

МЕДИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

АВТОРЕФЕРАТ

На ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

**„ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ МЕТАБОЛИТНИ
ЕФЕКТИ НА НЯКОИ АНТИЕПИЛЕПТИЧНИ ЛЕКАРСТВА“**

За присъждане на образователна и научна степен „Доктор“ на
РАДОСЛАВ ЦВЕТАНОВ КЛИСУРОВ

Научна специалност: ФАРМАКОЛОГИЯ (вкл. ФАРМАКОКИНЕТИКА и ХИМИОТЕРАПИЯ)

Научен ръководител:

**проф. д-р Надка Бояджиева, дм, дмн, Катедра по фармакология и
токсикология, МФ, МУ – София**

София,

2017 г.

Дисертационният труд е написан на 122 страници. Той е онагледен с 28 фигури и 5 таблици. Цитирани са 195 литературни източника.

Докторантът работи като асистент в Катедрата по фармакология и токсикология към Медицински факултет на Медицински университет-София. Експерименталните изследвания са проведени в същата катедра.

Дисертационният труд е одобрен и насрочен за защита от катедрен съвет на Катедрата по фармакология и токсикология към МФ на МУ-София, състоял се на 01.02.2017г. Дисертантът е отчислен с право на защита със Заповед N РК ПК 36-343/24.02.207 на ректора на МУ-София проф. д-р Виктор Златков, дм.

Дисертационният труд е насрочен за защита пред научно жури в състав:

Проф. д-р Н. Бояджиева, дмн

Проф. д-р И. Костадинова, дмн

Проф П. Пейчев, дм

Доц. д-р Г. Ставрева, дм

Доц д-р М.Варадинова, дм

Резервни членове: Доц. д-р И.Ламбев, дм и

Доц. д-р Р.Николов, дм.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 29.03.2017 г. от 15:45 ч. часа в Аудитория №2, етаж 2, Предклиничен университетски център, ул. Здраве №2, София.

СЪДЪРЖАНИЕ

Въведение	4
Цел и задачи.....	5
Материал и методи.....	6
Резултати от собствени изследвания.....	9
Дискусия.....	29
Изводи.....	31
Приноси.....	32
Публикации.....	33

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Епилепсията е хронично заболяване на мозъка, което изисква при повечето пациенти продължително лечение с антиепилептични лекарствени продукти. Фармакотерапията на епилепсия е свързана и с ефекти на някои лекарства върху други функции като мозъчни, обменни, двигателни, паметови и т.н. Механизмите на действие на антиепилептичните лекарства са свързани с влияние върху регулаторни механизми на мозъка. Част от лекарствата повлияват и механизми, регулиращи апетит, метаболизъм, затлъстяване и др. Има данни в литературата, че хроничното въвеждане на някои антиепилептични лекарства повлиява метаболизма.

Хипертония, захарен диабет, затлъстяване и атеросклероза са четири от водещите метаболитни заболявания, които са рискови за здравето и живота на хората. Причините за тази тревожна тенденция са много и включват както индивидуалните особености на човешкия организъм, така и факторите на околната среда. През последните години се увеличава броят на хората, страдащи от захарен диабет с или без хипертония, затлъстяване и други метаболитни нарушения. Посоченото поставя въпроса за механизмите на развитие на метаболитните нарушения, включително за роля на фармакотерапията. Нехормонални фармакологични лекарствени продукти могат да въздействат върху метаболитните процеси в организма. Една от групите лекарства, с възможно влияние е тази на антиепилептичните фармакологични средства (някои от тях). Малко, до липсващи са познанията за влиянието на някои антиепилептични лекарства върху регулацията на метаболизма. Те са средства за продължително приложение (понякога се прилагат с десетилетия), както при деца, така и при възрастни хора. Централните им механизми на действие, хроничното им приложение и оскъдната налична информация за някои от тях относно промените, които оказват в метаболизма, очертаха направления за настоящите експериментални фармакологични изследвания.

Отчитайки неизяснените факти за антиепилептични средства и тяхното влияние върху метаболитни функции, както и значимостта на търсене на причините за ежегодното увеличаване на броя на хората със затлъстяване, предиабет, или развит захарен диабет и нарушения в мастна и въглехидратна обмяна, във фармакологичните изследвания на настоящият дисертационен труд се фокусира върху три сравнително широко прилагани средства за лечение на епилепсия.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на проучването е да се изследват ефектите на антиепилептични фармакологични средства валпроева киселина, топирамат и карбамазепин върху апетит, хранително поведение, някои невромедиатори и показатели на метаболизъм при мъжки и женски експериментални плъхове в период на растеж.

За да се постигне посочената цел са поставени следните задачи:

1. Да се проучат ефектите на три антиепилептични фармакологични средства-валпроева киселина, карбамазепин и топирамат върху общо тегло и хранително поведение на животни с или без експериментално затлъстяване.
2. Да се проучат ефектите на топирамат върху хормоните инсулин и лептин и показатели на въглехидратна и мастна обмяна на плъхове с или без затлъстяване.
3. Да се проучи ефектът на топирамат, валпроева киселина и карбамазепин върху нивата на катехоламини в мозъка на плъхове.
4. Да се проучи влиянието на висококалорийна диета върху нивата на катехоламини в мозък на плъхове.

5. Да се проучат ефектите на топирамат върху свободни радикали в мозъка на плъхове с или без затлъстяване.

6. Да се проучат сравнително ефектите на топирамат и валпроева киселина върху показатели на метаболизъм (плазмени нива на глюкоза и липиди) на потомството на бременни животни, които са третирани с посочените фармакологични средства по време на бременността.

МАТЕРИАЛ И И МЕТОДИ

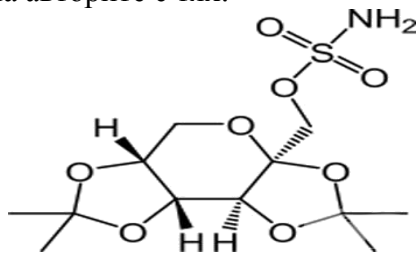
Експериментите са проведени в съответствие с изискванията, изложени в "Принципи на лабораторни грижи за животните" (НИН публикация No. 85_23, преработен 1985), както и правилата на Етичния комитет на Медицинския университет в София. Опитите бяха извършени върху неполовозрели мъжки и женски плъхове (общ брой 186) на възраст 25 дни (начало на изследванията). Част от опитите бяха проведени и върху половозрели мъжки плъхове (брой =24; възраст 3 месеца). Животните бяха разпределяни в групи от 5-8 животни. Всички животни бяха отглеждани на свободен достъп до вода и храна. 90 неполовозрели плъхове бяха поставени допълнително и на диета чрез храняване с висококалорийна течна мастна храна и ядки (слънчогледови и фастъци) с цел развитие на модел на затлъстяване. Използван бе публикуваният опит на д-р Теодора Ханджиева Дърленска (дисертационен труд, 2010). Във връзка със задачите на научното изследване, неполовозрелите плъхчета бяха отделяни от майките на 25-ия ден от раждането, разпределяни в групи за хранене и третиране с фармакологичните антиепилептични средства. В хода на експериментите, с цел измерване на количеството употребявана ежедневно храна, част от животните за определени експерименти бяха отглеждани в самостоятелни касети. Под всяка фигура в раздел резултати е посочен броят на животните в група. Повечето експерименти са хронични-продължителност 1-2 месеца и това определяше спазване на всички условия за стандартно отглеждане на животните и елиминиране на стрес върху тях.

Изследванията върху бременни животни и тяхното потомство се проведеха в два етапа: **Първи етап:** Третиране на бременни плъхове, разпределени в групи по 3 бременни животни с три фармакологични средства, съответно: валпроева киселина (50 мг/кг т.м.і.р.); топирамат (100 мг/кг т.м.і.р.); карбамазепин (100мг/кг т.м.і.р.). Група бременни животни служеха за контрола, третирани с физиологичен разтвор 1 мл/кг т.м.)

Втори етап: Проучване на потомството на възраст 3 седмици. Определяни бяха следните показатели: телесна маса, глюкоза и липиди в кръв.

I. Фармакологични средства.

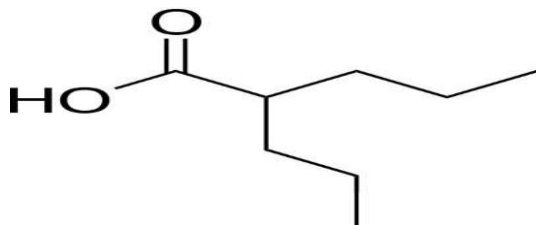
Дозите на фармакологичните средства са подбрани на база литературен анализ и опит на авторите с тях.



1. Топирамат – прилага се в доза от 100 мг / кг телесна маса на ден і.р. през цялата продължителност на експеримента - 8 седмици.



2. Карбамазепин – прилага се в доза от 100 мг/кг телесна маса i.p.



2. Валпроева киселина – прилага се в доза от 50 мг/кг телесно тегло, i.p.

II. Нефармакологични средства

1. Богата на мазнини храна – Експерименталното затлъстяване беше създадено по утвърден от нас метод (Т. Ханджиева – Дърленска и Н. Бояджиева 2010г.). Новост в настоящите експерименти е създаването на затлъстяване при полово незрели плъхове (след 25-ия ден от раждането), което се осъществява чрез първоначално хранване на животните с богата на мазнини течна храна (смес от растителна и животинска мас) за период от 10 дни и последващото им отглеждане с богати на мазнини семки (слънчогледови и фъстъци). Това е модел на физиологично експериментално затлъстяване на полово незрели животни, базиран на природната особеност на гризачите да консумират в големи количества семки и фъстъци и затлъстяване без допълнителен стрес.

Методи и апаратура

Използвана апаратура: Donau Lab Sonic DLS 310T ултразвукова вана, Unipam 302 хомогенизатор, Zanezki K-24 Центрофуга, и Perkin-Elmer 552 UV-VIS спектрофотометър с 2 мл кварцови кювети, elisakit

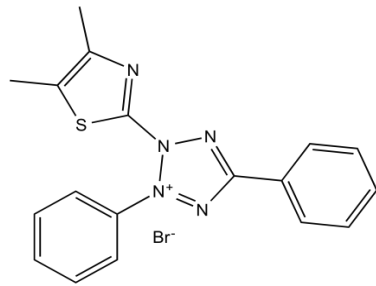
1. Метод за определяне на протеини.

Концентрациите на протеина (мг/г) се определят спектрофотометрично. За целта се използва Биуретова проба. Това е фотоколориметричен метод за количествено определяне на белтъци в разтвор. Основава се на свойството на белтъците да образуват виолетовооцветен комплекс с медни йони в алкална среда. Определянето на концентрациите на протеин в изследвания разтвор се извършва по стандартна права.

2. Метод за определяне на свободни радикали в плазма

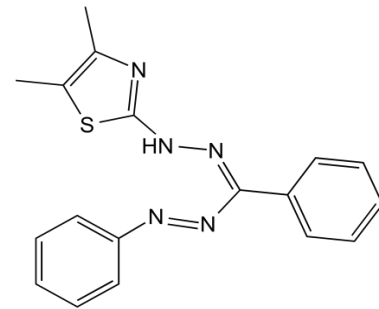
За оценка на радикалообразуването в плазма и тъкан беше използван МТТ/формаза тест. Той се базира на превръщането на жълтооцветения МТТ във виолетово оцветен формаза под действие на образуващите се в плазмата свободни радикали. Колкото по-силно изразено е протичането на тази реакция, толкова по-голямо количество свободни радикали се образуват и остават несвързани от плазмените

антиоксидантни



3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
(MTT)

системи.



(E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan
(Formazan)

Mitochondrial Reductase

Към проба, стандартизирана по протеиново съдържание се добавят 0,1 мг МТТ в концентрация 1мг/мл в PBS и 0,1 мл 0,3mM разтвор на ксантин. Пробите се инкубират в термостат при 37 градуса за 30 минути, след което се охлаждат до стайна температура. Адсорбцията на получения в резултат от взаимодействието формазан се измерва спектрофотометрично при 576 nm. Концентрацията му се определя в pmol/mg protein чрез използване на екстинкционен коефициент 13 nm/sm. Получените резултати се представят като проценти от контролната група.

3. ELISA методи за определяне на инсулин и лептин

Концентрациите на грелин, инсулин и лептин в плазма бяха определени чрез ELISA методи. Определянето се провеждаше съгласно инструкциите и протокола на производителя. Използвани бяха специфични за плъхове ELISA готови набори (китове). Бяха определени концентрации на инсулин и лептин серум на животните с помощта на ELISA готови набори за плъхове от фирмата BioVendor.

