

*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**

АВТОРЕФЕРАТ

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

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

София, 2018

*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**

АВТОРЕФЕРАТ

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

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

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

**Официални рецензенти:
Проф. д-р Славина Сурчева, дм
Проф. д-р Ирен Белчева, дм, дмн**

София, 2018

Дисертационният труд е написан на 134 стандартни печатни страници и е онагледен с 37 фигури и 1 таблица. Библиографията включва 244 литературни източника.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на заседание на Катедрения съвет на Катедрата по фармакология и токсикология при Медицински факултет, Медицински университет - София, състояло се на 17.04.2018 г.

Публичната защита ще се проведе на 22.06.2018 г. от 11:30 часа в зала 326, етаж 3, на Катедрата по фармакология и токсикология, Медицински факултет, Медицински университет- София, пред научно жури в състав:

Председател:

Проф. д-р Славина Кирилова Сурчева, дм

Членове:

Проф. д-р Красимира Симеонова Якимова, дм, дмн

Проф. д-р Ирен Петкова Белчева, дм, дмн

Проф. д-р Елена Борисова Джамбазова, дм

Доц. д-р Любка Павлова Танчева, дф

Резервни членове:

Доц. д-р Цветанка Петрова Дончева, дм

Доц. д-р Мария Ганева Ганева, дм

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

1. СЪДЪРЖАНИЕ

1. СЪДЪРЖАНИЕ	4
2. НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА	5
3. ВЪВЕДЕНИЕ	6
4. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	8
5. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	9
6. РЕЗУЛТАТИ	16
6.1. In vivo експерименти	16
6.2. In vitro експерименти	33
6.3. Имунохистохимично изследване на pSTAT3 в РО/АН	39
7. ДИСКУСИЯ	43
8. ИЗВОДИ	49
9. ПРИНОСИ	50
10. СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ И ЦИТИРАНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	51
11. СПИСЪК НА УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ И КОНФЕРЕНЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	53
12. ПРОВЕДЕНИ КУРСОВЕ И УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	55
13. БЛАГОДАРНОСТИ	56

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

ARC - *nucleus arcuatus hypothalami*

CAF - кафетерийна диета ("*cafeteria diet*")

DMH - дорзомедиален хипоталамус

LepRb - дълга изоформа на лептиновия рецептор

LHA – латерален хипоталамус

MPA - медиална преоптична област

PI3K - фосфатидилинозитол 3-киназа

PO/AH - преоптична област на предния хипоталамус

POMC - проопиомеланокортин

PVN - паравентрикуларно ядро

STAT3 - сигнален преобразовател и активатор на транскрипцията 3

VMH - вентромедиален хипоталамус

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

3. ВЪВЕДЕНИЕ

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. 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.

5. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

5.1. 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).

5.2. 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, превалираща в западното общество и свързана с настоящата пандемия от затлъстяване. 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, хипергликемия 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. 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.

5.3. 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].

5.4. 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.

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)

5.5. 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.

5.5.1. 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.

5.6. 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.

5.7. 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 10).

5.7.1. 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 рН от 7,4. Разтворът беше непрекъснато оксигениран по време на експериментите.

5.7.2. 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.

5.7.3. 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 стъклено покритие (Clark Electromedical Instruments GC150F-10) за екстрацелуларен запис на акционни потенциали. Записваните акционни потенциали бяха предварително усилен 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, 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.

5.8. 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).

5.8.1. 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 неколккратно 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].

5.8.2. 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 антитялото 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 антителио (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 М PBS (pH 7,36) и инкубирани с вторично антимиши IgG антителио, конюгирано с биотин (Catalog No. BA-9200, VectorLab), в разреждане 1:250 с 0,01 М PBS. Инкубацията с вторичното антителио 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.

5.8.3. 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.

5.9. 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.

6. РЕЗУЛТАТИ

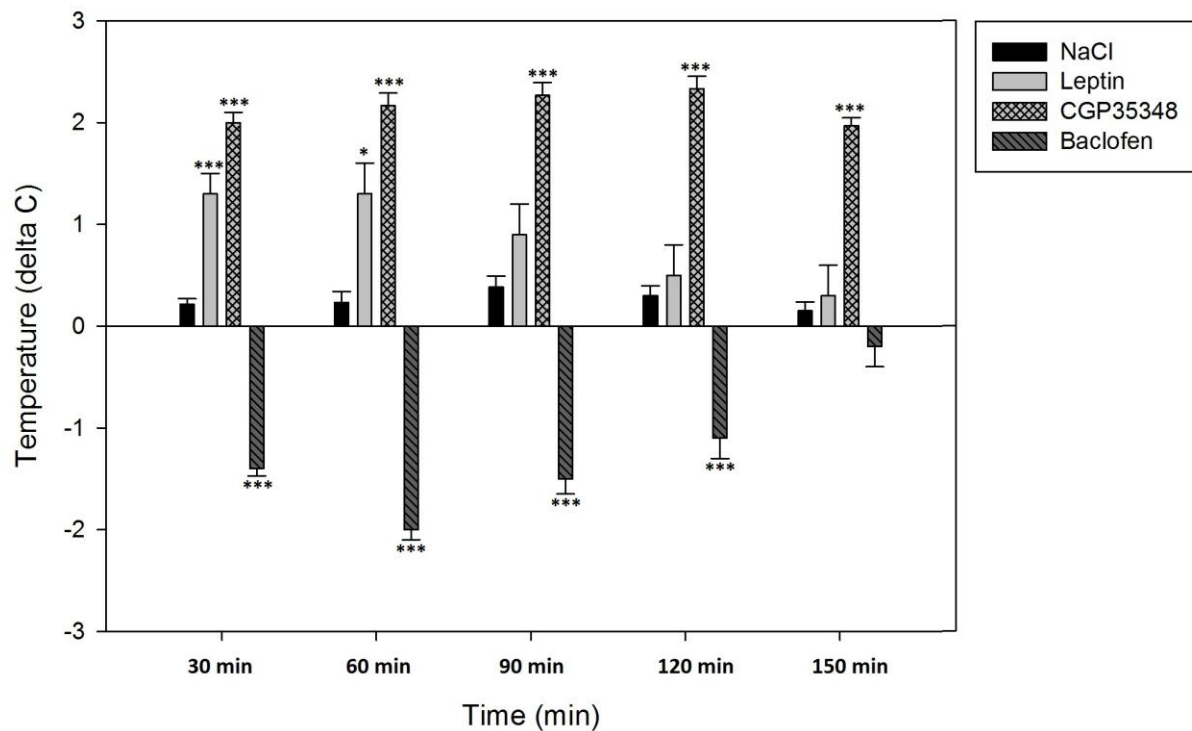
6.1. In vivo експерименти

6.1.1. 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.1).

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. 1).

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.1).



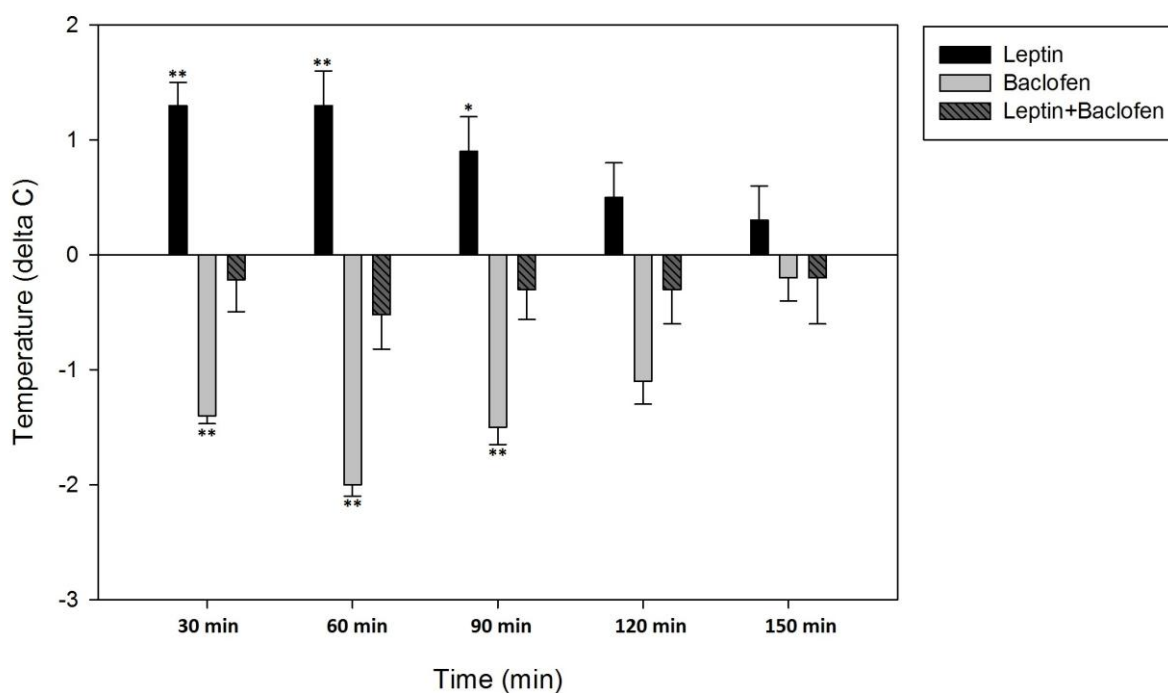
Фиг. 1: Ефекти на интраперитонеално (i.p.) инжектиране на leptin, baclofen и CGP35348, приложени самостоятелно, върху телесната температура на плъхове с нормална телесна маса.

