



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

д-р Ивайло Атанасов Богомилов

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

АВТОРЕФЕРАТ

**На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР“**

Научен ръководители: Проф. д-р Румен Николов, д.м.

Проф. д-р Надка Бояджиева, д.м.н.

София, 2023



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

д-р Ивайло Атанасов Богомилов

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

АВТОРЕФЕРАТ

**На дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР“ в докторска програма: Фармакология (вкл. фармакокинетика и
химиотерапия)**

**Област на висше образование: 7. Здравеопазване и спорт Професионално
направление: 7.1. Медицина Научна специалност: Фармакология (вкл.
фармакокинетика и химиотерапия)**

Научени ръководители: Проф. д-р Румен Николов, д.м.

Проф. д-р Надка Бояджиева, д.м.н.

Рецензенти: Проф. д-р Славина Кирилова Сурчева, дм

Проф. д-р Любка Павлова Танчева, дм

Дисертационният труд е написан на 123 стандартни печатни страници и е онагледен с 31 фигури и 33 таблици. Библиографията включва 219 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на заседание на Катедрения съвет на Катедра по фармакология и токсикология при Медицински факултет, Медицински университет – София, състояло се на 06.03.2023 г.

Публичната защита ще се проведе на 26.06.2023 г. от 9 часа в платформата Google Meet, пред научно жури в състав:

Председател :

1. Проф. д-р Славина Кирилова Сурчева, дм – Катедра по фармакология и токсикология, МФ, МУ – София (вътрешен член за МУ - София)

Членове:

2. Проф. д-р Красимира Симеонова Якимова, дмн – пенсиониран преподавател по малко от 5 години, Катедра по фармакология и токсикология, МФ, МУ – София (вътрешен член за МУ - София)
3. Проф. д-р Иванка Илиева Костадинова, дм, дмн – Медицински университет – Пловдив, външен член за МУ - София
4. Проф. д-р Любка Павлова Танчева, дм – БАН (външен член за МУ – София)
5. Доц. д-р Силвия Ганчева Маринова, дм – Медицински университет - Варна (външен член за МУ - София)

Резервни членове:

1. Доц. д-р Теодора Светославова Ханджиева-Дърленска, дм – Катедра по фармакология и токсикология, МФ, МУ – София (вътрешен член)
2. Доц. д-р Делян Пенев Делев, дм – Медицински университет - Пловдив (външен член за МУ - София)

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по фармакология и токсикология, Медицински факултет, Медицински университет – София, ул. „Здраве“ №2 и на интернет страницата на Медицински университет – София.

Забележка: В автореферата номерата на таблиците съответстват на същите в дисертационния труд. Цитираните литературни източници съответстват на посочените в библиографската справка в дисертационния труд.

Съдържание:

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	6
ВЪВЕДЕНИЕ	7
А. Периферният серотонин - нов хормон, регулиращ множество метаболитни функции	7
Периферният серотонин, като средство за лечение на метаболитни нарушения	8
В. Мозъчният серотонин и връзката му със затлъстяването и метаболитните заболявания	9
1. Затлъстяването и централно мозъчната серотонинергична система	9
2. Серотонинът като регулатор на глюкозения метаболизъм	10
ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	11
МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	13
Експериментални животни	13
Фармакологични методи	13
1. Експериментален модел, изследващ ролята на периферния серотонин при затлъстели и диабетни плъхове порода Вистар (Wistar), с използване на периферен серотонинов инхибитор - LP533401	13
2. Експериментален модел, изследващ ролята на мозъчния серотонин при затлъстели и диабетни плъхове порода Wistar, с използване на селективен централен серотонинов агонист - WAY163909	17
3. Експериментален модел, изследващ ролята на мозъчния серотонин, при затлъстели и диабетни плъхове порода Wistar с използване на селективен централен серотонинов агонист – Ro60-0175.....	20
4. Биохимични методи	23
5. ELISA (Enzyme Immunosorbent Assay)	24
6. Статистически методи	25
РЕЗУЛТАТИ.....	27
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).....	27
1.1. Ефект върху телесното тегло при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	27

1.2. Ефект върху кръвната захар при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	29
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).....	32
1.4. Ефект върху стойностите на лептин при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	35
1.5. Ефект върху стойностите на грелин при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	36
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)	39
2.1. Ефект върху телесното тегло при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	39
2.2. Ефект върху кръвната захар при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar).....	41
2.3. Ефект върху стойностите на имунореактивен инсулин и инсулинова резистентност, изчислена чрез НОМА - индекс при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909	44
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)	46
3.1. Ефект върху телесното тегло при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro 60-0175 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)	46
3.2. Ефект върху кръвната захар при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro 60-0175 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)	48
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)	51
ДИСКУСИЯ.....	54
ИЗВОДИ.....	59
ПРИНОСИ	60
Приноси с научно-теоретично значение:	60
Приноси с научно-приложно значение:	61
Публикации, свързани с дисертационния труд:	62
Участия в конгреси, свързани с дисертационния труд:.....	63
Summary	65

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

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

HOMA - homeostatic model assessment

5-НТ - 5-хидрокситриптамин, серотонин

ТРН - триптофан хидроксилазата

Trp - триптофан хидроксилаза

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

SERT - серотонинови транспортери

GDS - gut-derived serotonin - серотонин, получен в червата

SSRI - инхибитори на обратното захващане на серотонина

NASH - неалкохолен стеатохепатит

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]. В мозъка серотонинът служи като невротрансмитер, като регулира множество физиологични аспекти, включително: поведение, учене, апетит и глюкозна хомеостаза. [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]. Интересно е, че множество други периферни клетъчни типове, включително панкреатични β -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 суперсемејството 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]. 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.

Периферен 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 β -клетки да произвеждат инсулин в достатъчни количества.

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.

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]. Блокирането на серотониновия синтез в периферията може да бъде привлекателна стратегия за лечение на диабет тип 2 и при хора.

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 β -клетки, промотира инсулиновата секреция и по време на бременността, също както и β -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 множество 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 показва голям терапевтичен потенциал при възпалителни и костни дегенеративни заболявания и при различни форми на диабет и затлъстяване.

В. Мозъчният серотонин и връзката му със затлъстяването и метаболитните заболявания

1. Затлъстяването и централно мозъчната серотонинергична 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, 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]. 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.

2. Серотонинът като регулатор на глюкозения 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, който се появява при чувствителните към инсулин тъкани и един от патологичните 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.

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 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 фармакологичното агонизиране на рецептора на серотонина подобрява инсулиновата чувствителност при болни със ЗД тип 2 [202].

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.

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 Wistar (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% - общата енергийна плътност на комбинираната високолипидна- високовъглехидратна храна беше 4298 ккал/кг, докато на храната давана на контролната група беше 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 денонощие, като единствено хранителния им прием беше ограничаван в часовете преди взимане на кръв за изследвания. Освен хранителния 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].

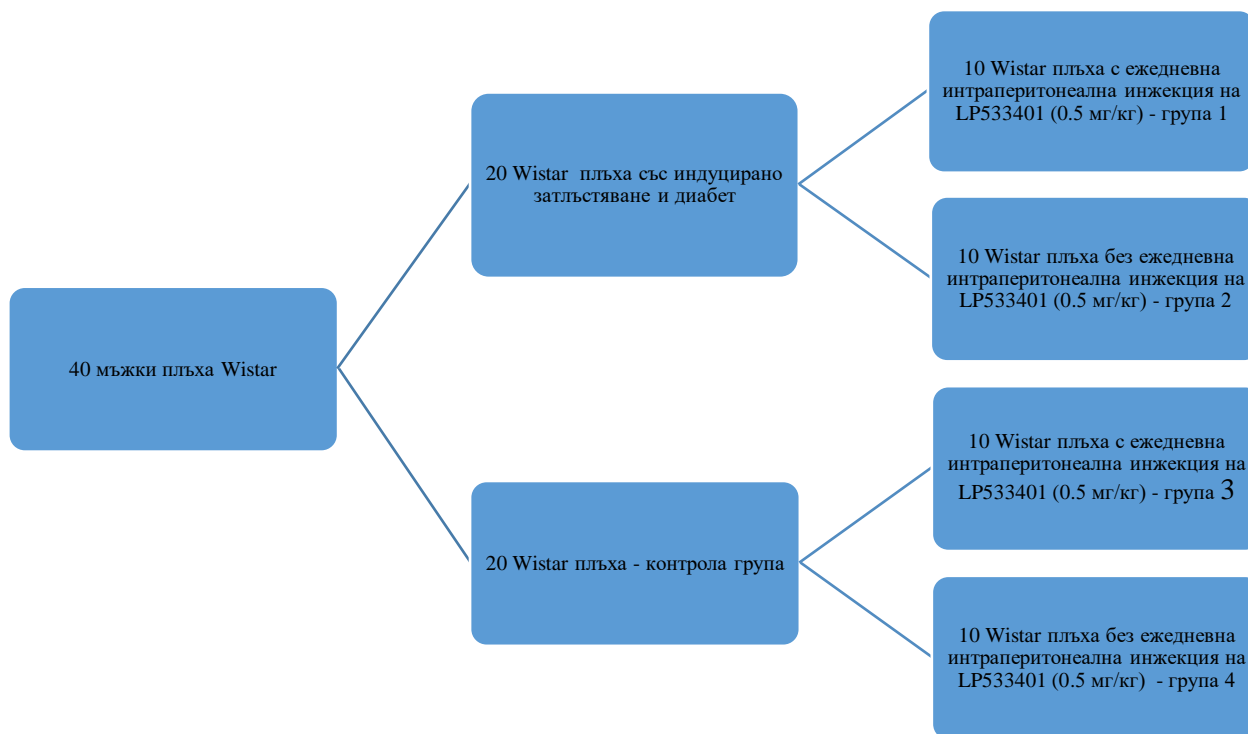
Стойностите за 100 гр хранителен продукт	Енергийна стойност, ккал	Общо количество мазнини, гр	Общо количество въглехидрати, гр	Общо количество белтъци, гр	Захари, гр	Наситени мастни киселини, гр	сол, гр
Чипс Lay's® Сирене	516	33	48	6.7	2.1	2.6	1.2
7 DAYS Bake Rolls® сол	449	15	63	14	7	5.8	2.7
Солети 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® SNOCAPIC®	378	4.4	73.2	9.6	28.9	1.7	0.47

Таблица 2. Състав и хранителна стойност на кафетерийната диета.

От групата 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/см², 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/см² до 0.68 гр/см², което се определя като нормална стойност за възрастни плъхове Wistar [206]. ИТМ се определи по формулата ИТМ= тегло в грама/ дължината в см².

