

*Медицински Университет - София,
Медицински Факултет
Катедра по Фармакология и Токсикология*

д-р Милен Христов Христов

**ЕФЕКТИ НА ЛЕПТИН ВЪРХУ
ТЕРМОРЕГУЛАЦИЯТА НА ПЛЪХОВЕ
В НОРМА И ЗАТЛЪСТЯВАНЕ:
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С
ГАМК_B- ЕРГИЧНИ СРЕДСТВА**

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

СПЕЦИАЛНОСТ: ФАРМАКОЛОГИЯ
(вкл. Фармакокинетика и Химиотерапия)

Научен ръководител
Проф. д-р Красимира Якимова, дм, дмн

София, 2018

1. СЪДЪРЖАНИЕ

1. Съдържание	2
2. Най-често използвани съкращения в текста	5
3. Увод	6
4. Литературен обзор	8
4.1. Характеристика на терморегулацията	9
4.1.1. Терморегулаторни механизми	9
4.1.2. Обща схема на терморегулацията	12
4.1.3. Аферентни пътища за пренасяне на термосетивната информация	13
4.1.4. Роля на преоптичния преден дял на хипоталамуса като терморегулаторен център	18
4.1.5. Еферентни пътища за осъществяване на терморегулаторните отговори	26
4.1.6. Терморегулаторни промени при треска	29
4.2. Физиологична роля на лептин	31
4.2.1. Лептинова сигнална система	33
4.2.2. Ефекти на лептин върху ЦНС	38
4.3. Физиологична роля на ГАМКв-рецепторната функция	43
4.3.1. Роля на ГАМКв-рецепторната функция в регулирането на телесната температура	46
5. Цел и задачи	48
6. Материали и методи	49
6.1. Експериментални животни	49
6.2. Експериментален модел на затлъстяване	49
6.3. Фармакологични средства	50
6.4. Метод за оценка на затлъстяване при плъхове	51
6.5. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) за определяне серумната концентрация на лептин	51

6.6. Мониториране на телесната температура	52
6.7. Регистриране на невроналната (тоничната) активност (firing rate)	53
6.8. Имунохистохимичен метод за определяне на pSTAT3	55
6.9. Статистически методи	56
7. Резултати	57
7.1. <i>In vivo</i> експерименти	57
7.1.1. Ефекти на leptin, baclofen и CGP35348, приложени самостоятелно, върху телесната температура на плъхове с нормална телесна маса	57
7.1.2. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и baclofen върху телесната температура на плъхове с нормална телесна маса	59
7.1.3. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и CGP35348 върху телесната температура на плъхове с нормална телесна маса	60
7.1.4. Получаване на експериментален модел на затлъстяване в плъхове, придружен с хиперлептинемия	61
7.1.5. Ефекти на leptin, baclofen и CGP35348, приложени самостоятелно, върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване	66
7.1.6. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и baclofen върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване	67
7.1.7. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и CGP35348 върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване	68
7.1.8. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на leptin върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване, в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса	69
7.1.9. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на baclofen върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване, в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса	70
7.1.10. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на CGP35348 върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване, в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса	71
7.1.11. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и baclofen върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване, в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса	72

7.1.12. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и CGP35348 върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване, в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса	73
7.2. In vitro експерименти	74
7.2.1. Ефекти на leptin върху невроналната активност на неврони от PO/АН на плъхове с нормална телесна маса	74
7.2.2. Ефекти на leptin, baclofen и CGP35348, приложени самостоятелно и в комбинация, върху невроналната активност на неврони от PO/АН на плъх с нормална телесна маса	76
7.2.3. Ефекти на leptin върху невроналната активност на неврони от PO/АН на плъхове с експериментален модел на затлъстяване.....	79
7.3. Имунохистохимично изследване на pSTAT3 в PO/АН на плъхове с нормална телесна маса и експериментален модел на затлъстяване.....	81
8. Обсъждане на резултатите.....	86
9. Обобщение.....	100
10. Изводи.....	102
11. Приноси.....	103
12. Списък на публикации и цитирания, свързани с дисертационния труд	104
13. Списък на участия в конгреси и конференции, свързани с дисертационния труд	106
14. Проведени курсове и участия в проекти, свързани с дисертационния труд	108
15. Благодарности.....	109
16. Литературна справка.....	110

2. НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА

На кирилица

ГАМК - γ-аминомаслена киселина

КМТ - кафява мастна тъкан

ЦНС - централна нервна система

На латиница

ACSF - изкуствена гръбначномозъчна течност

AgRP - агути-свързан пептид

ARC - *nucleus arcuatus hypothalami*

CAF - кафетерийна диета (*“cafeteria diet”*)

DMH - дорзомедиален хипоталамус

JAK2 - янус киназа 2

LepRb - дълга изоформа на лептиновия рецептор

LHA - латерален хипоталамус

LPB - латерално парабрахиално ядро

LPBd - дорзална част на латералното парабрахиално ядро

LPBel - външна латерална част на латералното парабрахиално ядро

MC4R - меланокортин-4 рецептор

MnPO - средно преоптично ядро

MPA - медиална преоптична област

NMDA - N-метил-D-аспартат

NPY - неuropeптид Y

PGE2 - простагландин E2

PI3K - фосфатидилинозитол 3-киназа

PO/AH - преоптична област на предния хипоталамус

POMC - проопиомеланокортин

PVN - паравентрикуларно ядро

SOCS-3 - супресор на цитокинната сигнализация 3

STAT3 - сигнален преобразовател и активатор на транскрипцията 3

VMH - вентромедиален хипоталамус

VTA - вентрална тегментална област (*area tegmentalis ventralis*)

3. УВОД

Лептин е адипоцитен хормон, който регулира телесната маса, приема на храна и енергийните разходи. Въпреки добре приетата концепция, че лептин регулира енергийния разход отчасти чрез модулиране на термогенезата, точните механизми на това действие остават ненапълно установени. По-точно не е ясно кои централни невронални пътища регулират термогенните лептинови ефекти. В последното десетилетие се натрупаха значително нови данни относно централните терморегулаторни вериги, което позволи идентифицирането на прицелните за лептин неврони, участващи в симпатиковия контрол на кафявата мастна тъкан. Така се стигна до заключението, че преоптичният преден дял на хипоталамуса (РО/АН) е един от регионите в централната нервна система с най-голяма експресия на функционален лептинов рецептор и основно таргетно място за осъществяване на терморегулаторните ефекти на лептина. Невроните в РО/АН играят ключова пускова роля в реализирането на терморегулаторните ответни реакции в организма. Все още липсват данни как точно лептин повлиява тези неврони и до какви промени води в тях взаимодействието му с невромедиатори, за които се знае, че участват в регулирането на телесната температура. Добре известно е, че междумедиаторните взаимодействия в терморегулаторните пътища имат важно значение за процесите на терморегулация. Проблемът за ролята и ефектите на лептин в организма по време на затлъстяване продължава да бъде актуален. В литературата се откриват сведения за различни аспекти на този проблем най-вече по отношение на хранителното поведение и поддържането на телесната маса, но има необходимост и от проучвания в тази насока по отношение на ефектите на лептин върху терморегулаторните процеси. Въпреки че лептиновата резистентност, която се открива в по-голямата част от индивидите със затлъстяване, е обект на множество проучвания в последните десетилетия, все още няма достатъчно информация за това кои региони в централната нервна система са засегнати от нея. Отговорите на всички тези въпроси биха значително разширили настоящото ни разбиране относно централните пътища и механизми, които регулират енергийната хомеостаза. Освен това те биха насочили и подобрили развитието на безопасни и ефективни интервенции за лечение на затлъстяването и съпътстващите го заболявания.

В настоящия дисертационен труд са проведени *in vivo* и *in vitro* изследвания с лептин и модулатори на ГАМК_B-рецепторната функция у плъхове с нормална телесна

маса, с цел търсене на зависимости между *in vivo* промените в телесната температура и *in vitro* промените в невроналната активност на невроните в РО/АН. Допълнително *in vivo* ефектите на веществата върху телесната температура у плъхове с нормална телесна маса са сравнени с тези, наблюдавани у плъхове с експериментален модел на затлъстяване. Бяха изследвани и ефектите на лептин върху терморегулаторния център у плъхове с модел на затлъстяване, за да се установи дали има промяна в лептиновото действие в условие на затлъстяване с придружена лептинова резистентност.

4. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Литературният обзор включва всички данни, известни до момента на провеждания експеримент и последващите публикации. Предвид постоянно развиващите се познания относно терморегулацията и действието на лептин, някои нови факти могат да останат извън обема на представения обзор.

4.1. Характеристика на терморегулацията

4.1.1. Терморегулаторни механизми

4.1.2. Обща схема на терморегулацията

4.1.3. Аферентни пътища за пренасяне на термосетивната информация

4.1.4. Роля на преоптичния преден дял на хипоталамуса като терморегулаторен център

4.1.5. Еферентни пътища за осъществяване на терморегулаторните отговори

4.1.6. Терморегулаторни промени при треска

4.2. Физиологична роля на лептин

4.2.1. Лептинова сигнална система

4.2.2. Ефекти на лептин върху ЦНС

4.3. Физиологична роля на ГАМК_B-рецепторната функция

4.3.1. Роля на ГАМК_B-рецепторната функция в регулирането на телесната температура

4.1. ХАРАКТЕРИСТИКА НА ТЕРМОРЕГУЛАЦИЯТА

4.1.1. ТЕРМОРЕГУЛАТОРНИ МЕХАНИЗМИ

Температурата в тялото на топлокръвните животни, включително човека, е строго регулирана величина чрез множество от неволеви терморегулаторни отговори като химична и нехимична термогенеза (треперене), кожен вазомоторен тонус, изпотяване, задъхване и пилоерекция. Всички тези физиологични отговори се контролират от централномозъчни механизми с цел да се създаде една благоприятна вътрешна температурна среда, нужна за правилното протичане на различни биохимични реакции. Добре известно е, например, че при повишаване на температурата белтъците променят четвъртичната си структура, проявяват тенденция към агрегация и в крайна сметка губят своите биологични свойства, което води до смърт на клетката. При многоклетъчните организми съществува възможността телесната температура да се поддържа сравнително постоянна независимо от промените в околната среда. В този смисъл организмите се разделят на ектотермни (пойкилотермни) и ендотермни (хомеотермни). При първите телесната температура е сходна с тази на околната среда, докато при вторите тя се регулира в сравнително тесни граници и е независима от околната температура. Ендотермните организми имат по-интензивни метаболитни процеси и произвеждат повече топлина. Поради това те могат да запазват постоянството си на телесната температура, регулирайки производството и отделянето на топлина от тялото. Човешкият организъм спада към ендотермните животни и телесната му температура се поддържа в тесни граници. Нормалната телесна температура при човека е около 37 °С. Това обаче се отнася за сърцевинната температура във вътрешността на тялото.

Поддържането на телесната температура зависи основно от баланса между получаваната и отдаваната от тялото топлинна енергия, т.е. от топлопродукцията и топлоотдаването. Промяната в околната температура основно е свързана с промени в топлоотдаването и са необходими регулаторни механизми, които съответно да го повишат или намалят, а също и да коригират нивото на топлопродукция, за да се възстанови топлинния баланс. От друга страна промяната в метаболитната активност и нивото на физическа активност водят до промяна в топлопродукцията и тогава

механизмите на топлоотделяне трябва съответно също да се променят, за да се запази топлинния баланс. Терморегулационните механизми основно могат да се разделят на две групи- пасивни и активни. Първата група включва механизми на топлообмен, почиващи изцяло на физични принципи, без участие на допълнителни регулаторни механизми. Втората група включва физиологични (неволеви, несъзнателни) и поведенчески (волеви, съзнателни) механизми, които заедно правят физичните механизми на терморегулация повече или по-малко ефективни. Физиологичните механизми на терморегулация включват промени в кръвообращението, които повлияват ефективността на топлообмена, изпотяването и промяна в топлопродукцията. Вазомоторният механизъм или промяната в кожното кръвообращение е един от основните физиологични механизми на терморегулацията. Повишаването на телесната температура води до вазодилатация на артериолите в кожата [Aoki et al., 2006]. Това увеличава кръвния поток през кожата и по този начин се пренася топлина от дълбочина към повърхността на тялото. При охлаждане настъпва вазоконстрикция и това спомага за запазване на топлината в тялото [Thompson et al., 2005]. Чрез настъпилата промяна в кожното кръвообращение не само се повишават възможностите за топлообмен с околната среда, но се осъществява и равномерно разпределение на топлината в целия организъм. Всички енергийни процеси в организма са свързани и с получаване на топлина. Поради това основната обмяна, специфичното динамично действие на храните и мускулната активност повишават топлинното съдържание на организма. Освен тези процеси в организма съществуват специфични механизми на топлопродукция, които са специфични за терморегулацията. Това са така наречената химична и нехимична термогенеза (треперене) [Nakamura et Morrison, 2007]. Химичната термогенеза е свързана със специфичен механизъм на обмяна, съществуващ в кафявата мастна тъкан. При нехимичната термогенеза топлината се получава при специфичен начин на мускулно съкращение, треперене.

Химичната термогенеза се извършва в кафявата мастна тъкан (КМТ) [Nakamura et Nakamura, 2017]. Тази тъкан се намира около големите съдове, по гърба (между лопатките), около вътрешните органи (бъбреците). Кафявата мастна тъкан съдържа голямо количество митохондрии, което говори за засилени окислителни процеси. За разлика от другите тъкани тя съдържа белтъка термогенин. Той изгражда йонно каналче, позволяващо преминаване на H^+ през митохондриалната мембрана. По този начин H^+ заобикаля АТФ-синтазата и получената при окислителните процеси енергия се превръща в топлина, вместо да се съхрани в макроергичните връзки на АТФ. Поради

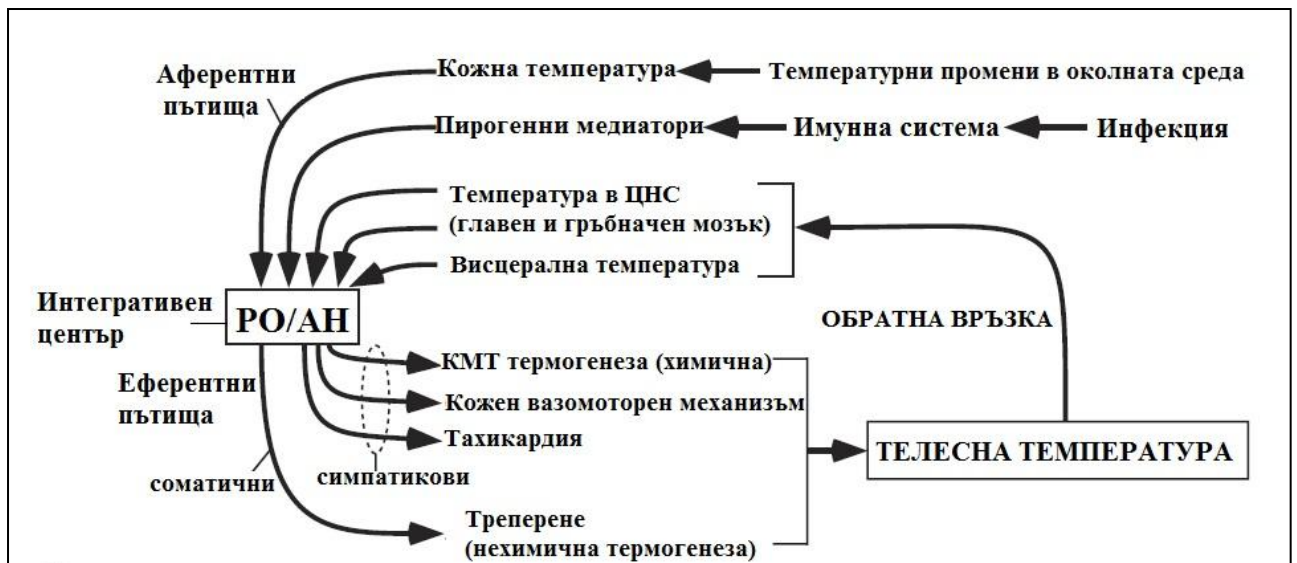
този механизъм на действие термогенинът е известен като разкачващ белтък-1 (uncoupling protein- 1, UCP1). Кафявата мастна тъкан е богато инервирана от симпатиковата нервна система и притежава β_3 -адренорецептори. По този начин тя отговаря с повишено производство на топлина при стимулиране на инервиращите я влакна и увеличаване на адреналина в плазмата [Nakamura et Nakamura, 2017].

Треперенето е основният механизъм за нехимична термогенеза [Kvadsheim et al., 2005]. То представлява некоординирано и неволево съкращение и отпускане на скелетните мускули без извършване на външна работа. При него производството на топлина може да се увеличи почти три пъти. Треперенето намалява ефективността на двигателната активност, въпреки че то може да бъде потиснато при волеви съкращения дори и в мускулите, които не участват пряко в изпълнения на волеви движения.

Поведенческите механизми на терморегулация са съзнателни механизми, включващи смяна на облеклото (топлоизолация), ограничаване а физическата активност (промяна в топлопродукцията), промени в околната среда (климатични инсталации, променящи температурните градиенти тяло- околна среда) и т.н. [Roberts, 1988]. Ефективността на поведенческите механизми е значително по- голяма от физиологичните механизми и благодарение на тях човек може да пребивава в най-неблагоприятни в топлинно отношение условия [Konishi et al., 2007; Gilbert et al., 2007].

4.1.2. ОБЩА СХЕМА НА ТЕРМОРЕГУЛАЦИЯТА

Поддържането на телесната температура се осъществява по принципа на регулация с отрицателна обратна връзка. Както при всяка регулаторна верига и тук са включени: наблюдавана величина със зададена стойност, рецептори, възприемащи съответните промени, регулаторен център, сравняващ зададената с действителната стойност на наблюдаваната величина и ефекторни механизми, водещи до съответни промени в действителната стойност (Фигура 1). Промените в температурата на кожата се възприемат от разположените там терморепцептори, а в централната нервна система има неврони, които са чувствителни към локални промени в температурата. Структурата в мозъка, която е най- тясно свързана с терморегулацията, е преоптичният преден дял на хипоталамуса (РО/АН). Крайният терморегулаторен отговор зависи както от околната температура, така и от сърцевинната температура. В последния случай отговорът е зависим от отклоненията спрямо предварително зададена стойност – в случая нормална телесна температура.



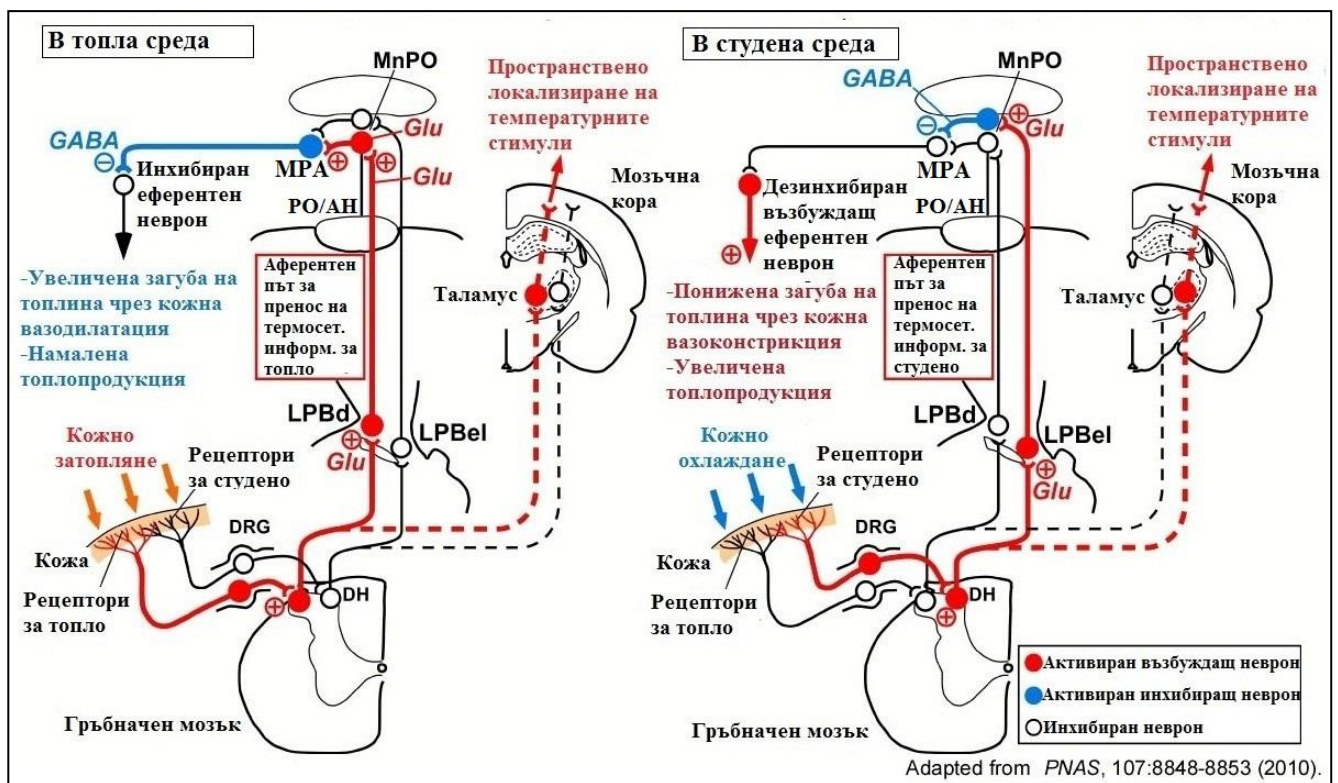
Фигура 1. Обща схема на терморегулаторната система (Модификация по Nakamura, 2011).

4.1.3. АФЕРЕНТНИ ПЪТИЩА ЗА ПРЕНАСЯНЕ НА ТЕРМОСЕТИВНАТА ИНФОРМАЦИЯ

Промените в телесната температура се отчитат от периферни и централни терморекцептори. Периферните рецептори са разположени по кожата и в дълбочина на тялото – най-вече в хранопровода, стомаха, дълбоките интраабдоминални вени. Терморекцепторите спадат към групата на рецептори с преходен рецепторен потенциал и са предимно от ванилоидов, меластатинов и анкиринов подвид. Обхватът на рецепторите е от 10 до 43°C, като температурата извън този обсег се възприема като болка [Caterina, 2007; Patapoutian et al, 2003].

Предаването на информацията от периферните рецептори става по няколко пътя [Nomoto et al., 2004]. Единият, спино-таламо-кортикален път, е свързан със способността за точно пространствено локализиране на температурните стимули от повърхността на тялото. Информацията от периферните терморекцептори, предавани по този път, позволява правилно взаимодействие с околната среда във връзка с нейните топлинни параметри [Hua et al., 2005]. Този път обаче не служи за предаване на термосетивността за целите на неволевите терморегулаторни отговори. Например лезия в таламичните зони, влизаци в състава на спино-таламо-кортикалния път, предотвратява електроенцефалографските отговори в първичната соматосетивна кора, предизвикани от промени в кожната температура, но не повлиява автономните термогенни отговори, предизвикани при охлаждане на кожата [Nakamura et Morrison, 2008]. Дори след премахването на неокортекса, дорзалния хипокамп и по-голямата част от стриатума, изследваните животни запазват способността за увеличаване на метаболитната активност в резултат на кожно охлаждане [Osaka, 2004]. На базата на натрупани експериментални доказателства през 2011 год. Nakamura и Morrison представят съвременен модел на фундаменталните невронални пътища, които регулират симпатиковите и соматичните терморегулаторни отговори, нужни за поддържането на температурната хомеостаза [Morrison et Nakamura, 2011] (Фигура 2). В техните изследвания, комбиниращи методите на ретроградно невронно проследяване и имунохистохимично определяне на c-Fos, успешно се идентифицира спино-парабрахиало-хипоталамичния път като основен аферентен път в предаването на термосетивната информация за целите на терморегулацията [Nakamura et Morrison, 2008; 2010]. Крайните разклонения на този път достигат невроните в хипоталамуса и

по-точно в преоптичната област на предния хипоталамус (PO/АН). В границите на латералното парабрахиално ядро (LPB) се намират отделни популации от неврони, локализирани в два съседни подучастъка, от които чрез директни проекции към PO/АН се медира кожната термосетивност: външен латерален участък (LPBel), съдържащ неврони, които се активират при охлаждане на кожата, и дорзален участък (LPBd) с неврони, активиращи се при затопляне на кожата. С помощта на *in vivo* електрофизиологични изследвания се установи функционалната роля на тези кожни сетивни пътища за топло и студено в осъществяването на терморегулаторния отговор [Morrison et Nakamura, 2011].



Фигура 2. Невронални пътища за пренос на термосетивна информация от кожата до централната нервна система. Пътищата за неволната терморегулация и съзнателното възприемане на температурните стимули са отделни.

DH, Заден рог; **DRG**, Спинален ганглий; **Glu**, Глутамат; **GABA**, γ -аминомаслена киселина; **LPBd**, Дорзална част на латералното парабрахиално ядро; **LPBel**, Външна латерална част на латералното парабрахиално ядро; **MnPO**, Средно преоптично ядро; **MPA**, Медиална преоптична област; **PO/АН**, Преоптична област на предния хипоталамус (Модификация по Nakamura, 2011).

В своите изследвания Nakamura и Morrison работят с анестезирани плъхове, подложени на различни температурни стимули. От техните експериментални резултати става ясно, че охлаждането на кожата води до повишаване на симпатиковата термогенеза в КМТ, увеличаване на треперенето и метаболизма (измерен чрез издишания CO_2), без съществено повлияване на телесната температура (Фигура 2). В допълнение към термогенните и метаболитните реакции, кожното охлаждане довежда до увеличаване на сърдечната честота [Nakamura et Morrison, 2007]. Предполага се, че предизвиканата тахикардия улеснява разпределението на топлината, произведена от термогенните органи, както улеснява доставката на енергийни субстрати за тяхното активиране. Също така повишената сърдечна дейност би допринесла за увеличеното производство на топлина от сърдечната мускулатура (сърдечна термогенеза). Всички тези терморегулаторни отговори, предизвикани в резултат от охлаждането на кожата, са се преустановили от инхибирането на невроните в LPBe1 чрез билатерално локално инжектиране на ГАМК_A- рецепторния агонист muscimol или от блокирането на глутаматергичните рецептори в LPBe1 чрез билатерално инжектиране на антагонистите AP5 и CNQX [Nakamura et Morrison, 2008]. В заключение от експериментите става ясно, че активирането на невроните в LPBe1 от глутаматергични проекции, изхождащи от невроните в задния рог на гръбначния мозък, е нужно за осъществяването на терморегулаторните студозащитни отговори, предизвикани от кожното охлаждане. В подкрепа на това твърдение е установената невъзможност на плъхове с двустранни лезии на LPB да поддържат телесната температура в условие на студена околна среда [Kobayashi et Osaka, 2003]. Както беше посочено по-горе невроните в дорзалния субрегион на LPB се предполага, че участват в предаването на термосетивната информация за топло. Затоплянето на кожата предизвиква кожна вазодилатация, което представлява защитен отговор, увеличаващ кръвния поток на кожата, за да се улесни разсейването на телесната топлина от повърхността на тялото (Фигура 2). Този терморегулаторен отговор се предизвиква най-вече чрез намаляване на кожната симпатикова активност, чиято тоничност регулира кръвния поток на кожата, дори и при термонеутрални условия. Затоплянето на кожата също увеличава и сърдечната честота, като това би спомогнало за по-лесното разсейване на топлината чрез поддържане на сърдечния дебит и артериалното налягане в достатъчна степен, за да се осигури оптимално увеличение на кожния кръвоток [Nakamura et Morrison, 2010]. Подобно на опитите за студ-индуцираните промени, кожната вазодилатация и тахикардия, предизвикани от затоплянето на кожата, се преустановяват при блокиране на

глутаматергичните рецептори в LPBd. Обратно на това, глутаматергичната стимулация на невроните в LPBd предизвиква кожна вазодилатация и тахикардия, водещи до бърз спад в телесната температура. Аналогично на студозащитните термогенни отговори, тези резултати сочат, че активирането на невроните в LPBd от глутаматергични проекции, изхождащи вероятно от невроните в задния рог на гръбначния мозък, е нужно за осъществяването на терморегулаторните топлозащитни отговори, предизвикани от затоплянето на кожата [Nakamura et Morrison, 2010].

Както вече беше посочено крайните разклонения на спино-парабрахиало-хипоталамичния път достигат до преоптичния дял на предния хипоталамус (Фигура 2). В своите проучвания Nakamura и Morrison установяват, че стимулирането на невроните в LPBel чрез наноинжектиране на N-метил-D-аспартат (NMDA) предизвиква термогенни, метаболитни и тахикардни отговори, наподобяващи описаните защитни отговори по време на охлаждане на кожата. Тези LPBel –индуцирани терморегулаторни отговори не са били наблюдавани при блокиране на глутаматергичните рецептори в средното преоптично ядро (MnPO) на PO/АН. Това е дало основание да се предположи, че невроните в LPBel, активиращи се при охлаждане на кожата, изпращат глутаматергични проекции до невроните в MnPO. В подкрепа на това становище е изследването им, при което стимулирането на рецепторите за глутамат в MnPO чрез наноинжектиране на NMDA е предизвикало повишена термогенеза в КМТ, увеличено треперене и метаболизъм, терморегулаторни отговори, наподобяващи тези при излагане кожата на студ. Тъй като подобни стимулации в други подрегиони на PO/АН не предизвикват такива реакции, а невроните в LPBel преобладаващо изпращат аферентни влакна към MnPO, се счита, че MnPO е основен регион на PO/АН, получаващ кожна термосетивна информация за студено от LPBel [Nakamura et Morrison, 2008]. Същата зависимост се наблюдава и между невроните от LPBd и MnPO. Кожната вазодилатация, наблюдаваща се или при стимулирането на невроните в LPBd, или при затопляне на кожата, се преустановява при блокиране на глутаматните рецептори в MnPO [Nakamura et Morrison, 2010]. По същия начин се смята, че невроните от LPBd, активиращи се при затопляне на кожата, изпращат директни глутаматергични аферентни влакна до MnPO и описания LPBd- MnPO термосетивен път е задължителен за осъществяването на защитните терморегулаторни отговори при повишаване на температурата на околната среда. Откритието, че MnPO получава термосетивна информация за студено и топло като глутаматергични проекции, предполага, че термосетивните сигнали за студено и топло, изхождащи от LPBel и

LPBd, съответно, активират отделни популации от неврони в MnPO. В допълнение към кожните термосетивни сигнали, които идват от задния рог на гръбначния мозък, LPB получава масивна висцерална аферентна информация, свързана със стомашното разпъване, ситостта, вкуса, жаждата, кръвното налягане и температурата от *nucleus tractus solitarii* [Geerling et Loewy, 2008; Saper, 2002]. Това предполага, че LPB може да бъде място, където температурните соматосетивни сигнали могат да бъдат модифицирани от сигналите, произхождащи от вътрешните органи, за да се осигури интегриран сигнал към PO/АН, централно място, контролиращо различни хомеостазни функции.

Централните терморекцептори са разположени предимно в преоптичната област на предния хипоталамус, въпреки че могат да се открият и в други области на ретикуларната формация и мозъчния ствол. Те реагират директно на промените в околната им температура и така отчитат пряко сърцевинната температура на тялото, което се използва непосредствено за промяна в терморегулационната активност [Wechselberger et al., 2006]. Съществува съгласуване на информацията между централните и периферните терморекцептори. Информацията от периферните рецептори може да се комбинира с тази от централните и да модифицира терморегулаторните отговори. В общия случай това позволява осъществяването на изпреварваща регулация-терморегулаторните механизми се променят още преди да е настъпила съответната промяна в сърцевинната температура, но тя е предсказана от информацията, получена от периферните рецептори. Предполага се, че информацията от периферните терморекцептори е свързана повече с терморегулация при охлаждане на организма, докато централните терморекцептори имат по-голямо значение при затопяне на тялото [Sakurada et al., 1993].

4.1.4. РОЛЯ НА ПРЕОПТИЧНИЯ ПРЕДЕН ДЯЛ НА ХИПОТАЛАМУСА КАТО ТЕРМОРЕГУЛАТОРЕН ЦЕНТЪР

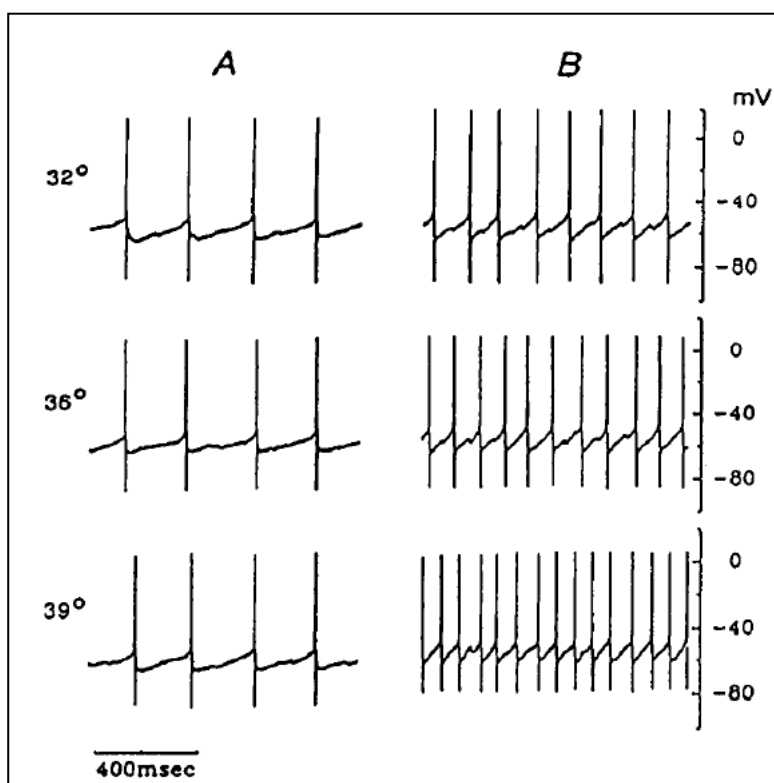
Преоптичният преден дял на хипоталамуса (РО/АН) изпълнява водеща роля в прецизното регулиране на телесната температура. Силно доказателство за значението на този регион в участието на терморегулацията идва от проучвания, включващи директно топлинно стимулиране на определени области от централната нервна система. В едни от най-ранните изследвания върху животни беше установено, че при затопляне на кръвта в *arteria carotis* или промиването на третото мозъчно стомахче със затоплен физиологичен разтвор се постига задъхване и кожна вазодилатация [Hammouda., 1933]. Недостатък на тези ранни проучвания е, че топлинната стимулация не е била толкова прецизно осъществена и добре локализирана.

През 1960 год. предният хипоталамус е бил изследван с помощта на термостимулатор имплантиран в котки [Freeman et al., 1959] и кучета [Hammel et al., 1960]. Термостимулаторът позволява температурата да бъде променена в дискретна част от хипоталамуса. Охлаждането на преоптичната област води до треперене и нарастване на топлинната продукция [Hellstrom et al., 1967; Jacobson et al., 1970] чрез индуциране на химична термогенеза, увеличаваща метаболитната активност в кафявата мастна тъкан, и чрез повишаване плазмените нива на хормоните: тироксин [Evans et al., 1974], катехоламини и глюкокортикоиди [Gale et al., 1970]. В допълнение преоптичното охлаждане води до задръжка на топлина чрез кожна вазоконстрикция и различни поведенчески прояви [Boulant et al., 1977; Adair., 1977]. Противоположно на това, преоптичното затопляне предизвиква кожна вазодилатация, задъхване, изпотяване и различни поведенчески отговори, водещи до загуба на топлина [Kanosue et al., 1994; 1994].

Още през 1960 год. в електрофизиологичните си експерименти Nakayama и сътрудници описват термосетивните качества на невроните от преоптичния преден дял на хипоталамуса. Идентифицирани са били две групи неврони в резултат на активността им към промяната в локалната температурата на хипоталамуса. За тази цел е била измерена честотата на акционните потенциали (firing rate), която представлява броят импулси за секунда [Boulant et al., 2010]. Едната група неврони са наречени температуронечувствителни, защото показват много малка или не показват зависима от температурата промяна в активността им. Вторите по брой неврони в РО/АН са

класифицирани като топлочувствителни, поради способността им да променят своята активност в резултат на локални температурни промени. За разлика от температуронечувствителните по-голямата част от топлочувствителните неврони се повлияват от промени в кожната и гръбначномозъчната температура. На фигура 3 са показани вътреклетъчно записани акционни потенциали на описаните неврони поставени в 3 различни температурни условия [Griffin et al., 1996]. Температуронечувствителният неврон (фигура 3А) има същата честота на акционните потенциали в ниски (32°C), неутрални (36°C) и високи (39°C) температурни условия, докато в топлочувствителния неврон (фигура 3В) честотата на акционните потенциали намалява по време на охлаждане и се увеличава по време на затопляне.

В най-ранните изследвания върху терморегулацията са се използвали микроелектроди, за да се запише активността на невроните от хипоталамус на анестезирани и неанестезирани животни с помощта на имплантирани термостимулатори, променящи локалната температура. През 1980 год. подобни електрофизиологични записи са се извършвали *in vitro* в хипоталамични тъканни срезове [Dean et al., 1989; Kelso et al., 1982; Kelso et Boulant, 1982]. Тези срезове, с дебелина 350 µm, са били поддържани витални в инкубационни камери чрез постоянно перфузиране с изкуствена, наситена с кислород, гръбначномозъчна течност. Активността на невроните, показана на фигура 3, е записана от преоптични тъканни срезове на плъх. Въпреки различните типове изследвания (*in vivo* и *in vitro*) съотношението между отделните групи неврони се е запазило [Boulant et Dean, 1986].



Фигура 3. *In vitro* изследване, показващо температурните ефекти върху активността на (А) температуронечувствителен неврон и (В) топлочувствителен неврон. Записите са направени вътреклетъчно от преоптични тъканни срезове на плъх. Двата типа неврони проявяват спонтанни акционни потенциали. Вижда се, че затоплянето увеличава честотата на акционните потенциали в топлочувствителните неврони (Модификация по Boulant, 2000).

Моделът на фигура 4 демонстрира основните типове неврони, локализирани в РО/АН, класифицирани на базата на тяхната активност спрямо промяната на локалната температура в хипоталамуса [Boulant et al., 2010; Pierau et al., 1998]. Топлочувствителните неврони (отбелязани с W) представляват 30% от цялата невронна популация. Те показват значително увеличение в честотата на акционните потенциали при нарастване на температурата в преоптичния дял (Тро). Посредством синаптични връзки с някои ефекторни неврони, преоптичните топлочувствителни неврони успяват да контролират загубата на топлина. Тази загуба се увеличава пропорционално при увеличаването на Тро.