4. Метод за определяне на катехоламини в биологични среди

В края на всеки експеримент животните бяха декапитирани, бяха взети материали за биохимични, хормонални и имунологични изследвания (цял мозък, кръв и отделен серум). Изчисляване на концентрацията на медиаторите в тъканните проби е извършено чрез използване на аналитичен метод за спектрофотометрично определяне на катехоламини след дериватизационна реакция. Методът е модифициран от Катедрата по фармацевтична химия и анализ при ФФ за целите на настоящото изследване. Методът се базира на цветната реакция, която се осъществява при взаимодействието на адреналин и други катехоламини с железен трихлорид. При нея жълтият разтвор на железен трихлорид променя цвета си в зелен в присъствие на катехоламини. Полученият зелен продукт на реакцията се отчита с помощта на спектофотометър при 340 nm. Концентрацията на пробите се определя на база на стандартна калибрационна права. По-долу накратко представяме метода:

Подготовка на пробите за анализ: Мозъци от контролни и опитни животни се изследваха за съдържание на адреналин, серотонин и общо количество катехоламини. 1 гр тъкан се хомогенизира с 4 мл физиологичен разтвор за 10 мин. до получаване на хомогенат. Полученият хомогенат се разрежда до 10 мл и се центрофугира при 8000 об/мин за 20 мин. Супернатантата се събира и 1 мл от нея се преципитира с 9 мл к.НСl. Полученият разтвор се центрофугира за 15 мин при 8000 об/мин. Супернатантата се събира. 5 мл от него се обработва с 1 мл 3% разтвор на FeCl₃ съгласно указанията на метода. Адсорбцията на получените разтвори се измерва при 340 nm. Концентрацията на катехоламини в пробата се изчислява спрямо стандартната права. Приготвяне на разтвори за стандартната права: В мерителна колба от 100 мл се поставя предварително претеглено с аналитична точност количество от субстанция адреналин (Sigma, EU) както следва: 10, 5, 2.5, 125, 62.5, 31.25 мг. Приготвят се разтвори с помощта на 1 мл от

всяка концентрация на адреналин + 3 мл 3% FeCl₃ + дестилирана вода. Така се постигат 6 концентрации на работните разтвори, посочени по-долу.

1. 0,0001 g/ml
2. 0.00005 g/ml
3. 0.000025 g/ml
4. 0.0000125 g/ml
5. 0.00000625 g/ml
6. 0.000003125 g/ml

Приготвя се сравнителен разтвор (blanc). Адсорбцията на получените разтвори се измерва при 340 nm и резултатите се използва за построяване на калибрационна права, съгласно която се определят съдържанието на адреналин в мозъци на контролни и опитни плъхове.

5. Биохимични лабораторни методи за определяне на глюкоза и липиди в кръв, вкл. провеждане на глюкозо-толерантен тест на гладно на плъхове (по опита на д-р Богданов и д-р Мемед в дисертационните им трудове).

6. Статистически анализ.

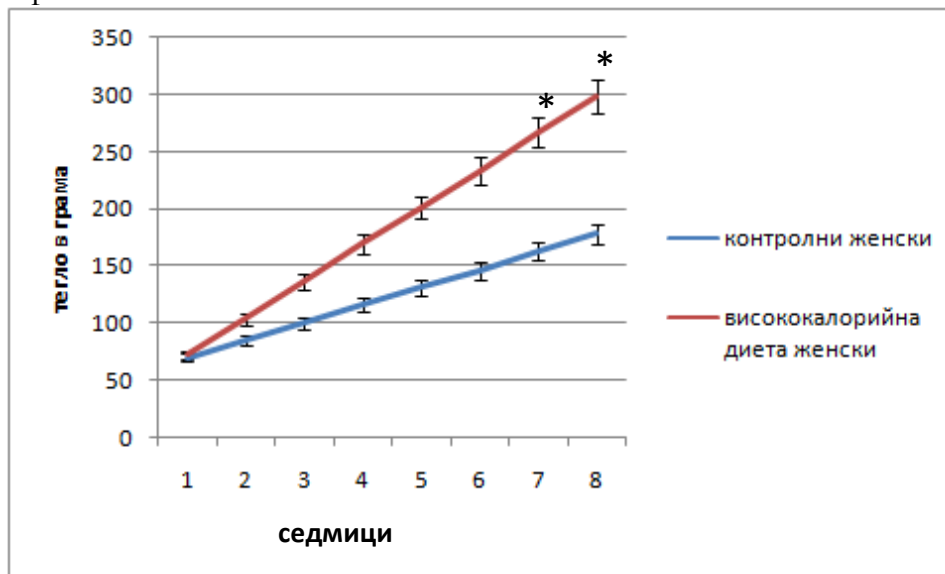
Използва се еднофакторен ANOVA анализ на данните. Стойност на $p < 0.05$ се счита за статистически значима.

ЧАСТ ТРЕТА: РЕЗУЛТАТИ ОТ ФАРМАКОЛОГИЧНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ

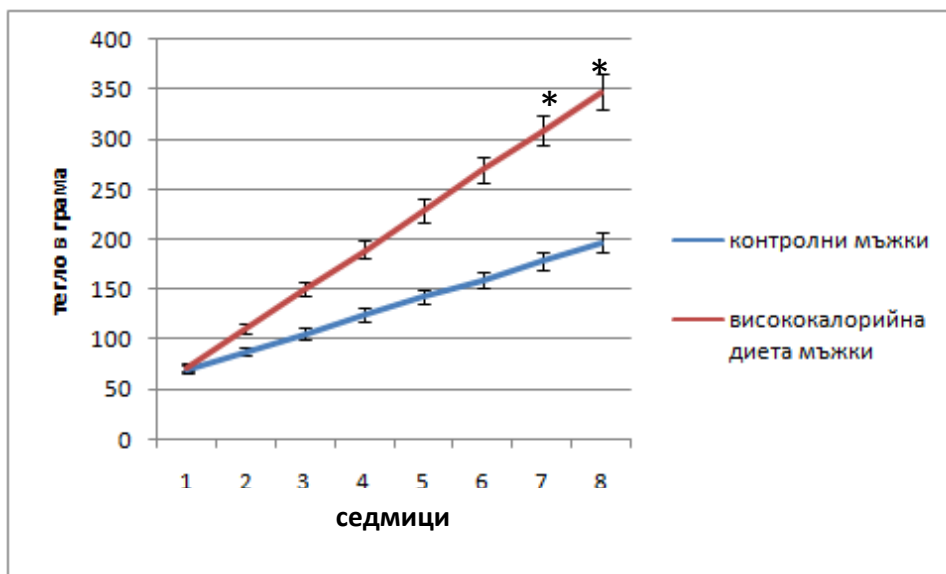
Получените експериментални резултати могат да се групират в раздели, както следва:

Раздел 1: Ефект на хранителния режим върху телесната маса и затлъстяването

През 8-седмичния период на хранене на плъховете с високо-калорийна диета се постигна развитие на затлъстяване при експерименталните животни. Теглото на захранваните с високо-калорийната диета животни се повиши статистически значимо ($p < 0.01$) в сравнение с контролните животни. Разликата между двете групи може да се види на фиг. 2 и 3:



Фиг. 2. Влияние на висококалорийната диета върху телесната маса при женски неполовозрели плъхове, които са приемали храна с високо съдържание на мазнини през целия период на експеримента от 8 седмици. В края на периода се отчита статистически значима промяна в теглото на животните, които са захранвани с висококалорийна храна, сравнени с контролната група, която е приемала храна за гризачи. Брой на животни в група 6-8. * $p < 0,05$

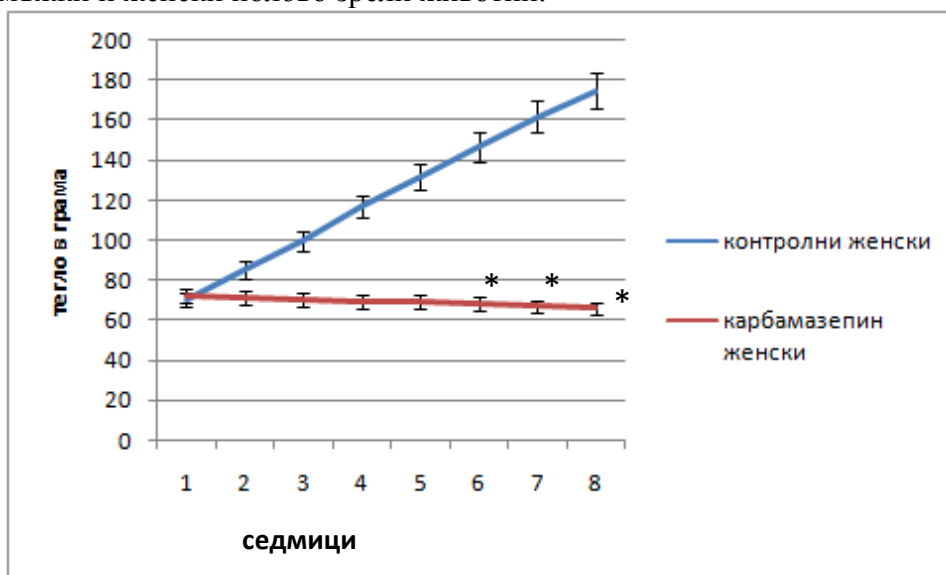


Фиг. 3. Влияние на 8 седмична висококалорийна диета върху телесна маса на мъжки неполовозрели плъхове. В края на периода се отчита статистически значима промяна в теглото на животните, които са захранвани с висококалорийна храна, сравнени с контролната група, която е приемала само храна за гризачи. Брой на животни в група 6-8. * $p < 0,05$.

Резултатите, представени на фиг. 2 и 3 показват, че мъжките и женските животни, приемащи висококалорийната диета повишават значимо теглото си след 2-рата седмица от захранването. Високо-калорийната диета повишава значимо теглото на опитните животни, като това повишение става по-бързо към 4-5 седмица. Допускаме, че причината за по-ускореното повишаване на теглото след 4-та седмица на хранене с висококалорийна диета се дължи както на увеличаване на апетита с растежа на плъхчетата и навлизане в периода на тяхното полово развитие (пубертет), адаптация към мастната диета и самостоятелно хранене след отделяне от майките, така и на по-ускорено натрупването на висцерална мастна тъкан.

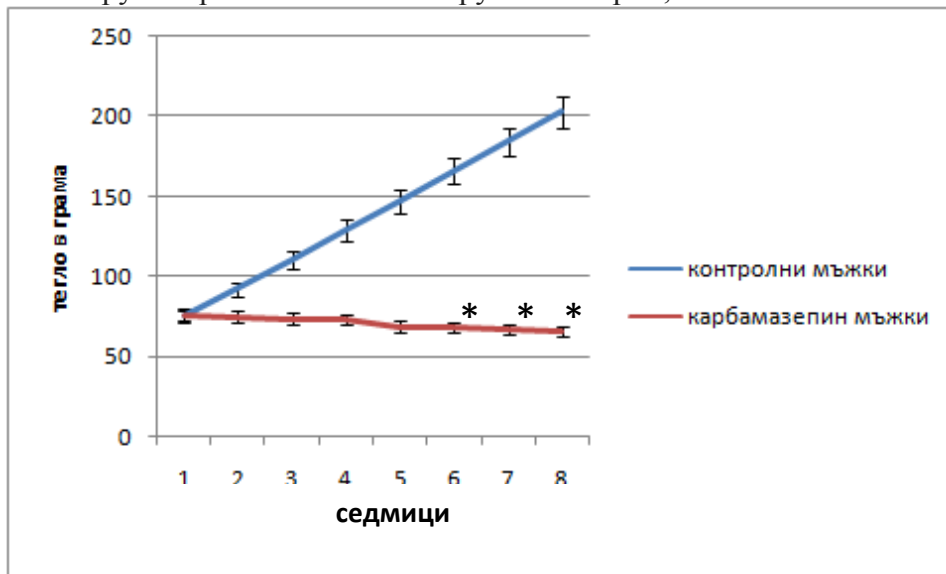
Раздел 2: Ефекти на карбамазепин върху тегло на мъжки и женски плъхове

На фиг. 4, 5, 6 и 7 са представени резултатите от експериментите с карбамазепин върху мъжки и женски полово зрели животни.



Фиг. 4. Влияние на карбамазепин (100 mg/kg т.м. i.p.) върху телесната маса при **незахранвани** с висококалорийна храна неполовозрели женски плъхове – отчита се

понижение в телесната маса на третираните с карбамазепин животни, спрямо контролната група. Брой на животни в група 6-8. * $p < 0,05$

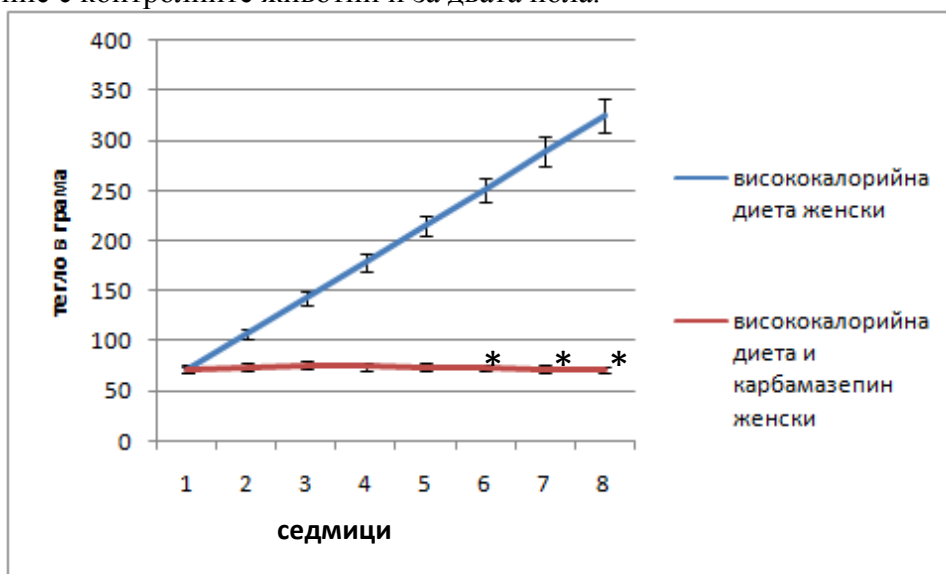


Фиг. 5. Влияние на карбамазепин (100 mg/kg т.м. i.p.) върху телесната маса при незахранвани с висококалорийна храна неполовозрели мъжки плъхове – отчита се понижение в телесната маса на третираните с карбамазепин животни, което е статистически значимо спрямо контролната група. Брой на животни в група 6-8. * $p < 0,05$.