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): * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

6.1.2. 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. 2).



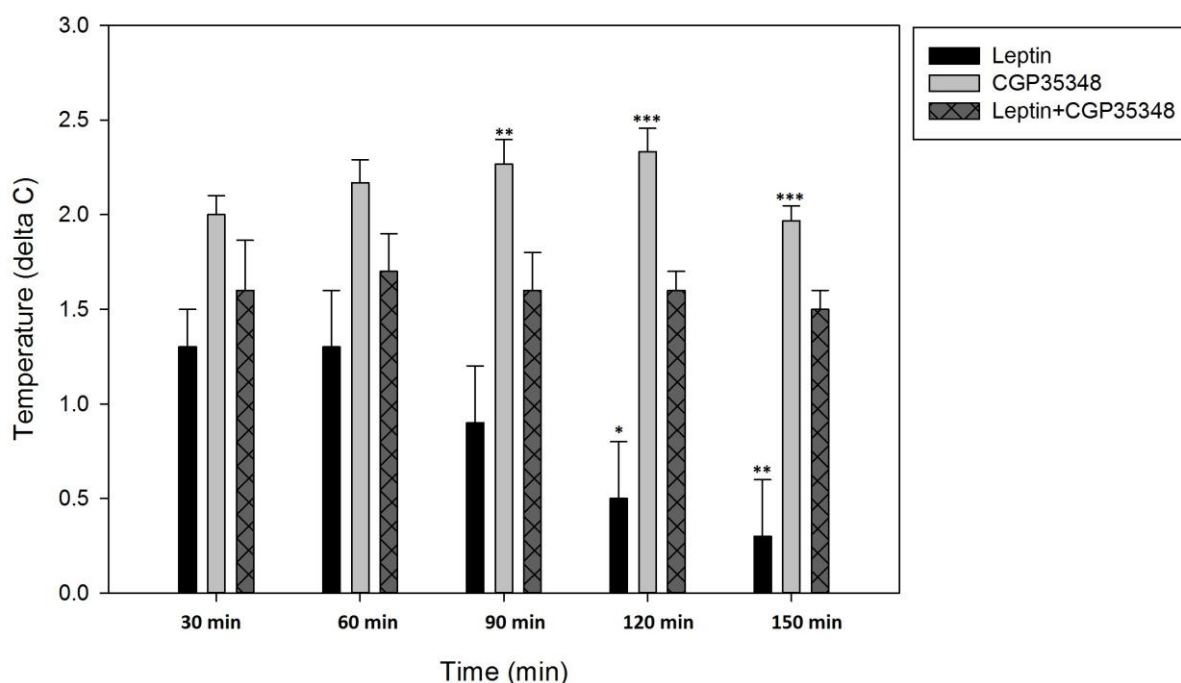
Фиг. 2: Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и baclofen върху телесната температура на плъхове с нормална телесна маса.

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: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

6.1.3. 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. 3).



Фиг. 3: 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.

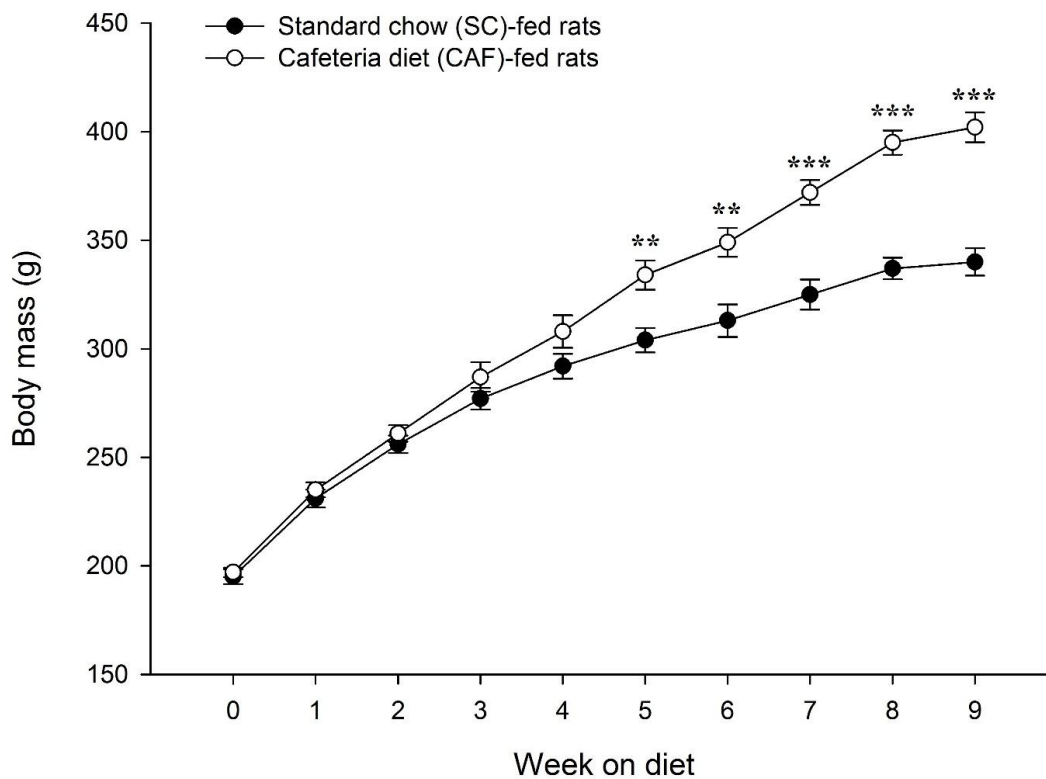
Статистическа значимост в сравнение с комбинацията: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.1.4. 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. 4).

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. 5, 6).

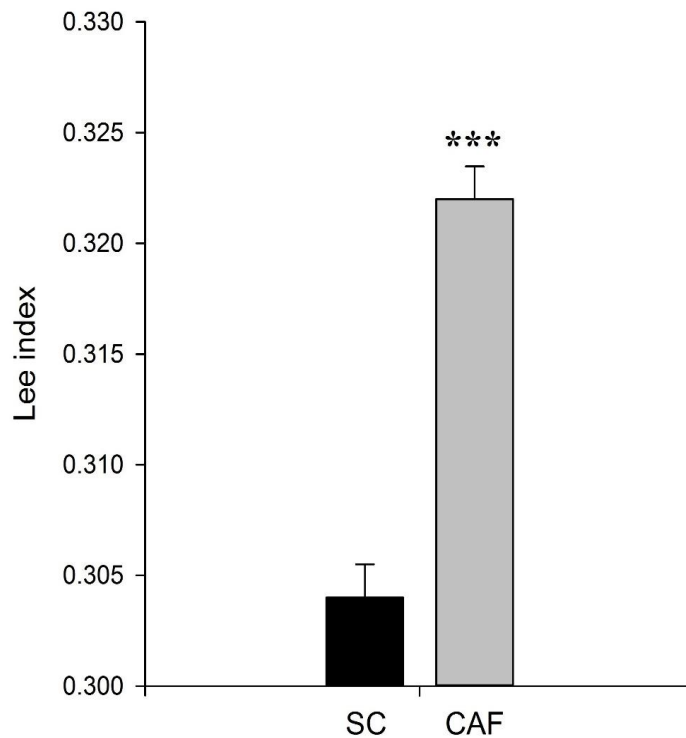
В края на деветата седмица серумната концентрация на лептин в плъховете с експериментален модел на затлъстяване беше значимо по-висока от измерената в плъховете с нормална телесна маса ($p < 0.001$) (Фиг. 7). Установените високи серумни нива на лептин в животните на висококалорийна диета е допълнителен маркер за предизвикания обезитет. Затлъстяването в комбинация с хиперлептинемия демонстрира наличието на лептинова резистентност.



Фиг. 4: 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.