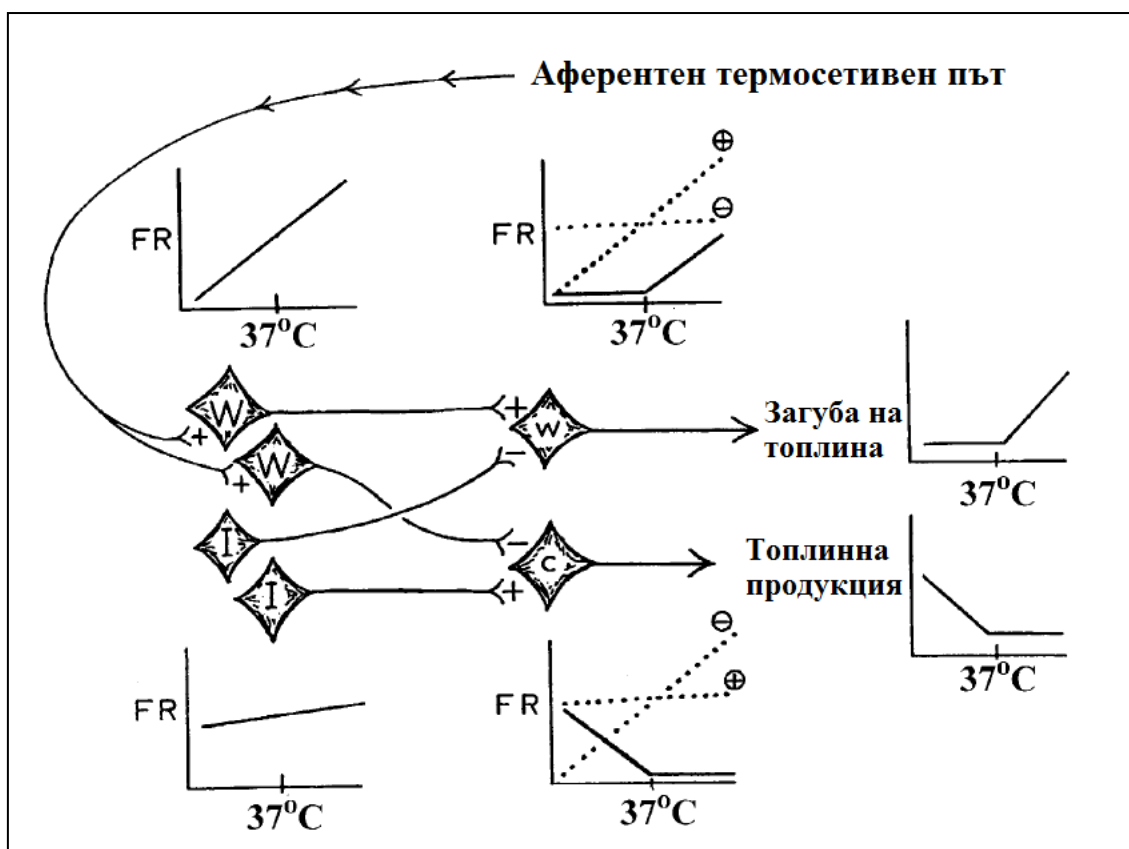
Много малка част (по-малко от 5%) от преоптичните неврони са класифицирани като студочувствителни (отбелязани като С на фигура 4). Не е учудващо, че

студочувствителните неврони са по-малко от топлочувствителните, тъй като поведението при топло и студено не е симетрично. Нормалната телесна температура е само на няколко градуса от горната граница на поносимост и значително поотдалечена от долната. Не трябва също да се забравя, че човекът е ендотермен организъм и сам произвежда необходимата за поддържане на телесната температура топлина. Поради това терморегулаторните механизми на централно ниво зависят предимно от информацията, получена от топлочувствителните неврони. Всъщност много проучвания показват, че студочувствителните неврони не са с вродена студочувствителност. Предполага се, че те получават инхибиращо влияние от близко разположените топлочувствителни неврони. По време на охлаждане в преоптичната област, топлочувствителните неврони намаляват активността си, като по този начин намаляват своето инхибиращо влияние върху студочувствителните неврони, които от своя страна, увеличават активността си. Подобни отговори се наблюдават когато продукцията и задръжката на топлина възникват в резултат на спадане на температурата в хипоталамуса под зададената стойност. Поради тази причина се смята, че студочувствителните неврони са ефекторни неврони, контролиращи тези терморегулаторни отговори. Някои от изследователите в тази област имат противоречиви мнения и повдигат въпроса за важноста на студочувствителните неврони. Например според Kanasue и сътрудници [Kanosue et al., 1994; 1994] топлочувствителните неврони са преобладаващата част от ефекторни неврони, които контролират различните терморегулаторни отговори.

Най-голямата част от преоптичните неврони (повече от 60%) са температуронечувствителни (отбелязани с I на фигура 5), като характерно за тях е, че не показват или показват много малка активност при промяна на температурата в хипоталамуса. Повечето местни възбудни и инхибиторни синапси в РО/АН произхождат от температуронечувствителните неврони. Безспорно е мнението, че тези неврони изпълняват разнообразни функции, свързани или несвързани с терморегулацията. Както се вижда от фигура 4, една от терморегулаторните функции на тези неврони е осигуряването на тоничен контрол върху студочувствителните неврони. В този смисъл студочувствителните неврони се явяват като интерневрони, които сравняват задръжните потенциали, изхождащи от топлочувствителните неврони и възбудните потенциали, изхождащи от температуронечувствителни неврони. Допуска се, че по подобен начин някои топлочувствителни неврони изпълняват ролята на интерневрони, приемащи възбудни синаптични връзки от вродените

топлочувствителни неврони и инхибиращи синаптични връзки от температуронечувствителните неврони (фигура 4) [Boulant et al., 2010; Pierau et al., 1998].

Важен модел на невроните в РО/АН е развит от Hammel, който предполага, че сравняването на възбудните и инхибиторните потенциали изхождащи от топлочувствителните и температуронечувствителните неврони, стои в основата на разбирането за температурната зададена стойност (set point), както и на възникващите терморегулаторни отговори- загуба на топлина, задръжка на топлина и термогенеза [Boulant, 2006]. Както се вижда от фигура 4, ако ефекторният интерневрон е синаптично възбуден от температуронечувствителните неврони и синаптично инхибиран от топлочувствителните неврони, то тогава той е студочувствителен и увеличава своята активност когато температурата в хипоталамуса спадне под зададената. Обратно на това, ако интерневронът е синаптично инхибиран от температуронечувствителните неврони и синаптично възбуден от топлочувствителните неврони, то тогава той е ефекторен топлочувствителен неврон, който увеличава своята активност когато температурата в хипоталамуса надвиши зададената. Доказателство за тази хипотеза идва от няколко различни електрофизиологични изследвания, включващи тъканни срезове. В едно от тези изследвания е установено, че студочувствителността на интерневроните се губи по време на перфузия с богата на магнезий и бедна на калций среда, в която обратимо се блокира синаптичното предаване [Kelso et Boulant, 1982; Curras et al, 1991]. Интрацелуларните записи показват, че термосетивността на студочувствителните неврони е строго зависима от възбудните и задръжните постсинаптични потенциали, произхождащи от околните неврони.



Фигура 5. Модифицирано схематично изображение на оригиналния модел от Hammel през 1965 год., обясняващ температурната регулация на зададената стойност от невроните в РО/АН. Загубата на топлина и топлинната продукция регулират зададената температурна стойност около 37 °С.

W, топлочувствителни неврони; **I**, температуронечувствителни неврони; **c**, студочувствителен ефекторен неврон, предизвикващ топлинна продукция; **w**, топлочувствителен ефекторен неврон, предизвикващ загуба на топлина. В малките диаграми е изобразена (плътни линии) зависимостта между честотата на акционните потенциали (**FR**, firing rate) на всеки неврон и температурата в РО/АН. С прекъснати линии са означени възбудните (+) и инхибиторните (-) влияния на топлочувствителните и температуронечувствителните неврони върху ефекторните неврони (Модификация по Boulant, 2000).

Съвременните невроанатомични изследвания, проведени от Nakamura и Morrison, обясняват локалните механизми в РО/АН, нужни за осъществяването на терморегулаторните отговори в резултат на постъпващата термосетивна информация. Крайните разклонения на описания от тях спино-парабрахиало-хипоталамичен път достигат до два подучастъка на РО/АН: средното преоптично ядро (MnPO) и медиалната преоптична област (MPA) на предния хипоталамус (Фигура 2). Стимулирането на невроните в MnPO с NMDA или дезинхибирането им с ГАМК_A-рецепторния антагонист bicuculline предизвиква увеличаване на термогенезата в КМТ, треперене, повишени метаболитни и тахикардни отговори, имитирайки студозащитни терморегулаторни реакции [Nakamura et Morrison, 2008; 2011; Osaka, 2008]. Всички тези отговори, предизвикани от активирането на невроните в MnPO или от излагане на кожата на студ, се преустановяват чрез двустранна блокада на ГАМК_A рецепторите в MPA [Nakamura et Morrison, 2007; 2008; 2011]. Проведените опити показват, че физиологичните терморегулаторни реакции, предизвикани от охлаждането на кожата, зависят от ГАМК-ергичното инхибиране на невроните в медиалната преоптична област на предния хипоталамус, което вероятно се осигурява от невроните в MnPO, получаващи термосетивна информация за студено. В подкрепа на това твърдение са проведените предишни анатомични изследвания, доказващи, че някои MnPO неврони инервират MPA [Uschakov et al., 2007], и че MnPO е богато ядро на ГАМК-ергични неврони [Nakamura et al., 2002; Gong et al. 2004]. Освен това много от невроните в MnPO се активират (повишена експресия на c-Fos) в отговор на понижаване температурата на околната среда [Bratincsak et Palkovits, 2004]. Трябва също така да се отбележи, че извънклетъчното ниво на ГАМК в РО/АН на свободно движещи се плъхове се повишава по време на излагане на ниска температура и се понижава по време на излагане на висока температура [Ishiwata et al., 2005]. Описаният модел в РО/АН може да обясни регулирането на кожния вазомоторен механизъм, който е важен както за студозащитните, така и за топлозащитните терморегулаторни механизми. Напречният разрез на низходящите влакна от РО/АН или инхибиране на невроните в MPA с ГАМК увеличава кожната вазоконстрикция чрез активиране на кожните вазоконстрикторни симпатикови нерви, намалявайки по този начин кръвния поток на кожата и разсейването на топлина от повърхността на тялото [Rathner et al., 2008; Tanaka et al., 2009]. Обратно на това, дезинхибицията на невроните в MnPO увеличава вазоконстрикторната симпатикова нервна активност [Tanaka et al., 2011]. В заключение Nakamura и Morrison правят следното обобщение от проведените опити върху

централните механизми на терморегулация (Фигура 2): При загряване на тялото сетивните сигнали от кожните терморептори постъпват като глутаматергични проекции чрез невроните в задния рог на гръбначния мозък до LPBd. Активираният LPBd неврон след това изпраща други глутаматергични проекции към MnPO, където се предполага, че локалните неврони се активират и осигуряват възбудни сигнали към низходящите неврони в МРА. Активираният неврон в МРА изпраща ГАМК-ергични инхибиторни сигнали към неврони от еферентните терморегулаторни пътища, за да потиснат симпатиковата активност в КМТ и кожните вазоконстрикторни нерви, както и активността на соматични моторни неврони, отговорни за треперенето. По време на охлаждане на организма сетивните сигнали от кожните терморептори се изпращат през задния рог на гръбначния стълб като глутаматергични проекции към LPBeI. Активираният LPBeI неврон след това осигурява глутаматергично възбуждане на ГАМК-ергичните неврони в MnPO, които инхибират низходящите неврони в МРА. Излагането на студ или простагландин E2 (PGE2)-индуцираното потискане на активността на ГАМК-ергичните неврони в МРА довежда до дезинхибиция на възбудните неврони в еферентните терморегулаторни пътища, които от своя страна активират студозащитните терморегулаторни отговори.

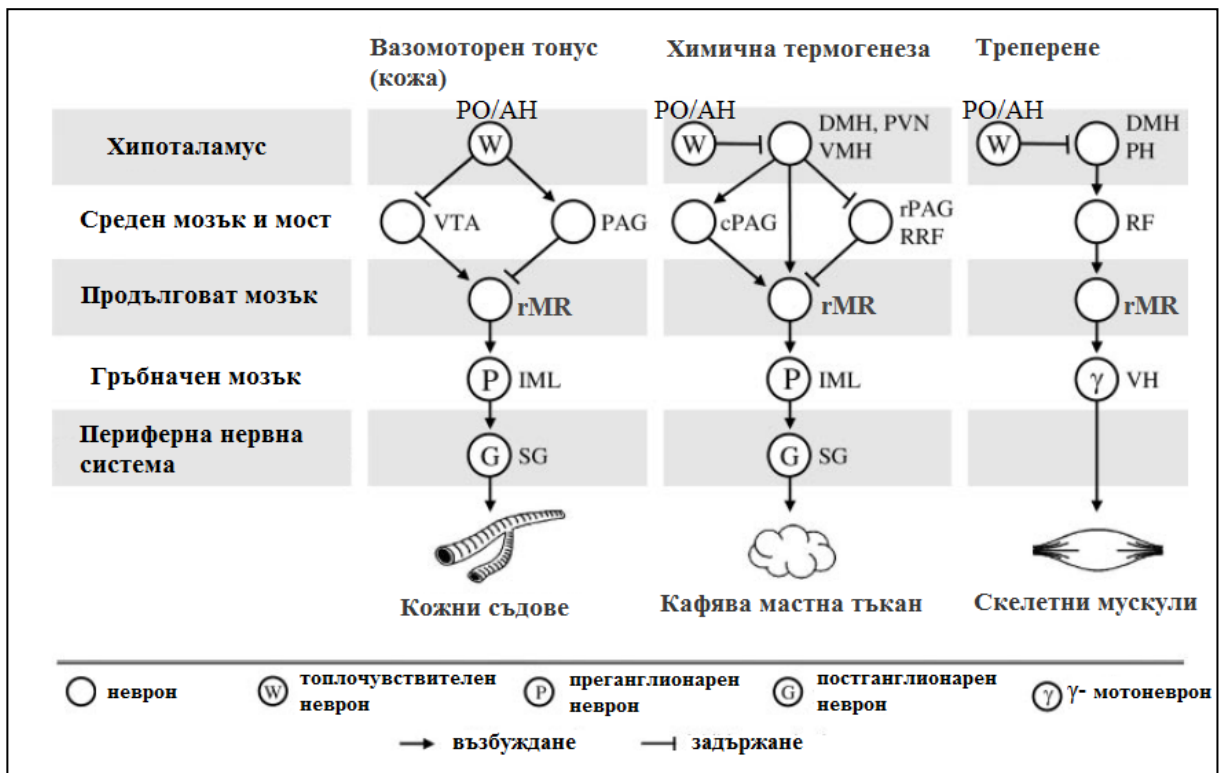
От горепосочените резултати ясно се вижда, че основният невромедиатор, участващ в регулирането на телесната температура е ГАМК. Nakamura и Morrison доказват, че ефектите на ГАМК върху невроните от МРА играят основна роля в осъществяването на терморегулаторните отговори, тъй като те получават ГАМК-ергични проекции от MnPO и изпращат такива до различни неврони от еферентните терморегулаторни пътища. Взаимодействието на ГАМК с други невромедиатори, невромодулатори и хуморални фактори може да промени функцията на невроните в МРА и оттук да се променят посоките на протичане на терморегулаторните реакции, което още повече усложнява картината на терморегулаторните процеси. Установяването на тези взаимодействия ще разшири доста настоящото ни разбиране относно централната невронална мрежа, въввлечена в температурната регулация.

4.1.5. ЕФЕРЕНТНИ ПЪТИЩА ЗА ОСЪЩЕСТВЯВАНЕ НА ТЕРМОРЕГУЛАТОРНИТЕ ОТГОВОРИ

Връзката на невроните в РО/АН със съответните ефекторни системи не е добре охарактеризирана. Предаването на информацията от аферентните на еферентните неврони става през няколко последователни звена, където отговорът се интегрира и модифицира съгласно зададената стойност на нормална телесна температура. Тези междинни звена обхващат различни части на хипоталамуса и ретикуларната формация с нейните многобройни ядра в мозъчния ствол [Egan et al., 2005]. Установено е, че отделните терморегулаторни отговори използват самостоятелни регулаторни вериги. В повечето случаи ефекторните пътища са тонично потиснати и активирането им изисква освобождаване от задържането. В някои случаи в зависимост от силата на стимула (температурата) могат да се проявят различни невронални кръга на една и съща ефекторна верига [Dimicco et Zaretsky, 2007; McAllen, 2004]. Някои от невроналните вериги (Фигура 6), свързващи топлочувствителните хипоталамични неврони с автономните терморегулаторни ефектори в плъхове, особено кафявата мастна тъкан и скелетните мускули (топлопродуциращи ефектори) и кръвоносните съдове в опашката (специализиран топлообменен орган), са добре охарактеризирани през последните няколко десетилетия. Гласък в тази насока е дало развитието на техниките за ретроградно трансинаптично маркиране чрез използване на модифициран вирус на бяс, както и усъвършенстването на техниките за лезиране на отделни структури и фармакологичната инхибиция или стимулация на различни невронни популации [Nagashima et al., 2000]. Както е показано на фигура 6, кафявата мастна тъкан и кръвоносните съдове на кожата се контролират от симпатиковите ганглии, като телата на преганглионарните неврони са разположени в интермедиолатералния стълб на гръбначния мозък. Тези гръбначномозъчни неврони получават директна инервация от невроните, разположени във вентромедиалния медуларен регион (rMR), който включва в себе си ростралното *raphe pallidus* ядро (rRPa), *raphe magnus* ядрото (RMg) и латерално разпростиращото се парапирамидално ядро [Nakamura et al., 2002; 2004]. Сега се знае, че rMR е медуларен регион, който съдържа симпатикови премоторни неврони, които контролират термогенезата в КМТ, кожния вазомоторен механизъм и сърдечната честота за целите на терморегулацията и треската [Nakamura et al., 2004]. Последните открития показват, че rMR съдържа и соматични премоторни неврони,

които могат да предизвикват треперене [Nakamura et Morrison, 2011]. Експерименталните изследвания през последното десетилетие подкрепят теорията, че регулирането на тези премоторни неврони се осъществява чрез низходящи сигнални пътища, изхождащи от РО/АН, като тази връзка стои в основата на еферентния контрол върху терморегулаторните и фебрилните реакции. Излагането на ниски температури или инжектирането на PGE₂ в РО/АН води до активирането на много неврони в rMR, демонстрирано чрез повишената експресия на c-Fos [Cano et al., 2003; Morrison et al., 1999; Nakamura et al., 2002]. Инхибирането на невроните в rMR блокира физиологичните терморегулаторни реакции (повишена термогенеза в КМТ, треперене, кожна вазоконстрикция и тахикардия), които се предизвикват чрез охлаждане на кожата или инжектиране на PGE в РО/АН [Korsak et Gilbey, 2004; Madden et Morrison, 2003; Morrison, 2003; Rathner et al., 2008; Nakamura et Morrison, 2011; 2007]. Тези открития показват, че активирането на невроните в rMR е необходим процес в еферентните механизми, които предизвикват студозащитни или фебрилни реакции. Дезинхибирането на невроните в rMR чрез блокиране на локалните ГАМК_A рецептори с bicuculline предизвиква описаните вече терморегулаторни отговори при излагане на ниска околна температура (Cao et Morrison, 2003; Morrison, 1999; Morrison et al., 1999). Това откритие предполага, че терморегулаторните премоторни неврони в rMR се контролират от низходящи тонични ГАМК-ергични проекции, изхождащи вероятно от невроните в РО/АН. Антагонизирането на йонотропните глутаматергични рецептори в rMR също блокира термогенезата в КМТ и тахикардията, предизвикани чрез охлаждане на кожата или инжектирането на PGE₂ в РО/АН [Madden et Morrison, 2003, Nakamura et Morrison, 2007], или предизвикани чрез стимулиране на невроните в DMH [Cao et Morrison, 2006]. В допълнение стимулирането на невроните в DMH предизвиква увеличена експресия на c-Fos в невроните на rMR [Zaretskaia et al., 2008]. Тези резултати сочат, че са нужни глутаматергични проекции за активирането на премоторните неврони в rMR, които медиират студозащитните или фебрилните еферентни сигнали от РО/АН, и един потенциален източник на такива глутаматергични влакна е DMH. DMH се състои от дорзомедиалното хипоталамично ядро и дорзална хипоталамична област. Невроните в DMH се активират (увеличена експресия на c-Fos) в отговор на студово излагане, системна инжекция с LPS или стрес [Bratincsak et al., 2004; Cano et al., 2003; Sarkar et al., 2007]. Инхибирането на невроните в DMH чрез инжектиране на muscimol незабавно предотвратява термогенезата в КМТ, треперенето и тахикардията, предизвикани чрез охлаждане на кожата или инжектиране на PGE₂ в

PO/АН [Madden et Morrison, 2003; Nakamura et Morrison, 2011; 2007; Zaretskaia et al., 2003; Tanaka et al., 2001], което демонстрира, че студозащитните и фебрилните реакции изискват активиране на невроните в DMH. В допълнение още rMR е под контрол на хипоталамични (вентромедиални и паравентрикуларни ядра), средномозъчни (периакведукталното сиво мозъчно вещество, ретрорубралното поле и вентралната тегментална зона), както и произхождащи от моста (*locus coeruleus*) неврони, получаващи директна инервация от невроните в PO/АН (Фигура 6) [Cano et al., 2003].
 Още изследвания обаче са необходими, за да се установи тяхната роля в терморегулацията.



Фигура 6. Еферентни невронни пътища за контрол на кожния вазомоторен тонус, химичната термогенеза в кафявата мастна тъкан и треперенето.

DMH, дорзомедиален хипоталамус; **IML**, интермедиолатерален стълб; **PAG**, периакведукталното сиво мозъчно вещество; **cPAG**, каудален PAG; **rPAG**, рострален PAG; **PH**, заден хипоталамус; **PO/АН**, преоптична област на предния хипоталамус; **PVN**, паравентрикуларно ядро; **RF**, ретикуларна формация; **rMR**, вентромедиален медуларен регион; **RRF**, ретрорубралното поле; **SG**, симпатиков ганглий; **VH**, преден рог; **VMH**, вентромедиален хипоталамус; **VTA**, вентрална тегментална област (Модификация по Romanovsky, 2006).

4.1.6. ТЕРМОРЕГУЛАТОРНИ ПРОМЕНИ ПРИ ТРЕСКА

В някои случаи терморегулацията се променя в резултат на настъпило пренастройване на зададената величина за нормална телесна температура (Фигура 1). Ако тази промяна настъпи сравнително бързо, терморегулаторните механизми реагират както при понижаване (при по- висока зададена стойност) или повишаване (при пониска зададена стойност) на околната температура. В първия случай ще се включат механизмите за съхранение и производство на топлина, а във втория- за усилен топлоотделяне и потисната топлопродукция.

Треската е състояние на повишена телесна температура над 37°C. При нея става пренастройване на терморегулацията така, че телесната температура се регулира на по- високо ниво. Това ниво може да бъде повишено в различна степен –от 0.1°C до 4°C [Mackowiak et Boulant, 1996]. Причината за това са действията на различни вещества, наречени пирогени, върху терморегулаторния център. Пирогените биват ендогенни и екзогенни и са налице при практически всички инфекциозни заболявания. Едни от най- ефективните ендогенни пирогени са интерлевкините 1 и 6, интерфероните, простагландин Е2, а пример за екзогенни пирогени са бактериалните липополизахариди [Romanovsky et al., 1996]. Отделени в организма или инжектирани у доброволци и експериментални животни, екзогенните пирогени предизвикват треска чрез стимулиране на редица клетки в организма- моноцити, макрофаги, ендотелни клетки, Купферови клетки и др., притежаващи специфични рецептори за микробните продукти [Elmqvist et al., 1996; Romanovsky et al., 1996]. Ендогенните пирогени спадат към цитокините и се отделят от изброените клетки при наличие на инфекция, травма или друга причина. Те са с кратък полуживот в кръвообращението и висока активност дори в ниски концентрации. Те се свързват със специфични рецептори в преоптичната област и в *organum vasculosum laminae terminalis*. Експериментално разрушаване на тези зони у животни намалява значително способността на пирогените да предизвикват треска. Свързването на пирогените има два главни ефекта- активиране на фосфолипаза А2, което води до повишено образуване на арахидонова киселина, и повишена експресия на циклооксигеназа 2, в резултат на което се повишава локалната продукция на PGE2 [Matsumura et al., 1998; Yamagata et al., 2001]. Последният от своя страна въздейства на хипоталамичните неврони така, че те повишават зададената величина за телесната температура [Ranel et Griffin, 2003]. При треска нивото на PGE2 в

споменатите по-горе хипоталамични зони и в ликвора на третия мозъчен вентрикул е повишено. Ефектът на PGE₂ върху преоптичните неврони се опосредства само от един от четирите типа простагландинови рецептори – трети тип (EP-3) [Oka et al., 2000]. У генно-манипулирани мишки с отстранен EP-3-рецептор инжектирането на екзогенен (липополизахарид) или ендогенен (интерлевкин 1) пироген не предизвиква треска [Ushikubi et al., 1998]. Активирането на EP-3-рецептора в преоптичните неврони води до тяхната инхибиция, чрез намаляване нивото на цикличния аденозинмонофосфат, като по този начин се повишава зададеното ниво на телесната температура [Steiner et al., 2002].

4.2. ФИЗИОЛОГИЧНА РОЛЯ НА ЛЕПТИН

Откриването на лептина през 1994 г. от Jeffrey M. Friedman, продукт на *ob* гена, който не е експресиран като функционален протеин в *ob/ob* мишки, привлича вниманието на научната общност. Над 20 години след откриването му и с повече от 19000 статии, отнасящи се до действието му, става известно участието на лептина в регулирането на енергийната хомеостаза и репродуктивната, невроендокринната, имунната и метаболитните функции. Лептинът е адипокинен пептид със 167 аминокиселини и мотив с четири спирали, подобен на този на цитокините [Brennan et Mantzoros, 2006]. Той се произвежда предимно в бялата мастната тъкан, но се експресира и в други тъкани и органи, като плацента, яйчници, епителна тъкан на гръдната жлеза, костен мозък [Margetic et al., 2002] и лимфоидни тъкани [Matarese et al., 2005].

Нивата на лептин имат пулсиращ характер и следват циркаден ритъм, с най-високи нива между полунощ и ранна сутрин и най-ниски нива в началото до средата на следобед [Sinha et al. 1996; Licinio et al., 1997]. По-конкретно концентрацията на циркулиращия лептин може да бъде до 75,6% по-висока през нощта в сравнение с нивата следобед [Sinha et al. 1996]. Пулсиращият характер на лептиновата секреция е сходен при индивиди със затлъстяване и нормална телесна маса, с изключение на това, че затлъстелите индивиди имат по-високи ритъмни амплитуди [Sinha et al. 1996; Licinio et al., 1997].

Концентрацията на лептин отразява количеството енергия, съхранена в телесните мазнини. Нивата на циркулиращия лептин са право пропорционални на количеството бяла мастна тъкан в организма [Considine et al., 1996] и варират с резки промени в калорийния прием [Boden et al., 1996; Chan et al., 2003]. Жените са склонни да имат по-високи нива на лептин в сравнение с мъжете, въпреки че при жените се наблюдава значителен спад в количеството на циркулиращия лептин след менопауза [Kiess et al., 2008]. Този полов диморфизъм до голяма степен е независим от индекса на телесна маса и се дължи отчасти на разликите в половите хормони, количеството и разпределението на мастната тъкан в организма [Saad et al., 1997; Kiess et al., 2008]. Жените са склонни да натрупват бяла мастна тъкан периферно, докато мъжете са склонни към кореман или андроиден тип разпределение. Подкожната мастна тъкан експресира повече лептинова иРНК в сравнение с оменталната и това може частично да обясни по-високите концентрации на лептин при жените в сравнение с мъжете

[Montague et al., 1997; Saad et al., 1997]. Хормоните и цитокините, различни от половите стероиди, също засягат секрецията на лептина, но в по-малка степен [Brennan et Mantzoros, 2006]

Тъй като затлъстяването обикновено се свързва с повишена плазмена концентрация на лептин, се предполага, че то води до намаляване на лептиновото действие. Състоянието, при което наблюдаваме намалената ефективност на лептина да потиска желанието за хранене, се нарича лептинова резистентност. Лептиновата резистентност изключително добре се демонстрира при гризачи, в които се предизвиква затлъстяване чрез хранене с вкусна, висококалорийна диета (диета-индуцирано затлъстяване). Такива гризачи с диета-индуциран обезитет представляват основен експериментален модел на човешко затлъстяване. Установено е, че мишки с диета-индуциран обезитет стават постепенно по-малко чувствителни към прилагането на лептин [El-Haschimi et al., 2000]. Резистентността към лептиновото действие е описана и при възрастни гризачи [Scarpace et al., 2000], гризачи със сезонно затлъстяване [Tups et al., 2004] и селектирани гризачи със склонност към диета-индуцирано затлъстяване [Levin et al., 2004], като за всички изброени е характерно състояние на увеличено съдържание на мастна тъкан и повишена плазмена концентрация на лептин.

Докато концепцията за лептиновата резистентност е добре приета, нейните механизми остават ненапълно установени. Въпреки това няколко механизма се предполага, че допринасят за намаленото действие на лептина по време на затлъстяване: недостатъчност при транспортиране на лептин до ЦНС [Banks et al., 1996], дефекти в сигналната каскада на лептиновия рецептор (клетъчна лептинова резистентност) [Munzberg et al., 2004; El-Haschimi et al., 2000] и неправилна невронна организация в хипоталамуса [Bouret et al., 2008].

Продължаващото нарастване на затлъстяване сред възрастни и деца, както и нашата невъзможност за противодействие на прекомерното наддаване на телесна маса чрез поведенчески промени или разработване на безопасни и ефективни лекарства, показват, че много съществени елементи от регулирането на енергийния разход са все още неизвестни. Проблемът за ролята и ефектите на лептина в организма по време на затлъстяване продължава да бъде обект на множество проучвания. Установяването на лептиновите ефекти в условие на лептинова резистентност би дало възможност да се обяснят по-подробно патогенетичните промени, които настъпват в индивиди с наднормена телесна маса и затлъстяване.

4.2.1. ЛЕПТИНОВА СИГНАЛНА СИСТЕМА

Лептин се свързва със своите рецептори (LepR), които са разположени в цялата централна нервна система и някои периферни тъкани [Fei et al., 1996]. Известни са поне шест вариации или изоформи на лептиновия рецептор (LepRa, LepRb, LepRc, LepRd, LepRe и LepRf) [Lee et al., 1996]. Тези изоформи имат хомоложни извънклетъчни домени, но различни вътреклетъчни домени, които варират по дължина и последователност [Lee et al., 1996; Tartaglia, 1997]. Предполага се, че късите изоформи LepRa и LepRc играят важна роля при транспортирането на лептин през кръвно-мозъчната бариера [Bjorbaek et al., 1998; Hileman et al., 2002], докато дългата изоформа на лептиновия рецептор LepRb е функционалната форма и е основно отговорна за лептиновата сигнализация [Lee et al., 1996; Tartaglia, 1997]. Най-голяма е експресията на LepRb в централна нервна система, и по-специално в хипоталамуса, където регулира енергийната хомеостаза и невроендокринната функция. Зони в хипоталамуса с висока степен на LepRb експресия са *nucleus arcuatus hypothalami* (ARC), дорзомедиалният хипоталамус (DMH), медиалната преоптична област (MPA), вентромедиалният хипоталамус (VMH), латералният хипоталамус (LHA), паравентрикуларното ядро (PVN) и вентралните преамиларни ядра. От екстрахипоталамичните области в мозъка важни за лептиновото действие са *nucleus tractus solitarii* (NTS), *area tegmentalis ventralis* (VTA) и др. [Fei et al., 1996; Elmquist et al., 1998; Frontini et Giordano, 2010]. В модела *db/db* мишки дългата форма на лептиновия рецептор е дисфункционална, което води до затлъстяване и метаболитен синдром [White et Tartaglia, 1996].

LepRb принадлежи към семейството на рецептора за интерлевкин 6 от клас 1 цитокинини рецептори и структурата му е изградена от 3 участъка: екстрацелуларен лиганд-свързващ, трансмембранен и сигнален цитоплазмен участък [Taga et Kishimoto, 1997; Tartaglia et al., 1997]. Подобно на другите цитокинини рецептори LepRb не притежава вътрешна ензимна активност, а вместо това осъществява своята сигнална трансдукция с помощта на тирозин киназа от семейството на Як киназата (Jak2) [Kloek et al., 2002]. След като лептинът се свърже със своя рецептор, настъпва фосфорилиране и активиране на вътреклетъчната Jak2 [Couturier et al., 2003], която от своя страна започва да фосфорилира отделни тирозинови участъци в молекулата на LepRb, с краен резултат активиране на различни фактори включени в сигналната каскада [Banks et al., 2000]. LepRb съдържа 3 консервативни вътреклетъчни тирозинови остатъци,

разположени на аминокиселинна позиции 985, 1077 и 1138 (Tyr985, Tyr1077 и Tyr1138). Фосфорилирането на Tyr1138 привлича сигналния преобразовател и активатор на транскрипцията 3 (STAT3), улесняващ неговото фосфорилиране и активиране от Jak [Banks et al., 2000] (Фигура 7).

Лептин и STAT3 сигнализация

JAK2/STAT3 сигналният път играе основна роля в енергийната хомеостаза и евентуално в невроендокринната функция. Активирането на STAT3 от лептин индуцира транскрипцията на анорексогенния невропептид проопиомеланокортин (POMC) в ARC на хипоталамуса [Ernst et al., 2009] (Фигура 7). В изследвания включващи генетичномодифицирани мишки молекулата на LepRb е заменена с мутантна LepRb^{S1138} (мутация на вътреклетъчния тирозинов остатък Tyr1138), която не може да активира STAT3 в отговор на лептиновото свързване. Също както при *db/db* животните (лишени от лептинова сигнализация), мишките хомозиготни за експресията на LepRb^{S1138} (*s/s* мишки) проявяват хиперфагия и намален енергиен разход, водещ до значително затлъстяване на фона на високата плазмена концентрация на лептин [Bates et al., 2003]. Освен че са пропорционални на голямото количество бяла мастна тъкан, високите лептинови нива в *s/s* мишките показват наличието на резистентност по отношение на енергийните хомеостазните ефекти на лептина. Както в *s/s*, така и в *db/db* мишките, храненето е значително увеличено, а функцията на щитовидната жлеза и разходът на енергия са намалени [Bates et al., 2003; 2004]. Въпреки това, за разлика от *db/db* мишките, *s/s* мишките са фертилни и с нормална дължина, което предполага, че STAT3-независими сигнални пътища могат да бъдат отговорни за регулирането на невроендокринната функция от лептина [Bates et al., 2003]. Gao et al. са изследвали мишки с невронспецифично премахване на STAT3 [Gao et al., 2004]. Тези мишки са имали намалена POMC експресия в ARC и също са развили хиперфагия, затлъстяване и диабет. В допълнение авторите на изследването са наблюдавали появата на невроендокринни дефекти, включително намален линеен растеж и безплодие. Несъответствията между *s/s* модела и мишките с невронспецифичното STAT3 премахване се дължат на факта, че мутацията в Tyr1138 на *s/s* мишките може да доведе до ниско ниво на STAT3 активиране от лептин. В изследвания със специфично премахване на функционалния STAT3 само в POMC-експресиращи неврони е

установена намалена експресия на POMC, но въпреки това мишките са реагирани на анорексогенния ефект на лептина [Xu et al., 2007].

Освен че довежда до активиране на POMC неврони, JAK2/STAT3 сигналният път потиска AgRP/NPY невроните в ARC, които са отговорни за произвеждането на орексогенните невропептиди агути-свързания пептид (AgRP) и невропептид Y (NPY) [Bates et al., 2003; Gong et al., 2008]. Специфичното премахване на STAT3 от AgRP/NPY невроните в мишки довежда до хиперлептинемия, хиперфагия, умерено повишаване на телесната маса и хиперинсулинемия, предизвикана от диета с високо съдържание на мазнини [Gong et al., 2008].

Тези прецизни генетични експерименти с мишки показват, че свързването на лептин към LepRb води до фосфорилиране и активиране на STAT3 и по този начин предизвиква повишена експресия на POMC и понижена експресия на NPY и AgRP, които медиират ефекта на лептина върху енергийната хомеостаза и невроендокринната функция. Освен това е установено, че прилагането на лептин води до фосфорилирането на STAT3 в няколко клетъчни линии *in vitro* и в различни животни *ex vivo* и *in vivo* [Kim et al., 2000]. Следователно степента на лептин индуцираното фосфорилиране на STAT3 (pSTAT3) служи като маркер за клетъчния лептинов отговор.

Лептин и PI3K сигнализация

In vitro опити демонстрират, че бързи отговори, вероятно прекалено бързи, за да бъдат медиирани от промени в генната експресия, се предизвикват от остро прилагане на лептин в определени популации от неврони [Spanswick et al., 1997; Hill et al., 2008]. Например Spanswick et al. показват, че лептин, приложен върху хипоталамусни срезове, намалява акционния потенциал и невронната активност на глюкозо-чувствителните неврони, разположени в ARC и VMH [Spanswick et al., 1997]. Тези ефекти са били придружени от бавна прогресивна хиперполяризация до ново равновесно състояние, 5 до 15 минути след прилагането. Важно е да се отбележи, че ефектите са се наблюдавали само в див тип животински модели, но не и при затлъстели плъхове порода Zucker със съпътстваща мутантна LepR изоформа. Докато някои от вътреклетъчните сигнални пътища, индуцирани от лептин, като например JAK2/STAT3 пътя, предизвикват клетъчни отговори главно чрез промени в генната експресия, фосфатидилинозитол 3-киназният (PI3K) път засяга клетъчната функция по-бързо чрез посттранслационни промени като протеиново фосфорилиране (Фигура 7). Лептин-индуцираният PI3K път

води до деполяризация на POMC невроните [Hill et al., 2008] чрез активиране на АТР-чувствителни калиеви канали [Plum et al., 2006] и потенциал-зависими калциеви канали [Wang et al., 2008], като по този начин допринася за острите ефекти на лептина, свързани с потискането на апетита и загубата на телесна маса. Подобно на инсулина, анорексогенния ефект на лептина е отслабен от интрацеребровентрикуларното въвеждане на PI3K-инхибиторите wortmannin и LY294002 [Niswender et al., 2001].

