинация с повишено усвояване на глюкоза в черния дроб [20] и същевременно насърчава разсейването на енергия от кафяви адипоцити [42,43], може да се предскаже, че инхибирането на продукцията на GDS може да подобри контрола на КЗ при захарния диабет тип 2.

В действителност, Trh1 инхибитори, които намаляват нивата на серотонина в циркулацията, без да повлияват мозъчния серотонин, са налични и са тествани при животински модели [54]. Следователно, блокирането на серотониновия синтез в периферията може да бъде привлекателна стратегия за лечение на диабет тип 2 и при хора.

Въпреки, че серотонинът е решаващ фактор, поддържащ функцията на панкреасните  $\beta$ -клетки [9,10], Trh1 инхибитора не повлиява на периферните нива на инсулина. Този резултат може да подсказва, че дозата на инхибитора, използвана в част от експериментите, е достатъчна да потисне серотониновия синтез в ентохромафиновите клетки на червата, но не и в панкреатичните  $\beta$ -клетки.

Наскоро Крейн и колеги също използваха периферен серотонинов инхибитор при мишки за лечение на диабет, предизвикан от затлъстяване. Те третират експериментални животни с ежедневни интраперитонеални инжекции на този инхибитор, а не перорална доза. Инжекционно приложение на периферен серотонинов инхибитор на мишки води до намаляване на хипергликемията и периферната инсулинова резистентност и допълнително увеличава енергийния разход на мишките и намалява затлъстяването [43]. Подобни резултати са получени и от друга изследователска група [42].

Тъй като диабетът тип 2 обикновено се свързва с повишен риск от развитие на други метаболитни нарушения като атеросклероза или чернодробна стеатоза, би било от

решаващо значение да се изследва въздействието на инхибиторите на Trp1 върху развитието на тези заболявания. Всъщност, инхибирането на синтеза на GDS е патентовано като метод за предотвратяване и лечение на хиперлипидемия и атеросклероза [55]. Освен това многобройни проучвания предполагат, че инхибитори на синтеза на GDS могат да бъдат полезни при лечението на възпалителни заболявания [45,46,51], както и остеопороза с ниска костна маса [56]. Следователно, Trp1 инхибиторите могат да служат като мултицелево лекарство в бъдеще.

Въпреки, че въздействията на серотонина, произвеждан в централната нервна система при регулирането на поведението и физиологията, е бил в центъра на научния интерес от десетилетия насам, доскоро периферният серотонин е бил игнориран. Напоследък стана ясно, че серотониновата система в периферията регулира множество физиологични аспекти, независимо от мозъчния серотонин. По-специално, периферният серотонин играе централна функция в регулирането на глюкозната и липидната хомеостаза чрез действие върху различни органи и клетъчни типове. Серотонинът, продуциран в панкреатичните  $\beta$ -клетки, промотира инсулиновата секреция и по време на бременността също както и  $\beta$ -клетъчна пролиферация [9,10,19,21,22]. Серотонинът, произведен в червата, действа върху черния дроб, за да стимулира глюконеогенезата и да потисне чернодробното усвояване на глюкоза [20] и върху белите адипоцити, за да стимулира липолизата [20] и да потисне усвояването на глюкоза, производството на адипонектин и инсулиновото действие [38,41]. Серотонинът, продуциран директно от адипоцитите, потиска термогенезата и усвояването на глюкоза в друг функционален тип масти - кафява мастна тъкан [42,43]. Освен това, серотонинът може да действа директно върху мускулите, за да стимулира гликолизата [49,50], и подпомага производството на цитокини в макрофагите [46] (Фигура 2).

Серотониновото сигнализиране в периферията показва огромна сложност поради множеството места на производство на тази молекула, способността ѝ да действа като авто-, пара- и ендокринен фактор и съществуването на поне 14 серотонинови рецептора. Това множество от действия на периферния серотонин се разкри напоследък. Интересът върху периферния серотонин е силно стимулиран от факта, че периферния серотонинов синтез и системите за сигнализиране показват голям терапевтичен потенциал при възпалителни и костни дегенеративни заболявания и при различни форми на диабет и затлъстяване.

## **Б. Мозъчният серотонин и връзката му със затлъстяването и метаболитните заболявания**

### **1. Затлъстяването и метаболитните заболявания като епидемия**

Затлъстяването се определя от Световната здравна организация (СЗО) като ИТМ > 30 кг/м<sup>2</sup> (BMI- body mass index, ИТМ – индекс на телесната маса) и е световен проблем с пандемичен характер (www.who.int Файл № 311, май 2014 г.). В САЩ повече от една трета от населението е със затлъстяване [57,58], докато в България 51,2% от възрастното население е с наднормено тегло (за наднормено тегло се приема ИТМ между  $\geq 25$  kg / m<sup>2</sup> и <30 kg / m<sup>2</sup>), като от тях 33,1% със затлъстяване. Затлъстяването увеличава риска от развитието на метаболитен синдром [59] и свързаните с него съпътстващи заболявания като сърдечно-съдови заболявания, захарен диабет тип 2 (ЗД тип 2), неалкохолен мастен черен дроб, (неалкохолен стеатохепатит (NASH), нарушение в хомеостазата на мазнини и редица малигнени заболявания на различни органи и системи [60-62]. Разходите за здравеопазване, свързани със затлъстяването в САЩ, се оценяват на 147 млрд. долара годишно, което е почти 10% от бюджета на здравно осигурителните органи там [63], а средно за страните от ЕС, разходите за здравно обслужване, свързани със затлъстяването, са около 705 млн. евро годишно за 2012 г. [64], което подчертава общественото значение на затлъстяването като болест. Поради всички тези причини през 1997 година Световната здравна организация признава затлъстяването като болест. [65]. Прогнозните средства, които ще се отделят за лечение на затлъстяването и заболяванията, които са свързани с него се очаква да нараснат с 10-20% през следващите две десетилетия, докато намаляването на ИТМ само с 10% сред световното население би спестило на здравните системи разходи в размер на милиарди щатски долара [63]. Имайки предвид изброените по-горе причини затлъстяването се явява обект на интерес на много изследователи през последните години.

Поднормено тегло	ИТМ < 18.5
Нормално тегло	ИТМ 18.5-24.9
Наднормено тегло	ИТМ 25-29.9
Затлъстяване клас I (Умерено затлъстяване)	ИТМ 30-35
Затлъстяване клас II (Тежко затлъстяване)	ИТМ 35-39.9
Затлъстяване клас III (високостепенно – болестно затлъстяване)	ИТМ $\geq$ 40
Свръх затлъстяване	ИТМ $\geq$ 50
Свръх свръхзатлъстяване	ИТМ $\geq$ 60

Таблица 1. Класификация на затлъстяването спрямо ИТМ по СЗО, ИТМ= тегло в кг/р<sup>2</sup> в см.

Надаването на телесно тегло и увеличаване на мазнините в тялото се получава, когато енергийният прием (т.е. храната) надвишава енергийния разход и следователно прекомерният прием на храна и липсата на физически активност се считат за основни причини за затлъстяване. Разбира се много други причини, включително генетични и епигенетични, трябва да бъдат взети под внимание и са обект на изследвания и научна дейност. Последните данни от СЗО показва, че броя на хората с недостатъчна физическа активност нараства в много страни по света (www.who.int Fact Sheet № 385, февруари 2014). Нарастването на хората със затлъстяване в световен мащаб става едновременно и с увеличаването на приемането на висококалорична храна, и такива богати на захари и мазнини [66]. Прекомерната консумация на този вид храна е свързана не само със затлъстяването, като изолирано заболяване, но и с развитието на мастен черен дроб [67], абдоминално (вицерален) тип затлъстяване [68] и ЗД тип 2 [69]. Освен прекомерната консумация на мазнини и захари, моделът на хранене се е променил през последните

десетилетия, като показва тенденция към увеличаване на честотата на храненията. Така например американските деца консумират до 27% от калорийния си прием, отредени за деня, от междинни „закуски“, като снаксове, чипсове и т.н. [70], като това поведение на хранене и „заучаването“ още от ранна детска възраст, на подобен режим на прием на храна допринася за затлъстяването, както и за метаболитните му последствия [71-73]. Намаляването на физическата активност и увеличаването на броя на храненията и то с храни с високо съдържание на калории водят до увеличаване на теглото. Основният въпрос е защо хората не намаляват прием на калории, въпреки ясната представа за последствията от консумирането на храни богати на захари и мазнини.

През последните години, образователното равнище на населението в развитите страни, където и затлъстяването е основен проблем, се повишава, като повече възрастни хора осъзнават значението на ИТМ [74,75], както и неблагоприятните аспекти на храните, богати на захари и мазнини, и факта, че затлъстяването увеличава риска от заболявания като ЗД тип 2. Въпреки това общо осъзнаване на проблема, разпространението на затлъстяването достига пандемични размери, което показва, че поне част от населението не е в състояние да регулира собствения си енергиен баланс.

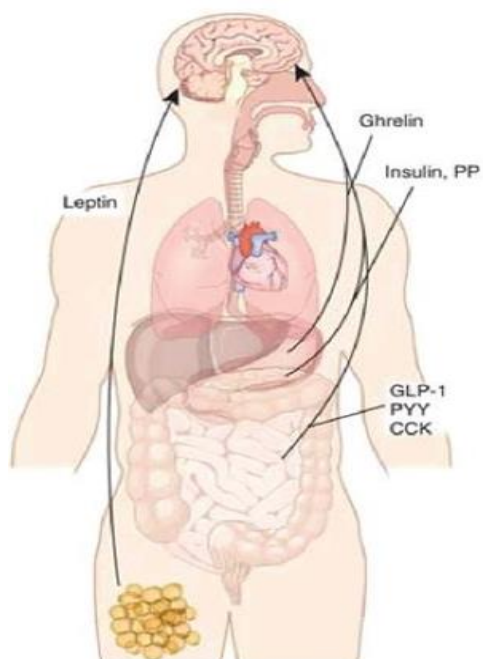
Регулацията на енергийния баланс в значителна част е под автономен контрол и не винаги е само съзнателен процес. Макар, че решение за консумация на храна и физическа активност е полудоброволно, чувството за глад, ситост и мотивация за хранене са сложни процеси. Регулирането на глада и ситостта, както и "харесването" и "желанието" на определена храната се регулират от мозъка. Общоприетото мнение е, че дисбаланса в определени процеси на ниво ЦНС, участващи в регулирането на приема на храна, допринася за затлъстяването [76]. Хомеостатичните такива, както компоненти от т. нар. система на възнаграждение (rewarding system) свързана с храненето, водят до сложни поведенчески и адаптационни процеси, свързани и с действителните калорийни нужди. Очевидно тези адаптационни процеси се оказват не функциониращи поне за една трета от възрастното население, живеещо в западния свят. Обяснение може да се търси в нарушение на хомеостатичния контрол регулиран главно от хипоталамуса, или с дисфункция на процесите, осъществяващи се на ниво rewarding system, в кортиколимбичните области, както и като комбинация от двете. Тъй като цялостното поведение на хранене е резултат от

частично изяснено комплексно взаимодействие между тези главни пътища, са нужни задълбочени проучвания, за да се разграничат смущенията, възникващи при индивидите, които преяждат. При хората, част от тези пътища могат да бъдат изследвани чрез комбиниране на техники за невроизображение и въпросници относно поведенческите модели по отношение на хранителните им навици. До този момент, повечето от данните, съществуващи в научната литература за молекулярните механизми, при дисрегулация свързани с храненето се основават главно на данни от проучвания при гризачи. Друг важен фактор е съществуването на доказателства за ролята на ЦНС в метаболитните последици от затлъстяването, като инсулинова резистентност и дислипидемия [77]. Мозъчните области, участващи в хомеостатичния контрол на енергийния баланс и мозъчни пътища, участващи в системата свързана/ с чувството за “награда” (rewarding system), наскоро се доказва, че са въввлечени и в метаболизма на глюкозата и липидите [78-89]. Повечето данни до този момент са на базата от проучвания при гризачи, като е важно да се направи анализ при хората, за да се разберат механизмите и като крайна цел, да се заложи намирането на възможност за “лечение“ или “контролиране“ на затлъстяването и неговите метаболитни последици. Тази цел може да се постигне, ако проучванията се фокусират върху серотониновите транспортери в хипоталамусната област и върху допаминовите транспортери в стриатума, за които е известно, че играят централна роля в регулирането на енергийния баланс.

## **2. Невробиологично регулиране на приема на храни**

За да контролира приема на храна и енергийния баланс, мозъкът получава и интегрира периферни сигнали от различни органи (фигура 3), участващи в енергийния метаболизъм. Тази интеграция включва сложна мрежа от ядра в рамките на мозъка, хипоталамуса и мезокортиколимбичните области. Хипоталамусът служи като хомеостатичен контролен център, който регулира енергийния метаболизъм и се състои от множество ядра с различни функции. Що се отнася до регулирането на приема на храна важна роля играе хипоталамусното аркуатно ядро (hypothalamic arcuate nucleus ARC), наричано също и инфундибуларно ядро (IFN). Кръвно-мозъчната бариера в ARC се счита за "изтънена" и затова хормоните лесно могат да навлязат и активират невроните в ARC, като по този начин регулират енергийния метаболизъм [80]. При активирането на невроните от групата на ARC, които са свързани с орексигения неuropeптид Y (NPY) / agouti (AgRP) се стимулира приема на храна, докато при активирането на невроните, свързани с

анорексигенни пропиомеланокортин (POMC), водят до инхибиране приема на храна. Невроните на ARC дават проекции към няколко различни хипоталамични ядра, като например вентромедиалното (VMH), дорзомедиалното (DMH) и латералните (LH) хипоталамосни ядра, като и към други ядра, които участват в поддържането на енергийната хомеостаза. Освен това ARC има проекции и към паравентрикуларното ядро (PVN), централно разположено в хипоталамуса и считано за контролен център за интегриране на различни сигнали от и извън хипоталамуса за регулиране на функцията на предната част на хипофизата, разхода на енергия и приемането на храна [81]. PVN допълнително интегрира информация, получена от стомашно чревния тракт, чрез вагалните аферентни нерви и от ядрото на tractus solitaire (HTC) в мозъчния ствол [82;83], като по този начин допринася за поведенческите процеси свързани с храненето.



Фигура 3.

Хормони, като инсулин, освободен от панкреаса, лептин, отделен от адипоцитите и грелин, продуциран от стомаха и чревни пептиди като: глюкагоноподобен пептид 1 (GLP-1), пептид YY (PYY) и холецистокинин действа върху периферните нерви и в мозъка, за да сигнализира за енергийния баланс.

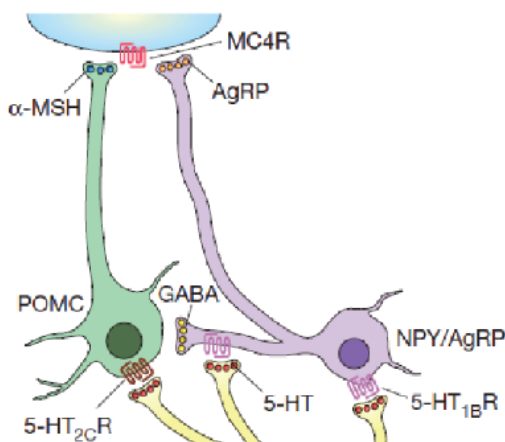
Адаптирано от: От невронатомия до поведение: централна интеграция на периферни сигнали, регулиращи поведението при хранене ". К. Уилямс & Дж. К. Елмиквист. Nature Neuroscience 15,1350-1355 (2010)

Хипоталамичните зони като PVN и ARC получават плътни проекции от серотонергични неврони, произхождащи от дорзалните рафични ядра (dorsal raphe nuclei).

Серотонинът (5-хидрокситриптамин, 5-НТ) действа като модулиращ невротрансмитер, който координира многобройни когнитивни, автономни и други функции за поддържане на хомеостазата и затова играе важна роля в регулирането на енергийния баланс. Приложението на серотонин в хипоталамичната област, потенциално намалява приема на храна и е доказано, че целостта на хипоталамуса е задължителна за нормалната реакция към серотонинергичните лекарства [85]. 5-НТ влакна се свързват с NPY неврони в ARC [86], като 5-НТ увеличава активността на NPY свързаните невроните, като невронални проекции в ARC-PVN [87], но все още не е известно дали това включва директни ефекти на серотонина върху NPY невроните в ARC. За анорексигенните неврони обаче се знае, че инхибиторът на обратното захващане на серотонин d-FEN увеличава спонтанната скорост на активиране на POMC невроните в ARC, които също експресират 5-НТ<sub>2c</sub> рецепторите, като същевременно увеличава освобождаването на  $\alpha$ -меланоцит стимулиращ хормон (MSH; от POMC), като по този начин осигуряват механизъм, чрез който серотонина пряко действа в ARC, като намалява желанието за прием на храна [88].

В изследванията при хора е доказано, че лекарства, които увеличават серотонинергичното сигнализиране, като 2C-рецепторните агонисти на серотонина - lorcaserin и fenfluramine, оказват хипофагични ефекти, което се потвърждава и от проведените проучвания при гризачи, като се предполага, че серотонинът играе важна роля в регулацията на приема на храна при хора [89-91]. В допълнение, субкортикалният серотонинов транспорт е пряко свързан с ИТМ при хората [92].

Взети заедно тези данни показват, че хипоталамусът интегрира входящата информация за нуждите от хранене и енергийните запаси чрез сложна мрежа от орексигенни и анорексигенни клетъчни популации, а невротрансмитерът серотонин участва в тази сложна регулаторна система. Трябва да се подчертае, че по-голямата част от данните за мозъчните схеми, участващи в поведението при храненето, са получени от проучвания с гризачи, тъй като човешкият мозък не е лесно достъпен за *in vivo* изследвания.



Фигура 4. Серотонин и енергия баланс: молекулярни механизми и последици за диабет тип 2 (DD Lam & LK Heisler Exp Rev Mol Med. 9 (5), стр. 1-24, 2007, Cambridge University Press). Серотонин в арковидното ядро (ARC). 5-HT = серотонин, 5-HT1BR - = серотонин 1B рецептор; 5-HT2CR - = серотонин 2C рецептор; POMC = проопиомеланокортин; GABA = у-аминомаслена киселина; NPY = Невропептид Y, AgRP = пептид, свързан с агути; MC4R = меланокортин, 4 рецептор; MSH = стимулиран с меланокортин хормон.

Приемането на храна се влияе не само от хомеостатичния контрол, но и от възнаграждащите свойства на храната (усещанията, носещи удоволствие от храненето) (фиг. 4), заучените навици свързани с храната и хедонистичните свойства на самата храна [93]. Мозъчните зони, които участват в чувството за награждаване, варират от средния мозък (VTA) до лимбични структури (вентрален стриатум, амигдала, хипокампус и части от (пре) фронталната кора) и са част от мезокортиколибичния път или път на възнаграждението [94]. Чувството за награда има две отличими компоненти, а именно „желание“ и „харесване“, което се отнася съответно до мотивацията и хедонистичните аспекти на самото хранене. Предполага се, че тези два компонента се регулират от два различни нервни субстрата - допамин за „желанието“ и опиоиди за „харесването“ [95]. В striatal nucleus accumbens (NAc), съществуват подобни вериги, включващи тези две субстрати. Въпреки че, допаминът традиционно се счита за основен регулатор на хедонизма, сега се вярва, че "харесването" на храната или хедонистичното усещане за удоволствие, когато се приема храна, включва стриатумната опиоидна система (т.е. участват енкефалин и  $\beta$ -ендорфини). [96]. За разлика от "желанието" за хранене, наричано още мотивация за получаване на храна или "стимулираща проба", която се приписва конкретно на стриатната допаминова система [97; 98]. Храната сама по себе си и хранителните стимули (миризма, това как изглежда храната и др.)

предизвикват освобождаване в стриатум на допамин, което предизвиква "желанието" за или на самата храна [99]. Изследванията обаче показват и връзка между нивата на допамина в стриатума и количествено измерение на удоволствието, което се получава при определена храна при хората [100], което предполага, че допаминът може да играе роля и в „харесването“, от където може да се заключи, че двете системи, с които могат да се опишат „желанието“ и „харесването“ за хранене, са взаимно свързани.

Именно по тази причина може да се каже, че хипоталамните и мезокортиколимбичните пътища са силно интегрирани и свързани, за да се гарантира подходящо поведение при хранене в отговор на калорийните нужди. Това се осъществява от директните и индиректните анатомични връзки между хипоталамуса и стриатума и между хипоталамуса и VTA [94; 96]. Инфузията на NPY в страничния хипоталамус, nucleus accumbens, както и в VTA води до промяна на мотивационното поведение свързано с храненето [101; 102], а инжектирането в стриатума на опиоиди предизвиква чувства, които биват подобни на тези, когато се консумира „вкусна храна“. Това чувство може да бъде блокирано чрез инхибиране на активността на латералния хипоталамус [103; 104], демонстрирайки участието на всички тези области на мозъка и функционалността на връзките между тези структури за регулиране на поведението при хранене.

### **3. Серотонинергична и допаминергична сигнална трансмисия**

Серотонинът и допаминът са модулационни невротрансмитери в интегрираната мрежа от хипоталамусни и мезокортиколимбични пътища, които регулират енергийния баланс. Серотонинът се синтезира от аминокиселината триптофан в мозъчните ядра, а допамина (DA) от фенилаланин в средния мозък, VTA и substantia nigra. Възходящите серотонинергични влакна се събират в медиалния мозъчен пакет и дават проекции към голямо разнообразие от мозъчни региони: кортекс, хипокампус, таламус, хипоталамус, стриатум, амигдала и nucleus accumbens [105]. Допаминергичните проекции на VTA към nucleus accumbens (NAc), медиалният префронтален кортекс, хипокампуса и амигдалата са основно включени в регулирането на чувството за награждаване / мотивация [106], докато

проекциите от *substantia nigra* към *striatum*, *globus pallidus* и субталамичното ядро, играят важна роля в мотивацията на двигателния контрол като цяло [107].

От местата на образуване на невротрансмитерите се транспортират до пресинаптични неврони, където се съхраняват във везикули и се освобождават в синаптичната цепка при активиране на специфични неврони и последващо свързване със съответните рецептори. Съществуват 5 субтипа на допаминовите рецептори при бозайници (D1R-D5R) [108] и 7 класа с 14 подтипове рецептори на серотонин, от които няколко рецепторни подтипа играят роля в регулирането на енергийния баланс [84]. Екстрацелуларните серотонинови и допаминови концентрации се регулират съответно от серотониновия (SERT) и допаминовия (DAT) транспортер, които се намират на пресинаптичната клетъчна повърхност. Тези трансфери улесняват повторното поемане на несвързан серотонин или допамин в пресинаптичния неврон за повторно съхранение във везикули и повторна употреба. Поради своята функция транспортните връзки са важни регулатори на допаминергичното и серотонергичното предаване на сигнала [109]. Фокусът пада върху мозъчните серотонинови и допаминови транспортери (SERT и DAT) заради установените им роли в храненето. Освен това, за разлика от невропептидите, SERTs и DATs могат да бъдат визуализирани *in vivo* при хора, използвайки SPECT [110;111].

#### **4. Затлъстването и серотонин- и допаминергична система**

Много от регулаторните пътища за прием на храна, включително тези, които използват серотонин и допамин като невротрансмитер, са засегнати от затлъстяване или от хиперкалориините диети, водещи до затлъстяване. По отношение на серотонина, най-ранните изследвания от 70-те и 80-те години показват, че изчерпването на хипоталамичния серотонин води до хиперфагия и затлъстяване при гризачи [112-114], а инфузията на серотонин в хипоталамуса води до загуба на тегло [115]. В допълнение, разрушаването на цялата структура на SERT при женски плъхове води до увеличаване на обиколката на талията и затлъстяване [116;117], но не е известно дали това е чист хипоталамусен ефект. При хората, *fenfluramine* - лекарство, което увеличава серотонинергичното предаване, води до загуба на тегло и намален апетит [118]. Други серотонинергични лекарства като някои селективни инхибитори на обратното захващане на серотонина (SSRI) и агонисти на серотонин 2C рецептора (например-лоркасерин) също обуславят намален прием на храна

и водят до загуба на телесно тегло [119;120], въпреки че дългосрочното използване на SSRI е свързано с (повторно) увеличаване на теглото [121; 122]. Освен това, генетично изследване при хора показва, че късия алел на промотора на гена на SERT, свързан с намалена транскрипция на гена е рисков фактор за затлъстяване [123]. Всички фармакологични и генетични изследвания при хора, споменати по-горе обаче, включват изследване на цялостната серотонинова медиация (т.е. освен централния серотонин е изследван и този в периферията) и тъй като 95% от серотонина се намира извън ЦНС, ефектите не могат да се припишат само на серотонина в ЦНС. Изследване *in vivo* демонстрира обратна връзка между ИТМ и SERT в субкортикалната област [92], което показва, че и при хора серотониновата система на мозъка участва в регулирането на телесното тегло и може да бъде засегната при затлъстяването. Проучванията за връзката между мозъчната SERT и връзката му с телесното тегло обаче са ограничени.

Допаминаргична система в стриатума е неразривно свързана с мотивацията и възнаграждението, въпреки че трябва да се подчертае, че повечето проучвания са били извършени при гризачи. Проучванията показват, че затлъстелите субекти показват повишена мотивация за хранене [124-126]. Разработени са две различни теории за това как стриатумната допаминова система може да доведе до повишена мотивация за храна и затлъстяване. Първата от тях - "теорията за недостатъчност на чувството за награда", предполага, че затлъстелите субекти са в хиподопаминаргично състояние, т.е. затлъстели субекти изпитват по-малко чувство за възнаграждение от храна, което води до компенсаторно увеличаване на приема на храна и евентуално до затлъстяване [127]. Доказано е, че когато се консумира храна, затлъстелите хора показват по-малко активиране на стриатума в сравнение със слаби индивиди [128;129], което е в съответствие с намалени стимули на допамин D2/3 рецепторите [130-132] и намалено амфетамин-индуцирано освобождаване на допамин при затлъстели хора [132]. В допълнение, индивидите с къс Taq1a алел, който е свързан с атенюирана стриатална допаминаргична сигнализация, са по-податливи на затлъстяване [128;133], което показва, че намаленото допаминно сигнализиране може да допринесе за развитие на затлъстяване. Втората теория, т.нар "моделът – на постоянно награждаване", предполага, че при затлъстяване се получава хиперактивност на системата за възнаграждение, водеща до преяждане и след това до затлъстяване [134]. Всъщност, проучванията с fЯМР показват, че при група затлъстели жени

се наблюдава по-голяма реактивност на храносмилателната система, както и по-голямо активиране в стриатума в сравнение със слабите индивиди, когато очакват и консумират храна [135-137]. Нещо повече, слабите индивиди изложени на риск от затлъстяване при носителство на алела Taq1 (т.е. компрометирана сигнална система на допамин), показват повишена активност в каудалните области на главния мозък при хранителен стимул [138]. При обобщаване, повече проучвания до този момент показват, че предполагаемият недостиг на чувството за награждаване при затлъстели е по-скоро последица от преяждане или от самото затлъстяване, а не пряката причина за него. Това е в съответствие с изследванията при гризачи, показващи, че храненето с високо съдържание на мазнини или диети с повишено съотношение на мазнини/въглеhidрати, намалява количеството на стриатумните D2/3 рецептори, при индивидни, които все още не са затлъстели [83-85]. Разрушаването на D2 рецепторите води до бързо развиване на дефицит в системата, която е отговорна за изпитване на удоволствие и започва ексцесивно търсене на храна при плъхове [86], което показва, че намаления броя на стритумните D2/3 рецептори могат на свой ред да доведат до преяждане. Тъй като понастоящем не съществуват проучвания за ефекта от преяждането върху стриатумната допаминова система при хората, остава спекулативно дали данните за гризачите могат да бъдат приложени и при човека.

Както беше посочено по-горе, DAT са важни регулатори на наличното количество извънклетъчен допамин [109] и следователно потенциално допринасят за хипо- или хипердопаминергична констелация на стриатумната система. Понастоящем не е известно дали концентрациите на извънклетъчния допамин в мозъчната система се повишава или намалява при прием на храна при хора. Нивата на DAT могат да отразяват наличния екстрацелуларен допамин, тъй като дългосрочното и системно допаминово изчерпване води до намалено свързване на DAT в стриатума [87]. При гризачи, 90% намаление на DAT увеличат екстрацелуларните допаминови концентрации в стриатума и хипоталамуса [144;145], което показва, че понижаването на DAT може действително да допринесе за високите нива на извънклетъчния допамин в стриатума. Интересното е, че тези гризачи показват повишена мотивация да “работят” за храната си [145]. По същия начин, диетиндуцираните затлъстели гризачи имат по-ниски DAT, по-малък брой D2/3 рецептори и по-високи нива на извънклетъчния допамин и показват по-висока мотивация за храна [90]. Тъй както и при затлъстелите хора също имат по-висока мотивация за хранене [124-126], както

и намален брой D2/3 рецептори [130-132], може да се очаква и по-ниски DAT при тях. Изследванията при хора наистина показват обратна връзка между стриатумното DAT свързването и ИТМ [146;147], въпреки че при някои проучвания тази корелация не е на лице [148; 149].

Обобщавайки повече известни до този момента данни, може да се каже, че намаленото серотонинергично сигнализиране и ниската наличност на SERT са свързани с хиперфагия и затлъстяване. Освен това, затлъстели субекти имат повишена мотивация за хранене и намален брой на D2/3 рецепторно свързване и могат да имат по-ниско DAT свързване. Не е известно дали при хората, както при гризачите, допаминовата сигнализация е свързана с мотивация за хранене и дали тя бива засегната от прекомерната консумация на храна. Дали промените в централно мозъчната допаминова система, при хора, имат отношение с човешкото затлъстяване и дали тя е свързана с промяна в мотивация за хранене са въпроси на които няма точен отговор.

## **5. Хранителни навици и затлъстяване**

Затлъстяването се дължи или на намаляване на енергийния разход и/или на повишаване на калорийния прием. Общият прием на калории се е увеличил през последните десетилетия, а проучванията и изследванията върху хранителните навици отчитат повишен прием на храни богати на мазнини и захари [66]. Самият калориен излишък увеличава телесното тегло и намалява инсулиновата чувствителност, дори при здрави индивиди, които не страдат от затлъстяване [150]. Освен това повишената консумация на захари и мазнини са свързани с повишаване на теглото и развитие на инсулинова резистентност при хората [151-155]. Интересно е, че изследвания с гризачите показват, че диети с високо съдържание на мазнини и на захари, но не само на захар или мазнина, води до затлъстяване в рамките на една седмица, което е придружено от увеличаване на генната експресия на NPY и намаление на POMC в ARC, настройка на ниво ЦНС, която довежда до хиперфагия [156]. Това показва, че приемането на комбинация от мазнини и захари независимо може да допринесе за затлъстяването чрез директни ефекти върху генната експресия в хипоталамуса, регулиращ приема на храна. В допълнение, специфичната комбинация от мазнини и захари, но не и поотделно на мазнина или захари, причинява глюкозен нетолеранс, което от своя страна би

довело до наддаване на тегло и затлъстяване и затваряне на порочен кръг [157]. По този начин, в хиперкалорична храна, освен самата калорийна стойност на консумираната храна, съдържанието на дадени макронутриенти в диетата, има независими ефекти върху развитието на затлъстяване и нарушения на глюкозния метаболизъм. В ежедневието хората рядко консумират големи количества мазнини или захар поотделно, тъй като в по-големия брой от случаите храната съдържа комбинация от мазнини и захари, а хранителните навици често комбинират храни с високо съдържание на захари, като например подсладените със захар скокове, които вървят в съчетание със храна богата на мазнини. Освен ексцесивният прием на храна като цяло, като хранителен навик се забелязва увеличението в потреблението на междинни хранения, често богати на наситени мазнини и захари, като чипсове, сокове, вафли и т.н.. Проучване при деца показва, че 27% от дневния им калориен прием идва от междинни закуски, което възпитава подобни хранителни навици още от ранна детска възраст, които имат ефект и при по-нататъшния период на пубертет, съзряване и достигане до зряла възраст [70,158]. Освен това, междинните хранения между основните хранения, имат не добър ефект относно задоволяването на хранителните потребности и биват последвани от основно хранене, без ограничение в калорийния прием, което води до положителен енергиен баланс [159]. При плъховете, които консумират свободно избираема храна с високо съдържание на мазнини и захари, се наблюдава увеличение на честотата на храненията, а не учвеличение в количеството на отделните хранителни порции [104]. В допълнение, тези животни стават затлъстели и развиват инсулинова резистентност [105]. При хората, подобно поведение също бива наблюдавано и пак се свързва с развитие на затлъстяване и инсулинова резистентност [70-72]. Въпреки това, проучвания свързани с ефекта на тези междинни закуски върху метаболитните параметри и по-важното върху мозъчната функция и процесите на биохимично и клетъчно ниво, при хора, понастоящем не са налични.