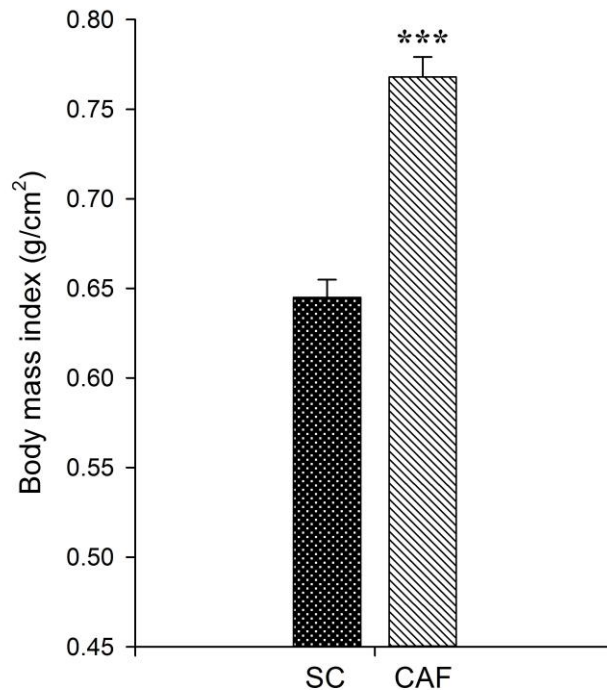
Статистическа значимост в сравнение с групата на стандартна лабораторна храна: ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.



Фиг. 5: 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.

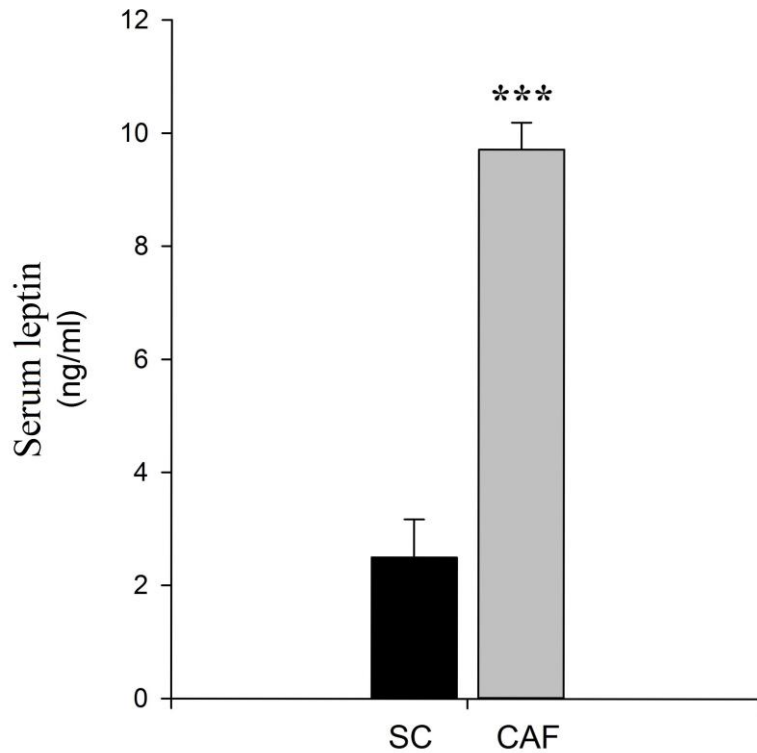
Статистическа значимост в сравнение с групата с нормална телесна маса (SC):
 *** $p < 0,001$.



Фиг. 6: 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. 7: 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.

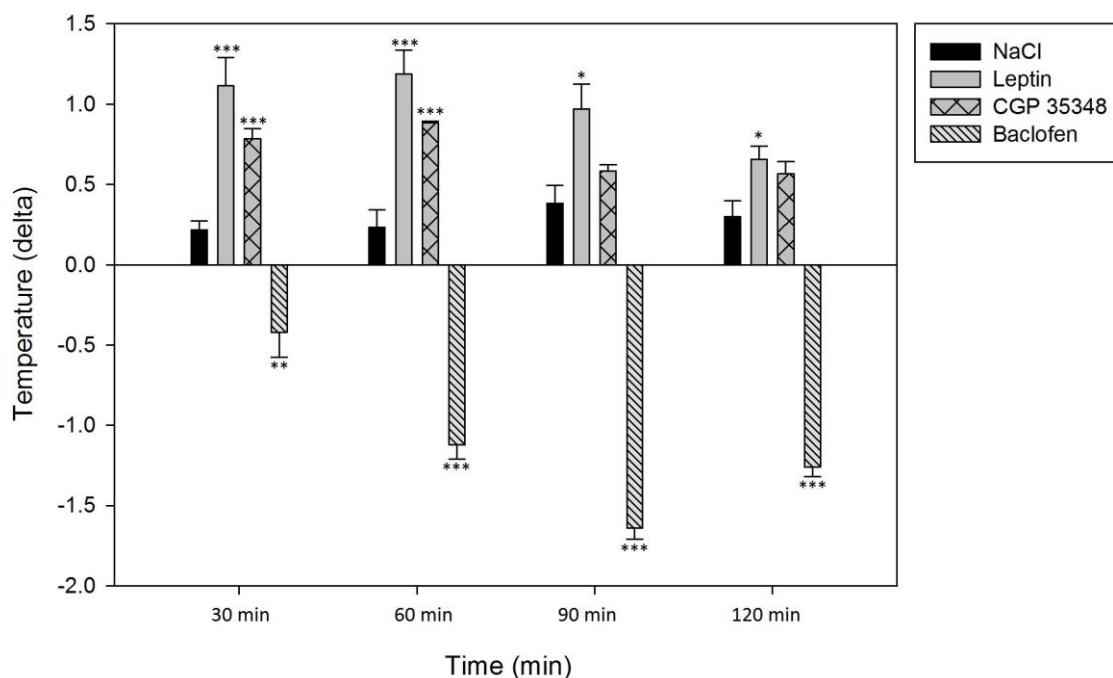
Статистическа значимост в сравнение с групата с нормална телесна маса (SC):
*** $p < 0,001$.

6.1.5. 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. 8).

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. 8).

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. 8).



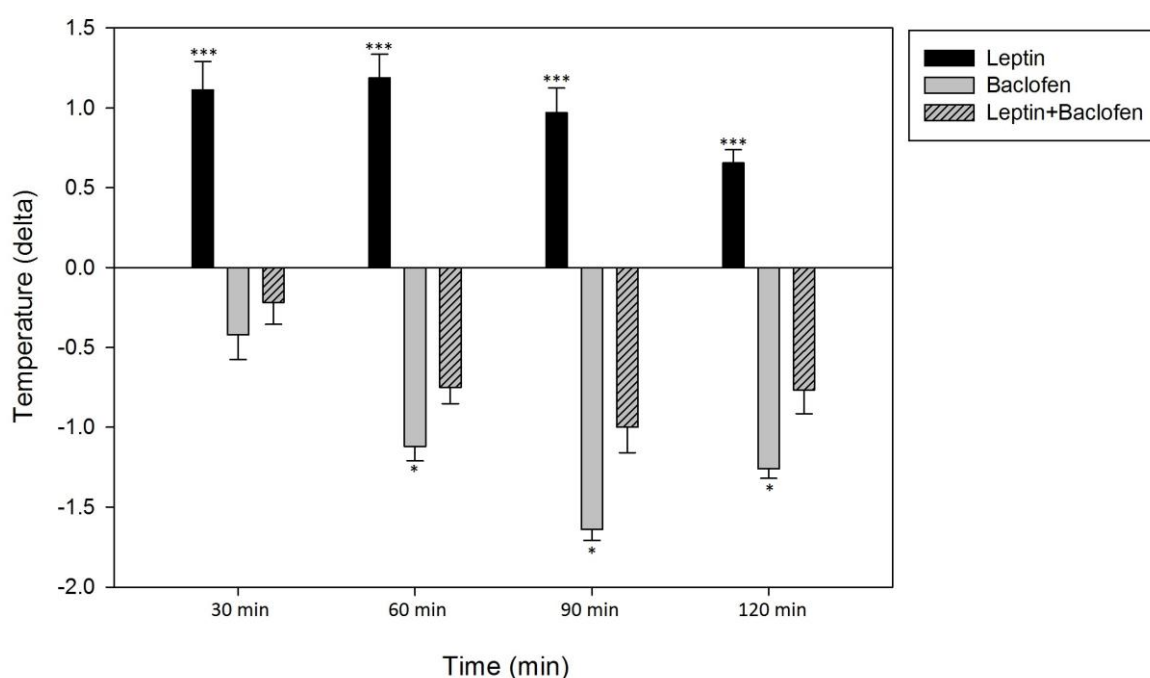
Фиг. 8: Ефекти на интраперитонеално (i.p.) инжектиране на leptin, baclofen и CGP35348, приложени самостоятелно, върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване.