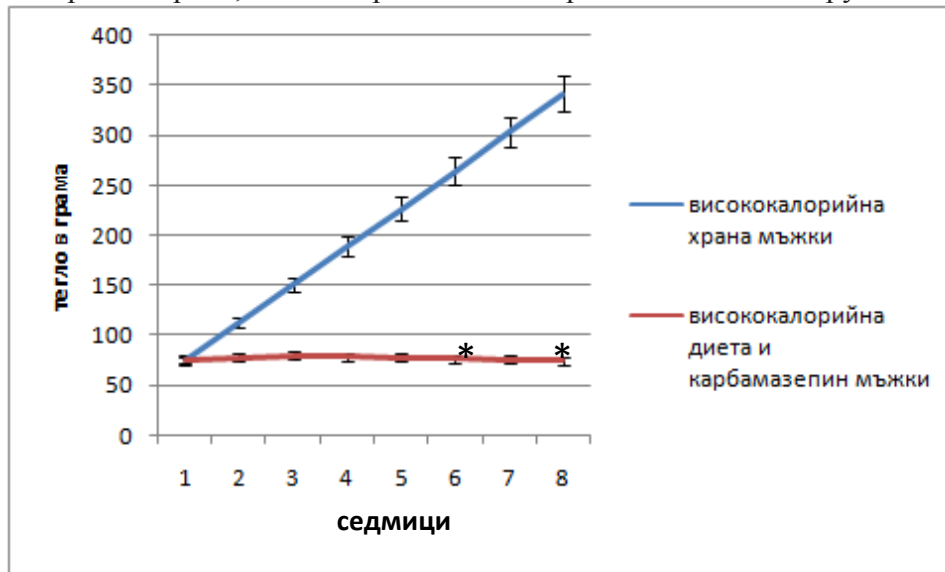
Приемът на карбамазепин значимо понижава теглото на животните от двата пола. При ежедневното наблюдение на животните отчитаме тенденция към намален прием на храна при тези, третирани с карбамазепин в сравнение с контролните животни. Посоченото дава основание да допуснем намален апетит на животните под влияние на карбамазепин.

Резултатите с карбамазепин върху експериментални животни със затлъстяване са представени на фиг. 6 и 7 (за двата пола плъхове).

Още по-отчетлив е резултата от ефекта на карбамазепин върху телесното тегло и апетита при захранваните с висококалорийна храна животни. Статистически значими са разликите в теглото между захранваните допълнително с мастна диета плъхове в сравнение с контролните животни и за двата пола.



Фиг. 6. Влияние на карбамазепин (100 mg/kg т.м. i.p) върху телесната маса на неполовозрели женски животни, които са захранвани с висококалорийна храна за 8 седмици. Отчита се статистически значимо понижение в телесната маса на третираните с карбамазепин плъхове спрямо контролните животните, които са захранвани с висококалорийна храна, но без карбамазепин. Брой на животни в група 6-8. * $p < 0.05$.



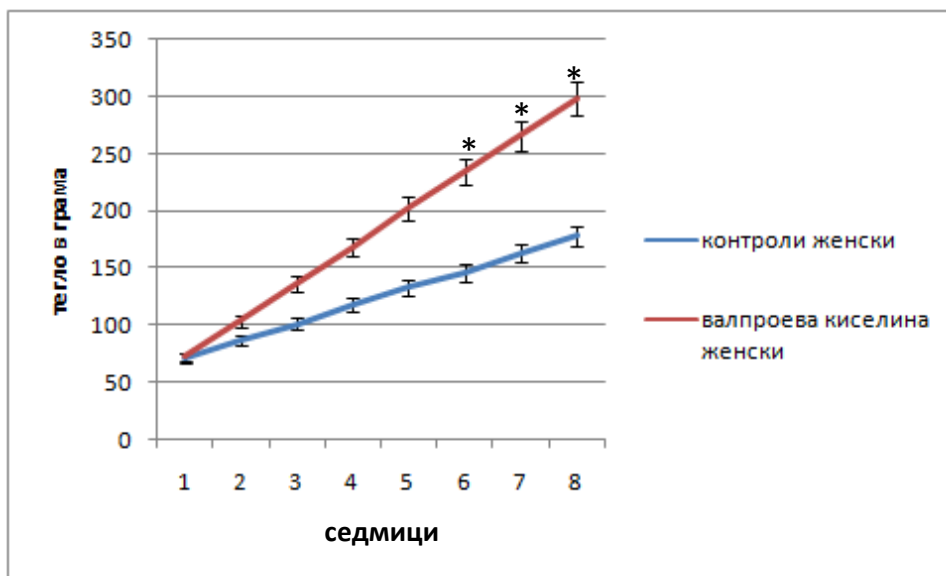
Фиг. 7. Влияние на карбамазепин (100 mg/kg т.м. i.p) върху телесната маса на мъжки неполовозрели животни, които са захранвани с висококалорийна храна през целия период на третиране от 8 седмици. Отчита се статистически значимо понижение в телесната маса на третираните с карбамазепин в сравнение с животните, които са захранвани с висококалорийна храна, но без карбамазепин. Брой на животни в група 6-8. * $p < 0.05$.

Продължителното третиране с карбамазепин на мъжки и женски млади плъхове (след 25-ия ден от раждането) понижава тяхното тегло. Анализът на резултатите показва, че няма разлики в ефекта на карбамазепин върху теглото между двата пола животни. Допускаме, че продължителното въвеждане на карбамазепин води до потискане на апетита на животните и намаляване на теглото им в периода на растеж. По-отчетлив е резултатът с карбамазепин при групите животни, приемали висококалорийна храна.

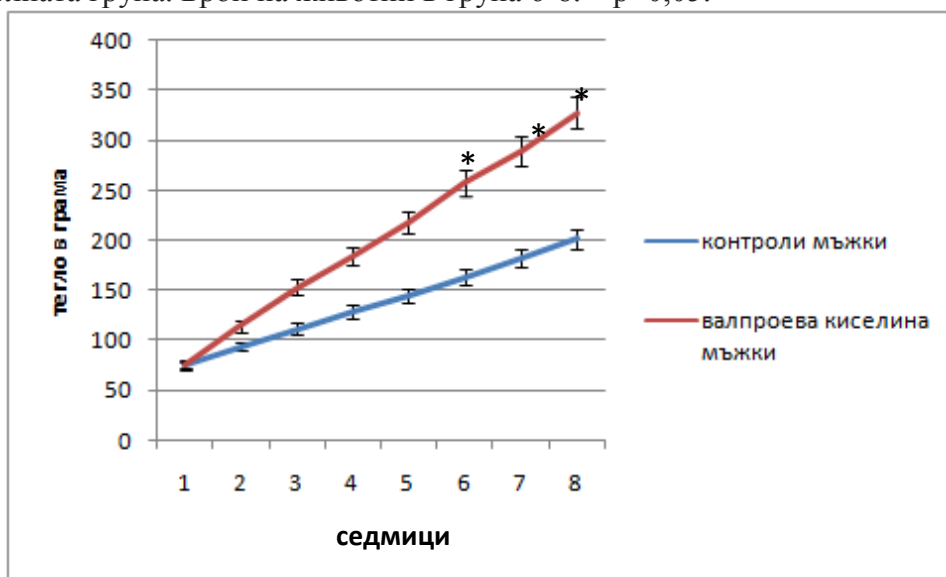
Заклучения: 1. Карбамазепин понижава теглото на мъжки и женски животни в хода на растежа. 2. Карбамазепин понижава степента на затлъстяване на неполовозрели мъжки и женски плъхчета при хранене с висококалорийна (богата на мазнини) диета.

Раздел 3: Ефекти на валпроева киселина върху тегло на мъжки и женски плъхове

Резултати от проучване на валпроева киселина са представени на фигури 8, 9, 10 и 11.

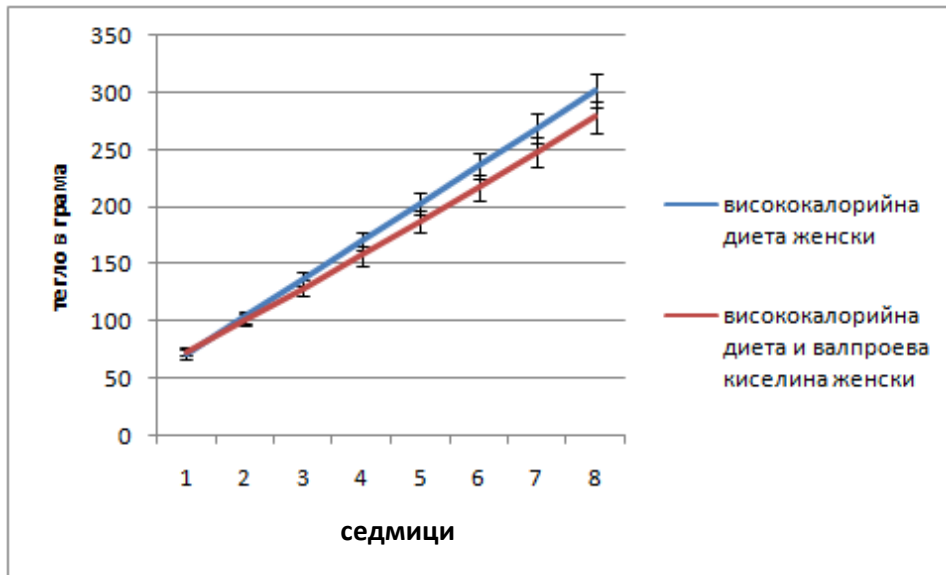


Фиг. 8. Влияние на валпроева киселина (50 mg/kg т.м. i.p.) върху телесната маса на **незахранвани** с висококалорийна храна неполовозрели **мъжки** плъхове – отчита се повишаване на телесната маса на третираните с валпроева киселина животни, спрямо контролната група. Брой на животни в група 6-8. * p<0,05.

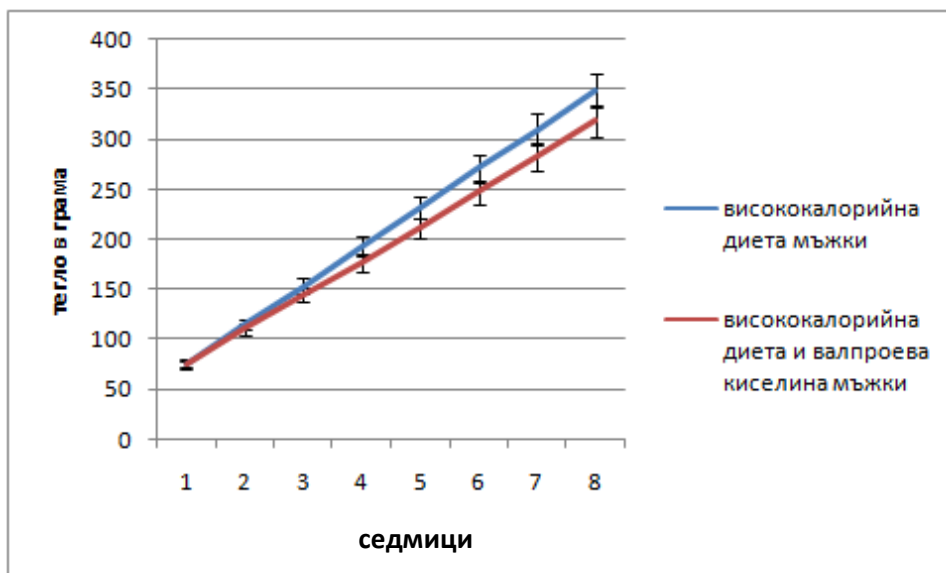


Фиг. 9. Влияние на валпроева киселина (50 mg/kg т.м. i.p.) върху телесната маса при **незахранвани** с висококалорийна храна неполовозрели **женски** плъхове – отчита се повишаване на телесната маса на третираните с валпроева киселина животни, спрямо контролната група. Брой на животни в група 6-8. *p<0,05

Продължителното третиране на мъжки и женски животни с валпроева киселина предизвиква повишаване на теглото им, което е статистически значимо в сравнение с животните от контролната група.. Допуска се увеличаване на апетита и потребностите от храна на животните под влияние на многократно третиране с валпроева киселина.



Фиг. 10. Влияние на валпроева киселина (50 мг/кг т.м. i.p) върху телесната маса на **женски** неполовозрели животни, които са захранвани с **висококалорийна храна** през целия период на третиране от 8 седмици. Брой животни в група 6-8.



Фиг. 11. Влияние на валпроева киселина (50 mg/kg т.м. i.p) върху телесната маса на **мъжки** неполовозрели животни, които са захранвани с **висококалорийна храна** през целия период на третиране от 8 седмици. Брой животни в група 6-8.