## **6. Серотонинът като регулатор на глюкозния метаболизъм**

Затлъстяването и хиперкалоричното хранене повлияват периферния метаболизъм на глюкозата чрез модулиране на инсулиновото действие, което се нарича инсулинова чувствителност. Това е директен ефект и последица на молекулярно ниво, които се появяват при чувствителните към инсулин тъкани и един от патофизиологичните аспекти на затлъстяването. Все пак освен периферните механизми е възможно да се наблюдават

промени в мозъчните кръгове, за които е известно, че регулират метаболизма на глюкозата. Глюкозата е основно гориво за много органи и в гладно състояние, по-голямата част от циркулиращата в кръвта глюкоза се поема от мозъка. В миналото се е смятало, че мозъкът може да се „храни“ само с глюкоза, но днес се знае, че освен от глюкоза мозъкът може да си добавя енергия от кето телата, но те не могат да бъдат единствен източник на енергия, а съотношението между кето тела и глюкоза трябва да бъде поне 50% на 50%.

Концентрацията на глюкозата в кръвта строго се регулира от периферните хормони и от автономната нервна система. Накратко, нивото на кръвната захар се повишава след хранене, което води до освобождаване от панкреаса на инсулин, което улеснява приемането на глюкоза в чувствителни към инсулин тъкани чрез глюкозен транспортер подтип 4 (GLUT4) (в мозъка този транспортер е подтип под тип 3 (GLUT3) и е инсулино-независим по отношение на вкарването на глюкозата в мозъчната клетка) [162]. След хранене, по-голямата част от погълнатата глюкоза се „вкарва“ в скелетната мускулатура, като при излишък на глюкоза, тя „захранва“ мастната тъкан [163]. След като глюкозата влезе в клетката, тя се окислява или съхранява. По време на хиперинсулинемията, продукцията на глюкоза в черния дроб се намалява, а способността на инсулина да потисне ендогенната продукция на глюкоза от черния дроб се нарича чернодробна чувствителност. Обратно, по време на периоди на гладуване плазмената концентрация на инсулин е ниска и нивата на глюкагон, кортизол и растежен хормон се повишават, което води до повишаване на гликогенолизата и глюконеогенезата, като по този начин се предотвратява хипогликемията. Освен гореспоменатите хормони, автономната нервна система играе важна роля в глюкозната хомеостаза. Още през 1855 г. Клод Бернар демонстрира връзка между мозъка и периферния метаболизъм на глюкозата, като показва пик в плазмените нива на глюкозата след пробиване на основата на четвъртото мозъчно стомахче в заек [164]. Именно след това изследване се описва и свойството мозъка да „усеща“ енергийния статус чрез периферните хормони и хранителни вещества, които модулират производството и поглъщането на глюкоза чрез симпатиковата и парасимпатиковата нервна система [77,165]. Ретроспективни проучвания описват анатомични връзки, които се простират между хипоталамуса, черния дроб, мастната тъкан и панкреаса [166;167], като различни изследвания в няколко различни модела при гризачи са показали, че тези връзки са важни по отношение на регулирането на метаболизма на глюкозата [168; 169]. Всъщност изследванията при гризачите показват, че

част от ефекта на инсулина върху метаболизма на глюкозата е чрез сигнализирането му в хипоталамуса [170;171;172]. Няколко ядра в хипоталамуса съдържат чувствителни към глюкоза неврони, а именно невроните свързани с POMC и AgRP / NPY са показали, че участват в регулирането на глюкозния метаболизъм (77;173;174). Понастоящем не е известно как хиперкалоричното хранене и затлъстяването засягат взаимодействието между мозъка и периферния глюкозен метаболизъм при хората и дали това допринася за инсулинова резистентност.

Инсулиновата резистентност се определя като намален биологичен ефект на инсулин върху метаболитните пътища, чувствителни към инсулин, в различни тъкани. Механизмите на инсулиновата резистентност са сложни и все още не са напълно изяснени. Инсулиновата резистентност повишава риска за ЗД тип 2 [175]. Освен генетичните фактори [30], възпалението на мастната тъкан [176], метаболитния стрес на ниво ендоплазмен ретикулум, митохондриалната дисфункция и липотоксичността (натрупване на ектопични липиди) играят роля в намаляването на инсулиновото сигнализиране и по този начин и на инсулиновото действие [177;178]. В допълнение, специфични макроеlementи допринасят за развитието на инсулинова резистентност независимо от повишаването на телесното тегло. По този начин, приема на мазнини и захари участва в развитието на инсулинова резистентност [179-182], а при проучвания при гризачи е доказано, че консумацията на комбинация от мазнини и захар причинява нарушение в глюкозния метаболизъм в рамките на седмица [161], като се асоциира с поведенчески промени в стила на хранене [160]. Не е напълно изяснено, дали при хора именно стила на хранене и употребата на определени макронутриенти е водеща причина за инсулинова резистентност. До този момент има проучвания, които показват, че при затлъстелите жени, които имат чести междинни хранения с храни богати на захари и мазнини, имат по-високи стойности HOMA-IR (индекс, който може до голяма степен да ни покаже нивото на инсулинова резистентност), в сравнение със затлъстели жени, които нямат тази навик на хранене. Както е описано по-горе, инсулиновото действие и метаболизмът на глюкозата са под контрола на мозъка и затова, изглежда вероятно инсулиновата резистентност при затлъстяването да бъде частично медирана чрез промени в регулирането на глюкозата в мозъчните пътища, като най-вероятно място за това е хипоталамуса. Дали това е последица от затлъстяването или се дължи и на храната, която се употребява и стила на хранене бива трудно да се определи.

Плъховете на диета с високо съдържание на мазнини и захари показват промени в експресията в хипоталамуса на POMC и NPY [8] неврони, за които е известно, че участват в глюкозната хомеостаза, както и глюкозната нетолерантност [156]. Хипоталамусните POMC и NPY клетки са чувствителни към инсулин и антагонизират действието на инсулина, чрез локално блокиране на инсулиновите рецептори, което води до хиперинсулинемия и чернодробна инсулинова резистентност с повишено глюкозно производство [183;184]. По тези причини, може да се каже, че инсулиновата резистентност има много факторна етиология, като изследванията при гризачите показват, че звена в главния мозък може да са причина за развитието ѝ.

Има няколко линии на доказателства, показващи връзка между централния серотонин и допамина и периферния глюкозен метаболизъм. Допаминът е свързан с метаболизма на глюкозата [185]. При отстраняване на D2 рецепторите при мишки те развиват глюкозната нетолерантност [186] и обратно, при антагонизиране на D2 рецепторите за допамин с бромокриптин се подобрява инсулиновата чувствителност при гризачите [187] и се подобрява гликемичния контрол и глюкозния толеранс при хората [188]. Освен това е показано, че пациентите с шизофрения, които приемат лекарства, характеризиращи се с централна допаминенергична дисрегулация, проявяват смущения в глюкозния метаболизъм [189]. Публикувано проучване показва, че дълбоката мозъчна стимулация в NAc на плъхове довежда до значително увеличение на плазмената глюкоза, като този ефект не може да бъде причислен като стимулиран от стрес [79]. Освен това данните показват подобрена периферна инсулинова чувствителност по време на дълбока мозъчна стимулация, насочена към NAc при хора с obsesивно-компулсивно разстройство, което корелира с отделяне на стриатумен допамин при тези пациенти. Друго наблюдение пък дава данни, че изчерпването на допамина намалява чувствителността към инсулин при здрави незатлъстели мъже. Тези резултати предполагат връзка между стриатумното освобождаване на допамин, сочейки връзката между стриатумния допамин и инсулиновата чувствителност. В допълнение, клиничните проучвания показват положителна връзка между болестта на Паркинсон, състояние, при което се наблюдава дегенерация на нигростриатумните допаминови неврони и 3Д тип 2 [190,191], въпреки че при дълбоката мозъчна стимулация на субталамичното ядро няма промяна в глюкозния метаболизъм при тези пациенти [192,193].

Допаминът като медиатор в различни области на мозъка може да бъде свързано с глюкозния метаболизъм, като модулирането на извънклетъчния допамин влияе върху инсулиновата чувствителност, но са необходими по-подробни изследвания, за да се изяснят кои пътища за сигнализиране на допамина, както и кои мозъчни зони са отговорни за глюкозната хомеостаза и инсулиновата резистентност при хората.

При гризачите, нивата на извънклетъчния серотонин в хипоталамусното супрахиазматично ядро (SCN) са свързани с глюкозен нетолеранс [195] като агонизиращите 2С рецептори на серотонина, подобряват инсулиновата чувствителност, докато отстраняването на серотониновите 2С рецептори води до чернодробна инсулинова резистентност [196;197]. При мишки с дефицит на SERT, от своя страна, се развива хипергликемия и имат хиперинсулинемия и намалена чувствителност на инсулин в черния дроб още преди началото на затлъстяването [198]. При хората генетичните изследвания показват връзка между серотониновата система (обобщено периферната и централномозъчната) и инсулиновата резистентност, като взаимоотношенията са свързани с полиморфизъм в промоторния регион за SERT [199] и в промоторния регион на серотонин 2С рецептора [200]. Също така, фармакологичното антагонизиране на 2С серотониновите рецептори при хора, влошават инсулиновата чувствителност [201], докато фармакологично агонизиране на рецептора на серотонина подобрява инсулиновата чувствителност при болни със ЗД тип 2 [202]. Дългосрочното фармакологично инхибиране на SERT, от своя страна с медикаменти от групата на SSRI, води до хипергликемия, наддаване на тегло и отключване на ЗД тип 2 [203]. Дали тези ефекти могат да бъдат приписани на хипоталамусната серотонинова система остава да бъде изследвано.

Изследванията при гризачите показват силна връзка между хипоталамичния серотонин и периферния метаболизъм на глюкозата, а фармакологичните и генетичните изследвания потвърждават, че това взаимодействие е функционално и при хората. При хората остава неясно дали хипоталамусните серотонинергични пътища независимо допринасят за инсулиновата резистентност, чрез директен ефект върху метаболизма на глюкозата или непряко чрез неговото въздействие върху регулирането на телесното тегло.

## **В. Обобщение на литературния обзор**

Серотониновата система в периферията регулира множество физиологични аспекти, независимо от мозъчния серотонин. По-специално, периферният серотонин играе централна функция в регулирането на глюкозната и липидната хомеостаза чрез действие върху различни органи и клетъчни типове. Серотонинът, продуциран в панкреатичните  $\beta$ -клетки, промотира инсулиновата секреция и по време на бременността също както и  $\beta$ -клетъчна пролиферация [9,10,19,21,22]. Серотонинът, произведен в червата, действа върху черния дроб, за да стимулира глюконеогенезата и да потисне чернодробното усвояване на глюкоза [20] и върху белите адипоцити, за да стимулира липолизата [20] и да потисне усвояването на глюкоза, производството на адипонектин и инсулиновото действие [38,41]. Серотонинът, продуциран директно от адипоцитите, потиска термогенезата и усвояването на глюкоза в друг функционален тип масти - кафява мастна тъкан [42,43]. Освен това, серотонинът може да действа директно върху мускулите, за да стимулира гликолизата [49,50], и подпомага производството на цитокини в макрофагите [46].

По отношение на централно мозъчната серотонинова медиация, най-ранните изследвания от 70-те и 80-те години, които показват, че изчерпването на хипоталамичния серотонин води до хиперфагия и затлъстяване при гризачи [112-114], а инфузията на серотонин в хипоталамуса води до загуба на тегло [115]. Още през 1855 г. Клод Бернар демонстрира връзка между мозъка и периферния метаболизъм на глюкозата, като показва пик в плазмените нива на глюкозата след пробиване на основата на четвъртото мозъчно стомахче в заек [164]. Именно след това изследва се описва и свойството мозъка да „усеща“ енергийния статус чрез периферните хормони и хранителни вещества, които модулират производството и поглъщането на глюкоза чрез симпатиковата и парасимпатиковата нервна система [77,165]. При гризачите, нивата на извънклетъчния серотонин в хипоталамусното супрахиазматично ядро (SCN) са свързани с глюкозен нетолеранс [195], като агонизиращите 2C рецептори на серотонина подобряват инсулиновата чувствителност, докато отстраняването на серотониновите 2C рецептори води до чернодробна инсулинова резистентност [196;197]. При мишки с дефицит на SERT, от своя страна, се развива хипергликемия и имат хиперинсулинемия и намалена чувствителност на инсулин в черния дроб още преди началото на затлъстяването [198]. При хората генетичните изследвания показват връзка между серотониновата система (обобщено периферната и

централномозъчната) и инсулиновата резистентност, като взаимоотношенията са свързани с полиморфизъм в промоторния регион за SERT [199] и в промоторния регион на серотонин 2C рецептора [200]. Също така, фармакологичното антагонизиране на 2C серотониновите рецептори, при хора, влошават инсулиновата чувствителност [201], докато фармакологичното агонизиране на рецептора на серотонина подобрява инсулиновата чувствителност при болни със ЗД тип 2 [202].

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящото изследване е да се проучи ролята на серотонинергичната система във фармакологичното повлияване на метаболитните функции и заболявания върху експериментални модели при плъхове.

За осъществяване на тази цел са поставени следните задачи:

1. Да се разработи експериментален модел, изследващ ролята на периферния серотонин при затлъстели и диабетни плъхове порода Вистар (Wistar), с използване на периферен серотонинов инхибитор - LP533401.

2. Да се разработи експериментален модел, изследващ ролята на мозъчния серотонин при затлъстели и диабетни плъхове порода Вистар (Wistar), с използване на селективен централен серотонинов агонист - WAY163909 и Ro60-0175

3. Да се проследи динамиката на телесното тегло, при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при затлъстели и диабетни плъхове порода Вистар (Wistar) и да се сравни с контролна група.

4. Да се проследи динамиката на телесното тегло, при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909 при затлъстели и диабетни плъхове порода Вистар (Wistar).

5. Да се проследи динамиката на телесното тегло, при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro60-0175 при затлъстели и диабетни плъхове порода Вистар (Wistar).

6. Да се определят промените на плазмените нива на кръвна захар, имунореактивния инсулин, НОМА-индекс, лептин и грелин, при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при затлъстели и диабетни плъхове порода Вистар (Wistar).

7. Да се определят промените на плазмените нива на кръвна захар и имунореактивния инсулин и НОМА-индекс, при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909 при затлъстели и диабетни плъхове порода Вистар (Wistar).

8. Да се определят промените на плазмените нива на кръвна захар, имунореактивния инсулин и НОМА-индекс, при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro 60-0175 при затлъстели и диабетни плъхове порода Вистар (Wistar).

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

## Експериментални животни

За целите и задачите на проведените експериментални изследвания се използваха половно-зрели мъжки плъхове порода Wistar (Вистар), доставени от централен вивариум. Опитите се проведоха при спазване на стандартните условия за отглеждане, храна и вода. Експериментите бяха извършени спрямо Международните Насоки и Принципи на Експерименти с Животни (International Guiding Principles for Animals Research), както и етичните принципи при планиране и провеждане на експериментите според КЕНИМУС (Комисия по Етика на Научните изследвания при Медицински Университет).

## Фармакологични методи

### **1. Експериментален модел, изследващ ролята на периферния серотонин при затлъстели и диабетни плъхове порода Вистар (Wistar), с използване на периферен серотонинов инхибитор LP533401**

Експериментите *in vivo* се проведоха върху 40 мъжки плъхове порода Вистар със средно тегло 200-230 грама, при взимане на животните от централен вивариум. При провеждането на опитите се спазваше циркадният ритъм (12 ч. светло/12 ч. тъмно). Поддържаната температура на околната среда по време на експериментите беше  $22 \pm 1^\circ \text{C}$ . Плъховете бяха разделени в 2 групи - плъхове с индуцирано затлъстяване и диабет и здрави плъхове (контрол група).

Индуцираното затлъстяване беше постигнато чрез приложение на висока калорийна кафетерийна диета („cafeteria diet” (CAF)), която включваше храна с високо съдържание на мазнини и въглехидрати, както към нея беше прибавян и глюкозо-фруктозен сироп – high fructose corn syrup (HFCS 55) в продължение на 8 седмици, в сравнение със стандартен хранителен режим на контролната група. Кафетерийната диета включваше храна с високо съдържание на мазнини и въглехидрати в съотношение - мазнини 30%, въглехидрати 57% и протеини 13% - обща енергийната плътност на комбинираната високолипидна - високовъглехидратна храна беше 4298 ккал/кг, докато на храната давана на контролната група около 2908 ккал/кг. Глюкозо-фруктозеният

сироп – high fructose corn syrup (HFCS 55) е със съдържание 55% фруктоза, 42% глюкоза и 3% висши захариди. Съставът и хранителната стойност на кафетерийната диета може да бъде открита в Таблица 2.

Опитните животни в групата, в която се целеше развитие на затлъстяване, имаха достъп до храна през цялото денонощието, като единствено хранителния им прием беше ограничаван в часовете преди взимане на кръв за изследвания. Освен хранителният режим с високо съдържание на мазнини и въглехидрати, основно обусловен от различни видове ядки и храни с рафинирани захари и мазнини (чипсове и сладки изделия), на опитните животни беше предоставен глюкозо-фруктозен сироп – high fructose corn syrup. Според редица автори глюкозо-фруктозен сироп води до бързо развитие на затлъстяване, в рамките на от 2 до 10 седмици при опитни животни [204].

Стойностите за 100 гр хранителен продукт	Енергийна стойност, ккал	Общо количество мазнини, гр	Общо количество въглехидрати, гр	Общо количество белтъци, гр	Захари, гр	Наситени мастни киселини, гр	сол, гр
Чипс Lay's® Сирене	516	33	48	6.7	2.1	2.6	1.2
7 DAYS Bake Rolls® сол	449	15	63	14	7	5.8	2.7
Солети със сол Хрус-Хрус®	389.5	5.23	77.5	8.11	1.99	1.5	2.8
Хрупкави печени хлебни кубчета с вкус на бекон., Кубети®	456	15	68	9.4	3	1.4	2.2
Хрупкави вафли, Ная®	528.7	28.3	63.1	5.8	41.5	12.6	0.2
Печени фъстъци, Детелина®	561	41.5	15.5	26.8	4.1	9.1	3
Зърнена закуска, NESTLÉ® СНОСАРИС®	378	4.4	73.2	9.6	28.9	1.7	0.47

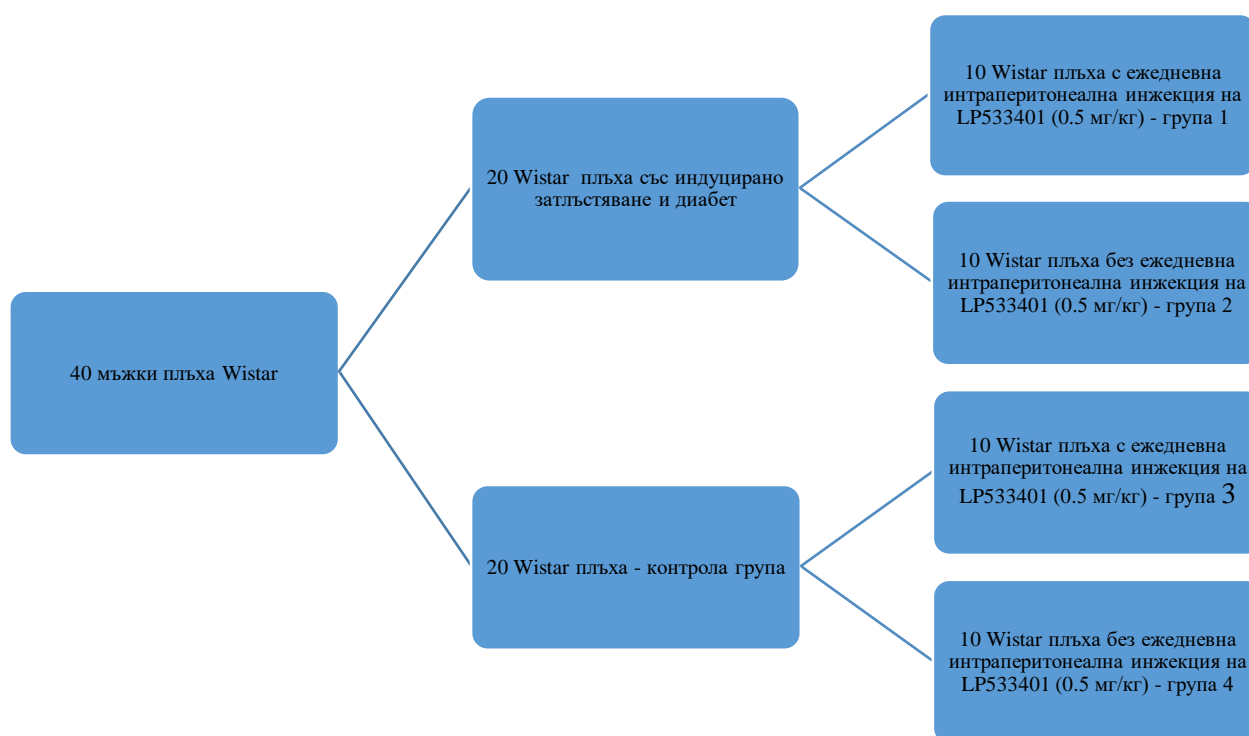
Таблица 2. Състав и хранителна стойност на кафетерийната диета.

От група със затлъстяване всички животни развиха стойности на кръвна захар, на гладно (след поне 8 часов глад) над 7.0 ммол/л, което се дефинира като нарушена

гликемия на гладно, а 18 от тях над 7.5 ммол/л, което се дефинира като захарен диабет [205].

Всички плъхове от групата със затлъстяване, достигнаха ИТМ над 0.68 гр/см<sup>2</sup>, което се приема за затлъстяване при порода Wistar, за възрастни мъжки плъхове. [206]. Всички плъхове от контролната групата бяха с ИТМ между 0.48 гр/см<sup>2</sup> до 0.68 гр/см<sup>2</sup>, което се определя като нормална стойност за възрастни плъхове Wistar [206]. ИТМ се определи по формулата ИТМ= тегло в грамове/дължината в см<sup>2</sup>.

Всяка от тези две групи беше разделена на други 2 - по една с ежедневно интраперитонеално инжектиране на LP533401 в доза 0.5 мг/кг в продължение на 4 седмици, и една без инжектиране (фигура 5).



Фигура 5. Експериментален дизайн. Четиридесет плъха Wistar, бяха разделени в две групи – една със индуцирано затлъстяване и диабет и една контрола, всяка от двете групи беше разделена на още две групи - една с ежедневна интерперитонеална апликация на LP533401 (0.5 мг/кг), група 1 - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 2 - група със затлъстяване и диабет без ежедневна

интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 3 – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 4 – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг).

LP-533401 хидрохлорид (Sigma-Aldrich®) е субстанция, която се прилагаше след разтваряне с физиологичен разтвор. LP-533401 е инхибитор на триптофан 5-хидроксилаза 1 (Trh1), който блокира биосинтезата на серотонин, получен от червата. Поради селективно блокиране на Trh1, ефекти от страна на ЦНС не би следвало да се наблюдават. Използваните дози на изследваното вещество в експеримента са базата на литературни данни [207]. В групите, при които не се прилагаше LP-533401, се поставяше еквивалентна доза физиологичен разтвор вместо това.

Наблюдението на животните траеше 4 седмици.

Животните бяха разделени по три или по пет в кафез. Телесната маса на всички животни беше измервана седмично, заедно с нивото на кръвна захар, имунореактивен инсулин, грелин и лептин.

## **2. Експериментален модел, изследващ ролята на мозъчния серотонин при затлъстели и диабетни плъхове Wistar, с използване на селективен централен серотонинова агонист - WAY163909**

Експериментите *in vivo* се проведеха върху 40 мъжки плъхове порода Вистар със средно тегло 220-240 гр, при взимане на животните от централен вивариум. При провеждането на опитите се спазваше циркадният ритъм (12 ч. светло/12 ч. тъмно). Поддържаната температура на околната среда по време на експериментите беше 22°C. Плъховете бяха разделени в 2 групи - плъхове с индуцирано затлъстяване и диабет и здрави плъхове (контрол група).

Индуцираното затлъстяване беше постигнато чрез приложение на висока калорийна кафетерийна диета („cafeteria diet” (CAF)), която включваше храна с високо съдържание на мазнини и въглехидрати, както към нея беше прибавян и глюкозо-фруктозен сироп – high fructose corn syrup (HFCS 55), в продължение на 8 седмици, в сравнение със стандартен хранителен режим на контролната група. Кафетерийната диета

включваше храна с високо съдържание на мазнини и въглехидрати в съотношение - мазнини 30%, въглехидрати 57% и протеини 13% - обща енергийната плътност на комбинираната високолипидна - високовъглехидратна храна беше 4298 ккал/кг, докато на храната давана на контролната група около 2908 ккал/кг. Глюкозо-фруктозеният сироп – high fructose corn syrup (HFCS 55) е със съдържание 55% фруктоза, 42% глюкоза и 3% висши захариди. Съставът и хранителната стойност на кафетерийната диета може да бъде открита в Таблица 3.

Опитните животни в групата, в която се целеше развитие на затлъстяване, имаха достъп до храна през цялото денонощието, като единствено хранителния им прием беше ограничаван в часовете преди взимане на кръв за изследвания. Освен хранителният режим с високо съдържание на мазнини и въглехидрати, основно обусловен от различни видове ядки и храни с рафинирани захари и мазнини (чипсове и сладки изделия), на опитните животни беше предоставен глюकोзо-фруктозен сироп – high fructose corn syrup. Според редица автори глюकोзо-фруктозен сироп води до бързо развитие на затлъстяване, в рамките на от 2 до 10 седмици, при опитни животни [204].

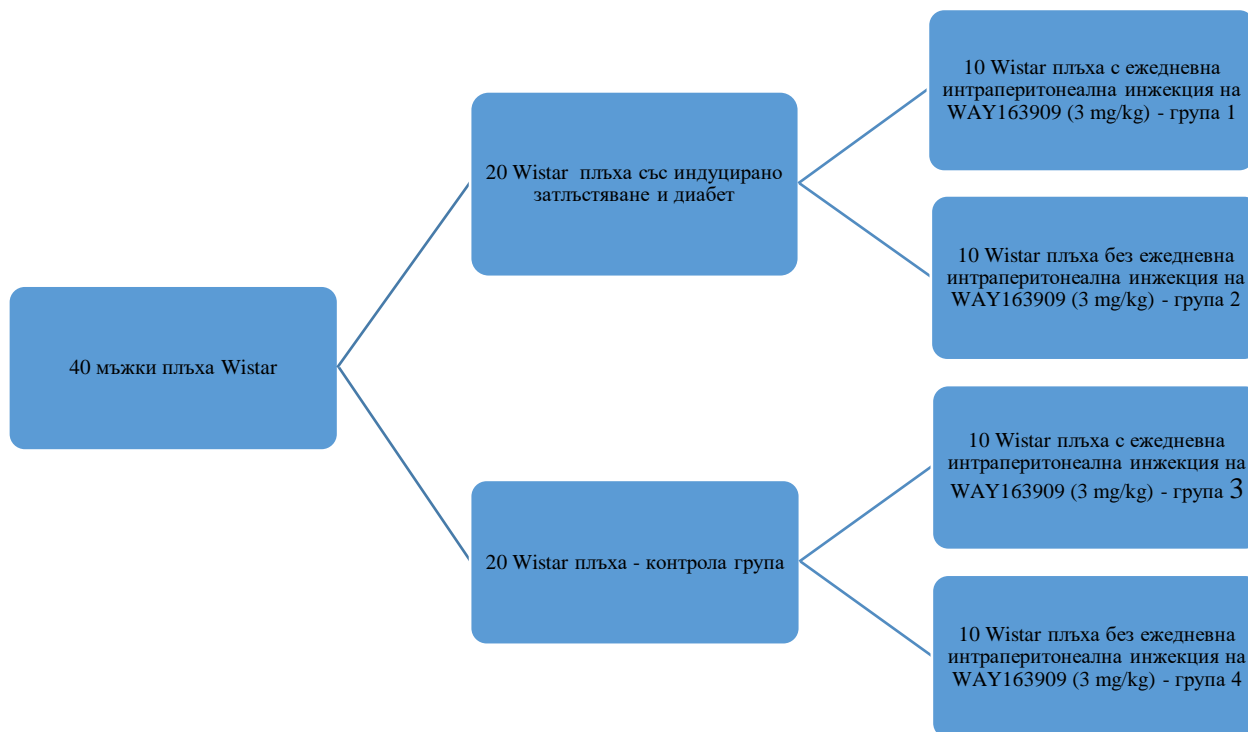
Стойностите за 100 гр хранителен продукт	Енергийна стойност, ккал/кг	Общо количество мазнини, гр	Общо количество въглехидрати, гр	Общо количество белтъци, гр	Захари, гр	Наситени мастни киселини, гр	сол, гр
Чипс Lay's® Сирене	516	33	48	6.7	2.1	2.6	1.2
7 DAYS Bake Rolls® сол	449	15	63	14	7	5.8	2.7
Солети със сол Хрус-Хрус®	389.5	5.23	77.5	8.11	1.99	1.5	2.8
Хрупкави печени хлебни кубчета с вкус на бекон., Кубети®	456	15	68	9.4	3	1.4	2.2
Хрупкави вафли, Ная®	528.7	28.3	63.1	5.8	41.5	12.6	0.2
Печени фъстъци, Детелина®	561	41.5	15.5	26.8	4.1	9.1	3
Зърнена закуска, NESTLÉ® СНОСАРИС®	378	4.4	73.2	9.6	28.9	1.7	0.47

Таблица 3. Състав и хранителна стойност на кафетерийната диета.

От група със затлъстяване всички животни развиха стойности на кръвна захар на гладно (след поне 8 часов глад) над 7.0 ммол/л, което се дефинира като нарушена гликемия на гладно, а 19 от тях над 7.5 ммол/л, което се дефинира като захарен диабет [205].

Всички плъхове от групата със затлъстяване, достигнаха ИТМ над 0.68 гр/см<sup>2</sup>, което се приема за затлъстяване при порода Wistar, за възрастни мъжки плъхове. [206]. Всички плъхове от контролната групата бяха с ИТМ между 0.48 гр/см<sup>2</sup> до 0.68 гр/см<sup>2</sup>, което се определя като нормална стойност за възрастни плъхове Wistar [206]. ИТМ се определи по формулата ИТМ= тегло в грамове/ дължината в см<sup>2</sup>.