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): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

6.1.6. 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.9)



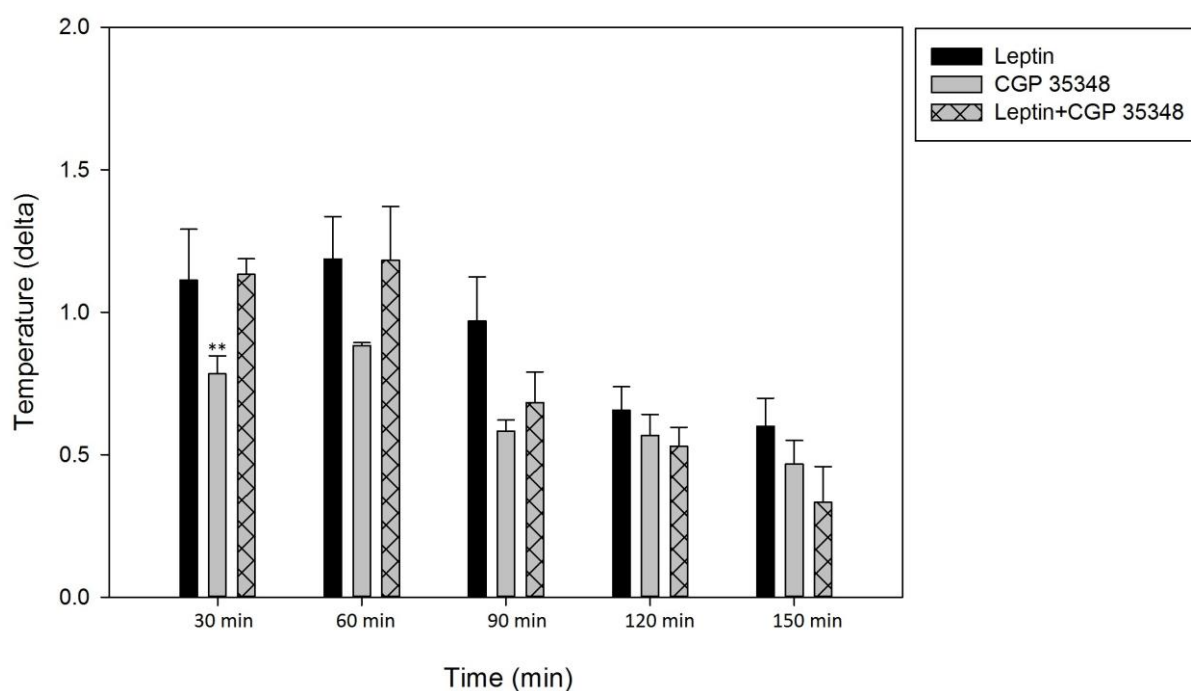
Фиг. 9: Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и baclofen върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване.

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: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

6.1.7. 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.10).



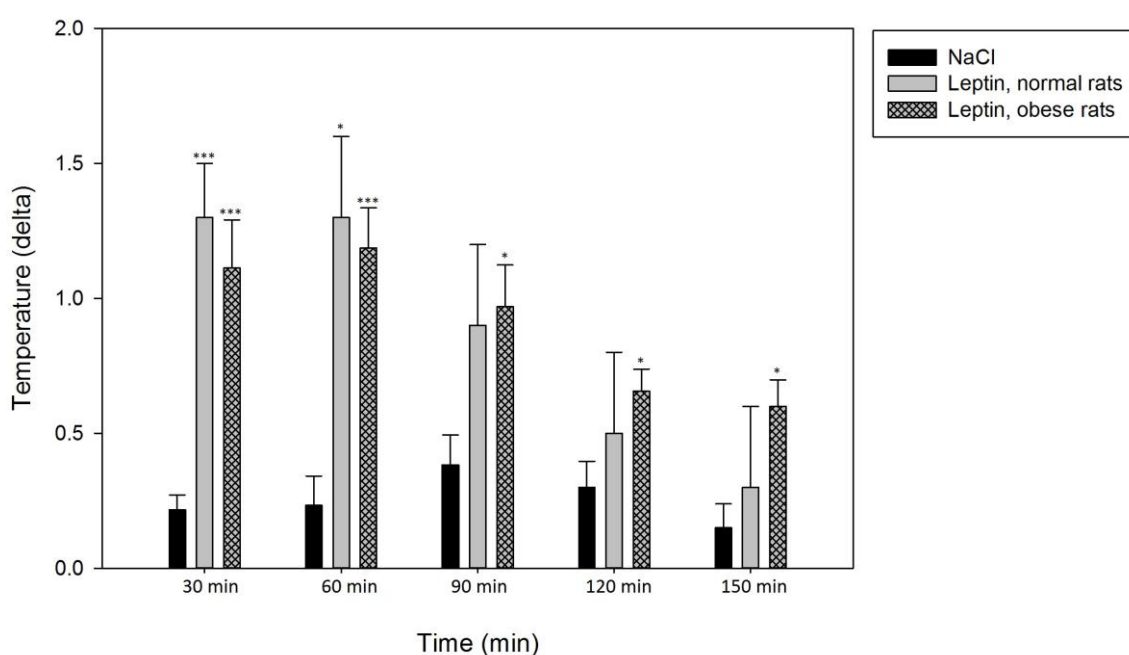
Фиг. 10: Ефект на интраперитонеално (i.p.) прилагане на комбинация от leptin и CGP35348 върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване.

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: ** $p < 0,01$.

6.1.8. 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.11).



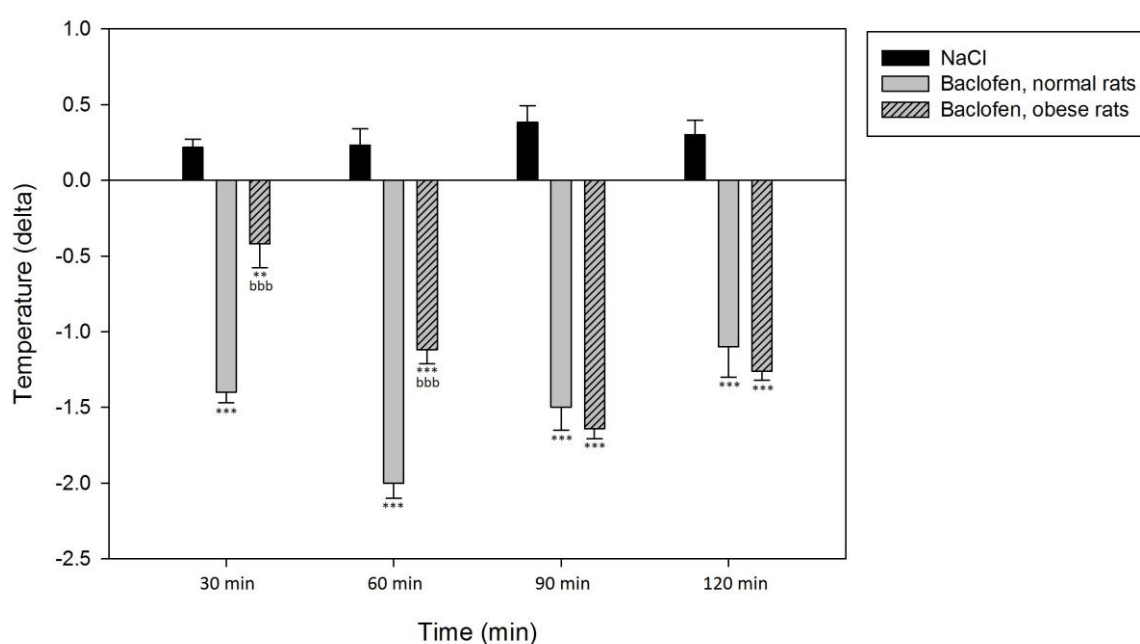
Фиг. 11: Ефекти на интраперитонеално (i.p.) инжектиране на leptin, приложен самостоятелно, върху телесната температура на плъхове с модел на затлъстяване (obese rats) в сравнение с този на плъхове с нормална телесна маса (normal rats).

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): * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

6.1.9. 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.12).



Фиг. 12: 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).

