

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



**Mgr. Resha Matyšková**

**Vliv leptinu a ghrelinu na příjem potravy a metabolické parametry u obézních ovariektomovaných myších samic**

**Impact of leptin and ghrelin on food intake and metabolic parameters in obese ovariectomized female mice**

Dizertační práce

Vedoucí dizertační práce: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Konzultant: Prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.

Praha 2011

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze.....

RESHA MATYŠKOVÁ

Podpis: .....

## **IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM:**

MATYŠKOVÁ, Resha. *Vliv leptinu a ghrelinu na příjem potravy a metabolické parametry u obézních ovariectomovaných myších samic. [Impact of leptin and ghrelin on food intake and metabolic parameters in obese ovariectomized female mice]*. Praha, 2011. 125 s., 2 příl.. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i. Vedoucí práce Maletínská, Lenka.

## ABSTRAKT

Dizertační práce je zaměřena na účinky leptinu a antagonistů receptoru ghrelinu na příjem potravy a metabolické parametry u ovariektomovaných (OVX) myších samic na vysokotučné (HF) dietě.

V první části dizertační práce byl zaveden model obezity vyvolané HF dietou u dvou různých myších kmenů (NMRI a C57BL/6). Obezita vyvolaná HF dietou se u myší vyvinula v důsledku dlouhodobého krmení HF dietou obsahující 60 % tuku; standardní (St) dieta obsahovala pouze 9 % tuku. Jako vhodný kmen pro další pokusy na příjem potravy pak sloužil pouze kmen C57BL/6, který je náchylnější k obezitě než linie NMRI.

V druhé části práce byl zaveden model OVX myších samic z kmene C57BL/6 na HF dietě. Tento model je podobný obezitě u žen po menopauze, která je navíc podporována vysokokalorickou stravou. OVX myši na HF dietě akumulovaly 4krát více bílé tukové tkáně než OVX myši na St dietě, měly významně zvýšené hladiny glukosy, inzulinu a leptinu a sníženou citlivost na účinky leptinu, adipokinu snižujícího příjem potravy, podávaného do mozku ve srovnání s OVX myšmi na St dietě. Podání estradiolu po dobu 4 týdnů zlepšilo centrální citlivost k leptinu a parametry metabolického syndromu.

Protože ovariektomie a HF dieta zvyšují citlivost ke ghrelinu, hormonu produkovaného zejména žaludkem, který zvyšuje chuť k jídlu, ve třetí části práce jsme vyslovili hypotézu, že antagonisté receptoru ghrelinu by mohli potlačit zvýšenou citlivost na účinek ghrelinu vedoucí k obezitě. To znamená, že antagonisté receptoru ghrelinu by mohli sloužit jako potenciální antiobezitika především při estrogenové deficitě. V naší studii dlouhodobé podkožní podání antagonisty receptoru ghrelinu [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 významně snížilo tělesnou hmotnost, příjem potravy, množství bílé tukové tkáně a hladiny leptinu, inzulinu a glukosy u OVX myší na HF dietě.

**Klíčová slova:** obezita, leptin, ghrelin, estradiol, myši, ovariektomie, vysokotučná dieta

## ABSTRACT

The thesis is focused on the effect of leptin and ghrelin receptor antagonists on food intake and metabolic parameters in ovariectomized (OVX) female mice on a high fat (HF) diet.

In the first part of the thesis, diet-induced obesity was introduced in two strains of mice (NMRI and C57BL/6). Diet-induced obesity resulted from overconsumption of a HF diet containing 60 % of fat; a standard (St) diet contained only 9 % of fat. The strain C57BL/6 was more susceptible to a HF diet than the NMRI strain and was chosen for further experiments on food intake.

In the second part of the thesis, OVX C57BL/6 female mice on a HF diet were introduced as a model of common obesity in women after menopause and overconsumption of high caloric food. OVX mice on a HF diet accumulated more than 4 times higher amount of the white adipose tissue compared to those on a St diet, had significantly elevated glucose, insulin and leptin levels and attenuated sensitivity to effect of centrally administered leptin, an adipokine that decreases food intake. Central leptin sensitivity and metabolic syndrome parameters were improved after 4 weeks of estradiol treatment.

Because both ovariectomy and HF diet result in enhanced sensitivity to ghrelin, the hormone produced predominantly by the stomach that stimulates appetite, in the third part of the thesis, we hypothesized that ghrelin receptor antagonists could suppress enhanced sensitivity to ghrelin resulted in obesity. It means that ghrelin receptor antagonists could serve as anti-obesity agents especially at estrogen deficiency. In our study, we showed that a long-term subcutaneous administration of ghrelin receptor antagonist [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 significantly decreased body weight, food intake, white adipose mass and leptin, insulin and glucose levels especially in OVX mice fed a HF diet.

**Key words:** obesity, leptin, ghrelin, estradiol, mice, ovariectomy, high fat diet

# PODĚKOVÁNÍ

Úvodem bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lence Maletínské, CSc. (Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i., Praha, ČR) za vedení při mém postgraduálním studiu, odborné rady, pomoc a trpělivost nejen při experimentální části práce.

Dále děkuji za cenné rady mému konzultantovi prof. MUDr. Martinovi Haluzíkovi, DrSc. (3. interní klinika, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, ČR).

Mé velké díky patří také Ing. Blance Železné, CSc. (Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i., Praha, ČR) za ochotu a pomoc při provádění pokusů a za její připomínky k pracovním verzím mé dizertační práce.

Kolektivu oddělení Biochemie a molekulární biologie (Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i., Praha, ČR) děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí, a z tohoto kolektivu dále Janě Maixnerové, PhD., Bc. Andree Špolcové a Bc. Miroslavě Pýchové za pomoc při experimentální části a Aleně Vytejkové a Hedvice Vysušilové za péči o laboratorní zvířata.

Za spolupráci při podání látek do mozku a provedení ovariektomie děkuji RNDr. Renatě Haugvicové, CSc. (Chambon a.s., Praha, ČR), za syntézy peptidových ligandů receptoru pro ghrelin Ing. Miroslavě Blechové (Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i., Praha, ČR) a za poskytnutí nepeptidových ligandů receptoru pro ghrelin prof. Jeanu Martinezovi a prof. Jeanu-Alainovi Fehrentzovi (Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier, Francie).

V neposlední řadě patří mé velké a upřímné díky mému skvělému manželovi a mým obětavým rodičům za jejich lásku, podporu, trpělivost a vstřícnost při mých studiích.

Tato práce byla podporována výzkumným záměrem Akademie věd České republiky (č. Z40550506), Grantovou agenturou České republiky (č. grantů: 303/05/0614, 305/06/0427 a 303/09/0744) a Ministrem zdravotnictví České republiky (č. MZOVFN2005).

# OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>9</b>
<b>1. ÚVOD</b>	<b>11</b>
1.1. Obezita	12
1.1.1. Příčiny vzniku obezity	13
1.1.2. Zdravotní komplikace při obezitě	13
1.2. Hypotalamo-hypofyzárně-gonadální osa	13
1.2.1. Estradiol a příjem potravy	14
1.3. Regulace příjmu potravy	15
1.3.1. Centrální mechanismy regulace příjmu potravy	15
1.4. Peptidy ovlivňující příjem potravy	19
1.4.1. Adipokiny	19
1.4.1.1. Leptin	20
1.4.1.2. Adiponektin	23
1.4.1.3. Rezistin	23
1.4.2. Ghrelin	24
1.4.2.1. Analogy ghrelinu	28
1.4.2.1.1. Agonisté receptoru GHS-R1a	29
1.4.2.1.2. Antagonisté receptoru GHS-R1a	31
1.4.2.1.3. Inverzní agonisté receptoru GHS-R1a	33
1.4.3. Vzájemný vztah estradiolu a adipokinů a ghrelinu	34
1.5. Zvířata jako biologický model	35
1.5.1. Model myší obezity: Obezita vyvolaná vysokotučnou dietou	35
<b>2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIÁL</b>	<b>38</b>
<b>4. METODY</b>	<b>39</b>
4.1. Zavedení modelu obezity vyvolané vysokotučnou dietou u myší	39
4.1.1. Experimentální zvířata a diety	39
4.1.2. Charakterizace modelu	39
4.2. Zavedení modelu ovariektomovaných myších samic na vysokotučné dietě	40
4.2.1. Experimentální zvířata a diety	40
4.2.2. Ovariektomie a dodání estradiolu	40
4.2.3. Odběr krve/séra a orgánů	41
4.2.4. Stanovení biochemických parametrů v séru	41
4.3. Vliv vysokotučné diety a estradiolu na centrální účinky leptinu u ovariektomovaných samic	41