В заключение, лептиновата сигнализация чрез PI3K пътя в хипоталамуса е отговорна за бързите (острите) ефекти на лептин, които се осъществяват чрез повлияване на електрофизиологичните свойства на невроните.

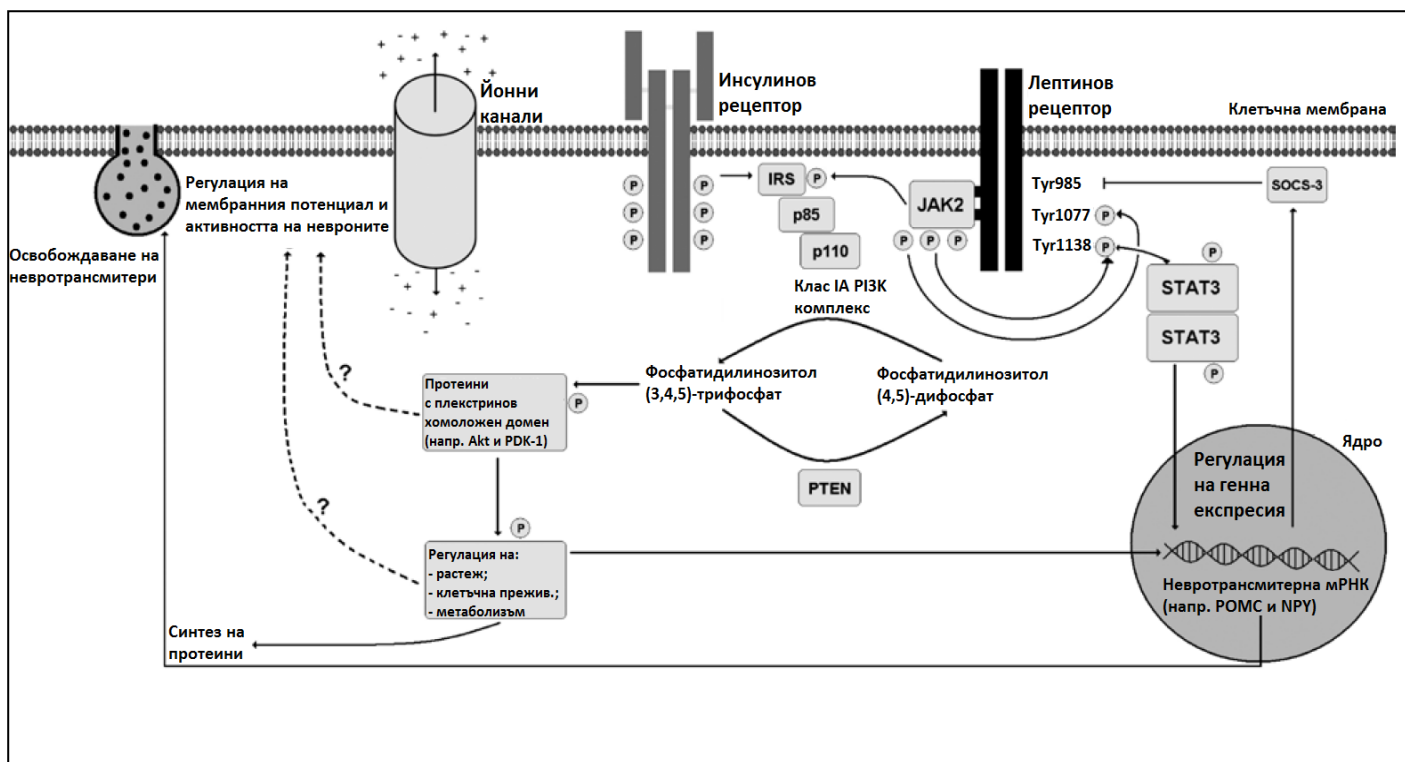
Лептин и MAPK

Митоген-активирани протеин кинази (MAPK) са група кинази, които контролират голям брой клетъчни процеси, включително диференциация, пролиферация и апоптоза и включват множество сигнализиращи молекули: извънклетъчни сигнал-свързани кинази 1 и 2 (ERK1/2), c-Jun аминок-терминални кинази (JNK) и p38 [Sharma et al., 2009]. MAPK могат да бъде активирани от лептин [Gao et al., 2009], а плъховете с дисфункционална форма на лептиновия рецептор имат намалена или липсваща MAPK активност [Rahmouni et al., 2009]. ERK1/2 е основният MAPK, участващ в централните ефекти на лептина и играе ключова роля в регулирането на приема на храна, телесната маса и енергийните разходи. Системното или централно *in vivo* прилагане на лептин води до повишаване активността на ERK1/2 в POMC невроните на ARC. Инхибирането на ERK1/2 намалява загубата на апетит и телесна маса, наблюдавани след прилагането на лептин, както и потиска лептин-индуцираното повишаване на симпатиковата активност в КМТ [Rahmouni et al., 2009].

Лептин и AMPK

Действието на лептин в периферните тъкани се дължат отчасти на регулирането на аденозин монофосфат-активираната протеин киназа (AMPK), която в допълнение към p38, допринася за ефекта на лептина върху окисляването на мастни киселини и усвояването на глюкоза [Minokoshi et al., 2002]. В скелетната мускулатура на мишки лептин активира AMPK, което води до фосфорилиране и инхибиране на ацетил-коензим А карбоксилазата с последващо стимулиране на бета окислението [Steinberg et

al., 2006]. Способността на лептина да стимулира окисляването на мастни киселини в скелетните мускули може да предотврати липотоксичността и последващата инсулинова резистентност, което допълнително благоприятства приложението на лептин при хора с метаболитен синдром и съпътстваща хиполептинемия. За разлика от ефекта му върху мускулите, лептинът има инхибиторно действие върху AMPK в хипоталамуса, което води до стимулиране на ацетил-коензим А карбоксилазата и последващо намаляване на хранителния прием и телесната маса [Minokoshi et al., 2002].



Фигура 7. Схематично изображение на лептиновата сигнална система.

IRS, инсулинов рецепторен субстрат; **JAK2**, янус киназа 2; **NPY**, невропептид Y; **PI3K**, фосфатидилинозитол 3-киназа; **POMC**, проопиомеланокортин; **PTEN**, фосфатаза и тензинов хомолог; **SOCS-3**, супресор на цитокината сигнализация 3; **STAT3**, сигнален преобразовател и активатор на транскрипцията 3 (Модификация по Donato et al., 2010).

4.2.2. ЕФЕКТИ НА ЛЕПТИН ВЪРХУ ЦНС

Роля на лептин в поддържането на енергийната хомеостаза

Лептинът поддържа енергийната хомеостаза чрез адаптиране на апетита/хранителния прием и енергийните разходи. Той взаимодейства с няколко невронални пътища в и извън хипоталамуса, за да регулира приема на енергия чрез орексогенни и анорексогенни неuropeптиди.

Хипоталамичният ARC е важно място за действието на лептина. Той се намира в съседство с третия мозъчен вентрикул и непосредствено над *eminencia mediana*, циркумвентрикуларен орган, в който кръвно-мозъчната бариера е специално модифицирана, за да позволи на периферните пептиди, като лептин и инсулин, достъп до рецепторите им [Arora et Anubhuti, 2006]. Лептин действа върху две популации от неврони в ARC. Както вече стана ясно, лептин директно стимулира невроните в ARC да отделят POMC. POMC представлява прекурсорен протеин, който се разцепва до няколко продукта, един от които е α -меланоцит-стимулиращ хормон (α -MSH) [Morrison, 2009]. α -MSH е анорексогенен неuropeптимид, който намалява приема на храна чрез активиране на меланокортин-4 (MC4R) и меланокортин-3 рецепторите (MC3R). Лептин също така стимулира POMC невроните да секретират кокаин- и амфетамин-регулаторния транскрипт (CART), който също потиска апетита. Експресията както на CART, така и POMC, е силно намалена в състояния на лептинов дефицит [Duan et al., 2007].

Установено е, че заедно със стимулиращия си ефект върху POMC невроните, лептин инхибира AgRP/NPY невроните в ARC, които експресират орексогенните неuropeптиди AgRP и NPY [Cowley et al., 2001]. AgRP антагонизира α -MSH/MC4R сигнализирането и инхибира ендогенната MC4R активност, а NPY ефективно повишава апетита и намалява енергийния разход. Лептинът инхибира орексогенния ефект на тези неврони чрез активирането на хиперполяризиращите АТР-чувствителни калиеви канали, като по този начин намалява акционния потенциал и невронната активност [Cowley, 2003].

ARC не е единствената област в хипоталамуса, участващ в регулирането на енергийната хомеостаза от лептин. LepRb е широко разпространен в цялата централна нервна система, като ARC заема само 15-20% от всички неврони [Leshan et al., 2006]. Вентромедиалният хипоталамус (VMH) е друга ключова област, прицелно място за

действието на лептина. Sternson et al. са открили, че LepRb-експресиращите неврони във VMH изпращат възбудни импулси до POMC невроните в ARC [Sternson et al., 2005]. Установено е още, че лептин стимулира секрецията на два анорексогенни неuropeптида, експресирани в невроните от VMH: стероидогенен фактор-1 (SF-1) и мозъчен невротрофичен фактор (BDNF). SF-1 е транскрипционен фактор, необходим за развитието на VMH. Мишки с липсваща експресия на LepRb в SF-1 невроните са хиперфагични и затлъстели, докато мишки с липса на LepRb както в SF-1 невроните, така и в POMC невроните, са с екстремно затлъстяване [Dhillon et al., 2006]. За BDNF се знае, че стимулира развитието на мозъка и също така регулира приема на храна. Премахването на гена за BDNF в мишки води до затлъстяване и хиперлептинемия [Rios et al., 2001].

Паравентрикуларно ядро (PVN) е богато на неврони, които експресират LepRb. До тези неврони достигат множество проекции, идващи от ARC, които допринасят за регулирането на телесната маса и хранителния прием [Tung et al., 2008]. Установено е, че лептин увеличава експресията на протиреотропин-освобождаващия хормон [Legradí et al., 1997] и кортикотропин-освобождаващия хормон (CRH) [Costa et al., 1997] в невроните от PVN. Това дава основание да се счита, че лептин може да регулира индиректно енергийната хомеостаза чрез повлияване върху щитовидната и надбъбречната оси.

Латералният хипоталамус (LHA), описан още като центъра на глада, съдържа неврони, които експресират орексогенните неuropeптиди меланин-концентриращ хормон (MCH) и орексин. Тяхната продукция се повлиява от действието на лептин. Лептин намалява генната експресия на MCH *in vitro* [Bayer et al., 1999], а интрацеребровентрикуларното му приложение предотвратява MCH-индуцираното увеличаване на хранителния прием в плъхове [Sahu, 1998]. Освен това лептин инхибира експресията на орексин чрез хиперполяризиране на клетъчната мембрана и намаляване активността на орексиновите неврони в LHA. В допълнение прилагането на лептин в *ob/ob* мишки потиска глад-индуцираното повишаване на орексиновата експресия [Yamanaka et al., 2003].

Освен в хипоталамуса LepRb се експресира широко в дорзалния вагален комплекс и в други структури на каудалния мозъчен ствол. Дорзалният вагален комплекс включва в себе си *area postrema*, *nucleus tractus solitarii* (NTS) и дорзалното моторно ядро на вагусния нерв (DMV). Периферното приложение на лептин води до повишаване нивото на pSTAT3 в невроните на NTS и DMV [Hosoi et al., 2002]. Приложен директно в

дорзалния вагален комплекс, лептин значително намалява приема на храна и телесната маса [Grill et al., 2002]. На нивото на NTS се предполага, че лептин действа синергично с периферните сигнални молекули глюкагон-подобен пептид 1 и холецистокинин, за да създаде чувство за ситост [Williams et al., 2006]. Освен това се предполага, че лептин действа синергично и с амилин, хормон, секретирани от панкреатични β -клетки в отговор на хранителен прием и допринасящ за краткотрайното чувство за ситост. При едновременно им приложение в гризачи амилинът увеличава лептиновото свързване във VMH и ARC и се наблюдава адитивно намаляване на приема на храна и телесната маса [Turek et al., 2010]. Тези резултати дават основание да се обсъжда ролята на амилина като потенциален лептинов сенсibiliзатор в лечението на затлъстяване.

Двете най-важни компоненти на енергийната хомеостаза са хранителния прием и телесната температура. Освен чрез потискане на апетита, лептин повишава енергийния разход и чрез увеличаване на термогенезата. Установено е, че *ob/ob* мишките проявяват ниска телесна температура (1-2°C по-ниска от контролните животни) и не могат да преживеят в среда с бързо понижаване на околната температура, което демонстрира важната роля на лептина в предизвикването на студ-индуцираната термогенеза [Trayhurn et al. 1997]. Тези термогенни аномалии, свързани с лептиновия дефицит, могат да бъдат поправени чрез екзогенен внос на лептин в организма [Harris et al., 1998]. Най-добре проученият ефекторен орган, който произвежда топлина, е КМТ. Процесът на разкачване, който се наблюдава в нея, се регулира от симпатиковата активация на β_3 -адренергичните рецептори и тиреоидните хормони [Bartness et al., 2010; Silva, 2006]. Освен важната роля за поддържане на телесната температура, термогенезата в КМТ може също така да предотврати значителното покачване на телесната маса (диета-индуцирана термогенеза). Освен β_3 -адренергичната медиация и хормоните на щитовидната жлеза, лептинът също участва в регулирането на термогенезата в КМТ. Лептиновият дефицит в гризачи води до атрофия на КМТ и понижена експресия на разкачващия протеин 1, като по този начин потиска образуването на топлина [Commins et al., 1999], докато екзогенното внасяне на лептин в плъхове стимулира симпатиковата инервация в КМТ [Haynes et al., 1997]. Бързото намаляване на телесната маса при екзогенно внасяне на лептин в *ob/ob* мишки се дължи не само на анорексогенния ефект на лептина, но и на индуцираната термогенеза в КМТ [Rafael et Herling, 2000].

Ефектите на лептин по отношение на телесната температура са добре документирани, но все още не са напълно известни механизмите, с които той ги осъществява на централно ниво. Познаването на тези механизми може да позволи модулирането им с цел повишаване на енергийния разход. Това от своя страна би допринесло за развитието на безопасни и ефективни методи за лечение на затлъстяване. Освен това установяването ефектите на лептин върху централните невронални пътища, свързани с контрола на хранителния прием и телесната температура, са от значение за изясняването на процесите, регулиращи продължителността на живот [Bartfai et Conti, 2012].

Ролята на лептина в процеса на възнаграждение

Лептин влияе върху хедоничните аспекти на храненето и по този начин допринася за поддържането на енергийната хомеостаза. Той взаимодейства с мезолимбичната допаминергична система, за която е известно, че регулира възбудата, настроението и възнаграждението. LepRb е открит както във вентралната тегментална област (VTA), така и в *substantia nigra*, които са част от мезолимбичната система. В опити с плъховете директното приложение на лептин във VTA намалява възбудимостта на допаминовите неврони и води до понижен прием на храна [Hommel et al., 2006]. Установено е, че LepRb-експресиращите неврони в ЛНА инервират VTA и директното приложение на лептин в ЛНА стимулира експресията на тирозин хидроксилаза, скорост-определящ ензим в производството на допамин, в невроните на VTA [Leininger et al., 2009]. Всичко това дава основание да се счита, че лептинът влияе върху мезолимбичната допаминова система, за да намали стимула за прием на храна.

Ролята на лептина в развитието на мозъка и синаптичната пластичност

В изследвания с *ob/ob* и *db/db* мишки е установено намалена мозъчна маса, намален кортикален обем, намалено общо съдържание на ДНК в мозъка, нарушена миелинизация и незрял тип експресия на синаптични и глиални протеини в сравнение с мишки от див тип. Лептиновата заместителна терапия в ембрионални и ювенилни *ob/ob* мишки повишава масата и общото ДНК съдържание на мозъка, нормализира експресията на синаптични и глиални маркери и подпомага миграцията на невроните

към кортикалната плоча [Udagawa et al., 2006; Ahima et al., 1999]. Използвайки метода на обемно магнитно резонансно изображение Matochik et al. установяват, че заместителната лептинова терапия при възрастни хора с вроден дефицит на лептин води до увеличаване на сивото мозъчно вещество в предния *gyrus cinguli*, долния париетален лобул и малкия мозък [Matochik et al., 2005]. Тези изследвания доказват изключително важното значение на лептина за правилния растеж и развитие на невроните в ЦНС.

Лептин може също така да доведе до пренареждане на синаптичните връзки или да стимулира синаптичната пластичност в хипоталамуса, като това може да допринесе за лептиновата регулация върху енергийната хомеостаза в дългосрочен план. Известно е, че *ob/ob* мишките имат значително повече инхибиторни и по-малко възбудни синапси върху POMC невроните и повече възбудни и по-малко инхибиторни синапси върху AgRP/NPY невроните в сравнение с дивия тип мишки [Pinto et al., 2004]. След 12 дни третиране с лептин броят на възбудните и инхибиторните синапси върху POMC и NPY невроните в *ob/ob* мишките се е възстановил до нивата в мишките от дивия тип [Pinto et al., 2004]. Необходими са допълнителни и задълбочени проучвания, за да се определи дали тези открития се отнасят и за хората.

4.3. ФИЗИОЛОГИЧНА РОЛЯ НА ГАМК_B-РЕЦЕПТОРНАТА ФУНКЦИЯ

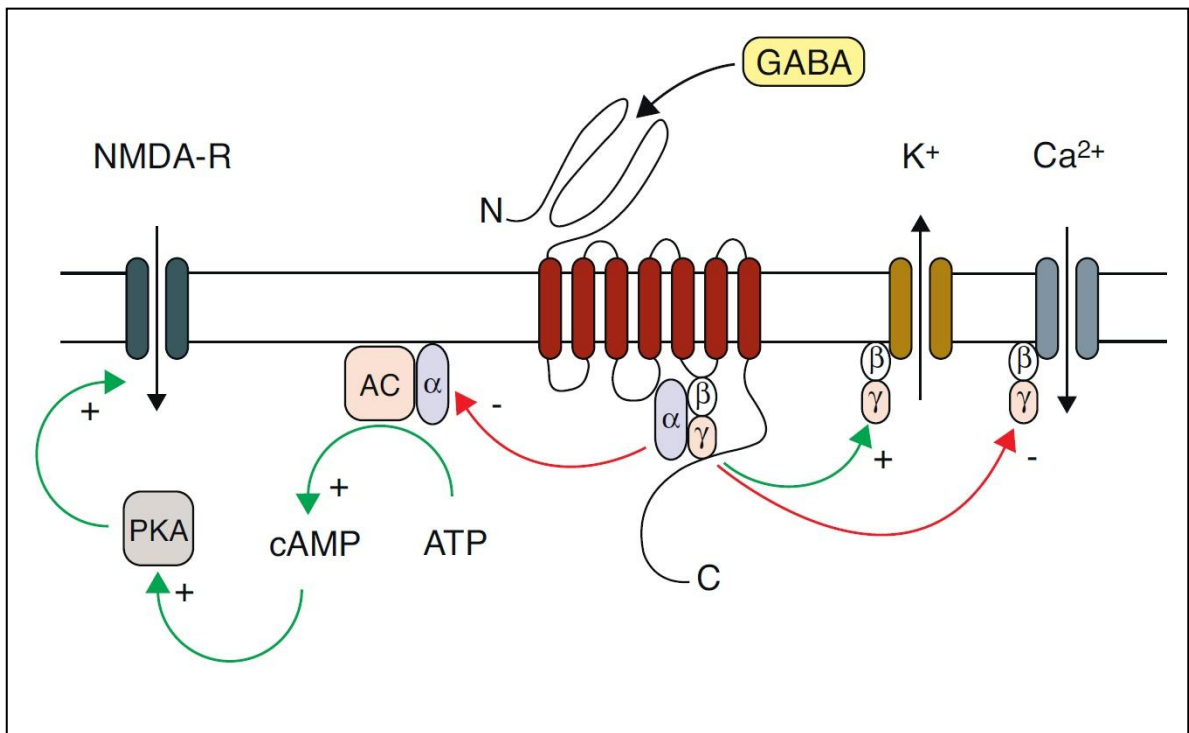
ГАМК е основният инхибиторен невротрансмитер в централната нервна система на гръбначните животни. ГАМК-ергичната невротрансмисия се осъществява посредством два класа рецептори. Йонотропните ГАМК_A рецептори медираат бързите ГАМК отговори, като задействат отварянето на хлорен канал. Метаботропните ГАМК_B рецептори са членове на семейство 3 (или семейство C) G протеин свързани рецептори и медираат по-бавните ГАМК отговори чрез активиране на G-протеини и повлияване на вторични посредници [Bettler et Tiao, 2006]. Кинетичните и фармакологичните разлики между ГАМК_B-рецепторните отговори допълнително са предположили наличието на молекулярно различни ГАМК_B рецепторни подвидове. Сега се знае, че рецепторните подвидове са базирани на изоформните субединиците ГАМК_{B1a} и ГАМК_{B1b}, които се комбинират с ГАМК_{B2} субединицата, за да се образуват хетеромерните ГАМК_{B(1a,2)} и ГАМК_{B(1b,2)} рецептори. Структурно ГАМК_{B1a} и ГАМК_{B1b} се различават чрез двойка "суши-домени", които са уникални за ГАМК_{B1a} [Bettler et al., 2004]. ГАМК_{B(1a,2)} хетеродимерът съществуват предимно като пресинаптичен рецептор, докато ГАМК_{B(1b,2)} хетеродимерът съществуват предимно като постсинаптичен рецептор [Bischoff et al., 1999].

ГАМК_B-рецепторната функция се осъществява благодарение на G α и G $\beta\gamma$ субединиците на активирания G протеин. Първата идентифицирана ефекторна молекула в сигналната каскада на ГАМК_B е аденилат циклазата, чиято активност се потиска от G α_i /G α_o субединиците (Фигура 8). За съжаление физиологичните последствия от тази модулация са слабо изследвани, но включват ефекти върху транскрипционни фактори, кинази и Ca²⁺-зависимо интрацелуларно сигнализиране [Couve et al., 2002; Chalifoux et Carter, 2011]. В сравнение с G α ефекторната система G $\beta\gamma$ -медираното сигнализиране е много по-добре проучено. Основните G $\beta\gamma$ -зависими ефекторни протеини на пресинаптичните ГАМК_B рецептори са P/Q- и N-тип потенциал-зависими Ca²⁺ канали [Bussieres et El Manira, 1999]. Ролята на ГАМК_B е да инхибира тези Ca²⁺ канали във възбудните и инхибиторните нервни окончания, като по този начин ограничава освобождаването на невротрансмитерите. По дефиниция ГАМК_B авторецепторите инхибират освобождаването на ГАМК, докато ГАМК_B хетерорецепторите намаляват освобождаването на други невротрансмитери, като

например глутамат, допамин, адреналин или серотонин. В зависимост от това дали нервното окончание освобождава инхибиторен или възбуден невротрансмитер пресинаптичните ГАМК_B рецептори увеличават или намаляват възбудимостта на постсинаптичния неврон. Пресинаптичните ГАМК_B рецептори ограничават освобождаването на невротрансмитерите не само чрез инхибиране на Ca²⁺ канали, но и чрез забавяне на натрупването на синаптични везикули [Sakaba et Neher, 2003]. Нови факти показват, че пресинаптичните ГАМК_B рецептори се свързват с вътрешно изправителни K⁺ канали тип Kir3, за да инхибират освобождаването на глутамат [Ladera et al., 2008]. Активирането на Kir3 каналите е характерно и за ефектите на постсинаптичните ГАМК_B рецептори, които предизвикват бавни инхибиторни постсинаптични потенциали чрез индуциране на K⁺ ефлукс, хиперполяризиращ клетъчната мембраната. Постсинаптичните ГАМК_B рецептори също така потискат активността на Ca²⁺ канали, което инхибира разпространението на акционния потенциал в дендритите на неврона [Perez-Garcí et al., 2006] (Фигура 8).

Активирането на ГАМК_B не води само до модулиране на активността на невроните, но също така предизвиква дългосрочни промени в здравината на синаптичната връзка. Постсинаптичните ГАМК_B рецептори ограничават индукцията на дългосрочно потенциране чрез предизвикване на хиперполяризация, докато авторецепторите улесняват дългосрочното потенциране чрез дезинхибиране на постсинаптичния неврон [Huang et al., 2005; Otmakhova et Lisman, 2004]

ГАМК_B рецепторите са идентифицирани в ЦНС, в периферната нервна система, както и в няколко периферни органа. В ЦНС регионите с най-висока експресия на ГАМК_B рецепторите са хипокамп, таламични ядра, малък мозък, амигдала, неокортекс и хабенула. Малко по-ниска е плътността на рецепторите в хипоталамуса и в гръбначния мозък [Bischoff et al., 1999]. Периферно се срещат в автономните ганглии, слезката, пикочния мехур, тънките черва, белите дробове, тестисите, стомаха, панкреаса, бъбреците, черния дроб, фалопиевите тръби, миокарда и скелетните мускули [Hyland et Cryan, 2010]. ГАМК_B - рецепторната функция участват в различни физиологични и патофизиологични състояния като спастичност, болка, когнитивна функция, безпокойство, болести на настроението, епилепсия и наркомания [Filip et al., 2007; Froestl, 2010; Vlachou and Markou, 2010].



Фигура 8. Схематично изображение на ГАМК_B-рецепторната функция.

GABA, γ-аминомаслена киселина (ГАМК); **AC**, аденилат циклаза;

PKA, протеин киназа А; **NMDA-R**, глутаматен N-метил-D-аспартат рецептор
(Модификация по Chalifoux et Carter, 2011).

4.3.1. РОЛЯ НА ГАМК_B-РЕЦЕПТОРНАТА ФУНКЦИЯ В РЕГУЛИРАНЕТО НА ТЕЛЕСНАТА ТЕМПЕРАТУРА

Добре известна е ролята на ГАМК в регулацията на телесната температура (Фигура 2). Централното или системното приложение на ГАМК и ГАМК-рецепторни агонисти обикновено води до спад в телесната температура, докато ГАМК-рецепторните антагонистите предизвикват хипертермия [Clark et Lipton, 1985; Serrano et al. 1985; Yakimova et Ovtcharov, 1989; Jackson et Nutt, 1991]. Интензивността и продължителността на тези терморегулаторните промени зависят от начина и дозата на приложение, видовете животни, температурата на околната среда и общите условия. Първото предположение, че ефектът на ГАМК може да бъде рецепторно-специфичен, идва от проведените експерименти на Serrano et al., в които ГАМК-индуцираната хипотермия не е била блокирана от приложението на ГАМК_A-рецепторния антагонист bicuculline [Serrano et al. 1985]. Това е дало основание да се предположи, че ефектът на ГАМК върху терморегулацията не е първоначално медиран от активирането на ГАМК_A рецепторите. Тъй като интраперитонеалното и интрацеребровентрикуларното приложение на ГАМК_B-рецепторния агонист baclofen индуцира хипотермия в мишки, се е предположило, че стимулирането на ГАМК_B рецепторите изпълнява основна роля в терморегулаторните ефекти на ГАМК [Gray et al., 1987; Jackson et Nutt, 1991]. Установено е, че от ГАМК рецепторите само ГАМК_B участва в промяната на температурната чувствителност на топлочувствителните неврони в РО/АН. Въпреки инхибиращото действие върху невроналната им активност, приложението на baclofen увеличава температурната чувствителност на топлочувствителните неврони [Yakimova et al., 1996; Yakimova, 2006]. Този ефект е особено впечатляващ в експерименти, при които невроните все още отговарят на температурните промени, дори когато тоничната активност е напълно потисната от baclofen. Резултатите будят огромен интерес основно поради три причини: (1) увеличението на температурната чувствителност е съпроводено с понижаване на тоничната активност; (2) ефектът върху температурната чувствителност е специфичен за топлочувствителните неврони; (3) ефектът е рецепторно-специфичен, тъй като ГАМК_B антагонистът phaclofen напълно предотвратява baclofen-индуцираното повишаване на температурната чувствителност [Yakimova et al., 1996; Pierau et al., 1998]. Увеличаването на невроналната топлочувствителност в хипоталамуса има за резултат активиране на механизмите за

загуба на топлина с последващо понижаване на телесната температура в целия организъм. Това откритие е в съгласие с по-ранната идея, че ефектът на ГАМК върху терморегулацията е предимно медиран от ГАМК_В рецепторите [Serrano et al., 1985; Yakimova et Ovtcharov, 1989; Jackson et Nutt, 1991]. ГАМК_А рецепторите също участват в регулирането на телесната температура, тъй като предварителното интраперитонеално прилагане на bicuculline усилва хипотермията, индуцирана от ниски дози baclofen в плъхове [Sancribian et al 1991]. Антагонистичното взаимодействие между ГАМК рецепторите в осъществяването на терморегулаторните отговори може да се обясни с модулиращия ефект на ГАМК_А върху ГАМК_В рецепторите, тъй като bicuculline увеличава baclofen-индуцираното повишаване на температурната чувствителност на топлочувствителните неврони в РО/АН [Yakimova et al., 1996].

5. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия труд е да се установят ефектите на лептин върху терморегулацията у плъхове с нормална телесна маса и затлъстяване, както и взаимодействията на лептин с вещества, повлияващи ГАМК_B-рецепторната терморегулаторна функция.

Задачи:

1. Да се изследват промените в телесна температура при системно (i.p.) въвеждане на лептин в мъжки плъхове с нормална телесна маса и експериментален модел на затлъстяване.
2. Да се изследват промените в телесна температура при системно (i.p.) въвеждане на лептин в комбинация с ГАМК_B-агониста baclofen или ГАМК_B-антагониста CGP35348 в мъжки плъхове с нормална телесна маса и експериментален модел на затлъстяване.
3. Да се проучат ефектите на лептин върху невроналната активност (firing rate) на неврони от РО/АН в хипоталамични срези от плъхове с нормална телесна маса и модел на затлъстяване.
4. Да се проучат ефектите и взаимодействията на лептин, ГАМК_B-агониста baclofen и ГАМК_B-антагониста CGP35348 върху невроналната активност на неврони от РО/АН в хипоталамични срези от плъхове.
5. Да се изследва броя на pSTAT3 позитивните неврони в РО/АН при системно (i.p.) въвеждане на лептин в мъжки плъхове с нормална телесна маса и експериментален модел на затлъстяване.
6. Да се верифицира лептиновата резистентност у плъхове, с експериментален модел на затлъстяване.

6. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

6.1. Експериментални животни

За нуждите на експерименталните изследвания се използваха 115 мъжки полово зрели плъхове от порода *Wistar*. Опитите се извършваха върху плъхове с нормална телесна маса и плъхове с експериментален модел на затлъстяване. Животните се отглеждаха при стандартни условия – биологичен ритъм (12 ч. светло/12 ч. тъмно), осигуряване на оптимална температура ($22\pm 1^\circ\text{C}$), влажност $50 \pm 10\%$ и достатъчни количества вода и стандартна лабораторна храна за гризачи. Спазени бяха международните принципи за експериментиране с животни (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington DC, National Academy Press, 1996), както и етичните принципи при планиране и провеждане на експериментите според Комисията по етика на научните изследвания при Медицински университет – София (КЕНИМУС).

6.2. Експериментален модел на затлъстяване

За предизвикване модел на затлъстяване в плъхове се използваше кафетерийната диета „cafeteria diet” (CAF), която по-точно отразява разнообразието от вкусна, висококалорийна храна, преваляраща в западното общество и свързана с настоящата пандемия от затлъстяване [Sampey et al., 2011]. В този модел на затлъстяване плъховете имат свободен достъп до стандартна лабораторна храна за гризачи и вода, като едновременно с това им се предлага вкусна, високоенергийна, нездравословна човешка храна *ad libitum* (бисквити, крекери, кексчета, зърнени храни и др.) водеща до хиперфагия и нарастване на телесната маса за сметка на бялата мастна тъкан. Плъхове, хранени с CAF проявяват по-голяма степен на хиперинсулинемия, хиперглицемия и глюкозна непоносимост в сравнение с плъхове, хранени с широко използваните лабораторни фуражни храни, обогатени с мазнини (HFD- high fat diet). Тези резултати дават основание да се счита, че CAF осигурява отличен модел на човешки метаболитен синдром, създавайки фенотип на значително затлъстяване [Sampey et al., 2011; Higa et al., 2014]. Това е причината да се избере този модел на затлъстяване за целите на дисертационния труд.

В състава на кафетерийната диета се включиха хранителни продукти по предложение на Sampey и сътрудници (Таблица 1)[Sampey et al., 2011]. Всеки ден се предоставяха по 2 различни продукта заедно със стандартната лабораторна храна и вода за период от 9 седмици. Индивидуалната телесна маса на плъховете се отчиташе ежеседмично.

Стойностите са за 100 g хранителен продукт	Енергийна стойност, kcal	Общо количество мазнини, g	Общо количество въглехидрати, g	Общо количество белтъци, g	Захари, g	Наситени мастни киселини, g	сол, g
Кексчета "Magdalenas"(Karmela®)	427.5	21.5	53.3	5.2	30.72	2.96	0.4
Крекери "Brezel" (Croco®)	476	19.9	64	8.8	3.9	13	2.5
Вафлички (Karmela®)	549	32.86	59.73	3.56	28.75	14.8	0.32
Печени осолени фъстъци (K-classic®)	588	47	13	25	3.4	8	1
Царевични пръчици с лешник (Star®)	501	26	52	11	1.4	8.4	1.1
Царевични пръчици с кашкавал (Star®)	528	32	54	4.3	3.4	14	1.4
Зърнена закуска с шоколад (K-classic®)	386	2.6	81	7.3	26	0.4	0.18
Зърнена закуска с мед (K-classic®)	384	2.6	80	8.5	25	1	0.58

Таблица 1. Състав и хранителна стойност на кафетерийната диета.

6.3. Фармакологични средства

1. **Leptin** (Leptin from rat, рекомбинантен и експресиран в E.coli, Sigma-Aldrich®)- Лиофилизиран прах от 0.2 µm филтриран разтвор във фосфатен буфер.
2. **CGP 35348 hydrate** (ГАМК_B- антагонист, Sigma-Aldrich®) - Използвана е субстанция, която се прилагаше след разтваряне с физиологичен разтвор.
3. **S(-) Baclofen hydrochloride** (ГАМК_B- агонист, Sigma-Aldrich®)- Използвана е субстанция, която се прилагаше след разтваряне с физиологичен разтвор.

Използвани са дози на изследваните вещества в отделните експерименти на базата на литературни данни и предварителни наши изследвания [Yakimova et al., 1996; Davidowa et Plagemann, 2000; Davidowa et al., 2006; Patel et Ebenezer, 2008; Faouzi et al., 2007].

6.4. Метод за оценка на затлъстяване при плъхове

За определяне състояние на затлъстяване при плъховете се използваха индексите на Lee и телесната маса. Индексът на Lee изразява отношението между кубичен корен от телесната маса в грамове и назо-аналната дължина в сантиметри. За състояние на затлъстяване се счита, когато полученият резултат е по-голям от 0.31 [Hariri et Thibault, 2010; Novelli et al., 2007].

Индекс на Lee = $\sqrt[3]{\text{телесна маса (g) / назо-аналната дължина (cm)}}$

Novelli et al. осъществяват серия от опити с мъжки плъхове от порода Wistar и установяват, че индекса на телесната маса може да послужи за определяне на нормална телесна маса и затлъстяване. Индекса на телесната маса за плъхове изразява отношението на телесната маса в грамове и назо-аналната дължина в сантиметри на квадрат. За мъжки плъхове порода Wistar нормалните стойности за индекса на телесната маса са между 0.45 и 0.68 g/cm², а стойности над 0.68 g/cm² определят състояние на затлъстяване [Novelli et al., 2007].

Индекс на телесната маса = телесна маса (g) / назо-аналната дължина (cm²)

6.5. Ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) за определяне серумната концентрация на лептин

За това изследване се използваха 24 мъжки плъха Wistar, разпределени в две групи по 12 животни. В деня преди изследването храната на животните беше премахната, за да се намалят колебанията, предизвикани от храненето. В деня на изследването плъховете се декапитираха и кръв за определяне на серумната концентрация на лептин се събираше в EDTA епруветки. Пробите се центрофугираха на 2000- 3000 оборота за 15 мин на 4°C. Ензимно-свързаният имуносорбентен анализ (ELISA) представлява имунологичен метод, чрез който се изследва количествено серумната концентрация на лептин.

6.5.1. Протокол за Rat Leptin ELISA кит

Rat Leptin ELISA (BioVendor) се осъществява на базата на реакцията двоен-антитяло „сандвич“. Микроплаката е предварително инкубирана с антимиши антитяло, специфично за лептин. Фиксираното антитяло в ямките на микроплаката се свързва с количеството лептин, което се намира в стандартите и пробите. След 60 минути инкубация с последващо измиване към ямките се прибавя биотин-свързано поликлонално антитяло, специфично за лептин. По този начин двете антитела образуват „сандвич“. Следва последователно добавяне на стрептавидин-HRP, реактив за усилване и субстратен разтвор, при което се развива цветна жълта реакция пропорционално на количеството лептин. Ензимната реакция се прекратява чрез добавяне на кисел разтвор и промяната в цвета се измерва спектрофотометрично при дължина на вълната 450 nm. Серумното съдържание на лептин се представя в pg/ml.

6.6. Мониторирание на телесната температура

За целите на това изследване лабораторните животни бяха разпределени в групи от по 6-8 животни. Системно прилаганите вещества (интраперитонеално, i.p.) се инжектираха в обем 0,2 ml/100 g телесна маса, самостоятелно и в различни комбинации. Телесната температура на животните се регистрираше чрез въведени ректално на 6 см термисторни проби TX-8 и апарат IsoThermex 16 (Columbus Instruments, USA). По време на експериментите животните бяха леко ограничени в движенията си. Температурата на околната среда по време на изследванията се поддържаше $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Всички опити започваха в 10 часа сутринта. Определяше се изходната температура на плъховете, както и промените в температурата след прилагане на веществата през различни интервали от време и продължителност. Всяко животно бе използвано само веднъж.

6.7. Регистриране на невроналната (тоничната) активност (firing rate)

За провеждането на тези експерименти бе използвана постановка за екстрацелуларен запис от неврони в мозъчни срези от медиалната преоптична област на предния хипоталамус на плъхове (Фигура 9).

6.7.1. Приготвяне на перфузионните разтвори

Перфузионните разтвори се приготвяха ежедневно от десет пъти концентрирани съхраняващи разтвори. Нормалната изкуствена гръбначномозъчна течност (ACSF) съдържаше 124mM NaCl, 5mM KCl, 1.2mM NaH₂PO₄, 1.3mM MgSO₄, 26mM NaHCO₃, 1.2mM CaCl₂ и 10mM глюкоза (Sigma, Germany).