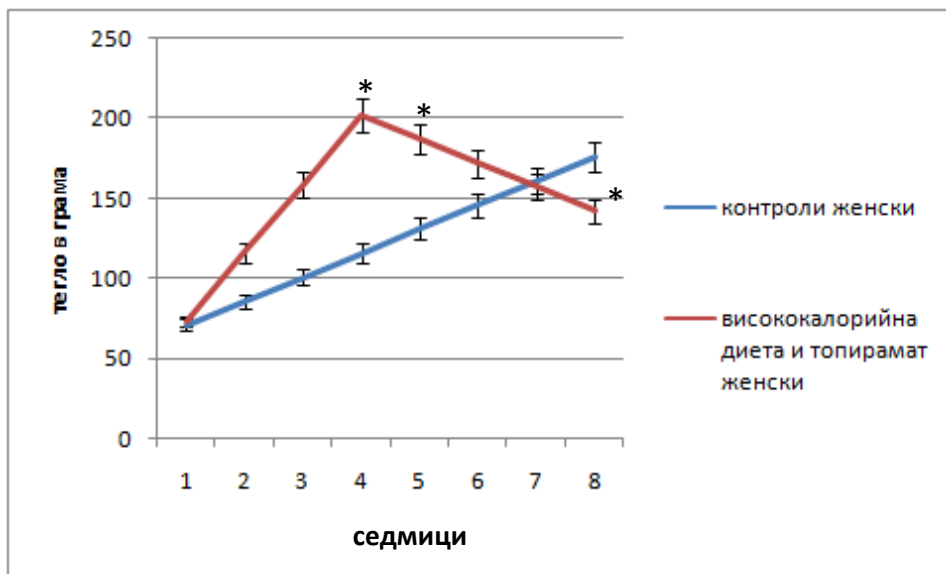
Хроничното третиране с валпроева киселина **не повишава теглото** на мъжки и женски плъхове в периода на растеж, които допълнително са захранвани с висококалорийна храна.

Заключения: 1. Многократното третиране с валпроева киселина на мъжки и женски плъхове без висококалорийна диета в период на растеж увеличава теглото им, което е статистически значимо в сравнение с контролните животни. 2. Валпроева киселина не предизвиква потенциране на ефекта на висококалорийната диета (с мас) върху теглото на мъжки и женски животни в периода на техния растеж (няма различия в теглото между опитни и контролни плъхове).

Раздел 4: Ефекти на топирамат върху тегло на мъжки и женски плъхове

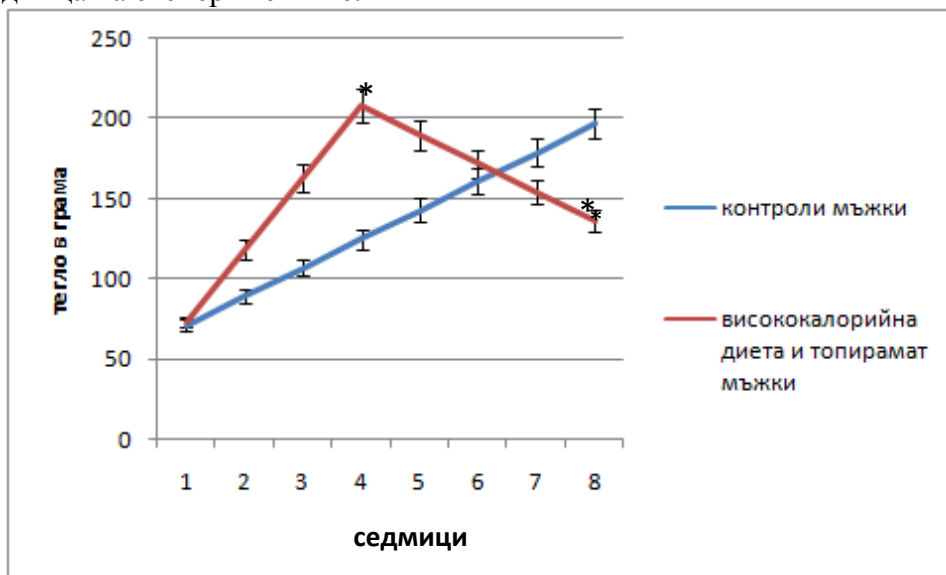
Резултати от проучванията с топирамат са представени на фигури 12 и 13. Тези експерименти се различават от посочените по-горе. При тях животните (мъжки и

женски неполовозрели плъхчета) са подложени на диета за затлъстяване (храна, богата на мазнини) за 4 седмици и експериментът е продължил с въвеждането на топирамат за 4 седмици.



Фиг. 12. Влияние на топирамат в доза 100mg/kg т.м. i.p. върху телесната маса на женски животни, със затлъстяване. Отчита се статистически значимо понижение на теглото на животните със затлъстяване и третирани с топирамат в сравнение с контролната група. Брой на животни в група 6-8. * $p < 0,05$

Включването на топирамат след хранене с висококалорийна храна спира повишаването на телесната маса. Рано, още след първата седмица на третиране с топирамат се отчита намаляване на теглото на животните, което продължава до края на 8-та седмица на експериментите.



Фиг. 13. Влияние на топирамат в доза 100mg/kg т.м. i.p. върху телесната маса на мъжки животни, третирани с фармакологичното средство за 4 седмичен период след първоначално хранене с висококалорийна храна за 4 седмици. Отчита се значимо понижение на теглото на затлъстелите животни, като в края на периода на експеримента теглото спада до стойности по-ниски от тези на контролната група, която е получавала само лабораторна храна за плъхове. Брой на животни в група 6-8. * $p < 0,05$

При мъжки животни включването на топирамат след 4-та седмица на захранване спира повишаването на телесната маса подобно на експеримента с женските плъхове. Още с първите приеми на топирамат теглото на животните започва да спада. Понижаване на теглото се наблюдава още на първата седмица. Този ефект се засилва с времето и теглото и се понижава и достига стойности под нормалните за контролни животни.

Заклучение: Продължителното ежедневно въвеждане на топирамат на мъжки и женски животни със създаден модел на затлъстяване намалява теглото, което е по-значимо проявено при мъжките плъхове. Допускаме роля на половите хормони в по-изразения ефект на топирамат при мъжките плъхове.

Раздел 5: Проучване влиянието на висококалорийна диета върху катехоламини в мозък на мъжки и женски плъхове

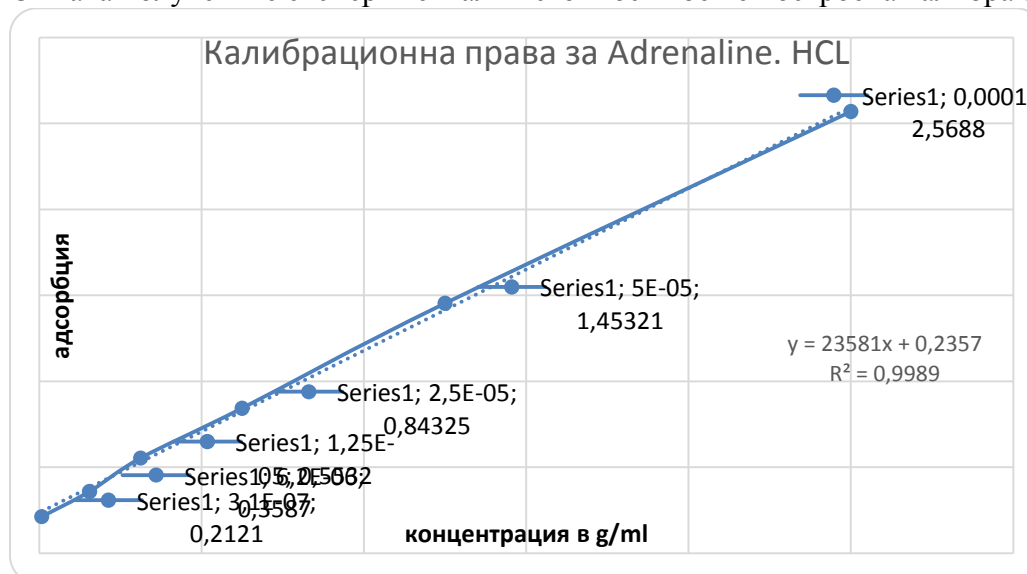
Резултатите от проучванията с карбамазепин, валпроева киселина и топирамат показаха ефекти на трите фармакологични средства върху теглото и степента на затлъстяване в период на растеж на животните. Отчитайки теглото и храната, която животните консумираха ежедневно, както и механизмите на действие на тези фармакологични средства, може да се допусне, че ефектите им са централни. Анализът в литературата показва роля на катехоламини в мозъка в регулиране на апетит и метаболизъм и малко експериментални изследвания за влиянието на посочените антиепилептични средства върху адреналин на мозък на неполовозрели плъхове. Първа задача на това проучване бе анализът на адреналин.

Резултати от анализ на адреналин:

Приготвените предварително разтвори на Adrenaline.HCL с точни концентрации се спектрофотометрират при 340 nm дължина на вълната. Получените стойности са представени в следната таблица:

Концентрация	Адсорбция
0,0001	2,5688
0,00005	1,4663
0,000025	0,96513
0,0000125	0,5532
0,00000625	0,31644
0,000003125	0,1652

От така получените експериментални стойности беше построена калибрационна права:



Фиг. 14. Калибрационна права за адреналин е построена на база данните, получени при количествено определяне на адреналин чрез фотоколориметрия на разтвор след проведена дериватизационна реакция с $FeCl_3$ – корелационния коефициент е 0,9989.

Както се вижда от правата получените стойности много добре са представени с корелационен коефициент $R=0,9989$. Това показва много добро съвпадение на експерименталните стойности с теоретично очаквания ход на правата. Така получената калибрационна права беше използвана за изчисляване на концентрациите на медиаторите в мозъка на експерименталните животни

При спектрофотометричното определяне на приготвените проби от експерименталните животни се получиха резултати, които са обобщени в следните таблици 1 и 2:

A-Carb	K-Carb	A-Valp	K-Valp	A-Top	K-Top
0,708677	0,0497	0,657146	0,0443	0,733488	0,0523
0,709631	0,0498	0,647603	0,0433	0,733488	0,0523
0,710586	0,0499	0,658100	0,0444	0,734443	0,0524
0,709631	0,0498	0,658100	0,0444	0,734443	0,0524
0,710586	0,0499	0,657146	0,0443	0,734443	0,0524
0,710586	0,0499	0,647603	0,0433	0,733488	0,0523

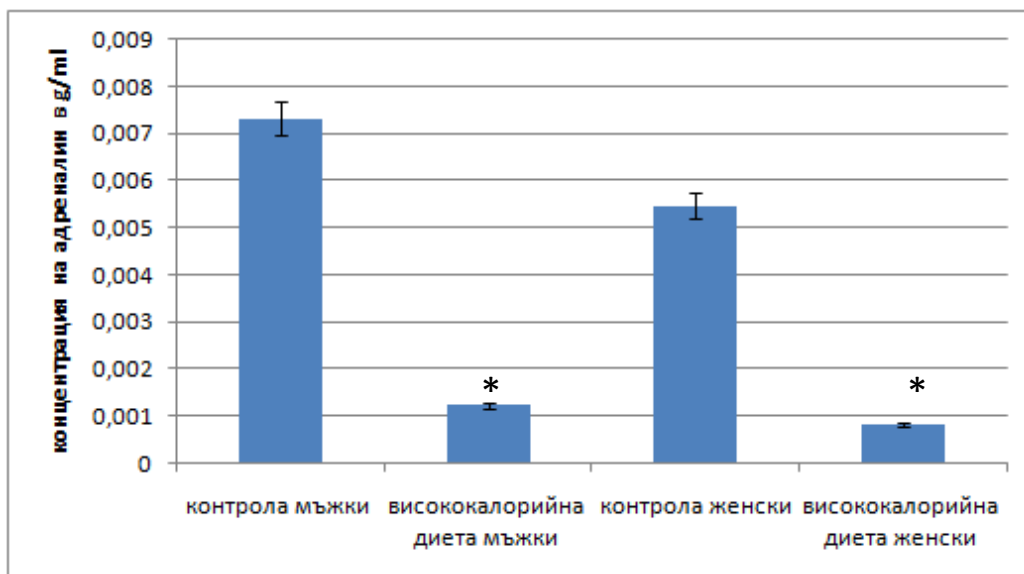
Табл. 1. Концентрация (K) на адреналин в мозък на мъжки неполовозрели плъхове, третирани с изследваните фармакологични средства – карбамазепин, валпроева киселина и топирамат и на нормална лабораторна храна (Carb – карбамазепин; Valp- валпроева киселина; Top- топирамат). А-адсорбция. Брой на животни в група = 6.

A-Carb	K-Carb	A-Valp	K-Valp	A-Top	K-Top
0,605615	0,0389	0,234408	0,0361	0,701997	0,049
0,603706	0,0387	0,584621	0,0367	0,692454	0,048
0,603706	0,0387	0,578895	0,0361	0,693409	0,0481
0,604661	0,0388	0,585575	0,0368	0,693409	0,0481
0,604661	0,0388	0,580804	0,0363	0,694363	0,0482
0,605615	0,0389	0,584621	0,0367	0,693409	0,0481

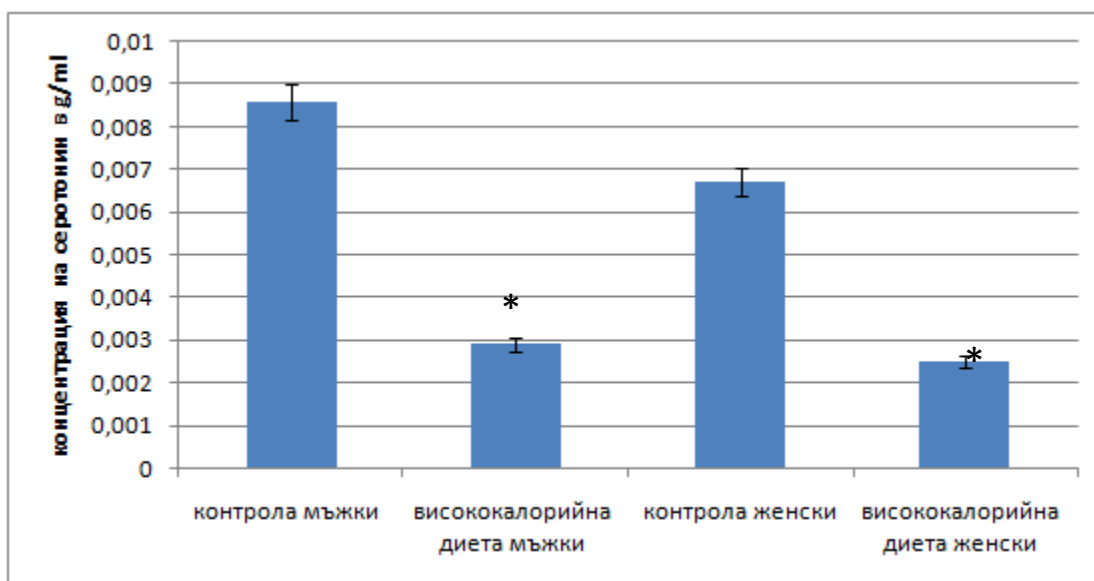
Табл. 2. Концентрация (K) на адреналин в мозък на женски неполовозрели плъхове, третирани с изследваните фармакологични средства – карбамазепин, валпроева киселина и топирамат и на нормална лабораторна храна (Carb – карбамазепин; Valp- валпроева киселина; Top- топирамат). А-адсорбция. Брой на животни в група = 6.