4.3.1. Stanovení příjmu potravy	41
4.4. Vliv antagonistů a inverzního agonisty receptoru GHS-R1a na příjem potravy u obézních ovariektomovaných samic	43
4.4.1. Test krátkodobého příjmu potravy	43
4.4.2. Test dlouhodobého příjmu potravy	45
4.4.2.1. Odběr krve/séra a orgánů myším po dlouhodobém příjmu potravy	46
4.4.2.2. Stanovení biochemických parametrů v séru	46
4.4.2.3. Stanovení sedativního a analgetického účinku po podání antagonisty a inverzního agonisty receptoru GHS-R1a	46
4.5. Výpočty a statistika	47
<b>5. VÝSLEDKY</b>	<b>48</b>
5.1. Charakterizace modelu obezity vyvolané vysokotučnou dietou u myší	48
5.2. Charakterizace modelu ovariektomovaných myších samic na vysokotučné dietě	52
5.3. Vliv vysokotučné diety a estradiolu na centrální účinky leptinu u ovariektomovaných samic	56
5.4. Vliv antagonistů a inverzního agonisty receptoru GHS-R1a na příjem potravy u obézních ovariektomovaných samic	62
5.4.1. Test krátkodobého příjmu potravy	62
5.4.2. Test dlouhodobého příjmu potravy	70
5.4.2.1. Dlouhodobý vliv [D-Lys <sup>3</sup> ]GHRP-6 na příjem potravy	71
5.4.2.2. Dlouhodobý vliv SPa na příjem potravy	78
5.4.2.3. Sedativní a analgetický účinek po podání [D-Lys <sup>3</sup> ]GHRP-6 a SPa	78
<b>6. DISKUZE</b>	<b>85</b>
6.1. Obezita a příjem potravy	85
6.2. Charakterizace modelu obezity vyvolané vysokotučnou dietou u myší	86
6.3. Charakterizace modelu ovariektomovaných myších samic na vysokotučné dietě	87
6.4. Vliv vysokotučné diety a estradiolu na centrální účinky leptinu u ovariektomovaných samic	89
6.5. Vliv antagonistů a inverzního agonisty receptoru GHS-R1a na příjem potravy u obézních ovariektomovaných samic	90
6.5.1. Test krátkodobého příjmu potravy	91
6.5.2. Test dlouhodobého příjmu potravy	93
<b>7. ZÁVĚRY</b>	<b>96</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>97</b>
<b>SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ</b>	<b>109</b>
<b>PŘÍLOHY</b>	<b>111</b>



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3V	– Třetí mozková komora (Third Ventricle)
AdipoR1	– Receptor pro adiponektin typ 1
AdipoR2	– Receptor pro adiponektin typ 2
AgRP	– Agouti Related Peptide
ANOVA	– Analýza rozptylu (Analysis of Variance)
ARC	– Nucleus arcuatus
BMI	– Index tělesné hmotnosti (Body Mass Index)
CART	– Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript
CCK	– Cholecystokinin
CNS	– Centrální nervová soustava
DIO	– Obezita vyvolaná vysokotučnou dietou (Diet Induced Obesity)
DMN	– Dorsomediální jádro
DMSO	– Dimetylsulfoxid
E2	– 17 $\beta$ -estradiol
ELISA	– Enzymoimunochemické stanovení (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
ER $\alpha$	– Receptor pro estradiol typ $\alpha$
ER $\beta$	– Receptor pro estradiol typ $\beta$
ERK 1/2	– Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2
FSH	– Hormon stimulující folikuly (folitropin) (Follicle Stimulating Hormone)
GHRH	– Hormon uvolňující růstový hormon (somatoliberin) (Growth Hormone Releasing Hormone)
GHS	– Skupina syntetických sekretagogenních peptidů (Growth Hormone Secretagogues)
GHS-R1a	– Receptor pro ghrelin typ 1a
GHS-R1b	– Receptor pro ghrelin typ 1b
GIT	– Gastrointestinální trakt
GLP-1	– Peptid-1 podobný glukagonu (Glucagon Like Peptide-1)
GnRH	– Hormon uvolňující gonadotropin (gonadoliberin) (Gonadotropin Releasing Hormone)
GOAT	– Ghrelin-O-acyl transferasa
HF dieta	– Vysokotučná dieta (High Fat Diet)
HHG osa	– Hypotalamo-hypofyzárně-gonadální osa
HOMA	– Homeostasis Model Assessment (ukazatel rezistence k inzulinu)

ICV	– Podání látek do mozkové komory neboli intracerebroventrikulární podání
JAK	– Janus-kinasa (Janus Protein Kinase)
KO	– Obecný termín pro jakýkoliv vyřazený gen (Knock-out)
LH	– Luteinizační hormon (lutropin) (Luteinizing Hormone)
LHA	– Laterální hypotalamus
MCH	– Hormon koncentrující melanin (Melanin Concentrating Hormone)
Myši ArKO	– Myši s vyřazeným genem pro aromatasu
Myši $\alpha$ ERKO	– Myši s vyřazeným genem pro receptor estradiolu ER $\alpha$
Myši $\beta$ ERKO	– Myši s vyřazeným genem pro receptor estradiolu ER $\beta$
$\alpha$ -MSH	– Hormon stimující $\alpha$ -melanocyty ( $\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone)
NK1R	– Receptor pro substanci P
NPY	– Neuropeptid Y
NTS	– Nucleus Tractus Solitarius
Ob-R	– Receptor pro leptin
OVX samice	– Ovariectomované samice
OVX/St	– Ovariectomované samice na standardní dietě
OVX/HF	– Ovariectomované samice na vysokotučné dietě
OVX/St + E2	– Ovariectomované samice na standardní dietě s náhradou estradiolu
OVX/HF + E2	– Ovariectomované samice na vysokotučné dietě s náhradou estradiolu
POMC	– Pro-opiomelanokortin (Pro-opiomelanocortin)
PR-A	– Receptor pro progesteron typ A
PR-B	– Receptor pro progesteron typ B
PVN	– Paraventriculární jádro
PYY	– Peptid YY
RIA	– Radioimunochemické stanovení (Radioimmunoassay)
Samci/St	– samci na standardní dietě
Samci/HF	– samci na vysokotučné dietě
SC	– Podkožní (subkutánní) podání látek
SEM	– Střední chyba průměru (Standard Error of Mean)
SPa	– [D-Arg <sup>1</sup> , D-Phe <sup>5</sup> , D-Trp <sup>7,9</sup> , Leu <sup>11</sup> ]substance P
St dieta	– Standardní dieta
STAT	– Signal Transducer and Activator of Transcription
VMN	– Ventromediální jádro

# 1. ÚVOD

Obezita se v dnešní době stala nejrozšířenější metabolickou nemocí na světě s trvale vzestupným trendem výskytu. V patogenezi tohoto onemocnění se uplatňují genetické dispozice a vlivy prostředí, které se mohou projevovat v regulaci příjmu potravy. Nadbytečný příjem energie v důsledku snadné dostupnosti chutné a energeticky bohaté stravy a současný způsob života vedoucí k minimalizaci tělesné aktivity způsobují obezitu. Zdravotní rizika vzniklá obezitou jsou spojena zejména se zvýšeným množstvím nitrobřišního tuku, který se nejčastěji vyskytuje u mužů a žen po menopauze.

Systém, který kontroluje regulaci příjmu potravy, obsahuje silné mechanismy proti podvýživě a slabé proti přejídání. Vychází to z historie přežití lidstva. Slabí jedinci umírali a přežívali ti, kteří měli genetické dispozice k ukládání energetických zásob. Obrana před nadbytečným příjmem energie v minulosti nikdy nebyla nutná. V dnešní době je boj proti obezitě bojem proti mechanismům, které tisíce let chránily lidstvo před vymřením.

Regulace příjmu potravy je složitý proces, který je ovlivňován zejména hormonálními a metabolickými signály z periferie a hormonální regulací na úrovni hypotalamu. Krátkodobá regulace příjmu potravy určuje pocit hladu nebo sytosti, dobu trvání jídla a množství přijaté potravy. Mezi hormony, které ovlivňují krátkodobou regulaci, řadíme např. neuropeptid cholecystokinin. Na rozdíl od krátkodobé regulace dlouhodobá regulace příjmu potravy řídí energetickou rovnováhu v organismu v delším časovém horizontu. Mezi hormony, které působí dlouhodobě, patří zejména inzulin vznikající v  $\beta$  buňkách Langerhansových ostrůvků, hormon produkovaný tukovou tkání leptin a hormon produkovaný žaludkem ghrelin.

V důsledku složitosti regulace příjmu potravy je obtížné nalézt látku, která by potlačila příjem potravy nebo zvýšila výdej energie a tím vyvolala snížení tělesné hmotnosti bez vedlejších účinků. Nicméně během posledních 15 let odborníci objevili velké množství nových peptidů regulujících příjem potravy. Některé jejich analogy mají jistě budoucnost v léčbě obezity [1].

## 1.1. OBEZITA

Obezitu definujeme jako přebytečné nahromadění tukové tkáně v organismu [1]. Je způsobena dlouhodobou pozitivní energetickou bilancí, tj. tělo přijímá více energie než vydává, a takto vznikající přebytek se ukládá v tukových rezervách.

Dříve se obezita považovala za estetický a společenský problém. V posledních desetiletích se ukázalo, že představuje závažný zdravotní problém, že zkracuje život a je doprovázena různými komplikacemi zneprůjemňujícími život [2].