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 серотонинов агонист - WAY163909

Експериментите *in vivo* се проведоха 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 прибаван 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% - общата енергийна плътност на комбинираната високолипидна- високовъглехидратна храна беше 4298 ккал/кг, докато на храната давана на контролната група беше около 2908 ккал/кг. Глюкозо-фруктозения 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 хранителния 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/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

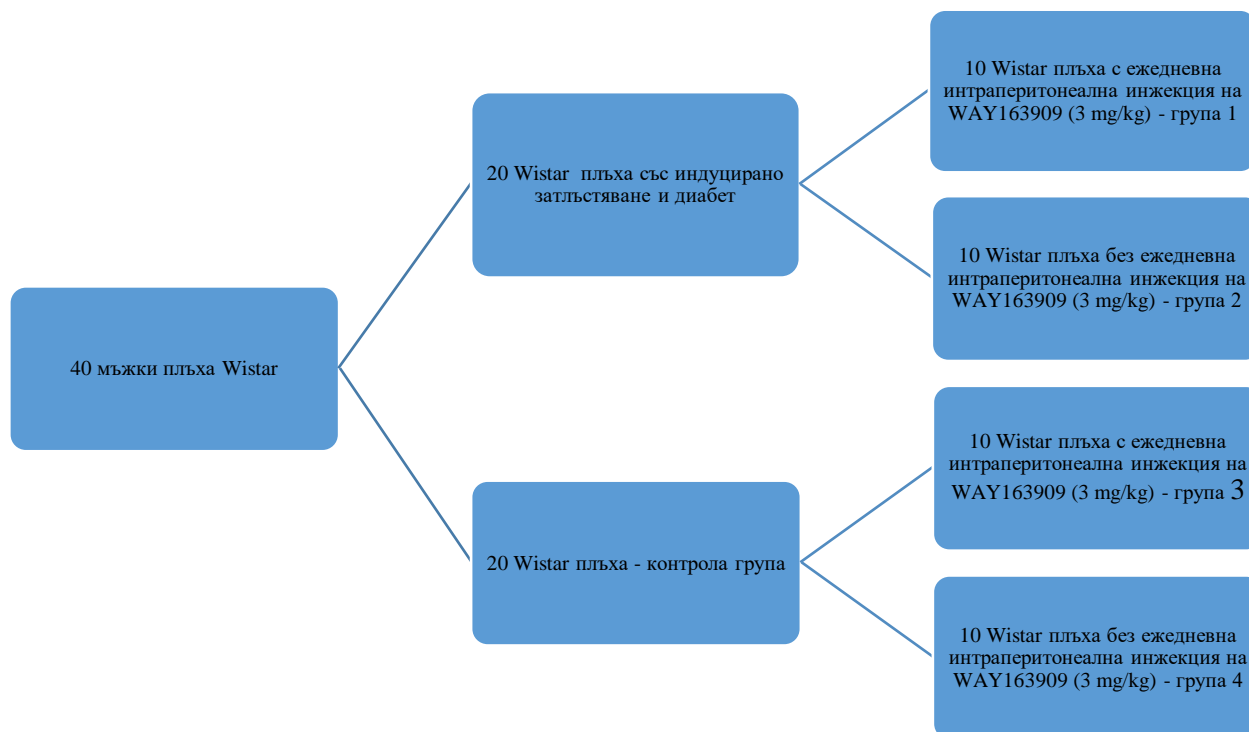
Таблица 3. Състав и хранителна стойност на кафетерийната диета.

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/см², 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/см² до 0.68 гр/см²,

което се определя като нормална стойност за възрастни плъхове Wistar [206]. ИТМ се определи по формулата $ИТМ = \frac{\text{тегло в грамове}}{\text{дължината в см}^2}$.

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 интраперитонеална 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_{2C} 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_{2C} 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 (12ч. светло/ 12 ч. тъмно). Поддържаната температура на околната среда по време на експериментите беше 22 С. 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].

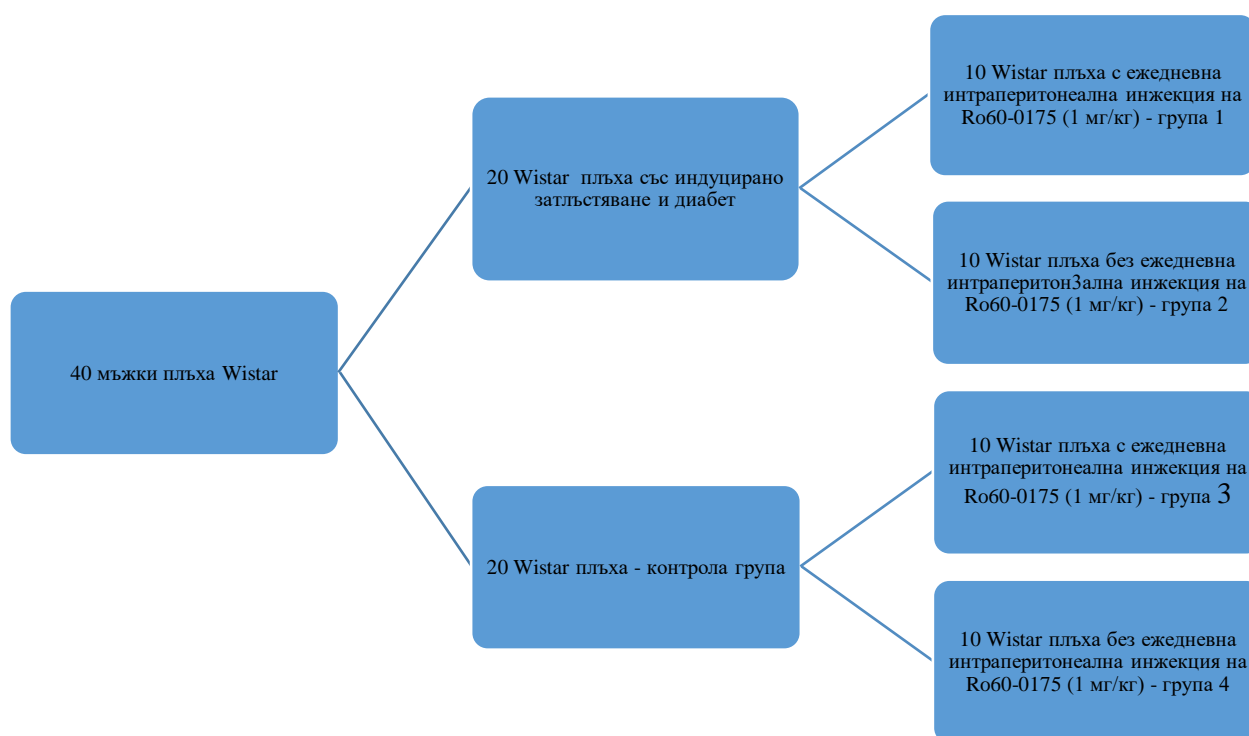
Стойностите за 100 гр хранителен продукт	Енергийна стойност, ккал	Общо количество мазнини, гр	Общо количество въглехидрати, гр	Общо количество белтъци, гр	Захари, гр	Наситени мастни киселини, гр	сол, гр
Чипс Lay's® Сирене	516	33	48	6.7	2.1	2.6	1.2
7 DAYS Bake Rolls® сол	449	15	63	14	7	5.8	2.7
Солети 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® CHOCAPIC®	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 г/см^2 , което се прима за затлъстяване при порода Wistar, за възрастни мъжки плъхове. [206]. Всички плъхове от контролната група бяха с ИТМ между 0.48 гр/см^2 до 0.68 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 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 интерперитонеална апликация на Ro60-0175 (1 мг/кг) и една без; група 1 - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro60-0175 (1

мг/кг), група 2 - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro60-0175 (1 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-НТ2В, така и за 5-НТ2С серотониновите рецепторни подтипове, с добра селективност спрямо 5-НТ2А 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. Определяна 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).

<i>НОМА- индекс и тежест на инсулинова резистентност</i>	
<i>Норма</i>	До 2,5
<i>Инсулинова резистентност</i>	2.5-8
<i>Захарен диабет (на фона на изразена инсулинова резистентност)</i>	≥ 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 μ l/ml кръв). Пробите се центрофугираха на 3500 оборота за 10 мин. на +4 °C. След отделянето на плазмата се

добавяше 100 μ 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 C-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-терминалния 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 проведе 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 +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.

2.1. 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 четириседмичното проследяване от 452 ± 9.44 грама изгодно до 436 ± 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).

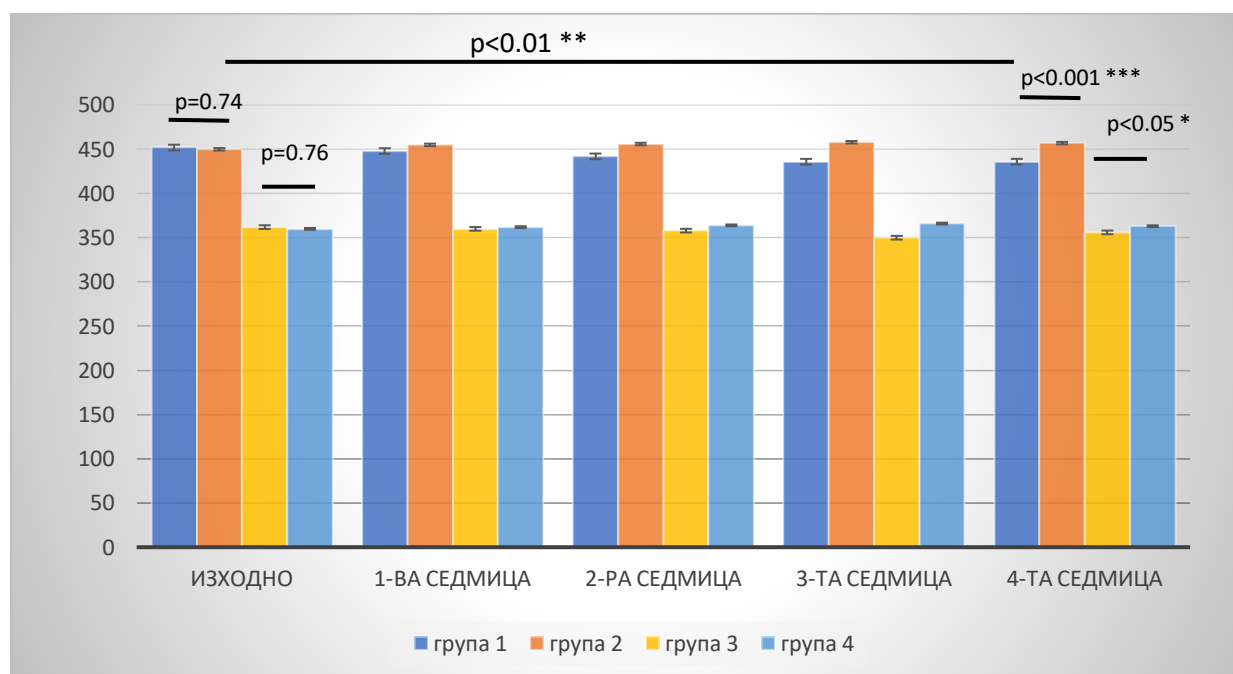
От получените данни се наблюдава редукция на телесно тегло и в контролната група с интраперитонеална апликация на LP533401 (0.5 мг/кг) - група 3, от 362 ± 14.1 грама изходно до 356 ± 6.04 грама на четвърта седмица, което е статистически значима промяна. При сравнение на група 3 с група 4 (контролната 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

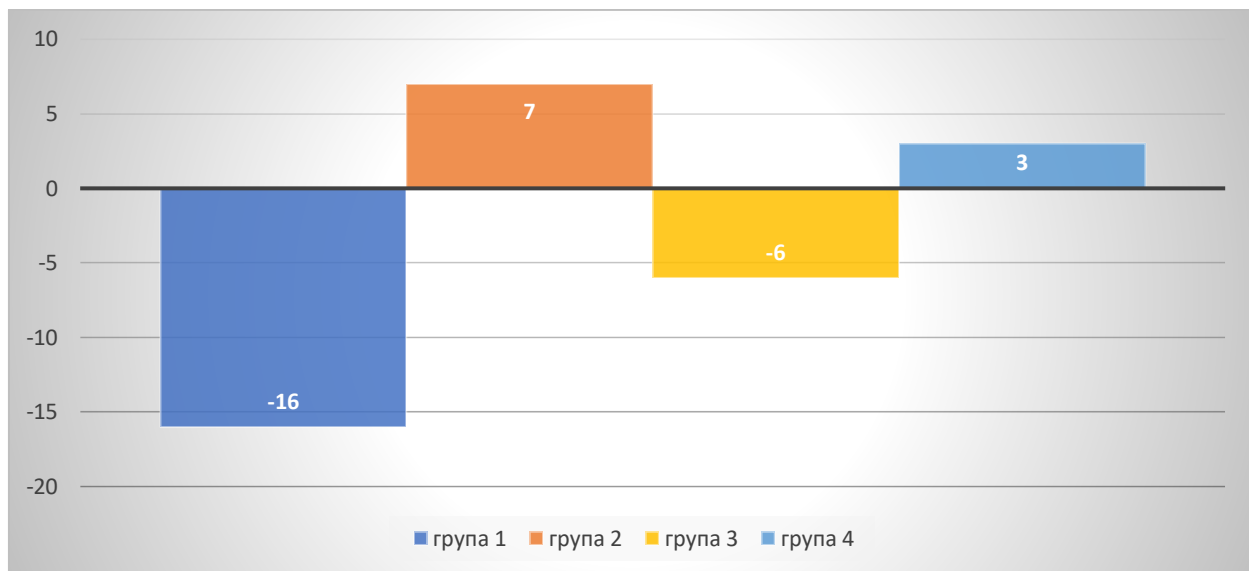
затлъстяване и захарен диабет без ежедневна интраперитонеална апликация на LP533401 (фигура 8).