В посочените таблици са отбелязани стойностите на адсорбцията и изчислените на база концентрации на адреналин в пробите.

На фиг. 15 и 16 са представени резултатите от сравнителните изследвания на мозъчна концентрация на адреналин и серотонин при мъжки и женски животни. За първи път се установява промяна в катехоламини на мозък на плъх след продължително хранене с висококалорийна диета в период на растеж на плъхчета. Няма разлика в резултатите между мъжки и женски животни.



Фиг. 15. Влияние на 8 седмична висококалорийна мастна диета върху нивата на адреналин в мозък на неполовозрели мъжки и женски плъхове. Отчетени са понижени концентрации на адреналин в мозъка на животните, получаващи висококалорийна храна, спрямо контролната група, която е захранвана с нормална лабораторна храна и при двата пола. Брой животни в група – 6-8. * $p < 0,05$ при сравняване със съответната по пол контролна група.

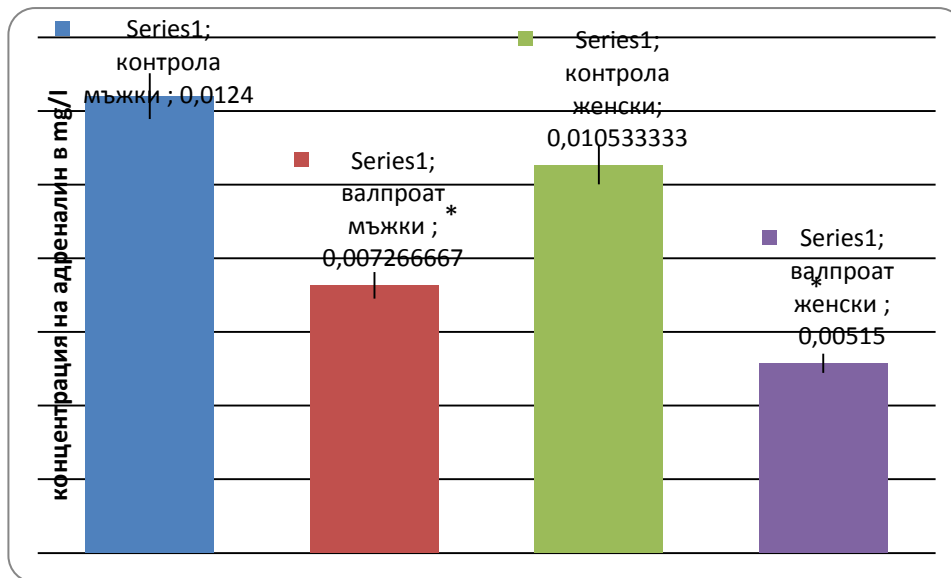


Фиг. 16. Влияние на 8 седмична висококалорийна диета върху концентрациите на серотонин в мозък на мъжки и женски неполовозрели плъхове. Отчита се понижаване в концентрацията на серотонин в мозък на захранваните с висококалорийна храна плъхове и при двата пола в сравнение с контролните групи, които са захранвани с нормална лабораторна храна. Брой животни в група 6-8. * $p < 0,05$ при сравняване със съответната по пол контролна група.

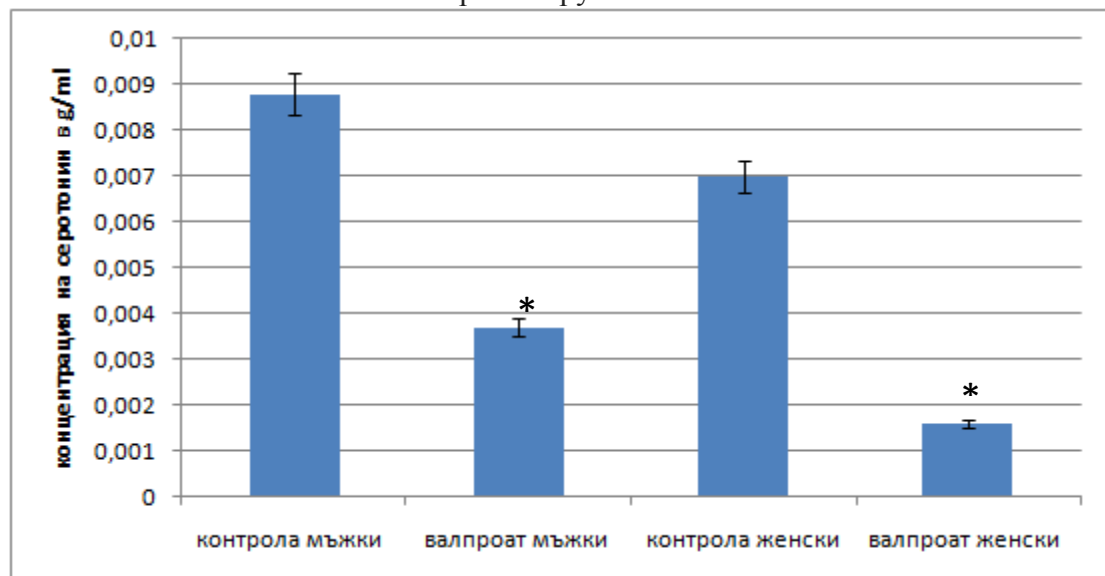
Раздел 6: Проучване влиянието на валпроева киселина върху катехоламини в мозък на мъжки и женски плъхове

След установяване ефекта на висококалорийната мастна диета върху адреналин и серотонин в мозък на плъхчета в период на растеж, експериментите продължиха с определяне на ефектите на антиепилептични фармакологични средства върху катехоламини в мозък. При първата серия от експерименти бе проучено влиянието на

валпроева киселина върхи мозъчни концентрации на адреналин при неполовозрели мъжки и женски плъхчета отглеждани в условия на „нормална” храна за тези животни (без натоварване с мастна диета). На фиг. 17 и 18 са представени резултатите от тези изследвания.



Фиг. 17. Влияние на валпроева киселина върху нивата на адреналин в мозък на мъжки и женски неполовозрели плъхове след 8 седмично третиране с фармакологичното средство в доза 50 mg/kg т.м. i.p. Отчитат се понижени концентрации на невромедиатора в мозък на животните, третирани с валпроева киселина, спрямо контролната група. Брой животни в групата 6-8. * $p < 0,05$ при сравняване със съответната по пол контролна група.



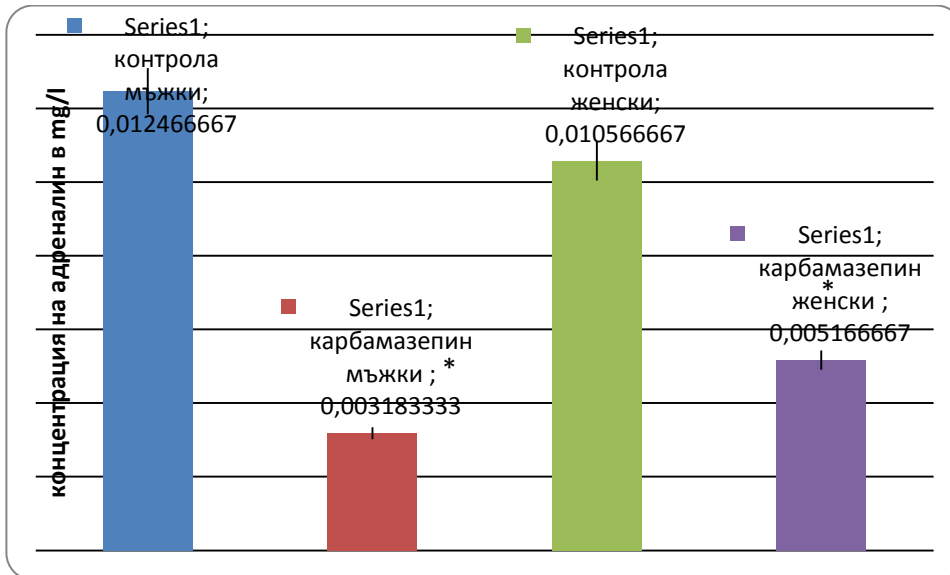
Фиг. 18. Влияние на валпроева киселина върху нивата на серотонин в мозък на мъжки и женски неполовозрели плъхове след 8 седмично третиране с фармакологичното средство в доза 50 mg/kg т.м. i.p. Отчитат се понижени концентрации на серотонин в мозък на животните, третирани с валпроева киселина. Брой животни в групата 6-8. * $p < 0,05$ при сравняване със съответната по пол контролна група.

Заклучение: Приложението на валпроева киселина понижава концентрациите на катехоламините в мозък на плъхчета. Допускаме, че наблюдаваните промени в

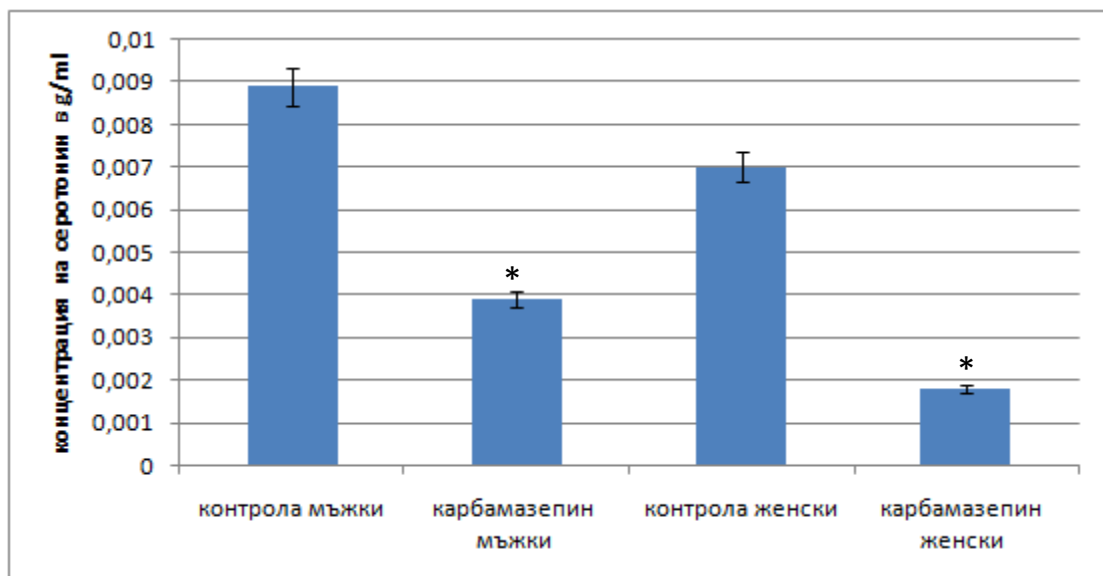
концентрациите на катехоламините имат роля за промените в хранителното поведение на животните и метаболитни нарушения в процеса на растеж на животните.

Раздел 7: Влияние на карбамазепин върху катехоламини (адреналин и серотонин) в мозък на мъжки и женски плъхове

На фиг. 19, 20 и 21 са представени резултатите от изследванията с карбамазепин. Статистически значимо е понижаването на концентрациите на катехоламини в мозък на мъжки и на женски животни след продължително третиране с карбамазепин в период на израстване на животните.

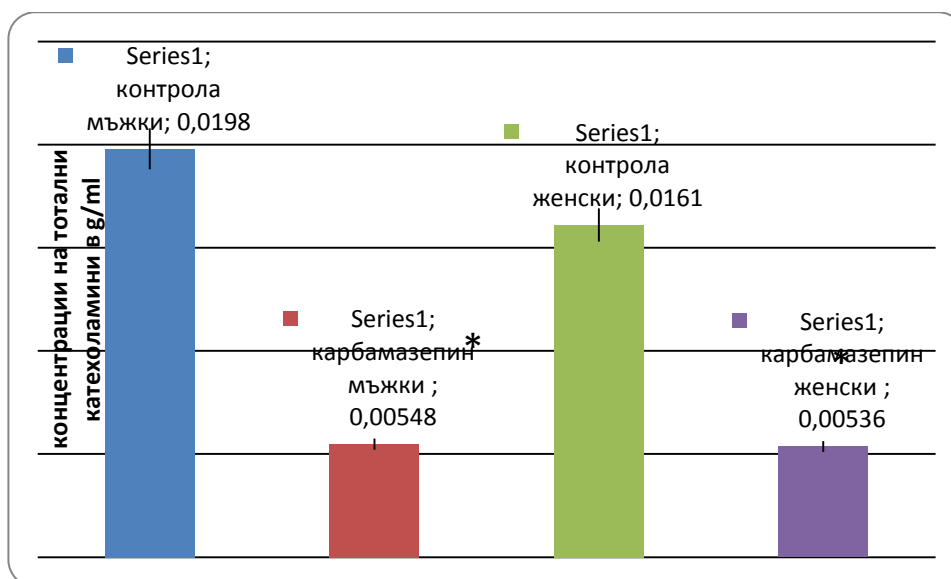


Фиг. 19. Влияние на карбамазепин върху нивата на адреналин в мозък на мъжки и женски неполовозрели плъхове след 8 седмично третиране с фармакологичното средство в доза 100 mg/kg т.м. i.p. Отчитат се понижени концентрации на адреналин в мозък на животните, третирани с карбамазепин, спрямо контролната група. Брой животни в групата 6-8. * $p < 0,05$ при сравняване със съответната по пол контролна група.