V minulosti se k léčbě obezity využívalo mnoha látek (tyroidální hormony  $T_3$  a  $T_4$ , dinitrofenol, amfetamin, fenfluramin a fenylpropanolamin), které ale měly závažné vedlejší účinky (např. návykovost) [3]. V současné době je v České republice zatím schválen pouze jeden lék k léčbě obezity: orlistat (inhibitor pankreatické lipasy), který snižuje vstřebávání tuku ve střevě. Orlistat se používá dlouhodobě a tělesnou hmotnost snižuje v kombinaci s úpravou složení a množství přijaté potravy a změnou životního stylu. Mezi jeho vedlejší účinky patří např. průjemy [3, 4]. Pro vysoké kardiovaskulární riziko byl v lednu 2010 z trhu stažen sibutramin (inhibitor zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu). Dalším nadějným lékem se zdál být rimonabant [5] – potlačuje chuť k jídlu blokováním kanabinoidních receptorů v mozku a periférii, ale kvůli jeho vedlejším účinkům (deprese) byl v USA a Evropě stažen z trhu (v České republice nebyl nikdy v prodeji).

Výskyt obezity v posledních 10 – 20 letech ve všech vyspělých světových zemích včetně České republiky stále stoupá. Oblasti s nejvyšším výskytem obezity jsou USA (dokonce i v populaci amerických Indiánů), Velká Británie, východní Evropa (zejména u žen), velká část střední a jižní Evropy a státy Středozeří [6]. Přibližně každý třetí dospělý člověk v České republice trpí nadváhou a každý pátý je obézní. Průzkum agentury STEM/MARK ukazuje, že počet obézních Čechů za čtyři roky stoupl o 450 tisíc lidí [7]. Obezita rapidně roste i v mnoha rozvojových zemích. Celosvětově je problémem rostoucí obezity také u dětí a mladistvých [8].

Vzhledem k tomu, že množství tuku v lidském organismu se obtížně měří a liší se u lidí různého věku, pohlaví (procento tuku v lidském organismu bývá vyšší u žen než u mužů) a etnického původu [9], byl k určení obezity zaveden tzv. index tělesné hmotnosti (zkratka BMI z anglického výrazu „Body Mass Index“), který je definován jako podíl tělesné hmotnosti v kg a druhé mocniny výšky v  $m^2$ . Hodnota BMI 18,5 – 25  $kg/m^2$  znamená normální hmotnost, nad 25  $kg/m^2$  nadváhu a nad 30  $kg/m^2$  obezitu.

### 1.1.1. Příčiny vzniku obezity

Nepoměr mezi příjmem a výdejem energie může být způsoben buď nadměrným příjmem energie, k němuž dochází na základě poruchy regulace příjmu potravy, nebo špatným životním stylem, nebo nedostatečným výdejem energie vzniklým nedostatečnou pohybovou aktivitou. Na vzniku obezity se také podílejí genetické dispozice, hormonální vlivy (např. snížená funkce štítné žlázy a nedostatek estrogenu při menopauze) a některé léky (např. antidepressiva, psychofarmaka – léky na uklidnění, a gestageny – hormonální léčba u žen) [10].

### 1.1.2. Zdravotní komplikace při obezitě

Obezita je často doprovázena vznikem diabetu II. typu (spojeného se sníženou citlivostí na inzulin), kardiovaskulárních onemocnění (hypertenze, aterosklerózy, srdeční arytmie a mozkových cévních příhod), některých typů nádorů (rakoviny tlustého střeva, prsu, ledvin, děložního čípku), gynekologických komplikací (poruch cyklu, neplodnosti, komplikací v těhotenství a porodu) a kožních problémů (ekzémů, mykóz, strií a celulitidy). Obézní jedinci mají větší potíže s dýcháním a může se u nich objevit spánková apnoe [10, 11].

## 1.2. HYPOTALAMO-HYPOFYZÁRNĚ-GONADÁLNÍ OSA

Hypotalamo-hypofyzárně-gonadální (HHG) osa je důležitá pro vývoj pohlavních buněk u savců. Hypotalamický hormon gonadoliberin (hormon uvolňující gonadotropin, zkratka GnRH – z anglického výrazu Gonadotropin Releasing Hormone) stimuluje syntézu hypofyzárních hormonů gonadotropinů, tedy luteinizačního hormonu (lutropinu – LH – z anglického slova „Luteinizing Hormone“) a hormonu stimulujícího folikuly (folitropinu – FSH – z anglického výrazu „Follicle Stimulating Hormone“). Pro sekreci GnRH je typický pulzní charakter. Mužské (androgeny) a ženské (estrogeny) pohlavní hormony zpětnou vazbou ovlivňují tyto pulzy (mění jejich frekvenci nebo amplitudu). Pohlavní hormony negativně zpětnou vazbou ovlivní sekreci GnRH v hypotalamu a LH a FSH v hypofýze [12, 13]. U žen existuje také pozitivní zpětná vazba: 36 – 48 hodin před ovulací se zpětná vazba estrogenů stává pozitivní a to iniciuje pulzy sekrece LH, které vyvolají ovulaci.

V této práci se nadále zabývám ženskými pohlavními hormony, tedy estrogeny.

Přirozeně se vyskytující estrogeny jsou  $17\beta$ -estradiol (dále jen E2), estron a estriol. Jsou sekretovány hlavně granulózovými buňkami ovariálních folikulů, žlutým tělískem a placentou.

Progesteron je produkován žlutým tělískem, placentou a v malých množstvích folikuly. Biologické účinky E2 a progesteronu jsou zprostředkovány specifickými receptory. Pro E2 jsou to receptory ER $\alpha$  a ER $\beta$ , pro progesteron jsou to receptory PR-A a PR-B [14]. U žen hrají E2 a progesteron klíčovou roli v pubertě, regulaci menstruačního cyklu, těhotenství a laktaci.

S pokračujícím věkem vaječníky žen přestávají reagovat na gonadotropiny a jejich funkce klesá, takže se pohlavní cyklus zastavuje (nastane menopauza). Vaječníky dále neprodukují E2 a progesteron. Děloha a pochva postupně atrofují. Protože se negativní zpětnovazebný účinek estrogenů a progesteronu snižuje, sekrece LH a FSH se zvyšuje a oba hormony mají vysoké plazmatické hladiny [15, 16].

Pokud odhlédneme od žen, pak dospělé myši samice mají estrální cyklus o délce 4 – 5 dnů pod vlivem GnRH v hypotalamu, který reguluje uvolnění LH a FSH z hypofýzy a ty pak přímo působí na sekreci E2 a progesteronu [17].

Myši s vyřazeným genem (tzv. „knock-out“, dále jen zkratka KO) pro receptor ER $\alpha$  (myši  $\alpha$ ERKO) jsou neplodné. Mají nedostatek E2, nemají estrální cyklus, takže jsou podobné ženám po menopauze s vysokými plazmatickými hladinami LH. Myši  $\beta$ ERKO (mají vyřazený gen pro receptor ER $\beta$ ) mají sníženou plodnost s normálními plazmatickými hladinami E2 [18].

Aromatasa je enzym odpovědný za přeměnu androgenů na estrogeny. Myši s vyřazeným genem pro aromatasu (myši ArKO) mají vysoké hladiny LH a FSH, nejsou schopné syntetizovat E2 a jsou neplodné. Myši také akumulují velké množství nitrobřišního tuku. Podání E2 napravilo tyto defekty [18, 19].

### **1.2.1. Estradiol a příjem potravy**

Již delší dobu je znám účinek E2 snižující příjem potravy. U samic různých druhů savců je příjem potravy úzce spojen s HHG osou, např. změnami hladin E2 v průběhu menstruačního cyklu. V době ovulace (u hlodavců se nazývá estrus) jsou hladiny E2 v krvi zvýšené a dochází k snížení příjmu potravy. Při ovariektomii (odstranění vaječníků) tomu tak není; HHG osa je v tomto případě nefunkční a hladiny E2 v krvi jsou nulové. To způsobuje vzrůst příjmu potravy a nárůst tukové tkáně u ovariektomovaných hlodavců. Bylo zjištěno, že dodání E2 ovariektomovaným potkaním samicím ve čtyřdenních intervalech navrátilo jejich tělesnou hmotnost a množství přijaté potravy do normálu [20].

Mechanismus působení E2 na příjem potravy není doposud znám. Má se za to, že E2 ovlivňuje účinek cholecystokininu (nejznámějšího periferního signálu sytosti, působícího krátkodobě bezprostředně po jídle, zkratka CCK). Chronickým podáním E2 se zvýšil účinek

nitrobršně podávaného CCK u ovariektomovaných potkanů [21]. Dále bylo prokázáno, že CCK byl poměrně málo účinný u ovariektomovaných potkaních samic ve srovnání se samci [21]. E2 pravděpodobně snižuje příjem potravy na úrovni centrální nervové soustavy (CNS). Receptory pro E2 jsou exprimovány v mozkovém kmeni a hypotalamu. Účinek E2 na příjem potravy zprostředkuje receptor Erb, role receptoru ER $\beta$  je neznámá. Bylo zjištěno, že E2 zvyšoval expresi imunoreaktivního c-Fos (ukazatele nervové aktivity) v mozkovém kmeni a hypotalamu, konkrétně v jeho paraventriculárním jádře, přičemž tato exprese byla vyvolána podáním CCK [22].