Приготвеният от съхраняващите разтвори работен разтвор (ACSF) се оксигенираше поне 60 минути с 95% O₂ и 5% CO₂ преди употреба, достигайки стабилно pH от 7,4. Разтворът беше непрекъснато оксигениран по време на експериментите.

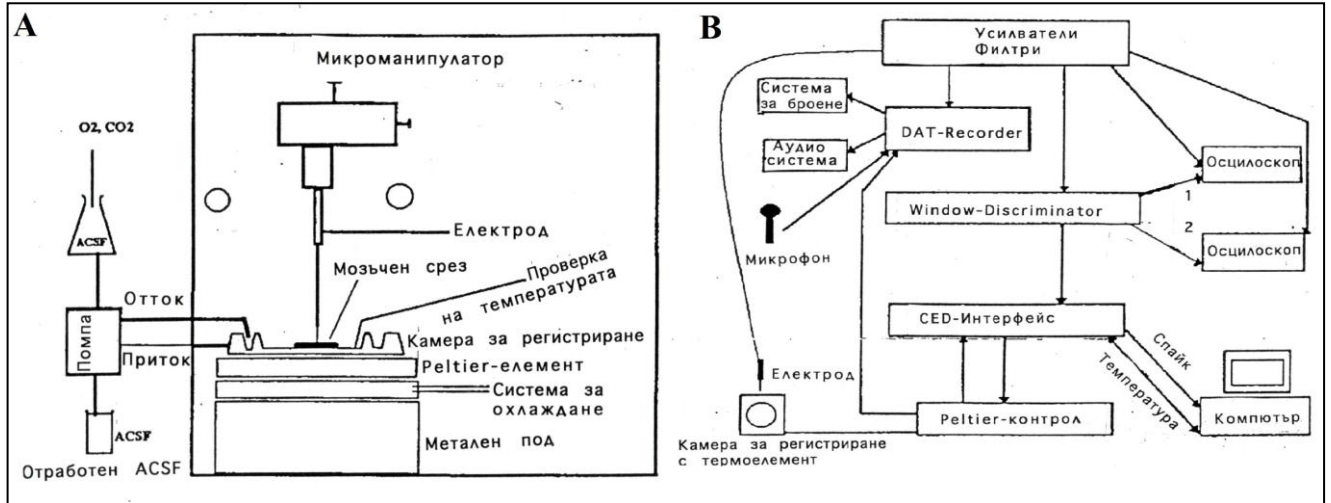
6.7.2. Приготвяне на мозъчните срези

С помощта на вибратор (Natsume Seisakusho, Tokyo, Japan) бяха приготвени срези с дебелина 400 µm от хипоталамичната област, вентрално на commissura anterior. Тези срези бяха адаптирани в инкубационна камера за поне 2 часа, преди поставяне в камерата за регистриране на невроналната активност.

6.7.3. Екстрацелуларно регистриране

Единични срези бяха премествани от инкубационната камера в камерата за регистриране, като бяха регистрирани спонтанно активни неврони при 38°C с помощта на платинено-иридиеви микроелектроди със стъкло покритие (Clark Electromedical Instruments GC150F-10) за екстрацелуларен запис на акционни потенциали. Записваните акционни потенциали бяха предварително усилены с преусилвател, филтрирани и показвани чрез осцилоскопи. Акционните потенциали бяха ограничавани чрез Window discriminator (World Precision Instruments, model 120). Данните бяха съхранявани продължително в DAT recorder (DTR 1800, Biologic, France) и в персонален компютър, използвайки интерфейс CED 1401 (Фигура 9), и обработени с компютърна програма „Spike 2” (Cambridge Electronic Design).

Потенциалите бяха регистрирани от неврони, разположени максимално 1,5 mm латерално от третия вентрикул и 1 mm каудално от commissura anterior. Електродите бяха въведени в мозъчния срез вертикално чрез електрически микроманипулатор под оптичен контрол. Само по един неврон от хипоталамичен срез бе третиран.



Фигура 9. Схематично изображение на камера за регистриране с термоелемент (А) и постановка за екстрацелуларен запис (В).

6.8. Имунохистохимичен метод за определяне на pSTAT3

За изследването се използваха 10 мъжки плъха Wistar. В деня преди изследването храната на животните беше премахната. Плъховете бяха инжектирани итраперитонеално с leptin (0,5 mg/kg) или физиологичен разтвор (0,2 ml/100g) и анестезирани 45 min по-късно с thiopental (40mg/kg).

6.8.1. Фиксация

Плъховете се перфузираха транскардиално с 4% разтвор на параформалдехид в 0.1M фосфатен буфер с pH 7.2-7.4. Веднага след това мозъкът се изваждаше от черепната кухина и се подлагаше на постфиксация за 1-2 часа в същия фиксатор на стайна температура. След неколkokратно промиване в 0.1M фосфатен буфер, pH 7.4, материала се оставяше да пренощува в 0.01M фосфатен натриево-хлориден буфер (PBS), pH 7.2-7.4, при температура 4°C. На следващия ден бяха приготвени коронарни мозъчни срези на замразяващ микротом (Reihart-Jung), като всеки пети срез с дебелина 40 µm се използваше при изследването. Бяха използвани координатите +0.36 mm до -0.96 mm от брегмата за изследване на медиалната преоптична област на предния хипоталамус на плъх [Paxinos et Watson, 2007].

6.8.2. Имунохистохимично оцветяване

Всички оцветявания бяха извършвани чрез методиката на свободно плуващи срези. Срезите бяха измити в 0,01 M PBS (pH 7,36), съдържащ 0,3% Triton X-100 (Merck), трикратно по 5 min с цел подобряване на пенетрацията на анти тялото при последваща инкубация. Ендогенната пероксидаза бе блокирана в разтвор от 1,2% водороден пероксид в абсолютен метанол в продължение на 30 min на стайна температура с последващо 15-минутно промиване в 0,01 M PBS/0,3% Triton X-100. За редуциране на неспецифичното пероксидазно оцветяване срезите бяха преинкубирани с 0,01 M PBS, съдържащ 5% нормален кози серум за 1 h на стайна температура. След това се извърши инкубация на срезите с първично моноклонално анти-pSTAT3 анти тяло (Catalog No. sc-8059, Santa Cruz Biotechnology) в разреждане 1:100. Общото инкубационно време беше 24 h в хладилник при 4°C. След това срезите бяха трикратно промити с 0,01 M PBS (pH 7,36) и инкубирани с вторично антимиши IgG анти тяло, конюгирано с биотин (Catalog

No. BA-9200, VectorLab), в разреждане 1:250 с 0,01 М PBS. Инкубацията с вторичното анти тяло беше в продължение на 45 min на стайна температура. След ново трикратно измиване срезите бяха потопени в комплекс авидин/пероксидаза (The Vectastain ABC Elite Kit, Catalog No. PK-6100, VectorLab). Времето за инкубация беше 30 min във влажна камера на стайна температура. След измиване на срезите се извърши визуализиране на реакциите от 5 до 15 min на тъмно с помощта на 3,3' диаминобензидин (DAB) като хромоген. След това реакцията бе преустановена и срезите бяха поставени на предметни стъкла, бяха дехидратирани и покрити с изкуствена смола.

6.8.3. Получаване на изображения и техен анализ

Светлинномикроскопският анализ на всички препарати бе осъществен чрез микроскоп, свързан към персонален компютър чрез дигитална камера. Количествените данни бяха получени с компютърна система за анализиране на образи NIS-Elements Advanced Research (Ver. 2.30). Всеки образ от изследваната област се отвеждаше от светлинния микроскоп до монитора на анализатора, където увеличен се подлагаше на обработка. След маркирането на всички клетки образът се анализираше компютърно, при което се получаваха данните за броя на клетките в изследваното поле и гъстотата им на единица площ.

6.9. Статистически методи

Данните от всички експерименти бяха анализирани със софтуера Sigma Plot 12.5. Получените резултати бяха проверени за нормално разпределение чрез непараметричния тест на Шапиро-Уилк (Shapiro-Wilk) и представени като средна стойност \pm средна грешка (mean \pm S.E.M.) посредством методите на дисперсионния анализ (one-way ANOVA). При наличие на значима разлика, установена с ANOVA, резултатите се анализираха с помощта на post-hoc теста на Холм-Сидак (Holm-Sidak method). Статистически значима разлика между групите се приемаше при $p < 0,05$. Резултатите бяха представени графично чрез програмата Sigma Plot 12.5.

7. РЕЗУЛТАТИ

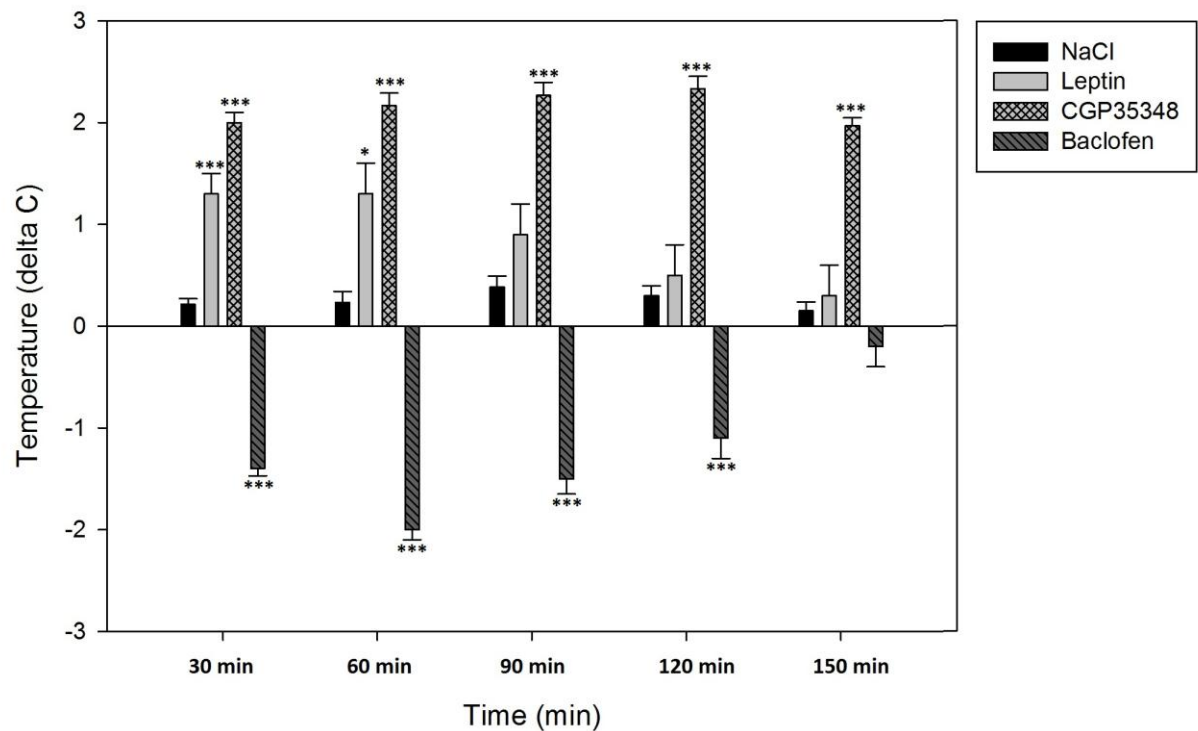
7.1. In vivo експерименти

7.1.1. Ефекти на leptin, baclofen и CGP35348, приложени самостоятелно, върху телесната температура на плъхове с нормална телесна маса

При интраперитонеално инжектиране на leptin (0,5 mg/kg) в плъхове с нормална телесна маса се наблюдаваше умерено статистически значимо повишаване на телесната температура на 30^{-та} и 60^{-та} min след въвеждането (Фиг. 10).

Прилагането на ГАМК_B-рецепторният антагонист CGP35348 (5 mg/kg, i.p.) предизвика значима ($p < 0,001$) продължителна хипертермия, наблюдавана на 30^{-та}, 60^{-та}, 90^{-та}, 120^{-та} и 150^{-та} min след инжектирането (Фиг. 10).

Инжектирането на ГАМК_B-рецепторният агонист baclofen (5 mg/kg, i.p.) предизвика значимо понижаване ($p < 0,001$) на телесната температура в изследваните плъховете между 30^{-та} и 120^{-та} min, с максимум на 60^{-та} min след въвеждането на baclofen (Фиг.10).



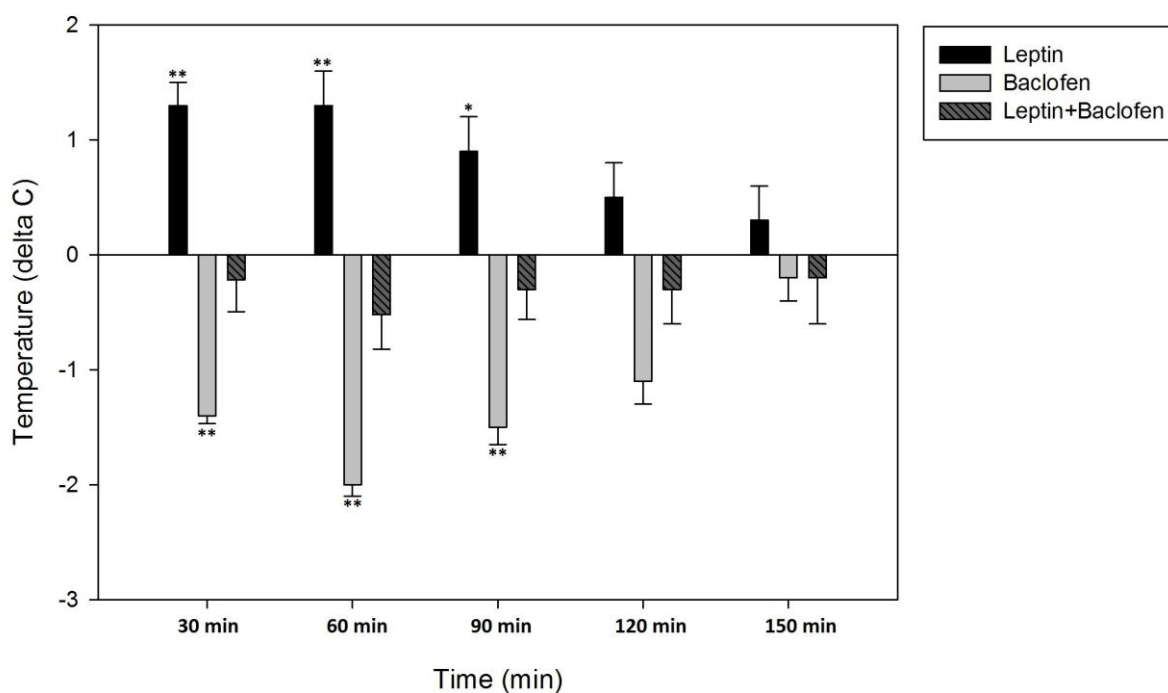
Фиг. 10: Ефекти на интраперитонеално (i.p.) инжектиране на leptin, baclofen и CGP35348, приложени самостоятелно, върху телесната температура на плъхове с нормална телесна маса.

Средна промяна на телесната температура на плъхове (temperature delta °C) след интраперитонеално инжектиране на: leptin (0,5 mg/kg), baclofen (5 mg/kg) и CGP35348 (5 mg/kg).

Статистическа значимост в сравнение с контролната група (NaCl): * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

7.1.2. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и baclofen върху телесната температура на плъхове с нормална телесна маса

Прилагането на baclofen (5 mg/kg, i.p.) непосредствено преди leptin (0,5 mg/kg, i.p.) промени ефектите върху телесната температура, както на leptin, така и на baclofen. Не беше наблюдаван нито хипертермичния ефект на leptin, нито хипотермичния ефект на baclofen (Фиг. 11).



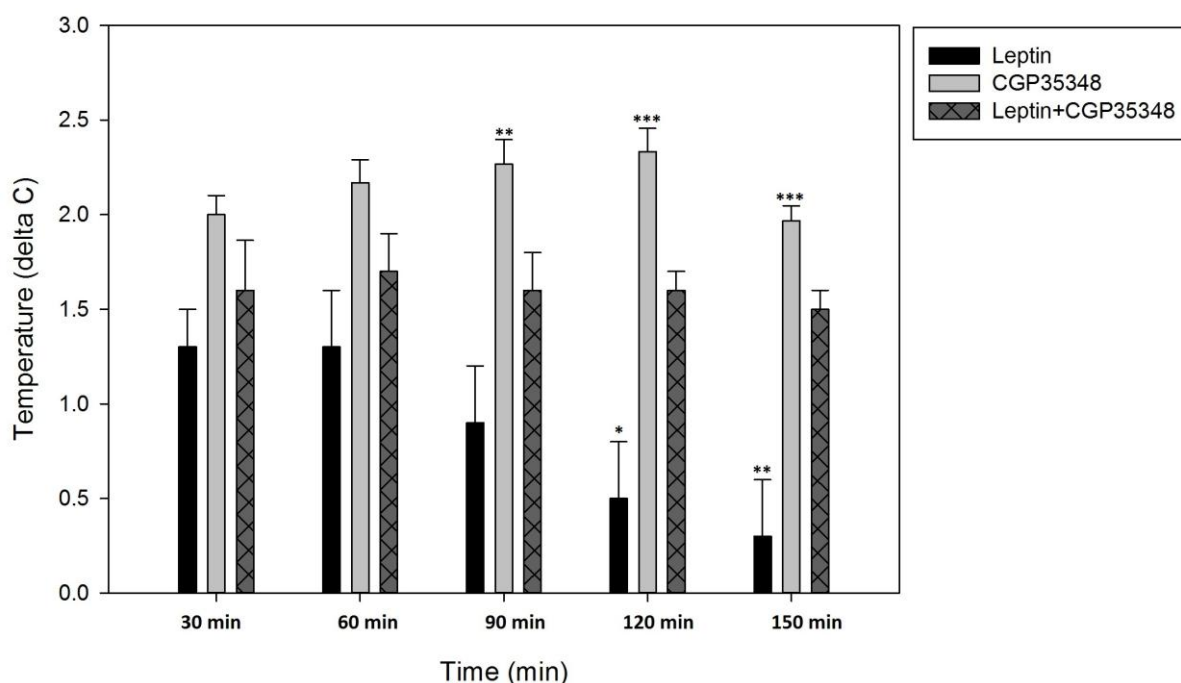
Фиг. 11: Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и baclofen върху телесната температура на плъхове с нормална телесна маса.

Средна промяна на телесната температура на плъхове (temperature delta °C) след интраперитонеално инжектиране на leptin (0,5 mg/kg) и baclofen (5 mg/kg), самостоятелно и в комбинация.

Статистическа значимост в сравнение с комбинацията: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

7.1.3. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и CGP35348 върху телесната температура на плъхове с нормална телесна маса

Не бе наблюдаван синергизъм в хипертермичния ефект на leptin и CGP35348. Прилагането на CGP35348 (5 mg/kg i.p.) непосредствено преди leptin (0,5 mg/kg i.p.) предизвика намаляване на хипертермичната реакция в сравнение със CGP35348 (5 mg/kg i.p.), приложен самостоятелно. Намаляването на хипертермичния ефект на комбинацията беше статистически значимо между 90-та и 150-та min след въвеждането, когато ефектът на самостоятелно приложения leptin не беше вече статистически значим (Фиг. 12).



Фиг. 12: Ефекти на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и CGP35348 върху телесната температура на плъхове с нормална телесна маса.

Средна промяна на телесната температура на плъхове (temperature delta °C) след интраперитонеално инжектиране на leptin (0,5 mg/kg) и CGP35348 (5 mg/kg), самостоятелно и в комбинация.

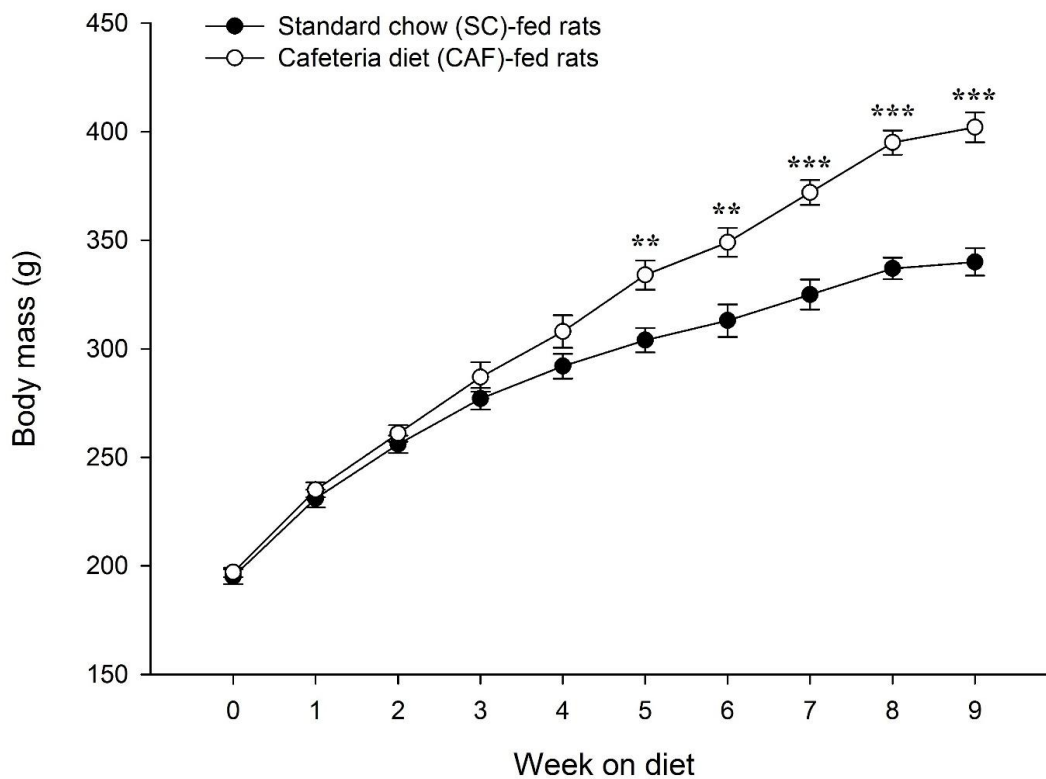
Статистическа значимост в сравнение с комбинацията: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

7.1.4. Получаване на експериментален модел на затлъстяване в плъхове, придружен с хиперлептинемия

Храненето на плъхове с кафетерийната диета (CAF) в продължение на 9 седмици доведе до значително покачване телесната маса. Покачването беше значимо след четвъртата седмица от началото на диетата ($p < 0.01$), като от седмата до деветата седмица статистически значимата разлика в телесната маса беше голяма в сравнение с плъховете с нормална телесна маса ($p < 0.001$). В края на деветата седмица плъховете, получаващи CAF, имаха приблизително 60 грама по-голяма телесна маса в сравнение с плъховете, получаващи само стандартна лабораторна храна (Фиг. 13).

Измерването на назо-аналната дължина не показва разлика между двете групи животни в края на деветата седмица. Плъховете на висококалорийна диета имаха значимо по-големи стойности на индексите на Lee и телесната маса в сравнение с плъховете на стандартна лабораторна храна ($p < 0.001$) в края на диетичния период. Тези стойности бяха по-големи от 0.31 за индекса на Lee и 0.68 за индекса на телесната маса, което демонстрира успешно предизвикан модел на затлъстяване (Фиг. 14, 15).

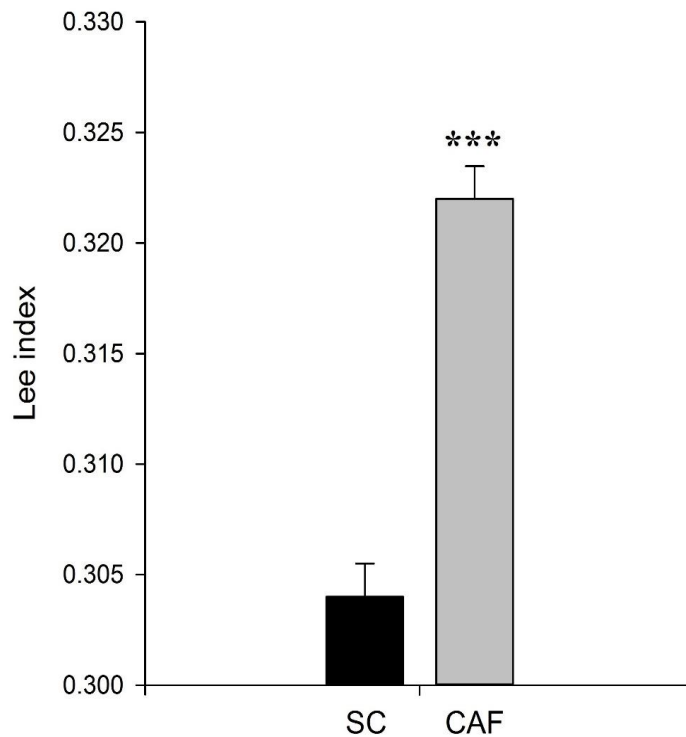
В края на деветата седмица серумната концентрация на лептин в плъховете с експериментален модел на затлъстяване беше значимо по-висока от измерената в плъховете с нормална телесна маса ($p < 0.001$) (Фиг. 16). Установените високи серумни нива на лептин в животните на висококалорийна диета е допълнителен маркер за предизвикания обезитет. Затлъстяването в комбинация с хиперлептинемия демонстрира наличието на лептинова резистентност.



Фиг.13: Промени в телесната маса (*body mass*) на плъхове с нормална телесна маса и експериментален модел на затлъстяване за период от 9 седмици (*week on diet*).

Средна промяна в телесната маса (*body mass*) на плъхове, хранени със стандартна лабораторна храна (*standard chow (SC)-fed rats*, $n=20$), и плъхове, хранени с кафетерийна диета (*cafeteria diet (CAF)-fed rats*, $n=20$) за период от 9 седмици.

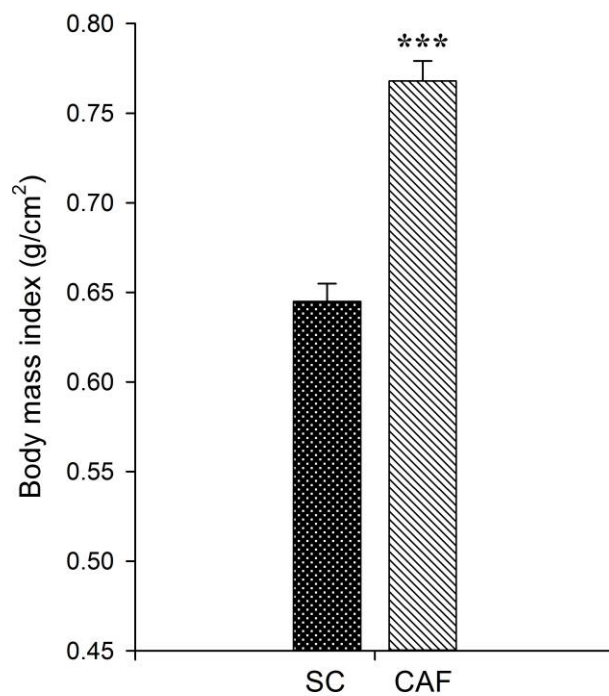
Статистическа значимост в сравнение с групата на стандартна лабораторна храна: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Фиг. 14: Индекс на Lee (Lee index) на плъхове с нормална телесна маса и експериментален модел на затлъстяване.

Средна стойност на Lee индекса на плъхове с нормална телесна маса (*standard chow* (SC), n=20) и плъхове с експериментален модел на затлъстяване (*cafeteria diet* (CAF), n=20). Lee индексът на животните, получаващи CAF, надвишава праговата стойност от 0.31, което демонстрира успешно предизвикан модел на затлъстяване.

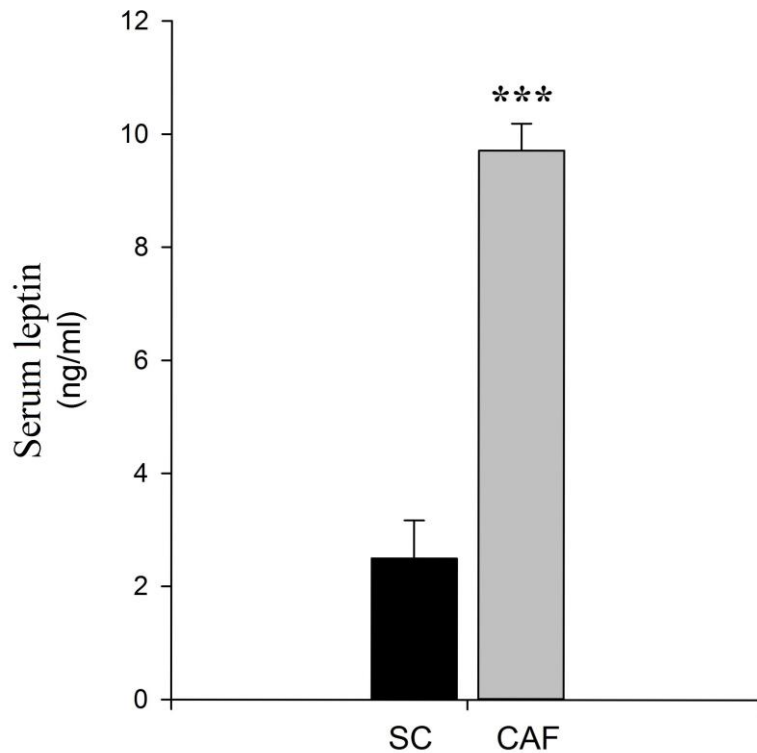
Статистическа значимост в сравнение с групата с нормална телесна маса (SC):
*** $p < 0,001$.



Фиг. 15: Индекс на телесната маса (body mass index, BMI) на плъхове с нормална телесна маса и експериментален модел на затлъстяване.

Средна стойност на BMI на плъхове с нормална телесна маса (*standard chow* (SC), n=20) и плъхове с експериментален модел на затлъстяване (*cafeteria diet* (CAF), n=20). BMI на животните, получаващи CAF, надвишава праговата стойност от 0.68, което демонстрира успешно предизвикан модел на затлъстяване.

Статистическа значимост в сравнение с групата с нормална телесна маса (SC):
*** $p < 0,001$.



Фиг. 16: Серумна концентрация на лептин (*serum leptin*) в плъхове с нормална телесна маса и модел на затлъстяване.

Средна стойност на серумната концентрация на лептин в плъхове с нормална телесна маса (*standard chow* (SC), n=12) и плъхове с експериментален модел на затлъстяване (*cafeteria diet* (CAF), n=12) в края на деветата седмица от диетичния режим.

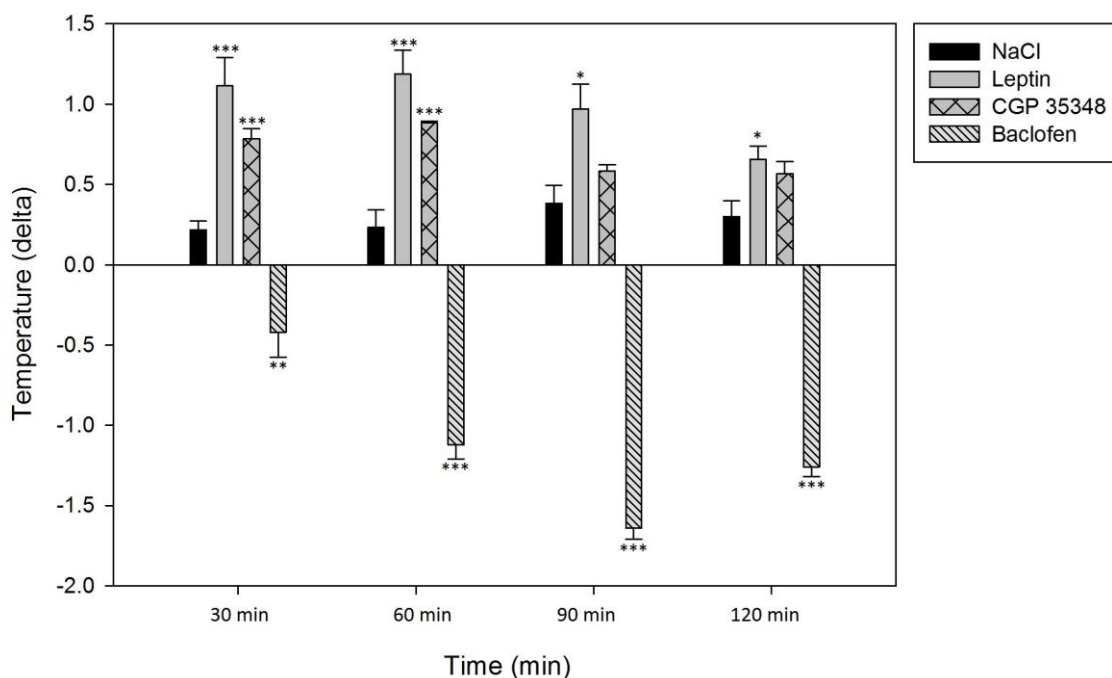
Статистическа значимост в сравнение с групата с нормална телесна маса (SC):
*** $p < 0,001$.

7.1.5. Ефекти на leptin, baclofen и CGP35348, приложени самостоятелно, върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване

Интраперитонеалното инжектиране на leptin в доза 0,5 mg/kg у плъхове с модел на затлъстяване доведе до статистически значимо повишаване на телесната температура на 30^{-та}, 60^{-та}, 90^{-та} и 120^{-та} min след въвеждането (Фиг. 17).

ГАМК_B-рецепторният антагонист CGP35348 (5 mg/kg, i.p.) предизвика значимо повишаване на телесната температура, което бе наблюдавано на 30^{-та} и 60^{-та} min след инжектирането (Фиг. 17).

При инжектирането на ГАМК_B-рецепторния агонист baclofen (5 mg/kg, i.p.) се наблюдаваше значимо понижаване на телесната температура в плъховете между 30^{-та} и 120^{-та} min, с максимум на 90^{-та} min след въвеждането на baclofen (Фиг.17).



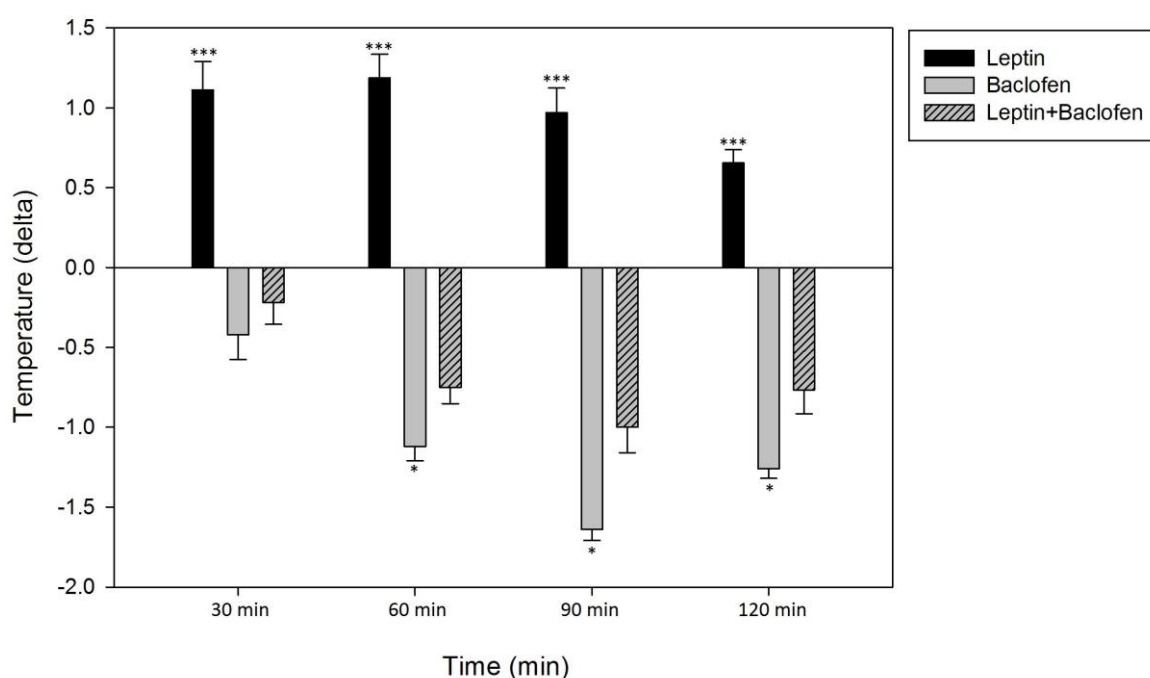
Фиг. 17: Ефекти на интраперитонеално (i.p.) инжектиране на leptin, baclofen и CGP35348, приложени самостоятелно, върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване.

Средна промяна на телесната температура на плъхове (temperature delta °C) след интраперитонеално инжектиране на: leptin (0,5 mg/kg), baclofen (5 mg/kg) и CGP35348 (5 mg/kg).

Статистическа значимост в сравнение с контролната група (NaCl): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

7.1.6. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и baclofen върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване

При комбинираното прилагане на baclofen (5 mg/kg, i.p.) непосредствено преди leptin (0,5 mg/kg, i.p.) се установи понижаване на телесната температура, като ефектът беше по-слабо изразен в сравнение със самостоятелно приложения baclofen. Хипотермичният ефект на комбинацията беше статистически значим между 60^{-та} и 120^{-та} min в сравнение с хипотермичния ефект на самостоятелно приложения baclofen (Фиг.18)



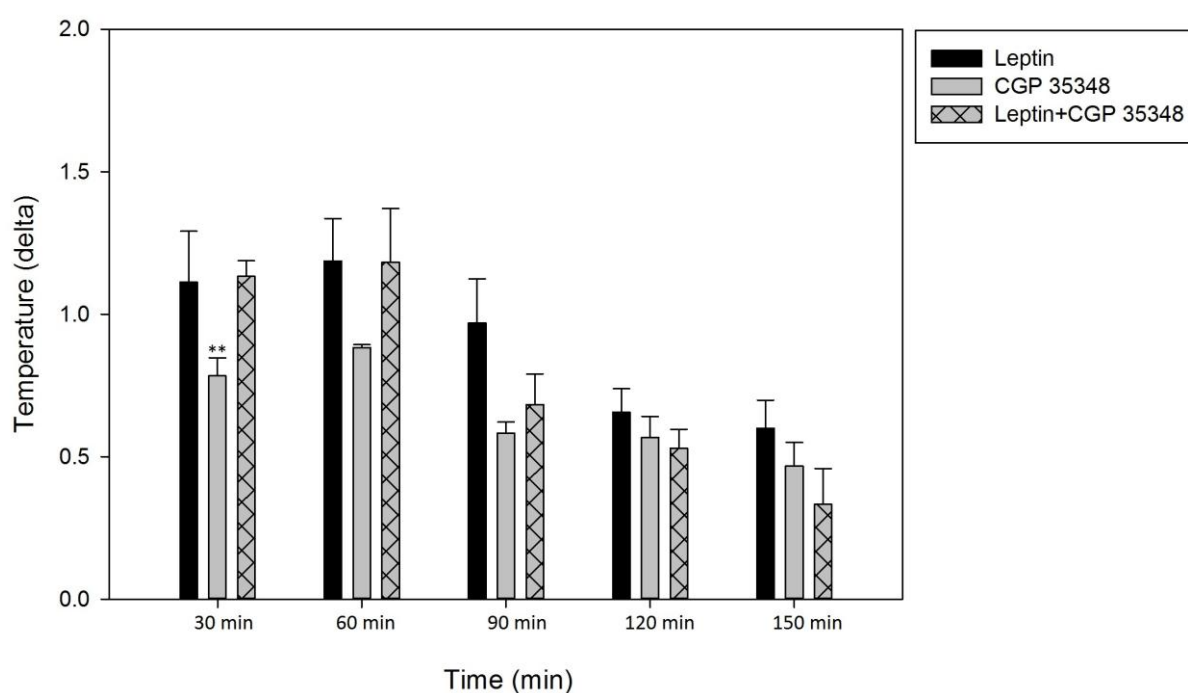
Фиг. 18: Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и baclofen върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване.