Фиг. 20. Влияние на карбамазепин върху нивата на серотонин в мозък на мъжки и женски неполовозрели плъхове след 8 седмично третиране с фармакологичното средство в доза 100 mg/kg т.м. i.p. Отчитат се понижени концентрации на серотонин в мозъка на животните, третирани с карбамазепин, статистически значими спрямо

съответната контролна група. Брой на животни в групата е 6-8. * $p < 0,05$ при сравняване със съответната по пол контролна група.

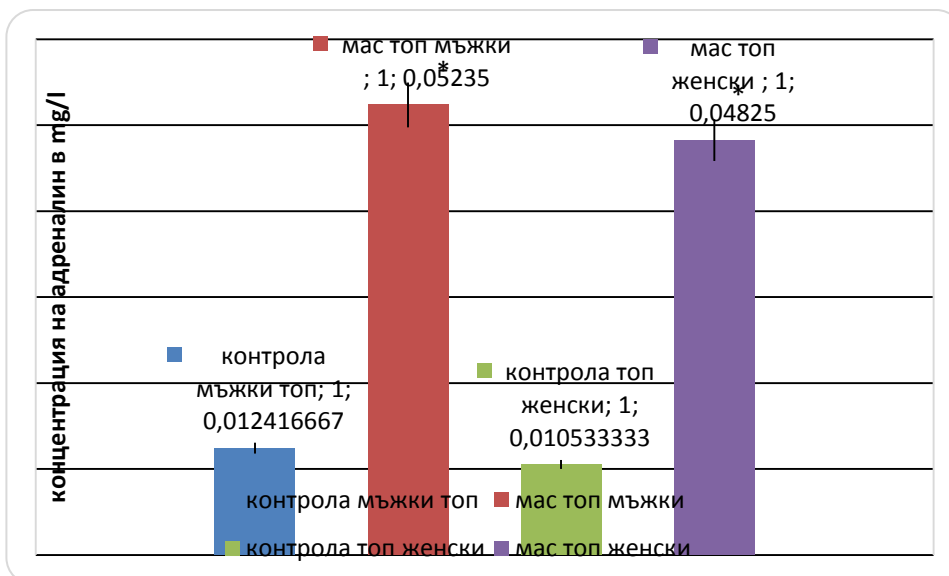


Фиг. 21. Влияние на карбамазепин върху нивата на тотални катехоламини в мозък на мъжки и женски неполовозрели плъхове след 8 седмично третиране с фармакологичното средство в доза 100 mg/kg т.м. i.p. Отчитат се понижени концентрации на тоталните катехоламини в мозък на животните, третирани с карбамазепин, статистически значими спрямо контролната група. Брой на животни в групата е 6-8. * $p < 0,05$

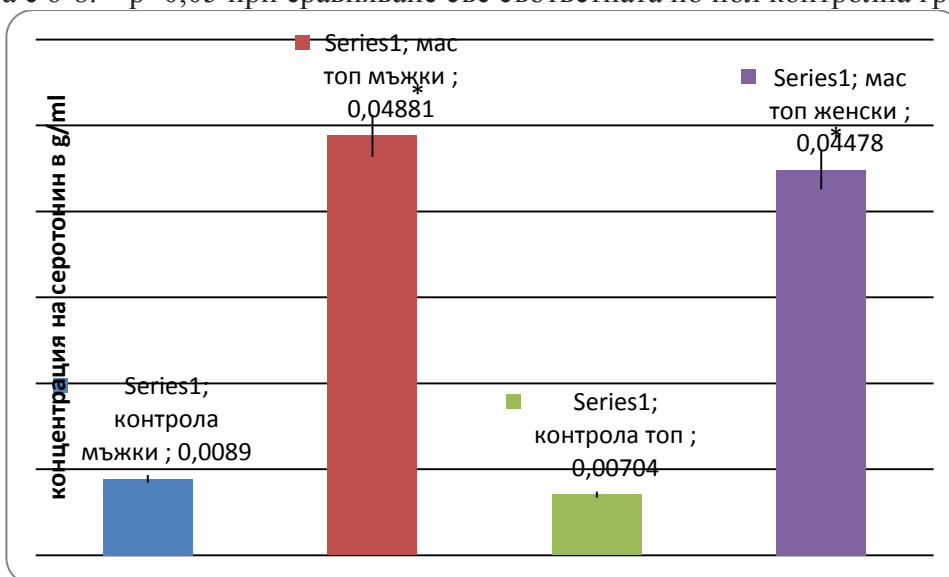
Заключение: Подобно на валпроева киселина, и карбамазепин понижава нивата на катехоламини в мозъка на изследваните животни. Ефектът на карбамазепин при мъжките плъхове е по-силно изразен от този при женските. Сравнителният анализ показва, че понижението на концентрацията на медиаторите е по-силно изразено при третираните с карбамазепин животните в сравнение с групите, получавали валпроева киселина. Допускаме, че при групите получавали антиепилептичните фармакологични средства, промените в концентрациите на медиаторите имат роля и за промените в телесното телло.

Раздел 8: Влияние на топирамат върху катехоламини (адреналин, серотонин и общи) в мозък на мъжки и женски плъхове

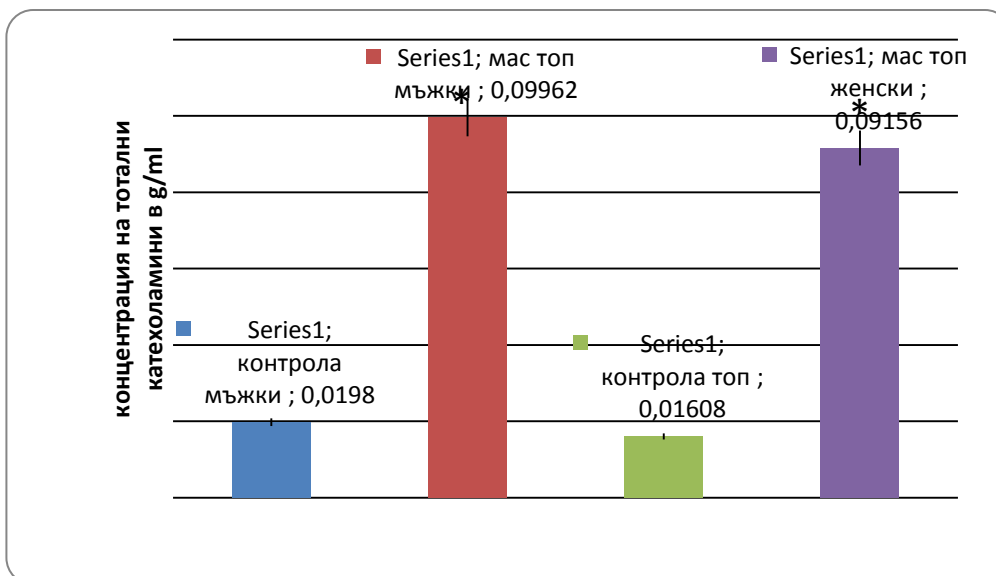
Резултатите от опитите с топирамат са представени на фиг. 22, 23 и 24. При тези експерименти, неполовозрелите животни първо са захранвани с богата на мазнини диета (създаден е модел на затлъстяване) и после са третирани ежедневно с топирамат в продължение на 4 седмици. Взет е мозък от плъховете и са определяни адреналин, серотонин и общи (тотални) катехоламини.



Фиг. 22. Влияние на топирамат върху нивата на адреналин в мозък на мъжки и женски плъхове (с или без затлъстяване) след 4 седмично третиране с фармакологичното средство в доза 100 mg/kg т.м. i.p. Отчитат се значимо повишени концентрации на адреналина в мозъка на животните, третирани с топирамат, които са статистически значими спрямо съответните контролни групи. Брой на животни в групата е 6-8. * $p < 0,05$ при сравняване със съответната по пол контролна група.



Фиг. 23. Влияние на топирамат (топ) върху нивата на серотонин в мозък на мъжки и женски неполовозрели плъхове след 4 седмично третиране с фармакологичното средство в доза 100 mg/kg т.м. i.p. Отчитат се повишени концентрации на адреналин в мозък на животните, третирани с топирамат, което е статистически значимо спрямо контролната група. Брой на животни в група е 6-8. * $p < 0,05$ спрямо съответната контролна група.

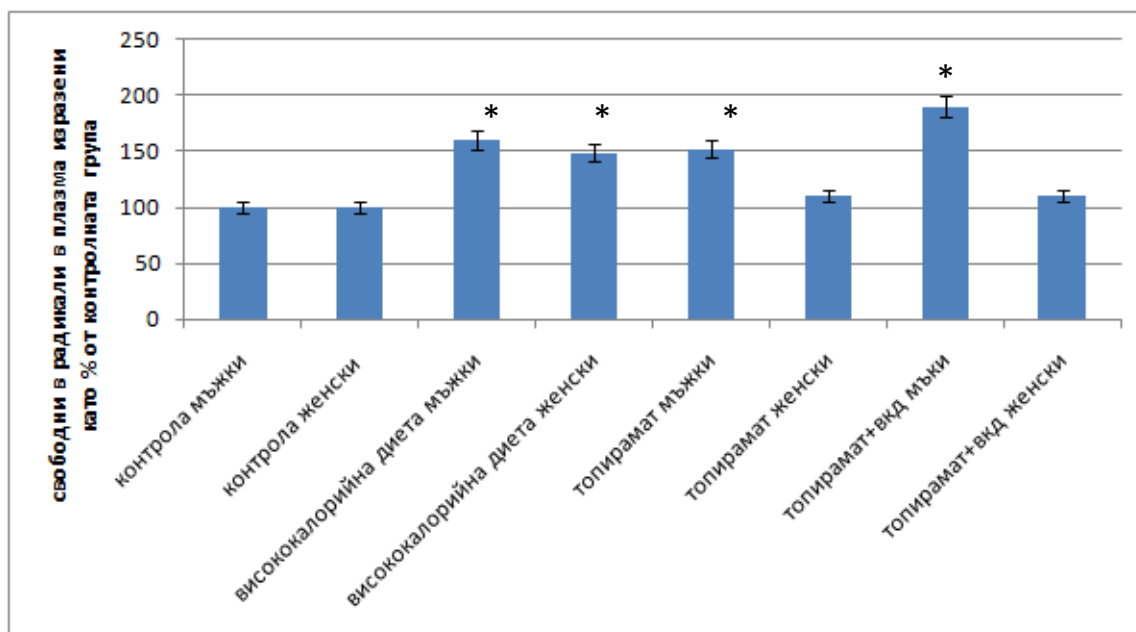


Фиг. 24. Влияние на топирамат върху нивата на тотални катехоламини в мозък на мъжки и женски неполовозрели плъхове след 4 седмично третиране с фармакологичното средство в доза 100 mg/kg т.м. i.p. Отчитат се значимо повишени концентрации на тоталните катехоламини в мозък на животните, третирани с топирамат, спрямо контролната група. Брой на животни в група е 6-8. * $p < 0,05$

Заклучение: Топирамат повишава статистически значимо концентрациите на катехоламини в мозък на плъхове. Този ефект е по-изразен при понижените в резултат на висококалорийната диета нива на изследваните медиатори в мозък на плъхове. Промените в мозъчни катехоламини имат роля в промените в телесното тегло на животните, което под влияние на топирамат се понижава.

Раздел 9: Влияние на топирамат върху свободни радикали в кръв на мъжки и женски плъхове с или без висококалорийна диета

Ролята на свободните радикали в механизмите, регулиращи апетит и метаболизъм се дискутира в литературата. В допълнение, макар и оскъдни, има данни, че някои антиепилептични лекарства има влияние върху механизми на оксидативен стрес.