### **1.3. REGULACE PŘÍJMU POTRAVY**

Centrem regulace příjmu potravy je hypotalamus. Podle klasické definice: v laterální části hypotalamu se nachází centrum hladu a pokud je stimulováno, dochází k nadměrnému příjmu potravy; ve ventromediální části hypotalamu je umístěno centrum sytosti a jeho stimulace způsobuje, že organismus odmítá potravu [23]. Dnes se ale již ví, že celý proces je komplikovanější a centra jsou mnohočetná a propojená.

Příjem potravy vede k uspokojení a následně k ukončení chuti k jídlu. Přejídání vede ke zvýšenému příjmu energie. Sytost je stav, který brání dalšímu příjmu potravy a objevuje se jako důsledek příjmu potravy [2].

Savci mají systém, který zajišťuje stálý přísun energie k buňkám i během období přerušeno příjmu potravy (např. během spánku a hladovění). Zásoby jídla jsou ukládány v tukové tkáni, která je endokrinním orgánem zapojeným v regulaci příjmu potravy. Tyto mechanismy mohou být narušovány jednak přejídáním a vysokotučnou stravou, ale také i přísnými dietami a hladověním [2].

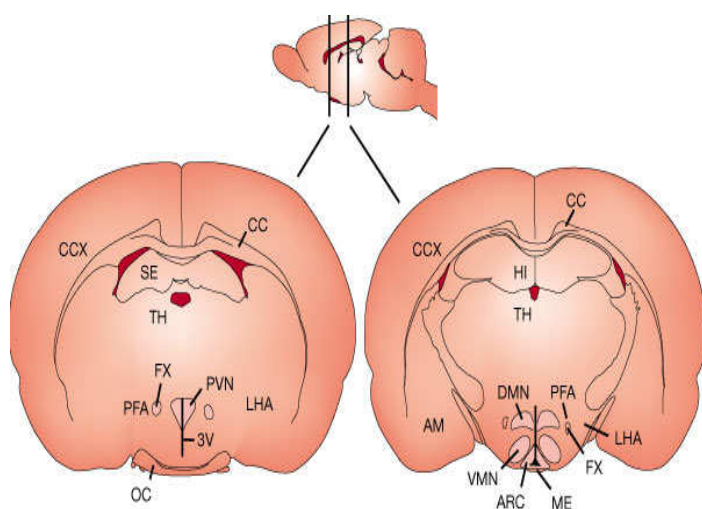
#### **1.3.1. Centrální mechanismy regulace příjmu potravy**

Přijímání potravy, její zpracování, ukládání a čerpání tukových rezerv jsou řízeny CNS na základě metabolických, nervových a hormonálních signálů.

V CNS je za oblast regulující příjem potravy považován hypotalamus, který je řídicím centrem a končí v něm podněty z jiných oblastí CNS i z periferie. Hypotalamus je zodpovědný za regulaci teploty těla, hospodaření s vodou, regulaci srdeční činnosti, krevního tlaku a aktivity

gastrointestinálního traktu (GIT) a také řídí některé emoční projevy chování (např. zuřivost a vztek) [24].

Pojem „jádro“ zde znamená oblast, která je tvořena neurony a je vizuálně rozlišitelná. Rozeznáváme jádra předního, středního a zadního hypotalamu. Největší pozornost bude níže věnována pouze jádrům středního hypotalamu, neboť nejvíce ovlivňují příjem potravy.



**Obr. 1. Schéma mozku.**

*Hypotalamus je hlavním centrem kontroly příjmu potravy a obsahuje tato důležitá jádra ovlivňující příjem potravy: ARC – nucleus arcuatus, VMN – ventromediální jádro, DMN – dorsomediální jádro, PVN – paraventriculární jádro. Další zkratky jsou LHA – laterální hypotalamus a 3V – třetí mozková komora. Ostatní části mozku nesouvisí s mým tématem, a proto jejich zkratky neuvádím [23].*

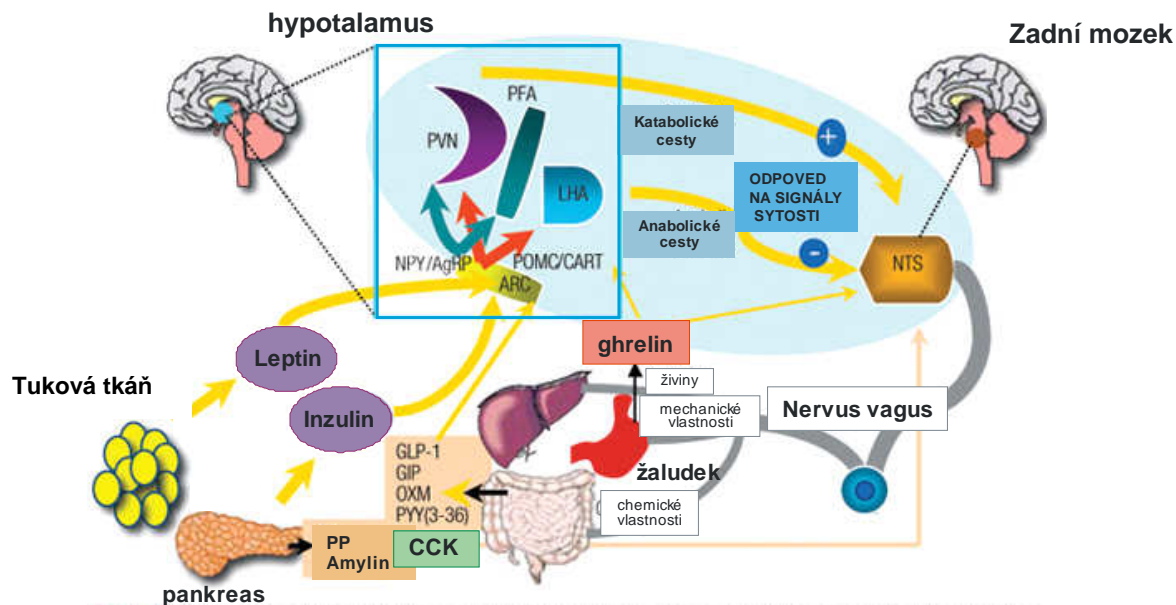
**Nucleus arcuatus (ARC)** je jedno z nejdůležitějších jader, která ovlivňují příjem potravy. Je lokalizován na spodině hypotalamu po obou stranách třetí mozkové komory (3V) (obr. 1). V ARC se nacházejí receptory pro řadu látek ovlivňujících příjem potravy: pro leptin, inzulin, ghrelin (obr. 2), kortizol, estrogen, růstový hormon a další [25]. Toto jádro obsahuje tzv. primární neurony související s regulací příjmu potravy: neurony AgRP/NPY (AgRP – Agouti Related Peptide, NPY – Neuropeptid Y), které produkují hormony zvyšující chuť k jídlu (tzv. orexigenní) a neurony POMC/CART (POMC – Pro-opiomelanokortin, CART – Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript), které produkují hormony s opačným účinkem (tzv.



anorexigenní) [23, 26]. Receptory pro leptin, inzulin a ghrelin se nacházejí na primárních neuronech. Leptin a inzulin stimulují expresi a sekreci neuropeptidů POMC/CART a potlačují expresi a sekreci neuropeptidů AgRP/NPY, čímž dochází k snížení příjmu potravy. Ghrelin má opačné účinky na tyto neuropeptidy, a tudíž dochází k zvýšení příjmu potravy (obr. 2). Léze ARC (tj. poškození nervových buněk v ARC např. pomocí glutamátu sodného) vedou k rozvoji obezity.

Dále do středního hypotalamu patří **ventromediální jádro (VMN)**, **dorsomediální jádro (DMN)** a **laterální hypotalamus (LHA)** (obr. 1). Selektivním poškozením VMN (centra sytosti) dojde k hyperfagii (přejídání) a následnému rozvoji obezity. Oproti tomu poškození LHA (centra hladu) způsobí hypofagii (snížení příjmu potravy) [23].

Primární signály dostávají informace z periferie a tyto primární neurony pak mohou dále ovlivňovat tzv. sekundární neurony, které nejsou přímo v ARC, ale např. v těchto mozkových oblastech: paraventriculární jádro (PVN) a LHA [23].



**Obr. 2. Model popisující peptidy působící v mozku na příjem potravy.** Centrální regulace příjmu potravy je ovlivňována peptidy přicházejícími z periferie a produkovány v hypothalamu. Leptin a inzulin (jejich hladiny jsou přímo úměrné tělesné hmotnosti a obsahu tuku v organismu) pronikají do mozku přes hematoencefalickou bariéru. V hypothalamu v ARC stimulují expresi a sekreci anorexigenních POMC/CART a naopak potlačují expresi a sekreci orexigenních AgRP/NPY a tím dochází k snížení příjmu potravy. Ghrelin vylučovaný žaludkem v mozku působí opačně na produkci POMC/CART a AgRP/NPY, čímž dochází k zvýšení příjmu potravy. Leptin, inzulin a ghrelin ovlivňují dlouhodobou regulaci příjmu potravy. Na krátkodobé regulaci se podílejí např. peptidy, které se uvolňují bezprostředně po jídle a způsobí sytost (tzv. signály sytosti, patří sem např. CCK). CCK je vytvářen v GIT a jeho signál je do mozku přenášen přes nervus vagus do mozkového kmene (např. do nucleus tractus solitarius, NTS) a dále pak do dalších mozkových oblastí. V mozku pak nervové dráhy spojí informaci z NTS a několika hypothalamických jader (ARC, PVN, LHA) k indikaci příjmu potravy a výdeji energie [27].