	група 1	група 2	група 3	група 4
Изходно	452±9.44	450±19	362±14.1	360±13.3
1-ва седмица	448±9.77	448±20	360 ± 11.5	362±12.9
2-ра седмица	442±9.57	456±21.3	358±12	364±13.2
3-та седмица	436±5.16	458±18.4	350±9.42	366±9.94
4-та седмица	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)



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).

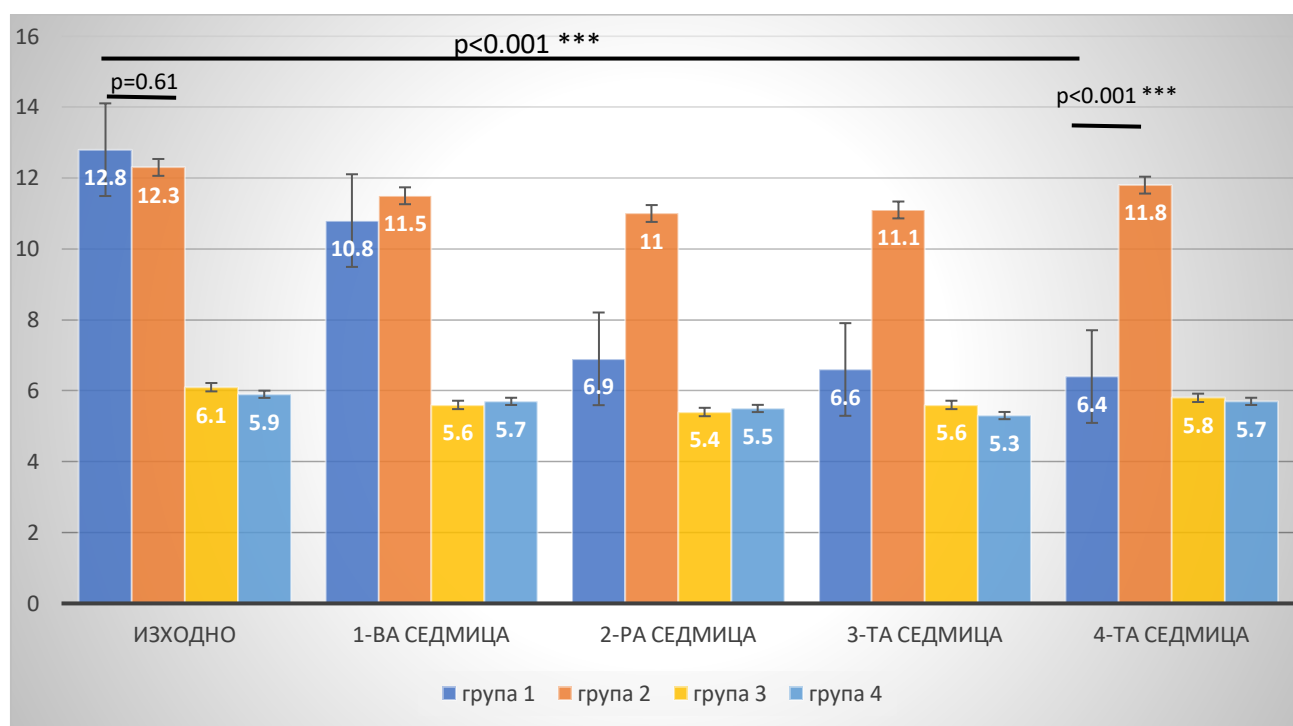
От проведените изследвания се установи понижаване на стойностите на кръвната захар на гладно в група 1 - плъхове със затлъстяване и захарен диабет с ежедневна интраперитонеална апликация на LP533401 (0.5 мг/кг). Средните изходни нива на кръвна захар в група 1 в началото на проучването са - 12.8 ± 2.29 ммол/л, като понижаването на кръвната захар в края на четири седмичното проследяване е до 6.4 ± 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).

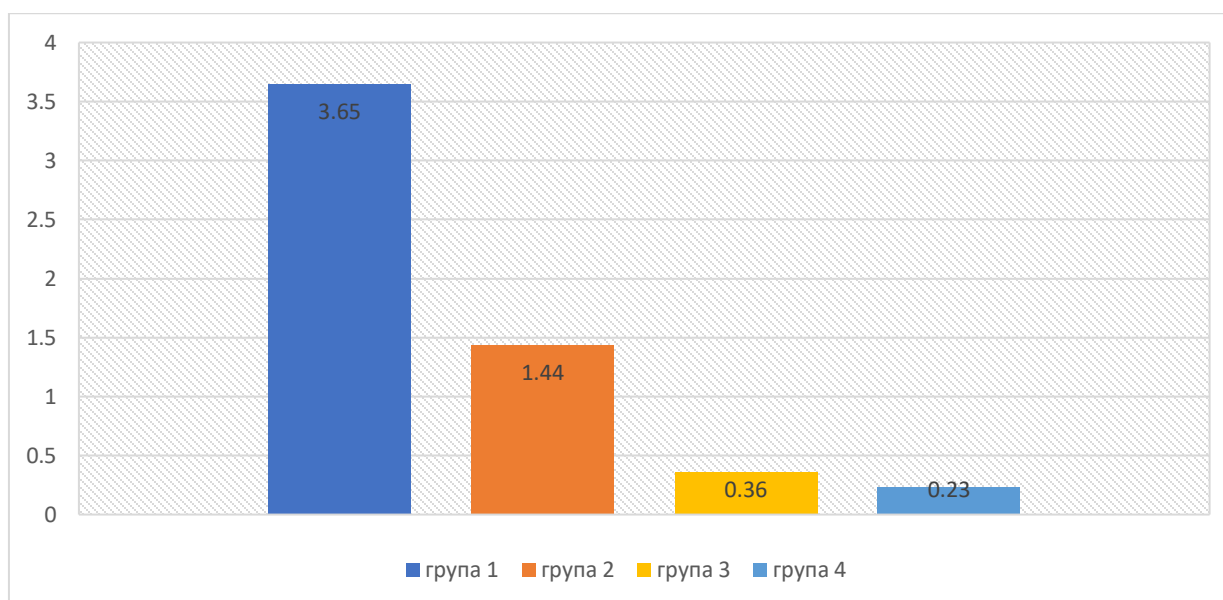
	група 1	група 2	група 3	група 4
изходно	12.8±2.29	12.3±2.03	6.1±0.29	5.9±0.214
1-ва седмица	10.8±1.53	11.5±1.64	5.6±0.19	5.7±0.24
2-ра седмица	6.9±0.26	11±1.53	5.4±0.31	5.5±0.31
3-та седмица	6.6±0.28	11.1±1.04	5.6±0.36	5.3±0.23
4-та седмица	6.4±0.34	11.8±0.76	5.8±0.38	5.7±0.22

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

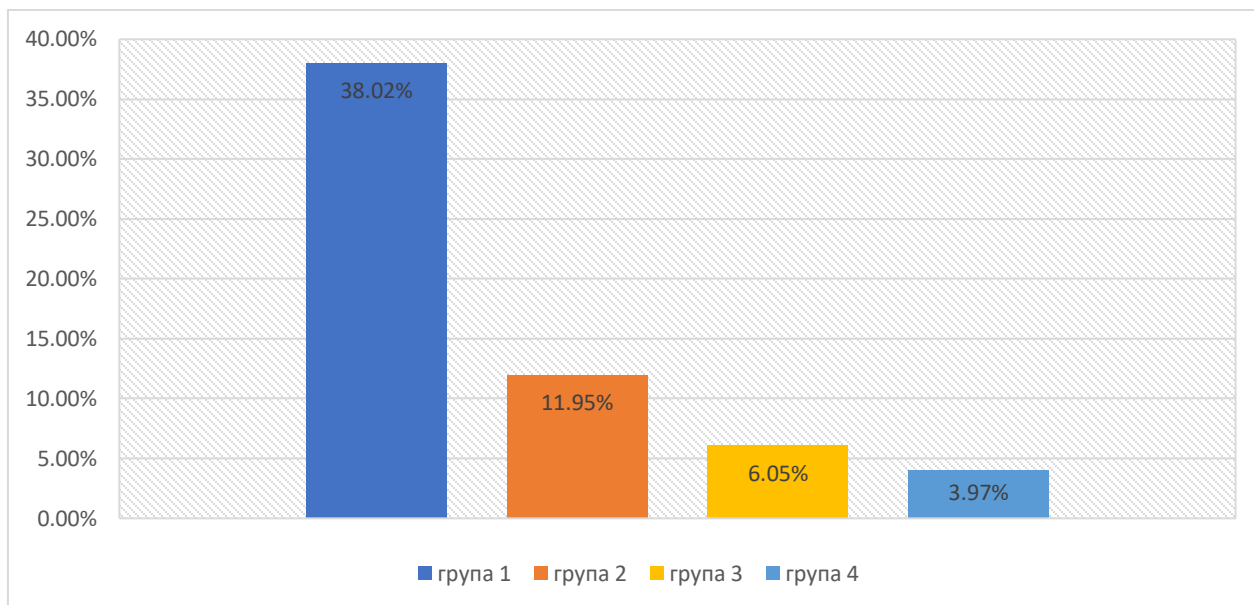


Фигура 10. Средната стойности на кръвната захар в различните групи, измерена в ммол/л, дадено по седмици. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция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

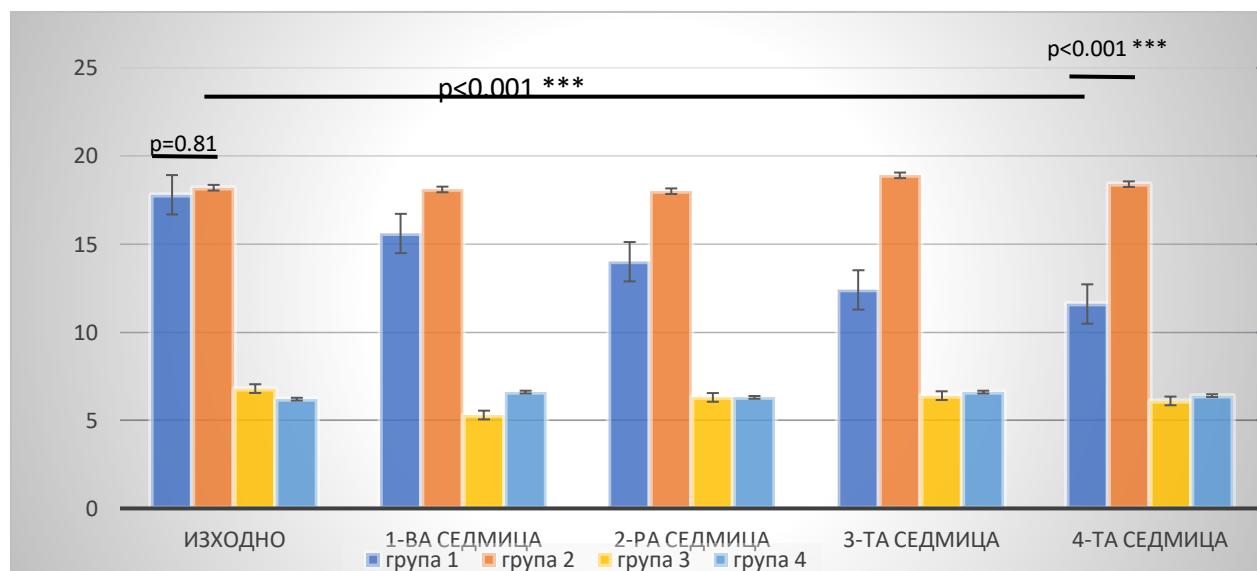
1.3.Ефект върху стойностите на имунореактивен инсулин и инсулинова резистентност, изчислена чрез НОМА - индекс при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)

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 ± 2.49 mIU/мл – изходно до 11.6 ± 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 ± 1.09 , в началото на проучването (което се класифицира като инсулинова резистентност на фона на ЗД) се понижиха до 3.2 ± 0.34 , стойности близки до нормалните нива, които са при здрави контроли (фигура 14).

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

Таблица 10. Средна стойност на ИРИ измери в mIU/ml ± стандартно отклонение (SD).