Всяка от тези две групи беше разделена на други 2 - по една с ежедневна интраперитонеално инжектиране на WAY163909 в доза 3 мг/кг, в рамките на 4 седмици и една без инжектиране (фигура 6).



Фигура 6. Експериментален дизайн. Четиридесет плъха Wistar, бяха разделени в две групи – една със индуцирано затлъстяване и диабет и една контрола, всяка от двете групи беше разделена на още две групи - една с ежедневна интерперитонеална апликация на WAY163909 (3 мг/кг); група 1 - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 2 - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 3 – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг); група 4 – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг).

WAY-163909 хидрохлорид (Sigma-Aldrich®) е субстанция, която се прилага след разтваряне с физиологичен разтвор. WAY-163909 е вещество, което действа като селективен агонист за серотониновия 5-HT<sub>2C</sub> рецептор. До този момент основно са изследвани неговите антипсихотични ефекти при животински модели и е използвано за

изследване на ролята на подтипа на 5-HT<sub>2C</sub> рецептора в действието на вещества, водещи до зависимости като никотин и метамфетамин [208]. Използваните дози на изследваното вещество в експеримента са базата на литературни данни [209]. В групите, при които не се прилагаше WAY-163909 се поставяше еквивалентна доза физиологичен разтвор вместо това.

Наблюдението на животните траеше 4 седмици. Животните бяха разделени по три в кафез. Телесната маса на всички животни беше измервана седмично, заедно с нивото на кръвна захар и имунореактивен инсулин.

### **3. Експериментален модел, изследващ ролята на мозъчния серотонин, при затлъстели и диабетни плъхове Wistar с използване на селективен централен серотонинов агонист – Ro60-0175**

Експериментите *in vivo* се проведоха върху 40 мъжки плъхове порода Вистар със средно тегло 220-240 гр, доставени от централен вивариум. При провеждането на опитите се спазваше циркадният ритъм (12 ч. светло/12 ч. тъмно). Поддържаната температура на околната среда по време на експериментите беше 22°C. Плъховете бяха разделени в 2 групи - плъхове с индуцирано затлъстяване и диабет и здрави плъхове (контрол група).

Индуцираното затлъстяване беше постигнато чрез приложение на висока калорийна кафетерийна диета („cafeteria diet” (CAF)), която включваше храна с високо съдържание на мазнини и въглехидрати, както към нея беше прибавян и глюкозо-фруктозен сироп – high fructose corn syrup (HFCS 55), в продължение на 8 седмици, в сравнение със стандартен хранителен режим на контролната група. Кафетерийната диета включваше храна с високо съдържание на мазнини и въглехидрати в съотношение - мазнини 30%, въглехидрати 57% и протеини 13% - обща енергийната плътност на комбинираната високолипидна- високовъглехидратна храна беше 4298 ккал/кг, докато на храната давана на контролната група около 2908 ккал/кг. Глюкозо-фруктозеният сироп – high fructose corn syrup (HFCS 55) е със съдържание 55% фруктоза, 42% глюкоза и 3% висши захариди. Съставът и хранителната стойност на кафетерийната диета може да бъде открита в Таблица 4.

Опитните животни в групата, в която се целеше развитие на затлъстяване, имаха достъп до храна през цялото денонощието, като единствено хранителния им прием беше ограничаван в часовете преди взимане на кръв за изследвания. Освен хранителният режим с високо съдържание на мазнини и въглехидрати, основно обусловен от различни видове ядки и храни с рафинирани захари и мазнини (чипсове и сладки изделия), на опитните животни беше предоставен глюкозо-фруктозен сироп – high fructose corn syrup. Според редица автори глюкозо-фруктозен сироп води до бързо развитие на затлъстяване, в рамките на от 2 до 10 седмици, при опитни животни [204].

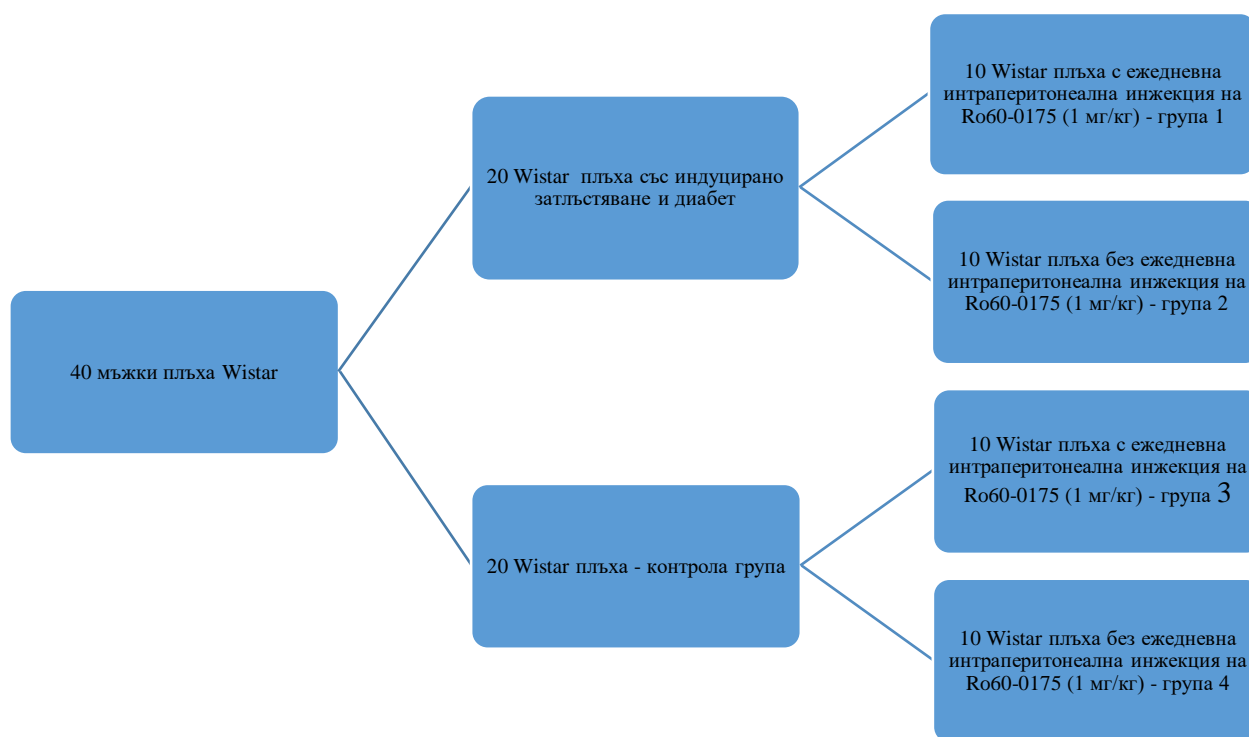
Стойностите за 100 гр хранителен продукт	Енергийна стойност, ккал	Общо количество мазнини, гр	Общо количество въглехидрати, гр	Общо количество белтъци, гр	Захари, гр	Наситени мастни киселини, гр	сол, гр
Чипс Lay's® Сирене	516	33	48	6.7	2.1	2.6	1.2
7 DAYS Bake Rolls® сол	449	15	63	14	7	5.8	2.7
Солети със сол Хрус-Хрус®	389.5	5.23	77.5	8.11	1.99	1.5	2.8
Хрупкави печени хлебни кубчета с вкус на бекон., Кубети®	456	15	68	9.4	3	1.4	2.2
Хрупкави вафли, Ная®	528.7	28.3	63.1	5.8	41.5	12.6	0.2
Печени фъстъци, Детелина®	561	41.5	15.5	26.8	4.1	9.1	3
Зърнена закуска, NESTLÉ® СНОСАРИС®	378	4.4	73.2	9.6	28.9	1.7	0.47

Таблица 4. Състав и хранителна стойност на кафетерийната диета.

От група със затлъстяване всички животни развиха стойности на кръвна захар на гладно (след поне 8 часов глад) над 7.0 ммол/л, което се дефинира като нарушена гликемия на гладно, а 17 от тях над 7.5 ммол/л, което се дефинира като захарен диабет [205].

Всички плъхове от групата със затлъстяване, достигнаха ИТМ над  $0.68 \text{ г/см}^2$ , което се прима за затлъстяване при порода Wistar, за възрастни мъжки плъхове. [206]. Всички плъхове от контролната групата бяха с ИТМ между  $0.48 \text{ гр/см}^2$  до  $0.68 \text{ гр/см}^2$ , което се определя като нормална стойност за възрастни плъхове Wistar. [206]. ИТМ се определя по формулата  $\text{ИТМ} = \text{тегло в грамове} / \text{дължината в см}^2$

Всяка от тези две групи беше разделена на други 2 - по една с ежедневна, интраперитонеална апликация на Ro60-0175 в доза  $1 \text{ мг/кг}$ , в рамките на 4 седмици и една без апликация (фигура 7).



Фигура 7. Експериментален дизайн. Четиридесет плъха Wistar, бяха разделени в две групи – една със индуцирано затлъстяване и диабет и една контрола, всяка от двете групи беше разделена на още две групи - една с ежедневна интраперитонеална апликация на Ro60-0175 ( $1 \text{ мг/кг}$ ) и една без; група 1 - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro60-0175 ( $1 \text{ мг/кг}$ ), група 2 - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro60-0175 ( $1 \text{ мг/кг}$ ), група 3 –

контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro60-0175 (1 мг/кг), група 4 – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro60-0175 (1 мг/кг).

Ro60-0175 хидрохлорид (Sigma-Aldrich®) е субстанция, която се прилага след разтваряне с физиологичен разтвор. Ro60-0175 е вещество е мощен и селективен агонист както за 5-HT<sub>2B</sub>, така и за 5-HT<sub>2C</sub> серотониновите рецепторни подтипове, с добра селективност спрямо 5-HT<sub>2A</sub> подтип и малък или никакъв афинитет към други рецептори [210]. Използваните дози на изследваното вещество в експеримента са базата на литературни данни [211]. В групите, при които не се прилагаше Ro60-0175 се поставяше еквивалентна доза физиологичен разтвор вместо това.

Наблюдението на животните траеше 4 седмици.

Животните бяха разделени по три в кафез. Телесната маса на всички животни беше измервана седмично, заедно с нивото на кръвна захар и имунореактивен инсулин.

#### **4. Биохимични методи**

##### **4.1. Определяне на глюкозата в кръвта на експерименталните животни.**

Кръвната захар се определяше от кръв от опашката чрез глюкометър (FreeStyle Optium Neo, Abbott Diabetes Care Ltd., Великобритания). Капката кръв се накапва на лентичката и резултатът се получава след 3 секунди.

##### **4.2. Определяне на инсулиновата резистентност чрез изчисляване на НОМА - индекс**

За изчисляване на инсулиновата чувствителност при експерименталните животни, се използва НОМА - индекс (Хомеостатичен модел за оценка на инсулинова чувствителност). Данните за оценката се основават на резултати от физиологични изследвания, които описват обратната връзка на глюкозната регулация и инсулиновата секреция. Създадената по този начин математическа формула, позволява да се изчисли функцията на бета клетките и оттам да се определи инсулиновата резистентност.

Индексът се изчислява по следната формула:  $НОМА = (Глюкоза \times Инсулин) / 22.5$

От всеки плъх и от отделните групи, се взе кръв, като се спазваха правилата за работа с експериментални животни. Изследването на кръвната захар се определи чрез

вземане на кръв от опашката на плъховете. Използва се глюкометър (FreeStyle Optium Neo, Abbott Diabetes Care Ltd., Великобритания). Капката кръв се накапва на лентичката и резултатът се получава след 3 секунди. За определяне на инсулина в кръвта на животните, се използва ELISA Rat Insulin (BioVendor, Brno, Czech Republic).

<b><i>НОМА- индекс и тежест на инсулинова резистентност</i></b>	
<b><i>Норма</i></b>	До 2,5
<b><i>Инсулинова резистентност</i></b>	2.5-8
<b><i>Захарен диабет (на фона на изразена инсулинова резистентност)</i></b>	$\geq 8$

Таблица 5. НОМА- индекс и тежест на инсулинова резистентност.

## **5. ELISA (Enzyme Immunosorbent Assay)**

5.1. ELISA метод за определяне на инсулин на плъхове (BioVendor, Brno, Czech Republic) е имунологичен метод за количествено определяне на инсулин в серума на плъхове. Осъществява се на базата на реакцията двоен-антитяло сандвич. Плаките са предварително инкубирани с моноклонални антитела конюгирани към ензимът horseradish peroxidase (HRP). След промиване за отстраняване на всички несвързани антитела се добавя ТМВ субстрат, за да се разпознае количествено свързаните с инсулина антитела. Резултатите се отчитат чрез спектрофотометър.

### 5.2. ELISA методи за изследване на грелин и лептин

5.2.1. Протокол за Rat Acylated Ghrelin ELISA кит (BioVendor, Brno, Czech Republic). Кръвта за определяне на грелин се събираше в EDTA епруветки, които съдържаха p-hydroxymercuribenzoic киселина (10  $\mu$ l/ml кръв). Пробите се центрофугираха на 3500 оборота за 10 мин. на +4 °C. След отделянето на плазмата се добавяше 100  $\mu$ l 1M HCl на 1 ml плазма. След това пробите се центрофугираха повторно за 5 мин. на +4 °C. Супернатантата се отделя за провеждане на изследвания върху грелин.

Rat Acylated Ghrelin ELISA (BioVendor, Brno, Czech Republic), реакция се прави на основата на реакцията двоен-антитяло сандвич. Плаките са предварително инкубирани с моноклонално антитяло, специфично за С-края на грелин. То показва количествено свързване на грелин, намиращ се в кръвната проба. Добавя се вторично (конюгирано антитяло) в ямките, за да се разпознае N-терминалният край на ацетилирания грелин. По този начин двете антитела формират сандвич, като се свързват за различни краища на хормона. Концентрацията на хормона в ямките се определя при прибавяне на Субстратен разтвор (Ellman's Reagent), който спира реакцията. Резултатът се отчита чрез спектрофотометър на 405 nm. Съдържанието на грелин се изчислява в пг/мл.

#### 5.2.2. Протокол за определяне на плъши лептин чрез ELISA кит

Плъши лептин ELISA (BioVendor, Brno, Czech Republic) е имунологичен метод за количествено изследване на плазмена концентрация на лептин. Определянето на лептин се провежда спрямо указанията на ELISA метод. Кръвната проба за определяне на лептин се събираше в EDTA епруветки. Пробите се центрофугираха на 2000 оборота за 15 мин. на  $17 \pm 4$  °C. Супернатантата се отделяше за изследване върху лептин. Пробите се отчетоха чрез спектрофотометър на 450 nm, като абсорбцията беше пропорционална на концентрацията на лептина. Плазменото съдържание на лептин се определяше в нг/мл.

## 6. Статистически методи

Данните от всички експерименти бяха анализирани със софтуер SPSS, v. 13. Получените резултати са обработени статистически и представени като средна стойност  $\pm$  средна грешка и стандартното отклонение, посредством методите на дисперсионния анализ (one-way ANOVA) и представени графично чрез статистическата програма SPSS 28.0.0.0 и Microsoft Excel, 2003.

### 6.1. Изчисляване на стандартно отклонение (SD) и коефициент на вариация (CV) на стойностите на кръвната захар

SD и CV са статистически стойности, които осигуряват различен ъгъл, от който да се погледне на променливостта на глюкозата в хода на проследяване на нейните стойности. "SD" или "стандартно отклонение" (Standard Deviation), е мярка за разположението на стойностите на кръвната глюкоза около средната стойност.

Нормалните стойности за стандартното отклонение, са тези, които се наблюдават при липса на захарен диабет. Въз основа на препоръките от конгреса на EASD в Берлин от 2018 година, стойността на SD трябва да бъде между 0.5-1.5, ако измервате в ммол/л във всички възрастови групи, при дефиниране на стабилен контрол на кръвната захар. При сравнение на изходни нива на КЗ и КЗ след започване на терапия с антидиабетен агент, стойности на SD над 1.5, говорят за значим хипогликемизиращ ефект.

Коефициент на вариация (CV) е математически коефициент, получен в резултат на математическо изчисление:

$$CV = (SD / \text{средната стойност на глюкозата}) * 100 \text{ умножаваме } \%$$

Нормалните стойности на CV следват да бъдат по-ниски от 33 % , при дефиниране на стабилен контрол на кръвната захар, въз основа на данни от конгреса на EASD в Берлин. При започване на терапия за понижаване на КЗ, стойности на CV над 33% говорят за силен хипогликемизиращ ефект на използвания агент, при стойности между 20% и 33% за значим хипогликемизиращ ефект, при сравнение на изходните стойности КЗ спрямо стойностите на фона на терапия.

6.2. Описателни методи: Вариационен анализ на количествени променливи средна, стандартно отклонение, стандартна грешка на средна при 95% доверителен интервал; графично изобразяване на данните.

6.3. Методи за проверка на статистически хипотези: Използваното на ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза бе  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  или  $p < 0.001$ .

# РЕЗУЛТАТИ

## 1. Ефект върху телесното тегло, кръвната захар, имунореактивния инсулин, нивото на инсулинова резистентност, лептин, и грелин, при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)

### *1.1. Ефект върху телесното тегло при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)*

В хода на проучването се проследиха стойности на телесното тегло на опитните животни, на седмична база, в отделните групи. От проведените измервания се установи сигнификантно намаляване на телесното тегло в групите с ежедневно интраперитонеална приложение на LP533401 в доза 0.5 мг/кг. В група 1 – групата със затлъстяване и захарен диабет с ежедневна интраперитонеална апликация на LP533401 (0.5 мг/кг) се наблюдава сигнификантна редукция на телесно тегло за четири седмичното проследяване от  $452 \pm 9.44$  грама изгодно до  $436 \pm 5.67$  грама на 4-та седмица,  $p < 0.01^{**}$ . Освен това при сравнение на стойностите на група 1 с група 2, в групите, които са със затлъстяване и захарен диабет се наблюдава статистически сигнификантна разлика по отношение на телесното тегло в края на четвъртата седмица от проучването  $p < 0.001^{***}$  (фигура 8).

От получените данни се наблюдава редукция на телесно тегло и в контролната група с интраперитонеална апликация на LP533401 (0.5 мг/кг) - група 3, от  $362 \pm 14.1$  грама изходно до  $356 \pm 6.04$  грама на четвърта седмица, което е статистически значима промяна. При сравнение на група 3 с група 4 (контролната група, при която не се използва периферния серотонинов антагонист) се наблюдава статистически значима разлика в стойностите на телесно тегло в края на четири седмичното проучване,  $p < 0.05^{*}$  (фигура 8).

Не се наблюдава статистически сигнификантна динамика в телесното тегло в контролна група без интраперитонеална апликация на LP533401 - група 4 за четирите седмици на проследяване. Наблюдава се наддаване на телесно тегло в група 2 - групата със

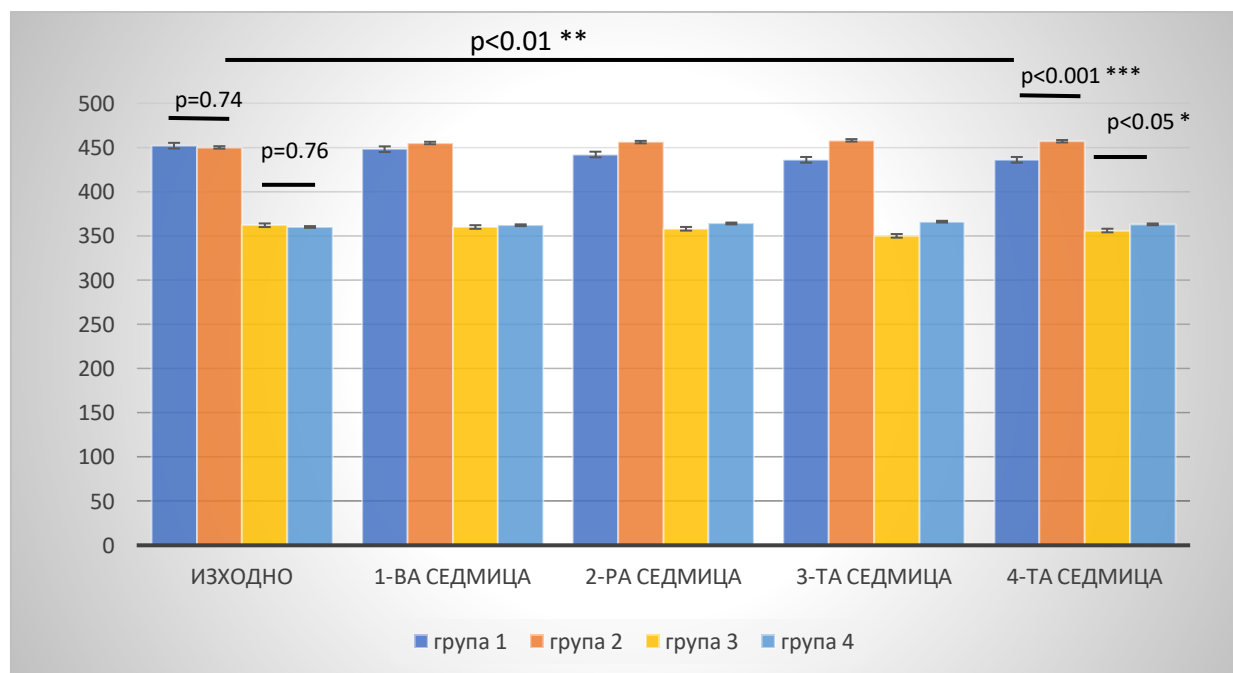
затлъстяване и захарен диабет без ежедневна интраперитонеална апликация на LP533401 (фигура 8).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	452±9.44	450±19	362±14.1	360±13.3
<b>1-ва седмица</b>	448±9.77	448±20	360 ± 11.5	362±12.9
<b>2-ра седмица</b>	442±9.57	456±21.3	358±12	364±13.2
<b>3-та седмица</b>	436±5.16	458±18.4	350±9.42	366±9.94
<b>4-та седмица</b>	436±5.67	457±15.8	356±6.04	363±10.8

Таблица 6. Средна стойност на т.т. в отделните групи в грамове ± стандартно отклонение (SD).

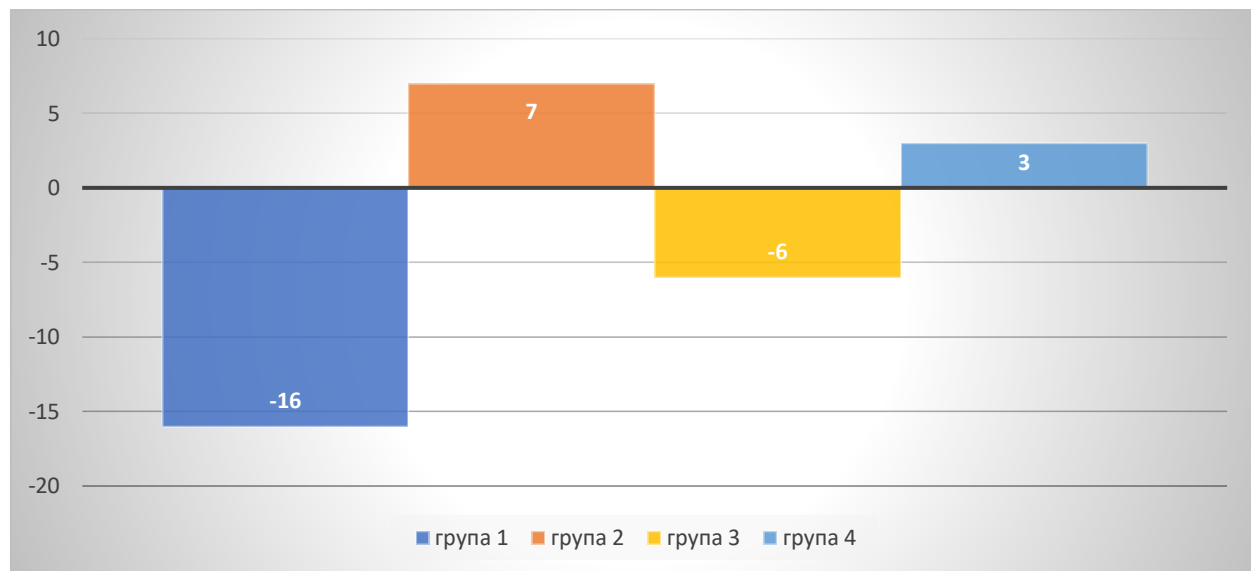
	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	452±3	450±6.01	362±4.48	360±4.21
<b>1-ва седмица</b>	448±3.09	448±6.32	360 ± 3.65	362±4.09
<b>2-ра седмица</b>	442±3.10	456±6.74	358±3.81	364±4.20
<b>3-та седмица</b>	436±1.63	458±5.83	2.98	366±3.14
<b>4-та седмица</b>	436±1.79	457±5.01	356±2.03	363±3.43

Таблица 7. Средна стойност на т.т в грамове ± стандартна грешка на измерването (SEM) .



Фигура 8. Средно телесно тегло, измерено в грамове, в различните групи, представено по

седмици. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 3 (n=10) - контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг). Статистическа значимост:  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.001^{***}$ .



Фигура 9. Обща загуба на телесно тегло, измерено в грамове, в отделните групи на четвърта седмици от проучването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг).

### ***1.2.Ефект върху кръвната захар при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).***

От проведените изследвания се установи понижаване на стойностите на кръвната захар на гладно в група 1 - плъхове със затлъстяване и захарен диабет с ежедневна интраперитонеална апликация на LP533401 (0.5 мг/кг). Средните изходни нива на кръвна

захар в група 1 в началото на проучването са  $12.8 \pm 2.29$  ммол/л, като понижаването на кръвната захар в края на четири седмичното проследяване е до  $6.4 \pm 0.34$  ммол/л, което е статистически значимо понижение,  $p < 0.001^{***}$ . Разликата в средните нива на кръвната захар в края на проучването между група 1 и група 2 - групите, които в началото на проучване са със затлъстяване и нарушение на въглехидратната обмяна е статистически значима  $p < 0.001^{***}$  (фигура 10).

Не се наблюдава статистическо значимо понижаване на стойности на кръвна захар в останалите три групи (фигура 10).

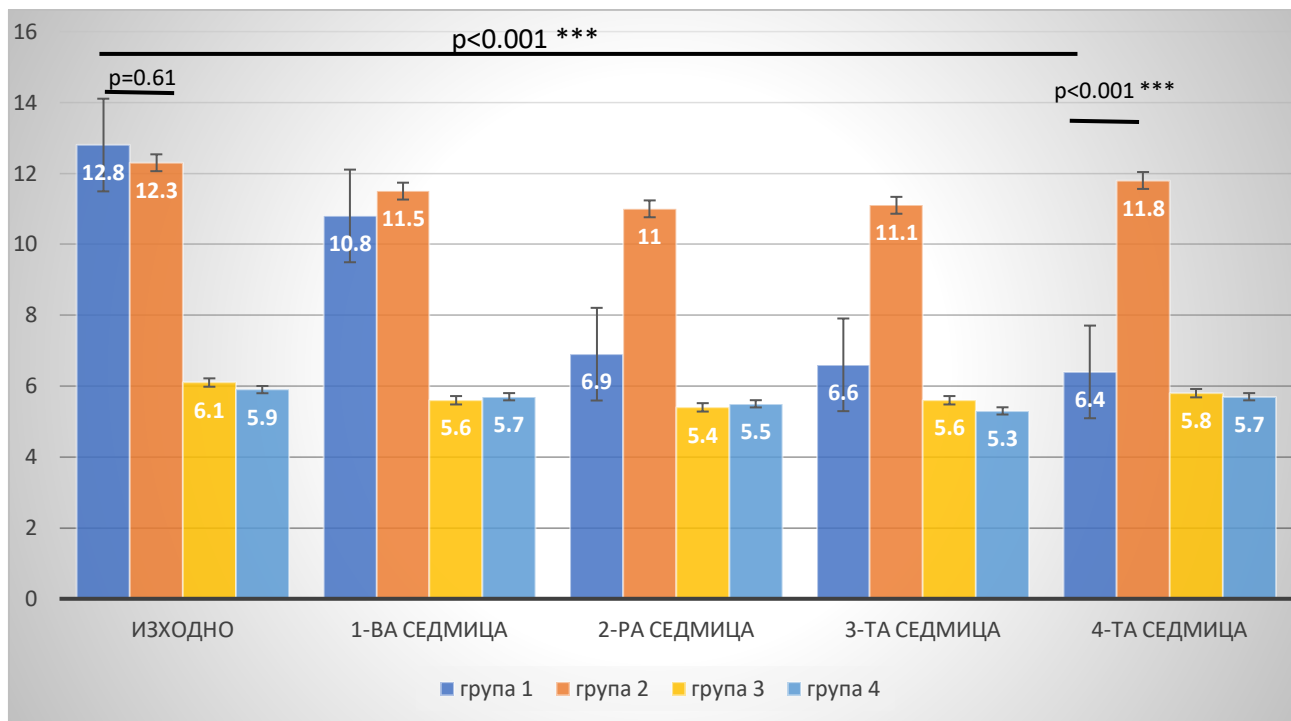
По време на наблюдавания период не се регистрираха хипогликемични стойности на кръвната захар, в нито една от изследваните групи (фигура 10).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>изходно</b>	12.8±2.29	12.3±2.03	6.1±0.29	5.9±0.214
<b>1-ва седмица</b>	10.8±1.53	11.5±1.64	5.6±0.19	5.7±0.24
<b>2-ра седмица</b>	6.9±0.26	11±1.53	5.4±0.31	5.5±0.31
<b>3-та седмица</b>	6.6±0.28	11.1±1.04	5.6±0.36	5.3±0.23
<b>4-та седмица</b>	6.4±0.34	11.8±0.76	5.8±0.38	5.7±0.22

Таблица 8. Средна стойност на КЗ в ммол/л ± стандартно отклонение (SD).

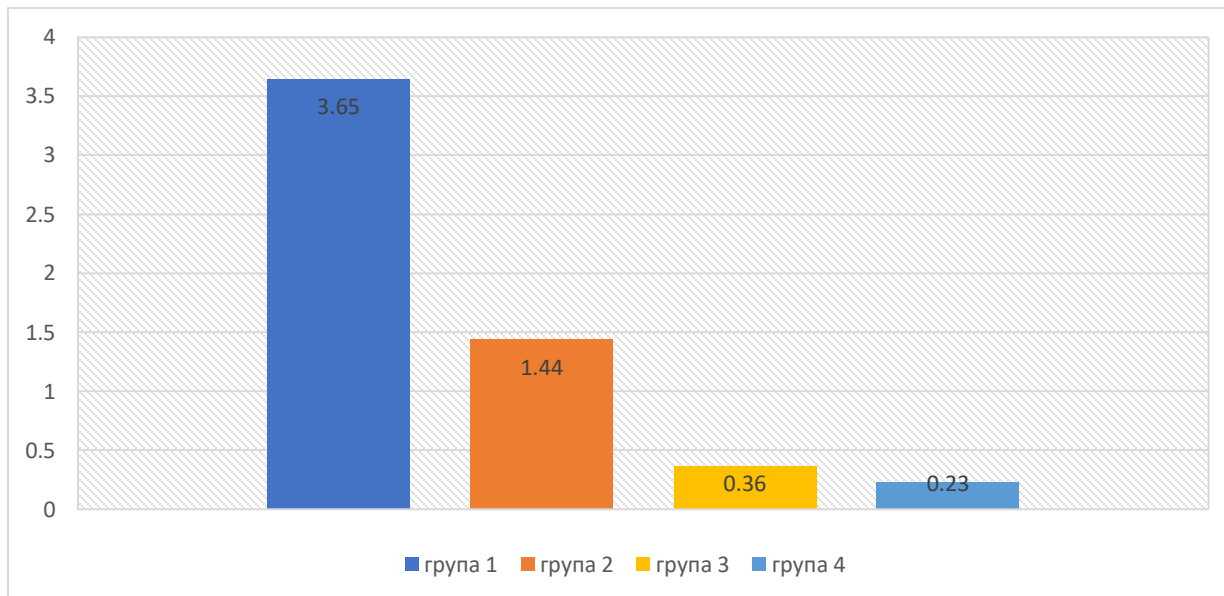
	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>изходно</b>	12.8±0.72	12.3±0.64	6.1±0.09	5.9±0.07
<b>1-ва седмица</b>	10.8±0.48	11.5±0.52	5.6±0.06	5.7±0.07
<b>2-ра седмица</b>	6.9±0.08	11±0.48	5.4±0.1	5.5±0.09
<b>3-та седмица</b>	6.6±0.08	11.1±0.32	5.6±0.12	5.3±0.07
<b>4-та седмица</b>	6.4±0.1	11.8±0.24	5.8±0.12	5.7±0.07

Таблица 9. Средна стойност на КЗ в ммол/л ± стандартна грешка на измерването (SEM).