## 1.4. PEPTIDY OVLIVŇUJÍCÍ PŘÍJEM POTRAVY

Přehled nejdůležitějších peptidů ovlivňujících příjem potravy je uveden v tab. 1. Peptidové hormony můžeme rozdělit z hlediska doby jejich účinku na krátkodobé (působí bezprostředně po jídle) a dlouhodobé (regulují energetickou rovnováhu v delším časovém horizontu a ovlivňují působení peptidů krátkodobých). Dále je můžeme rozdělit na ty, které se vylučují a působí buď v GIT nebo v CNS. A konečně je můžeme rozdělit na orexigenní a anorexigenní.

*Tab. 1. Příklady peptidů ovlivňujících příjem potravy*

<b>Přirozený peptid</b>	<b>Doba účinku</b>	<b>Místo účinku</b>	<b>Příjem potravy ↑ zvyšuje, ↓ snižuje</b>
$\alpha$ MSH	Krátkodobě	CNS	↓
Peptid CART	Krátkodobě	CNS	↓
MCH	Krátkodobě	CNS	↑
NPY	Dlouhodobě	CNS	↑
orexiny	Krátkodobě	CNS	↑
galanin	Krátkodobě	CNS	↑
Leptin	Dlouhodobě	Periferie, CNS	↓
Inzulin	Dlouhodobě	Periferie, CNS	↓
Ghrelin	Dlouhodobě, krátkodobě	Periferie, CNS	↑
CCK	Krátkodobě	Periferie, CNS	↓
PYY	Krátkodobě	Periferie, CNS	↓
GLP-1	Krátkodobě	Periferie, CNS	↓

$\alpha$ MSH – hormon stimulující  $\alpha$ -melanocyty, peptid CART – peptid cocaine and amphetamine regulated transcript, MCH – hormon koncentrující melanin, NPY – neuropeptid Y, CCK – cholecystokinin, PYY – peptid YY, GLP-1 – peptid-1 podobný glukagonu

### 1.4.1. Adipokiny

Adipokiny neboli adipocytokiny jsou proteiny, které jsou produkovány buňkami bílé tukové tkáně – adipocyty [28]. V organismu plní řadu funkcí, např. hrají významnou roli v regulaci příjmu potravy, udržování energetické rovnováhy a inzulínové rezistenci. Je třeba zdůraznit, že adipokiny působí komplexně a vzájemně se ovlivňují. Důsledkem poruch jejich

funkce je vznik obezity, diabetu II. typu, hypertenze a poruch srážlivosti krve. V současné době je známa celá řada proteinů, které můžeme řadit mezi adipokiny. Nejznámější z nich je leptin, adiponektin a rezistin. O adiponektinu a rezistinu se zmíním pouze ve stručnosti, neboť nebyly hlavními hormony, kterými se zabývám v této práci.

#### 1.4.1.1. Leptin

##### *Objev*

Název leptinu je odvozený z řeckého slova „leptos“, což znamená tenký, štíhlý. Objev leptinu, produktu *ob* genu, byl v roce 1994 jeden z nejvýznamnějších objevů v oblasti regulace příjmu potravy [29]. Mutace *ob* genu u tzv. *ob/ob* myši vede k morbidní obezitě, která je spojená s přejídáním [29]. *Ob/ob* myši neprodukují leptin, mají rezistenci k inzulínu a jsou neplodné. Po podání leptinu *ob/ob* myším došlo k úpravě těchto fenotypických odchylek a také ke snížení jejich tělesné hmotnosti [30].

##### *Struktura*

Leptin je protein o 167 aminokyselinách s trojrozměrnou strukturou podobnou cytokinům (např. faktoru inhibujícímu leukémii a lidskému růstovému hormonu). Terciární struktura leptinu je znázorněna na obr. 3 a je tvořena čtyřmi antiparalelními alfa-helixy (A, B, C a D), které jsou spojeny dvěma dlouhými (AB a CD) a jedním krátkým spojem (BC) [31].



*Obr. 3. Struktura leptinu [31].*

## **Výskyt**

Exprese leptinového genu je tkáňově specifická. Hlavním místem výskytu leptinu (obr. 3) jsou adipocyty, ale v menší míře je také produkován placentou a žaludkem [28, 30].

## **Vlastnosti**

Leptin hraje významnou roli v dlouhodobé regulaci příjmu potravy a energetického metabolismu. Má se za to, že leptin signalizuje z tukové tkáně do mozku nadměrné hromadění energetických zásob a že mozek dá signál ke snížení příjmu potravy a zvýšení energetického výdeje, díky čemuž nedochází k vzniku obezity [30]. Leptin tvořený v tukové tkáni proniká přes hematoencefalickou bariéru do CNS, konkrétně do ARC v hypotalamu, a tam potlačuje expresi a sekreci orexigenních AgRP/NPY a stimuluje expresi a sekreci anorexigenních POMC/CART, což vede k poklesu příjmu potravy. V hypotalamu leptin ovlivňuje sekreci dalších hormonů regulujících příjem potravy jako např. kortikoliberin, POMC, orexiny, MCH a melanokortiny [32].

Exprese leptinu je snížena např. při hladovění a výrazné fyzické aktivitě, naopak je zvýšena při nadměrném příjmu energie [33]. Hladiny leptinu v krvi jsou obecně vyšší u žen než u mužů. Souvisí to s vyšší akumulací podkožního tuku u žen než u mužů (exprese mRNA pro leptin je vyšší v podkožním tuku než v nitrobřišním) a s přítomností estrogenů u žen (estrogeny zvyšují expresi a produkci leptinu) [34, 35, 36].

Leptin zabraňuje steatóze (ztučnění) orgánů. U obezních jedinců nastane steatóza jater, když se vyčerpá kapacita tukových buněk k ukládání tuku [37].

Leptin má významný vliv na HHG osu. Stimuluje uvolnění GnRH [38] a sekreci LH a FSH [39]. Hraje klíčovou roli v reprodukci: ovlivňuje menstruační cyklus, těhotenství a laktaci [35, 40]. Je významným spouštěčem puberty. Je známo, že aby došlo k pohlavnímu a pubertálnímu vývoji, je důležitá přítomnost aspoň malého množství tuku v organismu, což znamená minimální koncentrace leptinu. Důkazem toho, že leptin pozitivně ovlivňuje pohlavní zrání, je studie získaná u *ob/ob* myší. Podávání leptinu infertilním *ob/ob* myším vedlo k urychlení jejich pohlavního zrání a obnovení fertility [41]. Nedostatek leptinu nebo porucha jeho signalizace do buňky je úzce spojena s hypotalamickou infertilitou u hlodavců a lidí. Různé myší kmeny (např. C57BL/6 a DBA/2J), jejichž obezita je vyvolaná vysokotučnou potravou, vykazují vysoké hladiny leptinu (přitom většina z nich má sníženou citlivost na účinky leptinu a v hypotalamu mohou mít i nižší počet receptorů pro leptin) a inzulinu a sníženou plodnost [42].

### ***Receptory pro leptin***

V roce 1995 byly identifikovány **receptory pro leptin (Ob-R)** [43]. Existují různé formy receptorů pro leptin, které mají shodnou extracelulární doménu a buď žádnou (**Ob-Re** – cirkuluje v krvi a pravděpodobně slouží jako vazebný protein pro leptin), nebo různě dlouhou intracelulární doménu: tzv. **dlouhá forma (Ob-Rb)** má dlouhou intracelulární doménu, nachází se v mozku, zejména v hypotalamu a NTS a je zodpovědná za signalizaci do buňky; a tzv. **krátké formy (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd a Ob-Rf)** se liší délkou intracelulární domény, podílejí se na transportu leptinu do tkání a udržují jeho stálé hladiny v organismu [44].

Receptory pro leptin jsou v hypotalamu soustředěny v oblastech, které ovlivňují regulaci příjmu potravy, tedy v ARC, VMN, PVN a DMN. V periférii se vyskytují např. v tukové tkáni (bílé i hnědé), plicích, ledvinách, slezině, játrech, tlustém střevě, prostatě a ovariích [30].

### ***Signalizace leptinu do buňky***

Leptin využívá k přenosu signálu do buňky tzv. Janus-kinasy (neboli JAK; z anglického výrazu Janus Protein Kinase; jsou to tyrosinproteinkinasy) a STAT- proteinů (z anglického výrazu Signal Transducer and Activator of Transcription; je to skupina intracelulárních signálních proteinů). JAK jsou spojeny s intracelulární doménou dlouhé formy receptoru (Ob-Rb) a po navázání leptinu k receptoru vyvolají fosforylaci této domény. Fosforylovaná intracelulární doména se pak váže na STAT-proteiny, které jsou po aktivaci přesouvány do jádra, kde stimulují transkripci specifických genů [23].