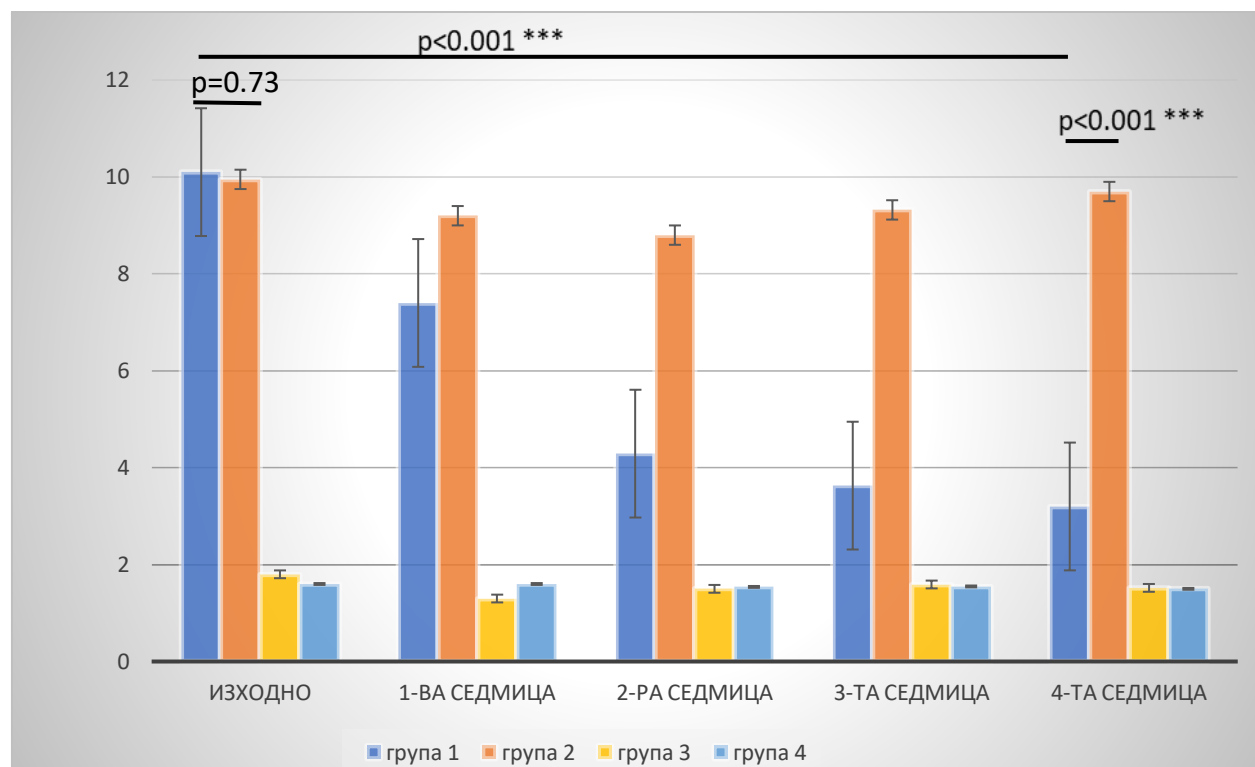


Фигура 13. Средна стойност на имунореактивен инсулин, измерена в mIU/мл, хода на проследяването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна

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

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



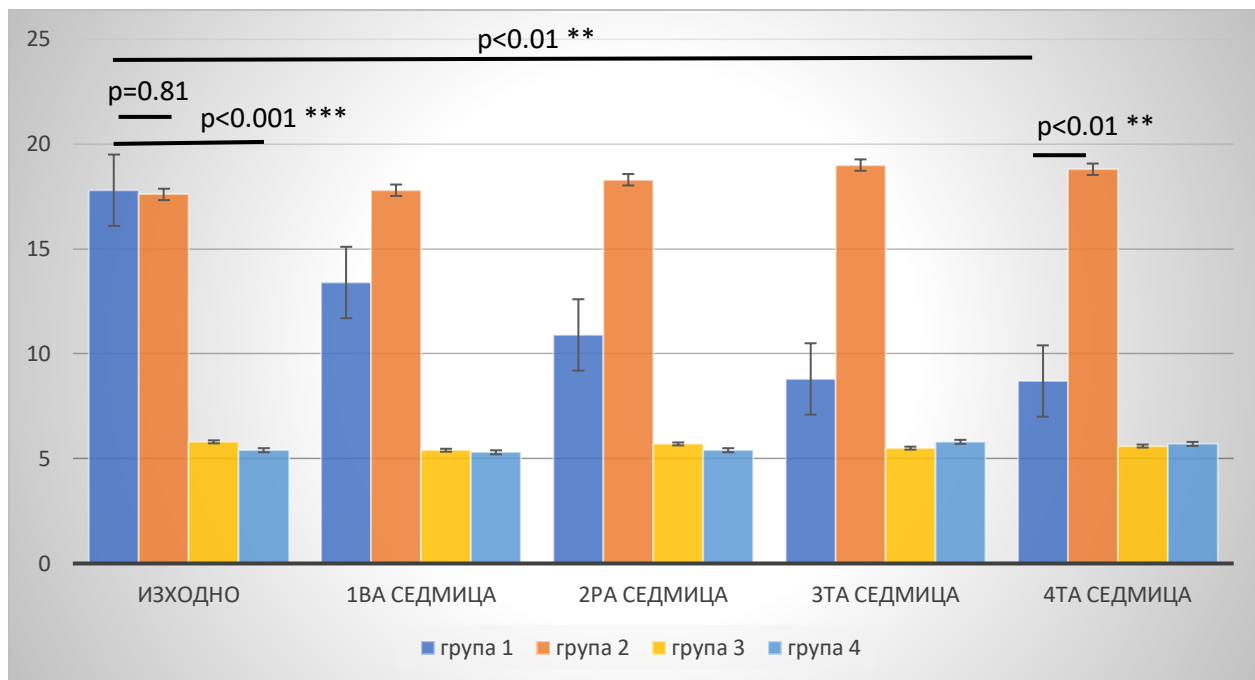
Фигура 14. Средни нива по седмици на НОМА - индекс, по групи, в хода на проследяването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (0.5 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция на LP533401 (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 ± 1.51 нг/мл до 8.7 ± 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 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
Изходно	17.8±1.51	17.6±1.97	5.8±13.7	5.4±1.41
1-ва седмица	13.4±2.28	17.8±1.22	5.4±0.92	5.3±0.76
2-ра седмица	10.9±1.83	18.3±1.14	5.7±1.01	5.4±0.56
3-та седмица	8.8±1.13	19±1.21	5.5±1.03	5.8±0.75
4-та седмица	8.7±0.95	18.8±1.06	5.6±0.66	5.7±0.23

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



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: $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$.

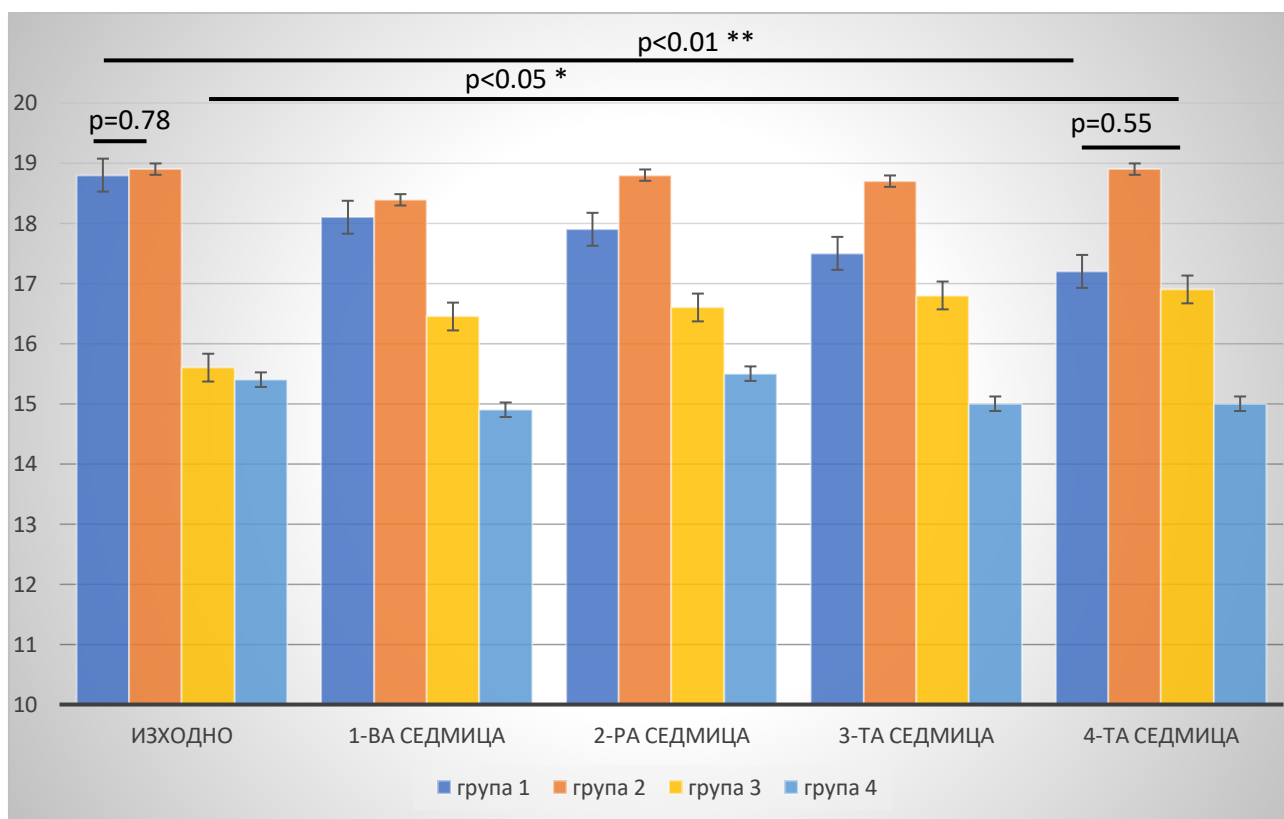
1.5.Ефект върху стойностите на грелин при приложение на периферния серотонинов инхибитор LP533401 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)

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).

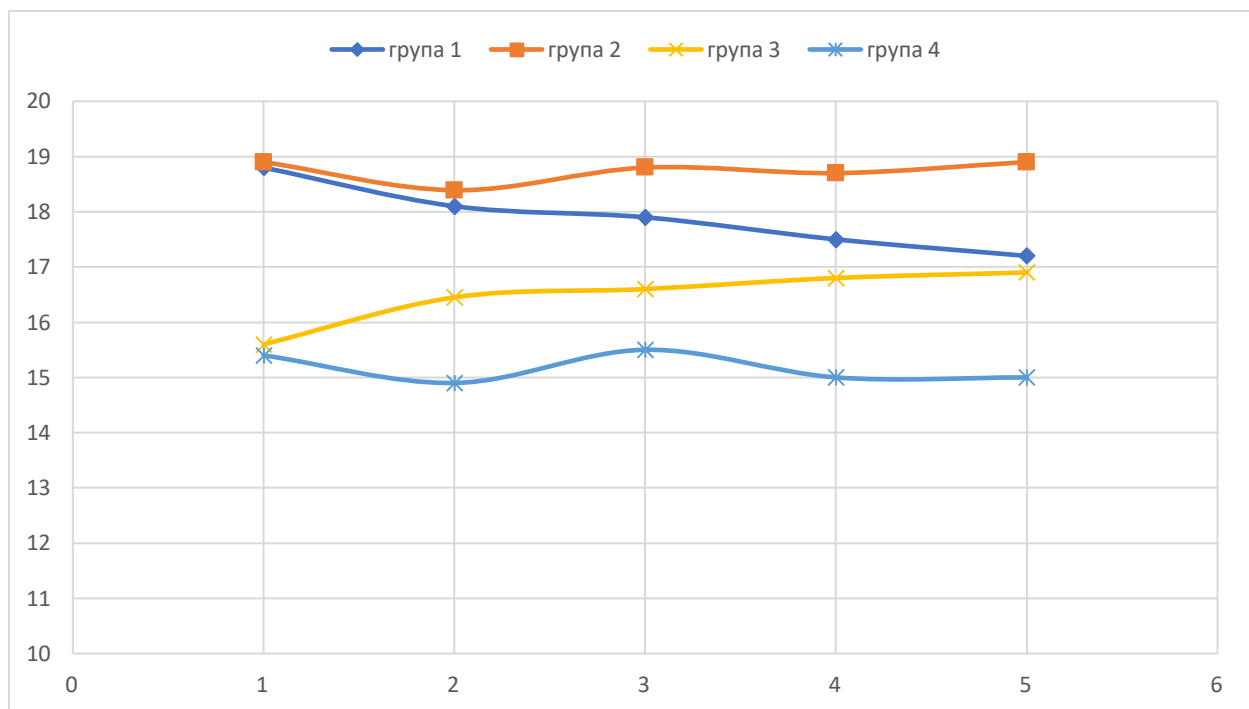
	група 1	група 2	група 3	група 4
Изходно	18.8±1.04	18.9±1.18	15.6±1.61	15.4±1.04
1-ва седмица	18.1±0.79	18.4±1.02	16.5±1.56	14.9±1.01
2-ра седмица	17.9±0.76	18.8±0.96	16.6±1.48	15.5±0.81
3-та седмица	17.5±0.70	18.7±0.62	16.8±1.25	15±0.62
4-та седмица	17.2±0.50	18.9±0.87	16.9±1.51	15±0.67

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



Фигура 16 . Средна стойност на ацетилян 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).