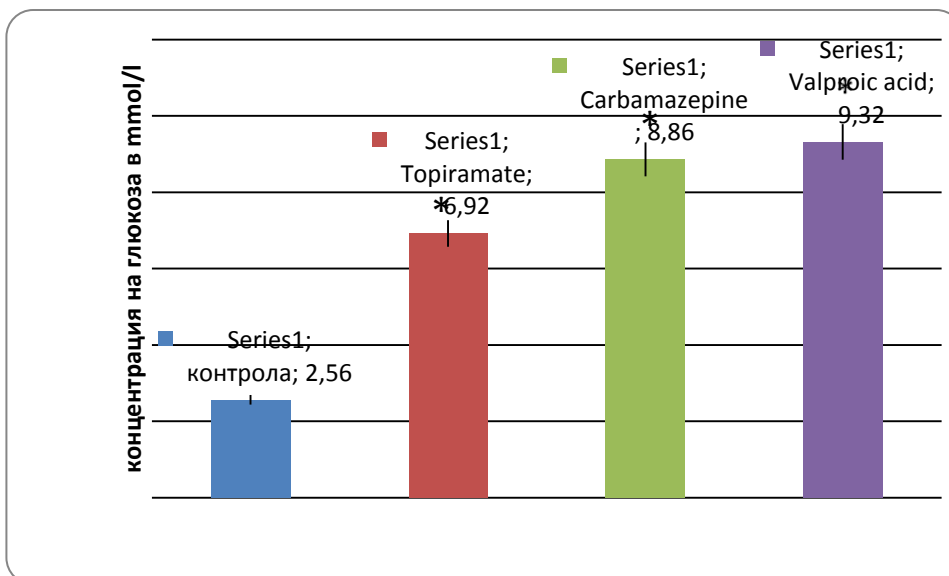
Фиг. 25. Влияние на топирамат върху количеството на свободни радикали при женски и мъжки неполовозрели животни, които са с или без висококалорийна диета (вкд) по време на растежа. * $p < 0.05$

Заключения от анализа на резултатите от фиг. 25: 1. Няма статистически значими различия в концентрациите на свободни радикали в кръв между мъжки и женски животни без висококалорийна диета; 2. Храненето с богата на мазнини диета (мас в легендата на фигурата) увеличава концентрацията на свободни радикали в кръв както на мъжки, така и на женски плъхове. По-проявен е ефекта върху женските плъхове; 3. Топирамат увеличава концентрацията на свободни радикали в кръв на женски плъхове, които са без висококалорийна мастна диета, което е статистически значимо спрямо контролната група (виж първи стълб на фигурата); 4. Топирамат не променя концентрацията на свободни радикали в кръв на мъжки плъхове, отглеждани в условия на без висококалорийно хранене. 5. Топирамат статистически значимо ($p < 0.001$) увеличава концентрацията на свободни радикали в кръв на женски животни и не променя тази при мъжки животни, които са отглеждани на висококалорийна мастна диета.

Дискусия към раздел 9: При проведените изследвания за радикалообразуване в кръв на лабораторни животни с или без експериментален модел на затлъстяване се установи, че висококалорийната мастна диета повишава значимо радикалообразуването в кръвната плазма на изследваните животни. Тези резултати са нови за млади животни (неполовозрели плъхчета). Този ефект е по-значим при женските в сравнение с мъжките животни. Топирамат не понижава радикалообразуването, а напротив има про-оксидантен ефект. Този факт се съобщава за първи път в литературата. Про-оксидативното действие се проявява по-силно, когато веществото се прилага след висококалорийната диета при женски животни. Механизмите на действие върху радикалообразуването са бъдеща задача на изследванията. Може да се допусне увеличено образуване на свободни радикали при рязко намаляване на теглото, въпреки че няма убедителни факти в литературата.

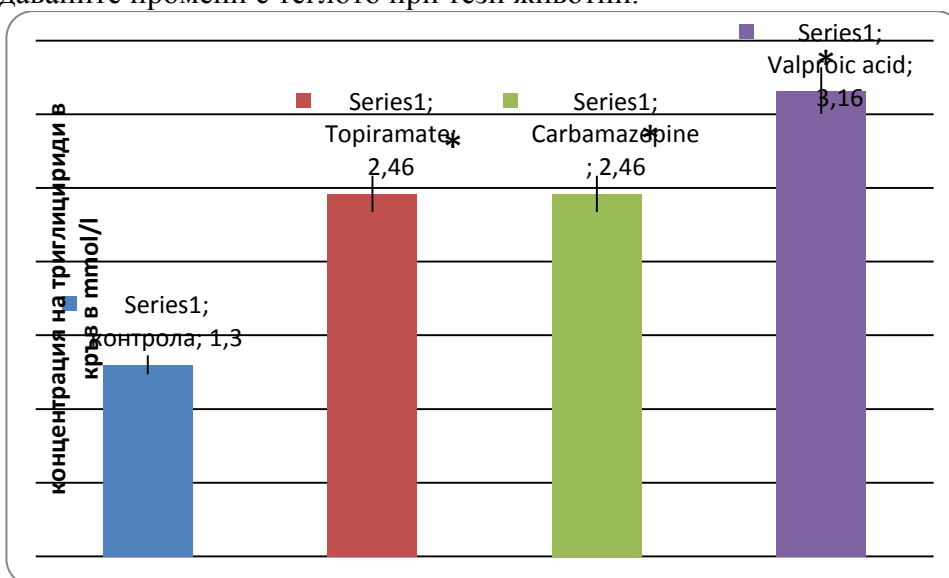
Раздел 10: Сравнителни проучвания на валпроева киселина, карбамазепин и топирамат върху показатели на въглехидратна и мастна обмяна на възрастни мъжки плъхове

В литературния анализ е посочено значението на проучванията на влиянието на антиепилептични средства върху метаболизъм на хора. Оскъдни са данните за изследвания върху метаболизма на деца в периода на растежа. Оскъдни до липсващи са и резултати от изследвания в посоченото направление върху плъхове. Опитите бяха проведени върху мъжки плъхове след продължително третиране (4 седмици) с валпроева киселина, топирамат или карбамазепин. Определяни бяха показатели на мастна и въглехидратна обмяна – серумни нива на глюкоза, триглицериди и холестерол



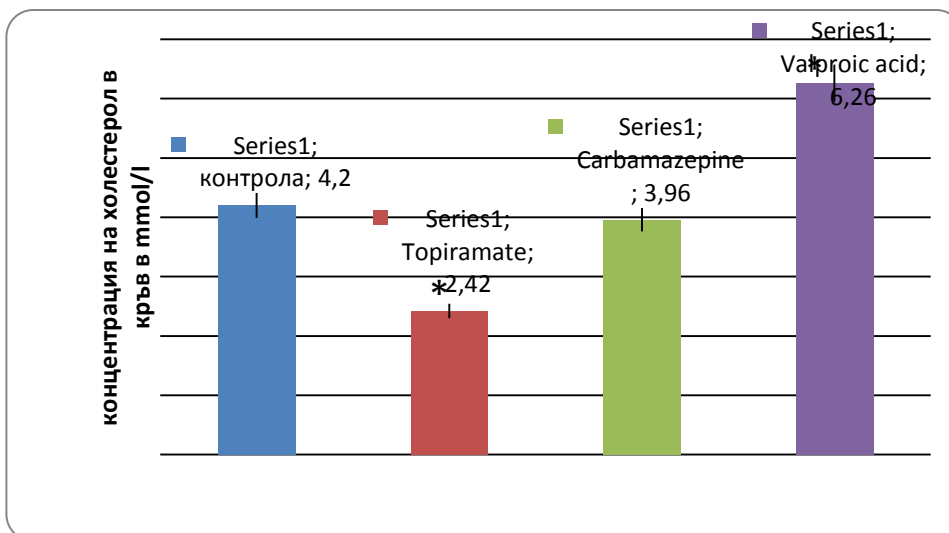
Фиг. 26. Влияние на 3 антиепилептични фармакологични средства – **валпроева киселина, карбамазепин и топирамат** върху серумните нива на глюкоза при мъжки половозрели плъхове. Отчита се повишаване в серумните нива на глюкоза, което е статистически значимо при сравняване с контролната група. Брой на животни в група 6-8. * $p < 0,05$

Получените резултати показват, че изследваните антиепилептични средства повишават плазмените нива на глюкоза при лабораторни животни. Нивата на глюкоза се повишават до стойности характерни за предиабетно състояние. Получените резултати са в съответствие с наличните клинични данни при хора. Най-силно изразени са промените при животните, приемали валпроева киселина. Това съответства на наблюдаваните промени с теглото при тези животни.



Фиг. 27. Влияние на 3 антиепилептични фармакологични средства – **валпроева киселина, карбамазепин и топирамат** върху серумните нива на триглицериди при мъжки половозрели плъхове. Отчита се повишаване, което е статистически значимо в сравнение с контролната група. Брой на животни в група 6-8. * $p < 0,05$.

Резултатите, получени от изследваните концентрации на триглицериди в кръв на лабораторни животни показват статистически значимото им повишаване под влияние и на трите фармакологични антиепилептични средства. Валпроевата киселина има най-изразен ефект.

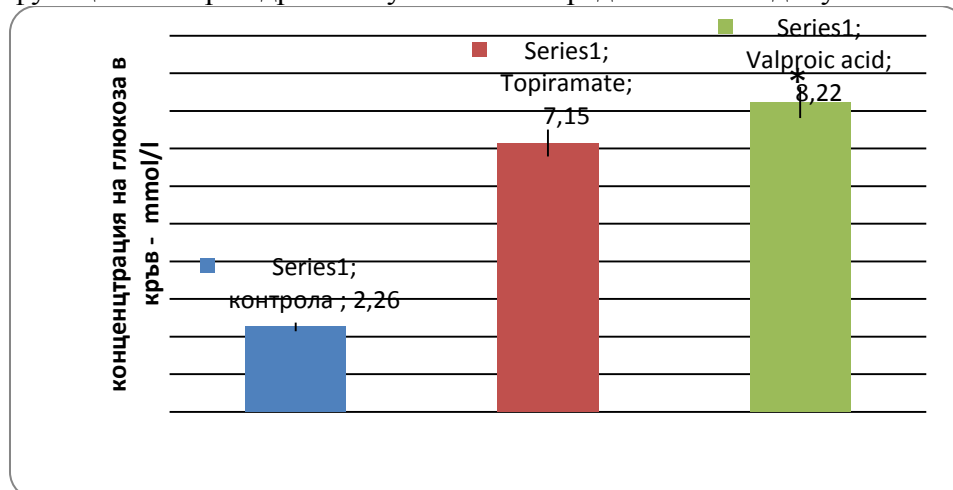


Фиг. 28. Влияние на 3 антиепилептични фармакологични средства – валпроева киселина, карбамазепин и топирамат върху серумните нива на общ холестерол при лабораторни животни. Отчита се повишаване под влияние на валпроева киселина и понижение при групата с топирамат, статистически значими в сравнение с контролната група животни. Брой животни в група 6-8. * $p < 0,05$.

Изследването на общ холестерол в плазма на лабораторни животни показва разнопосочния ефект на проучваните антиепилептични лекарства. Топирамат, прилаган в дози 100mg/kg i.p. понижава статистически значимо общия холестерол под нивата на контролната група. Карбамазепин не променя нивата на общия холестерол в доза от 100mg/kg i.p. като те се запазват близки до контролните животни. При валпроевата киселина (50mg/kg i.p.) се наблюдава значимо повишение в общия холестерол. Всяко от фармакологичните лекарства е прилагано за период от 4 седмици.

Раздел 11: Сравнителни проучвания на карбамазепин, валпроева киселина и топирамат върху въглехидратни показатели при потомството на плъхове, третирани по време на бременност с посочените фармакологични средства

В литературният анализ бе посочено, че са оскъдни до липсващи резултатите за пренаталните ефекти на редица фармакологични антиепилептични средства. В настоящите изследвания се проведе проучване върху потомството на бременни животни, третирани с валпроева киселина или с карбамазепин или с топирамат. Плъховете бяха третирани след 12 ден от гестацията. Потомството беше изследвано в динамика на развитието си до 21-ия ден: кръвна захар, тегло, поведение, липиди, функция на черен дроб. Резултатите са представени по-долу:



Фиг. 29. Влияние на топирамат и валпроева киселина върху показатели на въгледехидратната обмяна – серумни нива на глюкоза при новородени мъжки и женски плъхчета (възраст 3 седмици), третирани пренатално с фармакологичните средства. Брой на животни в група 2-6. * $p < 0.05$.

Животните, третирани пренатално с валпроева киселина (13-ти ден от развитие на бременността с доза 450 мг/кг), показват повишени нива на глюкоза в кръв, които са близки до стойностите, характерни за предиабет. От всички третирани пренатално с топирамат (100 мг/кг) са оживели само 2 плъхчета, другите не доживяват раждането (резултатите на фигурата са от 2 животни за топирамат). При новородените, третирани пренатално с валпроева киселина наблюдаваният ефект е еднопосочен с този при неполовозрелите плъхове, само че е по-слабо изразен.

Раздел 12: Влияние на топирамат върху инсулин, лептин, глюкоза и липиди в кръв на мъжки плъхове с или без експериментално затлъстяване

Резултатите са представени на таблици 3, 4 и 5 както следва:

№ група	Инсулин	Лептин
1. Контролни животни	2.42+0.26	400+25
2. Опитна без затлъстяване с топирамат	1.76+0.42	380+40
3. Опитна със затлъстяване без топирамат	4.26+0.8	765+64
4. Опитна със затлъстяване и топирамат	1.52+0.36 *	530+42 *

Табл. 3. Концентрации на инсулин и лептин в плазма на женски неполовозрели плъхове с или без експериментално затлъстяване третирани с топирамат. Отчита се понижение в нивата на инсулин при групите, третирани с топирамат в сравнение с контролните групи, които не са третирани с фармакологичното средство. * $p < 0.05$

№ група	Глюкоза	Липиди
1. Контролна, без затлъстяване и без топирамат	5.6+0.2	1.26+0.12
2. Опитна без затлъстяване с топирамат	5.3+0.3	1.34+0.26 *
3. Опитна със затлъстяване без топирамат	5.9+0.3	2.18+0.34
4. Опитна със затлъстяване и топирамат	5.2+0.4	1.48+0.26 *

Табл. 4. Влияние на топирамат върху глюкоза и липиди в серум на женски неполовозрели плъхове със или без затлъстяване. Отчита се понижение в нивата на глюкоза при групите, третирани с топирамат. Понижението в серумните нива на липиди е статистически значимо при групите третирани с топирамат спрямо контролните. * $p < 0.001$ в сравнение със съответната контрола

№ група	Тегло [g]
1. Контролна, без затлъстяване и без топирамат	220+10
2. Опитна без затлъстяване с топирамат	200+12
3. Опитна със затлъстяване без топирамат	270+14
4. Опитна със затлъстяване и топирамат	210+12*

Табл. 5. Влияние на 30-дневно приложение на топирамат заедно с и без богата на мазнини диета, върху тегло на мъжки неполовозрели плъхове. * $p < 0.05$ в сравнение с група 3.