### ***Leptin a obezita***

U *ob/ob* myši, které nejsou schopné produkovat leptin, se po aplikaci leptinu snížila jejich tělesná hmotnost. Naproti tomu hladiny leptinu v krvi jsou u většiny obézních lidí zvýšeny vzhledem k obsahu tuku v organismu a jeho podání obézním osobám nevede ke snížení jejich hmotnosti [45]. To naznačuje, že obézní lidé a hlodavci mají tzv. **rezistenci k leptinu**, která je charakterizovaná vysokými hladinami leptinu v krvi a necitlivostí na účinky exogenně podávaného leptinu. Důvody pro rezistenci k leptinu nejsou příliš objasněny. Nefunkčnost leptinu může být způsobena jeho nedostatečným transportem přes hematoencefalickou bariéru, nebo je poškozena signalizace leptinu do buňky [46, 47, 48, 49]. Rezistence k leptinu se nejčastěji vyskytuje u lidí a hlodavců, jejichž obezita je vyvolaná vysokotučnou stravou.

#### 1.4.1.2. Adiponektin

Adiponektin (také může být uváděn jako Acrp30 a apM1) je protein o 244 aminokyselinách a byl objeven v roce 1996 [50]. Adiponektin je pokládán za protektivní adipokin. Mírně snižuje příjem potravy, výrazně zlepšuje rezistenci k inzulinu (vysoké hladiny adiponektinu zabraňují vzniku diabetu II. typu; mechanismus, jakým adiponektin působí zlepšení citlivosti na inzulin, není zcela jasný), zvyšuje oxidaci mastných kyselin, snižuje hladinu triglyceridů, působí protizánětlivě a antiateroskleroticky [28, 51, 52].

Na rozdíl od leptinu jsou koncentrace adiponektinu v krvi sníženy u obézních jedinců a zvýšeny u štíhlých [53]. Dále jsou jeho hladiny sniženy v různých modelech obezity: myši s nedostatkem leptinu – *ob/ob* myši, myši s nefunkčním receptorem pro leptin – *db/db* myši a myši, jejichž obezita je vyvolaná vysokotučnou potravou [51].

Adiponektin se váže na membránové receptory spřažené s G-proteiny: **AdipoR1** (identifikován zejména v kosterním svalu) a **AdipoR2** (např. v játrech) [28].

#### 1.4.1.3. Rezistin

Rezistin je adipokin bohatý na cystein a jeho molekulová hmotnost je 12,5 kDa. Byl objeven v letech 2000/2001 nezávisle třemi vědeckými skupinami [54, 55, 56]. Je produkován zejména adipocyty. Jeho fyziologické účinky jsou stále kontroverzní. Rezistin by mohl být důležitým faktorem pro asociaci obezity s diabetem. Brzdí stimulační účinek inzulinu na transport glukosy do adipocytů. Není ale známo, zda tak působí i v jiných buňkách a neví se, jakým mechanismem rezistin narušuje předávání inzulinových signálů buňkám. Není ani jasné, zda exprese a sekrece rezistinu jsou zvýšené [55, 57] nebo snižené [58, 59, 60, 61] při obezitě. Podání nebo nadměrná exprese rezistinu způsobují rezistenci k inzulinu [62]. Role rezistinu v obezitě a utilizaci glukosy je zřejmá spíše u hlodavců než u lidí. U myši se zdá, že rezistin tvoří antagonistický funkční pár s inzulinem, zatímco u lidí je vliv rezistinu na citlivost k inzulinu slabý [28]. Je to způsobeno pravděpodobně odlišnou expresí rezistinu u hlodavců a lidí. U myši je největší exprese rezistinu v bílé tukové tkáni a u lidí spíše v kostní dřeni [28].

Rezistin je velmi kontroverzní a řada otázek čeká na objasnění. Např. zda je rozpoznáván specifickým receptorem, jaká je to molekula? Jaká je vlastně normální fyziologická úloha rezistinu v organismu?

## 1.4.2. Ghrelin

### *Objev*

Ghrelin byl objeven Kojimou a jeho spolupracovníky v roce 1999 jako přirozený ligand „sirotčího“ receptoru, který je specifický pro skupinu syntetických sekretagogenních peptidů (z anglického výrazu „Growth Hormone Secretagogues“, GHS) [63]. Tento objev je typickým příkladem tzv. „reverzní farmakologie“. To znamená, že nejprve byly testovány účinky GHS, poté byl objeven receptor a nakonec přirozený ligand, tedy ghrelin. GHS jsou peptidové nebo nepeptidové molekuly, které stimulují vylučování růstového hormonu z hypofýzy. Protože ghrelin podporuje uvolnění růstového hormonu, z této jeho vlastnosti pochází i jeho název (slovo „ghre“ je praindoevropské a znamená růst).

### *Struktura*

Preproghrelin je tvořen 117 aminokyselinami, z nichž prvních 23 aminokyselin patří signálnímu peptidu. Po odštěpení signálního peptidu vzniká dalším štěpením peptid obsahující 28 aminokyselin. Tento peptid, ghrelin, je dále posttranslačně modifikován: hydroxylová skupina serinového zbytku v pozici 3 je esterifikována n-oktanovou kyselinou. Tato hydrofobní skupina je důležitá pro biologickou aktivitu ghreluinu. Nedávno byl objeven enzym katalyzující vazbu n-oktanové kyseliny na hydroxylovou skupinu Ser<sup>3</sup> [64]. Tento enzym byl nazván ghrelin-O-acyl transferasa (GOAT). GOAT se vyskytuje v žaludku a střevech, tedy ve stejných místech jako ghrelin.

Existují 4 formy ghreluinu, které vznikají ze stejného prekurzoru, ale liší se typem acylací serinového zbytku v pozici 3: n-oktanoylovaný ghrelin (C8:0) (dále jen ghrelin, viz výše zmíněný), des-n-oktanoylovaný ghrelin (dále jen desacyl ghrelin), dekanoylovaný (C10:0) a pravděpodobně decenoylovaný (C10:1) [65].

Strukturu lidského ghreluinu ukazuje obr. 4. Lidský a potkaní ghrelin se liší pozicí pouze dvou aminokyselin (u potkaního ghreluinu jsou v pozici 11 a 12 místo argininu a valinu lysin a alanin) Aminokyselinová sekvence potkaního a myšího ghreluinu se od sebe neliší. Ghrelin byl také detekován u slepic, ryb a skokanů [66].





**Obr. 4. Struktura lidského ghreluinu [66].**

Kromě ghreluinu stojí ještě za zmínku desacyl ghrelin. Je to neacylovaná forma ghreluinu, která se vyskytuje v žaludku a krvi. V krvi ale cirkuluje více desacyl ghrelin než acylovaný. Je to pravděpodobně proto, že poločas rozpadu desacyl ghreluinu je delší než ghreluinu (desacyl ghrelin asi 30 minut ve srovnání s ghrelinem 9 – 13 minut) [67]. Fyziologické funkce desacyl ghreluinu v organismu nejsou doposud příliš objasněné a veškeré publikované výsledky jsou kontroverzní. Není např. jasné, zda desacyl ghrelin sám o sobě má účinek na příjem potravy či ho dokonce nesnižuje [67]. Bylo zjištěno, že desacyl ghrelin podávaný nitrobríšně blokoval ghrelinem navozený příjem potravy [68]. Desacyl ghrelin pravděpodobně neovlivňuje žaludeční sekreci [69], ale buď potlačuje vyprazdňování žaludku [70], nebo ho vůbec neovlivňuje [69].

### **Výskyt**

Hlavním zdrojem ghreluinu jsou buňky sliznice žaludku. V menší míře se vyskytuje např. v dvanáctníku, tlustém střevě, ledvinách, hypotalamu v ARC, hypofýze, pankreatu, srdci, placentě a plicích [71, 72, 73].

### **Vlastnosti**

Ghrelin plní v organismu řadu důležitých funkcí. Např. stimuluje sekreci růstového hormonu, zvyšuje příjem potravy, příjem energie, motilitu žaludku a žaludeční sekreci. Ovlivňuje funkci slinivky břišní a metabolismus glukosy a má kardioprotektivní účinky [66, 74].

V hypofýze ghrelin silně stimuluje vyplavování růstového hormonu a slabě prolaktinu a kortikotropinu [71]. Růstový hormon je uvolňován somatoliberinem (hormonem uvolňujícím růstový hormon, z anglického výrazu „Growth Hormone Releasing Hormone“, GHRH) a ghrelinem. Ghrelin ale stimuluje produkci růstového hormonu jiným mechanismem než GHRH: receptor pro ghrelin je odlišný od receptoru pro GHRH. Vazba ghreluinu na receptor aktivuje dráhu fosfolipasy C, zatímco u GHRH je to adenylátcyklasový systém. Bylo navíc

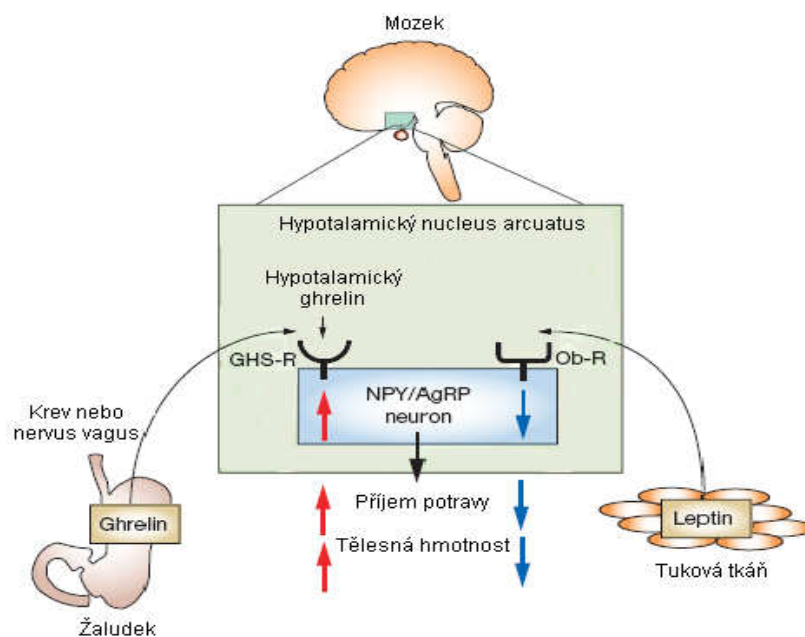
zjištěno, že ghrelin a GHRH mají spolu synergistický účinek na uvolnění růstového hormonu: společná aplikace obou látek v nízkých koncentracích významně zvýšila sekreci růstového hormonu [75].