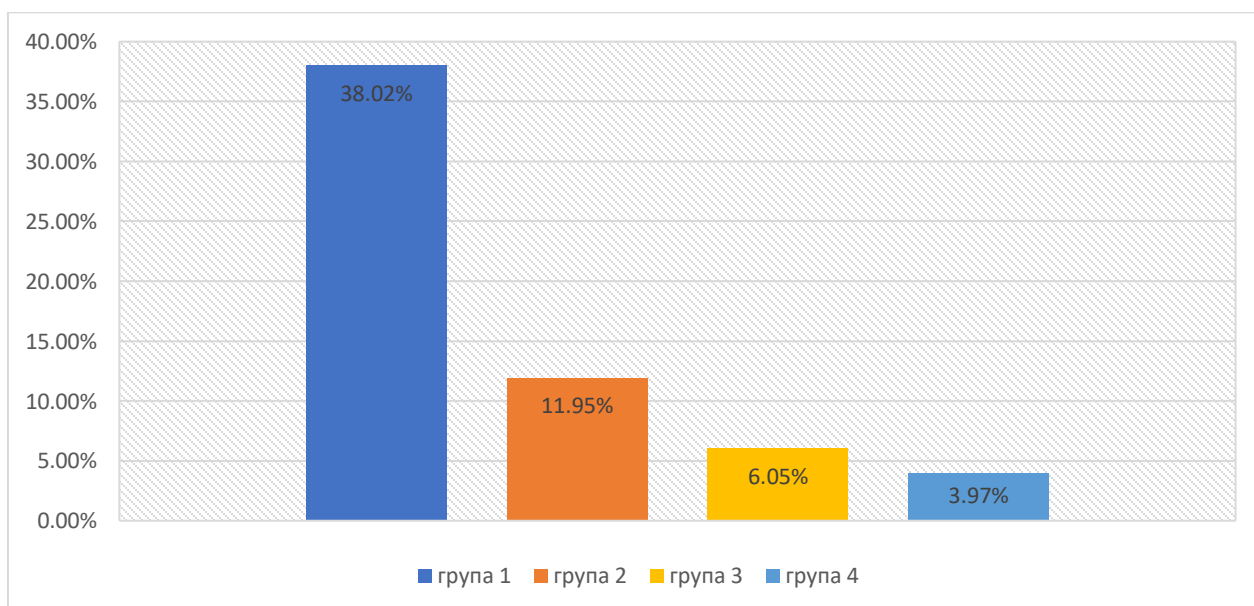


Фигура 10. Средната стойности на кръвната захар в различните групи, измерена в ммол/л, дадено по седмици. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг). Статистическа значимост: p<0.05\*, p<0.01\*\*, p<0.001\*\*\*.

Стандартното отклонение (SD) на кръвната захар в група 1 за четирите седмици е 3.65, а коефициентът на вариация е 38.02%, които са по-високи от очакваните (съответно между 0.5 - 1.5 за стандартно отклонение и до 33 % за коефициента на вариация на стойностите на кръвната захар при отделни проследявания) (фигури 11 и 12). В останалите групи стойности на двата показателя са в очаквания диапазон (фигури 11 и 12). От тези данни може да се заключи, че ежедневното интраперитонеално приложение на периферен серотонинов инхибитор - LP533401 в доза 0.5 мг/кг, води до съществена редукция на кръвната захар при опитните животни с развит захарен диабет и нарушена гликемия на гладно, но не се отразява на стойности на кръвната захар в контролната група с ежедневно интраперитонеално приложение на LP533401 в доза 0.5 мг/кг - група 3.



Фигура 11. Стандартно отклонение (SD) на кръвната захар в ммол/л, за отделните групи, на четвърта седмица от проучването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг).



Фигура 12. Коефициент на вариация (CV) на кръвната захар, за отделните групи, на

четвърта седмица от проучването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг).

***1.3.Ефект върху стойностите на имунореактивен инсулин и инсулинова резистентност, изчислена чрез НОМА - индекс при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)***

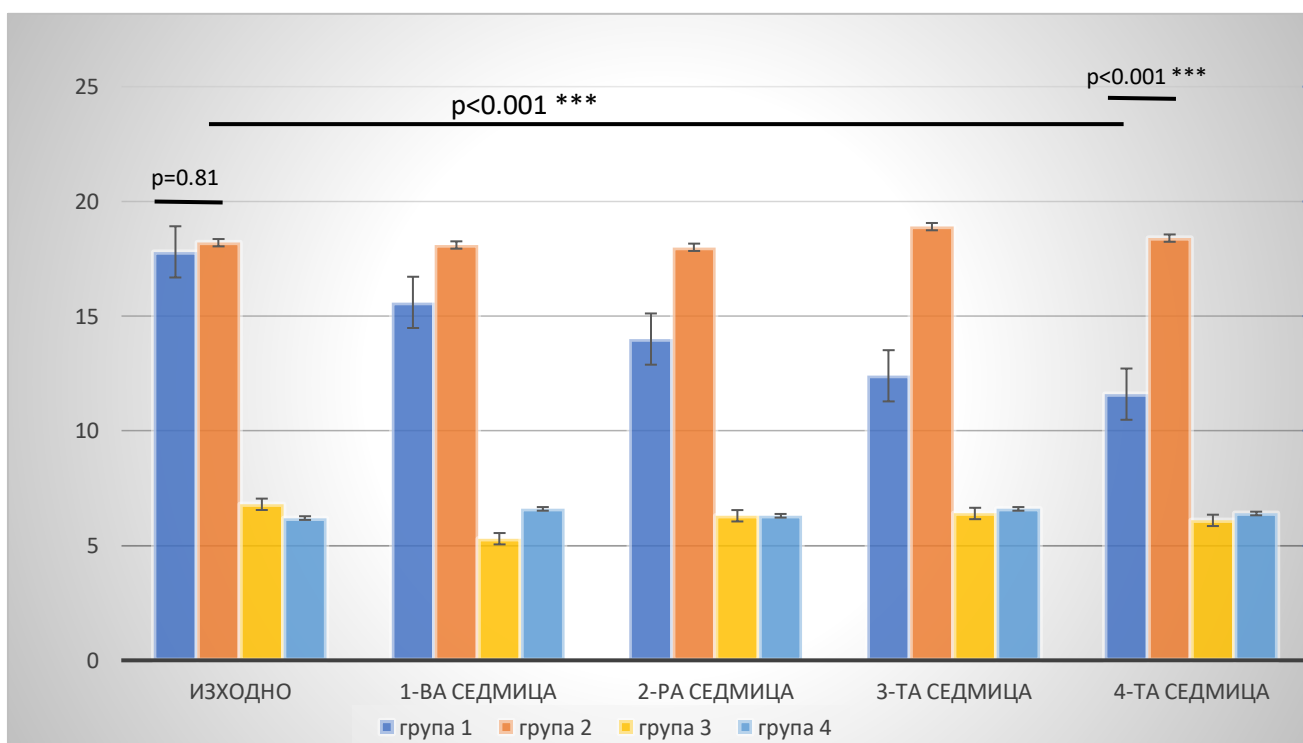
Стойностите на имунореактивен инсулин в отделните групи беше проследено седмично. От проведените измервания се установи сигнификантно намаляване на имуреактивения инсулин в група 1, групата със затлъстяване и захарен диабет с ежедневна интраперитонеална апликация на LP533401 (0.5 мг/кг) от  $17.8 \pm 2.49$  mIU/мл – изходно до  $11.6 \pm 1.41$  mIU/мл на четвърта седмица,  $p < 0.01^{**}$  (фигури 13). Установи се статистически сигнификантна разлика в стойностите на имунореактивния инсулин в група 2, при сравнение на стойностите му с тези в група 1, в края на наблюдението,  $p < 0.001^{***}$ . Не се наблюдава сигнификантна динамика в нивото на имунореактивен инсулин в останалите групи (фигура 14). Същата констелация се наблюдава и при проследяването на НОМА - индекс, като се отчете статистически значима разлика в стойности на НОМА - индекс между групи 1 и 2 - в края на четири седмичния период на наблюдение, което говори за намаляване в стойности на инсулиновата резистентност в група използваща периферния серотонинов инхибитор,  $p < 0.001^{***}$ (фигура 14). Това се дължи, както на намаляване нивата на кръвна захар, описано по-горе, така и на намалените стойности на имунореактивен инсулин, в хода на проследяването. Така стойности на НОМА - индекс в група 1 от  $10.1 \pm 1.09$  в началото на проучването (което се класифицира като инсулинова резистентност на фона на ЗД) се понижиха до  $3.2 \pm 0.34$ , стойности близки до нормалните нива. които са при здрави контроли (фигура 14).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	17.8±2.49	18.2±2.30	6.8±1.11	6.2±1.15
<b>1-ва седмица</b>	15.6 ±1.74	18.1±2.14	5.3±0.94	6.2±1.13
<b>2-ра седмица</b>	14±1.65	18±1.60	6.3±0.93	6.3±1.10
<b>3-та седмица</b>	12.4±2.35	18.9±1.86	6.4±0.68	6.6±1.69
<b>4-та седмица</b>	11.6±1.41	18.4±1.68	6.1±1.14	6.4±1.28

Таблица 10. Средна стойност на ИРИ измерен в мIU/мл ± стандартно отклонение (SD).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	17.8±0.79	18.2±0.72	6.8±0.35	6.2±0.36
<b>1-ва седмица</b>	15.6 ±0.55	18.1±0.67	5.3±0.29	6.2±0.35
<b>2-ра седмица</b>	14±0.52	18±0.50	6.3±0.29	6.3±0.34
<b>3-та седмица</b>	12.4±0.74	18.9±0.58	6.4±0.21	6.6±0.53
<b>4-та седмица</b>	11.6±0.44	18.4±0.53	6.1±0.36	6.4±0.40

Таблица 11. Средна стойност на ИРИ измерен в мIU/мл ± стандартна грешка на измерването (SEM).



Фигура 13. Средна стойност на имунореактивен инсулин, измерена в мIU/мл, хода на проследяването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна

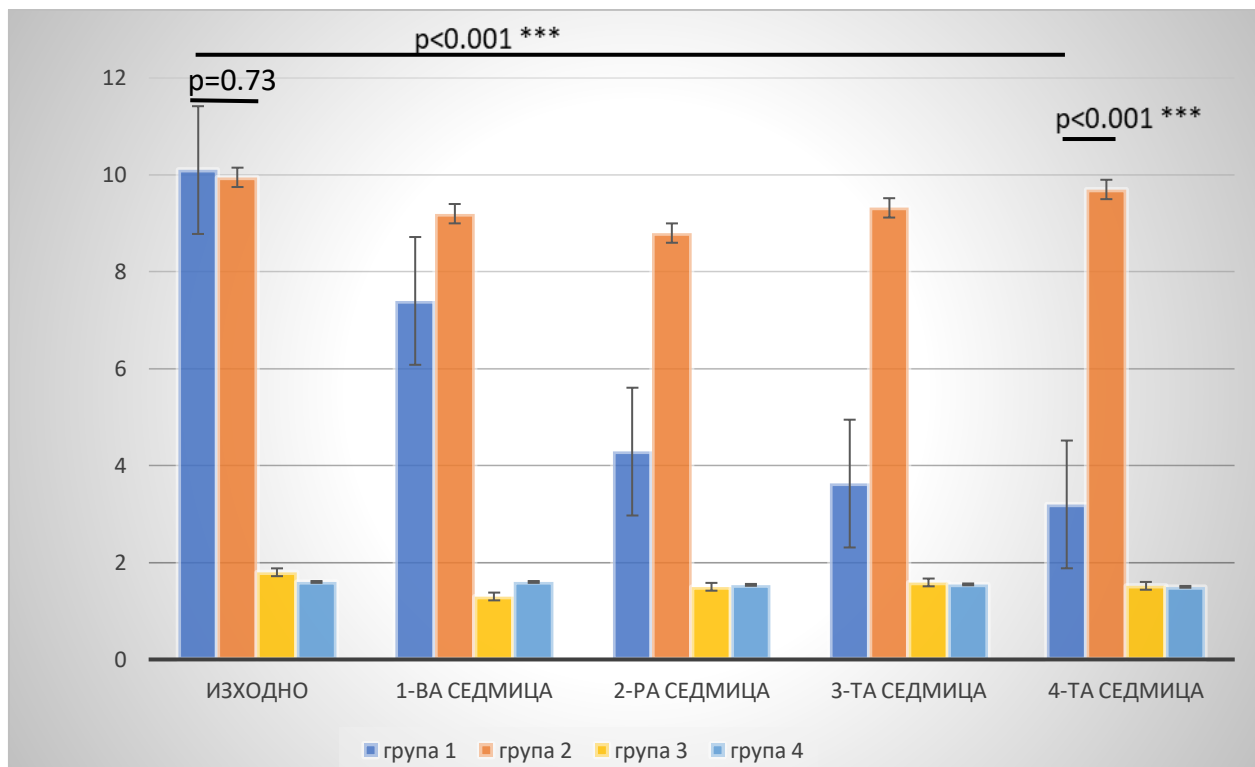
интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг). Статистическа значимост:  $p < 0.001^{***}$ .

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	10.1±1.09	9.95±0.82	1.8±0.4	1.6±0.39
<b>1-ва седмица</b>	7.4±0.70	9.2±0.69	13±0.43	1.6±0.31
<b>2-ра седмица</b>	4.3±0.72	8.8±0.68	1.5±0.30	1.5±0.31
<b>3-та седмица</b>	3.6±0.57	9.3±0.70	1.59±0.27	1.55±0.27
<b>4-та седмица</b>	3.2±0.34	9.7±0.94	1.5±0.23	1.5±0.31

Таблица 12. Средна стойност на HOMA - индекс ± стандартно отклонение (SD).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	10.1±0.34	9.95±0.26	1.8±0.12	1.6±0.12
<b>1-ва седмица</b>	7.4±0.22	9.2±0.21	13±0.13	1.6±0.1
<b>2-ра седмица</b>	4.3±0.0.22	8.8±0.21	1.5±0.09	1.5±0.08
<b>3-та седмица</b>	3.6±0.18	9.3±0.22	1.5±0.08	1.5±0.08
<b>4-та седмица</b>	3.2±0.1	9.7±0.29	1.5±0.07	1.5±0.1

Таблица 13. Средна стойност на HOMA - индекс ± стандартно отклонение (SD).



Фигура 14. Средни нива по седмици на НОМА - индекс, по групи, в хода на проследяването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг); група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг ). Статистическа значимост :  $p < 0.001^{***}$ .

#### ***1.4. Ефект върху стойностите на лептин при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)***

В началото на четири седмичния период, се установиха сигнификантно по-високи нива на лептин в групите със затлъстяване и захарен диабет, което най-вероятно се дължи на лептиновата резистентност, която се наблюдава при затлъстяване,  $p < 0.01^{**}$ . В хода на проведените изследвания, в група 1, групата със затлъстели животни с ежедневна интраперитонеална апликация на периферен серотонинов антагонист - LP533401 (0.5 мг/кг),

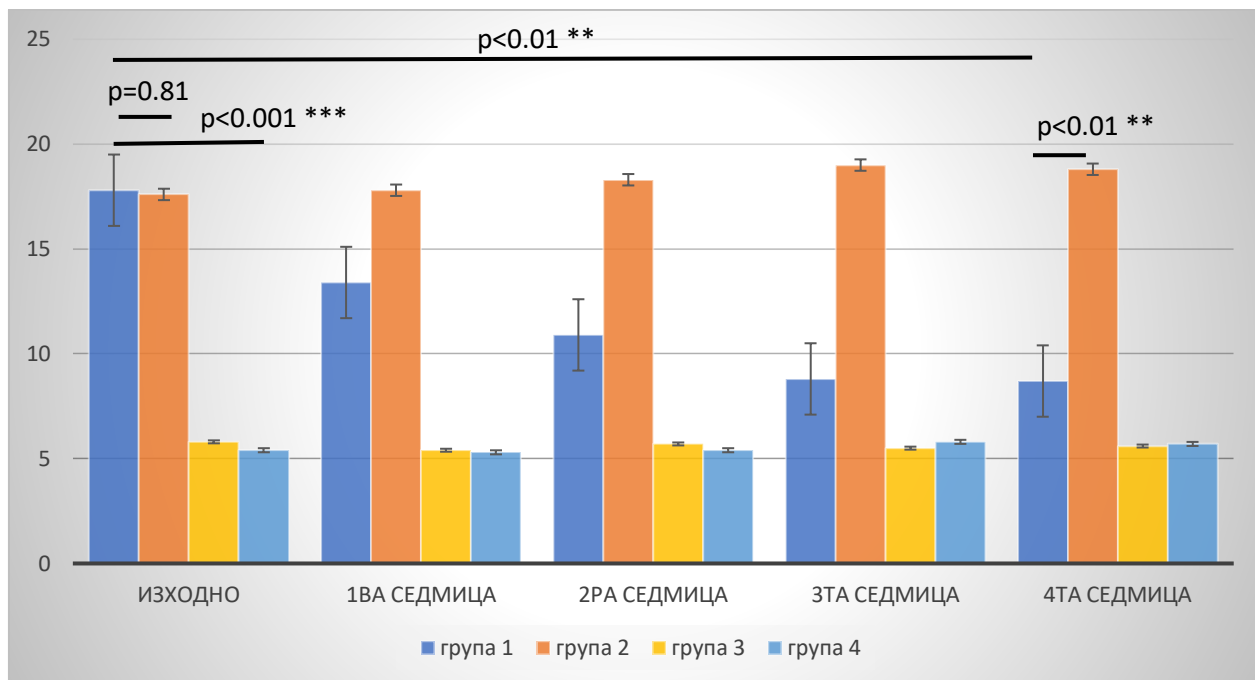
се наблюдава сигнификантно намаляване на нивата на лептина от  $17.8 \pm 1.51$  нг/мл до  $8.7 \pm 0.95$  нг/мл в края на наблюдението,  $p < 0.01^{**}$ . Статистически сигнификантна разлика се наблюдава и при сравнение на стойностите на лептина в група 1 с група 2 ( $p < 0.01^{**}$ ), групите, в които в началото на наблюдението се отчетоха сигнификантно по-високи нива на лептина в сравнение с контролните групи. Не се наблюдава статистически значима динамика в стойностите на лептина в останалите групи (фигури 15).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	17.8±1.51	17.6±1.97	5.8±13.7	5.4±1.41
<b>1-ва седмица</b>	13.4±2.28	17.8±1.22	5.4±0.92	5.3±0.76
<b>2-ра седмица</b>	10.9±1.83	18.3±1.14	5.7±1.01	5.4±0.56
<b>3-та седмица</b>	8.8±1.13	19±1.21	5.5±1.03	5.8±0.75
<b>4-та седмица</b>	8.7±0.95	18.8±1.06	5.6±0.66	5.7±0.23

Таблица 14. Средна стойност на лептим в нг/мл ± стандартно отклонение (SD).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>изходно</b>	17.8±0.47	17.6±0.62	5.8±0.43	5.4±0.44
<b>1-ва седмица</b>	13.4±0.72	17.8±0.38	5.4±0.29	5.3±0.24
<b>2-ра седмица</b>	10.9±0.58	18.3±0.36	5.7±0.31	5.4±0.17
<b>3-та седмица</b>	8.8±0.35	19±0.38	5.5±1.032	5.8±0.23
<b>4-та седмица</b>	8.7±0.30	18.8±0.33	5.6±0.20	5.7±0.1

Таблица 15. Средна стойност на лептин в нг/мл ± стандартна грешка на измерването (SEM).



Фигура 15. Средна стойност на лептина, измерена в нг/мл, по седмици в отделните групи. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг). Статистическа значимост:  $p < 0.01^{**}$ ,  $p < 0.001^{***}$ .

### ***1.5.Ефект върху стойностите на грелин при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове **порода Вистар (Wistar).*****

При изследването на стойностите на ацетилиран грелин се установиха по-високи изходни нива на хормона в групите със затлъстяване и захарен диабет. В хода на проследяването се установи сигнификантно понижение на стойностите на грелина в група 1 – групата със затлъстяване и захарен диабет с ежедневна интраперитонеална апликация на LP533401 (0.5 мг/кг) на четвърта седмица  $p < 0.01^{**}$ . При сравнение на

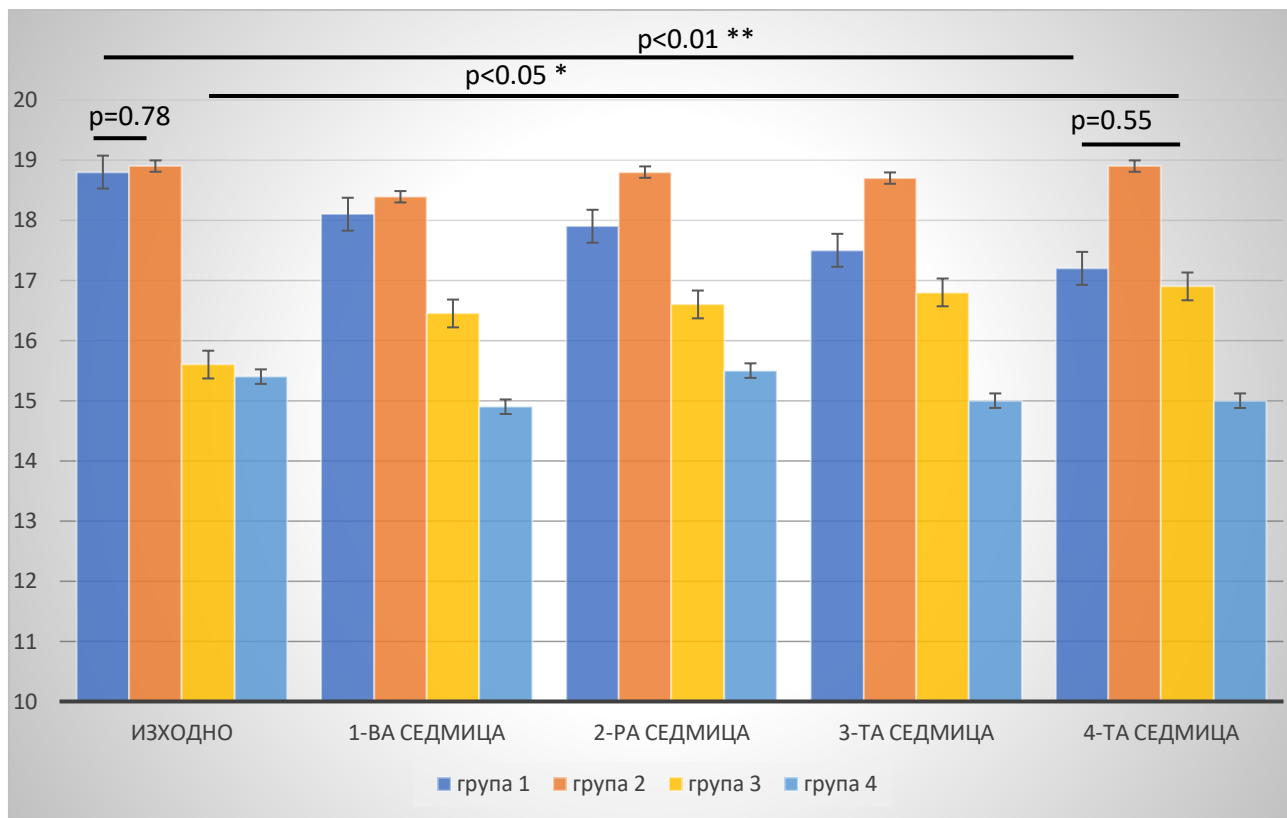
нивата на грелина в група 1 и група 2, в края на изследването, също се открива сигнификантна разлика в стойностите му, въпреки че изходно двете групи започват със сравними нива на хормона,  $p < 0.01^{**}$ . Установиха се сигнификантно по-високи нива на грелин, на четвъртата седмица, спрямо изходните нива и в група 3 ( $p < 0.05^*$ ) - контролната група с ежедневна интраперитонеална апликация на LP533401 (0.5 мг/кг), като двете групи – 1-ва и 3-та достигнаха близки средни нива на грелина през четвъртата седмица от наблюдението - (фигура 16 и 17).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	18.8±1.04	18.9±1.18	15.6±1.61	15.4±1.04
<b>1-ва седмица</b>	18.1±0.79	18.4±1.02	16.5±1.56	14.9±1.01
<b>2-ра седмица</b>	17.9±0.76	18.8±0.96	16.6±1.48	15.5±0.81
<b>3-та седмица</b>	17.5±0.70	18.7±0.62	16.8±1.25	15±0.62
<b>4-та седмица</b>	17.2±0.50	18.9±0.87	16.9±1.51	15±0.67

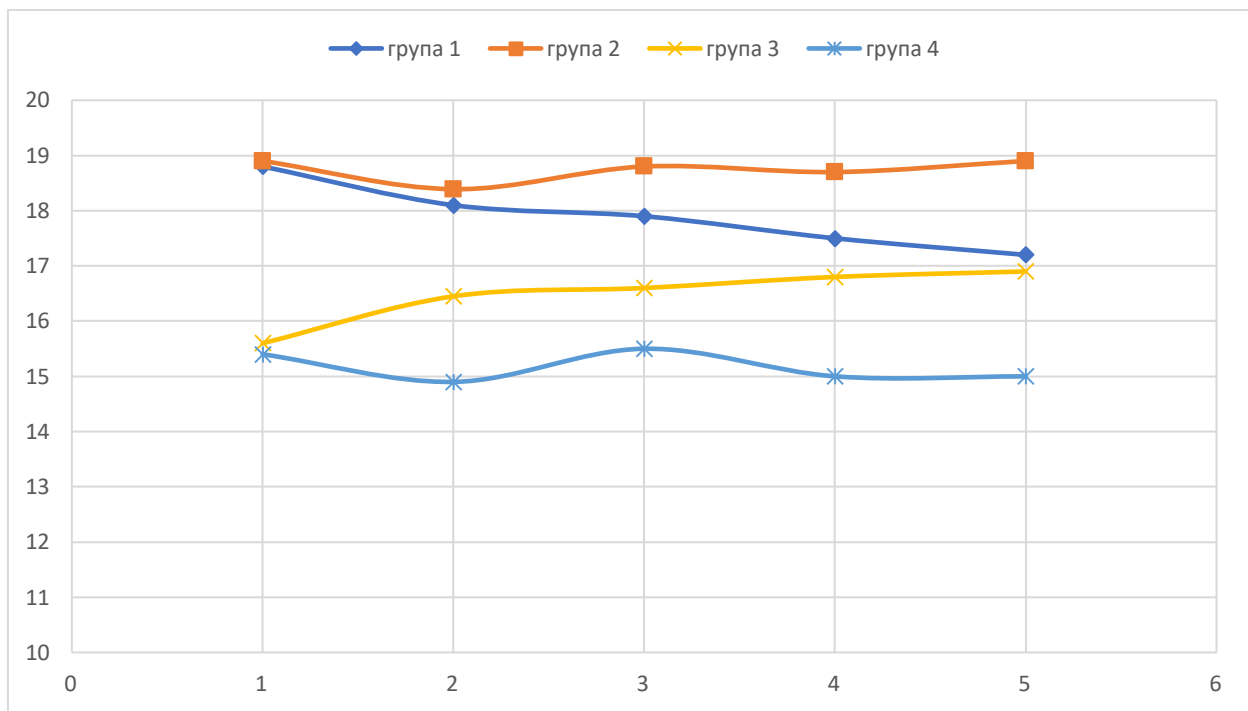
Таблица 16. Средна стойност на грелина в пг/мл ± стандартно отклонение (SD).

)	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	18.8±0.32	18.9±0.37	15.6±0.50	15.4±0.32
<b>1-ва седмица</b>	18.1±0.24	18.4±0.32	16.5±0.49	14.9±0.32
<b>2-ра седмица</b>	17.9±0.24	18.8±0.19	16.60.46	15.5±0.25
<b>3-та седмица</b>	17.5±0.22	18.7±0.19	16.8±0.39	15±0.19
<b>4-та седмица</b>	17.2±0.15	18.9±0.27	16.9±0.47	15±0.21

Таблицаа 17. Средна стойност на грелина в пг/мл ± стандартна грешка на измерването (SEM).



Фигура 16 . Средна стойност на ацетилиран грелин (пг/мл) по седмици в отделните групи. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг ). Статистическа значимост:  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ .



Фигура 17. Динамика на стойностите на ацетилиран грелин (pg/ml) по седмици в отделните групи. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг).