Средна промяна на телесната температура на плъхове (temperature delta °C) след интраперитонеално инжектиране на leptin (0,5 mg/kg) и baclofen (5 mg/kg), самостоятелно и в комбинация.

Статистическа значимост в сравнение с комбинацията: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

7.1.7. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и CGP35348 върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване

Комбинираното приложение на leptin и CGP35348 не доведе до синергизъм в хипертермичната реакция. Повишаването на телесната температура при инжектиране на CGP35348 (5 mg/kg i.p.) непосредствено преди leptin (0,5 mg/kg i.p.) не бе по-силно изразено отколкото ефекта при самостоятелното приложение на leptin (Фиг.19).



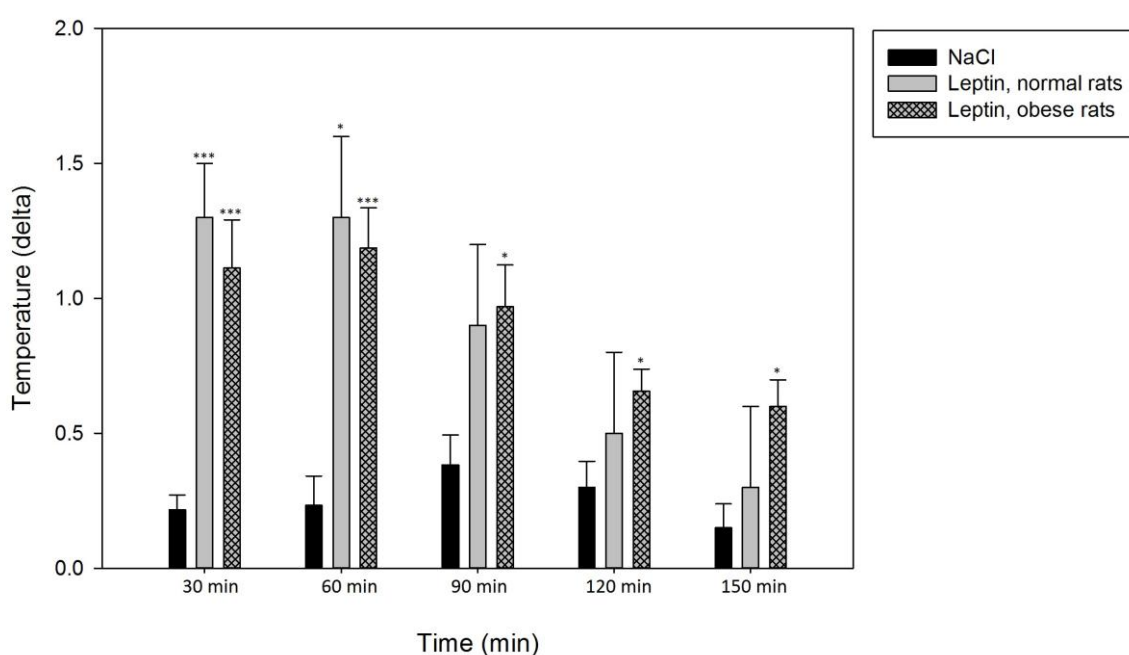
Фиг. 19: Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и CGP35348 върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване.

Средна промяна на телесната температура на плъхове (temperature delta °C) след интраперитонеално инжектиране на leptin (0,5 mg/kg) и CGP35348 (5 mg/kg), самостоятелно и в комбинация.

Статистическа значимост в сравнение с комбинацията: ** $p < 0,01$.

7.1.8. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на leptin върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване, в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса

Прилагането на leptin (0,5 mg/kg i.p.) в двете опитни групи животни доведе до повишаване на телесната температура. При плъховете с модел на затлъстяване се наблюдаваше тенденция към по-слабо повишаване на телесната температура на 30^{-та} и 60^{-та} min., но с по-продължителен ефект в 90^{-та}, 120^{-та} и 150^{-та} min след инжектирането на leptin в сравнение с плъховете с нормална телесна маса (Фиг.20).



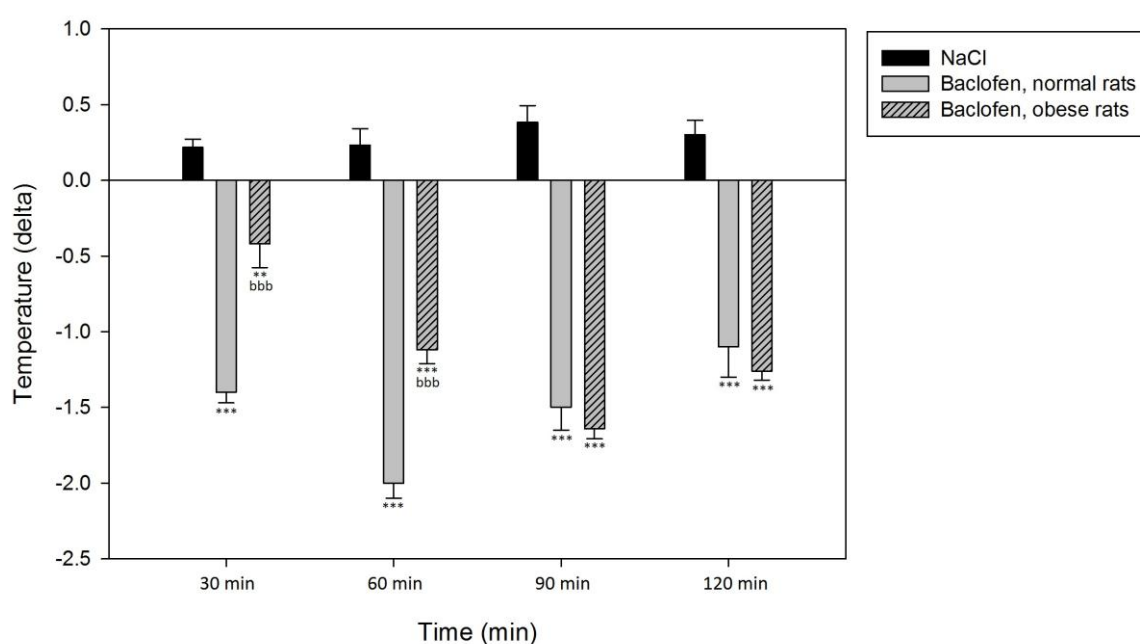
Фиг. 20: Ефекти на интраперитонеално (i.p.) инжектиране на leptin, приложен самостоятелно, върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване (obese rats) в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса (normal rats).

Средна промяна на телесната температура на плъхове (temperature delta °C) след интраперитонеално инжектиране на: leptin (0,5 mg/kg)

*Статистическа значимост в сравнение с контролната група (NaCl): * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.*

7.1.9. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на baclofen върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване, в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса

При инжектирането на ГАМК_B рецепторния агонист baclofen (5 mg/kg, i.p.) се наблюдаваше понижаване на телесната температура в опитните животни. Хипотермичната реакция бе значимо по-слаба на 30^{-та} и 60^{-та} min след инжектирането на baclofen в плъховете с модел на затлъстяване в сравнение с плъховете с нормална телесна маса (Фиг.21).



Фиг. 21: Ефекти на интраперитонеално (i.p.) инжектиране на baclofen, приложен самостоятелно, върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване (obese rats), в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса (normal rats).

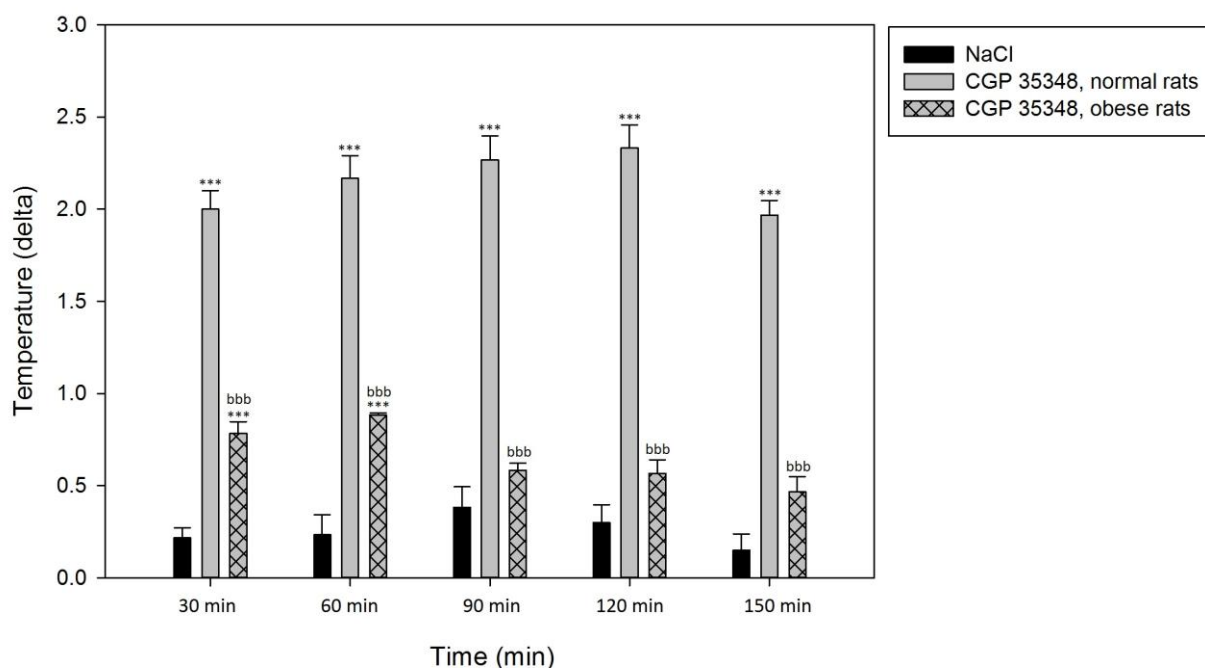
Средна промяна на телесната температура на плъхове (temperature delta °C) след интраперитонеално инжектиране на baclofen (5 mg/kg).

Статистическа значимост в сравнение с контролната група (NaCl): ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Статистическа значимост в сравнение с плъхове с нормална телесна маса (Baclofen, normal rats): ^{bbb} $p < 0,001$.

7.1.10. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на CGP35348 върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване, в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса

След въвеждането на ГАМК_B-рецепторния антагонист CGP35348 (5 mg/kg, i.p.) в двете групи опитни животни беше регистрирана хипертермична реакция. Покачването на телесната температура в плъховете с модел на затлъстяване беше значимо по-слабо ($p < 0,001$) на 30-та, 60-та, 90-та, 120-та и 150-та min след инжектирането на CGP35348 в сравнение с плъховете с нормална телесна маса (Фиг.22).



Фиг. 22: Ефекти на интраперитонеално (i.p.) инжектиране на CGP35348, приложен самостоятелно, върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване (obese rats), в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса (normal rats)

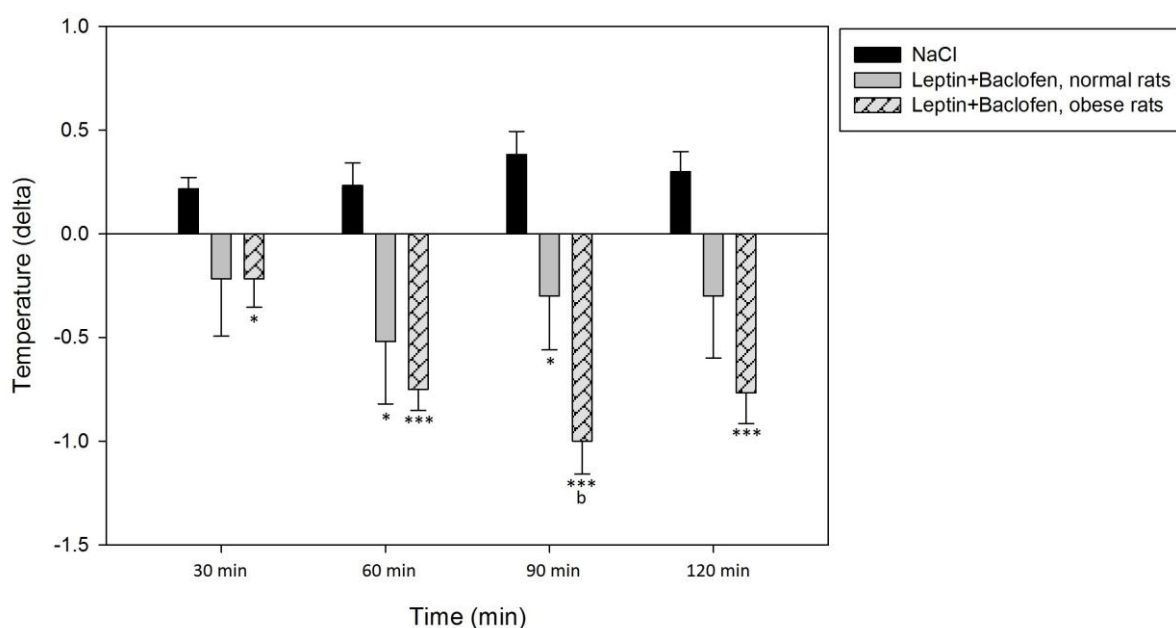
Средна промяна на телесната температура на плъхове (temperature delta °C) след интраперитонеално инжектиране на CGP35348 (5 mg/kg).

Статистическа значимост в сравнение с контролната група (NaCl): *** $p < 0,001$.

Статистическа значимост в сравнение с плъхове с нормална телесна маса (CGP35348, normal rats): ^{bbb} $p < 0,001$.

7.1.11. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и baclofen върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване, в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса

При комбинираното прилагане на leptin (0,5 mg/kg, i.p.) и baclofen (5 mg/kg, i.p.) в плъхове с модел на затлъстяване се наблюдаваше значимо понижаване на телесната температура, регистрирано на 90^{-та} min след инжектирането на комбинацията, в сравнение с плъховете с нормална телесна маса (Фиг.23).



Фиг. 23: Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и baclofen върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване (obese rats), в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса (normal rats)

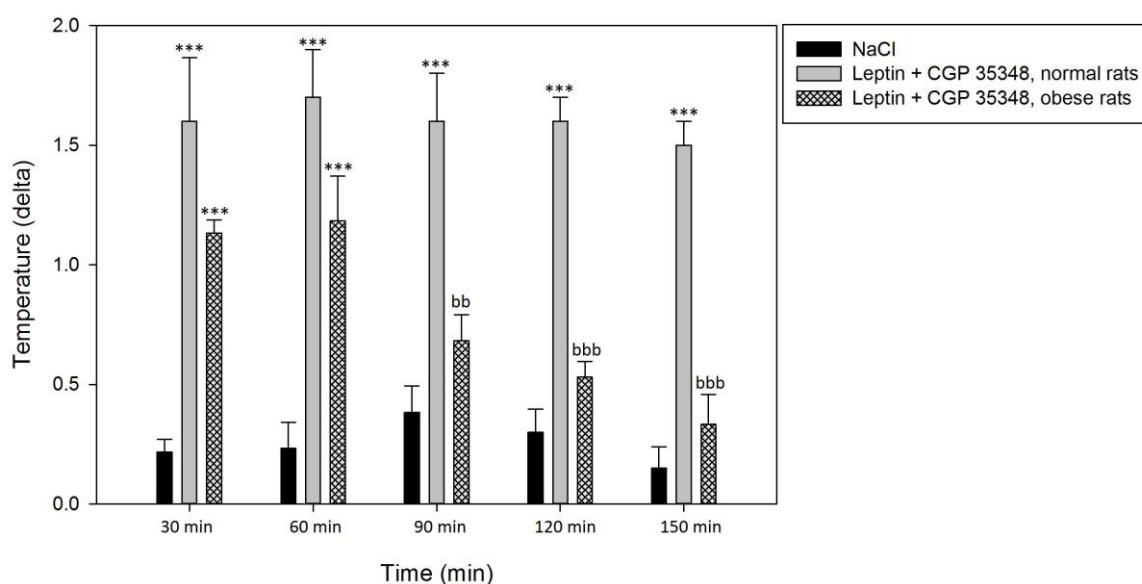
Средна промяна на телесната температура на плъхове (temperature delta °C) след интраперитонеално инжектиране на комбинация от leptin (0,5 mg/kg) и baclofen (5 mg/kg).

Статистическа значимост в сравнение с контролната група (NaCl): * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Статистическа значимост в сравнение с плъхове с нормална телесна маса (Leptin+Baclofen, normal rats): ^b $p < 0,05$.

7.1.12. Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и CGP35348 върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване, в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса

Комбинираното прилагане на leptin (0,5 mg/kg, i.p.) и CGP35348 (5 mg/kg, i.p.) доведе до повишаване на телесната температура в опитните животни. Хипертермичната реакция бе значимо по-слабо изразена в плъховете с модел на затлъстяване на 90-та, 120-та и 150-та min след инжектирането на комбинацията в сравнение с плъховете с нормална телесна маса (Фиг.24).



Фиг. 24: Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и CGP35348 върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване (obese rats), в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса (normal rats).

Средна промяна на телесната температура на плъхове (temperature delta °C) след интраперитонеално инжектиране на комбинация от leptin (0,5 mg/kg) и CGP35348 (5 mg/kg).

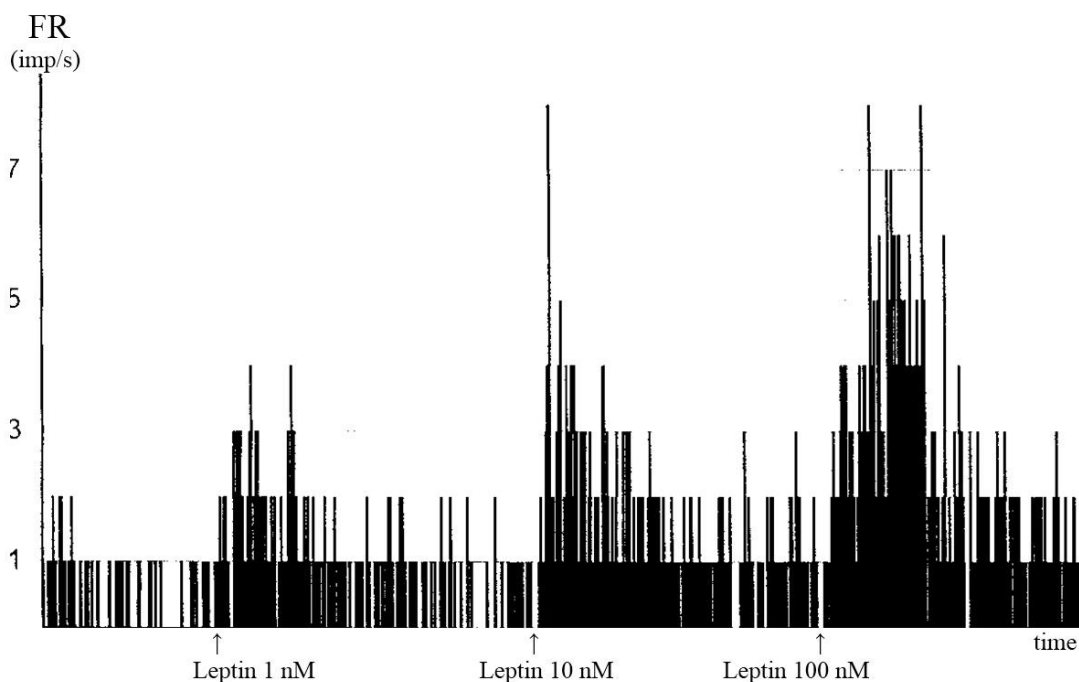
Статистическа значимост в сравнение с контролната група (NaCl): *** $p < 0,001$.

Статистическа значимост в сравнение с плъхове с нормална телесна маса (Leptin+CGP35348, normal rats): $^{bb}p < 0,01$; $^{bbb}p < 0,001$.

7.2. In vitro експерименти

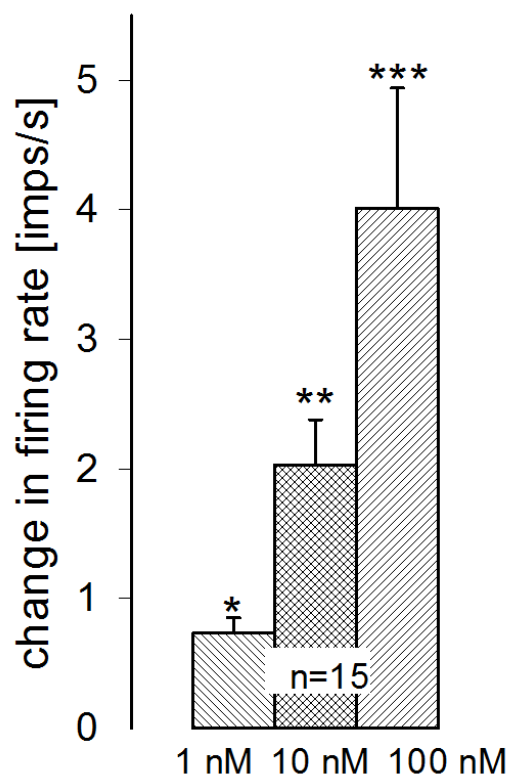
7.2.1. Ефекти на leptin върху невроналната активност на неврони от РО/АН на плъхове с нормална телесна маса

Бяха проведени проучвания върху неврони, регистрирани екстрацелуларно, в МРА на хипоталамични срезове от плъхове. Петнадесет екстрацелуларно регистрирани неврона, независимо от типа на тяхната температурна чувствителност, бяха използвани за проучване на промените в невроналната активност (firing rate, FR) под влияние на leptin в концентрации 1 nM, 10 nM и 100 nM, прилаган при спазване на различен ред на еднократно инжектиране на различните дози. Leptin доза-зависимо повиши невроналната активност на невроните в МРА на плъхове, независимо от типа на тяхната температурна чувствителност (Фиг. 25 и Фиг. 26).



Фиг. 25: Ефекти на leptin върху активността (firing rate, FR) на неврон в МРА на плъх с нормална телесна маса.

Оригинален запис на невроналната активност (FR, imp/s) от неврон в медиалната преоптична област в хипоталамичен срез от плъх. Leptin (стрелките: 0.1 ml от разтвор с концентрация 1 nM, 10 nM и 100 nM, bolus injection) повишава доза-зависимо невроналната активност. След отмиване на веществото с ACSF невроналната активност се възстановяваше.



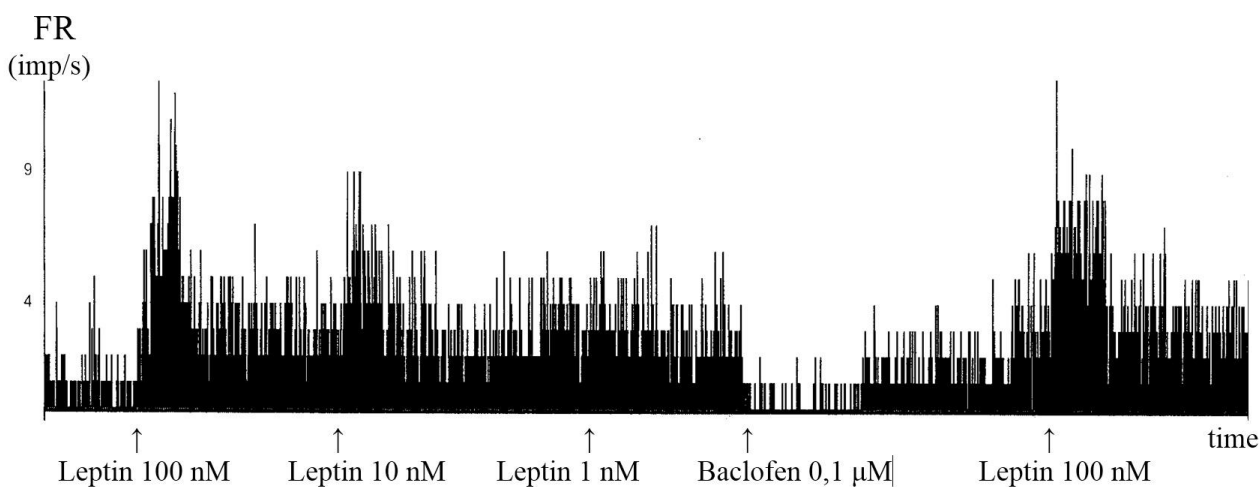
Фиг. 26: Доза-отговор ефекти на leptin върху невроналната активност на неврони в МРА от плъхове с нормална телесна маса.

Средна промяна на невроналната активност (imps/s) при екстрацелуларно регистрирани неврони в МРА, след прилагане на leptin (0.1 ml, bolus injection) в концентрации 1 nM, 10 nM и 100 nM, съответно, прилагани по различен ред върху изследваните неврони. Leptin доза-зависимо повишава тоничната активност (firing rate) на невроните в МРА, независимо от типа на тяхната температурна чувствителност.

Статистически значими стойности: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; брой на изследваните неврони ($n = 15$).

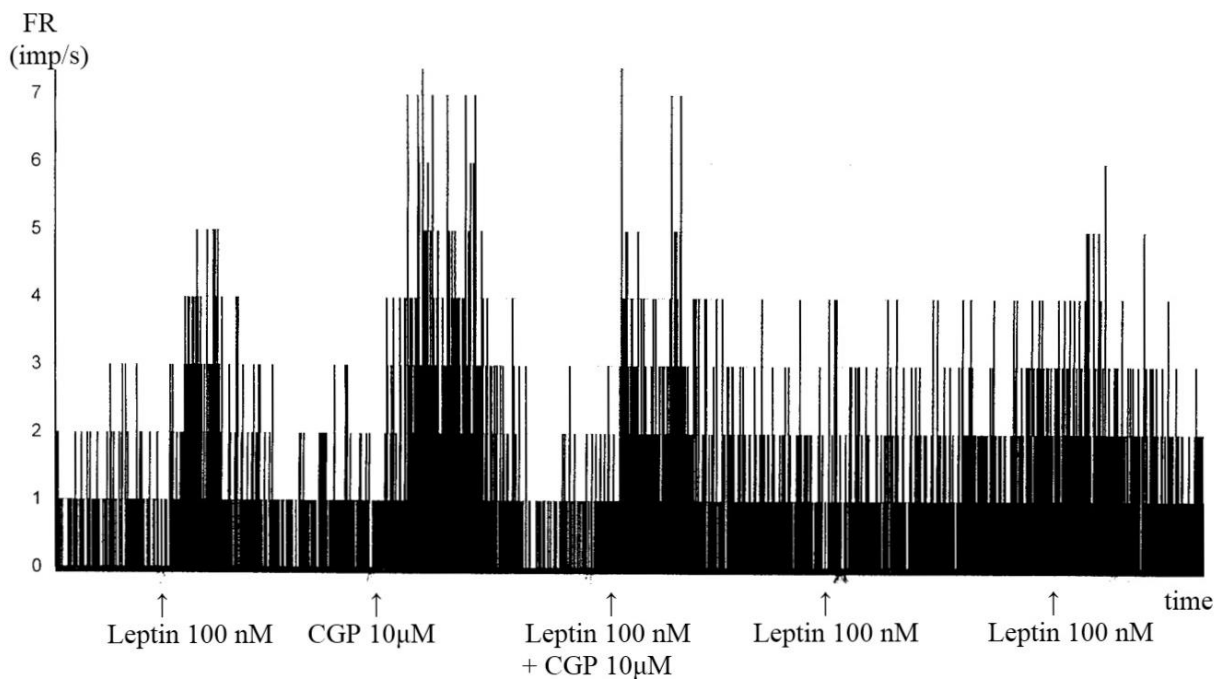
7.2.2. Ефекти на leptin, baclofen и CGP35348, приложени самостоятелно и в комбинация, върху невроналната активност на неврони от РО/АН на плъх с нормална телесна маса

При прилагането на leptin и ГАМК_B-агониста baclofen на един и същи неврон, не се установи значима промяна в техните самостоятелни ефекти (Фиг. 27 и Фиг. 29), а едновременното им прилагане - доведе до премахване на самостоятелните им ефекти. При комбинираното прилагане на leptin и ГАМК_B-антагониста CGP35348 не се наблюдаваше синергизъм, а обратно - намаляване на ефекта върху невроналната активност на комбинацията в сравнение с ефектите на самостоятелно приложените вещества (Фиг. 28). След прилагането на комбинация от leptin и ГАМК_B-антагониста CGP35348, самостоятелният ефект на leptin намаля значимо и беше необходимо продължително промиване с ACSF, докато се постигне възстановяване на ефекта на самостоятелното приложение на leptin (Фиг. 28 и Фиг. 29).



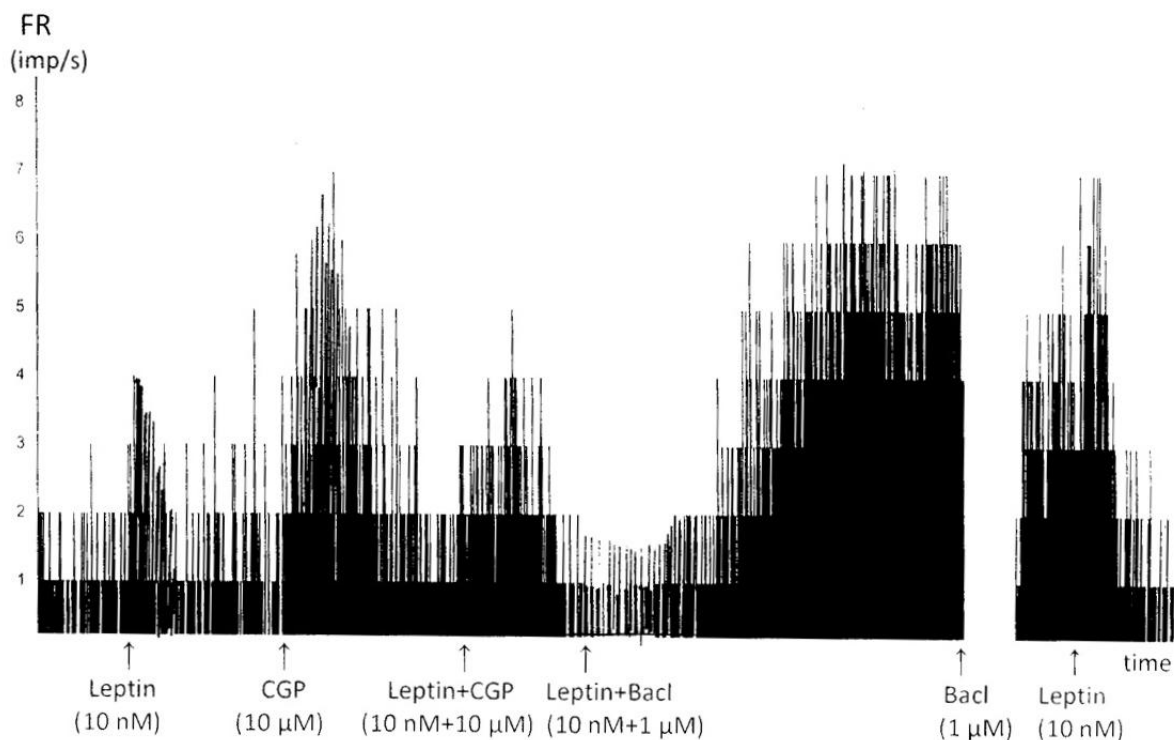
Фиг. 27: Ефекти на leptin и baclofen върху активността (FR) на неврон в МРА на плъх с нормална телесна маса.

Оригинален запис на невроналната активност (FR, imp/s) от неврон в медиалната преоптична област в хипоталамичен срез от плъх, след прилагане на (0.1 ml bolus injection) leptin (100 nM, 10 nM и 1 nM) и baclofen 0,1 μM.



Фиг. 28: Ефекти на leptin и CGP35348 върху активността (FR) на неврон в МРА на плъх с нормална телесна маса.

Оригинален запис на невроналната активност (FR, imp/s) от неврон в медиалната преоптична област в хипоталамичен срез от плъх след прилагане на (0.1 ml bolus injection) Leptin (100 nM) и CGP35348 10 μM, самостоятелно и в комбинация. Необходимо бе продължително промиване на неврона с ACSF до възстановяването на ефекта на лептина, след третирането с ГАМК_B-антагониста CGP35348.



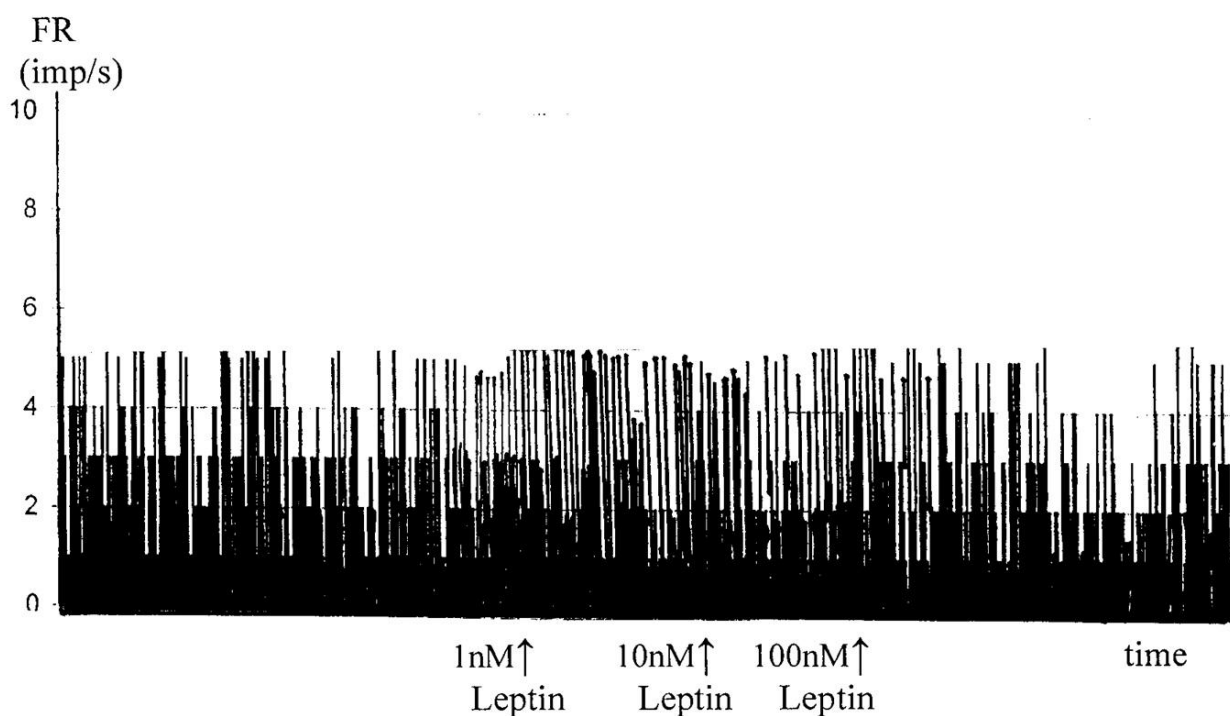
Фиг. 29: Ефекти на leptin, CGP35348 и baclofen върху активността (FR) на неврон в МРА на плъх с нормална телесна маса.

Оригинален запис на невроналната активност (FR, imp/s) от неврон в медиалната преоптична област в хипоталамичен срез от плъх след прилагане на (0.1 ml bolus injection) Leptin (1 nM), CGP35348 10 μM (самостоятелно и в комбинация) и Baclofen (0.1 μM и 1 μM).

Необходимо бе продължително промиване на неврона с ACSF до възстановяването на ефекта на лептина, след третирането с ГАМК_B-антагониста CGP35348, както и на спонтанното подобряване на невроналната активност, след третирането с лептин и ГАМК-ергични средства.

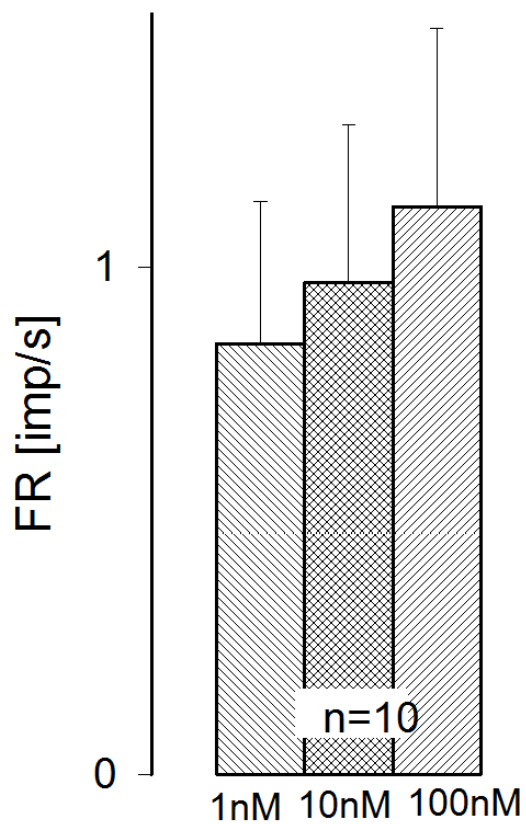
7.2.3. Ефекти на leptin върху невроналната активност на неврони от РО/АН на плъхове с експериментален модел на затлъстяване

Десет екстрацелуларно регистрирани неврона, независимо от типа на тяхната температурна чувствителност, бяха използвани за проучване на промените в невроналната активност (firing rate, FR) под влияние на leptin в концентрации 1 nM, 10 nM и 100 nM, прилаган при спазване на различен ред на еднократно инжектиране на различните дози. Leptin не доведе до значимо повишаване на невроналната активност на невроните от МРА на плъхове с експериментален модел на затлъстяване. (Фиг. 30 и Фиг. 31).