Ghrelin je jedinou periferní látkou, která zvyšuje příjem potravy. Podporuje pozitivní energetickou rovnováhu organismu: zvyšuje příjem energie a potlačuje její výdej. Vysloužil si přezdívku „hormon hladu“, protože v organismu vyvolává pocit hladu. Hladina ghreluinu v krvi je vysoká před jídlem a během jedné hodiny po jídle klesá na nejnižší hodnotu. To naznačuje, že ghrelin hraje úlohu v počáteční fázi jako signál pocitu hladu [66].

Je mnoho studií, které ukazují, že ghrelin po podání do periferie (podkožně nebo intravenózně) nebo do CNS (do mozkových komor) u hlodavců zvyšuje jejich tělesnou hmotnost potlačením energetických výdajů a zvýšením příjmu potravy [66, 76, 77].

Přítomnost ghreluinu v mozku je nezbytná pro jeho vliv na regulaci příjmu potravy. Způsob, jakým může ghrelin působit v CNS, je buď přímým kontaktem s neurony v mozku (mozek v malé míře produkuje ghrelin a nachází se tam i jeho receptor), nebo prostřednictvím aferentních drah bloudivého nervu neboli nervu vagu. Bylo zjištěno, že vagotomie (chirurgické přetětí bloudivého nervu) potlačuje schopnost ghreluinu zvyšovat příjem potravy a uvolňovat růstový hormon. To naznačuje, že přítomnost nervu vagu je pro účinky ghreluinu klíčová [78]. Lidský ghrelin prochází hematoencefalickou bariérou, zatímco myší ghrelin, který se liší od lidského pouze ve dvou aminokyselinách, zřejmě neprochází [79].

Leptin jako periferní anorexigenní signál a ghrelin jako periferní orexigenní signál regulují energetickou rovnováhu v organismu na úrovni hypotalamu. Ve vztahu ke ghreluinu leptin blokuje ghrelinem navozený příjem potravy a tvoří s ním antagonistický funkční pár. Účinek ghreluinu na příjem potravy je zprostředkován specifickým receptorem v hypotalamu v ARC. V ARC se vyskytuje mimo jiné i receptor pro leptin. Po vazbě ghreluinu na receptor se v ARC aktivují orexigenní neuropeptidy AgRP/NPY a exprese a sekrece anorexigenních neuropeptidů POMC/CART jsou potlačovány, tím dochází k zvýšení příjmu potravy. Leptin má na tyto neuropeptidy opačný účinek [66, 72]. Schéma působení ghreluinu a leptinu na regulaci příjmu potravy v hypotalamu je znázorněné na obr. 5.



**Obr. 5. Schéma regulace příjmu potravy ghrelinem a leptinem v hypothalamu. Signál periferního leptinu omezuje příjem potravy, zatímco periferní ghrelin signalizující hladovění stimuluje chuť k jídlu. Oba hormony informují mozek o stavu energetických zásob a působí jako fyziologičtí antagonisté [72].**

Ghrelin ovlivňuje energetickou rovnováhu také tím, že snižuje využití tuku a tak přispívá k hromadění energetických zásob [73].

Žaludek je hlavním zdrojem ghrelinu. Při chirurgickém zmenšení žaludku dochází ke snížení sekrece ghrelinu [66]. Intravenózní podání ghrelinu zvyšuje sekreci kyseliny chlorovodíkové a motilitu žaludku. Vagotomie ale tento účinek ruší [66].

Hlavním regulátorem sekrece ghrelinu je potrava. Není ale jasné, jakým způsobem potrava působí a která(é) její složka(y) hraje(i) klíčovou roli. Má se za to, že by to mohla být glukosa, a tudíž i hladiny inzulínu v krvi. Bylo dokázáno, že intravenózní podání glukosy snižuje koncentraci ghrelinu v krvi [80]. Výsledky ukazující vliv ghrelinu na sekreci inzulínu jsou kontroverzní. Některé studie dokázaly inhibiční účinky ghrelinu na sekreci inzulínu a další prokázaly opak [66, 72]. Nicméně hladiny ghrelinu a inzulínu jsou ovlivňovány koncentrací glukosy v krvi. Pokud je hladina glukosy vysoká, ghrelin stimuluje hladinu inzulínu a při bazálních koncentracích glukosy ghrelin nemá vliv na sekreci inzulínu [66].

Exprese mRNA pro ghrelin a jeho receptor v srdci a aortě dokazuje přímý účinek ghreluinu na kardiovaskulární systém. Ghrelin obecně zlepšuje činnost srdce a cév. Snižuje krevní tlak a tepovou frekvenci srdce [66, 73].

### ***Receptory pro ghrelin***

**Receptor pro ghrelin (GHS-R)** se sedmi transmembránovými doménami je spřažený s G-proteinem. Jsou známy dva typy receptorů, pojmenované jako **GHS-R1a** a **GHS-R1b**.

mRNA pro receptor GHS-R1a se nachází v mnoha mozkových oblastech. Ve velké míře se vyskytuje v hypotalamu, konkrétně v ARC. Také se vyskytuje v somatotropních buňkách hypofýzy. mRNA pro receptor GHS-R1a byla v malé míře prokázána i v periférii: v žaludku, tenkém a tlustém střevě, srdci, játrech, ledvinách, plicích, slinivce břišní a tukové tkáni [66, 71].

Receptor GHS-R1b je na C-konci zkrácený ve srovnání s receptorem GHS-R1a [66]. Funkce GHS-R1b není dosud známá [71].

### ***Signalizace ghreluinu do buňky***

Ghrelin využívá k přenosu signálu do buňky tzv. systém fosfolipasy C. Vazba ghreluinu na receptor GHS-R1a vede k aktivaci fosfolipasy C, uvolnění inositol trifosfátu a následně ke zvýšení intracelulární hladiny  $Ca^{2+}$  iontů.  $Ca^{2+}$  ionty aktivují proteinkinasu C a ta pak fosforyluje intracelulární proteiny [66, 81].

### ***Ghrelin a obezita***

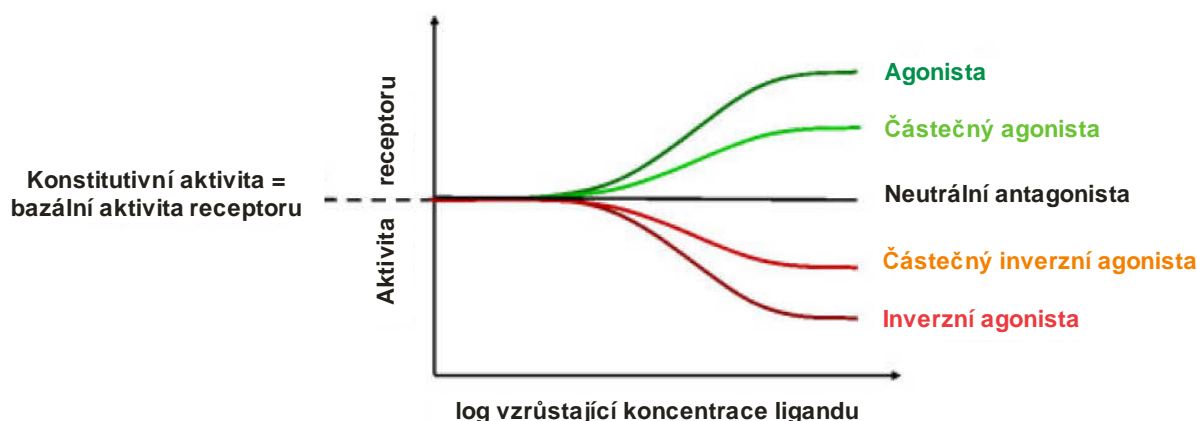
Hladiny ghreluinu v krvi negativně korelují s BMI a množstvím tuku v organismu, jsou tedy nízké u obézních jedinců a vysoké u štíhlých [82]. Ztráta hmotnosti způsobené nízkokalorickou stravou a/nebo cvičením vyvolá zvýšení hladiny ghreluinu. S tímto faktem souvisí i vysoké koncentrace ghreluinu u pacientek se syndromem mentální anorexie a mentální bulimie, u nichž se hladina ghreluinu dostala do normálních hodnot po zvýšení tělesné hmotnosti vyvolané vysokokalorickou stravou [83].