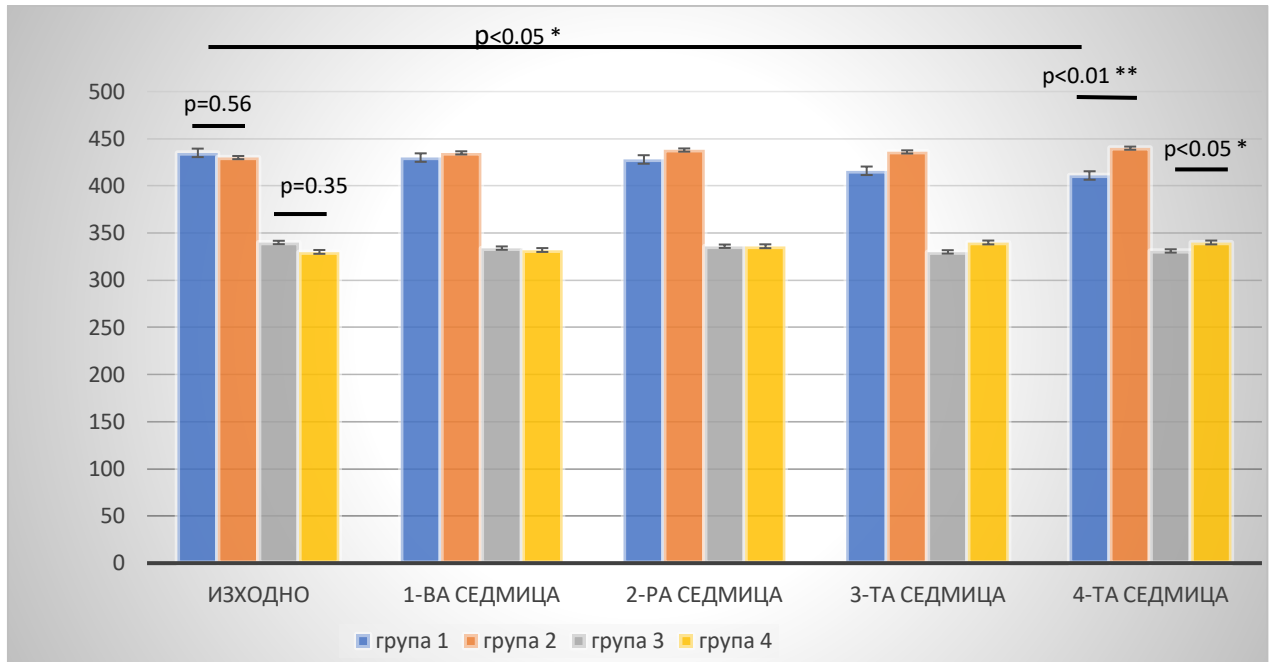
2. Ефект върху телесното тегло, кръвната захар, имунореактивния инсулин, нивото на инсулиновата резистентност при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)

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

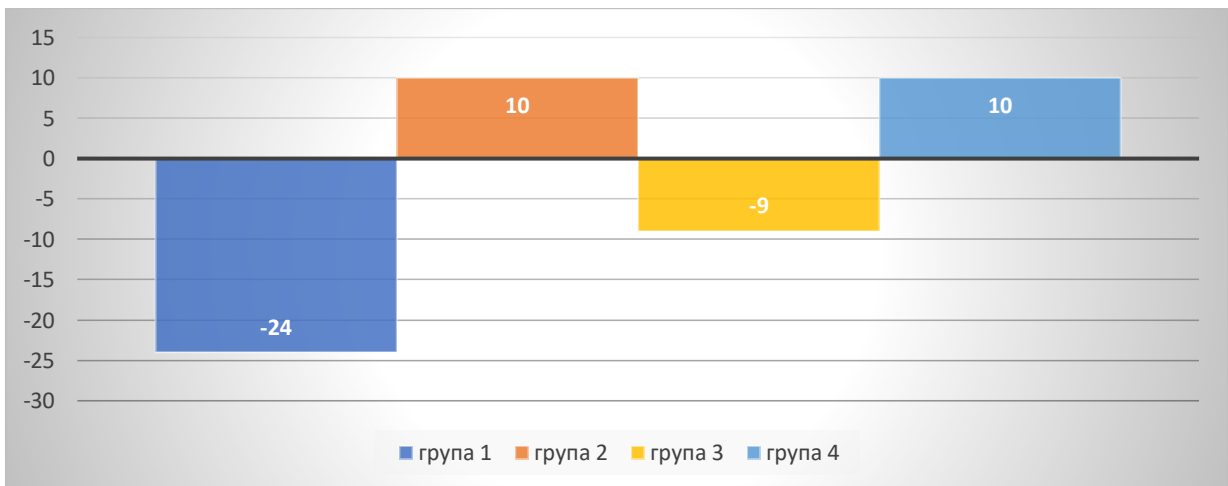
В хода на проведено проучване се проследиха стойности на телесното тегло на опитните животни на седмична база в отделните групи. От проведените измервания се установи сигнификантно намаляване на телесното тегло в групите с ежедневно интраперитонеално приложение на WAY163909 (3 мг/кг). В група 1 – групата 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
изходно	435±20.4	430±17.3	340±24.9	330±22.3
1-ва седмица	439±20.4	435±17.7	334 ± 23.7	332±21.9
2-ра седмица	428±19.1	438±16.3	326±19.2	336±17.6
3-та седмица	416±14.1	436±18.3	330±18.2	340±17.1
4-та седмица	411±12.6	441±15.2	331±7.33	340±6.05

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



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

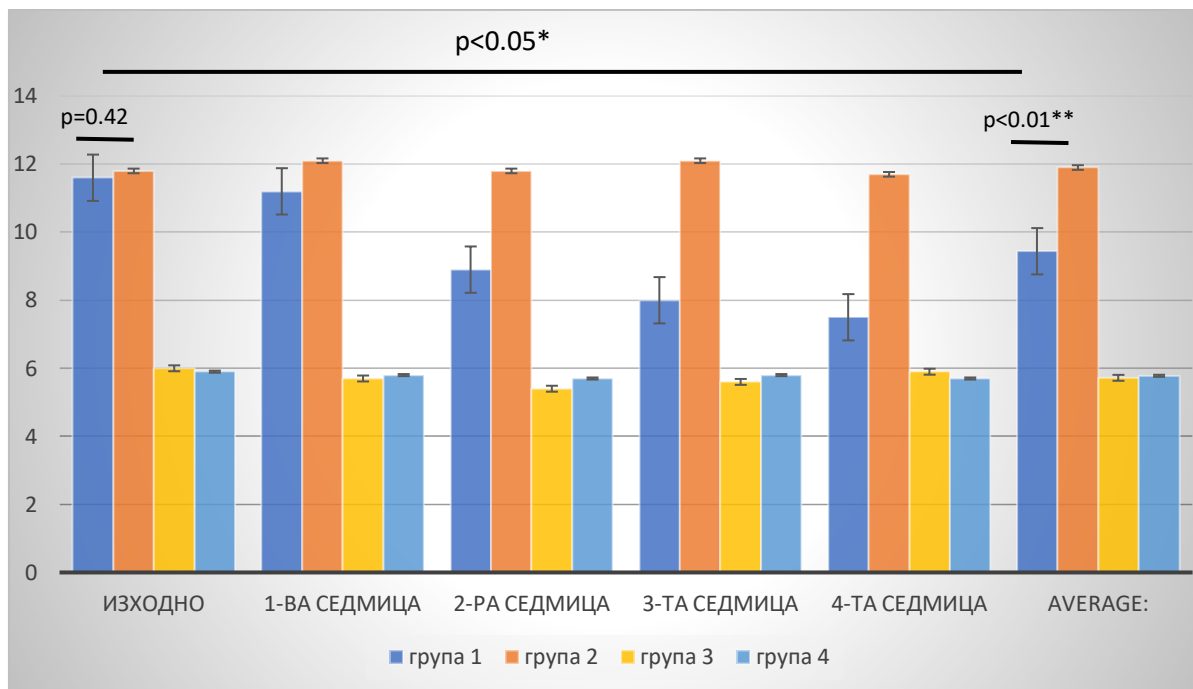
без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 3 – контролна група с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 4 – контролна група без ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг).

2.2. Ефект върху кръвната захар при приложение на селективния централен серотонинов агонист WAY163909 при мъжки плъхове порода Вистар (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 ± 2.24 ммол/л, като понижаването на кръвната захар в края на четири седмичното проследяване е 7.5 ± 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).

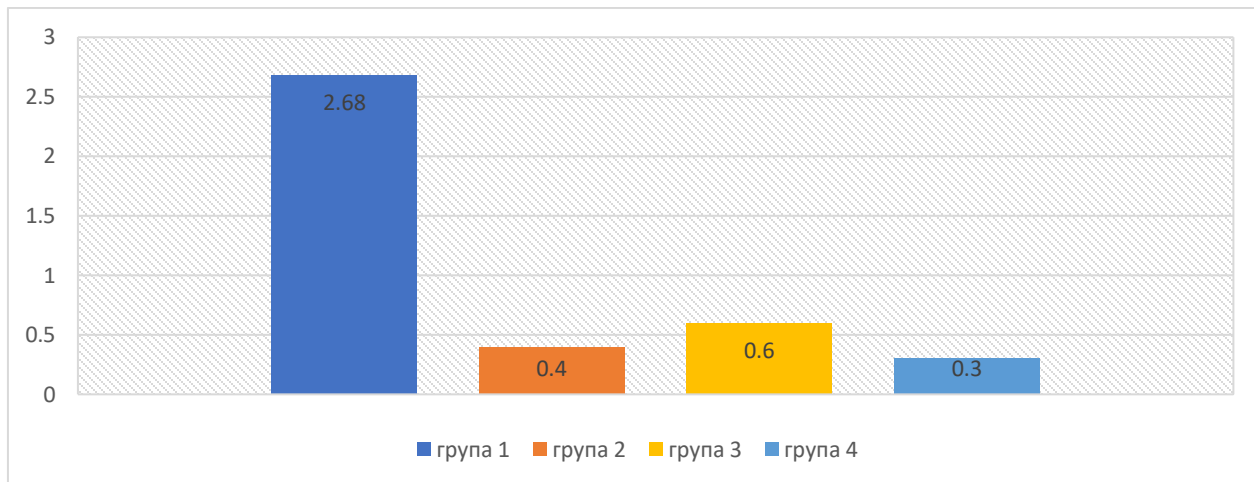
	група 1	група 2	група 3	група 4
Изходно	11.6 ± 2.24	11.8 ± 2.16	6.0 ± 0.46	5.91 ± 0.36
1-ва седмица	11.2 ± 1.98	12.1 ± 2.42	5.7 ± 0.47	5.8 ± 0.42
2-ра седмица	8.9 ± 1.49	11.8 ± 1.76	5.4 ± 0.56	5.7 ± 0.61
3-та седмица	8 ± 1.08	11.7 ± 1.40	5.6 ± 0.80	5.8 ± 0.77
4-та седмица	7.5 ± 0.92	11.9 ± 1.71	5.72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