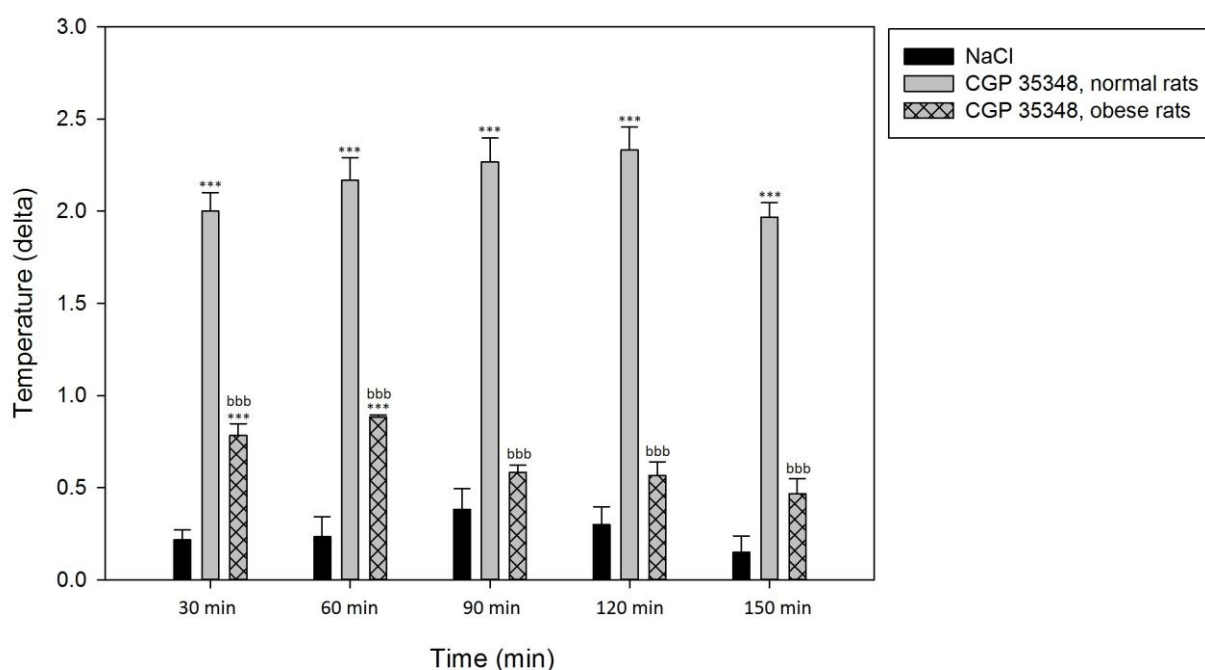
Средна промяна на телесната температура на плъхове (temperature delta °C) след интраперитонеално инжектиране на baclofen (5 mg/kg).

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} $p < 0,001$.

6.1.10. 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.13).



Фиг. 13: 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)

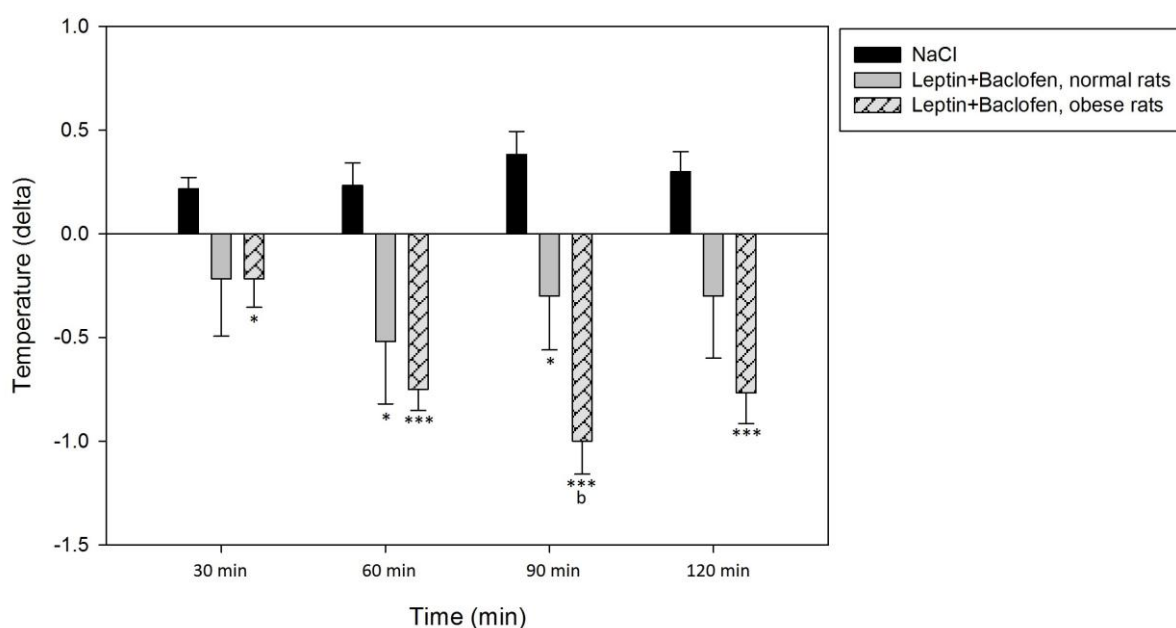
Средна промяна на телесната температура на плъхове (temperature delta °C) след интраперитонеално инжектиране на CGP35348 (5 mg/kg).

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} $p < 0,001$.

6.1.11. 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.14).



Фиг. 14: 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)

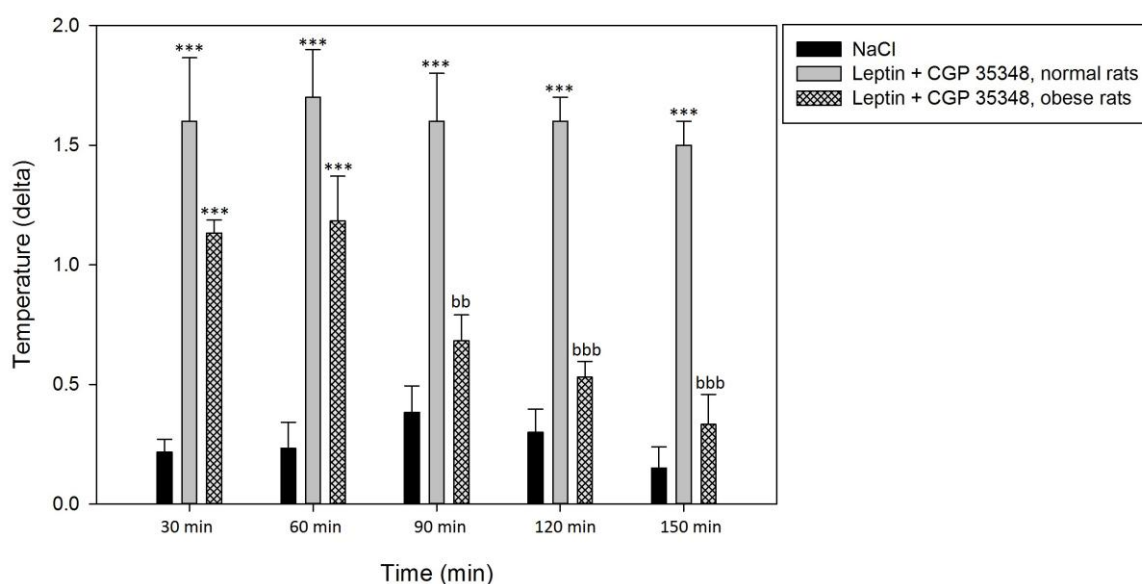
Средна промяна на телесната температура на плъхове (temperature delta °C) след интраперитонеално инжектиране на комбинация от leptin (0,5 mg/kg) и baclofen (5 mg/kg).

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 $p < 0,05$.

6.1.12. 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.15).



Фиг. 15: 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).

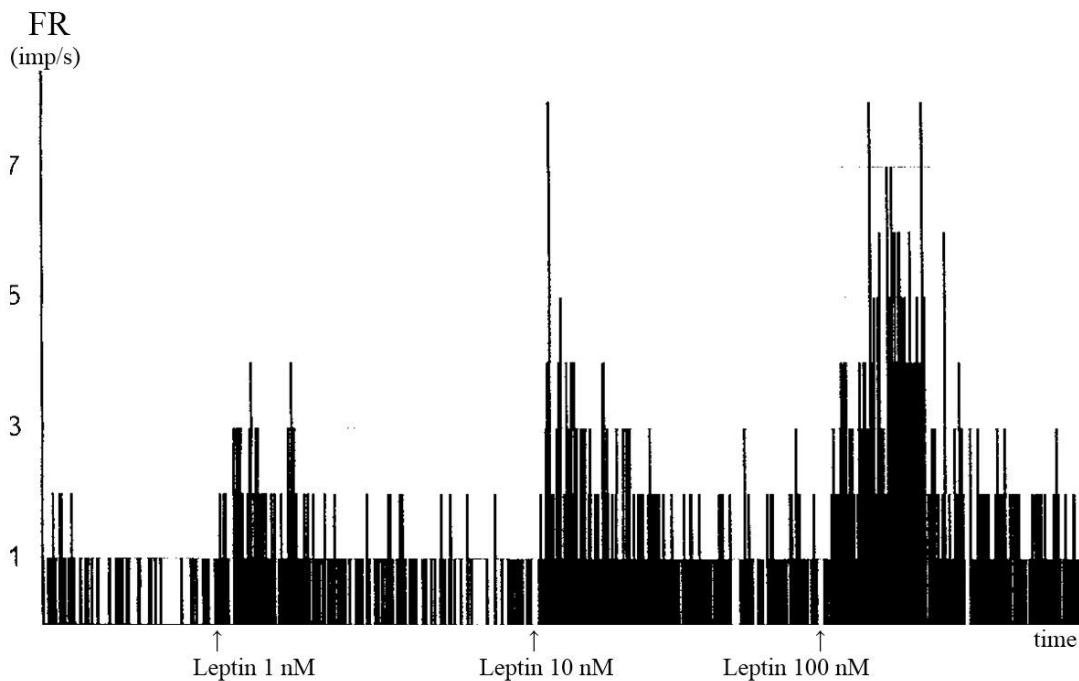
Статистическа значимост в сравнение с контролната група (NaCl): *** $p < 0,001$.