Фиг. 30: Ефекти на leptin върху активността (FR) на неврон в МРА на плъх с модел на затлъстяване.

Оригинален запис на невроналната активност (FR, imp/s) от неврон в медиалната преоптична област в хипоталамичен срез от плъх с модел с диетиндуцирано затлъстяване. Leptin (стрелките: 0.1 ml от разтвор с концентрация 1 nM, 10 nM и 100 nM, bolus injection) не променя значимо невроналната активност.

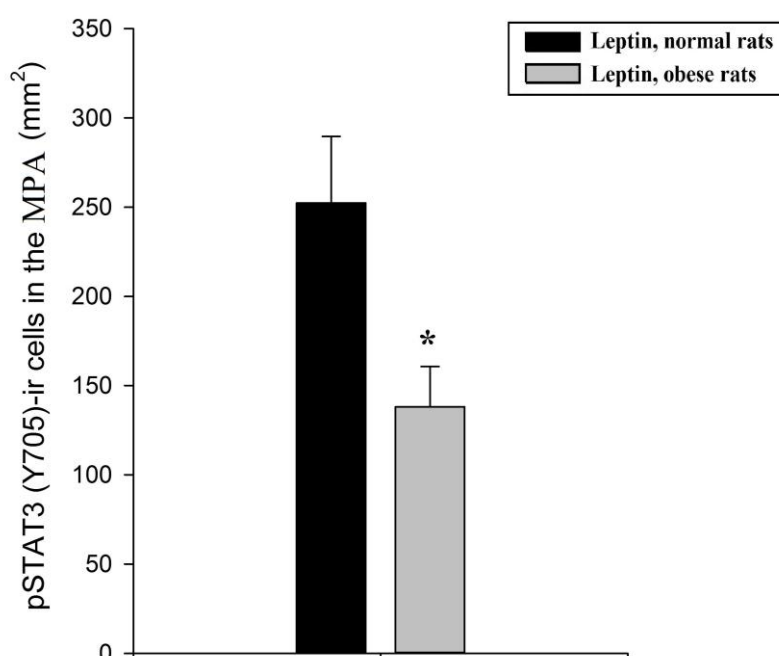


Фиг. 31: Доза-отговор ефекти на leptin върху невроналната активност на неврони в МРА от плъхове с модел на затлъстяване.

Средна промяна на невроналната активност (imps/s) при екстрацелуларно регистрирани неврони в МРА след прилагане на leptin (0.1 ml, bolus injection) в концентрации 1 nM, 10 nM и 100 nM, съответно, прилагани по различен ред върху изследваните неврони. Leptin не повлиява значимо firing rate на невроните в МРА, както и няма значим доза-отговор ефект.

7.3. Имунохистохимично изследване на pSTAT3 в РО/АН на плъхове с нормална телесна маса и експериментален модел на затлъстяване

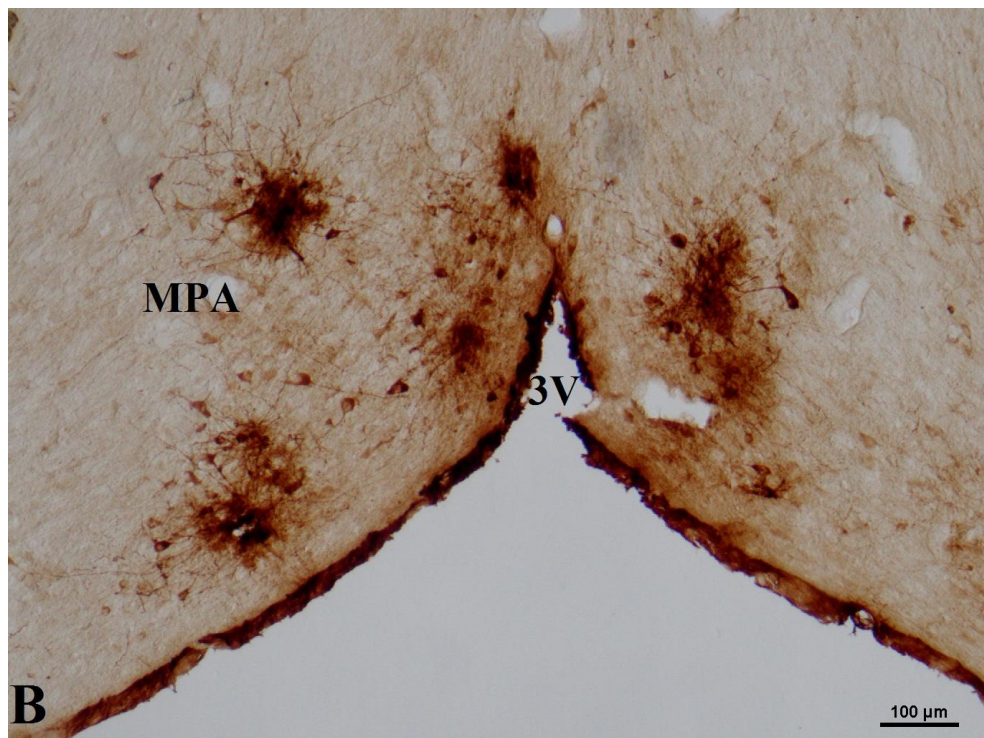
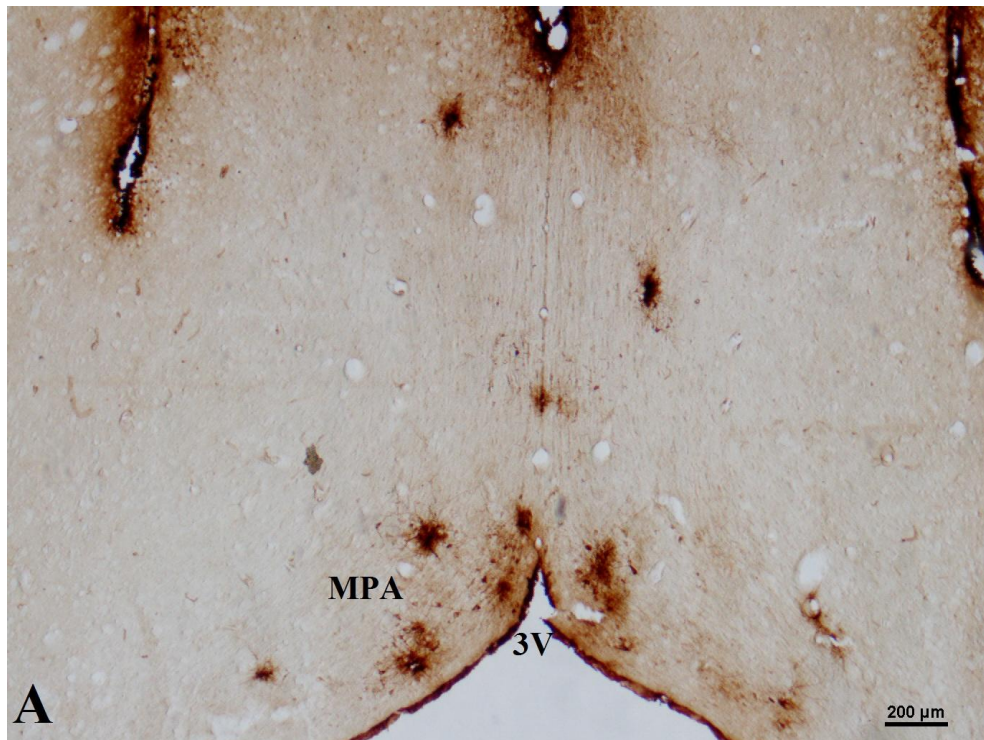
Интраперитонеалното инжектиране на leptin в доза 0,5 mg/kg в плъхове с нормална телесна маса и експериментален модел на затлъстяване доведе до повишаване броя на pSTAT3- позитивните неврони в МРА. Броят на маркираните клетки в МРА беше значимо по-голям в животните с нормална телесна маса в сравнение с животните с модел на затлъстяване ($p < 0.05$) (Фиг. 32). Освен това интензитета на имунохистохимичната реакция беше по- силно изразен в групата с нормална телесна маса (Фиг. 33, Фиг. 34, Фиг. 35, Фиг. 36). Маркиране на pSTAT3- позитивни неврони в МРА липсваше или беше незначително в третираните с физиологичен разтвор животни.



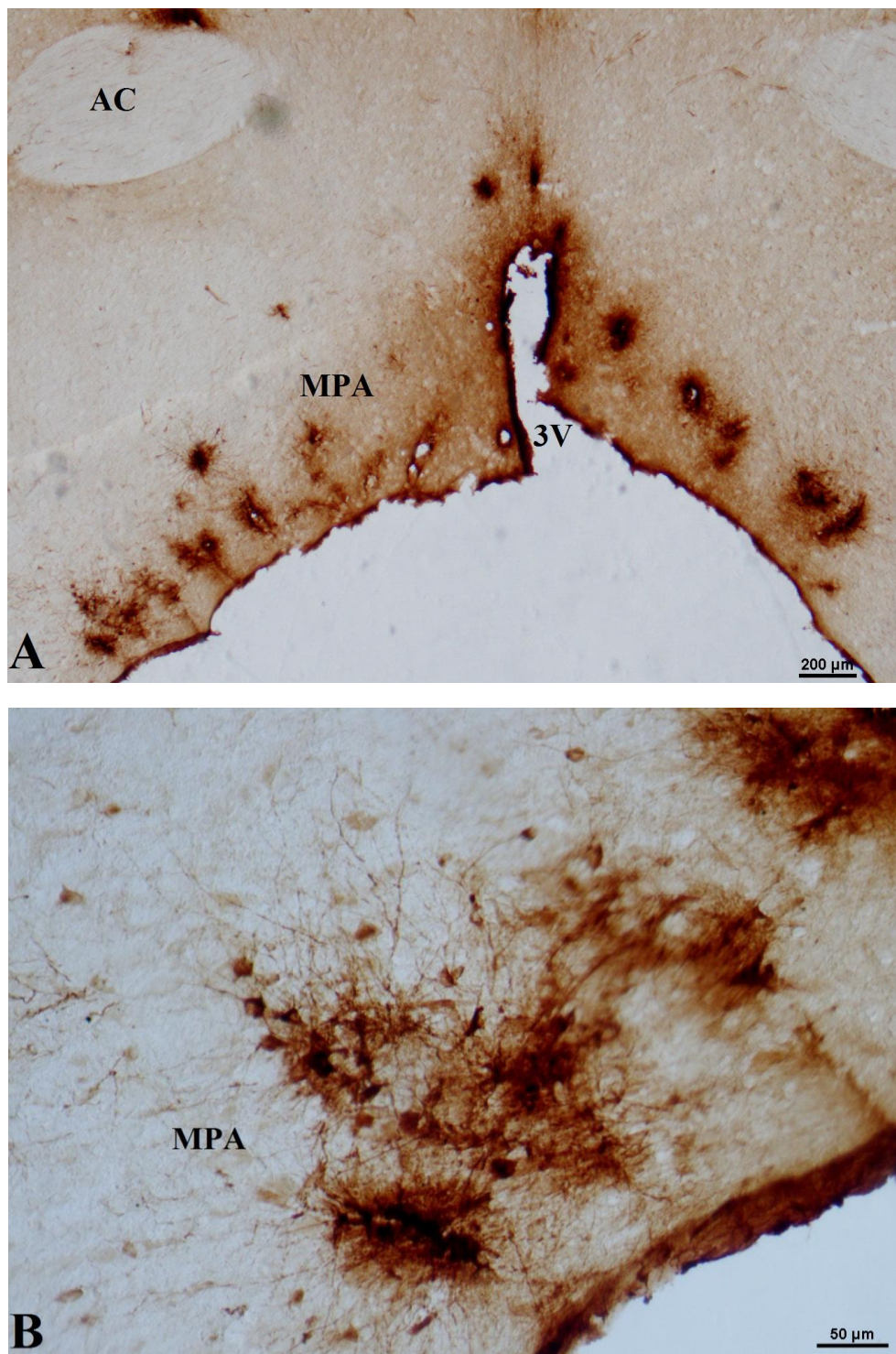
Фиг. 32: Среден брой на pSTAT3 маркираните неврони в МРА на плъхове с нормална телесна маса (normal rats) и модел на затлъстяване (obese rats) след системно прилагане на лептин.

Имунохистохимично изследване на pSTAT3 в медиалната преоптична област на предния хипоталамус (МРА) в плъхове с нормална телесна маса (n=3) и затлъстяване (n=3) 45 минути след интраперитонеално инжектиране на leptin в доза 0,5 mg/kg.

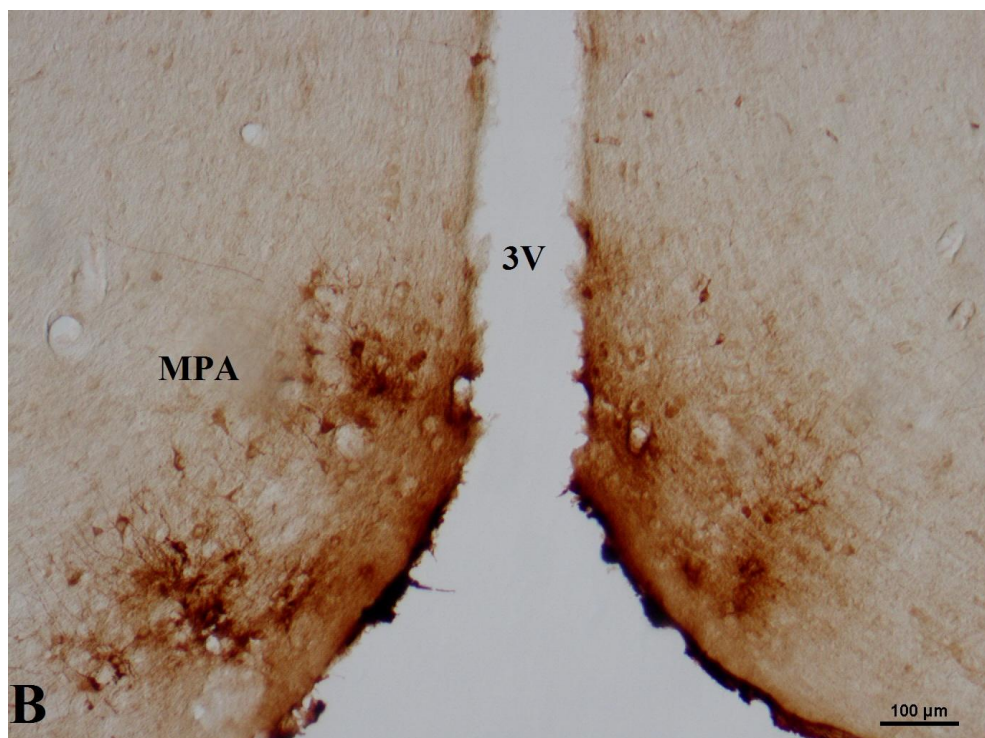
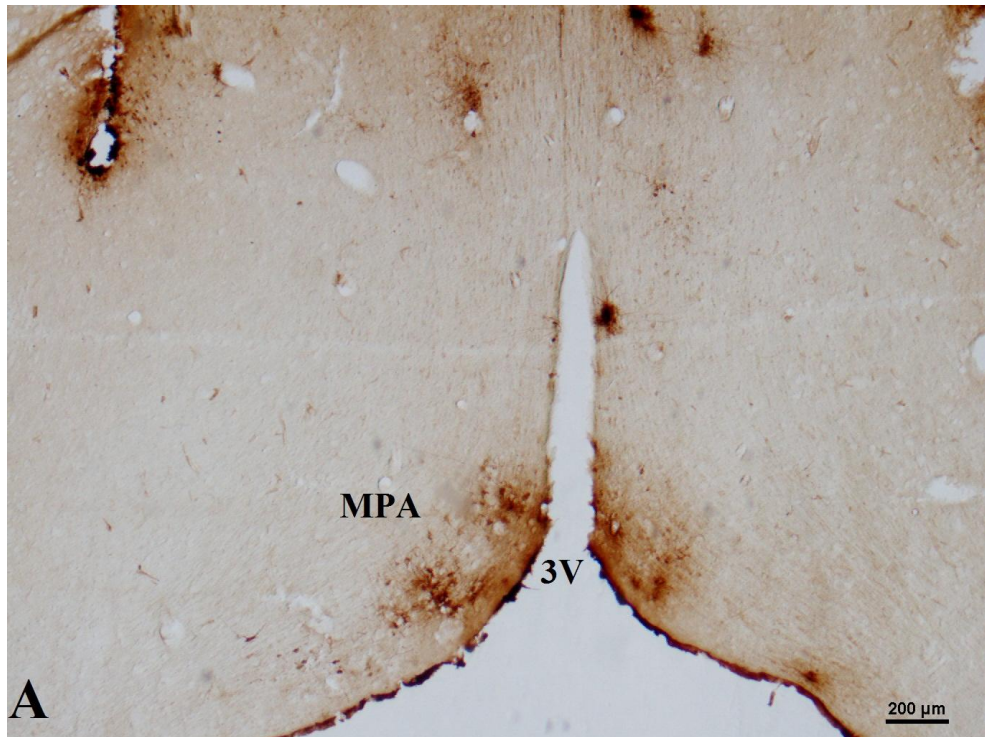
*Статистическа значимост в сравнение с групата с нормална телесна маса: * $p < 0,05$.*



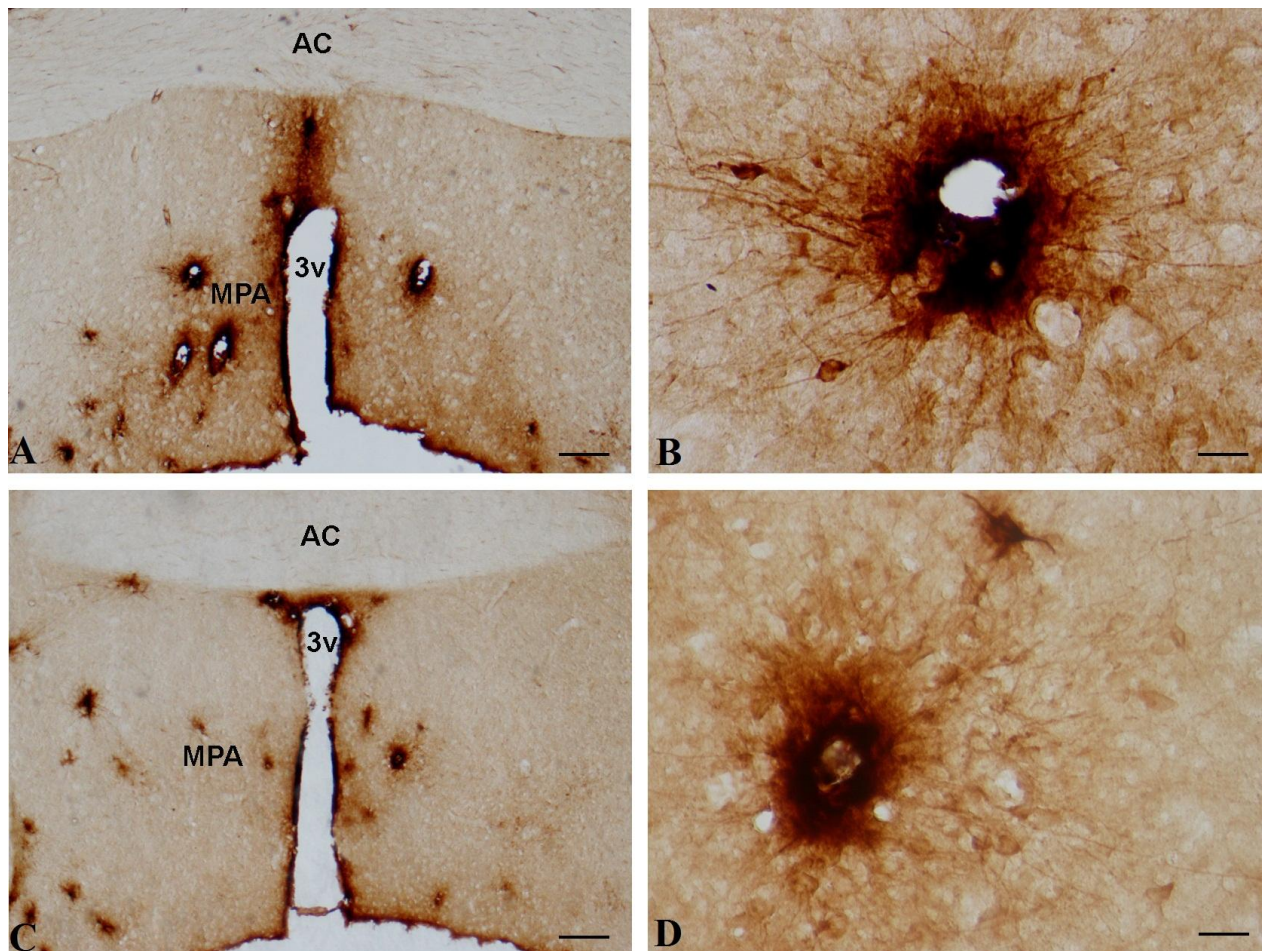
Фиг. 33: Имунохистохимично маркиране на pSTAT3-позитивните неврони в медиалната преоптична област на предния хипоталамус на плъх с нормална телесна маса след *i.p.* инжектиране на лептин. **A.** Увеличение- *x* 40. **B.** Увеличение- *x* 100. **MPA**, медиална преоптична област на предния хипоталамус; **3V**, трети мозъчен вентрикул.



Фиг. 34: Имунохистохимично маркиране на pSTAT3-позитивните неврони в медиалната преоптична област на предния хипоталамус на плъх с нормална телесна маса след *i.p.* инжектиране на лептин. **A.** Увеличение- x 40. **B.** Увеличение- x 200. **MPA**, медиална преоптична област на предния хипоталамус; **3V**, трети мозъчен вентрикул; **AC**, *commissura anterior*.



Фиг. 35: Имунохистохимично маркиране на pSTAT3-позитивните неврони в медиалната преоптична област на предния хипоталамус на плъх с модел на затлъстяване след *i.p.* инжектиране на лептин. **A.** Увеличение- х 40. **B.** Увеличение- х 100. **MPA**, медиална преоптична област на предния хипоталамус; **3V**, трети мозъчен вентрикул.



Фиг. 36: Имунохистохимично маркиране на pSTAT3-позитивните неврони в медиалната преоптична област на предния хипоталамус (Брегма ниво: -0,3 mm) на плъх с нормална телесна маса (A, B) и експериментален модел на затлъстяване (C, D) след i.p. инжектиране на лептин.

A, C. Увеличение- x 40. Размерна линия- 200µm. B, D. Увеличение- x 200. Размерна линия- 50µm. MPA, медиална преоптична област на предния хипоталамус; 3V, трети мозъчен вентрикул; AC, commissura anterior.

8. ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

В проведените от нас *in vivo* изследвания върху плъхове с нормална телесна маса се установи, че системното прилагане на leptin предизвиква значима хипертермия, както и прилагането на ГАМК_B-антагониста CGP35348, докато ГАМК_B-агониста baclofen води до понижаване на телесната температура. Не се наблюдаваше синергизъм при хипертермичния ефект на leptin и ГАМК_B-антагониста при едновременното им прилагане. Нито хипертермичният ефект на leptin, нито хипотермичният ефект на ГАМК_B-агониста baclofen се наблюдаваше при комбинираното им прилагане. *In vivo* ефектите бяха в корелация с установените *in vitro* промени в невроналната активност на невроните в МРА на плъхове с нормална телесна маса.

Основно значение за регулацията на телесната температура в организма се отдава на невроните, разположение в РО/АН. Знае се, че тези неврони оказват модулиращо действие върху преomotorните симпатикови неврони в ростралното *raphe pallidus* ядро (rRPa), което е част от вентромедиалния медуларен регион (Фигура 6). Инхибирането на серотониновите рецептори в rRPa предотвратява лептин индуцираната термогенеза, въпреки че рецептори за лептин не са директно експресирани върху невроните в rRPa [Morrison., 2004]. Оттук става ясно, че термогенното действие на лептина обхваща невронни вериги, които индиректно модулират активността на невроните в rRPa. Освен това невроните в РО/АН регулират активността на невроните в дорзомедиалния хипоталамус (DMH) [Cao et Morrison, 2006; Nakamura et al., 2002, Morrison et Nakamura, 2011], друг важен терморегулаторен участък в хипоталамуса. В DMH се намират част от възбудните, глутаматергични неврони, които изпращат еферентни влакна до невроните в rRPa и са от решаващо значение за по-нататъшното им стимулиране, и съответно активиране на термогенезата в КМТ. В описаната невронална верига (РО/АН >DMH>rRPa>КМТ) експресия на LepRb е установена само в невроните от РО/АН и DMH, което дава основание да се счита, че именно тези неврони са прицелни за ефектите на лептина върху терморегулацията (Фигура 37) [Zhang et al., 2011]. В рамките на РО/АН най-голяма плътност на лептиновите рецептори е открита в МРА [Scott et al., 2009; Frontini et Giordano, 2010; Hubschle et al., 2001]. В проведените от нас *in vitro* електрофизиологични изследвания ние за първи път демонстрирахме, че прилагането на лептин върху хипоталамични срези от плъхове

с нормална телесна маса предизвика доза-зависимо повишаване на невроналната активност при всички типове неврони в МРА. Нашите резултати от имунохистохимичните изследвания показаха силно увеличаване на фосфорилирания STAT3 в МРА на плъхове с нормална телесна маса след системно инжектиране на лептин, което допълнително подчертава, че LepRb невроните в МРА са прицелни за осъществяването на терморегулаторните ефекти на лептин.

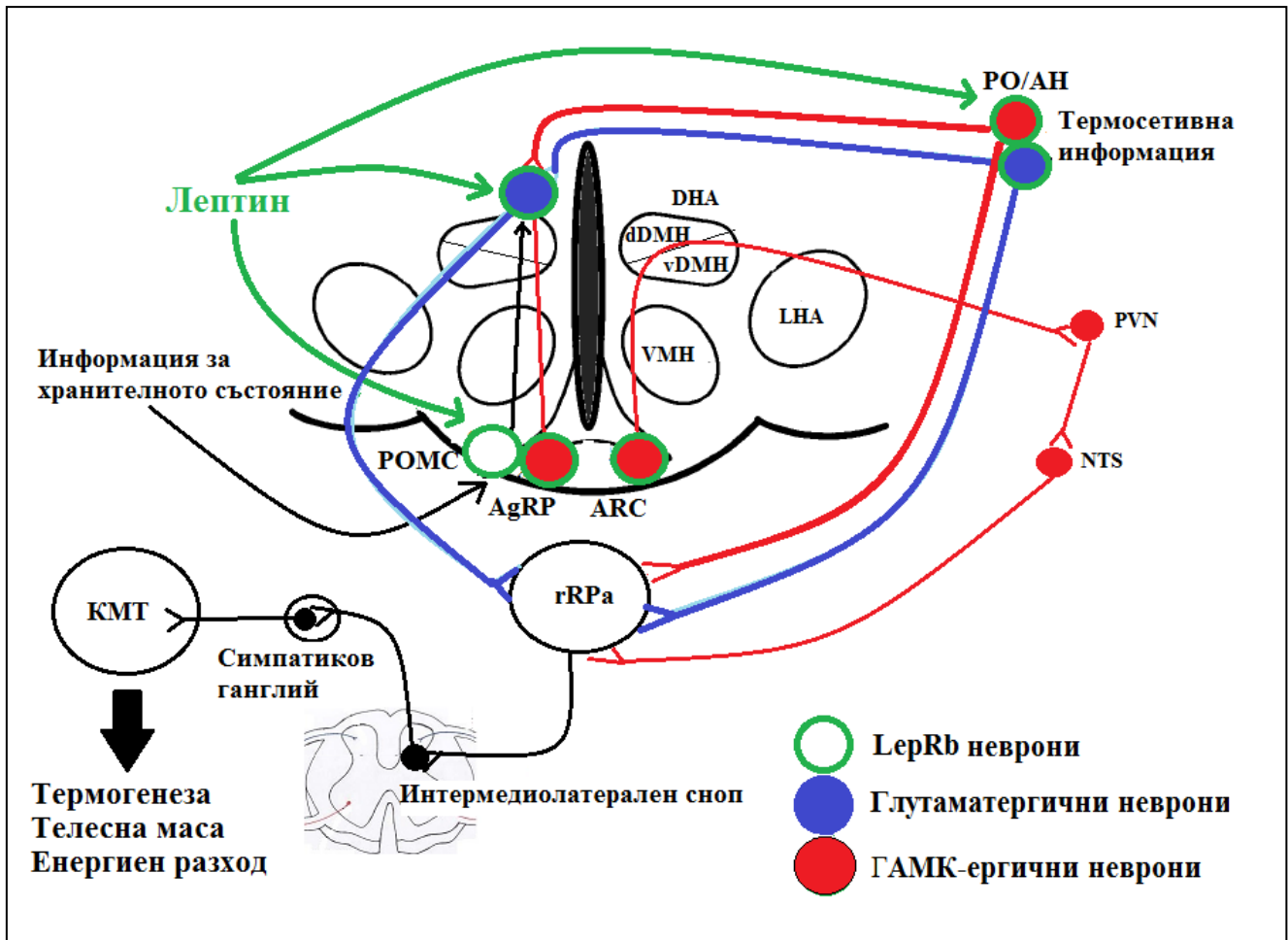
Излагането на студ увеличава експресията на c-Fos в LepRb невроните от DMH, а инжектирането на лептин в DMH води до увеличаване на температурата, измерена в КМТ [Zhang et al., 2011; Enriori et al., 2011]. Все още не е ясно как точно термогенното действие на лептина се интегрира на ниво РО/АН и DMH. Предполага се, че лептинът модулира ГАМК-ергичните проекции на МРА до DMH и стимулира глутаматергичните неврони в DMH, което води до увеличаване на термогенезата в КМТ (Фигура 37) [Zhang et al., 2011]. В нашите *in vitro* проучвания ние ясно показахме съществуването на взаимодействия между лептин и ГАМК върху невроналната активност на неврони от МРА. Предстои да се установи в детайли невробиохимичната природа на тези терморегулаторни невронални пътища. Наскоро бе установена функцията на глутаматергичните LepRb неврони в РО/АН, активиращи се при повишаване на околната температура. Тяхната фармакогенетична активация е довела до силно потискане на енергийния разход и хранителния прием, което е предизвикало понижаване на телесната температура и телесната маса. От резултатите беше направено заключението, че LepRb невроните в РО/АН изпълняват основна роля в поддържането на енергийната хомеостаза чрез регулиране на телесната температура и хранителния прием [Yu et al., 2016]. Също така се установи, че лептин стимулира продукцията на интерлевкин 1 и простагландини, които, повлиявайки активността на невроните в РО/АН, също допринасят за покачването на телесната температура [Luheshi et al., 1999]. Ниските нива на лептин по време на гладуване или неговата липса водят до необичаен възпалителен отговор и необичайно настъпване на трескаво състояние по време на възпаление в организма [Inoue et Luheshi, 2010].

Съществуват данни, че хипоталамичният ARC също участва в терморегулаторните ефекти на лептина (Фигура 37). Анорексогенните POMC неврони и орексогенните AgRP неврони са регулирани в отговор на различни хранителни състояния, като това отчасти се медира от действието на лептин.

Селективното премахване на LepRb невроните в ARC е в състояние да отслаби лептин-индуцирана стимулация на симпатиковата активност в КМТ [Harlan et al., 2011]. Невропептидите получени от POMC се свързват и стимулират меланокортин-4-рецепторите (MC4R), като инхибират хранителния прием и увеличават разхода на енергия, докато AgRP действа като обратен агонист на MC4R и по този начин увеличава хранителния прием и намалява разхода на енергия. В допълнение, невроните, експресиращи POMC и AgRP, се свързват широко с различни части на хипоталамуса, включително с PO/АН и DMH [Bagnol et al. 1999], а MC4R пък са асоциирани с регулацията на симпатиковата активност в КМТ [Voss-Andreae et al., 2007]. Всъщност MC4R са силно експресиращи по мембраните на невроните в DMH [Liu et al., 2003], както и на тези в rRPa [Fan et al., 2005]. Допуска се, че AgRP и POMC невроните в ARC могат да доставят информация относно хранителния статус, която да се интегрира в rRPa пряко или косвено чрез DMH. Мишките с липса на MC4R са чувствителни на повишаване на телената маса в резултат на хранене с диета богата на мазнини. Освен това те не повишават количеството на разкачващия белтък-1 в КМТ в отговор на тази диета [Voss-Andreae et al., 2007], което дава основание да се счита, че MC4R- сигналният път имат важната функция в диета- индуцираната термогенеза. Инжектирането на MC4R агониста МТII в DMH увеличава телесната температура, като този ефект се предотвратява чрез интра-DMH инжектиране на AgRP. Също така бе установено, че лептин-предизвиканата термогенеза в КМТ е все още индуцируема в мишки с дефицит на MC4R, което предполага известна независимост от MC4R сигналния път [Enriogi et al., 2011].

Терморегулаторните ефекти на лептина включват тясно взаимодействие между различни механизми на ниво хипоталамус и мозъчен ствол. Мозъчният ствол, който е еволюционно най-старата част от централната нервна система, има възможността да медира някои терморегулаторни функции на лептина независимо от хипоталамуса, например при децеребрация на плъхове [Skibicka et al., 2009]. Когато лептин се инжектира в четвъртото мозъчно стомачче на децеребрирани плъхове, температурата в КМТ и тялото се покачва умерено, а ако инжектирането на лептин се последва от третиране с тиреоиден освобождаващ хормон (TRH), то термогенните възможности на TRH нарастват значително [Hermann et al., 2006]. Този сензитиращ ефект е зависим от механизми, включващи

освобождаване на калциеви йони, и може да бъде приписан на директното действие на лептина върху невроните в NTS. Предполага се, че тези неврони, стимулирайки невроните в rRPa, контролират термогенезата в КМТ, но все още няма достатъчно данни, за да се потвърди тази връзка (Фигура 37).



Фигура 37. Схематично изложение на известните невронални вериги, регулиращи лептин-индуцираната термогенеза в КМТ.

PO/AH, преоптичен дял на предния хипоталамус; **DHA**, дорзална хипоталамична област; **DMH**, дорзомедиален хипоталамус; **VMH**, вентромедиален хипоталамус; **ARC**, *nucleus arcuatus*; **rRPa**, rostral raphe pallidus; **КМТ**, кафява мастна тъкан; **ГАМК**, гама-аминомаслена киселина; **AgRP**, агути свързания пептид; **POMC**, проопиомеланокортин; **PVN**, паравентрикуларно ядро; **NTS**, *nucleus tractus solitarii*; **LHA**, латерален хипоталамус.

Нашите *in vivo* и *in vitro* проучвания показаха наличие на ясни взаимодействия между лептин и ГАМК по отношение на терморегулаторните промени у плъхове с нормална телесна маса. Резултатите ни от *in vitro* изследванията са в съответствие с електрофизиологичните промени, които лептин, ГАМК_B-антагониста CGP35348 и ГАМК_B-агониста baclofen оказват върху невроналната активност на неврони от *nucleus infundibuli hypothalami* в млади пилета [Bogatyrev et al., 2017]. Има редица доказателства за взаимодействия между лептин и ГАМК на различни нива. Xu et al. доказват, че част от антиобезните ефекти на лептин се медираат чрез синаптично освобождаване на ГАМК от определена група хипоталамични неврони, експресиращи LepRb [Xu et al., 2012]. За да проучат този въпрос, те създават мишки, в които генът за везикуларния преносител на ГАМК (Vgat) е изтрит специфично в LepRb невроните, при което тези неврони губят способността си да освобождават ГАМК. Въпреки това те запазват способността си да отделят своите котрансмитери и да реагират на лептин. В резултат на това мутантните мишки са проявили лека, но значителна степен на преяждане, затлъстяване и намален разход на енергия. Засищаният ефект на периферно инжектирания лептин също е бил отслабен. Всички тези резултати показват, че малка, но значима част от антиобезните ефекти на лептин се медираат от ГАМК-ергични неврони. В подкрепа на това изследване и на получените от нас резултати е откритието, че ГАМК_B рецепторът е въввлечен в хипоталамичните механизми, регулиращи енергийната хомеостаза. Фармакологични проучвания показват, че оралното или интраперитонеалното въвеждане на ГАМК_B-рецепторния агонист baclofen води до повишаване на хранителния прием, докато интраперитонеалното въвеждане на ГАМК_B-рецепторния антагонист CGP 35348 потиска хранителната консумация [Ebenezer et Prabhaker, 2007; Bains et Ebenezer, 2013; Patel et Ebenezer, 2008; Patel et Ebenezer, 2004]. В зависимост от хранителния състав ефектът на baclofen върху хранителното поведение може да бъде различен. Например добре известно е, че baclofen потиска склонността към повтарящи се, дискретни и периодични пристъпи на консумиране на необичайно големи количества храна, богата на мазнини в плъхове [Buda-Levin et al., 2005, Wojnicki et al., 2006; Berner et al., 2009]. Клинични проучвания показват, че baclofen е ефективен при намаляване на преяждането с храна при пациенти с прекомерно хранене или *bulimia nervosa* [Broft et al., 2007]. Имунохистохимични изследвания в хипоталамуса демонстрираха едновременната експресията на ГАМК_B-рецептора с различни неuropeптиди, регулиращи хранителния прием и повлияващи се от действието на лептин. Например в ARC се установи, че ГАМК_B-имунореактивните клетъчни тела

съдържат POMC, NPY и AgRP, които представляват посредници в осъществяването на лептиновите ефекти [Backberg et al., 2003]. На периферно ниво се показва, че ГАМК_{B1}-субединицата е конститутивно експресирана в адипоцитите, за да регулира продукцията на лептина на транскрипционно ниво [Nakamura et al., 2011]. Vong et al. установяват, че изтриването на гена за лептиновия рецептор от ГАМК-ергичните неврони предизвиква тежка степен на преяждане и затлъстяване в мишки, ефекти, сравними с тези, получени при изтриването на гена за лептиновия рецептор от целия мозък [Vong et al., 2011]. Контрастът в големината на ефектите на горепосочените изследвания е интересен, защото се манипулират едни и същи неврони: Vong et al. изтриват лептиновия рецептор от ГАМК-ергичните неврони, докато Xu et al. изтриват механизма за синаптично освобождаване на ГАМК от невроните, експресиращи лептиновия рецептор. По-точно Vong et al. премахват една от няколко възможности за повлияване функцията на тези неврони (лептиновият рецептор), докато Xu et al. премахват една от няколко възможности за осъществяване на ефекта от тези неврони (освобождаването на ГАМК). Това че функционалната загуба на LepRb води до по-голямо преяждане и затлъстяване, отколкото загубата на освобождаването на ГАМК от същите неврони, може да подсказва, че антиобезните ефекти на лептин върху ГАМК-ергичните неврони са медиирани от промени в освобождаването на невротрансмитери различни от или в допълнение към ГАМК. Въпреки това Xu et al. значително допринасят за разбирането на мозъчните механизми, регулиращи енергийната хомеостаза, като показват, че синаптичното освобождаване на ГАМК от LepRb невроните играе важна роля в антиобезните ефекти на лептин.