Резултатите от проучванията върху лептин и инсулин са нови в литературата относно влиянието на топирамат. Установи се, че топирамат намалява концентрациите на лептин в кръв на плъхове със затлъстяване. Този резултат дава основание да се допусне централен механизъм на действие при наблюдаваните промени в теглото.

Отчетливи са и ефектите на топирамат върху концентрации на инсулин в серум на плъхове, които са захранвани с богата на мазнини храна. В резултат от проведеното захранване се отчитат повишени нива на инсулин в кръвта. Това се счита за един от

критериите за развитие на инсулинова резистентност. Топирамат намалява концентрациите на инсулин в кръвта на животните. Възможно е топирамат да намалява инсулиновата резистентност при затлъстяване.

ЗАКЛЮЧЕНИЯ НА РАЗДЕЛ РЕЗУЛТАТИ:

Проведени са фармакологични проучвания с топирамат, карбамазепин и валпроат с или без експериментално затлъстяване. Опитите са хронични и са върху полово незрели мъжки и женски, както и върху полово зрели мъжки плъхове. Затлъстяването е създадено чрез прием на богата на мазнини храна от плъховете в продължение на 2 месеца. Топирамат е прилаган 8 седмици на животни с или без затлъстяване. Карбамазепин и Валпроат са прилагани също за 8 седмици при животни без затлъстяване. В края на експериментите са определяни следните показатели в кръвта на изследваните плъхове: глюкоза, липиди, лептин и инсулин; общо телесна маса. Определени са концентрациите на катехоламините в мозъка. За първи път са установени при плъхове в период на растеж следните резултати:

- Топирамат намалява затлъстяването при животните;
- При модела на експериментално затлъстяване се увеличи концентрацията на лептин в кръв на полово незрели плъхове;
- Топирамат намалява концентрацията на лептин;
- Статистически значимо са променени инсулиновите плазмени нива под влияние на топирамат;
- Топирамат увеличава концентрацията на адреналин в мозък на плъхове в период на растеж
- Нивата на инсулин в плазма на плъхове в период на растеж се повишават при модел на затлъстяване;
- Топирамат намалява повишените инсулинови нива, когато се прилага при животни със затлъстяване;
- Карбамазепин понижава теглото на изследваните неполовозрели мъжки и женски плъхове в период на растеж
- Карбамазепин повишава нивата на катехоламини в мозъка
- Валпроева киселина понижава концентрациите на катехоламини в мозъка на мъжки и женски плъхове в период на растеж
- Валпроева киселина повишава значимо теглото както на мъжки, така и на женски плъхове в период на растеж.

Взети заедно резултатите показват метаболитни ефекти на изследваните лекарства върху половонезрели плъхове. Допуска се централен механизъм, по който се осъществява тези НЛР на изследваните антиепилептични лекарства.

ЧАСТ ЧЕТВЪРТА: ДИСКУСИЯ

Епилепсията е хронично заболяване, което изисква продължително лечение с различни медикаменти. Тя се проявява още в детска възраст, в периода на растеж, както при момичета, така и при момчета. Употребата на различни лекарства в детска възраст поставя въпроса за нежелани лекарствени ефекти, които могат да се отразят върху различни функции и органи на детето. Сравнително малко са проучени НЛР на антиепилептичните лекарства върху метаболизъм и метаболитни заболявания. Фармакологичните изследвания в настоящия труд демонстрират ефекти на три антиепилептични средства – валпроева киселина, карбамазепин и топирамат върху тегло, въглехидратна и мастна обмяна, хормони, регулиращи метаболизъм и апетит на експериментални мъжки и женски плъхчета с и без затлъстяване в период на растеж. За първи път се съобщават факти за 3-те фармакологични антиепилептични средства относно промени в метаболизъм в периода на растежа. За първи път се публикуват

резултати за различен отговор на мъжки и женски полово незрели плъхчета към НЛР на антиепилептични средства в период на растеж.

а. Валпроева киселина е широко прилагано средство за лечение на различни форми на епилепсия. Изследванията в настоящия труд демонстрират промени в показателите на мастна обмяна при нормогликемични плъхове. Тези промени са отчетени за валпроева киселина след продължителното третиране на животните в период на растеж. Те са по-значимо изразени при животните със създаден модел на затлъстяване и последващо третиране многократно (хронично) с валпроат. Тези резултати могат да се обяснят с хипотезата, че валпроева киселина потиска изграждането на мастите в тъканите. Тази хипотеза се подкрепя от изследователи (Zhou, W., et al., 2006; Murali, B., et al., 2002 и др.).

б. В подкрепа на нашите резултати са изследванията на (Rogiers, V., et al., 1985) доказващи, че валпроевата киселина инхибира глюконеогенезата и редуцира нивата на глюкоза при *in vitro* експерименти. Проучванията на валпроева киселина също доказват, че тя влияе като АМРК активатор и редуцира глюкоза в серума и акумулация на мазнини в черен дроб на мишки със затлъстяване (Avery, L.B., et al., 2014). В допълнение са публикувани резултати, че валпроева киселина оказва протективно действие на бета-клетките на панкреаса към индуцираното с палмитет стресова апоптоза (Huang, S., et al., 2014). При хора с епилепсия и провеждане на теста за глюкозен толеранс е отчетен понижаващият ефект на валпроева киселина при този тест (Rakitin, A., et al., 2015).

в. Резултатите от настоящите изследвания документират нови факти за антиепилептичното средство топирамат. Топирамат може да повлияе епилептичните гърчове и да намали усложненията от затлъстяване при пациенти с епилепсия. Фармакологичните проучвания показват, че топирамат има сложен механизъм на действие, към който добавяме и настоящи резултати за влияние върху хормони, регулиращи апетита (лептин и инсулин). Топирамат намалява усложненията на затлъстяване, усложненията на диабет, абдоминалното затлъстяване и др. (Gadde KM, et al., 2011; Garvey WT et al., 2011; Garvey WT, et al., 2012). Новост в литературата са нашите данни с топирамат относно повлияване на тегло и показатели на метаболизъм върху подрастващи животни (изследванията върху неполово зрели мъжки и женски плъхчета с продължително третиране с топирамат. Топирамат статистически значимо намалява теглото на животните в период на растеж със затлъстяване. Известно е, че лептин е хормон, който регулира апетита и показатели на метаболизъм. В хода на изследванията ние допуснахме, че значение в механизмите на действие на топирамат върху метаболизъм имат биогенните амини на мозък (катехоламини). При сравнителните изследвания, представени в настоящия дисертационен труд е отчетно влиянието на топирамат върху нива на катехоламини при мъжки и женски животни. Топирамат повишава статистически значимо катехоламините в мозък на изследваните животни, което корелира с намаляване на теглото на животните в периодът на изследване.

г. Ролята на свободните радикали в епилептогенеза и влияние на антиепилептични лекарства върху оксидативен стрес е проучвана от редица автори (McCormack JG и Denton RM, 1990; Brookes PS et al., 2002; 2004; Poon HF et al., 2004; Delorenzo RJ et al., 2005). Настоящите изследвания внасят новост с резултатите за влияние на топирамат върху кръвните нива на свободни радикали при мъжки и женски плъхове в период на растеж и с развито хранително затлъстяване.

ЧАСТ ПЕТА: ИЗВОДИ

1. Създаден е експериментален модел на затлъстяване на мъжки и женски животни в период на растеж и са установени ефектите на 3 антиепилептични фармакологични средства – валпроева киселина, карбамазепин и топирамат върху динамиката на теглото.

2. За първи път се съобщават данни за различия в ефектите на изследваните 3 антиепилептични лекарства върху тегло на мъжки и тегло на женски животни със затлъстяване.

3. Установени са промени под влияние на топирамат в нивата на лептин, инсулин, глюкоза и липиди в кръв подрастващи мъжки и женски плъхове.

4. Установени са промени в нивата на адреналин и серотонин в мозък на подрастващи мъжки и женски животни, третирани с топирамат. Топирамат повишава нивата на катехоламини в мозък на плъхове отглеждани в условия на висококалорийна мастна диета.

5. Документирани са промени в нивата на серотонин и тотални катехоламини в мозък на неполовозрели мъжки и женски плъхове, третирани с карбамазепин и валпроева киселина в период на растеж.

6. Проведени са сравнителни проучвания на три антиепилептични фармакологични средства (валпроева киселина, карбамазепин и топирамат) прилагани на бременни животни за влияние върху метаболитни показатели на потомството (мъжки и женски) по време ранното им развитие. Нови факти за риск за метаболизма на потомството са демонстрирани с резултати от посочените изследвания.

7. Метаболитни изменения под влияние на три антиепилептични средства (валпроева киселина, карбамазепин и топирамат) са установени и при възрастни със затлъстяване плъхове.

8. Взети заедно, резултатите от проведените изследвания внасят нови експериментални факти за промени в метаболитни показатели по време на разтежа под влияние на три употребявани в клиничната практика антиепилептични фармакологични средства (валпроева киселина, карбамазепин и топирамат). Тези нови факти допълват както фармакодинамиката, така и токсикологията (НЛР) на трите фармакологични средства.

ПРИНОСИ:

А) Теоретични:

1. За първи път е проведено сравнително проучване на три антиепилептични фармакологични средства (валпроева киселина, карбамазепин и топирамат) за влияние върху показатели на метаболизъм на мъжки и женски плъхове в период на растеж.

2. За първи път се доказват ефектите на топирамат върху мозъчни катехоламини на плъхове с или без затлъстяване. Топирамат променя плазмените нива на лептин, което се съобщава за първи път в литературата.

3. За първи път се установяват метаболитни промени в потомството на плъхове, третирани с топирамат и карбамазепин по време на бременността.

4. За първи път се съобщава за влияние на топирамат върху свободни радикали в кръв на неполовозрели растящи плъхове. Установена е про-оксидантна активност на топирамат.

Б) Практически:

5. Представен е експериментален модел на затлъстяване на неполовозрели плъхове за целите на фармакологичните изследвания.

6. Нови факти за фармакодинамиката на три фармакологични антиепилептични средства допълват информацията за тях за целите на експерименталната и клинична медицина.

7. Установените за първи път промени в показатели на метаболизъм на потомството под влияние на пренатално третиране с топирамат и карбамазепин поставя риска за бременните и посочените антиепилептични лекарства. В допълнение, с практическа значимост е да се търси употребата, дори еднократна на посочените лекарствени продукти в изясняване на механизмите на метаболитни нарушения в потомството с цел ранна профилактика.

Списък на публикацииите на асистент Радослав Клисуров

Общ брой публикувани статии и доклади = 9

От тях 4 публикации в научни списания, от които 2 са в списания с Импакт фактор
Общ брой доклади на международни конгреси – 5

1. Варадинова М, Клисуров Р, Бояджиева Н. Роля на бета-ендорфин при епилепсия, *Topmedica* 2014/04; 42 – 44.
2. Darlenska H, Klisurov R Effect of topiramate on noradrenaline expression in the brain of dietary-induced obese rats (preliminary data) *Comptes rendus de l'Acad'emie bulgare des Sciences* Tome 69, No 2, 2016. IF= 0.323
3. Boyadjieva Nadka and Klisurov R. Effect of topiramate and carbamazepin on insulin, leptin and metabolism of obese male rats. *Journal of Clinical & Experimental Pharmacology*, 2016; Journal Impact Factor 1.75 (в подготовка за печат)
4. Дърленска –Ханджиева Т., Р. Клисуров, Н. Бояджиева. Нови данни за Антиепилептичното лекарство Топирамат. *Неврология и Психиатрия*, том 46, кн. 1, 2015, стр. 43-56.

Доклади на 5 международни конгреси

Участия в конференции:

1. Клисуров Р, Бояджиева Н Влияние на антиепилептичните лекарства върху нивата на катехоламините в мозък на лабораторни животни — научна конференция „ДРЪЗНОВЕНИЕ И МЛАДОСТ ВЪВ ФАРМАКОЛОГИЯТА“ Медицински университет Пловдив Цигов чарк, 7-9 октомври, 2016 г.
2. Klisurov R., Handjieva-Darlenska T., Boyadjieva N. The effect of Topiramate on rats with experimental model of obesity 14th INTERNATIONAL SYMPOSIUM „ACAD. TASHO TASHEV” BASORD
3. Klisurov R., Boyadjieva N The effect of Topiramate on biogenic amines in the brain of rats with experimental model of obesity 14th INTERNATIONAL SYMPOSIUM „ACAD. TASHO TASHEV” BASORD
4. Klisurov R., Kamenova K., Boyadjieva N Effect of Topiramate on Leptin and Insulin of Rats with Experimental Obesity. First National Congress of the BSNCH with International Participation 2015

5. Klisurov R., Boyadjieva N Effect of Topiramate on Free Radicals of Rats with Experimental Obesity. First National Congress of the BSNCH with International Participation 2015.

Асистент Радослав Клисуров е участвал като изследовател в 2 конкурсни научни проекти към МУ-София (2015 и 2016 г.), които са отчетени.