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

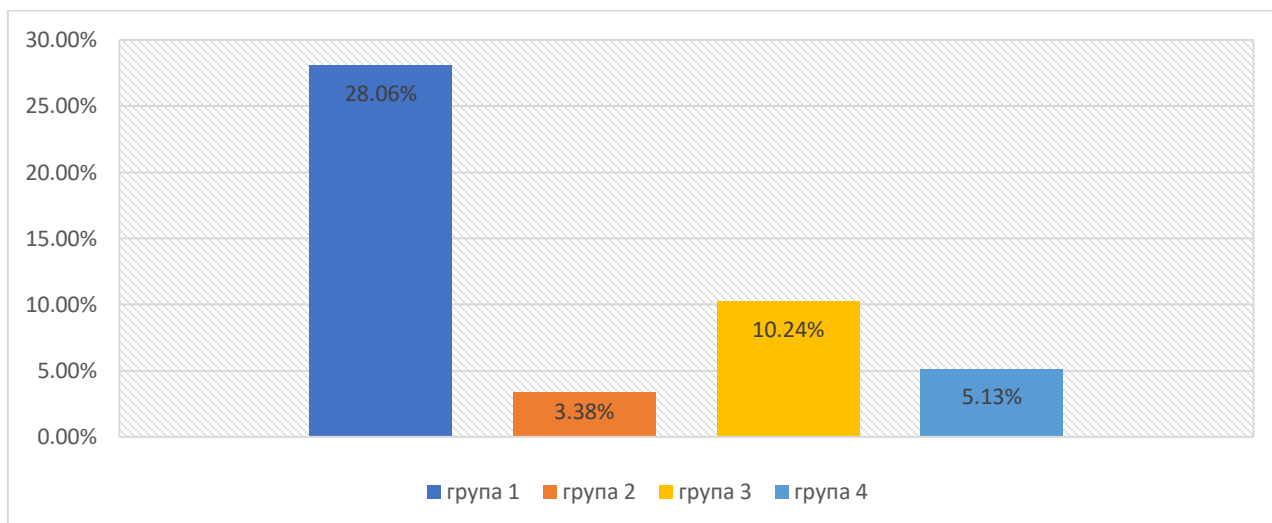


Фигура 20. Средната стойности на кръвна захар в различните групи, измерена в ммол/л, дадено по седмици. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция 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).



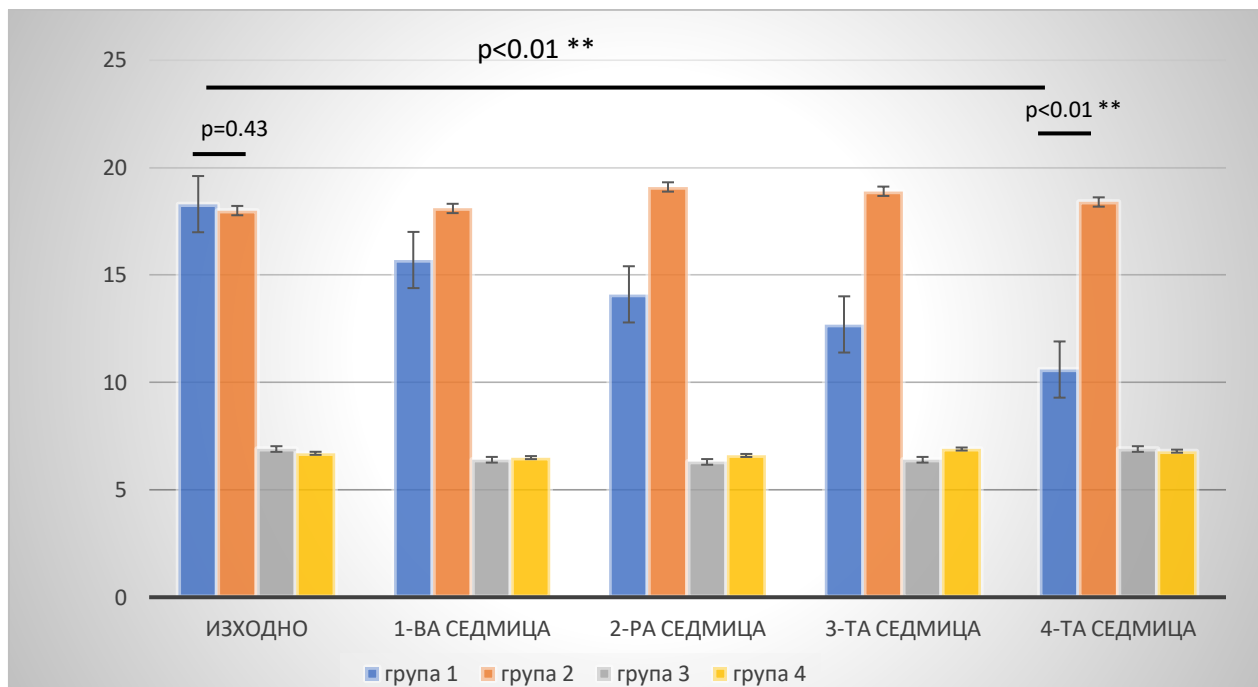
Фигура 22. Коефициент на вариация (CV) на кръвната захар, за отделните групи, за четирите седмици на проучването. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на WAY163909 (3 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална 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 имунореактивения 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 ± 4.1 mIU/мл – изходно до 10.6 ± 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 ± 1.86 - изходно до 3.53 ± 0.37 на четвърта седмица (фигура 24).

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

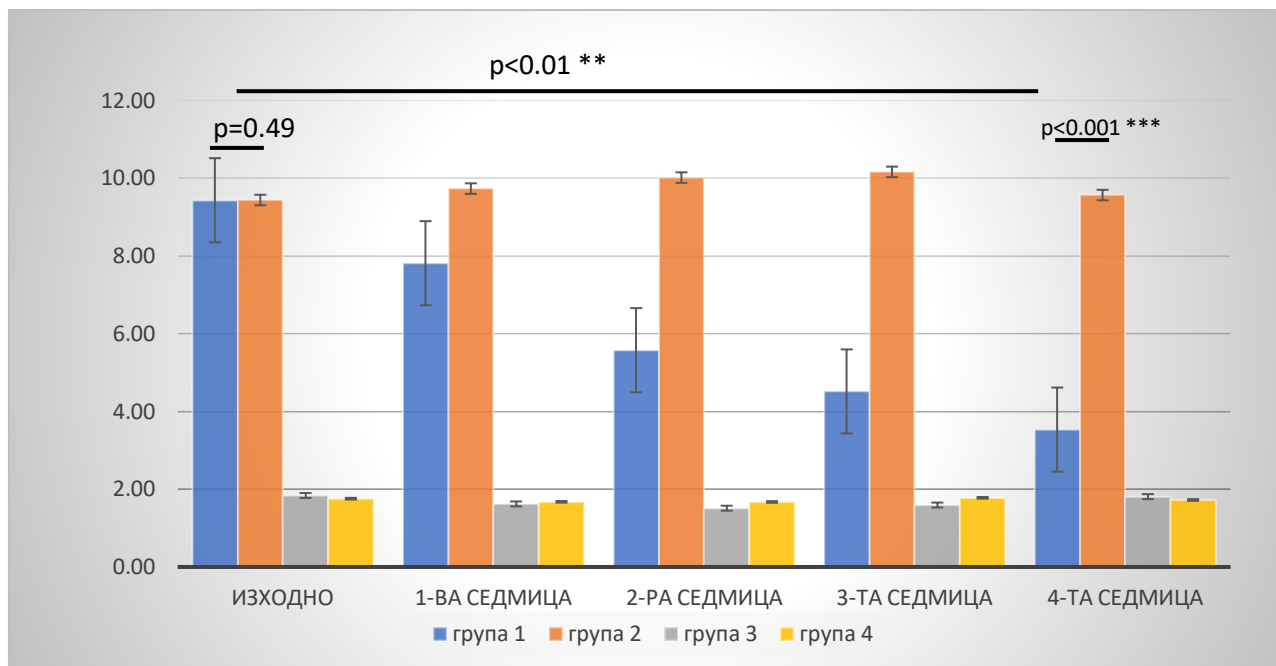
Таблица 22. Средна стойност на ИРИ в mIU/мл \pm стандартно отклонение (SD).



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
Изходно	9.43 ± 1.86	9.44 ± 1.69	1.84 ± 0.33	1.76 ± 0.34
1-ва седмица	7.82 ± 1.23	9.73 ± 1.52	1.62 ± 1.62	1.68 ± 0.24
2-ра седмица	5.58 ± 0.54	10.02 ± 1.43	1.51 ± 0.25	1.67 ± 0.24
3-та седмица	4.58 ± 0.63	10.2 ± 1.07	1.51 ± 0.28	1.67 ± 0.26
4-та седмица	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).



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)

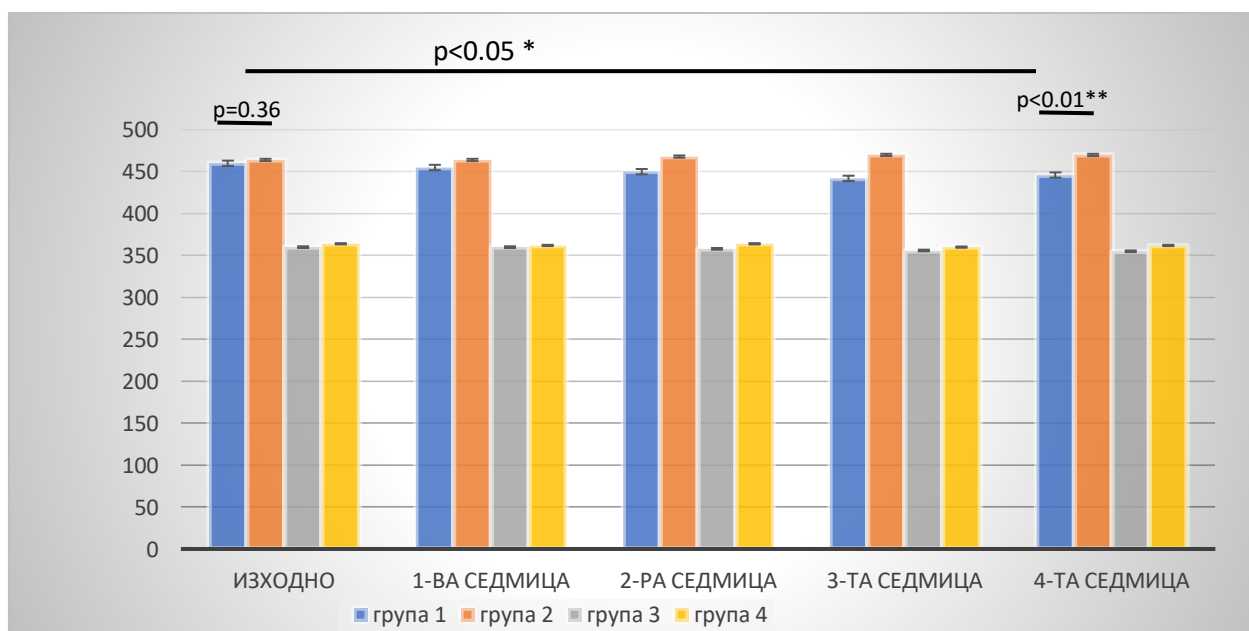
3.1. Ефект върху телесното тегло при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro 60-0175 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)

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 ± 25.9 грама – изходно до 446 ± 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 ± 20.4 грама изходно до 355 ± 7.33 грама на четвърта седмица, което не е статистически значима промяна (фигура 25).