Храненето на гризачи с висококалорийна храна води до затлъстяване, хиперлептинемия и лептинова резистентност [Handjiev-Darlenska et Boyadjieva, 2009]. В настоящия труд плъховете с експериментален модел на затлъстяване бяха хранени с САФ за 9 седмици, при което тяхната телесна маса, серумна концентрация на лептин, индексите на телесната маса и Lee бяха значимо увеличени. Получените резултати от *in vivo* изследванията върху плъхове с експериментален модел на затлъстяване показва, че системното прилагане на leptin предизвиква значимо повишаване на телесната температура, както и прилагането на ГАМК_B-антагониста CGP35348, докато ГАМК_B-агониста baclofen доведе до понижаване на телесната температура. Не бе наблюдаван синергизъм в хипертермичния ефект на leptin и ГАМК_B-антагониста при едновременното им прилагане. Ефектът на комбинацията бе по-слабо изразен в

сравнение със сумата от ефектите на самостоятелно приложените вещества. Комбинираното прилагане на baclofen и leptin предизвика понижаване на телесната температура, като ефектът беше по-слабо изразен в сравнение със самостоятелно приложения baclofen. В сравнението между резултатите от изследванията върху плъхове с нормалната телесна маса и плъхове с експериментален модел на затлъстяване ясно се забелязва разликата в ефектите върху телесната температура след инжектирането на веществата, самостоятелно и в комбинация. При прилагането на leptin в плъхове с модел на затлъстяване се забелязва тенденция към по-слабо повишаване на телесната температура на 30^{-та} и 60^{-та} min, но по-дълготрайно през 90^{-та}, 120^{-та} и 150^{-та} min след инжектирането на leptin. Системното прилагането на baclofen и CGP35348 в плъхове с модел на затлъстяване доведе до намаляване на хипотермичната реакция на ГАМК_B-агониста и хипертермичната реакция на ГАМК_B-антагониста в сравнение с плъховете с нормална телесна маса. От проведените *in vitro* изследваният върху неврони в МРА на плъхове с модел на затлъстяване установихме, че при болус инжектиране на лептин в различна концентрация активността на изследваните неврони слабо се променя. Допълнително бе извършено имунохистохимично изследване за определяне на лептин-индуцирания pSTAT3 в МРА. Резултатите показаха, че след системно приложение на лептин броя на pSTAT3-позитивните неврони в МРА е значимо по-малък в плъховете с експериментален модел за затлъстяване в сравнение с плъховете с нормална телесна маса. Проведените електрофизиологични и имунохистохимични изследвания демонстрират наличието на клетъчна лептинова резистентност в МРА по време на затлъстяване.

Въпреки че анорексогенното действие на лептина се понижава при развитие на лептинова резистентност, други лептинови ефекти се запазват. Например повишаването на симпатиковия тонус в бъбреците, водещ до повишено кръвно налягане, се запазва при лептин-резистентни мишки [Rahmouni et al., 2002]. Тази селективна лептинова резистентност не може лесно да се обясни с дефект в транспортната система на лептина или в общите механизми за клетъчна сигнализация. По-скоро това предполага, че само определени невронни субпопулации, експресиращи LepRb, участват или в контрола на храненето, или в сърдечно-съдовата функция, и че тези неврони са селективно засегнати по време на затлъстяване.

В биохимичната каскада на LepRb са включени различни сигнални пътища, като фосфатидилинозитол 3-киназният (PI3K) път е основен за бързите ефекти на лептина

[Donato et al., 2010]. PI3K главно повлиява електрофизиологичните характеристики на LepRb невроните, включващи промени в мембранныя потенциал или невроналната активност. В нашите *in vitro* изследвания ние демонстрираме доза-зависимото повишаване на невроналната активност на неврони от MPA в хипоталамични срезове на плъхове с нормална телесна маса след болус инжектиране на лептин в различна концентрация. От проведените *in vitro* изследвания върху плъхове с модел на затлъстяване ние не установихме такава зависимост. Инжектирането на лептин в различна концентрация слабо повиши невроналната активност на невроните от MPA, което демонстрира отслабване на лептиновата сигнализация и нарушено медиране на бързите лептинови ефекти. В съответствие с нашите изследвания са резултатите от *in vitro* опитите на Davidowa и Plagemann върху екстрацелуларно записани неврони от ARC, VMH и PVN в мозъчни срезове на ювенилни плъхове с нормална телесна маса и модел на неонатално прехранване [Davidowa et Plagemann, 2000; 2000; Davidowa et al., 2006]. Авторите установяват понижена промяна в невронална активност след прилагане на лептин върху неврони от ARC, VMH и PVN в мозъчни срезове на постнатално прехранени плъхове и допускат, че това е причината за персистиращата хиперфагия и затлъстяване в тези животни. В допълнение те демонстрират, че приложението на ГАМК_A-рецепторния антагонист SR 95531 предотвратява настъпилата промяна в лептиновия отговор върху невроните от PVN в плъховете с модел на неонатално прехранване [Davidowa et al., 2006]. Промяната в ефектите на лептин върху невроналната активност на различни хипоталамични неврони по време на затлъстяване може да се дължи на нарушения в PI3K сигнализацията. Установено е, че способността на лептин да индуцира PI3K в хипоталамуса е нарушена в мишки с диета-индуциран обезитет [Metlakunta et al., 2008] и в плъхове с хроничната централна лептинова инфузия [Sahu et Metlakunta, 2005].

Основният транскрипционен фактор, отговорен за настъпването на дългосрочните ефекти на лептина, е сигналният преобразовател и активатор на транскрипцията 3 (STAT3), чиято фосфорилирана форма служи като маркер за лептиновата сигнализация (pSTAT3). Ниските му нива, които се откриват в хипоталамични екстракти от гризачи с модел на затлъстяване, демонстрират съществуването на резистентност в рецепторната сигнализация на лептин в тези животни [El-Haschimi et al., 2000]. Munzberg et al. първи успяват да идентифицират зони в централната нервна система, характеризиращи се с отслабване на лептиновата сигнализация [Munzberg et al., 2004]. В техните изследвания

са използвани мишки с диета-индуцирано затлъстяване, в които след инжектиране на лептин се наблюдава намалено образуване на pSTAT3 в невроните на ARC, демонстриращо наличието на клетъчна лептинова резистентност. Установено е, че в мишки с диета-индуцирано затлъстяване не се наблюдава повишаване образуването на α -меланоцит стимулиращ хормон от невроните в ARC в резултат на приложение на лептин [Enriori et al., 2007]. Munzberg et al. установяват още, че, за разлика от ARC, в други части на ЦНС експресията на pSTAT3 е запазена в условие на затлъстяване в мишки, като допускат съществуването на регион-специфична лептинова резистентност. Авторите на изследването посочват, че такива места със запазена лептинова сигнализация са DMH, VMH, вентралните премамиларни ядра и NTS. По-късно Enriori и сътрудници потвърждават развитието на лептинова резистентност в ARC и запазената лептинова сигнализация в DMH в мишки с диета-индуцирано затлъстяване. Те доказват още така важната роля на DMH в лептин-предизвиканата симпатикова стимулация на кафявата мастна тъкан по време на затлъстяване [Enriori et al., 2011]. Изследвайки терморегулаторните ефекти на лептин в мишки с диета-индуциран обездитет, те установяват, че след интраперитонеално и интрацеребровентрикуларно инжектиране на лептин се повишава термогенезата в кафявата мастна тъкан, противно на развитата резистентност към анорексогенния ефект. Нашите резултати от *in vivo* изследванията върху терморегулаторните ефекти на лептин в плъхове с диета-индуцирано затлъстяване са в съответствие с установените промени от екипа на Enriori. Липсата на лептинова резистентност в DMH по време на диета-индуциран обездитет може да обясни липсата на значима разлика в хипертермичната реакция в нашите *in vivo* изследвания след системно прилагане на лептин в двете групи животни. Изследвания в плъхове с различни модели на лептинова резистентност също показаха намалено фосфорилиране на STAT3. Ladyman и Grattan съобщават, че бременността при плъхове, характеризираща се с хиперлептинемия и хиперфагия, е свързана с нарушен отговор към апетит-потискащия ефект на лептина, приложен интрацеребровентрикуларно [Ladyman et Grattan, 2004]. При използването на Western blotting те откриват регионални различия в pSTAT3 между небременни и бременни животни. Те установяват намалено образуване на pSTAT3 в ARC и VMH, но не и в DMH или LHA по време на бременността в плъхове. В допълнение, селективно отгледаните плъхове с предразположеност към диета-индуциран обездитет имат намалено активиране на STAT3 в ARC, VMH и DMH, но не и в NTS, в отговор на периферно въведен лептин [Levin et al., 2004]. По-късно Matheny et al., използват два

метода за индуциране на лептинова резистентност в плъхове: диета-индуцирано затлъстяване и лептинова свръхекспресия в ЦНС чрез използване на рекомбинантно аденовирус-асоциирано предаване [Matheny et al., 2011]. Те доказват, че диета-индуцирания обезитет предизвиква клетъчна лептинова резистентност, която се открива в ARC и VTA, но липсва в LHA, VMH, DMH, а хроничната централна лептинова свръхекспресия индуцира клетъчна лептинова резистентност във всички изследвани области. Причините за различните резултати от гореизброените експерименти остават неясни, но се предполага, че се дължат на различията в лабораторните животни, моделите за предизвикване на лептинова резистентност и продължителността на диетичния режим. Нашите изследвания за първи път демонстрират значимо намаляване на pSTAT3-позитивните клетки в медиалната преоптична област на предния хипоталамус в мъжки плъхове с диета-индуциран обезитет. Резултатите ни са в съответствие с установените промени в женски мишки с диета-индуцирано затлъстяване от екипа на McEwen et al. [McEwen et al., 2016]. В изследваните обезни животни те установяват намалено образуване на pSTAT3 в MPA, ARC и антеровентралното перивентрикуларно ядро. Освен това авторите доказват, че затлъстяването и съпътстващата лептинова резистентност в тези региони на хипоталамуса допринасят за развитието на инфертилитет в женските мишки. За разлика McEwen et al., които използват висококалорийна диета за период от 110 дни, в нашите изследвания ние демонстрираме нарушена лептинова сигнализация в MPA по-рано, в края на деветата седмица на диетичния режим.

Лептинът се транспортира през кръвно-мозъчната бариера в мозъка чрез насищаща, регулирана транспортна система [Banks et al., 1996]. При плъховете с диета-индуцирано затлъстяване съотношението на лептиновата концентрация между гръбначномозъчната течност и плазмата намалява. Въпреки че нивата на лептин в гръбначномозъчната течност на плъховете със затлъстяване все още са повишени в сравнение с плъховете с нормална телесна маса, наличността на лептин в ЦНС може да не е достатъчна, за да предизвика подходящо сигнал-рецепторно действие [Banks et al., 1999]. В съответствие с предложения модел е фактът, че лептиновата резистентност може да бъде подобрена (но не напълно възстановена) чрез централно въвеждане на лептин, което заобикаля всички дефектни транспортни механизми [El Haschimi et al., 2000]. Поради тази причина се смята, че нарушения в транспорта на лептин до ЦНС представлява един от компонентите в развитието на лептинова резистентност. Интересни данни сочат, че

невроните в ARC, особено тези, които са в непосредствена близост до *eminencia mediana* (ME), са уникално разположени да реагират на циркулиращи сигнални молекули като лептин. *Eminencia mediana* е циркумвентрикуларен орган, съдържащ фенестрирани капиляри. Границата между ME и ARC е покрита от таницити, които са високо специализирани глиални клетки, свързани чрез плътни връзки. Тези таницити, следователно, предпазват невроните в ARC от ME и кръвната циркулация [Bolborea et Dale, 2013]. Въпреки това таницитите могат да транспортират лептин в гръбначномозъчната течност, откъдето той достига прицелните клетки [Balland et al., 2014]. В допълнение много ARC неврони, експресиращи LepRb, изпращат проекции през бариерата на таницитите директно в ME и по този начин получават пряк достъп до циркулиращите нива на лептин [Faouzi et al., 2007]. Докато лептинът вероятно достига до повечето прицелни неврони чрез насищаема транспортна система през кръвно-мозъчната бариера или чрез гръбначномозъчната течност, LepRb невроните в ARC са уникално позиционирани за откриване на промени в плазмената концентрация на лептин, независимо от кръвно-мозъчната бариера, и по този начин отговарят на тези промени с повишена време- и доза-зависима чувствителност [Faouzi et al., 2007]. Тази уникална анатомична характеристика може също така да обясни защо невроните в ARC са склонни към развитие на лептинова резистентност, докато други региони остават чувствителни към лептин. Освен това транспортирането на лептин, медирано от таницитите, е чувствително към лептиновата резистентност и подобрене в таницитния транспорт възстановява лептиновата чувствителност и намалява телесната маса по време на затлъстяване [Balland et al., 2014]. Възможно е подобна анатомична връзка между ARC и ME да съществува и на други места в хипоталамуса. Така например *organum vasculosum laminae terminalis* (OVLT) е друг циркумвентрикуларен орган, който граничи с медиалната преоптична област на предния хипоталамус. Връзката между MPA и OVLT би могла да бъде аналогична на ARC и ME, като подобно на ARC това би довело до склонност към бързо развиване на лептинова резистентност в MPA по време на затлъстяване. Освен ME и OVLT други циркумвентрикуларни органи, съдържащи фенестрирани капиляри са: *organum subfornicale* (SFO) и *area postrema*. Предполага се, че по време на затлъстяване в SFO също се развива клетъчна лептинова резистентност, която допринася за развитието на хипертензия в обезните индивиди. Докато въвеждането на лептин в SFO води до значително понижаване на артериалното налягане в плъхове с нормална телесна маса, такъв ефект не се наблюдава при

инжектирането на лептин в SFO у плъхове с диета-индуциран обезитет [Smith et Ferguson, 2012].

Съществуват няколко молекулни и клетъчни медиатори, които могат директно да отслабят лептиновата сигнализация в състояние на затлъстяване. Активирането на STAT3 води до образуването и натрупването на супресора на цитокинната сигнализация 3 (SOCS-3), който има способността да се свърже с определена част от лептиновия рецептор (тирозинов остатък 985) (Фигура 7). По този начин SOCS-3 потиска лептиновата сигнална каскада, образувайки отрицателна обратна връзка [Bjorbak et al., 2000]. Прекъсването на която и да е част от тази отрицателна обратна връзка в гризачи довежда до потискане на апетита и намаляване на количеството бяла мастна тъкан [Mori et al., 2004]. McEwen et al. изтриват SOCS-3 специфично от невроните в предния мозък и установяват, че развитието на лептинова резистентност се забавя, но не се предотвратява, в MPA, ARC и антеровентралното перивентрикуларно ядро [McEwen et al., 2016]. Протеин-тирозин фосфатаза 1B (PTP-1B) е друг медиатор, допринасящ за развитието на лептинова резистентност [Vence et al., 2006]. Неговото действие е свързано с инактивирането (дефосфорилирането) на JAK2, като по този начин ограничава степента на активация на лептиновия рецептор. Подобно на SOCS-3, инхибирането на PTP-1B увеличава лептиновата рецепторна сигнализация и намалява размера на мастната тъкан [Vence et al., 2006]. Развитието на затлъстяване се съпровожда с появата на стрес в ендоплазмения ретикулум и състояние на хронично лекостепенно възпаление. Сега се знае, че и двата процеса допринасят за отслабването на лептиновите ефекти. Увеличената активност на инфламаторните сигнални пътища и среса на ендоплазматичния ретикулум в хипоталамуса на животни с модел на затлъстяване понижава лептиновата сигнализация в култивирани клетъчни модели и *in vivo* експерименти, а потискането на тези процеси в мозъка подобрява значително лептиновата функция [Zhang et al., 2008; Ozcan et al., 2009]. Предполага се, че сигналните пътища, отговорни за бързите (основно посредством PI3K) и дългосрочните (главно чрез STAT3) лептинови ефекти, се повлияват по различен начин от изброените медиатори на клетъчната лептинова резистентност.

Добре е известна важната физиологична роля на ГАМК_B-рецепторната функция в хранителното поведение и поддържането на енергийния баланс. За пръв път Sato et al. установяват, че ефектът на ГАМК_B-рецепторния агонист baclofen върху хранителното

поведение и енергоразхода е различен между мишки с модел на затлъстяване и мишки с нормална телесна маса [Sato et al., 2007]. В изследванията си те използват два модела на затлъстяване: диета-индуцирано затлъстяване и *db/db* мишки, като установяват, че периферно въведения baclofen значимо намалява хранителния прием, телесната маса и масата на бялата мастна тъкан, увеличава консумацията на кислород без да засяга двигателната активност и подобрява глюкозния толеранс в обезните животни. В резултат на третирането на затлъстелите животните с baclofen те допълнително получават данни за значимо повишена генна експресията на POMC и понижена генна експресия на невропептид Y в ARC. Тъй като в мишките с нормална телесна маса не са били наблюдавани подобни ефекти, авторите акцентират на това, че ефектите на baclofen върху хранителното поведение и енергийния баланс са ясно зависими от това дали изследваните субекти са със съпроводено затлъстяване, или не. Нашите резултати от *in vivo* изследванията след прилагането на baclofen и CGP34358 показват ясна разлика в терморегулаторните ефекти между двете групи изследвани животни. Повишеният енергоразход, който Sato et al. установяват в мишките с модел на затлъстяване обяснява наблюдаваното намаляване на хипотермичната реакция след прилагането на baclofen в плъховете с диета-индуцирания обезитет. Различни изследвания подкрепят наблюдаваните промени в ГАМК-сигнализацията по време на затлъстяване. Установено бе, че висококалорийната диета понижава концентрацията на ГАМК във фронталния кортекс и хипокампа на плъхове, а пристъпите на консумиране на необичайно големи количества храна водят до нарушаване на ГАМК-сигнализацията във VTA и префронталния кортекс [Sandoval-Salazar et al., 2016; Corwin et al., 2016]. Предполага се, че по този начин се намаляват инхибиторните процеси върху хранителното поведение.

Храненето с висококалорийна диета води до промени във взаимодействието между лептин и ГАМК на синаптично ниво [Lee et al., 2015]. Най-добър пример, илюстриращ тези промени, представлява NPY/AgRP невроните, които изпращат инхибиторни ГАМК-ергични влакна към POMC невроните в ARC. Установено е, че лептин инхибира AMPK (АМФ-активираната протеин киназа) зависимото освобождаване на ГАМК от NPY/AgRP невроните, като по този начин намалява инхибиторното влияние към анорексогенните POMC неврони. По време на хранене с висококалорийна храна експресията на AMPK намалява и по този начин лептин не може да осъществи инхибиторния си контрол върху пресинаптичните орексогенни NPY/AgRP неврони.

Предполага се, че JAK2–PI3K сигналният път остава дълго време активен по време на хиперлептинемия и това води до директното активиране на POMC невроните от лептин. В резултат на това става освобождаване на α -меланоцит стимулиращ хормон и глутамат, които свързвайки се със съответните рецептори по пресинаптичната мембрана на NPY/AgRP невроните оказват отрицателна обратна връзка и стимулират освобождаването на ГАМК. Крайният ефект е парадоксален, тъй като води до инхибиране на POMC невроните в състояние на хиперлептинемия. Сега се предполага, че този модел стои в основата на хранителното поведение по време на краткотрайна експозиция с висококалорийна диета [Lee et al., 2015].

9. ОБОБЩЕНИЕ

В настоящия дисертационен труд са проведени *in vivo* и *in vitro* изследвания с лептин, ГАМК_B-агониста baclofen и ГАМК_B-антагониста CGP35348, приложени самостоятелно или в различни комбинации, у плъхове с нормална телесна маса, с цел търсене на зависимости между *in vivo* промените в телесната температура и *in vitro* промените в невроналната активност на невроните в МРА. Допълнително *in vivo* ефектите на веществата върху телесната температура у плъхове с нормална телесна маса бяха сравнени с тези, наблюдавани у плъхове с експериментален модел на затлъстяване. Бяха изследвани и ефектите на лептин върху терморегулаторния център у плъхове с модел на затлъстяване, за да се установи дали има промяна в лептиновото действие в условие на затлъстяване с придружена лептинова резистентност.

Нашите резултати от *in vivo* изследванията върху плъхове с нормална телесна маса показват, че системното прилагане на лептин предизвиква статистически значима хипертермия, както и ГАМК_B-антагониста CGP35348, докато ГАМК_B-агонистът baclofen предизвика понижаване на телесната температура. Не бе наблюдаван синергизъм в хипертермичния ефект при комбинирането на лептин и ГАМК_B - антагониста. Ефектът на комбинацията беше по-малък от ефектите на веществата, приложени самостоятелно. Нито хипертермичния ефект на лептин, нито хипотермичния ефект на ГАМК_B-агониста бяха установени, когато лептин беше инжектиран непосредствено преди baclofen. Наблюдаваните *in vivo* ефекти бяха в корелация с установените *in vitro* промени в невроналната активност на невроните в МРА на плъхове с нормална телесна маса. Прилагането на лептин доведе до доза-зависимо повишаване на невроналната активност на невроните в МРА. При добавянето на лептин и ГАМК_B -агониста baclofen на един и същи неврон не се установи значима промяна в техните самостоятелни ефекти, а едновременното им прилагане доведе до премахване на самостоятелните им ефекти. При комбинираното прилагане на лептин и ГАМК_B-антагониста CGP35348 не се наблюдаваше синергизъм, а обратно - намаляване на ефекта върху тоничната активност на комбинацията в сравнение с ефектите на самостоятелно приложените вещества.

Нашите *in vivo* и *in vitro* проучвания показаха наличие на ясни взаимодействия между лептин и ГАМК по отношение на терморегулаторните промени у плъхове. Резултатите ни са в съответствие с доказателството, че синаптичното освобождаване на ГАМК от невроните, експресиращи LepRb, играе важна роля в антиобезните ефекти на

лептин. В допълнение те подкрепят хипотезата, че терморегулаторните ефекти на лептин се медиират основно от ГАМК-ергични неврони, разположение в МРА.

Храненето на плъхове с САФ доведе до затлъстяване, съпроводено с хиперлептинемия и лептинова резистентност. В сравнението между резултатите от изследванията върху плъхове с нормалната телесна маса и плъхове с експериментален модел на затлъстяване ясно се забелязва разликата в ефектите върху телесната температура след инжектирането на изследваните вещества. При прилагането на лептин в плъхове с модел на затлъстяване се наблюдава тенденция към по-слаба, но по-продължителна, хипертермична реакция в сравнение с плъхове с нормална телесна маса. Системното прилагането на baclofen и CGP35348 в плъхове с модел на затлъстяване доведе до намаляване на хипотермичната реакция на ГАМК_B-агониста и хипертермичната реакция на ГАМК_B-антагониста. При комбинираното прилагане на лептин и baclofen в плъхове с модел на затлъстяване се наблюдаваше значимо понижаване на телесната температура в сравнение с плъховете с нормална телесна маса. Хипертермичният ефект при комбинирането на лептин и ГАМК_B-антагониста бе значимо по-слабо изразено в плъховете с модел на затлъстяване.

In vitro u in vivo изследванията на ефектите на лептин върху МРА на плъхове с модел на затлъстяване демонстрираха наличието на нарушено лептиново действие. Прилагането на лептин върху неврони в МРА на плъхове с модел на затлъстяване не доведе до значимо повишаване на невроналната активност. Имунохистохимичното изследване на pSTAT3 в МРА показва наличието на клетъчна лептинова резистентност в обезните животни след системно прилагане на лептин. Броят на pSTAT3-маркираните неврони в МРА беше значимо по-малък в животните с модел на затлъстяване в сравнение с животните с нормална телесна маса. Освен това интензитета на имунохистохимичната реакция беше по-слабо изразен в групата със затлъстяване.

Резултатите от *in vitro u in vivo* изследванията на ефектите на лептин върху МРА на плъхове с модел на затлъстяване са в корелация с установената клетъчна лептинова резистентност в различни хипоталамични и екстрахипоталамични участъци в централната нервна система по време на затлъстяване в гризачи.

10. ИЗВОДИ

1. Системното инжектиране на лептин в плъхове води до покачване на телесната температура. При прилагането на лептин в плъхове с модел на затлъстяване се наблюдава тенденция към по-слаба, но по-продължителна, хипертермична реакция в сравнение с плъхове с нормална телесна маса.
2. Самостоятелното системно прилагане на ГАМК_B-агониста baclofen и ГАМК_B-антагониста CGP35348 в плъхове с модел на затлъстяване води до значимо намаляване на хипотермичната и хипертермичната реакция, съответно, в сравнение с плъхове с нормална телесна маса.
3. Комбинираното системно прилагане на лептин и CGP35348 не води до синергизъм в хипертермичния ефект у плъхове. Хипертермичната реакция при комбинираното инжектиране на веществата е значимо по-слабо изразена в плъхове с модел на затлъстяване в сравнение с плъхове с нормална телесна маса.
4. Комбинираното системно прилагане на лептин и baclofen води до премахване на самостоятелните им ефекти върху телесната температура в плъхове с нормална телесна маса, а системното им инжектиране в плъхове с модел на затлъстяване предизвиква значимо понижаване на телесната температура.
5. *In vitro* промените в тоничната активност на невроните в МРА след прилагането на лептин, baclofen и CGP35348, самостоятелно и в комбинация, са в съответствие с *in vivo* терморегулаторните промени, установени след системното инжектиране на веществата, в плъхове с нормална телесна маса.
6. Лептин доза-зависимо повишава невроналната активност на невроните в МРА на плъхове с нормална телесна маса. Прилагането му върху хипоталамични срези на плъхове с модел на затлъстяване не води до значима промяна в тоничната активност на невроните в МРА.
7. В условие на затлъстяване в МРА се развива клетъчна лептинова резистентност. Системното прилагане на лептин води до значимо намаляване броя на pSTAT3-позитивните неврони в МРА у плъхове с модел на затлъстяване в сравнение с плъхове с нормална телесна маса.

11. ПРИНОСИ

Оригинални приноси

1. За първи път се установиха промените в телесната температура след системно прилагане на лептин в плъхове с модел на затлъстяване, предизвикан чрез кафетерийна диета.
2. За първи път се установиха *in vivo* терморегулаторните взаимодействия между лептин, ГАМК_B-агонист и ГАМК_B-антагонист при плъхове с нормална телесна маса и модел на затлъстяване.
3. За първи път се установи, че ефектите на веществата, повлияващи ГАМК_B-рецепторната терморегулаторна функция са променени по време на затлъстяване.
4. За първи път се установиха *in vitro* ефектите от взаимодействието на лептин с ГАМК_B-рецепторен агонист и ГАМК_B-рецепторен антагонист върху тоничната активност на неврони в РО/АН на плъхове с нормална телесна маса.
5. За първи път се установиха *in vitro* промените, предизвикани от прилагането на лептин, върху тоничната активност на неврони в РО/АН на плъхове с нормална телесна маса и модел на затлъстяване. За първи път в световната литература се демонстрира промяната в ефектите на лептин върху тоничната активност на неврони от РО/АН по време на затлъстяване.
6. За първи път се установиха промените във фосфорилирането на STAT3 в РО/АН след системно прилагане на лептин в плъхове с нормална телесна маса и модел на затлъстяване. За първи път в световната литература се споменава за наличието на клетъчна лептинова резистентност в РО/АН след системно прилагане на лептин в мъжки плъхове с модел на затлъстяване.

Потвърдителни приноси

1. Установени са закономерности в повлияването на терморегулацията с ГАМК_B-рецепторен агонист и антагонист в *in vivo* опити върху телесната температура и *in vitro* експерименти върху неврони от РО/АН.
2. Храненето на плъхове с кафетерийна диета предизвиква затлъстяване, придружено с хиперлептинемия и лептинова резистентност.

12. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И ЦИТИРАНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Списък на публикации

1. **Hristov, M.**, B. Landzhov, K. Kamenova, K. Yakimova. Diet-induced obese rats are associated with leptin resistance in the medial preoptic area of the anterior hypothalamus.- CR Acad. Bulg. Sci., 2018. (под печат)
IF: 0.251
2. **Hristov, M.**, K. Yakimova. Effects of leptin on firing rate of neurons from the preoptic area of the anterior hypothalamus (PO/AH) in rats with normal weight and experimental model of obesity.- CR Acad. Bulg. Sci., 70, 2017, №8, 1163-1170.
IF: 0.251
3. **Hristov, M.**, E. DiBlasi, R. Nikolov, K. Yakimova. Leptin and GABA Interactions on Body Temperature of Rats with Experimental Model of Obesity.- Asian Journal of Medicine and Health, 5, 2017, №2, 1-8.
4. **Христов, М.** Действието на лептин върху терморегулацията при различни хомеостазни състояния.- Медицински преглед, 52, 2016, №2,15-21.
5. Yakimova, K. S., R.P. Nikolov, I.G. Todorov, **M. H. Hristov**. Leptin and GABA interactions on thermoregulation of rats.- J BiomedClinRes, 7, 2014 , №1 ,20-24
6. Todorov, I., **M. Christov**, K. Stanoeva, K. Yakimova. Leptin and GABA interactions on body temperature of rats.- Pharmacia, 60, 2013, №1, 3-7.

Списък на цитирания

1. **Цитираща:** Bogatyrev, S., K. S. Yakimova, B. Tzschentke. Influence of leptin and GABA_B-receptor agonist and antagonist on neurons of the hypothalamic infundibular nucleus in the chicken.- Journal of Comparative Physiology A, 203, 2017, №4, 291-299.

IF: 2.429

- **Цитирана:** Yakimova, K. S., R.P. Nikolov, I.G. Todorov, **M. H. Hristov**. Leptin and GABA interactions on thermoregulation of rats.- J Biomed Clin Res, 7, 2014, №1, 20-24.

2. **Цитираща:** John-Africa, L., N. Danjuma, J. Anuka, B. Chindo. Analgesic and Anti-inflammatory Activities of the Ethylacetate Extract of Mitracarpus villosus Leaves in Rodents - European Journal of Medicinal Plants, 15, 2016, №3, 1-10.

- **Цитирана:** Yakimova, K. S., R.P. Nikolov, I.G. Todorov, **M. H. Hristov**. Leptin and GABA interactions on thermoregulation of rats.- J BiomedClinRes, 7, 2014, №1, 20-24.

13. СПИСЪК НА УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ И КОНФЕРЕНЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. DiBlasi, E., **M. Hristov**, R. Nikolov, K. Yakimova. Leptin and GABA thermoregulatory interactions in rats- 2nd International Biomedical Congress (IBC), Sofia, 17-19 November, 2017. (Втора награда в постерната сесия, Награда за най-добър научен проект).
2. **Hristov, M.**, K. Yakimova. Leptin-induced change on firing rate of neurons from the preoptic area of the anterior hypothalamus (PO/AH) in normal and obese rats.- 2017 International Workshop Metabolic Diseases – Genetics Epigenetics And Proteomics, Innovation Corner – Progress Through Microbiology, Sofia, Bulgaria, 16-20 May, 2017, Abstr. 26.
3. DiBlasi, E., **M. Hristov**, R. Nikolov, K. Yakimova. Thermoregulatory interactions between leptin and modulators of GABA_B receptor function in rats with normal weight and experimental model of obesity- XVI International Congress of Medical Sciences, Sofia, 11-14 May, 2017, Abstr.41 (Трета награда за устна презентация).
4. **Христов, М.**, К. Якимова. Лептин и ГАМК - *in vivo* и *in vitro* взаимодействия върху терморегулацията у плъхове.- Втори Докторантски Симпозиум „Молекулярната биология- нови хоризонти“, София, България, 6-7 Април, 2017, Абстр. 30.
5. Yakimova, K., **M. Hristov**, R. Nikolov, E. DiBlazi. Effects of leptin on thermoregulation: *in vivo* and *in vitro* investigations on normal and obese rats.- 6th International Conference on the Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation, Ljubljana, Slovenia, 5-9 December, 2016, Abstr. 86.
6. **Hristov, M.**, R. Nikolov, K. Yakimova. Thermoregulatory interactions between leptin and modulators of GABA_B receptor.- 6th Congress of Pharmacy with International Participation, Sandanski, Bulgaria, 13-16 October, 2016, Abstr. 191.

7. **Hristov, M.**, K. Yakimova. Effects of leptin on firing rate of neurons from the preoptic area of the anterior hypothalamus (PO/AH) in normal and obese rats.- 6th Congress of Pharmacy with International Participation, Sandanski, Bulgaria, 13-16 October, 2016, Abstr. 190.
8. Yakimova, K. S., **M. H. Hristov**. Interaction of Leptin and GABA_B-agonist and antagonist on thermoregulation. - 14th International Congress on Amino Acids and Proteins, Vienna, Austria, 3-7 August, 2015, Abstr. Amino Acids 47, 2015, 8, 1689; Amino Acids 48, 2016, 2, 621.

IF: 3.196

9. Todorov, I., **M. Christov**, R. Nikolov, K. Yakimova. Leptin and GABA interactions on thermoregulation of rats. - VII National Congress of Pharmacology, Pleven, 17-19 October, 2014, Abstr. JBCR 7 (1), Supp.1, 75.
10. Todorov, I., **M. Hristov**, K. Yakimova. Effects of separate and combine administration of leptin, GABA_B- antagonist and GABA_B- agonist on body temperature of rats.- 24th European Students' Conference, Berlin, Germany, 4-7 September, 2013, Abstr. 342.
11. Todorov, I., **M. Hristov**, K. Yakimova. *In vivo* and *in vitro* effects of leptin, GABA_B-antagonist and GABA_B-agonist on thermoregulation in rats. XII International Congress of Medical Sciences, Sofia, 09-12 May, 2013, Abstr. *Tribuna Medica*, 65, 2013, Suppl. 1, 50. (Първа награда за устна презентация).

14. ПРОВЕДЕНИ КУРСОВЕ И УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Проведени курсове

1. Участие в квалификационен курс по: „Методология на научното изследване-обект на дисертационна теза и медицинска статистика“, организиран от Факултет по обществено здраве, Медицински университет-София. (Удостоверение за следдипломно обучение № 542/27.10.2016г.)
2. Участие в квалификационен курс по: „Защита и хуманно отношение към опитни животни, използвани за образователни или научни цели“, организиран от центъра за продължаващо обучение, Лесотехнически университет - София. (Удостоверение за професионална квалификация - регистрационен номер 4871/2016г.)

Участия в проекти

1. Договор № Д-135/2017 г., на тема: „Определяне на лептин-индуцираната експресия на фосфорилирания сигнален преобразувател и активатор на транскрипцията 3 (pSTAT3) в преоптичната област на предния хипоталамус на плъхове с нормална телесна маса и модел на затлъстяване“ от конкурса „Млад изследовател“ за финансиране на изследователски проекти -2017 г. към СМН, МУ-София.
2. Договор № 2/2016 г. на тема: „Ефекти на Лептин върху терморегулацията у плъхове с модел на затлъстяване: роля на GABA_B-рецепторни механизми“ от конкурса „ГРАНТ“ за финансиране на изследователски проекти -2016 г. към СМН, МУ-София. Отчет приет с оценка: ОТЛИЧНА.
3. Договор № 29/2012 г. на тема: „Лептин и GABA – in vivo и in vitro взаимодействия върху терморегулацията у плъхове“ от конкурса „ГРАНТ“ за финансиране на изследователски проекти -2012 г. към СМН, МУ-София. Отчет приет с оценка: ВИСОКА.

15. БЛАГОДАРНОСТИ

Искам да изкажа своята дълбока благодарност и признателност на своя научен ръководител проф. д-р Красимира Якимова за гласуваното доверие, безценните напътствия и съвети в процеса на работа, за вярата в мен и предоставените ми възможности за изява.

Благодаря на колектива на катедра „Фармакология и токсикология“, МФ, МУ-София за безценната помощ, която ми бе оказана, за приятелството и стимулиращата професионална среда.

Безкрайна признателност към цялата катедра „Анатомия, хистология и ембриология“, МФ, МУ-София и особено на проф. д-р Бойчо Ланджов за цялостната подкрепа и помощта при осъществяването на имунохистохимичното изследване.

Благодаря на моето семейство и най-скъпите ми хора, че бяха винаги до мен и ме подкрепяха в избора да се посветя на медицинската наука.

16. ЛІТЕРАТУРНА СПРАВКА

1. Adair ER. Skin, preoptic, and core temperatures influence behavioral thermoregulation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1977;42(4):559-64.
2. Ahima RS, Bjorbaek C, Osei S, Flier JS. Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology.* 1999;140(6):2755-62.
3. Aoki K, Stephens DP, Zhao K, Kosiba WA, Johnson JM. Modification of cutaneous vasodilator response to heat stress by daytime exogenous melatonin administration. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology.* 2006;291(3):R619-24.
4. Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides.* 2006;40(6):375-401.
5. Backberg M, Collin M, Ovesjo ML, Meister B. Chemical coding of GABA(B) receptor-immunoreactive neurones in hypothalamic regions regulating body weight. *Journal of neuroendocrinology.* 2003;15(1):1-14.
6. Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HE, Ollmann M, Gantz I, et al. Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 1999;19(18):RC26.
7. Bains RS, Ebenezer IS. Effects of the GABA(B) receptor agonist baclofen administered orally on normal food intake and intraperitoneally on fat intake in non-deprived rats. *European journal of pharmacology.* 2013;698(1-3):267-71.
8. Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, et al. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell metabolism.* 2014;19(2):293-301.
9. Banks AS, Davis SM, Bates SH, Myers MG, Jr. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *The Journal of biological chemistry.* 2000;275(19):14563-72.