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

6.2. In vitro експерименти

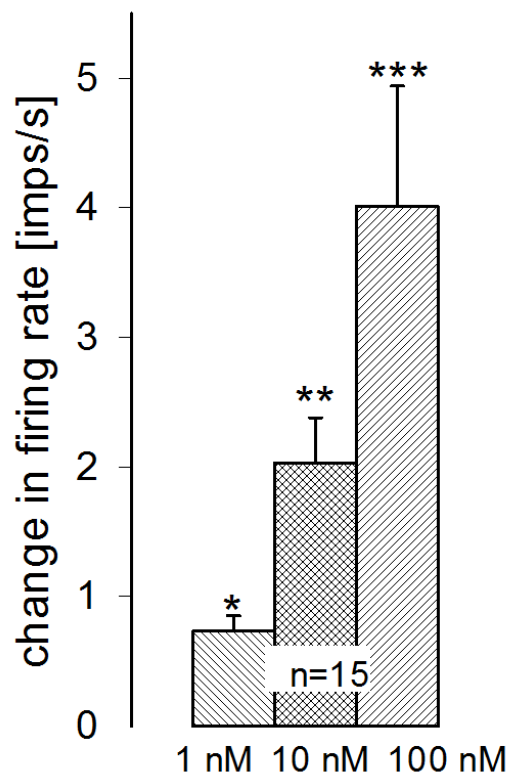
6.2.1. Ефекти на leptin върху невроналната активност на неврони от РО/АН на плъхове с нормална телесна маса

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. 16 и Фиг. 17).



Фиг. 16: 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.



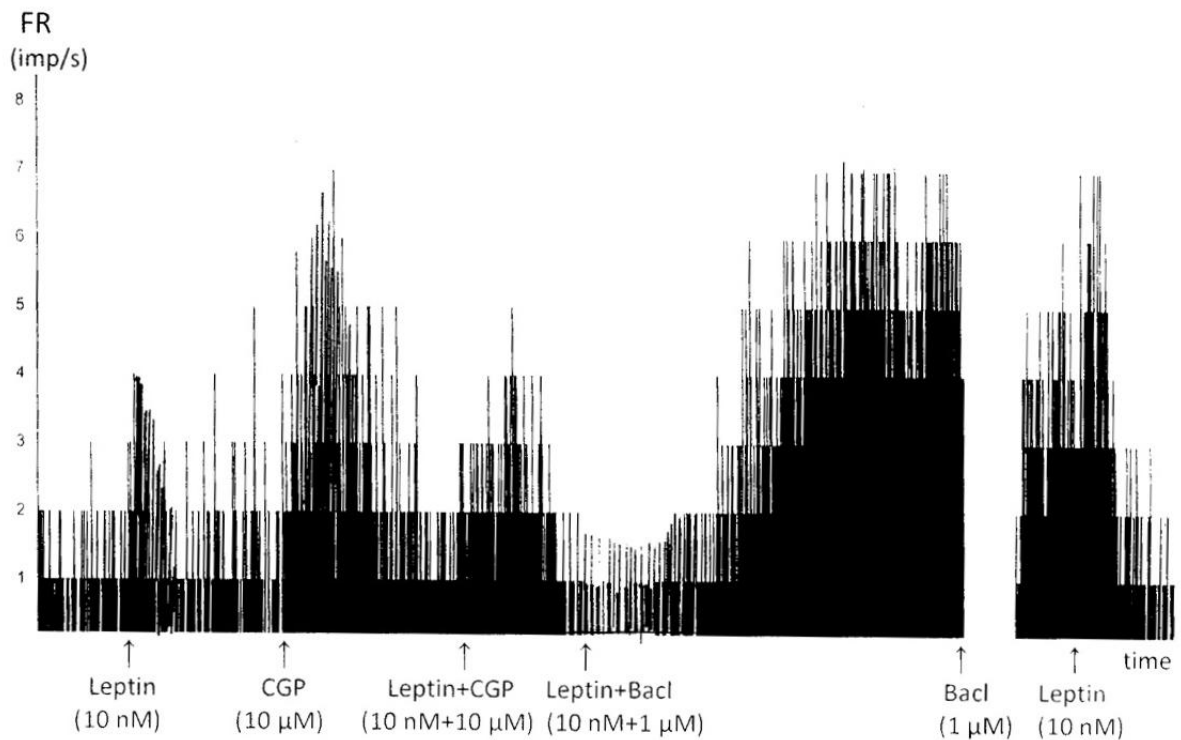
Фиг. 17: Доза-отговор ефекти на leptin върху невроналната активност на неврони в МРА от плъхове с нормална телесна маса.

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 ($n = 15$).

6.2.2. 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, а едновременно 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. 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. 18)



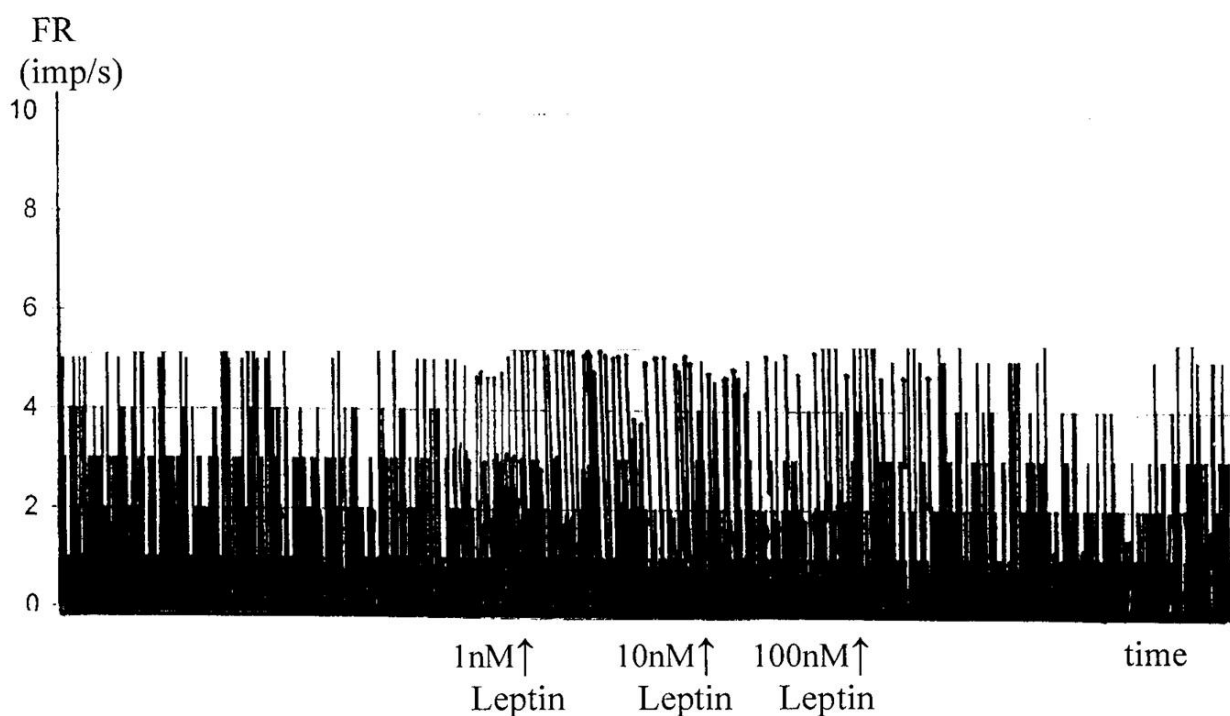
Фиг. 18: Ефекти на leptin, CGP35348 и baclofen върху активността (FR) на неврон в МРА на плъх с нормална телесна маса.

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.