## **2. Ефект върху телесното тегло, кръвната захар, имунореактивния инсулин, нивото на инсулиновата резистентност при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)**

### ***2.1. Ефект върху телесното тегло при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)***

В хода на проведено проучване се проследиха стойности на телесното тегло на опитните животни на седмична база в отделните групи. От проведените измервания се установи сигнификантно намаляване на телесното тегло в групите с ежедневно

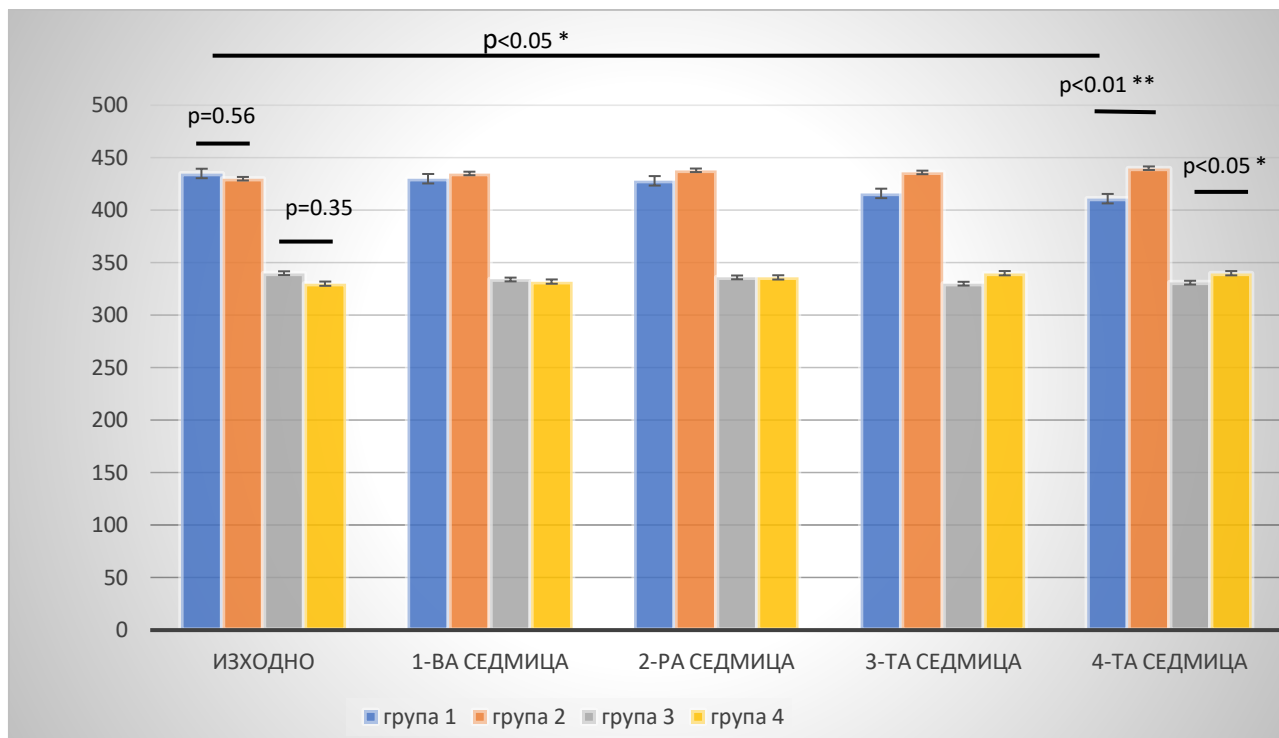
интраперитонеално приложение на WAY163909 (3 мг/кг). В група 1 – групата със затлъстяване и ЗД тип 2 с ежедневна интраперитонеална апликация на WAY163909 (3 мг/кг) се наблюдава сигнификантна редукция на телесно тегло в края на четири седмичното проследяване от 435±20.4 грама – изходно до 411±12.6 грама,  $p < 0.05^*$  (фигура 18). Статистически сигнификантна разлика има и при сравнение на стойностите на т.т. в края на проучването между група 1 и група 2,  $p < 0.01^{***}$  (фигура 18). Освен това се наблюдава редукция на телесно тегло и в контролната група с интраперитонеална апликация на WAY163909 (3 мг/кг) - група 3 от 340±24.9 грама изходно до 331±7.33 грама на четвъртата седмица, което не е статистически значима промяна. При сравнение на двете контролни групи – 3 и 4, на четвъртата седмица от проследяването, се констатира статистически значима разлика в стойностите на телесното тегло между групата с приложениена WAY163909 (3 мг/кг) и тази без ежедневна апликация,  $p < 0.05^*$  (фигура 18).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>изходно</b>	435±20.4	430±17.3	340±24.9	330±22.3
<b>1-ва седмица</b>	439±20.4	435±17.7	334 ± 23.7	332±21.9
<b>2-ра седмица</b>	428±19.1	438±16.3	326±19.2	336±17.6
<b>3-та седмица</b>	416±14.1	436±18.3	330±18.2	340±17.1
<b>4-та седмица</b>	411±12.6	441±15.2	331±7.33	340±6.05

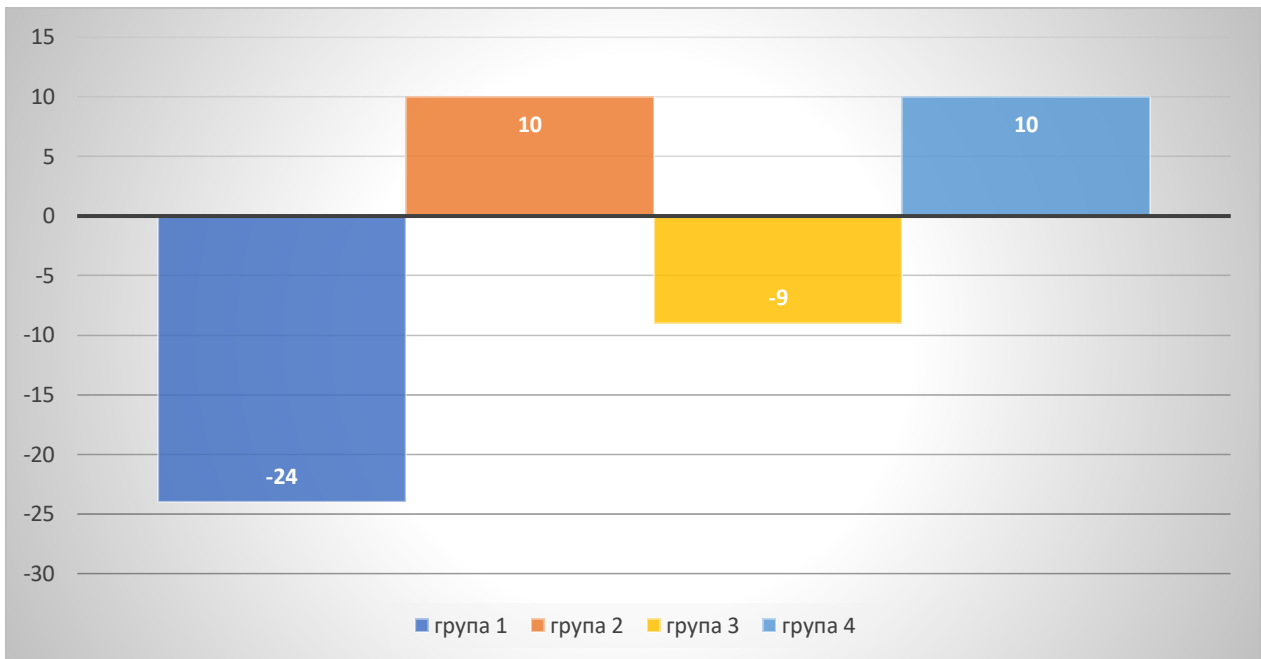
Таблица 18. Средна стойност на т.т. в грамове ± стандартно отклонение (SD).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>изходно</b>	435±6.45	430±5.47	340±7.88	330±7.07
<b>1-ва седмица</b>	439±6.43	435±5.62	334 ± 7.52	332±7.37
<b>2-ра седмица</b>	428±6.06	438±5.17	326±6.09	336±5.56
<b>3-та седмица</b>	416±4.45	436±5.81	330±5.77	340±5.42
<b>4-та седмица</b>	411±4	441±4.81	331±5.66	340±4.71

Таблица 19. Средна стойност на т.т. в грамове ± стандартна грешка на измерването (SEM).



Фигура 18. Средно телесно тегло, измерено в грамове, в различните групи, представено по седмици. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг). Статистическа значимост :  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ .



Фигура 19. Обща загуба на телесно тегло, измерено в грамове за отделните групи на четвърта седмица от проучването. Група 1 - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 2 - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 3 – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 4 – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг).

## ***2.2. Ефект върху кръвната захар при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909 при мъжки плъхове порода B6C3F1 (Wistar)***

От проведените изследвания се установи понижаване на стойностите на кръвната захар на гладно в група 1 - плъхове със затлъстяване и ЗД с ежедневна интраперитонеална апликация на WAY163909 (3 мг/кг). Средните изходни нива на кръвна захар в група 1 е  $11.6 \pm 2.24$  ммол/л, като понижаването на кръвната захар в края на четири седмичното проследяване е  $7.5 \pm 0.92$  ммол/л, което е статистически значимо понижение,  $p < 0.05^*$  (фигура 20). Разликата в стойностите на кръвната захар между група 1 и група 2, групите, в които в началото на проучване са със затлъстяване и нарушение на въглехидратната обмяна, в края на проучването е статистически значима,  $p < 0.01^{**}$

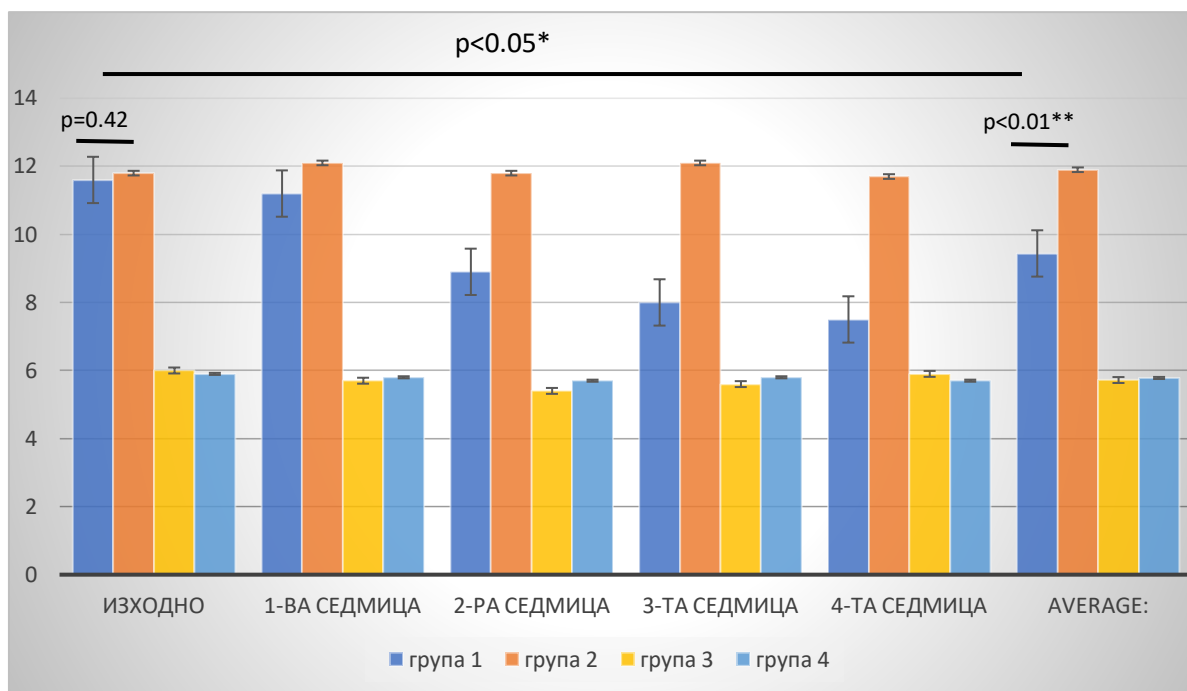
(фигура 20). Не се наблюдава статистическо значимо понижаване на стойности на кръвна захар в останалите три групи. По време на наблюдавания период не се регистрираха хипогликемични стойности на кръвната захар в нито една от изследваните групи (фигура 20).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	11.6 ± 2.24	11.8 ± 2.16	6.0 ± 0.46	5.91 ± 0.36
<b>1-ва седмица</b>	11.2 ± 1.98	12.1±2.42	5.7 ± 0.47	5.8 ± 0.42
<b>2-ра седмица</b>	8.9 ± 1.49	11.8 ± 1.76	5.4 ± 0.56	5.7 ± 0.61
<b>3-та седмица</b>	8 ± 1.08	11.7 ± 1.40	5.6 ± 0.80	5.8 ± 0.77
<b>4-та седмица</b>	7.5 ± 0.92	11.9 ± 1.71	5.72 ± 0.42	5.78 ± 0.63

Таблица 20. Средна стойност на КЗ в ммол/л ± стандартно отклонение (SD).

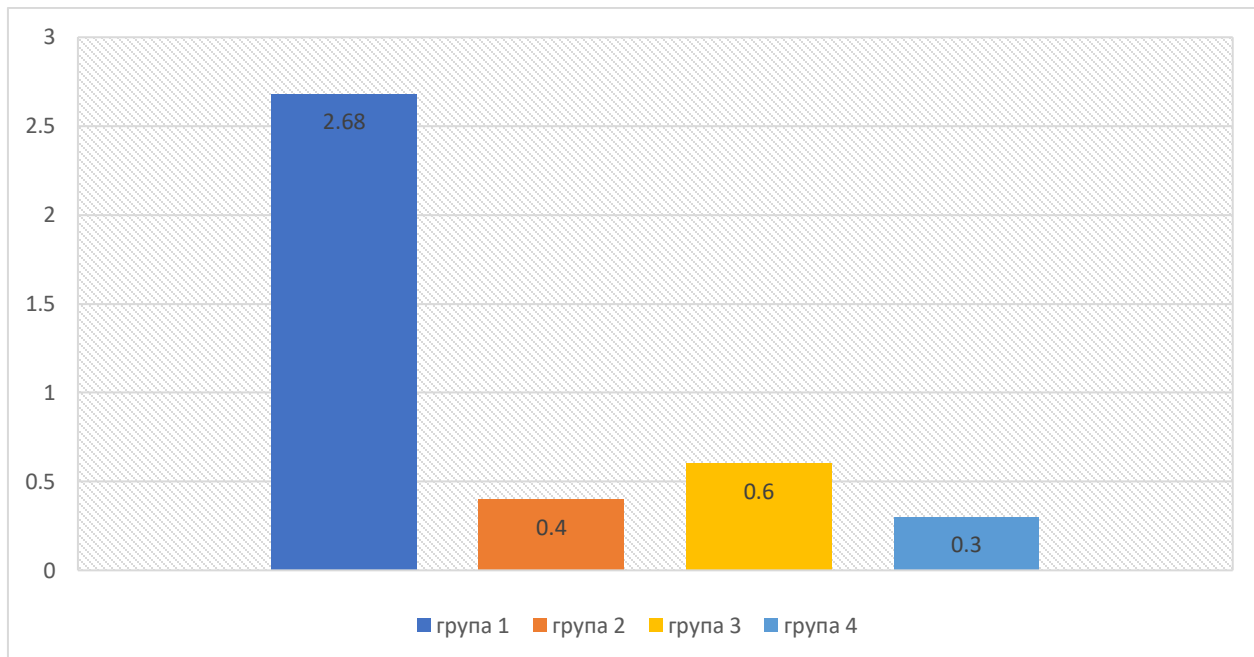
	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	11.6 ± 0.70	11.8 ± 0.68	6.0 ± 0.14	5.91 ± 0.11
<b>1-ва седмица</b>	11.2 ± 0.62	12.1±0.76	5.7 ± 0.14	5.8 ± 0.13
<b>2-ра седмица</b>	8.9 ± 0.47	11.8 ± 0.58	5.4 ± 0.18	5.7 ± 0.19
<b>3-та седмица</b>	8 ± 0.34	11.7 ± 0.44	5.6 ± 0.25	5.8 ± 0.24
<b>4-та седмица</b>	7.5 ± 0.29	11.9 ± 0.54	5.72 ± 0.13	5.78 ± 0.20

Таблица 21. Средна стойност на КЗ в ммол/л ± стандартна грешка на измерването (SEM).

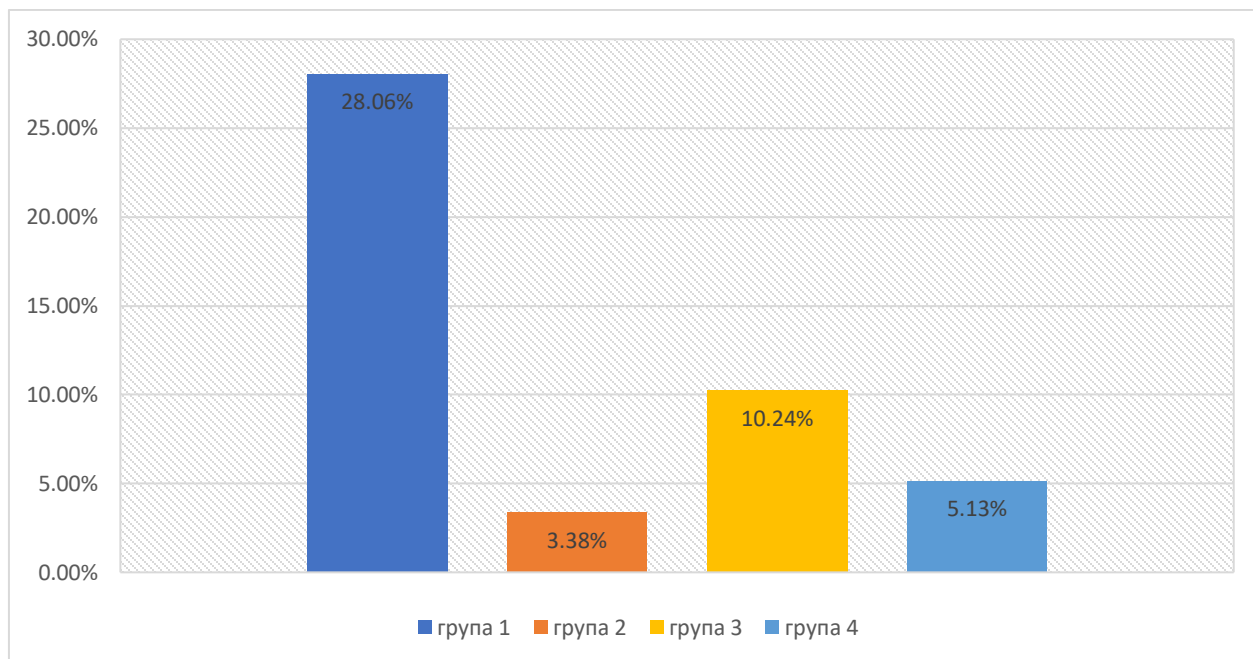


Фигура 20. Средната стойности на кръвна захар в различните групи, измерена в ммол/л, дадено по седмици. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг). Статистическа значимост :  $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.01^{**}$ .

Стандартното отклонение (SD) на кръвната захар в група 1, за четирите седмици на проследяване е 2.68, а коефициентът на вариация е 28.06%, които са по-високи от очакваните. В останалите групи стойностите на двата показателя са в очаквания диапазон. Като може да се заключи, че ежедневното интраперитонеално приложение на WAY163909 (3 мг/кг), води до съществена редукция на кръвната захар при опитните животни с развит ЗД и нарушена гликемия на гладно, но не се отразява в стойности на кръвната захар в контролната група с ежедневно интраперитонеално приложение на WAY163909 (3 мг/кг) - група 3 (фигура 21 и 22).



Фигура 21. Стандартно отклонение (SD) на кръвната захар в ммол/л, за отделните групи, на четвърта седмици от проучването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг).



Фигура 22. Коефициент на вариация (CV) на кръвната захар, за отделните групи, за четирите седмици на проучването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг).

### ***2.3. Ефект върху стойностите на имунореактивен инсулин и инсулинова резистентност, изчислена чрез НОМА - индекс при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909***

Стойностите на имунореактивен инсулин на отделните групи беше проследено седмично. От проведените измервания се установи сигнификантно намаляване на имуреактивения инсулин в група 1, групата със затлъстяване и захарен диабет с ежедневна интраперитонеална апликация на WAY163909 (3 мг/кг)-  $p < 0.01^{**}$  от  $18.3 \pm 4.1$  mIU/мл – изходно до  $10.6 \pm 1.18$  mIU/мл на четвърта седмица. Освен това се установи и статистически сигнификантна разлика при сравнение на стойностите на имунореактивен инсулин в група

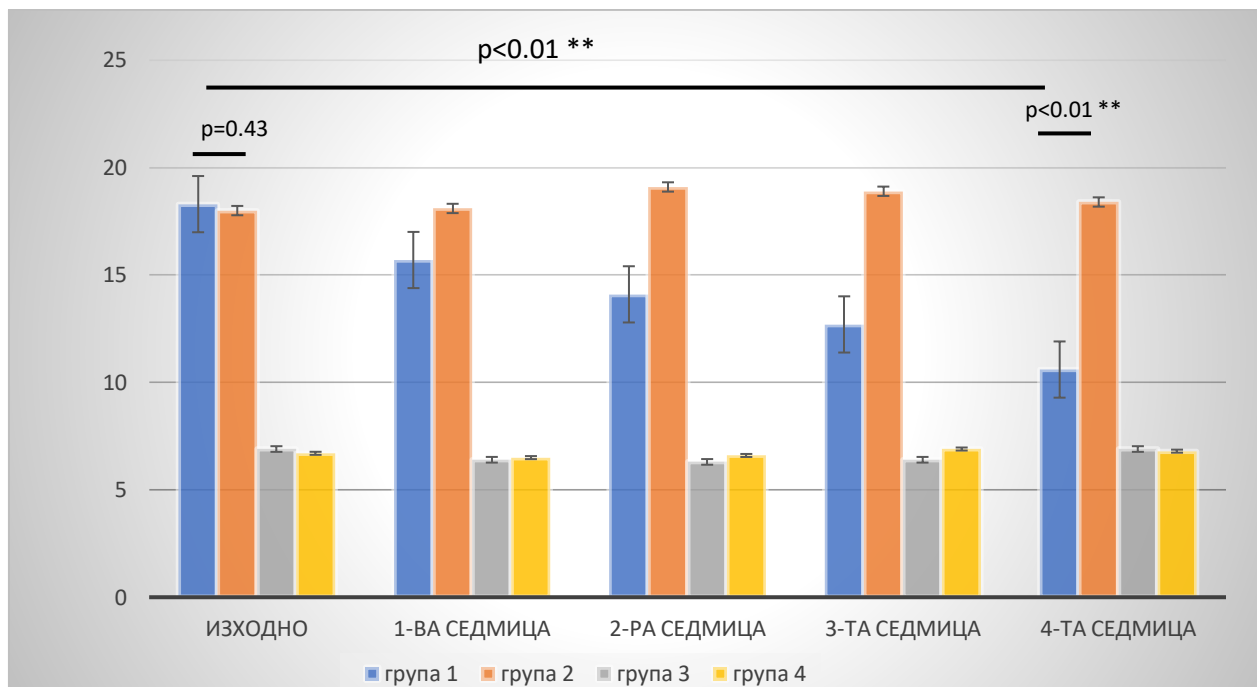
1 и 2,  $p < 0.01^{**}$  на четвърта седмица. Не се наблюдава сигнификантна динамика в нивото на имунореактивен инсулин в останалите групи (фигура 23). Същата констелация се наблюдава и при проследяването на НОМА - индекс, като се отчете статистически значима разлика в стойности на НОМА - индекс между групи 1 и 2, в края на четири седмичния период на наблюдение, което говори за намаляване в стойности на инсулинова резистентност в групата, използваща централно-мозъчния серотонинов агонист. Това се дължи, както на намалените нива на кръвна захар, описани по-горе, така и на намалените нива на имунореактивен инсулин, в хода на проследяването. Така стойности на НОМА - индекс в група 1 достигат нива от  $9.43 \pm 1.86$  - изходно до  $3.53 \pm 0.37$  на четвърта седмица (фигура 24).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	$18.3 \pm 4.1$	$12.3 \pm 3.47$	$6.9 \pm 0.98$	$6.7 \pm 0.86$
<b>1-ва седмица</b>	$15.7 \pm 2.92$	$18.0 \pm 3.00$	$6.4 \pm 0.84$	$6.5 \pm 0.89$
<b>2-ра седмица</b>	$14.1 \pm 3.22$	$19.1 \pm 2.74$	$6.3 \pm 0.95$	$6.6 \pm 1.03$
<b>3-та седмица</b>	$12.7 \pm 2.69$	$18.9 \pm 2.41$	$6.4 \pm 1.19$	$6.7 \pm 0.89$
<b>4-та седмица</b>	$10.6 \pm 1.18$	$18.4 \pm 1.75$	$6.9 \pm 0.77$	$6.8 \pm 1.11$

Таблица 22. Средна стойност на ИРИ в mIU/мл  $\pm$  стандартно отклонение (SD).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>изходно</b>	$18.3 \pm 1.29$	$12.3 \pm 1.9$	$6.9 \pm 0.31$	$6.7 \pm 0.27$
<b>1-ва седмица</b>	$15.7 \pm 0.92$	$18.0 \pm 0.95$	$6.4 \pm 0.26$	$6.5 \pm 0.28$
<b>2-ра седмица</b>	$14.1 \pm 1.01$	$19.1 \pm 0.86$	$6.3 \pm 0.30$	$6.6 \pm 0.33$
<b>3-та седмица</b>	$12.7 \pm 0.85$	$18.9 \pm 0.76$	$6.4 \pm 0.37$	$6.7 \pm 0.28$
<b>4-та седмица</b>	$10.6 \pm 0.37$	$18.4 \pm 0.55$	$6.9 \pm 0.24$	$6.8 \pm 0.35$

Таблица 23. Средна стойност на ИРИ в mIU/мл  $\pm$  стандартна грешка на измерването (SEM).



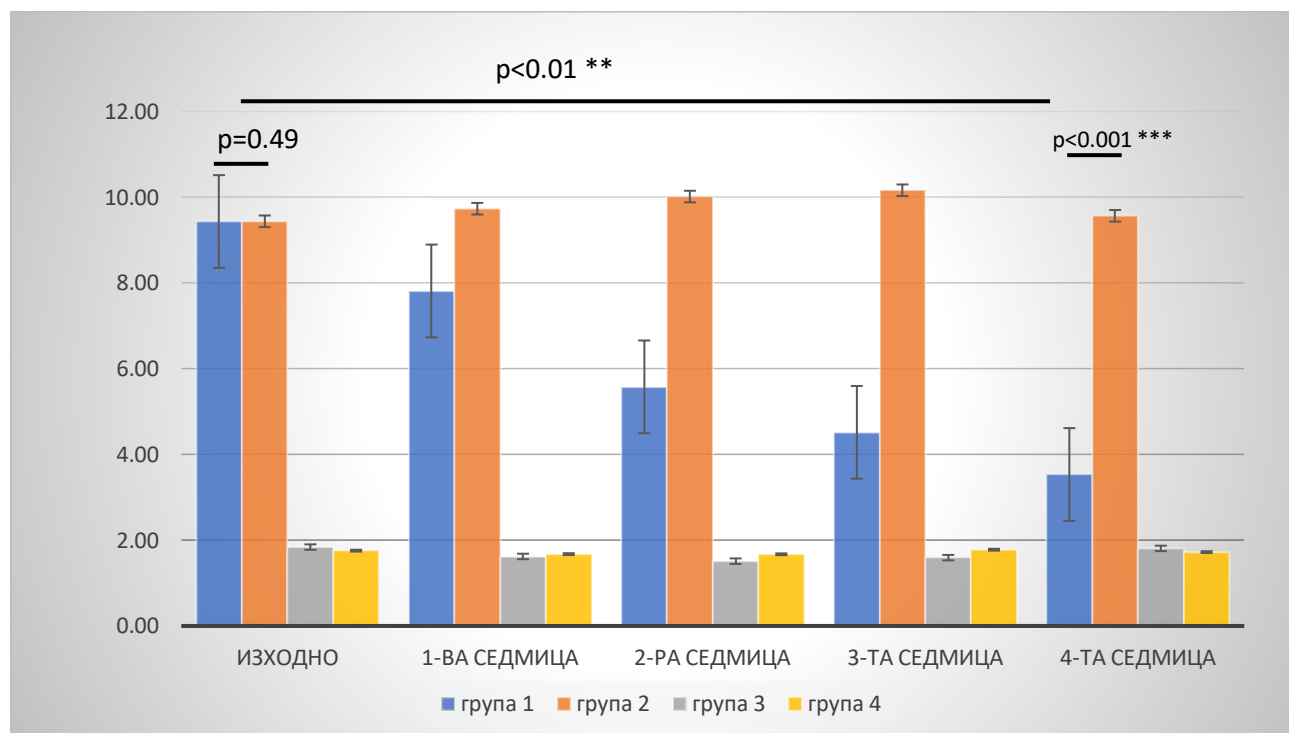
Фигура 23. Средна стойност на имунореактивен инсулин, измерена в mIU/мл, в хода на проследяването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг). Статистическа значимост: p<0,01\*\*.

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	9.43 ± 1.86	9.44 ± 1.69	1.84 ± 0.33	1.76 ± 0.34
<b>1-ва седмица</b>	7.82 ± 1.23	9.73 ± 1.52	1.62 ± 1.62	1.68 ± 0.24
<b>2-ра седмица</b>	5.58 ± 0.54	10.02 ± 1.43	1.51 ± 0.25	1.67 ± 0.24
<b>3-та седмица</b>	4.58 ± 0.63	10.2 ± 1.07	1.51 ± 0.28	1.67 ± 0.26
<b>4-та седмица</b>	3.53 ± 0.37	9.57 ± 1.02	1.81 ± 0.17	1.72 ± 0.19

Таблица 24. Средна стойност на HOMA - индекс ± стандартно отклонение (SD).

	група 1	група 2	група 3	група 4
Изходно	9.43 ± 0.58	9.44 ± 0.53	1.84 ± 0.10	1.76 ± 0.11
1-ва седмица	7.82 ± 0.39	9.73 ± 0.48	1.62 ± 0.09	1.68 ± 0.07
2-ра седмица	5.58 ± 0.17	10.02 ± 0.45	6.3 ± 0.08	6.6 ± 0.07
3-та седмица	4.58 ± 0.19	10.2 ± 0.34	1.51 ± 0.09	1.67 ± 0.08
4-та седмица	3.53 ± 0.11	9.57 ± 0.32	1.81 ± 0.05	1.72 ± 0.06

Таблица 25. Средна стойност на НОМА - индекс ± стандартна грешка на измерването (SEM).



Фигура 24. Средни нива на НОМА - индекс, по седмици и по групи, в хода на проследяването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг). Статистическа значимост: p<0.01\*\*, p<0.001\*\*\*.

**3. Ефект върху телесното тегло, кръвната захар, имунореактивния инсулин, нивото на инсулинова резистентност, изчислено чрез НОМА - индекс при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro 60-0175 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)**

**3.1.Ефект върху телесното тегло при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro 60-0175 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)**

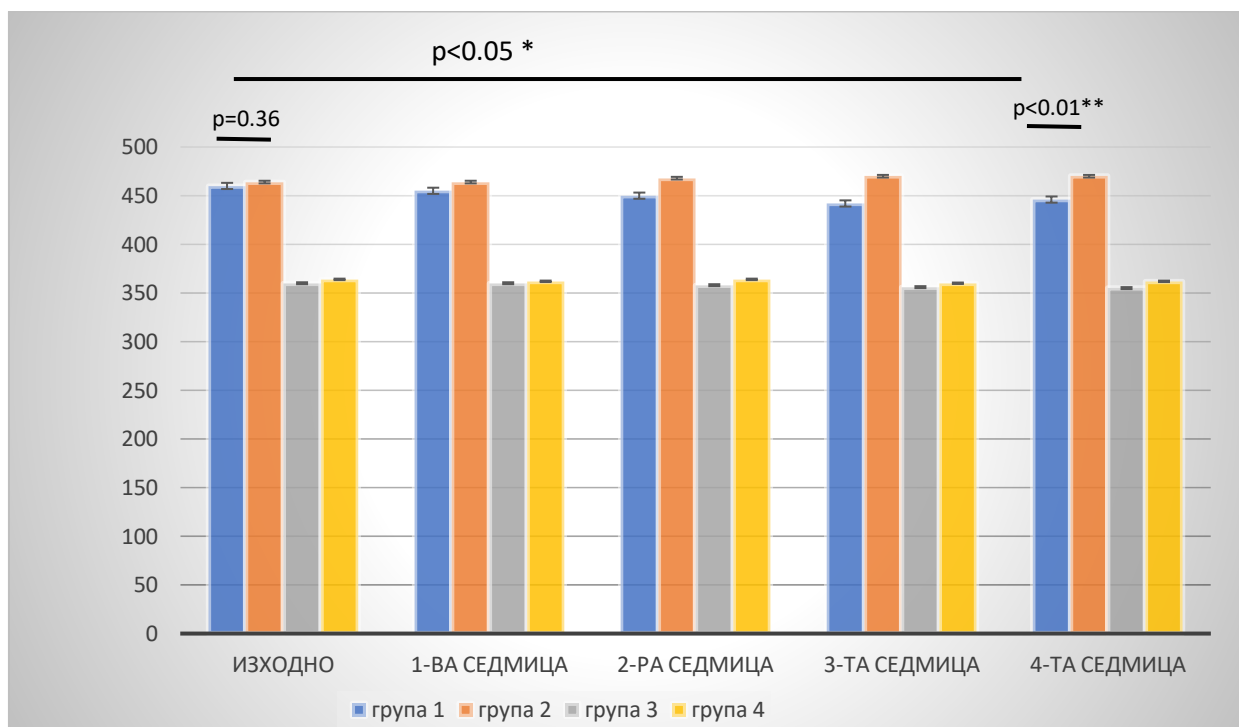
В хода на проведено проучване се проследиха стойности на телесното тегло на опитните животни, на седмична база, в отделните групи. От проведените измервания се установи намаляване на телесното тегло в групите с ежедневно интраперитонеално приложение на Ro 60-0175 (1 мг/кг). В група 1 – групата със затлъстяване и захарен диабет с ежедневна интраперитонеална апликация на Ro 60-0175 (1 мг/кг) се наблюдава сигнификантна редукция на телесно тегло в края на четири седмичното проследяване от  $460 \pm 25.9$  грама – изходно до  $446 \pm 14.2$  грама,  $p < 0.05^*$ . Има статистически сигнификантна разлика и в стойности на телесно тегло, на четвърта седмица от проучването, между група 1 и група 2,  $p < 0.01^{**}$ . Освен това се наблюдава редукция на телесно тегло и в контролната група с интраперитонеална апликация на Ro 60-0175 (1 мг/кг) - група 3, от  $360 \pm 20.4$  грама изходно до  $355 \pm 7.33$  грама на четвърта седмица, което не е статистически значима промяна (фигура 25) .