10. Banks WA, DiPalma CR, Farrell CL. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides*. 1999;20(11):1341-5.
11. Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*. 1996;17(2):305-11.
12. Bartfai T, Conti B. Molecules affecting hypothalamic control of core body temperature in response to calorie intake. *Frontiers in genetics*. 2012;3:184.
13. Bartness TJ, Vaughan CH, Song CK. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34 Suppl 1:S36-42.
14. Bates SH, Dundon TA, Seifert M, Carlson M, Maratos-Flier E, Myers MG, Jr. LRB-STAT3 signaling is required for the neuroendocrine regulation of energy expenditure by leptin. *Diabetes*. 2004;53(12):3067-73.
15. Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, et al. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*. 2003;421(6925):856-9.
16. Bayer L, Jacquemard C, Fellmann D, Griffond B. Survival of rat MCH (melanin-concentrating hormone) neurons in hypothalamus slice culture: histological, pharmacological and molecular studies. *Cell and tissue research*. 1999;297(1):23-33.
17. Bence KK, Delibegovic M, Xue B, Gorgun CZ, Hotamisligil GS, Neel BG, et al. Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nature medicine*. 2006;12(8):917-24.
18. Berner LA, Bocarsly ME, Hoebel BG, Avena NM. Baclofen suppresses binge eating of pure fat but not a sugar-rich or sweet-fat diet. *Behavioural pharmacology*. 2009;20(7):631-4.
19. Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiological reviews*. 2004;84(3):835-67.
20. Bettler B, Tiao JY. Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors. *Pharmacology & therapeutics*. 2006;110(3):533-43.

21. Bischoff S, Leonhard S, Reymann N, Schuler V, Shigemoto R, Kaupmann K, et al. Spatial distribution of GABA(B)R1 receptor mRNA and binding sites in the rat brain. *The Journal of comparative neurology*. 1999;412(1):1-16.
22. Bjorbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, et al. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology*. 1998;139(8):3485-91.
23. Bjorbak C, Lavery HJ, Bates SH, Olson RK, Davis SM, Flier JS, et al. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(51):40649-57.
24. Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1996;81(9):3419-23.
25. Bogatyrev S, Yakimova KS, Tzschentke B. Influence of leptin and GABAB-receptor agonist and antagonist on neurons of the hypothalamic infundibular nucleus in the chicken. *Journal of comparative physiology A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*. 2017;203(4):291-9.
26. Bolborea M, Dale N. Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends in neurosciences*. 2013;36(2):91-100.
27. Boulant JA. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2000;31 Suppl 5:S157-61.
28. Boulant JA. Neuronal basis of Hammel's model for set-point thermoregulation. *J Appl Physiol (1985)*. 2006;100(4):1347-54.
29. Boulant JA. Hypothalamic Neurons Regulating Body Temperature. *Comprehensive Physiology: John Wiley & Sons, Inc.*; 2010.
30. Boulant JA, Dean JB. Temperature receptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*. 1986;48:639-54.
31. Boulant JA, Gonzalez RR. The effect of skin temperature on the hypothalamic control of heat loss and heat production. *Brain research*. 1977;120(2):367-72.

32. Bouret SG, Gorski JN, Patterson CM, Chen S, Levin BE, Simerly RB. Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats. *Cell metabolism*. 2008;7(2):179-85.
33. Bratincsak A, Palkovits M. Activation of brain areas in rat following warm and cold ambient exposure. *Neuroscience*. 2004;127(2):385-97.
34. Brennan AM, Mantzoros CS. Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism*. 2006;2(6):318-27.
35. Broft AI, Spanos A, Corwin RL, Mayer L, Steinglass J, Devlin MJ, et al. Baclofen for binge eating: an open-label trial. *The International journal of eating disorders*. 2007;40(8):687-91.
36. Buda-Levin A, Wojnicki FH, Corwin RL. Baclofen reduces fat intake under binge-type conditions. *Physiology & behavior*. 2005;86(1-2):176-84.
37. Bussieres N, El Manira A. GABA(B) receptor activation inhibits N- and P/Q-type calcium channels in cultured lamprey sensory neurons. *Brain research*. 1999;847(2):175-85.
38. Cano G, Passerin AM, Schiltz JC, Card JP, Morrison SF, Sved AF. Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *The Journal of comparative neurology*. 2003;460(3):303-26.
39. Cano G, Passerin AM, Schiltz JC, Card JP, Morrison SF, Sved AF. Anatomical substrates for the central control of sympathetic outflow to interscapular adipose tissue during cold exposure. *The Journal of comparative neurology*. 2003;460(3):303-26.
40. Cao WH, Morrison SF. Disinhibition of rostral raphe pallidus neurons increases cardiac sympathetic nerve activity and heart rate. *Brain research*. 2003;980(1):1-10.
41. Cao WH, Morrison SF. Glutamate receptors in the raphe pallidus mediate brown adipose tissue thermogenesis evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons. *Neuropharmacology*. 2006;51(3):426-37.
42. Caterina MJ. Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007;292(1):R64-76.

43. Chalifoux JR, Carter AG. GABAB receptor modulation of synaptic function. *Current opinion in neurobiology*. 2011;21(2):339-44.
44. Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(9):1409-21.
45. Clark WG, Lipton JM. Changes in body temperature after administration of amino acids, peptides, dopamine, neuroleptics and related agents: II. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 1985;9(2):299-371.
46. Commins SP, Watson PM, Padgett MA, Dudley A, Argyropoulos G, Gettys TW. Induction of uncoupling protein expression in brown and white adipose tissue by leptin. *Endocrinology*. 1999;140(1):292-300.
47. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *The New England journal of medicine*. 1996;334(5):292-5.
48. Corwin RL, Wojnicki FH, Zimmer DJ, Babbs RK, McGrath LE, Olivos DR, et al. Binge-type eating disrupts dopaminergic and GABAergic signaling in the prefrontal cortex and ventral tegmental area. *Obesity*. 2016;24(10):2118-25.
49. Costa A, Poma A, Martignoni E, Nappi G, Ur E, Grossman A. Stimulation of corticotrophin-releasing hormone release by the obese (ob) gene product, leptin, from hypothalamic explants. *Neuroreport*. 1997;8(5):1131-4.
50. Couturier C, Jockers R. Activation of the leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(29):26604-11.
51. Couve A, Thomas P, Calver AR, Hirst WD, Pangalos MN, Walsh FS, et al. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation facilitates GABA(B) receptor-effector coupling. *Nature neuroscience*. 2002;5(5):415-24.
52. Cowley MA. Hypothalamic melanocortin neurons integrate signals of energy state. *European journal of pharmacology*. 2003;480(1-3):3-11.

53. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001;411(6836):480-4.
54. Curras MC, Kelso SR, Boulant JA. Intracellular analysis of inherent and synaptic activity in hypothalamic thermosensitive neurones in the rat. *The Journal of physiology*. 1991;440:257-71.
55. Davidowa H, Plagemann A. Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. *Neuroreport*. 2000;11(12):2795-8.
56. Davidowa H, Plagemann A. Different responses of ventromedial hypothalamic neurons to leptin in normal and early postnatally overfed rats. *Neuroscience letters*. 2000;293(1):21-4.
57. Davidowa H, Ziska T, Plagemann A. GABAA receptor antagonists prevent abnormalities in leptin, insulin and amylin actions on paraventricular hypothalamic neurons of overweight rats. *The European journal of neuroscience*. 2006;23(5):1248-54.
58. Dean JB, Boulant JA. In vitro localization of thermosensitive neurons in the rat diencephalon. *The American journal of physiology*. 1989;257(1 Pt 2):R57-64.
59. Dhillon H, Zigman JM, Ye C, Lee CE, McGovern RA, Tang V, et al. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron*. 2006;49(2):191-203.
60. Dimicco JA, Zaretsky DV. The dorsomedial hypothalamus: a new player in thermoregulation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007;292(1):R47-63.
61. Donato J, Jr., Frazao R, Elias CF. The PI3K signaling pathway mediates the biological effects of leptin. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2010;54(7):591-602.
62. Duan J, Choi YH, Hartzell D, Della-Fera MA, Hamrick M, Baile CA. Effects of subcutaneous leptin injections on hypothalamic gene profiles in lean and ob/ob mice. *Obesity*. 2007;15(11):2624-33.

63. Ebenezer IS, Prabhaker M. The effects of intraperitoneal administration of the GABA(B) receptor agonist baclofen on food intake in CFLP and C57BL/6 mice. *European journal of pharmacology*. 2007;569(1-2):90-3.
64. Egan GF, Johnson J, Farrell M, McAllen R, Zamarripa F, McKinley MJ, et al. Cortical, thalamic, and hypothalamic responses to cooling and warming the skin in awake humans: a positron-emission tomography study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(14):5262-7.
65. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(12):1827-32.
66. Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *The Journal of comparative neurology*. 1998;395(4):535-47.
67. Elmquist JK, Scammell TE, Jacobson CD, Saper CB. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. *The Journal of comparative neurology*. 1996;371(1):85-103.
68. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, et al. Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell metabolism*. 2007;5(3):181-94.
69. Enriori PJ, Sinnayah P, Simonds SE, Garcia Rudaz C, Cowley MA. Leptin action in the dorsomedial hypothalamus increases sympathetic tone to brown adipose tissue in spite of systemic leptin resistance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(34):12189-97.
70. Ernst MB, Wunderlich CM, Hess S, Paehler M, Mesaros A, Koralov SB, et al. Enhanced Stat3 activation in POMC neurons provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(37):11582-93.
71. Evans SE, Ingram DL. The significance of deep body temperature in regulating the concentration of thyroxine in the plasma of the pig. *The Journal of physiology*. 1974;236(1):159-70.

72. Fan W, Voss-Andreae A, Cao WH, Morrison SF. Regulation of thermogenesis by the central melanocortin system. *Peptides*. 2005;26(10):1800-13.
73. Faouzi M, Leshan R, Bjornholm M, Hennessey T, Jones J, Munzberg H. Differential accessibility of circulating leptin to individual hypothalamic sites. *Endocrinology*. 2007;148(11):5414-23.
74. Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic obesity in humans. *Annu Rev Med*. 2005;56:443-58.
75. Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, et al. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(13):7001-5.
76. Frankowska M, Filip M, Przegalinski E. Effects of GABAB receptor ligands in animal tests of depression and anxiety. *Pharmacological reports : PR*. 2007;59(6):645-55.
77. Freeman WJ, Davis DD. Effects on cats of conductive hypothalamic cooling. *The American journal of physiology*. 1959;197(1):145-8.
78. Froestl W. Chemistry and pharmacology of GABAB receptor ligands. *Advances in pharmacology*. 2010;58:19-62.
79. Frontini A, Giordano A. Leptin-sensitive neurons in mouse preoptic area express alpha 1A- and alpha 2A-adrenergic receptor isoforms. *Neuroscience letters*. 2010;471(2):83-8.
80. Gale CC, Jobin M, Proppe DW, Notter D, Fox H. Endocrine thermoregulatory responses to local hypothalamic cooling in unanesthetized baboons. *The American journal of physiology*. 1970;219(1):193-201.
81. Gao J, Tian J, Lv Y, Shi F, Kong F, Shi H, et al. Leptin induces functional activation of cyclooxygenase-2 through JAK2/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT pathways in human endometrial cancer cells. *Cancer science*. 2009;100(3):389-95.
82. Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, Morino K, Horvath TL, Shulman GI, et al. Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(13):4661-6.

83. Geerling JC, Loewy AD. Central regulation of sodium appetite. *Experimental physiology*. 2008;93(2):177-209.
84. Gilbert C, Maho YL, Perret M, Ancel A. Body temperature changes induced by huddling in breeding male emperor penguins. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007;292(1):R176-85.
85. Gong H, McGinty D, Guzman-Marin R, Chew KT, Stewart D, Szymusiak R. Activation of c-fos in GABAergic neurones in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation. *The Journal of physiology*. 2004;556(Pt 3):935-46.
86. Gong L, Yao F, Hockman K, Heng HH, Morton GJ, Takeda K, et al. Signal transducer and activator of transcription-3 is required in hypothalamic agouti-related protein/neuropeptide Y neurons for normal energy homeostasis. *Endocrinology*. 2008;149(7):3346-54.
87. Gray JA, Goodwin GM, Heal DJ, Green AR. Hypothermia induced by baclofen, a possible index of GABAB receptor function in mice, is enhanced by antidepressant drugs and ECS. *British journal of pharmacology*. 1987;92(4):863-70.
88. Griffin JD, Kaple ML, Chow AR, Boulant JA. Cellular mechanisms for neuronal thermosensitivity in the rat hypothalamus. *The Journal of physiology*. 1996;492 (Pt 1):231-42.
89. Grill HJ, Schwartz MW, Kaplan JM, Foxhall JS, Breininger J, Baskin DG. Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology*. 2002;143(1):239-46.
90. Hammel HT, Hardy JD, Fusco MM. Thermoregulatory responses to hypothalamic cooling in unanesthetized dogs. *The American journal of physiology*. 1960;198:481-6.
91. Hammouda M. The central and the reflex mechanism of panting. *The Journal of physiology*. 1933;77(4):319-36.
92. Handjieva-Darlenska T, Boyadjieva N. The effect of high-fat diet on plasma ghrelin and leptin levels in rats. *Journal of physiology and biochemistry*. 2009;65(2):157-64.
93. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition research reviews*. 2010;23(2):270-99.

94. Harlan SM, Morgan DA, Agassandian K, Guo DF, Cassell MD, Sigmund CD, et al. Ablation of the leptin receptor in the hypothalamic arcuate nucleus abrogates leptin-induced sympathetic activation. *Circ Res.* 2011;108(7):808-12.
95. Harris RB, Zhou J, Redmann SM, Jr., Smagin GN, Smith SR, Rodgers E, et al. A leptin dose-response study in obese (ob/ob) and lean (+/?) mice. *Endocrinology.* 1998;139(1):8-19.
96. Haynes WG, Morgan DA, Walsh SA, Mark AL, Sivitz WI. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *The Journal of clinical investigation.* 1997;100(2):270-8.
97. Hellstrom B, Hammel HT. Some characteristics of temperature regulation in the unanesthetized dog. *The American journal of physiology.* 1967;213(2):547-56.
98. Hermann GE, Barnes MJ, Rogers RC. Leptin and thyrotropin-releasing hormone: cooperative action in the hindbrain to activate brown adipose thermogenesis. *Brain research.* 2006;1117(1):118-24.
99. Higa TS, Spinola AV, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FS. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology.* 2014;6(1):47-54.
100. Hileman SM, Pierroz DD, Masuzaki H, Bjorbaek C, El-Haschimi K, Banks WA, et al. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology.* 2002;143(3):775-83.
101. Hill JW, Williams KW, Ye C, Luo J, Balthasar N, Coppari R, et al. Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *The Journal of clinical investigation.* 2008;118(5):1796-805.
102. Hommel JD, Trinko R, Sears RM, Georgescu D, Liu ZW, Gao XB, et al. Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron.* 2006;51(6):801-10.
103. Hosoi T, Kawagishi T, Okuma Y, Tanaka J, Nomura Y. Brain stem is a direct target for leptin's action in the central nervous system. *Endocrinology.* 2002;143(9):3498-504.

104. Hua le H, Strigo IA, Baxter LC, Johnson SC, Craig AD. Anteroposterior somatotopy of innocuous cooling activation focus in human dorsal posterior insular cortex. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2005;289(2):R319-R25.
105. Huang CS, Shi SH, Ule J, Ruggiu M, Barker LA, Darnell RB, et al. Common molecular pathways mediate long-term potentiation of synaptic excitation and slow synaptic inhibition. *Cell*. 2005;123(1):105-18.
106. Hubschle T, Thom E, Watson A, Roth J, Klaus S, Meyerhof W. Leptin-induced nuclear translocation of STAT3 immunoreactivity in hypothalamic nuclei involved in body weight regulation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(7):2413-24.
107. Hyland NP, Cryan JF. A Gut Feeling about GABA: Focus on GABA(B) Receptors. *Frontiers in pharmacology*. 2010;1:124.
108. Inoue W, Luheshi GN. Acute starvation alters lipopolysaccharide-induced fever in leptin-dependent and -independent mechanisms in rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2010;299(6):R1709-19.
109. Ishiwata T, Saito T, Hasegawa H, Yazawa T, Kotani Y, Otokawa M, et al. Changes of body temperature and thermoregulatory responses of freely moving rats during GABAergic pharmacological stimulation to the preoptic area and anterior hypothalamus in several ambient temperatures. *Brain research*. 2005;1048(1-2):32-40.
110. Jackson HC, Nutt DJ. Inhibition of baclofen-induced hypothermia in mice by the novel GABAB antagonist CGP 35348. *Neuropharmacology*. 1991;30(5):535-8.
111. Jacobson FH, Squires RD. Thermoregulatory responses of the cat to preoptic and environmental temperatures. *The American journal of physiology*. 1970;218(6):1575-82.
112. Kanosue K, Yanase-Fujiwara M, Hosono T. Hypothalamic network for thermoregulatory vasomotor control. *The American journal of physiology*. 1994;267(1 Pt 2):R283-8.
113. Kanosue K, Zhang YH, Yanase-Fujiwara M, Hosono T. Hypothalamic network for thermoregulatory shivering. *The American journal of physiology*. 1994;267(1 Pt 2):R275-82.

114. Kelso SR, Boulant JA. Effect of synaptic blockade on thermosensitive neurons in hypothalamic tissue slices. *The American journal of physiology*. 1982;243(5):R480-90.
115. Kelso SR, Perlmutter MN, Boulant JA. Thermosensitive single-unit activity of in vitro hypothalamic slices. *The American journal of physiology*. 1982;242(1):R77-84.
116. Kiess W, Petzold S, Topfer M, Garten A, Bluher S, Kapellen T, et al. Adipocytes and adipose tissue. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2008;22(1):135-53.
117. Kim YB, Uotani S, Pierroz DD, Flier JS, Kahn BB. In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin. *Endocrinology*. 2000;141(7):2328-39.
118. Kloek C, Haq AK, Dunn SL, Lavery HJ, Banks AS, Myers MG, Jr. Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(44):41547-55.
119. Kobayashi A, Osaka T. Involvement of the parabrachial nucleus in thermogenesis induced by environmental cooling in the rat. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2003;446(6):760-5.
120. Konishi M, Kanosue K, Kano M, Kobayashi A, Nagashima K. The median preoptic nucleus is involved in the facilitation of heat-escape/cold-seeking behavior during systemic salt loading in rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007;292(1):R150-9.
121. Korsak A, Gilbey MP. Rostral ventromedial medulla and the control of cutaneous vasoconstrictor activity following i.c.v. prostaglandin E(1). *Neuroscience*. 2004;124(3):709-17.
122. Kvadsheim PH, Folkow LP, Blix AS. Inhibition of shivering in hypothermic seals during diving. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2005;289(2):R326-R31.
123. Ladera C, del Carmen Godino M, Jose Cabanero M, Torres M, Watanabe M, Lujan R, et al. Pre-synaptic GABA receptors inhibit glutamate release through GIRK channels in rat cerebral cortex. *Journal of neurochemistry*. 2008;107(6):1506-17.

124. Ladyman SR, Grattan DR. Region-specific reduction in leptin-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) in the rat hypothalamus is associated with leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology*. 2004;145(8):3704-11.
125. Lee DK, Jeong JH, Chun SK, Chua S, Jr., Jo YH. Interplay between glucose and leptin signalling determines the strength of GABAergic synapses at POMC neurons. *Nature communications*. 2015;6:6618.
126. Legrady G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 1997;138(6):2569-76.
127. Leininger GM, Jo YH, Leshan RL, Louis GW, Yang H, Barrera JG, et al. Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell metabolism*. 2009;10(2):89-98.
128. Leshan RL, Bjornholm M, Munzberg H, Myers MG, Jr. Leptin receptor signaling and action in the central nervous system. *Obesity*. 2006;14 Suppl 5:208S-12S.
129. Levin BE, Dunn-Meynell AA, Banks WA. Obesity-prone rats have normal blood-brain barrier transport but defective central leptin signaling before obesity onset. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2004;286(1):R143-50.
130. Licinio J, Mantzoros C, Negrao AB, Cizza G, Wong ML, Bongiorno PB, et al. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nature medicine*. 1997;3(5):575-9.
131. Liu H, Kishi T, Roseberry AG, Cai X, Lee CE, Montez JM, et al. Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2003;23(18):7143-54.
132. Luheshi GN, Gardner JD, Rushforth DA, Loudon AS, Rothwell NJ. Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(12):7047-52.

133. Mackowiak PA, Boulant JA. Fever's glass ceiling. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1996;22(3):525-36.
134. Madden CJ, Morrison SF. Excitatory amino acid receptor activation in the raphe pallidus area mediates prostaglandin-evoked thermogenesis. *Neuroscience*. 2003;122(1):5-15.
135. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2002;26(11):1407-33.
136. Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology. *Journal of immunology*. 2005;174(6):3137-42.
137. Matheny M, Shapiro A, Tumer N, Scarpace PJ. Region-specific diet-induced and leptin-induced cellular leptin resistance includes the ventral tegmental area in rats. *Neuropharmacology*. 2011;60(2-3):480-7.
138. Matochik JA, London ED, Yildiz BO, Ozata M, Caglayan S, DePaoli AM, et al. Effect of leptin replacement on brain structure in genetically leptin-deficient adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(5):2851-4.
139. Matsumura K, Cao C, Ozaki M, Morii H, Nakadate K, Watanabe Y. Brain endothelial cells express cyclooxygenase-2 during lipopolysaccharide-induced fever: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18(16):6279-89.
140. McAllen RM. Preoptic thermoregulatory mechanisms in detail. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2004;287(2):R272-3.
141. McEwen HJ, Inglis MA, Quennell JH, Grattan DR, Anderson GM. Deletion of Suppressor of Cytokine Signaling 3 from Forebrain Neurons Delays Infertility and Onset of Hypothalamic Leptin Resistance in Response to a High Caloric Diet. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2016;36(27):7142-53.
142. Metlakunta AS, Sahu M, Sahu A. Hypothalamic phosphatidylinositol 3-kinase pathway of leptin signaling is impaired during the development of diet-induced obesity in FVB/N mice. *Endocrinology*. 2008;149(3):1121-8.

143. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2002;415(6869):339-43.
144. Montague CT, Prins JB, Sanders L, Digby JE, O'Rahilly S. Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes*. 1997;46(3):342-7.
145. Mori H, Hanada R, Hanada T, Aki D, Mashima R, Nishinakamura H, et al. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. *Nature medicine*. 2004;10(7):739-43.
146. Morrison CD. Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition? *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1792(5):401-8.
147. Morrison SF. RVLM and raphe differentially regulate sympathetic outflows to splanchnic and brown adipose tissue. *The American journal of physiology*. 1999;276(4 Pt 2):R962-73.
148. Morrison SF. Raphe pallidus neurons mediate prostaglandin E2-evoked increases in brown adipose tissue thermogenesis. *Neuroscience*. 2003;121(1):17-24.
149. Morrison SF. Activation of 5-HT1A receptors in raphe pallidus inhibits leptin-evoked increases in brown adipose tissue thermogenesis. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2004;286(5):R832-7.
150. Morrison SF, Nakamura K. Central neural pathways for thermoregulation. *Frontiers in bioscience*. 2011;16:74-104.
151. Morrison SF, Sved AF, Passerin AM. GABA-mediated inhibition of raphe pallidus neurons regulates sympathetic outflow to brown adipose tissue. *The American journal of physiology*. 1999;276(2 Pt 2):R290-7.
152. Munzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology*. 2004;145(11):4880-9.
153. Nagashima K, Nakai S, Tanaka M, Kanosue K. Neuronal circuitries involved in thermoregulation. *Auton Neurosci*. 2000;85(1-3):18-25.

154. Nakamura K. Central circuitries for body temperature regulation and fever. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2011;301(5):R1207-28.
155. Nakamura K, Matsumura K, Hubschle T, Nakamura Y, Hioki H, Fujiyama F, et al. Identification of sympathetic premotor neurons in medullary raphe regions mediating fever and other thermoregulatory functions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(23):5370-80.
156. Nakamura K, Matsumura K, Kaneko T, Kobayashi S, Katoh H, Negishi M. The rostral raphe pallidus nucleus mediates pyrogenic transmission from the preoptic area. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(11):4600-10.
157. Nakamura K, Morrison SF. Central efferent pathways mediating skin cooling-evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007;292(1):R127-36.
158. Nakamura K, Morrison SF. A thermosensory pathway that controls body temperature. *Nature neuroscience*. 2008;11(1):62-71.
159. Nakamura K, Morrison SF. Preoptic mechanism for cold-defensive responses to skin cooling. *The Journal of physiology*. 2008;586(10):2611-20.
160. Nakamura K, Morrison SF. A thermosensory pathway mediating heat-defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(19):8848-53.
161. Nakamura K, Morrison SF. Central efferent pathways for cold-defensive and febrile shivering. *The Journal of physiology*. 2011;589(Pt 14):3641-58.
162. Nakamura Y, Hinoi E, Takarada T, Takahata Y, Yamamoto T, Fujita H, et al. Positive regulation by GABA(B)R1 subunit of leptin expression through gene transactivation in adipocytes. *PloS one*. 2011;6(5):e20167.
163. Nakamura Y, Nakamura K. Central regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy homeostasis dependent on food availability. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2017.

164. Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG, Jr., Schwartz MW. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature*. 2001;413(6858):794-5.
165. Nomoto S, Shibata M, Iriki M, Riedel W. Role of afferent pathways of heat and cold in body temperature regulation. *Int J Biometeorol*. 2004;49(2):67-85.
166. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory animals*. 2007;41(1):111-9.
167. Oka T, Oka K, Scammell TE, Lee C, Kelly JF, Nantel F, et al. Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. *The Journal of comparative neurology*. 2000;428(1):20-32.
168. Osaka T. Thermogenesis elicited by skin cooling in anaesthetized rats: lack of contribution of the cerebral cortex. *The Journal of physiology*. 2004;555(Pt 2):503-13.
169. Osaka T. Prostaglandin E(2) fever mediated by inhibition of the GABAergic transmission in the region immediately adjacent to the organum vasculosum of the lamina terminalis. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2008;456(5):837-46.
170. Otmakhova NA, Lisman JE. Contribution of Ih and GABAB to synaptically induced afterhyperpolarizations in CA1: a brake on the NMDA response. *Journal of neurophysiology*. 2004;92(4):2027-39.
171. Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell metabolism*. 2009;9(1):35-51.
172. Patapoutian A, Peier AM, Story GM, Viswanath V. ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(7):529-39.
173. Patel SM, Ebenezer IS. The effects of intraperitoneal and intracerebroventricular administration of the GABAB receptor antagonist CGP 35348 on food intake in rats. *European journal of pharmacology*. 2004;503(1-3):89-93.

174. Patel SM, Ebenezer IS. The effects of acute multiple intraperitoneal injections of the GABAB receptor agonist baclofen on food intake in rats. *European journal of pharmacology*. 2008;601(1-3):106-10.
175. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th ed. Amsterdam ; Boston ;: Academic Press/Elsevier; 2007.
176. Perez-Garci E, Gassmann M, Bettler B, Larkum ME. The GABAB1b isoform mediates long-lasting inhibition of dendritic Ca²⁺ spikes in layer 5 somatosensory pyramidal neurons. *Neuron*. 2006;50(4):603-16.
177. Pierau FK, Sann H, Yakimova KS, Haug P. Plasticity of hypothalamic temperature-sensitive neurons. *Progress in brain research*. 1998;115:63-84.
178. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, et al. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science*. 2004;304(5667):110-5.
179. Plum L, Ma X, Hampel B, Balthasar N, Coppari R, Munzberg H, et al. Enhanced PIP3 signaling in POMC neurons causes KATP channel activation and leads to diet-sensitive obesity. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(7):1886-901.
180. Rafael J, Herling AW. Leptin effect in ob/ob mice under thermoneutral conditions depends not necessarily on central satiation. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2000;278(3):R790-5.
181. Rahmouni K, Haynes WG, Morgan DA, Mark AL. Selective resistance to central neural administration of leptin in agouti obese mice. *Hypertension*. 2002;39(2 Pt 2):486-90.
182. Rahmouni K, Sigmund CD, Haynes WG, Mark AL. Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes*. 2009;58(3):536-42.
183. Rannels HJ, Griffin JD. The effects of prostaglandin E₂ on the firing rate activity of thermosensitive and temperature insensitive neurons in the ventromedial preoptic area of the rat hypothalamus. *Brain research*. 2003;964(1):42-50.
184. Rathner JA, Madden CJ, Morrison SF. Central pathway for spontaneous and prostaglandin E₂-evoked cutaneous vasoconstriction. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2008;295(1):R343-54.

185. Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, et al. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Molecular endocrinology*. 2001;15(10):1748-57.
186. Roberts WW. Differential thermosensor control of thermoregulatory grooming, locomotion, and relaxed postural extension. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;525:363-74.
187. Romanovsky AA. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007;292(1):R37-46.
188. Romanovsky AA, Kulchitsky VA, Akulich NV, Koulchitsky SV, Simons CT, Sessler DI, et al. First and second phases of biphasic fever: two sequential stages of the sickness syndrome? *The American journal of physiology*. 1996;271(1 Pt 2):R244-53.
189. Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R, et al. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(2):579-84.
190. Sahu A. Leptin decreases food intake induced by melanin-concentrating hormone (MCH), galanin (GAL) and neuropeptide Y (NPY) in the rat. *Endocrinology*. 1998;139(11):4739-42.
191. Sahu A, Metlakunta AS. Hypothalamic phosphatidylinositol 3-kinase-phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway of leptin signalling is impaired following chronic central leptin infusion. *Journal of neuroendocrinology*. 2005;17(11):720-6.
192. Sakaba T, Neher E. Direct modulation of synaptic vesicle priming by GABA(B) receptor activation at a glutamatergic synapse. *Nature*. 2003;424(6950):775-8.
193. Sakurada S, Shido O, Fujikake K, Nagasaka T. Relationship between body core and peripheral temperatures at the onset of thermoregulatory responses in rats. *The Japanese journal of physiology*. 1993;43(5):659-67.
194. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity*. 2011;19(6):1109-17.

195. Sancibrian M, Serrano JS, Minano FJ. Opioid and prostaglandin mechanisms involved in the effects of GABAergic drugs on body temperature. *General pharmacology*. 1991;22(2):259-62.
196. Sandoval-Salazar C, Ramirez-Emiliano J, Trejo-Bahena A, Oviedo-Solis CI, Solis-Ortiz MS. A high-fat diet decreases GABA concentration in the frontal cortex and hippocampus of rats. *Biological research*. 2016;49:15.
197. Saper CB. The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. *Annual review of neuroscience*. 2002;25:433-69.
198. Sarkar S, Zaretskaia MV, Zaretsky DV, Moreno M, DiMicco JA. Stress- and lipopolysaccharide-induced c-fos expression and nNOS in hypothalamic neurons projecting to medullary raphe in rats: a triple immunofluorescent labeling study. *The European journal of neuroscience*. 2007;26(8):2228-38.
199. Sato I, Arima H, Ozaki N, Ozaki N, Watanabe M, Goto M, et al. Peripherally administered baclofen reduced food intake and body weight in db/db as well as diet-induced obese mice. *FEBS letters*. 2007;581(25):4857-64.
200. Scarpace PJ, Matheny M, Moore RL, Tumer N. Impaired leptin responsiveness in aged rats. *Diabetes*. 2000;49(3):431-5.
201. Scott MM, Lachey JL, Sternson SM, Lee CE, Elias CF, Friedman JM, et al. Leptin targets in the mouse brain. *The Journal of comparative neurology*. 2009;514(5):518-32.
202. Serrano JS, Minano FJ, Sancibrian M, Duran JA. Involvement of bicuculline-insensitive receptors in the hypothermic effect of GABA and its agonists. *General pharmacology*. 1985;16(5):505-8.
203. Sharma V, Mustafa S, Patel N, Wambolt R, Allard MF, McNeill JH. Stimulation of cardiac fatty acid oxidation by leptin is mediated by a nitric oxide-p38 MAPK-dependent mechanism. *European journal of pharmacology*. 2009;617(1-3):113-7.
204. Silva JE. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiological reviews*. 2006;86(2):435-64.

205. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Magosin S, et al. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97(5):1344-7.
206. Skibicka KP, Grill HJ. Hindbrain leptin stimulation induces anorexia and hyperthermia mediated by hindbrain melanocortin receptors. *Endocrinology*. 2009;150(4):1705-11.
207. Smith PM, Ferguson AV. Cardiovascular actions of leptin in the subfornical organ are abolished by diet-induced obesity. *Journal of neuroendocrinology*. 2012;24(3):504-10.
208. Spanswick D, Smith MA, Groppi VE, Logan SD, Ashford ML. Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature*. 1997;390(6659):521-5.
209. Steinberg GR, McAinch AJ, Chen MB, O'Brien PE, Dixon JB, Cameron-Smith D, et al. The suppressor of cytokine signaling 3 inhibits leptin activation of AMP-kinase in cultured skeletal muscle of obese humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(9):3592-7.
210. Steiner AA, Antunes-Rodrigues J, Branco LG. Role of preoptic second messenger systems (cAMP and cGMP) in the febrile response. *Brain research*. 2002;944(1-2):135-45.
211. Sternson SM, Shepherd GM, Friedman JM. Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nature neuroscience*. 2005;8(10):1356-63.
212. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:797-819.
213. Tanaka M, McKinley MJ, McAllen RM. Roles of two preoptic cell groups in tonic and febrile control of rat tail sympathetic fibers. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2009;296(4):R1248-57.
214. Tanaka M, McKinley MJ, McAllen RM. Preoptic-raphé connections for thermoregulatory vasomotor control. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(13):5078-88.

215. Tanaka M, Owens NC, Nagashima K, Kanosue K, McAllen RM. Reflex activation of rat fusimotor neurons by body surface cooling, and its dependence on the medullary raphe. *The Journal of physiology*. 2006;572(Pt 2):569-83.
216. Tanaka M, Tonouchi M, Hosono T, Nagashima K, Yanase-Fujiwara M, Kanosue K. Hypothalamic region facilitating shivering in rats. *The Japanese journal of physiology*. 2001;51(5):625-9.
217. Tartaglia LA. The leptin receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(10):6093-6.
218. Thompson CS, Holowatz LA, Kenney WL. Cutaneous vasoconstrictor responses to norepinephrine are attenuated in older humans. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2005;288(5):R1108-13.
219. Trayhurn P, Thurlby PL, James WP. Thermogenic defect in pre-obese ob/ob mice. *Nature*. 1977;266(5597):60-2.
220. Tung YC, Ma M, Piper S, Coll A, O'Rahilly S, Yeo GS. Novel leptin-regulated genes revealed by transcriptional profiling of the hypothalamic paraventricular nucleus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(47):12419-26.
221. Tups A, Ellis C, Moar KM, Logie TJ, Adam CL, Mercer JG, et al. Photoperiodic regulation of leptin sensitivity in the Siberian hamster, *Phodopus sungorus*, is reflected in arcuate nucleus SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling) gene expression. *Endocrinology*. 2004;145(3):1185-93.
222. Turek VF, Trevaskis JL, Levin BE, Dunn-Meynell AA, Irani B, Gu G, et al. Mechanisms of amylin/leptin synergy in rodent models. *Endocrinology*. 2010;151(1):143-52.
223. Udagawa J, Hashimoto R, Hioki K, Otani H. The role of leptin in the development of the cortical neuron in mouse embryos. *Brain research*. 2006;1120(1):74-82.
224. Uschakov A, Gong H, McGinty D, Szymusiak R. Efferent projections from the median preoptic nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. *Neuroscience*. 2007;150(1):104-20.

225. Ushikubi F, Segi E, Sugimoto Y, Murata T, Matsuoka T, Kobayashi T, et al. Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature*. 1998;395(6699):281-4.
226. Vlachou S, Markou A. GABAB receptors in reward processes. *Advances in pharmacology*. 2010;58:315-71.
227. Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S, Jr., Lowell BB. Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron*. 2011;71(1):142-54.
228. Voss-Andreae A, Murphy JG, Ellacott KL, Stuart RC, Nillni EA, Cone RD, et al. Role of the central melanocortin circuitry in adaptive thermogenesis of brown adipose tissue. *Endocrinology*. 2007;148(4):1550-60.
229. Wang JH, Wang F, Yang MJ, Yu DF, Wu WN, Liu J, et al. Leptin regulated calcium channels of neuropeptide Y and proopiomelanocortin neurons by activation of different signal pathways. *Neuroscience*. 2008;156(1):89-98.
230. Wechselberger M, Wright CL, Bishop GA, Boulant JA. Ionic channels and conductance-based models for hypothalamic neuronal thermosensitivity. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2006;291(3):R518-29.
231. White DW, Tartaglia LA. Leptin and OB-R: body weight regulation by a cytokine receptor. *Cytokine & growth factor reviews*. 1996;7(4):303-9.
232. Williams DL, Baskin DG, Schwartz MW. Leptin regulation of the anorexic response to glucagon-like peptide-1 receptor stimulation. *Diabetes*. 2006;55(12):3387-93.
233. Wojnicki FH, Roberts DC, Corwin RL. Effects of baclofen on operant performance for food pellets and vegetable shortening after a history of binge-type behavior in non-food deprived rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2006;84(2):197-206.
234. Xu AW, Ste-Marie L, Kaelin CB, Barsh GS. Inactivation of signal transducer and activator of transcription 3 in proopiomelanocortin (Pomc) neurons causes decreased pomc expression, mild obesity, and defects in compensatory refeeding. *Endocrinology*. 2007;148(1):72-80.

235. Xu Y, O'Brien WG, 3rd, Lee CC, Myers MG, Jr., Tong Q. Role of GABA release from leptin receptor-expressing neurons in body weight regulation. *Endocrinology*. 2012;153(5):2223-33.
236. Yakimova K, Ovtcharov R. Central temperature effects of the transmitter amino acids. *Acta physiologica et pharmacologica Bulgarica*. 1989;15(3):50-4.
237. Yakimova K, Sann H, Schmid HA, Pierau FK. Effects of GABA agonists and antagonists on temperature-sensitive neurones in the rat hypothalamus. *The Journal of physiology*. 1996;494 (Pt 1):217-30.
238. Yakimova KS. Effects of GABAB-agonist on rat hypothalamic neurons: functional antagonism with mu-receptor agonist. *Neuroscience research*. 2006;54(4):281-7.
239. Yamagata K, Matsumura K, Inoue W, Shiraki T, Suzuki K, Yasuda S, et al. Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(8):2669-77.
240. Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, et al. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*. 2003;38(5):701-13.
241. Yu S, Qualls-Creekmore E, Rezai-Zadeh K, Jiang Y, Berthoud HR, Morrison CD, et al. Glutamatergic Preoptic Area Neurons That Express Leptin Receptors Drive Temperature-Dependent Body Weight Homeostasis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2016;36(18):5034-46.
242. Zaretskaia MV, Zaretsky DV, Sarkar S, Shekhar A, DiMicco JA. Induction of Fos-immunoreactivity in the rat brain following disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain research*. 2008;1200:39-50.
243. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008;135(1):61-73.

244. Zhang Y, Kerman IA, Laque A, Nguyen P, Faouzi M, Louis GW, et al. Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(5):1873-84.