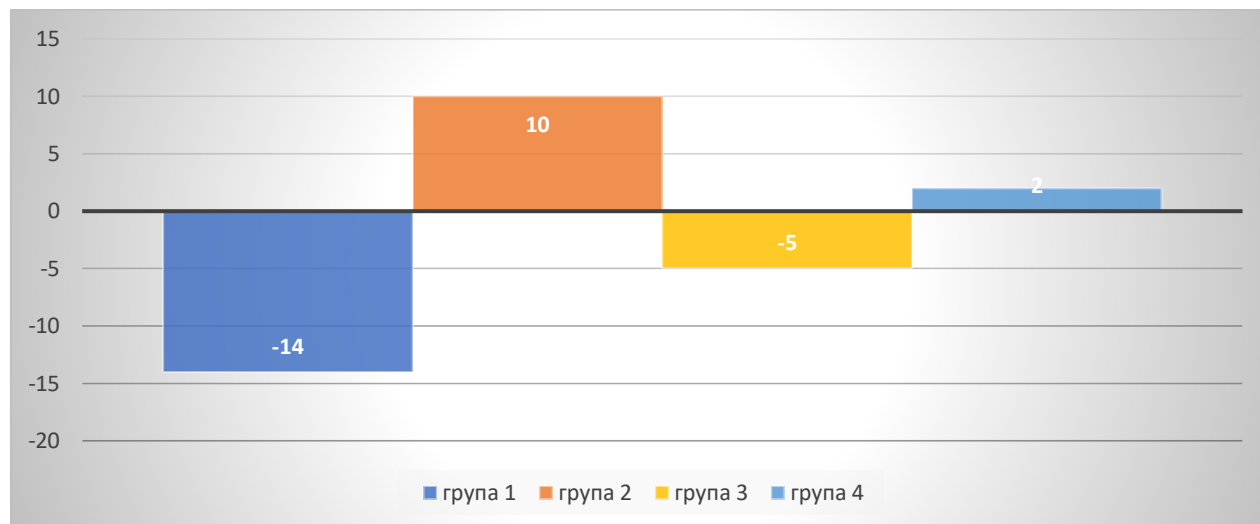
	група 1	група 2	група 3	група 4
изходно	460 ± 25.9	464 ± 26.1	360 ± 20.4	364 ± 23.4
1-ва седмица	455 ± 22.4	464 ± 23.5	360 ± 14.3	362 ± 25.9
2-ра седмица	450 ± 20.6	468 ± 22.2	356 ± 14.1	364 ± 22.0
3-та седмица	442 ± 17.9	470 ± 15.4	356 ± 12.8	360 ± 22.6
4-та седмица	446 ± 14.2	470 ± 16.1	355 ± 7.33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

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



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 седмица 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).

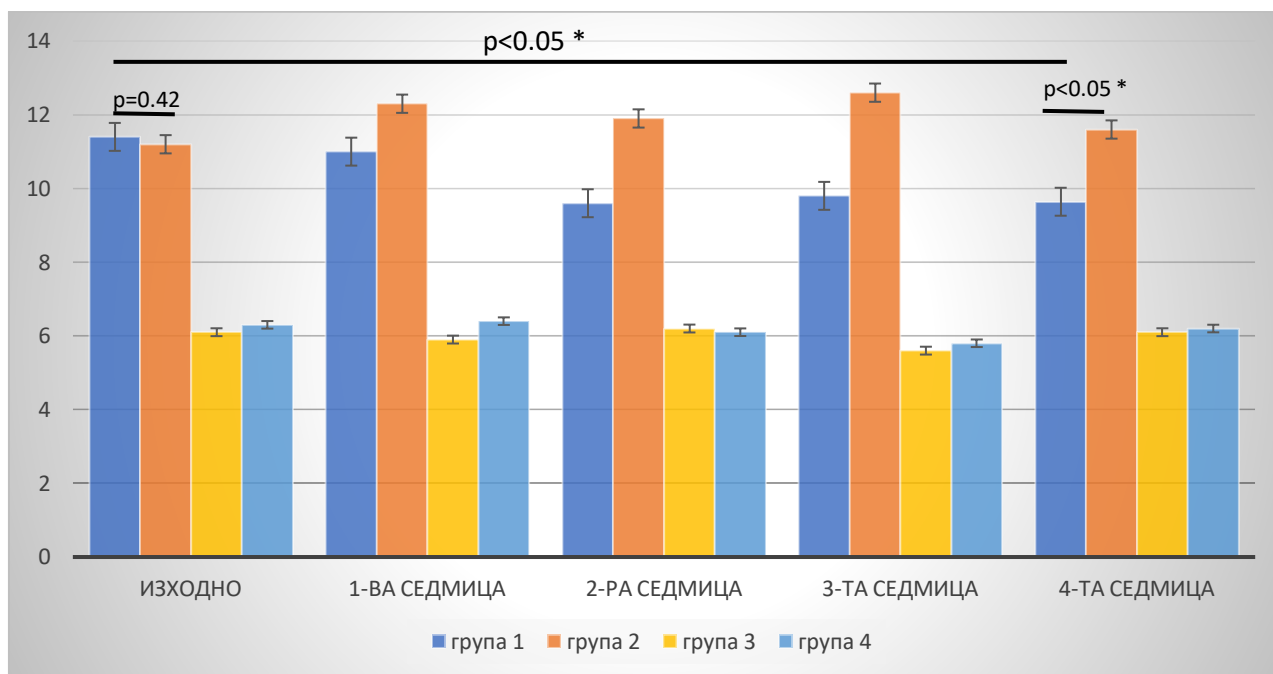
3.2. Ефект върху кръвната захар при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro 60-0175 при мъжки плъхове порода Вистар (Wistar)

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 Ro 60-0175 (1 мг/кг). Средните изходни нива на кръвна захар в група 1 е 11.4 ± 2.74 ммол/л, като понижаването на кръвната захар в края на четири седмично проследяване е до 9.64 ± 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).

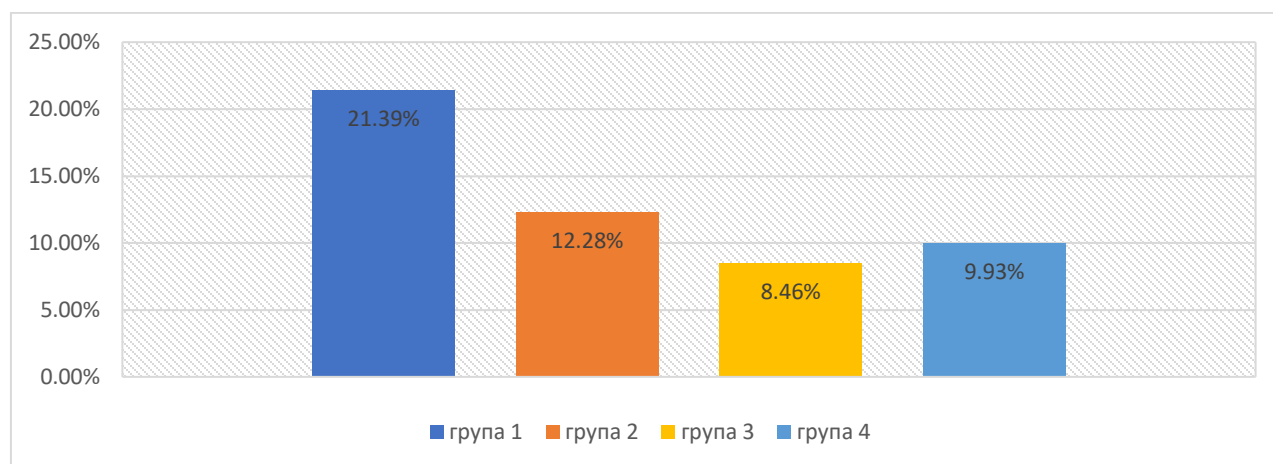
	група 1	група 2	група 3	група 4
изходно	11.4 ± 2.74	11.2 ± 1.96	6.1 ± 0.45	6.3 ± 0.33
1-ва седмица	11.0 ± 2.7	12.3 ± 2.00	5.98 ± 0.42	6.4 ± 0.30
2-ра седмица	9.6 ± 1.49	11.9 ± 1.85	6.2 ± 0.70	6.1 ± 0.58
3-та седмица	9.8 ± 1.86	12.6 ± 1.18	6.8 ± 0.76	5.7 ± 0.49
4-та седмица	9.64 ± 1.22	11.6 ± 1.44	6.1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

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

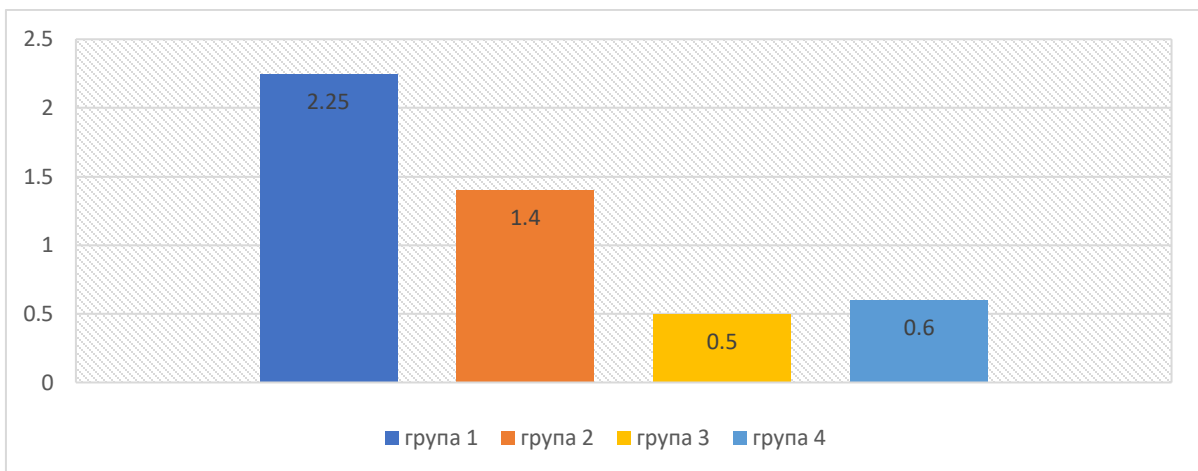


Фигура 27. Средната стойности на кръвна захар в различните групи, измерена в ммол/л, дадено по седмици. Група 1 (n=10) - група със затлъстяване и диабет с ежедневна интраперитонеална инжекция на Ro 60-0175 (1 мг/кг), група 2 (n=10) - група със затлъстяване и диабет без ежедневна интраперитонеална инжекция 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 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 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 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).

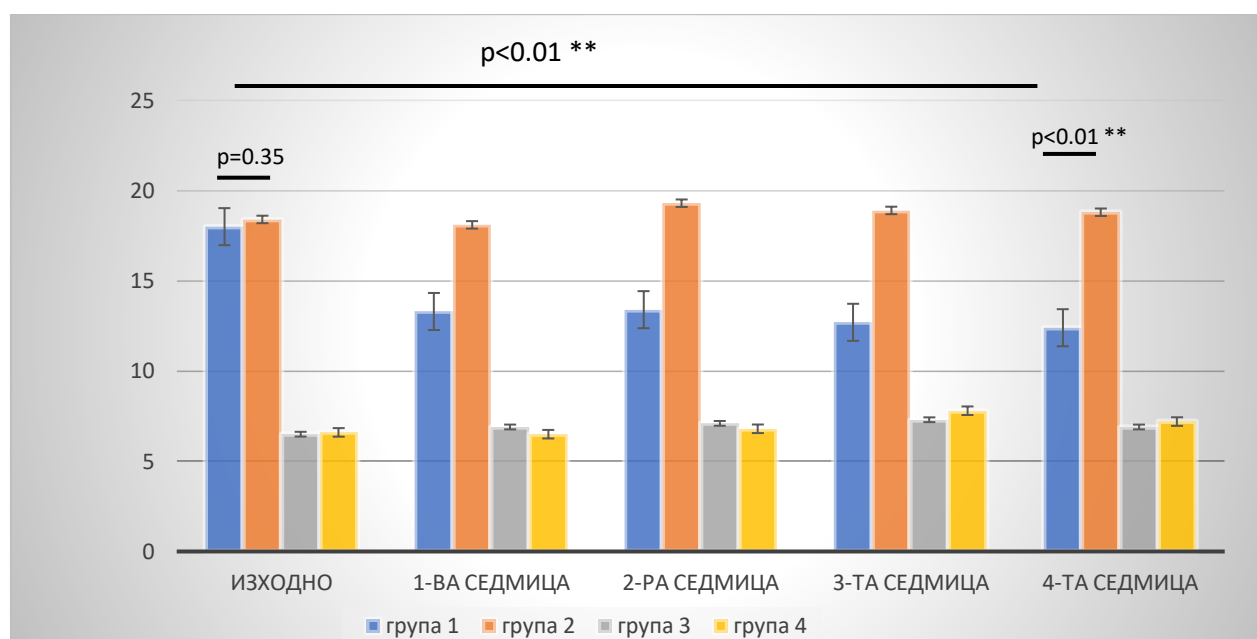
3.3. Ефект върху стойностите на имунореактивен инсулин и инсулинова резистентност, изчислена чрез НОМА- индекс при приложение на селективния централен серотонинов агонист Ro60-0175 при мъжки плъхове порода Висмар (Wistar)