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>изходно</b>	$460 \pm 25.9$	$464 \pm 26.1$	$360 \pm 20.4$	$364 \pm 23.4$
<b>1-ва седмица</b>	$455 \pm 22.4$	$464 \pm 23.5$	$360 \pm 14.3$	$362 \pm 25.9$
<b>2-ра седмица</b>	$450 \pm 20.6$	$468 \pm 22.2$	$356 \pm 14.1$	$364 \pm 22.0$
<b>3-та седмица</b>	$442 \pm 17.9$	$470 \pm 15.4$	$356 \pm 12.8$	$360 \pm 22.6$
<b>4-та седмица</b>	$446 \pm 14.2$	$470 \pm 16.1$	$355 \pm 7.33$	$362 \pm 6.05$

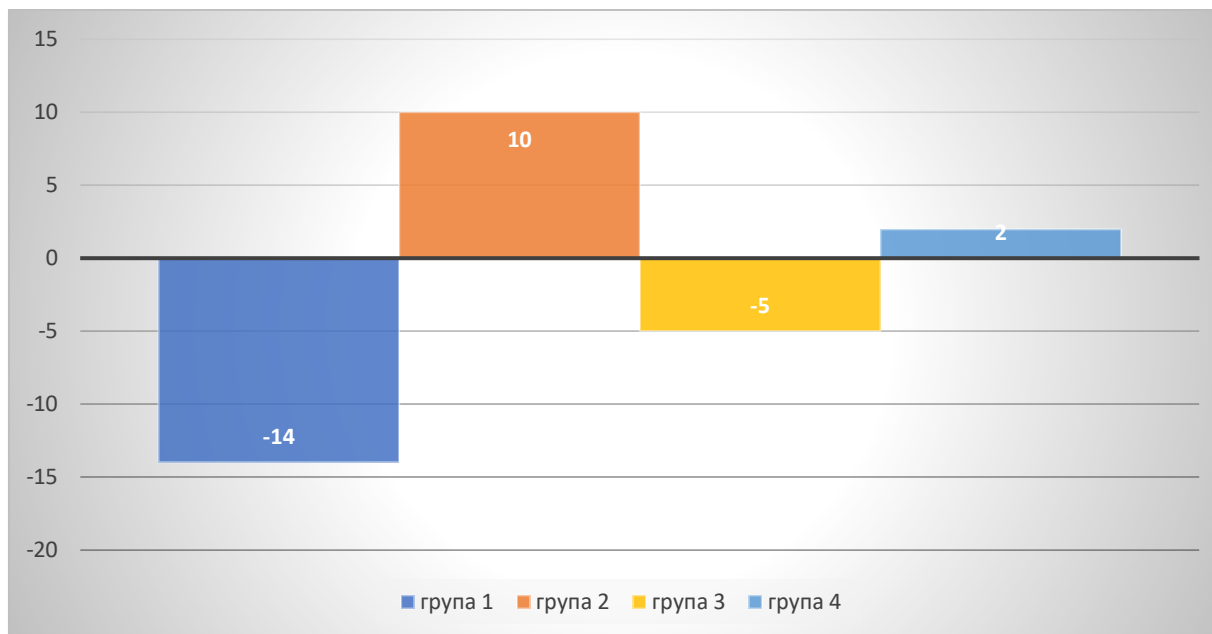
Таблица 26. Средна стойност на т.т. в грамове  $\pm$  стандартно отклонение (SD).

	група 1	група 2	група 3	група 4
изходно	460 ± 8.19	464 ± 8.22	360 ± 6.45	364 ± 7.4
1-ва седмица	455 ± 7.11	464 ± 7.44	360 ± 4.53	362 ± 8.2
2-ра седмица	450 ± 6.54	468 ± 7.03	356 ± 4.45	364 ± 6.98
3-та седмица	442 ± 5.68	470 ± 4.88	356 ± 4.06	360 ± 7.14
4-та седмица	446 ± 4.52	470 ± 5.10	355 ± 4.21	362 ± 6.50

Таблица 27. Средна стойност на т.т. в грамова ± стандартна грешка на измерването (SEM).



Фигура 25. Средно телесно тегло, измерено в грамове, в различните групи, представено по седмици. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг). Статистическа значимост: p<0.05\*, p<0.01\*\*.



Фигура 26. Обща загуба на телесно тегло, измерено в грамове за отделните групи на четвърта седмици от проучването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 4 (n=10) - контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг).

### ***3.2. Ефект върху кръвната захар при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro 60-0175 при мъжки плъхове порода Висмар (Wistar)***

От проведените изследвания се установи понижаване на стойностите на кръвната захар на гладно в група 1 - плъхове със затлъстяване и захарен диабет с ежедневна интраперитонеална апликация на Ro 60-0175 (1 мг/кг). Средните изходни нива на кръвна захар в група 1 е  $11.4 \pm 2.74$  ммол/л, като понижаването на кръвната захар в края на четири седмично проследяване е до  $9.64 \pm 1.22$  ммол/л, което е статистически значимо понижение,  $p < 0.05^*$ . Разликата в средните стойности на кръвната захар, в края на наблюдението, между група 1 и група 2, групите, които в началото на проучването са със затлъстяване и нарушение на въглехидратната обмяна, е статистически значима,  $p < 0.05^*$ . Не се наблюдава статистическо значимо понижаване на стойности на кръвна

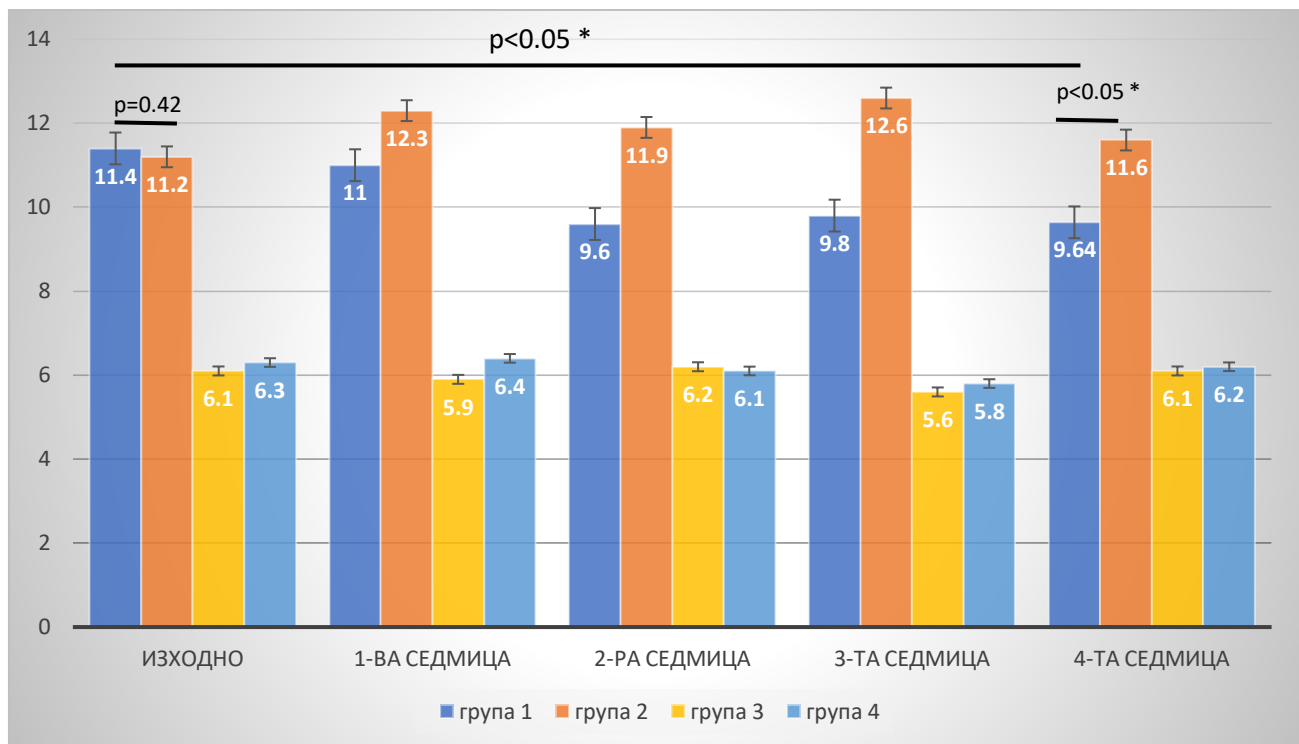
захар в останалите три групи. По време на наблюдаваният период не се регистрираха хипогликемични стойности на кръвната захар в нито една от изследваните групи (фигури 27 и 28).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>изходно</b>	11.4 ± 2.74	11.2 ± 1.96	6.1 ± 0.45	6.3 ± 0.33
<b>1-ва седмица</b>	11.0 ± 2.7	12.3 ± 2.00	5.98 ± 0.42	6.4 ± 0.30
<b>2-ра седмица</b>	9.6 ± 1.49	11.9 ± 1.85	6.2 ± 0.70	6.1 ± 0.58
<b>3-та седмица</b>	9.8 ± 1.86	12.6 ± 1.18	6.8 ± 0.76	5.7 ± 0.49
<b>4-та седмица</b>	9.64 ± 1.22	11.6 ± 1.44	6.1 ± 0.54	6.1 ± 0.62

Таблица 28. Средна стойност на КЗ в ммол/л ± стандартно отклонение (SD).

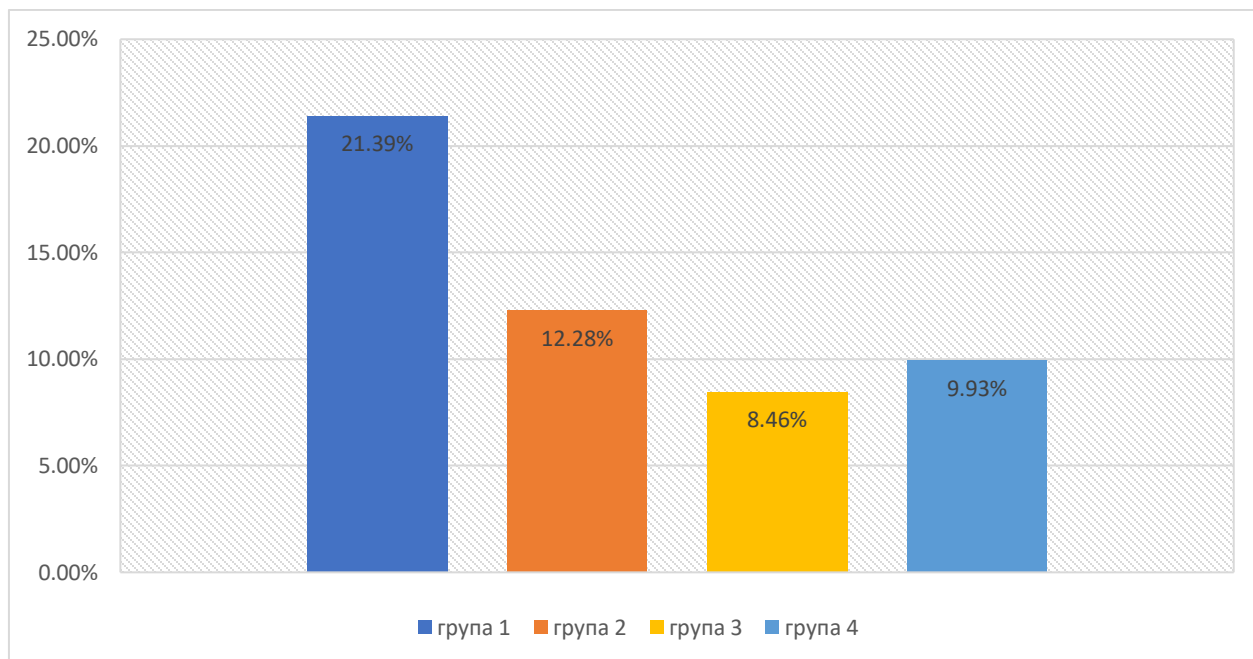
	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>изходно</b>	11.4 ± 0.86	11.2 ± 0.62	6.1 ± 0.14	6.3 ± 0.10
<b>1-ва седмица</b>	11.0 ± 0.81	12.3 ± 0.63	5.98 ± 0.13	6.4 ± 0.09
<b>2-ра седмица</b>	9.6 ± 0.47	11.9 ± 0.58	6.2 ± 0.22	6.1 ± 0.18
<b>3-та седмица</b>	9.8 ± 0.58	12.6 ± 0.37	6.8 ± 0.24	5.7 ± 0.49
<b>4-та седмица</b>	9.64 ± 0.38	11.6 ± 0.45	6.1 ± 0.17	6.1 ± 0.19

Таблица 29. Средна стойност на КЗ в ммол/л ± стандартна грешка на измерването (SEM).

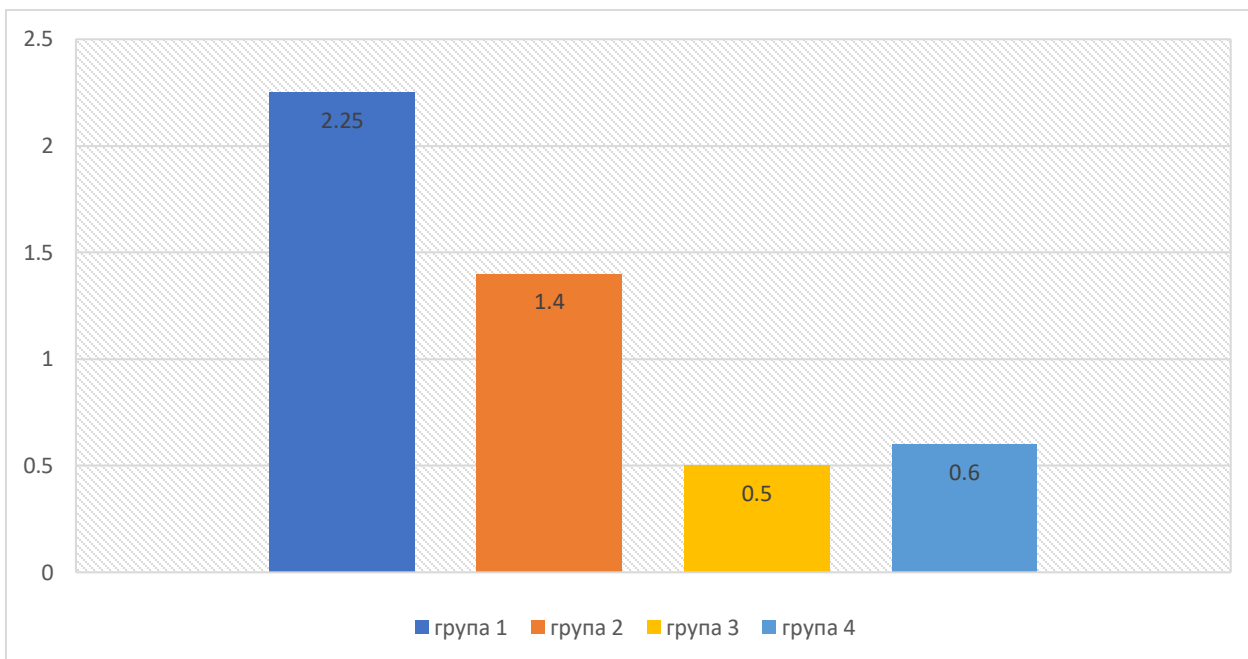


Фигура 27. Средната стойности на кръвна захар в различните групи, измерена в ммол/л, дадено по седмици. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг). Статистическа значимост:  $p < 0.05^*$ .

Стандартното отклонение (SD) на кръвната захар в група 1, за четири седмици на проучването е 2.25, а коефициентът на вариация е 21.39%, които са по-високи от очакваните. В останалите групи стойностите на двата показателя са в очаквания диапазон. Като може да се заключи, че ежедневното интраперитонеално приложение на Ro 60-0175 (1 мг/кг), води до съществена редукция на кръвната захар при опитните животни с развит ЗД и нарушена гликемия на гладно, но не се отразява в стойности на кръвната захар в контролната група с ежедневно интраперитонеално приложение на Ro 60-0175 (1 мг/кг) - група 3 (фигура 28 и 29).



Фигура 28. Коефициент на вариация (CV) на кръвната захар, за отделните групи, за четирите седмици на проучването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг).



Фигура 29. Стандартно отклонение (SD) на кръвната захар в ммол/л, за отделните групи, за четирите седмици на проучването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг).

### ***3.3. Ефект върху стойностите на имунореактивен инсулин и инсулинова резистентност, изчислена чрез НОМА - индекс при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro60-0175 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)***

Стойностите на имунореактивен инсулин на отделните групи бяха проследени на седмична база. От проведените измервания се установи сигнификантно намаляване на имуреактивения инсулин в група 1, групата със затлъстяване и захарен диабет с ежедневна интраперитонеална апликация на Ro 60-0175 (1 мг/кг) - от  $18.0 \pm 2.76$  мIU/мл – изходно до  $12.4 \pm 2.02$  мIU/мл на четвърта седмица,  $p < 0.01^{**}$ . Освен това се установи и статистически сигнификантна разлика при сравнение на

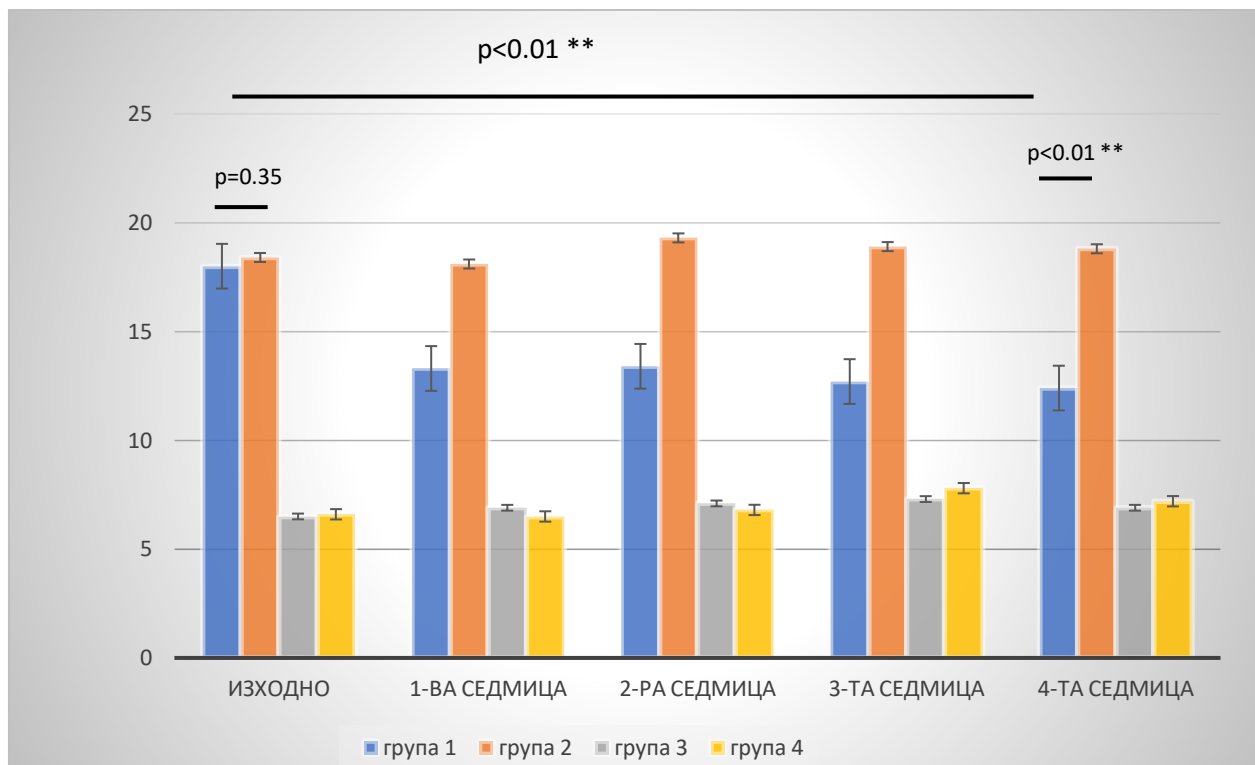
стойностите на имунореактивения инсулин в група 1 и 2,  $p < 0.01^{**}$  на четвърта седмица. Не се наблюдава сигнификантна динамика в нивото на имунореактивен инсулин в останалите групи (фигура 30). Същата констелация се наблюдава и при проследяването на НОМА - индекс, като се отчете статистически значима разлика в стойности на НОМА - индекс между групи 1 и 2, в края на четири седмичния период на наблюдение, което говори за намаляване в стойности на инсулиновата резистентност в група, използваща централно-мозъчния серотонинов агонист. Това се дължи, както на намалелите нива на кръвна захар описани по-горе, така и на намалените стойности на имунореактивен инсулин, в хода на проследяването. Така стойностите на НОМА - индекс в група 1 достигат нива до  $5.31 \pm 0.23$  на четвърта седмица (фигура 31).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	18.0 ± 2.76	18.4 ± 2.02	6.5 ± 0.75	6.6 ± 0.93
<b>1-ва седмица</b>	13.3 ± 1.47	18.1 ± 2.47	6.9 ± 0.76	6.5 ± 1.13
<b>2-ра седмица</b>	13.4 ± 1.86	19.3 ± 2.17	7.1 ± 0.91	6.8 ± 0.83
<b>3-та седмица</b>	12.7 ± 2.12	18.9 ± 1.68	7.3 ± 1.02	7.8 ± 0.81
<b>4-та седмица</b>	12.4 ± 2.02	18.8 ± 1.47	6.9 ± 0.74	7.2 ± 0.87

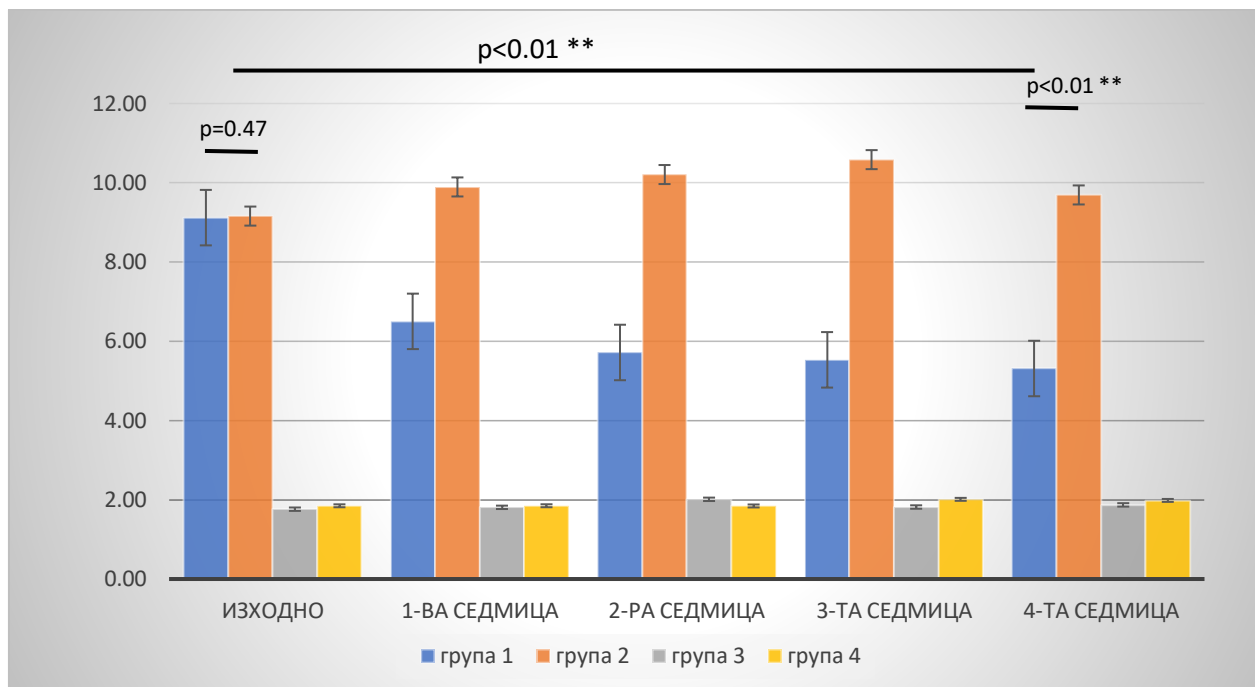
Таблица 30. Средна стойност на ИРИ измерен в mIU/ml ± стандартно отклонение (SD).

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>Изходно</b>	18.0 ± 0.87	18.4 ± 0.63	6.5 ± 0.23	6.6 ± 0.29
<b>1-ва седмица</b>	13.3 ± 0.46	18.1 ± 0.78	6.9 ± 0.24	6.5 ± 0.35
<b>2-ра седмица</b>	13.4 ± 0.59	19.3 ± 0.68	7.1 ± 0.28	6.8 ± 0.26
<b>3-та седмица</b>	12.7 ± 0.67	18.9 ± 0.53	7.3 ± 0.32	7.8 ± 0.25
<b>4-та седмица</b>	12.4 ± 0.64	18.8 ± 0.46	6.9 ± 0.23	7.2 ± 0.27

Таблица 31. Средна стойност на ИРИ в mIU/ml ± стандартна грешка на измерването (SEM).



Фигура 30. Средна стойност на имунореактивен инсулин, измерена в mIU/мл, хода на проследяването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг). Статистическа значимост:  $p < 0.01^{**}$ .



Фигура 31. Средни нива на НОМА - индекс, по седмици и групи, в хода на проследяването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 3 (n=10) – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 4 (n=10) – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг). Статистическа значимост:  $p < 0.01^{**}$ .

	група 1	група 2	група 3	група 4
<b>изходно</b>	9.2 ± 1.87	9.16 ± 1.56	1.76 ± 0.36	1.85 ± 0.31
<b>1-ва седмица</b>	6.6 ± 1.01	9.89 ± 1.53	1.76 ± 0.34	1.85 ± 0.21
<b>2-ра седмица</b>	5.72 ± 1.23	10.21 ± 1.48	2.01 ± 0.17	1.84 ± 0.23
<b>3-та седмица</b>	5.53 ± 0.88	10.58 ± 1.51	1.82 ± 0.38	2.01 ± 0.26
<b>4-та седмица</b>	5.31 ± 0.74	9.69 ± 0.74	1.87 ± 0.33	1.98 ± 0.26

Таблица 32. Средна стойност на НОМА - индекс ± стандартно отклонение (SD).

	група 1	група 2	група 3	група 4
изходно	9.2 ± 0.59	9.16 ± 0.49	1.76 ± 0.11	1.85 ± 0.10
1-ва седмица	6.6 ± 0.32	9.89 ± 0.48	1.76 ± 0.10	1.85 ± 0.06
2-ра седмица	5.72 ± 0.38	10.21 ± 0.46	2.01 ± 0.05	1.84 ± 0.07
3-та седмица	5.53 ± 0.27	10.58 ± 0.48	1.82 ± 0.12	2.01 ± 0.08
4-та седмица	5.31 ± 0.23	9.69 ± 0.23	1.87 ± 0.10	1.98 ± 0.08

Таблица 33. Средна стойност на НОМА - индекс ± стандартна грешка на измерването (SEM).

## ДИСКУСИЯ

Затлъстяването и метаболитните нарушения, свързани с него, се превръщат в пандемия през последните десетилетия. Множество световни медицински организации, приемат затлъстяването като хронична рецидивираща болест [212]. Именно по тази причина затлъстяването и метаболитните нарушения, които то води след себе си, са обект на научен интерес в световен мащаб. Намирането на правилните подходи в цялостния процес на диагностициране и лечение на метаболитните заболявания и затлъстяването стават все по важни за съвременния живот. Един от основните рискови фактори за развитие на ЗД е именно затлъстяването [213]. Повишеният сърдечно-съдов риск, който обуславя затлъстяването и заболяванията, свързани с него, като нарушения в глюкозния метаболизъм, нарушения в липидната обмяна и повишеното артериално налягане, се явяват непосредствена причина за инвалидизация и смъртност, не само сред възрастното население, но и сред подрастващите в развитите страни [213,214]. Като се има предвид нарастващия процент на хора със затлъстяване през последните години и в развиващите се страни, става ясно колко важно е да се намери правилната стратегия за лечение му [215].

През последните години стана ясно, че не само невробиологичните процеси в ЦНС, свързани с приема на храна, играят роля в развитието на затлъстяването. Множество хормони, отделящи се в периферията и по-точно в гастроинтестиналния тракт са важни за развитие на затлъстяване и отключване на различни патологични

метаболитни процеси. През последните десетилетия, се доказва важността на инкретините, лептина, адипонектина, грелина, като и на редица други пептидни молекули от периферията, които участват в сложената невробиологична регулация на приема на храна. Именно чрез детайлното проучване на тези „нови“ хормони се разработиха и част от новите класове лекарства за лечение на затлъстяване. GLP1 - рецепторните агонисти са именно такъв клас лекарства, които показаха своя ефект върху цялостния метаболитен статус, от положителните си ефекти върху редукция на телесно тегло, през намаляването на дислипидемия, стабилизирането на атеросклеротичните плаки до намаляване на големите сърдечно съдови инциденти в MACE [216]. Наред с това централно действащите медикаменти за редукция на телесно тегло също влизат в съображение, както в Европейски така и в Американски наръчници за лечение на затлъстяване [217]. Разбира се при всички тези медикаменти е важно да се определи съотношението полза и риска за пациента и да се избере най-подходящата терапия.

Изследвания за действието на лептина, адипонектина и грелина показаха важността на периферните хормони във финната регулация на важни метаболитни процеси и невробиологичните взаимодействия. Именно по тази причина най-вероятно новите класове лекарства за лечение на метаболитни заболявания, в това число и на затлъстяване, биха били търсени именно там.

Чрез изследване на действието на периферния серотонин, чрез периферен серотонинов антагонист (LP533401) в затлъстели и диабетни животни (мъжки плъхове порода Wistar) за първи път, опитахме да позиционираме този нов „хормон“ в сложната регулация на метаболитните процеси в организма. До този момент изследванията свързани с периферните серотонинови антагонисти, бяха насочени върху действието им върху костната плътност и нива на отделните холестеролови фракции. В част от проучванията, използващи такива агенти, беше установявано и редукция на телесно тегло и понижаване на стойностите на кръвна захар, без да беше правен задълбочен анализ върху тези резултати. В нашите опити за първи път направихме систематизиран анализ на нивата на кръвна захар, имунореактивен инсулин, нива на инсулинова резистентност изследвана чрез изчисляване на НОМА - индекс и нива на лептин и грелин

при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar). На свой ред беше проследено и телесното тегло в динамика на опитните животни.