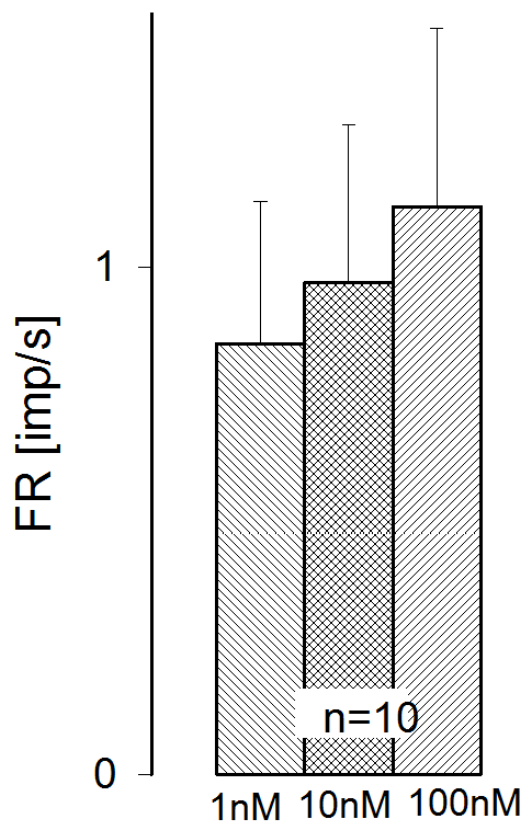
6.2.3. Ефекти на leptin върху невроналната активност на неврони от РО/АН на плъхове с експериментален модел на затлъстяване

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. 19 и Фиг. 20).



Фиг. 19: 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 диета-индуцирано затлъстяване. Leptin (стрелките: 0.1 ml от разтвор с концентрация 1 nM, 10 nM и 100 nM, bolus injection) не променя значимо невроналната активност.

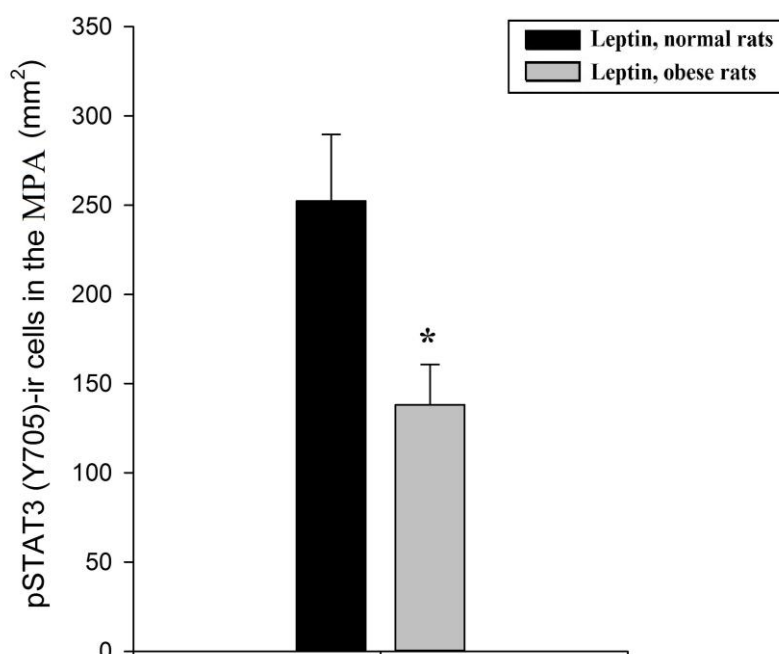


Фиг. 20: Доза-отговор ефекти на leptin върху невроналната активност на неврони в МРА от плъхове с модел на затлъстяване.

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.

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

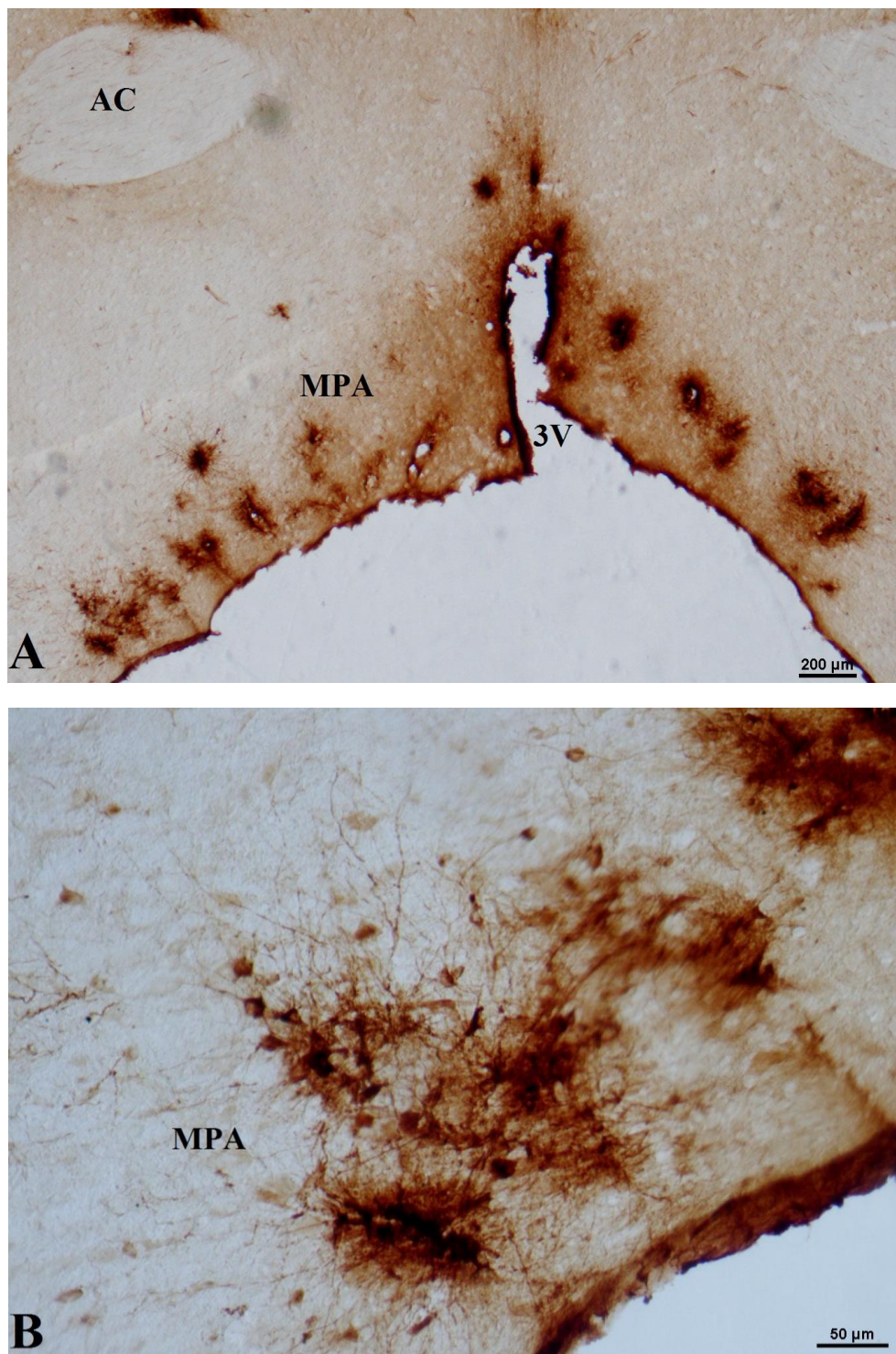
Интраперитонеалното инжектиране на leptin в доза 0,5 mg/kg в плъхове с нормална телесна маса и експериментален модел на затлъстяване доведе до повишаване броя на pSTAT3- позитивните неврони в МРА. Броят на маркираните клетки в МРА беше значимо по-голям в животните с нормална телесна маса в сравнение с животните с модел на затлъстяване ($p < 0.05$) (Фиг. 21). Освен това интензитета на имунохистохимичната реакция беше по- силно изразен в групата с нормална телесна маса (Фиг. 22, Фиг. 23, Фиг. 24). Маркиране на pSTAT3- позитивни неврони в МРА липсваше или беше незначително в третираните с физиологичен разтвор животни.