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 ± 2.76 mIU/мл – изходно до 12.4 ± 2.02 mIU/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

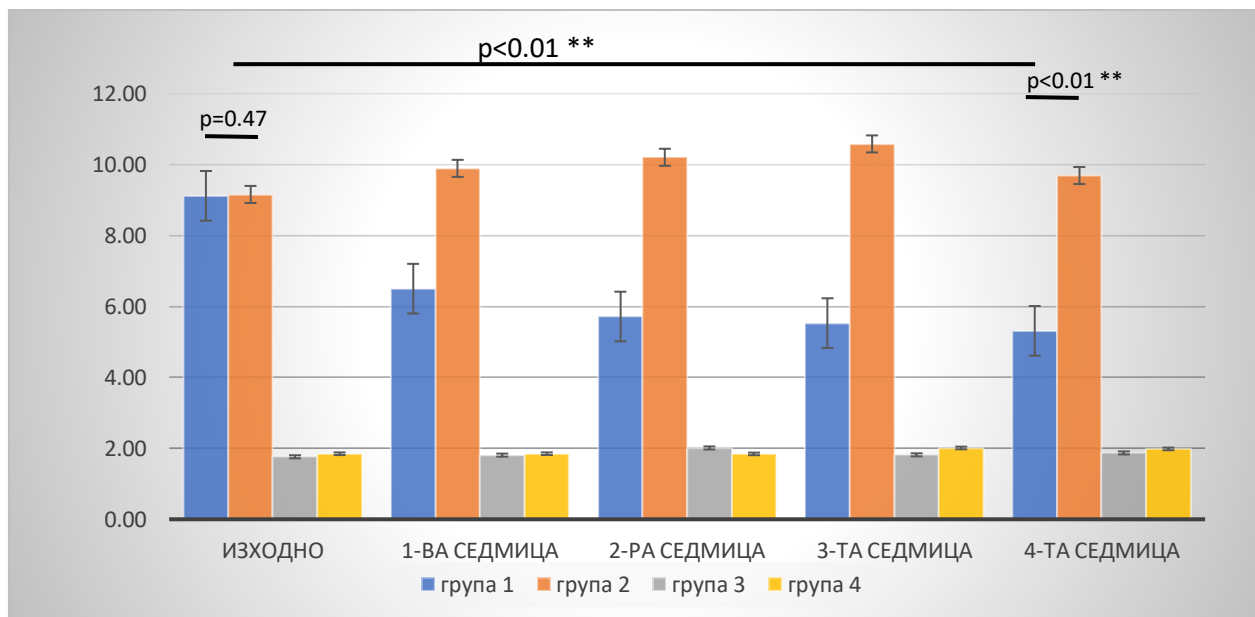
стойности на имунореактивен инсулин, в хода на проследяването. Така стойностите на НОМА - индекс в група 1 достигат нива до 5.31 ± 0.23 на четвърта седмица (фигура 31).

	група 1	група 2	група 3	група 4
Изходно	18.0 ± 2.76	18.4 ± 2.02	6.5 ± 0.75	6.6 ± 0.93
1-ва седмица	13.3 ± 1.47	18.1 ± 2.47	6.9 ± 0.76	6.5 ± 1.13
2-ра седмица	13.4 ± 1.86	19.3 ± 2.17	7.1 ± 0.91	6.8 ± 0.83
3-та седмица	12.7 ± 2.12	18.9 ± 1.68	7.3 ± 1.02	7.8 ± 0.81
4-та седмица	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 \pm стандартно отклонение (SD).



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
изходно	9.2 ± 1.87	9.16 ± 1.56	1.76 ± 0.36	1.85 ± 0.31
1-ва седмица	6.6 ± 1.01	9.89 ± 1.53	1.76 ± 0.34	1.85 ± 0.21
2-ра седмица	5.72 ± 1.23	10.21 ± 1.48	2.01 ± 0.17	1.84 ± 0.23
3-та седмица	5.53 ± 0.88	10.58 ± 1.51	1.82 ± 0.38	2.01 ± 0.26
4-та седмица	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).

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 отключването на различни патологични метаболитни процеси. През последните десетилетия, се доказва важноста на инкретините, лептина, адипонектина, грелина, както и на редица други пептидни молекули от периферията, които участват в сложната 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 4-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 съществения 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 отвърлят 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 понижаване 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 плъхове 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 експерименталните 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-НТ2С 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-НТ2С- рецептора) и Ro 60-0175 (селективен агонист на 5-НТ2В и 5-НТ2С -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, филологичните 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 ацетилян 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 - P533401.

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, 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**, Rumens 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_{2C} receptor agonist, in obese and diabetic Wistar rats, 30th European Congress on Obesity (ECO 2023), 17-20 May 2023 in Dublin, Ireland – accepted abstract

Summary

Role of the serotonergic system in the pharmacological influence of metabolic functions

1. The role of peripheral serotonin in obese and diabetic Wistar rats studied by using of peripheral serotonin inhibitor - LP533401

Background and aims: Although 95% of serotonin is produced in the periphery, its functions have been ignored until now. Recently it became clear that the serotonin system in the periphery regulates multiple physiological aspects independently of the brain-derived serotonin. In particular, peripheral serotonin plays a pivotal function in the regulation of glucose and lipid homeostasis by acting on different organs and cell types. Serotonin produced in pancreatic b- cells promotes insulin secretion and during pregnancy also b-cell proliferation. Serotonin produced in the intestine acts on the liver to promote gluconeogenesis and to suppress hepatic glucose uptake, and on white adipocytes to promote lipolysis and to suppress glucose uptake, adiponectin production and insulin action. Serotonin produced directly in the adipocytes suppresses thermogenesis and glucose uptake in another functional type of fat-brown adipose tissue. Moreover, serotonin might act directly on muscle to promote glycolysis, and it promotes cytokine production in macrophages. This plethora of actions of peripheral serotonin is being recently unravelled by studies utilizing cell-specific deletion approaches to target specific receptors or rate-limiting enzymes for serotonin synthesis. With our study, we want to see how peripheral serotonin affects hyperglycemia, peripheral insulin resistance and obesity in rats.

Materials and methods: Serotonin is a crucial factor supporting pancreatic b-cell function, using the Tph1 inhibitor - LP533401 (peripheral serotonin inhibitor), in our experiments, aiming to suppress serotonin synthesis in intestinal enterochromaffin cells and in pancreatic b-cells of experimental animals. We used forty Wistar rats separated into 2 groups- rats with obesity and diabetes and healthy rats (control group). Each of these groups was separated in other 2 - one with a daily intraperitoneal injection of LP533401 (0,5 mg/kg) and one without. In 4 weeks period, we were tracking blood glucose levels, insulin secretion and rats' weight. The differences in the mean

values among the groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0,05$) using the SPSS program

Results: It was shown that after the application of LP533401 the weight of the rats in the diabetic and obese group rats decreased by 3,6% ($P<0,01$) In the diabetic and obese rats group in which LP533401 was applied we registered a reduction of hyperglycemia (blood glucose over 7,0 mmol/l) by 50,0% ($P<0.001$), comparing the results before the start of using LP533401 and 53,6% ($P<0,001$) comparing with diabetic and obese rats group in which we were not using LP533401. The research also shows decreasing in insulin resistance by 34,8 % ($P<0,01$), the levels of ghrelin decreased by 12,2% and leptin levels decreased by 54,1% ($P<0,01$) in diabetic and obese rats group using LP533401 comparing with the results at the beginning of the study.

Conclusion: Using LP533401 inhibitor for the treatment of obesity and obesity-induced diabetes in male Wistar rats, LP533401 can significantly reduce hyperglycemia, peripheral insulin resistance, and levels of ghrelin and leptin and further reducing body weight not only in the obese and diabetic rats group but also in the control group.

2. The role of serotonin in the central nervous system in obese and diabetic Wistar rats studied by using central brain serotonin inhibitors - WAY-163909 and Ro 60-0175

Background and aims: Obesity can be caused because of reduction in energy expenditure and /or increased caloric intake. Total calorie intake has increased in recent decades and studies on eating behaviour have reported increased intake of foods rich in fats and sugars. Many regulatory pathways for food intake, including those that use serotonin as a neurotransmitter, are affected by obesity or by hypercaloric diets. Summarizing the data known so far, it can be said that reduced serotonergic signalling and low availability of SERT are associated with hyperphagia and obesity. . Because of these facts, it is important to know brain serotonin mediation affects hyperglycemia, peripheral insulin resistance and obesity in rats models.

Materials and methods: WAY-163909 is a novel 5-hydroxytryptamine (HT)(2C) (serotonin) receptor-selective agonist that we used in our study. We used forty Wistar rats separated into 2 groups- rats with obesity and diabetes and healthy rats (control group). Each of these groups was

separated into other 2 - one with h daily intraperitoneal injection (i.p.) of WAY-163909 (3 mg/kg) and one without. In 4 weeks period, we were tracking blood glucose levels, insulin secretion and rats' weight. The differences in the mean values among the groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0.05$) using the SPSS program.

Results: It was shown that after the application of WAY-163909, the weight of the rats in diabetic and obese group rats decreased by 5,5 % ($p<0,05$), and by 2,56% in the control group using the agent. In the diabetic and obese rats group in which WAY-163909 was applied, we registered a reduction of hyperglycemia (blood glucose over 7,0 mmol/l) by 35,4% ($P<0,05$) comparing the results before the start of using WAY-163909, which is greater in the rats which reduce more body weight. The research also shows decreasing in insulin resistance by 42,1 % ($P<0,01$) in the diabetic and obese rats group using WAY-163909.

Conclusion: Using WAY-163909 for the treatment of obesity and obesity-induced diabetes in male Wistar rats, WAY-163909 significantly reduces body weight hyperglycemia and peripheral insulin resistance. In the study was registered reducing of body weight not only in the obese and diabetic rats group but also in the control group.

Materials and methods: Ro60-0175 is a selective serotonin agonist in the central nervous system that we used in our study. Forty Wistar rats separate into 2 groups- rats with obesity and diabetes and healthy rats (control group). Each of these groups was separated in other 2 - one with a daily intraperitoneal injection (i.p.) of Ro60-0175 (1 mg/kg) and one without. In 4 weeks, we were tracking blood glucose levels, insulin secretion and rats' weight.

Results: It was shown that after the application of Ro60-0175, the weight of the rats in the diabetic and obese group decreased by 5.5% ($p<0.05$), and by 2.56% in the control group and no significant dynamic in the groups without daily intraperitoneal injection of Ro60-0175. In the diabetic and obese rats group in which Ro60-0175 was applied, we registered a reduction of hyperglycemia by 35.4% ($p<0.05$) comparing the results before the start of using Ro60-0175, which is greater in the rats which reduce more body weight. The research also shows decreasing in insulin resistance by 42.1 % ($P<0.01$) in diabetic and obese rats group using Ro60-0175

Conclusion: Using Ro60-0175 for the treatment of obesity and obesity-induced diabetes in male Wistar rats, Ro60-0175 significantly reduces body weight and hyperglycemia and peripheral insulin resistance.

Investing in serotonin mediation through the prism of metabolic disorders is a topic that will be relevant in the next years. Accumulated numerous pieces of evidence about the biochemical, physiological and pathophysiological processes in which serotonin mediation is involved are a main point for the search for new pharmacological agents affecting these processes. In our research, for the first time, we systematically presented the action of brain serotonin mediation, in the context of its importance in metabolic processes. Of course, more detailed research is needed on the action of serotonin, both in the periphery and in the central nervous system, in order to be able to make new classes of medications for the treatment of diabetes, dyslipidemia, obesity and other metabolic disorders.