От резултатите се показва, че периферният серотонин, който има множество ендо-, пара- и автокринни функции в организма, оказва въздействие върху телесното тегло, стойностите на кръвната захар и имунореактивения инсулин. В създадения от нас експериментален модел се демонстрира, че приложението на периферен серотонинов антагонист има ефект върху редукцията на телесно тегло при мъжки плъхове порода Wistar. След четири седмично приложение на LP533401 се забелязва сигнификантна редукция в стойности на телесно тегло в групите третирани с периферния серотонинов антагонист.

В групата със затлъстяване и захарен диабет, използваща LP533401, се наблюдава и редукция в нива на кръвна захар. Тук същественият въпрос е дали самата редукция на телесно тегло води до понижаване на кръвната захар или множеството други биохимични процеси, сред които секреция на инсулин, влиянието върху бета-клетъчна маса, масата на мастната тъкан и други (описани по-горе) опосредствани от действието на периферния серотонин, са също отговорни за това понижаване. Нужни са по задълбочени изследвания, при които затлъстяването не е водещ фактор за развитие на захарен диабет тип 2, за да се ограничи ефекта на периферния серотонин върху кръвна захар. Именно такива проучвания могат да докажат или отхвърлят хипотезата, дали агенти контролиращи секрецията на периферния серотонин, могат да бъдат нови класове антидиабетни лекарства. Липсата на хипогликемични стойности в контролната група използваща LP533401 показва, че най-вероятно секрецията на инсулин от панкреаса, която е под авто- и паракринен контрол на серотонина, се обуславя от нивата на кръвна захар.

Изследвано ниво на имунореактивен инсулин и инсулиновата резистентност, изчислена чрез НОМА - индекс, показват статистическо понижение в групата със затлъстели и диабетни плъхове Wistar, които използват LP533401. За първи път в световната литература се проследяват нивата на инсулин и НОМА - индекс при приложение на периферен серотонинов инхибитор. Именно това сигнификантно понижаване в стойности говори за възможните терапевтични ефекти, при използването

на контролиращи периферния серотонин агенти, за лечение на метаболитни заболявания и затлъстяване.

Лептин и грелин са хормони, за които през последните години се установи, че играят съществено значение в развитие на затлъстяването и са едни от основните регулатори на апетита. В проведените експерименти се проследиха нива на тези два хормона в контекста на приложение на периферен серотонинов инхибитор, при мъжки пълхове порода Wistar, което до този момент не е докладвано в световната литература. Отчете се сигнификантна динамика на двата хормона в групата, използваща периферен серотонинов антагонист. Динамиката на нива на лептин и грелин ясно корелира и с редукция на телесно тегло. Ниво на грелина се повиши и в контролната група, която използва периферния серотонинов антагонист. Именно по тази причина е възможна връзка между секрецията на грелин и серотониновата медиация в периферията. Тези твърдения би следвало да се проучат и потвърдят с по-обширни експерименти върху здрави контроли.

Важно е да се направят още проучвания на влиянието на периферния серотонин върху метаболитни процеси в организмите. Оказва се, че той играе съществена роля в липидната, въглехидратната и дори костната обмяна. Въпреки малката извадка от експериментални животни и краткото време за провеждане на проучванията, данните от нашите експериментални изследвания, показват, че периферният серотонин е важен „хормон“, що се отнася до метаболитните процеси в организма и може би една от бъдещите терапевтични стратегии при лечение на метаболитните заболявания.

Централно-мозъчната медиация на серотонина отдавна е в полезрението на научния интерес, що се касае до терапевтични стратегии за лечение на затлъстяване и регулацията на апетита. Множество различни агенти, които влияят на централно-мозъчната регулация на апетита са проучвани в годините [218]. Лоркасеринът - 5-HT<sub>2C</sub> рецепторен агонист, например бе одобрен медикамент за лечение на затлъстяване от FDA, като поради неубедителни доказателства свързани с повишаване на риска от карциноми бе оттеглен от пазара от фирмата производител, въпреки наблюдаваните положителни ефекти върху т.т., стойности на КЗ и кардиопротективните му ефекти

[219]. Търсенето на нови молекули, имащи ефект при контрола на апетита, свързани със серотониновата медиация на ниво ЦСН, продължава.

WAY163909 (селективен агонист на 5-HT<sub>2C</sub>- рецептора) и Ro 60-0175 (селективен агонист на 5-HT<sub>2B</sub> и 5-HT<sub>2C</sub> -рецепторите) са централни селективни серотонинови агонисти, които използвахме в нашето проучване. В проведените опити се установи сигнификантна редукция на телесно тегло в мъжки плъхове порода Wistar, с индуцирано затлъстяване и захарен диабет при интраперитонеално приложение на WAY163909 и Ro 60-0175, което корелира и с наличните до този момент данни от световната литература. До този момент обаче не беше изследвано влиянието на централните селективни серотонинови агонисти върху нивата на кръвната захар и на инсулиновата резистентност или данни от такива изследвания, които са оскъдни и представени по-скоро като наблюдаван ефект без да бъдат системно разгледани.

Установи се сигнификантна редукция в нивата на кръвната захар при затлъстели и диабетни мъжки плъхове порода Wistar, на които се прилага ежедневна интраперитонеална апликация с WAY163909 и Ro 60-0175. В контролните групи, използващи WAY163909 и Ro 60-0175, не се регистрираха хипогликемични стойности, което предполага, че редукцията на кръвната захар е по глюкозо-зависим начин. Редукция в нивата на кръвната захар при използване на двете различни вещества беше различно, въпреки подобния им механизъм на действие. Все пак и в двата експериментални модела понижението на кръвната захар достигна статистически сигнификантни нива. Тук основният въпрос е дали редукция на кръвната захар е обусловена от намаление на хранителния прием на опитните животни или съществуват и други механизми, които могат да доведат до корекция в нарушенията на въглехидратната обмяна. Това е въпрос, който подлежи на допълнителни изследвания, за да може да се докаже или отхвърли антидиабетният ефект на тези агенти.

При изследване на нивата на имунореактивен инсулин и НОМА - индекс също се наблюдава сигнификантна редукция в групите, използващи централно-мозъчни селективни серотонинови агонисти и изходна инсулинова резистентност. Редукцията на стойностите на имунореактивния инсулин и съответно на НОМА - индекса, корелира с редукцията на телесно тегло. Въпросът е дали тази редукция е следствие на ограничения

на приема на храна – феномен, който се наблюдаваше в групите, използващи WAY163909 и Ro 60-0175, или това намаление в нивата на инсулина има и друга биохимична и биофизиологична основа, която следва да бъде проучена.

Разглеждането на серотониновата медиация през призмата на метаболитните нарушения е тема, която ще бъде актуална през следващите години. Натрупаните множество доказателства за биохимичните, физиологичните и патофизиологичните процеси, в които участва серотониновата медиация са основен пункт за търсенето на нови фармакологични агенти, повлияващи тези процеси. В нашите изследвания за първи път систематизирано представихме действието на периферната и централно-мозъчната серотонинова медиация, що се отнася до важноста ѝ в метаболитните процеси. Разбира се необходими са по-детайлни изследвания в действието на серотонина, както в периферията, така и в ЦНС, за да могат да се направят нови класове медикаменти за лечение на захарен диабет, дислипидемия, затлъстяване и обусловените от тях метаболитни нарушения в организма.

## ИЗВОДИ

1. Разработени са експериментални модели за изследване действието на периферния серотонин и ефектите му по отношение на метаболитните процеси, чрез използване на периферен серотонинов антагонист (LP533401) и за действието на мозъчния серотонин и ефектите му по отношение на метаболитните процеси чрез прилагане на централни серотонинови агонисти (WAY163909 и Ro 60-0175) .

2. При приложение на периферен серотонинов антагонист - LP533401 се установи понижение на телесното тегло и стойностите на кръвна захар на мъжки плъхове порода Wistar в групата със затлъстяване и захарен диабет.

3. При приложение на периферен серотонинов антагонист - LP533401 се установи понижение на нивото на имунореактивен инсулин и степента на инсулинова резистентност, измерена чрез определяне на НОМА - индекс при мъжки плъхове порода Wistar в групата със затлъстяване и захарен диабет.

4. Установиха се по-високи нива на лептин в групите със затлъстяване и захарен диабет при мъжки плъхове порода Wistar, в началото на проучването и понижение на стойности на лептин в края на проучването, в групата със затлъстяване и захарен диабет, при която се прилагаше периферния серотонинов антагонист LP533401.

5. Установиха се по-високи нива на ацетилиран грелин в групите със затлъстяване и захарен диабет, при мъжки плъхове порода Wistar, в началото на проучването и понижение на стойности на ацетилирания грелин в края на проучването, в групата със затлъстяване и захарен диабет, при която се прилагаше периферния серотонинов антагонист LP533401.

6. Регистрира се повишаване на нивото на ацетилиран грелин в контролната група мъжки плъхове порода Wistar, използваща периферния серотонинов антагонист LP533401.

7. Установи се понижение в телесното тегло на мъжки плъхове порода Wistar при приложение на централните серотонинови агонисти (WAY163909 и Ro 60-0175) в групата със затлъстяване и захарен диабет.

8. Установи се понижение в стойностите на кръвна захар на мъжки плъхове порода Wistar при приложение на централните серотонинови агонисти (WAY163909 и Ro 60-0175) в групата със затлъстяване и захарен диабет.

9. Установи се понижение на нивото на имунореактивен инсулин и степента на инсулинова резистентност, измерена чрез определяне на НОМА - индекс, на мъжки плъхове порода Wistar при приложение на централните серотонинови агонисти (WAY163909 и Ro 60-0175) в групата със затлъстяване и захарен диабет.

# ПРИНОСИ

## *Приноси с научно-теоретично значение:*

1. За първи път се изследват ефектите на периферния серотонин по отношение на телесното тегло, въглехидратния метаболизъм, кръвната захар, имунореактивния инсулин и НОМА - индекса при мъжки плъхове порода Wisatr чрез използването на периферен серотонинов антагонист - LP533401.

2. За първи път се изследва връзката на периферния серотонин с други хормони, свързани със затлъстяването, като лептин и грелин при мъжки плъхове порода Wisatr чрез използването на периферен серотонинов антагонист - LP533401.

3. Демонстрирани са ефектите на централните серотонинови агонисти - WAY163909 и Ro 60-0175 върху телесното тегло при мъжки плъхове порода Wisatr.

4. Демонстрираха се ефектите върху стойности на кръвната захар и се съпоставиха с динамиката в телесно тегло след приложение на централните серотонинови агонисти WAY163909 и Ro 60-0175 при мъжки плъхове порода Wisatr.

5. Демонстрираха се ефектите върху нивата на имунореактивен инсулин и нивото на инсулинова резистентност при приложение на централните серотонинови агонисти WAY163909 и Ro 60-0175 при мъжки плъхове порода Wisatr.

***Приноси с научно-приложно значение:***

6. Резултатите от нашите изследвания биха допринесли за разработването на нови терапевтични стратегии в лечението на затлъстяването и захарен диабет тип 2, чрез приложение на периферни серотонинови антагонисти.

7. Резултатите от нашите изследвания биха допринесли за намиране на възможно взаимодействие между периферния серотонин, лептин и грелин.

8. Резултатите от нашите изследвания биха допринесли за разработването на нови терапевтични стратегии в лечението на затлъстяването и захарен диабет тип 2, чрез приложение на централни серотонинови агонисти.

## Публикации, свързани с дисертационния труд:

1. **И. Богомилов**, В. Михнева, Н. Бояджиева, ЦЕТРАЛНОМОЗЪЧНА МЕДИАЦИЯ И ВРЪЗКАТА С МЕТАБОЛИТНИТЕ ЗАБОЛЯВАНИЯ – ЗАТЛЪСТЯВАНЕ И ДИАБЕТ ТИП 2, Военна медицина 4/2018, ISSN-1312-2746
2. **I. Bogomilov**, V. Mihneva, R. Nikolov, N. Boyadjieva The role of peripheral serotonin in obese and diabetic Wistar rats studied by using of LP533401, 55th EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes: Barcelona, Spain, 16 - 20 September 2019. Diabetologia. 2019 Sep;62(Suppl 1):1-600. doi: 10.1007/s00125-019-4946-6. PMID: 31384961. **IF- 7,518 - abstract**
3. **I. Bogomilov**, I. Daskalova, V. Mihneva, R. Nikolov, N. Boyadjieva The role of peripheral serotonin and its interaction with other hormones in male Wistar rats with obesity and obesity-induced diabetes, studied by using of LP533401; 56th EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes: 21-25 September 2020. Diabetologia. 2020 Sep;63(Suppl 1):1-485. doi: 10.1007/s00125-020-05221-5. PMID: 32840677; PMCID: PMC7445463, **IF- 10,122- abstract**
4. **И. Богомилов**, Н. Бояджиева, Р. Николов, В. Михнева, И. Даскалова, ЗАТЛЪСТЯВАНЕТО ПРЕЗ ПРИЗМАТА НА ЦЕТРАЛНОМОЗЪЧНАТА МЕДИАЦИЯ -, GP News 8/2021, ISSN 1311-4727
5. **И. Богомилов**, И. Даскалова, В. Михнева<sup>1</sup>, Р. Николов, Н. Бояджиева, ПЕРИФЕРНИЯТ СЕРОТОНИН И МЕТАБОЛИЗМЪТ – НОВИ ХОРИЗОНТИ/ **I. Bogomilov**, I. Daskalova, V. Mihneva, R. Nikolov, N. Boyadjieva ROLE OF PERIPHERAL SEROTONIN IN METABOLISM, ОБЩА МЕДИЦИНА 4/2021 ISSN 1311-1817 УДК 611
6. **И. Богомилов**, Н. Бояджиева дм дмн, Р. Николов, В. Михнева, И. Даскалов, ХРАНИТЕЛНИ НАВИЦИ И ЗАТЛЪСТЯВАНЕТО ИГРА НА МОЗЪЧНИЯ СЕРОТОНИН И ДОПАМИН, , GP News 11/2022, ISSN 1311-4727
7. **Ivaylo Bogomilov**, Rumén Nikolov, Nadka Boyadjieva, Relation between serotonin in the central nervous system, obesity and glucose metabolism, studied with central nervous system serotonin agonist - Ro60-0175 in obese and diabetic Wistar rats C. R. Acad. Bulg. Sci. 2023 (под печат). **IF= 0.329**

## Участия в конгреси, свързани с дисертационния труд

1. **Bogomilov Ivaylo**, Daskalova Ivona, Benova Kristina, Rumen Nikolov, Boyadjieva Nadka, The roles serotonin in metabolism, Национален конгрес на Българската диабетна асоциация- с международно участие, юли 2018, Пампорово, България
2. **Bogomilov Ivaylo**, Mihneva Vesela, Nikolov Rumen, Boyadjieva Nadka, Obesity as an epidemic, International Biomedical Congress of Sofia, 15.11-17.11.2018, Sofia, Bulgaria
3. **Bogomilov Ivaylo**, Mihneva Vesela, Nikolov Rumen, Boyadjieva Nadka, Epigenetic mechanisms and the roles serotonin in obesity and diabety, International Diabetesity and Metabolic Surgery Summit November 28-30, 2019 Tel Aviv, Israel, „10 BEST PAPER COMPETITION“
4. **Ivaylo Atanasov Bogomilov**, Vesela Mihneva, Desimira Mironova, Rumen Nikolov, Nadka Boyadjieva, The role of peripheral serotonin in obesity, , 26th European Congress on Obesity 2019, Apr 28 - May 01, 2019 at SEC Centre, Glasgow, Scotland, United Kingdom
5. **Ivaylo Bogomilov**, MD, 1,2 , Major Mihneva Vesela, MD 1 , Assoc. Prof. Nikolov Rumen 2 ,Prof. Boyadjieva Nadka THE ROLE OF PERIPHERL SEROTONIN IN METABOLISM Bogomilov 24th Congress of Balkan Military Medical Committee (BMMC) 30th April and 3rd May 2019 in Tirana, Albania
6. **I. Bogomilov**, V. Mihneva, R. Nikolov, N. Boyadjieva, The role of peripheral serotonin in obese and diabetic Wistar rats studied by using of LP533401, 55th EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes : Barcelona, Spain, 16 - 20 September 2019. Diabetologia. 2019 Sep;62(Suppl 1):1-600. doi: 10.1007/s00125-019-4946-6. PMID: 31384961. – best presentation award
7. **Ivaylo Atanasov Bogomilov**, Vesela Mihneva, Ivona Daskalova, Nadka Boyadjieva, Rumen Nikolov, The role of peripheral serotonin in obese and diabetic Wistar rats studied by using of LP533401, European and International congress of Obesity (ECOICO) Online, 1-04.09.2020
8. **I. Bogomilov**, I. Daskalova, V. Mihneva, R. Nikolov, N. Boyadjieva The role of peripheral serotonin and its interaction with other hormones in male Wistar rats with obesity and obesity-induced diabetes, studied by using of LP533401; 56th EASD

Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes: 21-25 September 2020. Diabetologia. 2020 Sep;63(Suppl 1):1-485. doi: 10.1007/s00125-020-05221-5. PMID: 32840677; PMCID: PMC7445463.

9. **Ivaylo Bogomilov**, Vesela Mihneva, Nadka Boyadjieva, Rumen Nikolov, Ivona Daskalova, The role of peripheral serotonin in obese wistar rats studied by using of LP533401, 22nd European Congress of Endocrinology, 5-9 September 2020, European Society of Endocrinology
10. **Ивайло Богомилов**, МУ–София, Научни ръководители: проф. Н. Бояджиева и доц. Р. Николов Научна сесия Българска сърдечно и съдова асоциация в подкрепа на науката, докторантска сесия- “Ролята на периферния серотонин върху затлъстяването, ССС и ЗД тип 2, изследван чрез LP533401 при мъжки плъхове Wistars” октомври 2020 г., гр. София
11. **Ivaylo Bogomilov**, Ivona Daskalova, Vesela Mihneva, Rumen Nikolov & Nadka Boyadjieva, Peripheral serotonin and its interaction with other hormones, in male Wistar rats with obesity and obesity-induced diabetes, studied by using of LP533401, 23rd European Congress of Endocrinology, 22-26 May 2021, European Society of Endocrinology
12. **Ivaylo Atanasov Bogomilov**, Nadka Boyadjieva, Rumen Nikolov, Vesela Mihneva , Ivona Daskalova The action of WAY163909, central selective serotonin receptor agonist, in obese and diabetic Wistar rats, , (4-7 May 2022), Maastricht, Nederland the joint congress on obesity of the European Association of the Study of Obesity and the International Federation for the Surgery of Obesity and metabolic disorders-European Chapter
13. **Ivaylo Bogomilov**, Vesela Mihneva, Ivona Daskalova, Rumen Nikolov, Nadka Boyadjieva The action of WAY163909, central selective serotonin receptor, in obese and diabetic Wistar rats, , 24th European Congress of Endocrinology, 21-24 May 2022, Milan, Italy, European Society of Endocrinology
14. **Ивайло Богомилов**, Весела Михнева, Ивона Даскалова, Румен Николов, Надка Бояджиева, Захарния диабет и затлъстяването през призмата на периферния серотонин, , XIV-ти Международен Конгрес на Българска Диабетна Асоциация, „Отново заедно срещу диабета“, 26.08 - 28.08.22, конгресен център „Пампорово“
15. **Ivaylo Atanasov Bogomilov**, Nadka Boyadjieva, Rumen Nikolov, Vesela Mihneva, Ivona Daskalova, Action of Ro 60-0175, 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist, in obese and diabetic Wistar rats, 30th European Congress on Obesity (ECO 2023), 17-20 May 2023 in Dublin, Ireland – accepted abstract

## ЛИТЕРАТУРА

1. Keszthelyi, D., Troost, F.J. and Masclee, A.A. (2009) Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterol. Motil.* 21, 1239–1249.
2. Kang, K., Park, S., Kim, Y.S., Lee, S. and Back, K. (2009) Biosynthesis and biotechnological production of serotonin derivatives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 27–34.
3. Srinivasan, S., Sadegh, L., Elle, I.C., Christensen, A.G., Faergeman, N.J. and Ashrafi, K. (2008) Serotonin regulates *C. elegans* fat and feeding through independent molecular mechanisms. *Cell Metab.* 7, 533–544.
4. Curran, K.P. and Chalasani, S.H. (2012) Serotonin circuits and anxiety: what can invertebrates teach us? *Invert. Neurosci.* 12, 81–92.
5. Berger, M., Gray, J.A. and Roth, B.L. (2009) The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* 60, 355–366.
6. Lesch, K.P., Araragi, N., Waider, J., van den Hove, D. and Gutknecht, L. (2012) Targeting brain serotonin synthesis: insights into neurodevelopmental disorders with long-term outcomes related to negative emotionality, aggression and antisocial behaviour. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Bio. Sci.* 367, 2426–2443.
7. Marston, O.J., Garfield, A.S. and Heisler, L.K. (2011) Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance. *Eur. J. Pharmacol.* 660, 70–79.
8. Oury, F. and Karsenty, G. (2011) Towards a serotonin-dependent leptin roadmap in the brain. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 382–387.
9. Kim, H. et al. (2010) Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat. Med.* 16, 804–808.
10. Paulmann, N. et al. (2009) Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. *PLoS Biol.* 7, e1000229.
11. Stunes, A.K., Reseland, J.E., Hauso, O., Kidd, M., Tommeras, K., Waldum, H.L., Syversen, U. and Gustafsson, B.I. (2011) Adipocytes express a functional system for serotonin synthesis, reuptake and receptor activation. *Diabetes Obes. Metab.* 13, 551–558.

12. Chabbi-Achengli, Y., Coudert, A.E., Callebert, J., Geoffroy, V., Cote, F., Collet, C. and de Vernejoul, M.C. (2012) Decreased osteoclastogenesis in serotonin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 2567–2572.
13. Noda, M., Higashida, H., Aoki, S. and Wada, K. (2004) Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. *Mol. Neurobiol.* 29, 31–39.
14. Waku, T., Shiraki, T., Oyama, T., Maebara, K., Nakamori, R. and Morikawa, K. (2010) The nuclear receptor PPAR $\gamma$  individually responds to serotonin and fatty acid-metabolites. *EMBO J.* 29, 3395–3407.
15. Thorens, B. (2011) Brain glucose sensing and neural regulation of insulin and glucagon secretion. *Diabetes Obes. Metab.* 13 (Suppl. 1), 82–88.
16. Rorsman, P. and Braun, M. (2013) Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 155–179.
17. Ohta, Y. et al. (2011) Convergence of the insulin and serotonin programs in the pancreatic beta-cell. *Diabetes* 60, 3208–3216.
18. Gylfe, E. (1978) Association between 5-hydroxytryptamine release and insulin secretion. *J. Endocrinol.* 78, 239–248.
19. Ohara-Imaizumi, M. et al. (2013) Serotonin regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta cells during pregnancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 19420–19425.
20. Sumara, G., Sumara, O., Kim, J.K. and Karsenty, G. (2012) Gut-derived serotonin is a multifunctional determinant to fasting adaptation. *Cell Metab.* 16, 588–600.
21. Kim, K. et al. (2014) Functional role of serotonin in insulin secretion in a diet-induced insulin-resistant state. *Endocrinology*, en20141687.
22. Zhang, Q., Zhu, Y., Zhou, W., Gao, L., Yuan, L. and Han, X. (2013) Serotonin receptor 2C and insulin secretion. *PLoS One* 8, e54250.
23. Lin, H.V. and Accili, D. (2011) Hormonal regulation of hepatic glucose production in health and disease. *Cell Metab.* 14, 9–19.
24. Lesurtel, M. et al. (2006) Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 312, 104–107.

25. Soll, C., Jang, J.H., Riener, M.O., Moritz, W., Wild, P.J., Graf, R. and Clavien, P.A. (2010) Serotonin promotes tumor growth in human hepatocellular cancer. *Hepatology* 51, 1244–1254.
26. Zabala, M.T., Lorenzo, P., Alvarez, L., Berlanga, J.J. and Garcia-Ruiz, J.P. (1992) Serotonin increases the cAMP concentration and the phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA in rat kidney, small intestine, and liver. *J. Cell. Physiol.* 150, 451–455.
27. Coelho, W.S., Da Silva, D., Marinho-Carvalho, M.M. and Sola-Penna, M. (2012) Serotonin modulates hepatic 6-phosphofructo-1-kinase in an insulin synergistic manner. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 150–157.
28. Tudhope, S.J. et al. (2012) A novel mechanism for regulating hepatic glycogen synthesis involving serotonin and cyclin-dependent kinase-5. *Diabetes* 61, 49–60.
29. Moore, M.C., Geho, W.B., Lutz, M., Farmer, B., Neal, D.W. and Cherrington, A.D. (2004) Portal serotonin infusion and glucose disposal in conscious dogs. *Diabetes* 53, 14–20.
30. Watanabe, H. et al. (2010) Peripheral serotonin enhances lipid metabolism by accelerating bile acid turnover. *Endocrinology* 151, 4776–4786.
31. Rosen, E.D. and Spiegelman, B.M. (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847–853.
32. Rosen, E.D. and Spiegelman, B.M. (2014) What we talk about when we talk about fat. *Cell* 156, 20–44.
33. Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T.O., Kohlwein, S.D., Haemmerle, G., Lass, A. and Madeo, F. (2012) FAT SIGNALS—lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab.* 15, 279–291.
34. Kershaw, E.E. and Flier, J.S. (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2548–2556.
35. Samuel, V.T. and Shulman, G.I. (2012) Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148, 852–871.
36. Carlson, L.A., Ekelund, L.G. and Oro, L. (1967) Metabolic and cardio-vascular effects of serotonin. *Life Sci.* 6, 261–271.

37. Sohle, J., Machuy, N., Smailbegovic, E., Holtzmann, U., Gronniger, E., Wenck, H., Stab, F. and Winnefeld, M. (2012) Identification of new genes involved in human adipogenesis and fat storage. *PLoS One* 7, e31193.
38. Li, Q., Hosaka, T., Harada, N., Nakaya, Y. and Funaki, M. (2013) Activation of Akt through 5-HT<sub>2A</sub> receptor ameliorates serotonin-induced degradation of insulin receptor substrate-1 in adipocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 365, 25–35.
39. Kinoshita, M. et al. (2010) Regulation of adipocyte differentiation by activation of serotonin (5-HT) receptors 5-HT<sub>2AR</sub> and 5-HT<sub>2CR</sub> and involvement of microRNA-448-mediated repression of KLF5. *Mol. Endocrinol.* 24, 1978–1987.
40. Jones, J.R. et al. (2005) Deletion of PPAR $\gamma$  in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 6207–6212.
41. Uchida-Kitajima, S., Yamauchi, T., Takashina, Y., Okada-Iwabu, M., Iwabu, M., Ueki, K. and Kadowaki, T. (2008) 5-Hydroxytryptamine 2A receptor signaling cascade modulates adiponectin and plasminogen activator inhibitor 1 expression in adipose tissue. *FEBS Lett.* 582, 3037–3044.
42. Oh, C.M. et al. (2015) Regulation of systemic energy homeostasis by serotonin in adipose tissues. *Nat. Commun.* 6, 6794.
43. Crane, J.D. et al. (2014) Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat. Med.*
44. Gregor, M.F. and Hotamisligil, G.S. (2011) Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 415–445.
45. Duerschmied, D. et al. (2013) Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood* 121, 1008–1015.
46. Ghia, J.E. et al. (2009) Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis. *Gastroenterology* 137, 1649–1660.
47. de las Casas-Engel, M. et al. (2013) Serotonin skews human macrophage polarization through HTR<sub>2B</sub> and HTR<sub>7</sub>. *J. Immunol.* 190, 2301–2310.
48. Hajdуч, E., Dombrowski, L., Darakhshan, F., Rencurel, F., Marette, A. And Hundal, H.S. (1999) Biochemical localisation of the 5-HT<sub>2A</sub> (serotonin) receptor in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 369–372.

49. Coelho, W.S., Costa, K.C. and Sola-Penna, M. (2007) Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization. *Mol. Genet. Metab.* 92, 364–370.
50. Coelho, W.S. and Sola-Penna, M. (2013) Serotonin regulates 6-phosphofructo-1-kinase activity in a PLC-PKC-CaMK II- and Janus kinase-dependent signaling pathway. *Mol. Cell. Biochem.* 372, 211–220.
51. Mawe, G.M. and Hoffman, J.M. (2013) Serotonin signalling in the gut –functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat. Rev. Gastroenterol.Hepatol.* 10, 473–486.
52. Li, Z. et al. (2011) Essential roles of enteric neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 31, 8998–9009.
53. Kim, H.J. et al. (2011) Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. *J. Proteome Res.* 10, 722–731.
54. Liu, Q. et al. (2008) Discovery and characterization of novel tryptophan hydroxylase inhibitors that selectively inhibit serotonin synthesis in the gastrointestinal tract. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325, 47–55.
55. Karsenty, G. and Sumara, G. (2012). Methods of Preventing and Treating Hyperlipidemia or Atherosclerosis, Patent Application Number PCT/US2011/058396.
56. Inose, H., Zhou, B., Yadav, V.K., Guo, X.E., Karsenty, G. and Ducy, P. (2011) Efficacy of serotonin inhibition in mouse models of bone loss. *J. Bone Miner. Res.* 26, 2002–2011.
57. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 countryyears and 9.1 million participants. *Lancet* 2011 February 12;377 (9765): 557-67.
58. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA* 2010 January 20; 303(3): 235-41.
59. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet* 2005 September 24; 366(9491): 1059-62.
60. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002 April 18; 346(16):1221-31.
61. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003 April 24; 348(17): 1625-38.

62. Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J et al. Body mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 2009 March 28; 373 (9669): 1083-96.
63. Levi, J, Segal, L. M., St Laurent, R, Lang, A, and Rayburn, J. F as in Fat: How obesity threatens america's future. 2012.
64. Polder J, Takken J, Meerding W, Kommer GJ, Stokx L. Kosten van Ziekten in Nederland. 2002.
65. Obesity Society Council. Obesity as a disease: the Obesity Society Council resolution. *Obesity* (Silver Spring) 2008 June; 16(6): 1151.
66. Vos MB, Kimmons JE, Gillespie C, Welsh J, Blanck HM. Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Medscape J Med* 2008; 10(7): 160.
67. Oddy WH, Herbison CE, Jacoby P, Ambrosini GL, O'Sullivan TA, Ayonrinde OT et al. The Western dietary pattern is prospectively associated with nonalcoholic fatty liver disease in adolescence. *Am J Gastroenterol* 2013 May; 108(5): 778-85.
68. Heidemann C, Scheidt-Nave C, Richter A, Mensink GB. Dietary patterns are associated with cardiometabolic risk factors in a representative study population of German adults. *Br J Nutr* 2011 October; 106(8): 1253-62.
69. McNaughton SA, Mishra GD, Brunner EJ. Dietary patterns, insulin resistance, and incidence of type 2 diabetes in the Whitehall II Study. *Diabetes Care* 2008 July; 31(7): 1343-8.
70. Piernas C, Popkin BM. Trends in snacking among U.S. children. *Health Aff (Millwood)* 2010 March; 29(3): 398-404.
71. Bertea FH, Torgerson JS, Sjostrom L, Lindroos AK. Snacking frequency in relation to energy intake and food choices in obese men and women compared to a reference population. *Int J Obes (Lond)* 2005 June; 29(6): 711-9.
72. Mekary RA, Giovannucci E, Willett WC, van Dam RM, Hu FB. Eating patterns and type 2 diabetes risk in men: breakfast omission, eating frequency, and snacking. *Am J Clin Nutr* 2012 May; 95(5): 1182-9.