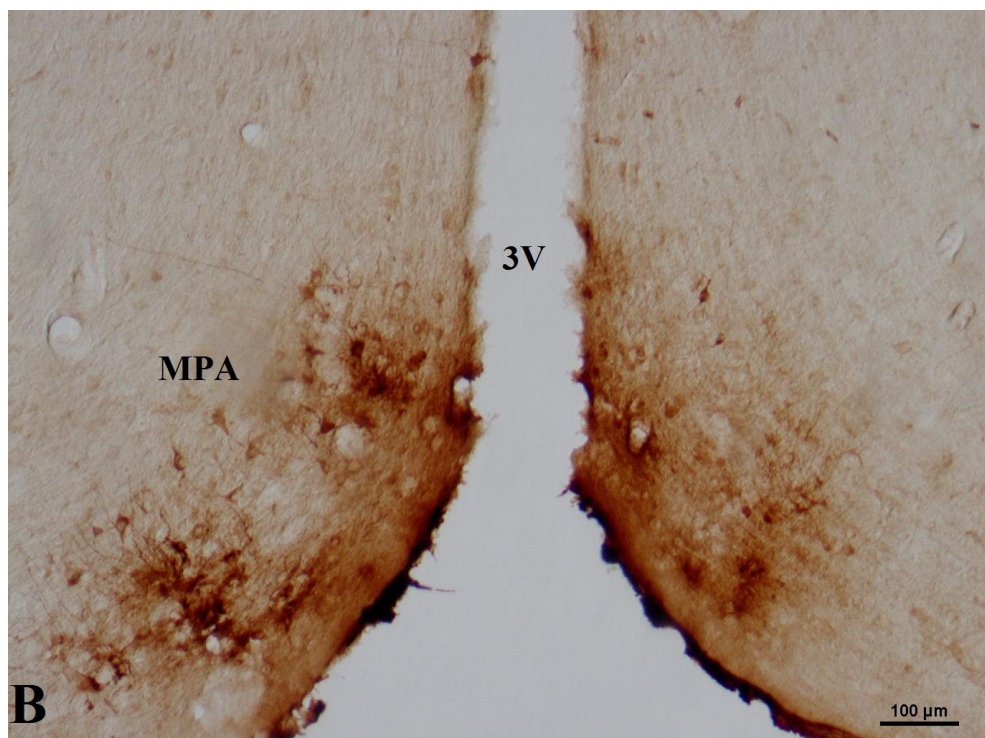
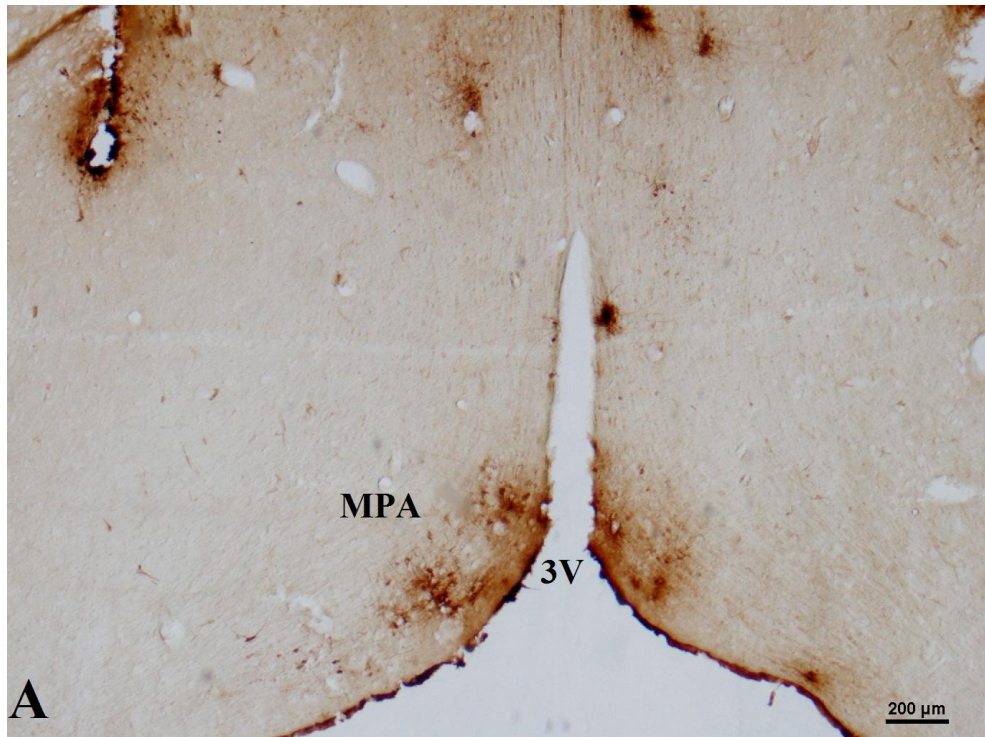
Фиг. 21: Среден брой на pSTAT3 маркираните неврони в МРА на плъхове с нормална телесна маса (normal rats) и модел на затлъстяване (obese rats) след системно прилагане на лептин.

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.

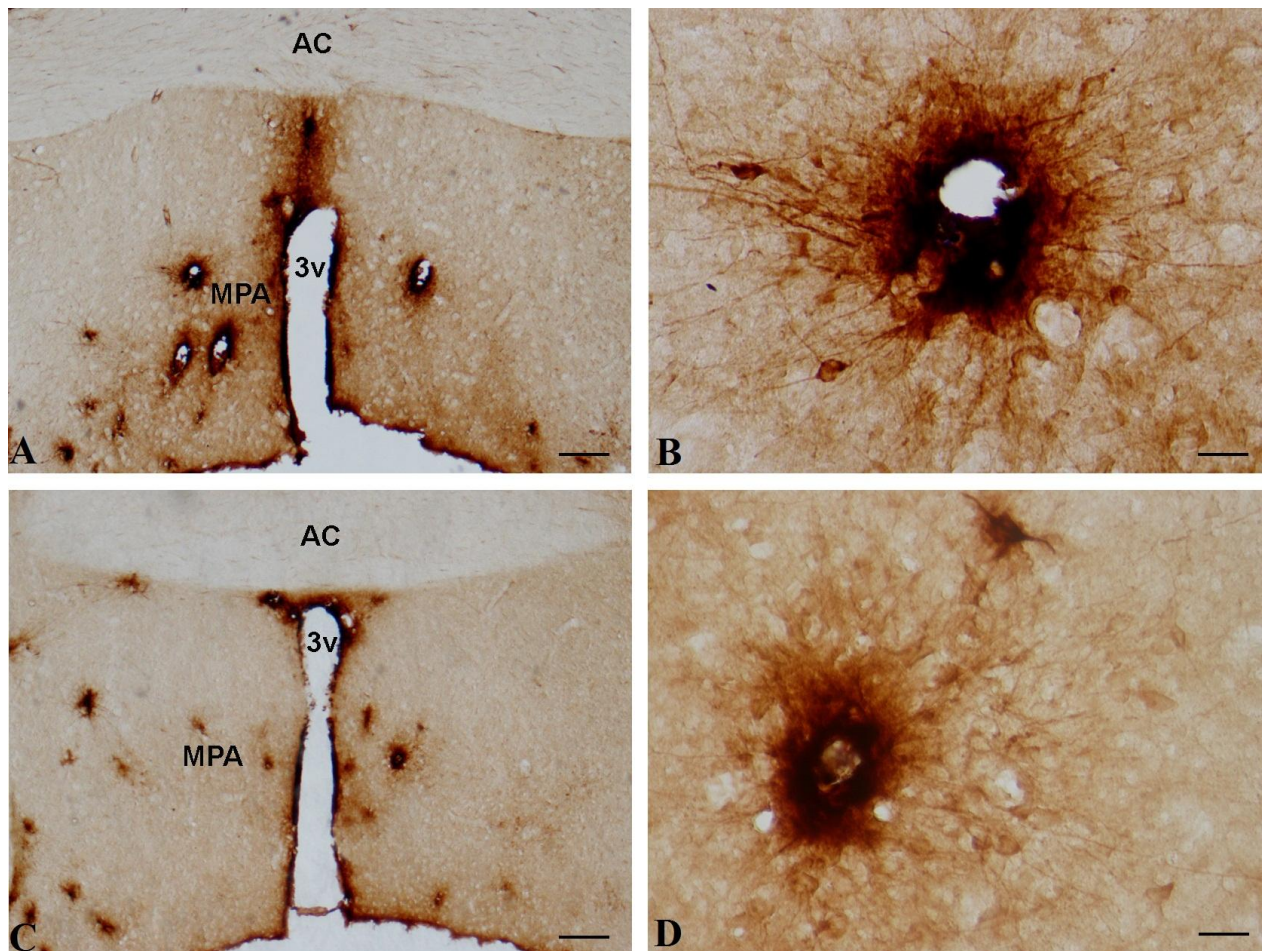
*Статистическа значимост в сравнение с групата с нормална телесна маса: * $p < 0,05$.*



Фиг. 22: 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- х 40. **B.** Увеличение- х 200. **MPA**, медиална преоптична област на предния хипоталамус; **3V**, трети мозъчен вентрикул; **AC**, *commissura anterior*.



Фиг. 23: 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. 24: 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.

7. ДИСКУСИЯ

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.

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 [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]. 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].

Храненето на гризачи с висококалорийна храна води до затлъстяване, хиперлептинемия и лептинова резистентност [Handjieva-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.

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 мембранный потенциал или невроналната активност. В нашите *in vitro* изследвания ние демонстрираме доза-зависимото повишаване на невроналната активност на неврони от МРА 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 МРА, 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. 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 обезитет 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.

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.

8. 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.

9. 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.

10. 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.

11. 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. DiBlasi. 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 усна презентация).

12. 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.

13. 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.