73. Sese MA, Jimenez-Pavon D, Gilbert CC, Gonzalez-Gross M, Gottrand F, de HS et al. Eating behaviour, insulin resistance and cluster of metabolic risk factors in European adolescents. The HELENA study. *Appetite* 2012 August; 59(1): 140-7.
74. Halkjaer J, Holst C, Sorensen TI. Intelligence test score and educational level in relation to BMI changes and obesity. *Obes Res* 2003 October; 11(10): 1238- 45.
75. Tzotzas T, Vlahavas G, Papadopoulou SK, Kapantais E, Kaklamanou D, Hassapidou M. Marital status and educational level associated to obesity in Greek adults: data from the National Epidemiological Survey. *BMC Public Health* 2010;10:732.
76. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006 September 21; 443(7109): 289-95.
77. Lam CK, Chari M, Lam TK. CNS regulation of glucose homeostasis. *Physiology (Bethesda )* 2009 June;24:159-70.
78. Bruinstroop E, Pei L, Ackermans MT, Foppen E, Borgers AJ, Kwakkel J et al. Hypothalamic neuropeptide Y (NPY) controls hepatic VLDL triglyceride secretion in rats via the sympathetic nervous system. *Diabetes* 2012 May;61(5):1043-50.
79. Diepenbroek C, van der Plasse G, Eggels L, Rijnsburger M, Feenstra MG, Kalsbeek A et al. Alterations in blood glucose and plasma glucagon concentrations during deep brain stimulation in the shell region of the nucleus accumbens in rats. *Front Neurosci* 2013;7: 226.
80. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000 April 6;404(6778):661-71.
81. Dougherty P. Hypothalamus: Structural Organization and Central Control of Feeding. Byrne JH, editor. *Neuroscience Online*, an electronic textbook for the neurosciences. [Section 4: Homeostasis and Higher Brain Function, Chapter 1 and 4]. 2014. University of Texas Medical School at Houston, Dept of Neurobiology and Anatomy.
82. Romano A, Potes CS, Tempesta B, Cassano T, Cuomo V, Lutz T et al. Hindbrain noradrenergic input to the hypothalamic PVN mediates the activation of oxytocinergic neurons induced by the satiety factor oleoylethanolamide. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013 November 15; 305(10): E1266-E1273.
83. Bailey TW, Hermes SM, Andresen MC, Aicher SA. Cranial visceral afferent pathways through the nucleus of the solitary tract to caudal ventrolateral medulla or paraventricular

- hypothalamus: targetspecific synaptic reliability and convergence patterns. *J Neurosci* 2006 November 15; 26(46): 11893-902.
84. Lam DD, Garfield AS, Marston OJ, Shaw J, Heisler LK. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol Biochem Behav* 2010 November;97(1):84-91.
  85. Leibowitz SF, Alexander JT. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biol Psychiatry* 1998 November 1;44(9):851-64.
  86. Guy J, Pelletier G, Bosler O. Serotonin innervation of neuropeptide Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 1988 February 15;85(1):9-13.
  87. Dryden S, Wang Q, Frankish HM, Pickavance L, Williams G. The serotonin (5-HT) antagonist methysergide increases neuropeptide Y (NPY) synthesis and secretion in the hypothalamus of the rat. *Brain Res* 1995 November 13; 699(1): 12-8.
  88. Heisler LK, Cowley MA, Tecott LH, Fan W, Low MJ, Smart JL et al. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. *Science* 2002 July 26; 297(5581): 609-11.
  89. Blundell JE, Hill AJ. Dexfenfluramine and appetite in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1992 December; 16 Suppl 3: S51-S59.
  90. Norris SL, Zhang X, Avenell A, Gregg E, Schmid CH, Kim C et al. Efficacy of pharmacotherapy for weight loss in adults with type 2 diabetes mellitus: a metaanalysis. *Arch Intern Med* 2004 July 12; 164(13): 1395-404.
  91. Smith SR, Weissman NJ, Anderson CM, Sanchez M, Chuang E, Stubbe S et al. Multicenter, placebo-controlled trial of lorcaserin for weight management. *N Engl J Med* 2010 July 15; 363(3): 245-56.
  92. Erritzoe D, Frokjaer VG, Haahr MT, Kalbitzer J, Svarer C, Holst KK et al. Cerebral serotonin transporter binding is inversely related to body mass index. *Neuroimage* 2010 August 1; 52(1): 284-9.
  93. Lockie SH, Andrews ZB. The hormonal signature of energy deficit: Increasing the value of food reward. *Mol Metab* 2013;2(4): 329-36.
  94. DiLeone RJ, Taylor JR, Picciotto MR. The drive to eat: comparisons and distinctions between mechanisms of food reward and drug addiction. *Nat Neurosci* 2012 October; 15(10): 1330-5.

95. Davis CA, Levitan RD, Reid C, Carter JC, Kaplan AS, Patte KA et al. Dopamine for "wanting" and opioids for "liking": a comparison of obese adults with and without binge eating. *Obesity (Silver Spring)* 2009 June; 17(6): 1220-5.
96. Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy action and reward. *Physiol Behav* 2005 December 15; 86(5): 773-95.
97. Berridge KC. The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)* 2007 April; 191(3): 391-431.
98. Barbano MF, Cador M. Opioids for hedonic experience and dopamine to get ready for it. *Psychopharmacology (Berl)* 2007 April; 191(3): 497-506.
99. Berridge KC. 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiol Behav* 2009 July 14; 97(5): 537-50.
100. Small DM, Jones-Gotman M, Dagher A. Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. *Neuroimage* 2003 August; 19(4): 1709-15.
101. Pandit R, Luijendijk MC, Vanderschuren LJ la Fleur SE, Adan RA. Limbic substrates of the effects of neuropeptide Y on intake of and motivation for palatable food. *Obesity (Silver Spring)* 2014 May; 22(5): 1216-9.
102. Brown CM, Coscina DV, Fletcher PJ. The rewarding properties of neuropeptide Y in perifornical hypothalamus vs. Nucleus accumbens. *Peptides* 2000 August; 21(8): 1279-87.
103. Stratford TR, Kelley AE. Evidence of a functional relationship between the nucleus accumbens shell and lateral hypothalamus subserving the control of feeding behavior. *J Neurosci* 1999 December 15; 19(24): 11040-8.
104. Will MJ, Franzblau EB, Kelley AE. Nucleus accumbens mu-opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network. *J Neurosci* 2003 April 1; 23(7): 2882-8.
105. Lam DD, Heisler LK. Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes. *Expert Rev Mol Med* 2007; 9(5): 1-24.
106. Fields HL, Hjelmstad GO, Margolis EB, Nicola SM. Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annu Rev Neurosci* 2007; 30: 289-316.

107. Joshua M, Adler A, Bergman H. The dynamics of dopamine in control of motor behavior. *Curr Opin Neurobiol* 2009 December; 19(6): 615-20.
108. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998 January; 78(1): 189-225.
109. Schmitt KC, Reith ME. Regulation of the dopamine transporter: aspects relevant to psychostimulant drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 2010 February; 1187: 316-40.
110. Booij J, Habraken JB, Bergmans P, Tissingh G, Winogrodzka A, Wolters EC et al. Imaging of dopamine transporters with iodine-123-FP-CIT SPECT in healthy controls and patients with Parkinson's disease. *J Nucl Med* 1998 November; 39(11): 1879-84.
111. de Win MM, Habraken JB, Reneman L, van den Brink W, den Heeten GJ, Booij J. Validation of [(123)I]beta-CIT SPECT to assess serotonin transporters in vivo in humans: a double-blind, placebo-controlled, crossover study with the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram. *Neuropsychopharmacology* 2005 May; 30(5): 996- 1005.
112. Breisch ST, Zemlan FP, Hoebel BG. Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. *Science* 1976 April 23; 192 (4237): 382-5.
113. Saller CF, Stricker EM. Hyperphagia and increased growth in rats after intraventricular injection of 5,7-dihydroxytryptamine. *Science* 1976 April 23; 192(4237): 385-7.
114. Waldbillig RJ, Bartness TJ, Stanley BG. Increased food intake, body weight, and adiposity in rats after regional neurochemical depletion of serotonin. *J Comp Physiol Psychol* 1981 June; 95(3): 391- 405.
115. Fetissov SO, Meguid MM. Serotonin delivery into the ventromedial nucleus of the hypothalamus affects differently feeding pattern and body weight in obese and lean Zucker rats. *Appetite* 2010 April; 54(2): 346-53.
116. Chen X, Margolis KJ, Gershon MD, Schwartz GJ, Sze JY. Reduced serotonin reuptake transporter (SERT) function causes insulin resistance and hepatic steatosis independent of food intake. *PLoS One* 2012; 7(3): e32511.
117. Homberg JR, la Fleur SE, Cuppen E. Serotonin transporter deficiency increases abdominal fat in female, but not male rats. *Obesity (Silver Spring)* 2010 January; 18(1): 137-45.
118. Salmela PI, Sotaniemi EA, Viikari J, Solakivi- Jaakkola T, Jarvensivu P. Fenfluramine therapy in non-insulin-dependent diabetic patients: effects on body weight, glucose

- homeostasis, serum lipoproteins, and antipyrine metabolism. *Diabetes Care* 1981 September; 4(5): 535-40.
119. Fidler MC, Sanchez M, Raether B, Weissman NJ, Smith SR, Shanahan WR et al. A one-year randomized trial of lorcaserin for weight loss in obese and overweight adults: the BLOSSOM trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2011 October; 96(10): 3067-77.
  120. Halford JC, Harrold JA, Boyland EJ, Lawton CL, Blundell JE. Serotonergic drugs : effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Drugs* 2007; 67(1): 27-55.
  121. Fava M, Judge R, Hoog SL, Nilsson ME, Koke SC. Fluoxetine versus sertraline and paroxetine in major depressive disorder: changes in weight with long-term treatment. *J Clin Psychiatry* 2000 November; 61(11):863-7.
  122. Raeder MB, Bjelland I, Emil VS, Steen VM. Obesity, dyslipidemia, and diabetes with selective serotonin reuptake inhibitors: the Hordaland Health Study. *J Clin Psychiatry* 2006 December; 67(12): 1974-82.
  123. Sookoian S, Gemma C, Garcia SI, Gianotti TF, Dieuzeide G, Roussos A et al. Short allele of serotonin transporter gene promoter is a risk factor for obesity in adolescents. *Obesity (Silver Spring)* 2007 February; 15(2): 271-6.
  124. Castellanos EH, Charboneau E, Dietrich MS, Park S, Bradley BP, Mogg K et al. Obese adults have visual attention bias for food cue images: evidence for altered reward system function. *Int J Obes (Lond)* 2009 September; 33(9): 1063-73.
  125. Nijs IM, Muris P, Euser AS, Franken IH. Differences in attention to food and food intake between overweight/obese and normal-weight females under conditions of hunger and satiety. *Appetite* 2010 April; 54(2): 243-54.
  126. Tetley A, Brunstrom J, Griffiths P. Individual differences in food-cue reactivity. The role of BMI and everyday portion-size selections. *Appetite* 2009 June; 52(3): 614-20.
  127. Volkow ND, Wang GJ, Baler RD. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn Sci* 2011 January; 15(1): 37-46.
  128. Stice E, Spoor S, Bohon C, Small DM. Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by TaqIA A1 allele. *Science* 2008 October 17; 322(5900): 449-52.

129. Stice E, Yokum S, Bohon C, Marti N, Smolen A. Reward circuitry responsivity to food predicts future increases in body mass: moderating effects of DRD2 and DRD4. *Neuroimage* 2010 May 1; 50(4): 1618-25.
130. de Weijer BA, van de Giessen E, van Amelsvoort TA, Boot E, Braak B, Janssen IM et al. Lower striatal dopamine D2/3receptor availability in obese compared with non-obese subjects. *EJNMMI Res* 2011; 1(1): 37.
131. Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W et al. Brain dopamine and obesity. *Lancet* 2001 February 3; 357(9253): 354-7.
132. van de Giessen E, Celik F, Schweitzer DH, van den Brink W, Booij J. Dopamine D2/3 receptor availability and amphetamine-induced dopamine release in obesity. *J Psychopharmacol* 2014 April 30.
133. Noble EP, Noble RE, Ritchie T, Syndulko K, Bohlman MC, Noble LA et al. D2 dopamine receptor gene and obesity. *Int J Eat Disord* 1994 April; 15(3): 205-17.
134. Dawe S, Loxton NJ. The role of impulsivity in the development of substance use and eating disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2004 May; 28(3): 343-51.
135. Stice E, Spoor S, Bohon C, Veldhuizen MG, Small DM. Relation of reward from food intake and anticipated food intake to obesity: a functional magnetic resonance imaging study. *J Abnorm Psychol* 2008 November; 117(4): 924-35.
136. Rothemund Y, Preuschhof C, Bohner G, Bauknecht HC, Klingebiel R, Flor H et al. Differential activation of the dorsal striatum by high-calorie visual food stimuli in obese individuals. *Neuroimage* 2007 August 15; 37(2): 410-21.
137. Stoeckel LE, Weller RE, Cook EW, III, Twieg DB, Knowlton RC, Cox JE. Widespread reward-system activation in obese women in response to pictures of high-calorie foods. *Neuroimage* 2008 June; 41(2): 636-47.
138. Stice E, Yokum S, Burger KS, Epstein LH, Small DM. Youth at risk for obesity show greater activation of striatal and somatosensory regions to food. *J Neurosci* 2011 March 23; 31(12): 4360-6.
139. Pritchett CE, Hajnal A. Obesogenic diets may differentially alter dopamine control of sucrose and fructose intake in rats. *Physiol Behav* 2011 July 25; 104(1): 111-6.

140. van de Giessen E, la Fleur SE, de BK, van den Brink W, Booij J. Free-choice and nochoice high-fat diets affect striatal dopamine D2/3 receptor availability, caloric intake, and adiposity. *Obesity (Silver Spring)* 2012 August; 20(8): 1738-40.
141. van de Giessen E, la Fleur SE, Eggels L, de BK, van den Brink W, Booij J. High fat/carbohydrate ratio but not total energy intake induces lower striatal dopamine D2/3 receptor availability in diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* 2013 May; 37(5): 754-7.
142. Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci* 2010 May; 13(5): 635- 41.
143. Gordon I, Weizman R, Rehavi M. Modulatory effect of agents active in the presynaptic dopaminergic system on the striatal dopamine transporter. *Eur J Pharmacol* 1996 February 29; 298(1): 27- 30.
144. Beeler JA, Frazier CR, Zhuang X. Dopaminergic enhancement of local foodseeking is under global homeostatic control. *Eur J Neurosci* 2012 January; 35(1): 146- 59.
145. Zhuang X, Oosting RS, Jones SR, Gainetdinov RR, Miller GW, Caron MG et al. Hyperactivity and impaired response habituation in hyperdopaminergic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 February 13; 98(4): 1982-7.
146. Narayanaswami V, Thompson AC, Cassis LA, Bardo MT, Dwoskin LP. Diet-induced obesity: dopamine transporter function, impulsivity and motivation. *Int J Obes (Lond)* 2012 November 20.
147. Chen PS, Yang YK, Yeh TL, Lee IH, Yao WJ, Chiu NT et al. Correlation between body mass index and striatal dopamine transporter availability in healthy volunteers--a SPECT study. *Neuroimage* 2008 March 1; 40(1): 275-9.
148. Thomsen G, Ziebell M, Jensen PS, da Cunha-Bang S, Knudsen GM, Pinborg LH. No correlation between body mass index and striatal dopamine transporter availability in healthy volunteers using SPECT and [<sup>11</sup>C]PE2I. *Obesity (Silver Spring)* 2012 December 12.
149. van de Giessen E, Hesse S, Caan MW, Zientek F, Dickson JC, Tossici-Bolt L et al. No association between striatal dopamine transporter binding and body mass index: a multi-center European study in healthy volunteers. *Neuroimage* 2013 January 1; 64: 61-7.
150. Brands M, Swat M, Lammers NM, Sauerwein HP, Endert E, Ackermans MT et al. Effects of a hypercaloric diet on beta-cell responsiveness in lean healthy men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013 February; 78(2): 217-25.

151. Consumption of sweet beverages and type 2 diabetes incidence in European adults: results from EPIC-InterAct. *Diabetologia* 2013 July; 56(7): 1520-30.
152. Assy N, Nasser G, Kamayse I, Nseir W, Beniashvili Z, Djibre A et al. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. *Can J Gastroenterol* 2008 October; 22(10): 811-6.
153. Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Despres JP, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2010 November; 33(11): 2477-83.
154. Schulze MB, Manson JE, Ludwig DS, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC et al. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *JAMA* 2004 August 25; 292(8): 927-34.
155. Hu FB, Malik VS. Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence. *Physiol Behav* 2010 April 26; 100(1): 47-54.
156. la Fleur SE, van Rozen AJ, Luijendijk MC, Groeneweg F, Adan RA. A free-choice high-fat high-sugar diet induces changes in arcuate neuropeptide expression that support hyperphagia. *Int J Obes (Lond)* 2010 March; 34(3): 537-46.
157. la Fleur SE, Luijendijk MC, van Rozen AJ, Kalsbeek A, Adan RA. A free-choice high-fat high-sugar diet induces glucose intolerance and insulin unresponsive-ness to a glucose load not explained by obesity. *Int J Obes (Lond)* 2011 April; 35(4): 595-604.
158. Piernas C, Popkin BM. Snacking increased among U.S. adults between 1977 and 2006. *J Nutr* 2010 February; 140(2): 325- 32.
159. Chapelot D. The role of snacking in energy balance: a biobehavioral approach. *J Nutr* 2011 January; 141(1): 158-62.
160. la Fleur SE, Luijendijk MC, van der Zwaal EM, Brans MA, Adan RA. The snacking rat as model of human obesity: effects of a free-choice high-fat high-sugar diet on meal patterns. *Int J Obes (Lond)* 2013 August 27.
161. Diepenbroek C, Eggels L, Ackermans M, Fliers E, Serlie M, Kalsbeek A et al. Obesogenic diets with fat and sugar reduce site specific sensitivity to insulin. *Appetite* 57[1], 13. 2011. Ref Type: Abstract
162. Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev* 2008 December; 60(4): 470-512.

163. DeFronzo RA, Gunnarsson R, Bjorkman O, Olsson M, Wahren J. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1985 July; 76(1): 149-55.
164. Bernard C. *Lecons de Physiologie Experimentale Appliqué a la Medicine Faites au College de France*. Paris, France: Bailere et Fils 1855; 296-313.
165. Sandoval D, Cota D, Seeley RJ. The integrative role of CNS fuel-sensing mechanisms in energy balance and glucose regulation. *Annu Rev Physiol* 2008; 70: 513-35.
166. Kreier F, Kap YS, Mettenleiter TC, van HC, van d, V, Kalsbeek A et al. Tracing from fat tissue, liver, and pancreas: a neuroanatomical framework for the role of the brain in type 2 diabetes. *Endocrinology* 2006 March; 147(3): 1140-7.
167. la Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM. Polysynaptic neural pathways between the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus, and the liver. *Brain Res* 2000 July 14; 871(1): 50-6.
168. Pocai A, Obici S, Schwartz GJ, Rossetti L. A brain-liver circuit regulates glucose homeostasis. *Cell Metab* 2005 January; 1(1): 53- 61.
169. German J, Kim F, Schwartz GJ, Havel PJ, Rhodes CJ, Schwartz MW et al. Hypothalamic leptin signalling regulates hepatic insulin sensitivity via a neurocircuit involving the vagus nerve. *Endocrinology* 2009 October; 150(10): 4502-11.
170. Pocai A, Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Schwartz GJ, Bryan J et al. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 2005 April 21; 434(7036): 1026-31.
171. Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. Hypothalamic insulin signalling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 2002 December; 8(12): 1376-82.
172. Ramnanan CJ, Saraswathi V, Smith MS, Donahue EP, Farmer B, Farmer TD et al. Brain insulin action augments hepatic glycogen synthesis without suppressing glucose production or gluconeogenesis in dogs. *J Clin Invest* 2011 September; 121(9): 3713-23.
173. Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY et al. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 2007 September 13; 449(7159): 228-32.

174. Wang Q, Liu C, Uchida A, Chuang JC, Walker A, Liu T et al. Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin. *Mol Metab* 2014 February; 3(1): 64-72.
175. Ross SA, Gulve EA, Wang M. Chemistry and biochemistry of type 2 diabetes. *Chem Rev* 2004 March; 104(3): 1255-82.
176. Klimentidis YC, Wineinger NE, Vazquez AI, de Los CG. Multiple metabolic genetic risk scores and type 2 diabetes risk in three racial/ethnic groups. *J Clin Endocrinol Metab* 2014 June 6; jc20141818.
177. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003 December; 112(12): 1821-30.
178. Gastaldelli A, Cusi K, Pettiti M, Hardies J, Miyazaki Y, Berria R et al. Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Gastroenterology* 2007 August; 133(2): 496-506.
179. Bisschop PH, de MJ, Ackermans MT, Endert E, Pijl H, Kuipers F et al. Dietary fat content alters insulin-mediated glucose metabolism in healthy men. *Am J Clin Nutr* 2001 March; 73(3): 554-9.
180. Jacob PS, de Meneses Fujii TM, Yamada M, Borges MC, Pantaleao LC, Borelli P et al. Isocaloric intake of a high-fat diet promotes insulin resistance and inflammation in Wistar rats. *Cell Biochem Funct* 2013 April; 31(3): 244-53.
181. Lecoultre V, Egli L, Carrel G, Theytaz F, Kreis R, Schneiter P et al. Effects of fructose and glucose overfeeding on hepatic insulin sensitivity and intrahepatic lipids in healthy humans. *Obesity (Silver Spring)* 2013 April; 21(4): 782-5.
182. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/ obese humans. *J Clin Invest* 2009 May; 119(5): 1322-34.
183. Heijboer AC, Voshol PJ, Donga E, van Eden CG, Havekes LM, Romijn JA et al. High fat diet induced hepatic insulin resistance is not related to changes in hypothalamic mRNA expression of NPY, AgRP, POMC and CART in mice. *Peptides* 2005 December; 26(12): 2554-8.

184. Obici S, Feng Z, Karkanas G, Baskin DG, Rossetti L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci* 2002 June; 5(6): 566-72.
185. Diepenbroek C, Serlie MJ, Fliers E, Kalsbeek A, la Fleur SE. Brain areas and pathways in the regulation of glucose metabolism. *Biofactors* 2013 August 1.
186. Garcia-Tornadu I, Ornstein AM, Chamson- Reig A, Wheeler MB, Hill DJ, Arany E et al. Disruption of the dopamine d2 receptor impairs insulin secretion and causes glucose intolerance. *Endocrinology* 2010 April; 151(4): 1441-50.
187. Luo S, Liang Y, Cincotta AH. Intracerebroventricular administration of bromocriptine ameliorates the insulin-resistant/ glucose-intolerant state in hamsters. *Neuroendocrinology* 1999 March; 69(3): 160-6.
188. Pijl H, Ohashi S, Matsuda M, Miyazaki Y, Mahankali A, Kumar V et al. Bromocriptine: a novel approach to the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2000 August; 23(8): 1154-61.
189. van Nimwegen LJ, Storosum JG, Blumer RM, Allick G, Venema HW, de HL et al. Hepatic insulin resistance in antipsychotic naive schizophrenic patients: stable isotope studies of glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 February; 93(2): 572-7.
190. Hu G, Jousilahti P, Bidel S, Antikainen R, Tuomilehto J. Type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. *Diabetes Care* 2007 April; 30(4): 842-7.
191. Lammers NM, Sondermeijer BM, Twickler TB, de Bie RM, Ackermans MT, Fliers E et al. Subthalamic nucleus stimulation does not influence basal glucose metabolism or insulin sensitivity in patients with Parkinson's disease. *Front Neurosci* 2014;8: 95.
192. de Weijer BA, van de Giessen E, Janssen I, Berends FJ, van de Laar A, Ackermans MT et al. Striatal dopamine receptor binding in morbidly obese women before and after gastric bypass surgery and its relationship with insulin sensitivity. *Diabetologia* 2014 May; 57(5): 1078-80.
193. Dunn JP, Kessler RM, Feurer ID, Volkow ND, Patterson BW, Ansari MS et al. Relationship of dopamine type 2 receptor binding potential with fasting neuroendocrine hormones and insulin sensitivity in human obesity. *Diabetes Care* 2012 May; 35(5): 1105-11.
194. Morris JK, Bomhoff GL, Gorres BK, Davis VA, Kim J, Lee PP et al. Insulin resistance impairs nigrostriatal dopamine function. *Exp Neurol* 2011 September; 231(1): 171-80.

195. Luo S, Luo J, Cincotta AH. Suprachiasmatic nuclei monoamine metabolism of glucose tolerant versus intolerant hamsters. *Neuroreport* 1999 July 13; 10(10): 2073-7.
196. Xu Y, Berglund ED, Sohn JW, Holland WL, Chuang JC, Fukuda M et al. 5-HT<sub>2</sub>CRs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate insulin sensitivity in liver. *Nat Neurosci* 2010 December; 13(12): 1457-9.
197. Zhou L, Sutton GM, Rochford JJ, Semple RK, Lam DD, Oksanen LJ et al. Serotonin 2C receptor agonists improve type 2 diabetes via melanocortin-4 receptor signalling pathways. *Cell Metab* 2007 November; 6(5): 398-405.
198. Berglund ED, Liu C, Sohn JW, Liu T, Kim MH, Lee CE et al. Serotonin 2C receptors in pro-opiomelanocortin neurons regulate energy and glucose homeostasis. *J Clin Invest* 2013 December 2; 123(12): 5061- 70.
199. Iordanidou M, Tavridou A, Petridis I, Arvanitidis KI, Christakidis D, Vargemezis V et al. The serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) is associated with type 2 diabetes. *Clin Chim Acta* 2010 February; 411(3-4): 167-71.
200. Iordanidou M, Tavridou A, Vasiliadis MV, Arvanitidis KI, Petridis J, Christakidis D et al. The -759C/T polymorphism of the 5-HT<sub>2</sub>C receptor is associated with type 2 diabetes in male and female Caucasians. *Pharmacogenet Genomics* 2008 February; 18(2): 153-9.
201. Gilles M, Wilke A, Kopf D, Nonell A, Lehnert H, Deuschle M. Antagonism of the serotonin (5-HT)-2 receptor and insulin sensitivity: implications for atypical antipsychotics. *Psychosom Med* 2005 September; 67(5): 748-51.
202. Ueno N, Inui A, Asakawa A, Takao F, Komatsu Y, Kotani K et al. Mosapride, a 5HT-4 receptor agonist, improves insulin sensitivity and glycaemic control in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 2002 June; 45(6): 792-7.
203. Briscoe VJ, Ertl AC, Tate DB, Dawling S, Davis SN. Effects of a selective serotonin reuptake inhibitor, fluoxetine, on counterregulatory responses to hypoglycemia in healthy individuals. *Diabetes* 2008 September; 57(9): 2453- 60.
204. Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM, Hoebel BG. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010 Nov;97(1):101-6. doi: 10.1016/j.pbb.2010.02.012. Epub 2010 Feb 26. PMID: 20219526; PMCID: PMC3522469.

205. Wang Z, Yang Y, Xiang X, Zhu Y, Men J, He M. [Estimation of the normal range of blood glucose in rats]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2010 Mar;39(2):133-7, 142. Chinese. PMID: 20459020.
206. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AA, Cicogna AC, Novelli Filho JL. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 2007 Jan;41(1):111-9. doi: 10.1258/00236770779399518. PMID: 17234057.
207. Oh, CM., Namkung, J., Go, Y. et al. Regulation of systemic energy homeostasis by serotonin in adipose tissues. *Nat Commun* 6, 6794 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms7794>
208. Odabas-Geldiay M, Shields H, Berro LF, Rice KC, Howell LL. Effects of acute treatments with the serotonin 2A antagonist M100907 alone or in combination with the serotonin 2C agonist WAY163909 on methamphetamine self-administration in rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend*. 2019 Jan 1;194:252-256. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2018.10.018. Epub 2018 Nov 13. PMID: 30469095; PMCID: PMC6312465.
209. Dunlop J, Marquis KL, Lim HK, Leung L, Kao J, Cheesman C, Rosenzweig-Lipson S. Pharmacological profile of the 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist WAY-163909; therapeutic potential in multiple indications. *CNS Drug Rev*. 2006 Fall-Winter;12(3-4):167-77. doi: 10.1111/j.1527-3458.2006.00167.x. PMID: 17227285; PMCID: PMC6506193.
210. Fletcher, P., Rizos, Z., Sinyard, J. *et al*. The 5-HT<sub>2C</sub> Receptor Agonist Ro60-0175 Reduces Cocaine Self-Administration and Reinstatement Induced by the Stressor Yohimbine, and Contextual Cues. *Neuropsychopharmacol* **33**, 1402–1412 (2008). <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301509>
211. Higgins GA, Silenieks LB, Lau W, de Lannoy IA, Lee DK, Izhakova J, Coen K, Le AD, Fletcher PJ. Evaluation of chemically diverse 5-HT<sub>2c</sub> receptor agonists on behaviours motivated by food and nicotine and on side effect profiles. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013 Apr;226(3):475-90. doi: 10.1007/s00213-012-2919-2. Epub 2012 Nov 25. PMID: 23184281.
212. World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1998; 2. EMA Draft Guideline on clinical evaluation of medicinal products used in weight control

- EMA/CHMP/311805/2014. Available here; 3. Bray GA et al. *Obes Rev* 2017;18:715–723;
4. EASO: 2015 Milan Declaration: A Call to Action on Obesity. Available here
213. CDC's Division of Diabetes Translation. National Diabetes Surveillance System. Available at <https://gis.cdc.gov/grasp/diabetes/DiabetesAtlas.html> and obesity BRFSS data, available at <http://www.cdc.gov/obesity/data/prevalence-maps.html> [accessed November 2017]
214. Adapted from Sharma AM. *Obes Rev*. 2010;11:808-9; Guh *et al. BMC Public Health* 2009;9:88; Luppino *et al. Arch Gen Psychiatry* 2010;67:220–9; Simon *et al. Arch Gen Psychiatry* 2006;63:824–30; Church *et al. Gastroenterology* 2006;130:2023–30; Li *et al. Prev Med* 2010;51:18–23; Hosler. *Prev Chronic Dis* 2009;6:A48
215. Hannah Ritchie and Max Roser (2017) - "Obesity". Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: '<https://ourworldindata.org/obesity>' [Online Resource]
216. Trujillo JM, Nuffer W, Smith BA. GLP-1 receptor agonists: an updated review of head-to-head clinical studies. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2021 Mar 9;12:2042018821997320. doi: 10.1177/2042018821997320. PMID: 33767808; PMCID: PMC7953228.
217. Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busetto L, Micic D, Toplak H; Obesity Management Task Force of the European Association for the Study of Obesity. European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obes Facts*. 2015;8(6):402-24. doi: 10.1159/000442721. Epub 2015 Dec 5. Erratum in: *Obes Facts*. 2016;9(1):64. PMID: 26641646; PMCID: PMC5644856.
218. Brashier DB, Sharma AK, Dahiya N, Singh SK, Khadka A. Lorcaserin: A novel antiobesity drug. *J Pharmacol Pharmacother*. 2014 Apr;5(2):175-8. doi: 10.4103/0976-500X.130158. PMID: 24799830; PMCID: PMC4008925.
219. Georgescu T, Lyons D, Heisler LK. Role of serotonin in body weight, insulin secretion and glycaemic control. *J Neuroendocrinol*. 2021 Apr;33(4):e12960. doi: 10.1111/jne.12960. PMID: 33909316.