#### **1.4.2.1. Analogy ghreluinu**

Ligandy receptorů obecně dělíme na agonisty, antagonisty a inverzní agonisty. Agonista je látka, která po vazbě na receptor zvýší jeho aktivitu (např. signalizací do buňky). Plný agonista vyvolá maximální odpověď, kdežto částečný agonista pouze částečnou. Receptor GHS-R1a vykazuje silnou konstitutivní aktivitu, to znamená, že receptor GHS-R1a působí sám o sobě

(vysílá signál do buňky) bez ohledu na to, zda je přítomen ligand. Z pohledu vazby ghrelinu na receptor rozlišujeme kompetitivní a nekompetitivní antagonisty. Kompetitivní antagonist se váže na receptor na stejné místo jako agonista (blokuje účinek agonisty tím, že soutěží o stejné vazebné místo), kdežto nekompetitivní antagonist se může vázat na jiné vazebné místo a potlačuje odpověď na navázání agonisty na receptor. Z pohledu konstitutivní aktivity receptoru rozlišujeme neutrální antagonisty a inverzní agonisty. Neutrální antagonist se váže na receptor, potlačuje účinek agonisty, ale přitom neovlivní konstitutivní aktivitu receptoru. Inverzní agonista inhibuje jak účinek agonisty, tak i konstitutivní aktivitu receptoru (obr. 6) [84].

Ghrelín jako stimulátor chuti k jídlu hraje významnou roli v dlouhodobé regulaci příjmu potravy a energetického metabolismu. Proto při současné epidemii obezity se antagonisté a zejména inverzní agonisté (ti zcela potlačují konstitutivní aktivitu receptoru GHS-R1a) receptoru GHS-R1a jeví jako potenciální látky pro léčbu obezity. Inverzní agonisté by mohli zabránit soustavnému pojídání mezi hlavními jídly dne a umožnit příjem přiměřených porcí [85].



*Obr. 6. Diagram koncentrační závislosti odezvy různých ligandů receptoru [84].*

#### 1.4.2.1.1. Agonisté receptoru GHS-R1a

Byla studována řada fragmentů ghrelinu a jejich schopnost vázat se na receptor GHS-R1a. Cílem bylo určit minimální sekvence potřebné k zachování biologické aktivity ghrelinu.

Analog obsahující prvních 5 N-koncových aminokyselinových zbytků ve struktuře ghrelinu (viz obr. 4) je schopný stejně efektivně aktivovat receptor GHS-R1a jako ghrelín v celé jeho délce. N-koncový pentapeptid se sekvencí **Gly-Ser-Ser(*n*-octanoyl)-Phe-Leu** představuje

tzv. „aktivní jádro“ ghrelinu, je to tedy minimální sekvence potřebná k zachování biologické aktivity ghrelinu [86]. C-koncové fragmenty ghrelinu jsou neaktivní.

Dále byl zkoumán vliv délky mastné kyseliny navázané na serinu v pozici 3, vazby oktanové kyseliny na serinu v pozici 3, náhrady serinu za jinou aminokyselinou a změny náboje na N- i C-koncových aminokyselinových zbytcích. Z výsledků je patrné, že při záměně serinu v pozici 3 za aromatickou aminokyselinu (např. tryptofan) byla zachována vazba takového analogu k receptoru GHS-R1a, ale při záměně za aminokyselinu s alifatickým postranním řetězcem (např. valin nebo leucin) nedochází k vazbě na tento receptor. Důležitá je L-konfigurace aminokyseliny v této pozici. Pro udržení biologické aktivity jsou důležité pozitivně nabitě aminokyseliny (na N- nebo C-konci peptidu), negativně nabitě aminokyseliny aktivitu potlačují [87]. Při záměně esterové vazby oktanové kyseliny na serinu v pozici 3 za vazbu amidovou byla zachována biologická aktivita [86]. Z toho vyplývá, že nestabilní esterová vazba není nezbytná pro vazbu na receptor.

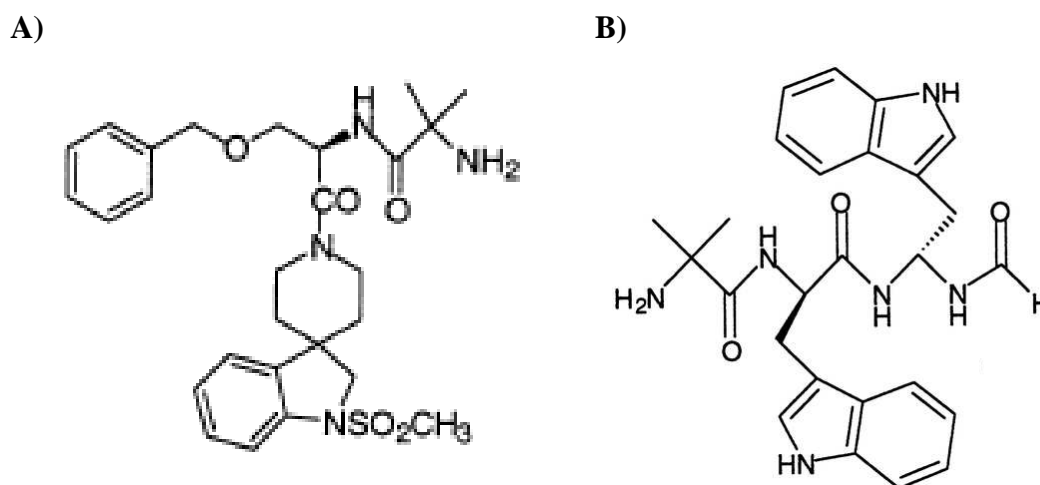
Ještě dřív, než byl objeven ghrelin, byl testován první synteticky připravený agonista receptoru GHS-R1a – hexapeptid GHRP-6. Z něho pak byli odvozeni další agonisté receptoru GHS-R1a: GHRP-2, GHRP-1 a hexarelin [88]. Na N-konec GHRP-6 a hexarelinu můžou být připojené dvě aminokyseliny (Tyr a Ala) pro případnou jodaci, a tak vznikli další dva agonisté receptoru GHS-R1a: Tyr-Ala-GHRP-6 a Tyr-Ala-hexarelin. Aminokyselinové sekvence těchto peptidových agonistů receptoru GHS-R1a ukazuje tab. 2. Vazebnými experimenty s <sup>125</sup>I-Tyr-Ala-GHRP-6 byla určena specifická vazba k receptoru GHS-R1a na membránách buněk izolovaných z přední hypofýzy a hypotalamu potkana [89]. Pomocí <sup>125</sup>I-Tyr-Ala-hexarelinu byla vazebnými experimenty dokázána specifická vazba k receptoru GHS-R1a v membránách buněk izolovaných z lidské hypofýzy a hypotalamu [90].

**Tab. 2. Aminokyselinové sekvence peptidových agonistů receptoru GHS-R1a**

<b>Analog</b>	<b>Sekvence</b>
GHRP-6	His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>
GHRP-2	D-Ala-D-βNal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>
GHRP-1	Ala-His-D-βNal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>
hexarelin	His-D-2-methyl-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>
Tyr-Ala-GHRP-6	Tyr-Ala-His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>
Tyr-Ala-hexarelin	Tyr-Ala-His-D-2-methyl-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>

Protože GHRP-6 vykazoval krátký poločas rozpadu (20 minut u lidí), byli navrženi nepeptidoví agonisté. Je jich velké množství, ale nejúčinnější je MK-0677, jehož strukturu ukazuje obr. 7A. Je velmi účinný *in vitro*, má dobrou biologickou dostupnost a poločas rozpadu (4,7 hodin u psů). V klinických testech na lidech výrazně stimuloval uvolnění růstového hormonu [84]. Dále je dobře popsán JMV 1843, jehož strukturu ukazuje obr. 7B. JMV 1843 má větší schopnost uvolňovat růstový hormon než ghrelin a hexarelin [91]. Byl dokonce podáván lidem na uvolnění růstového hormonu perorálně [92] a nyní je v druhé fázi klinické studie. Dosud ještě není známá studie zabývající se jeho účinkem na příjem potravy.

Agonisté receptoru GHS-R1a mohou sloužit jako léky na některé nemoci: kromě léčby deficitu růstového hormonu mohou dále např. sloužit k léčbě kachexie nebo anorexie. Takoví agonisté zvyšují příjem potravy a tělesnou hmotnost u pacientů s kachexií nebo anorexií. Přehled agonistů, kteří jsou nyní klinicky testovány, uvádí Depoortere [85].



**Obr. 7. Struktury některých nepeptidových agonistů receptoru GHS-R1a:**

**A) MK-0677; B) JMV 1843 [91].**

#### 1.4.2.1.2. Antagonisté receptoru GHS-R1a

Nejpoužívanější peptidoví antagonisté receptoru GHS-R1a jsou [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a [D-Arg<sup>1</sup>, D-Phe<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>]substance P (dále jen SPa), jejichž aminokyselinové sekvence jsou uvedené v tab. 3.

*In vitro* [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 vytěsňoval ghrelin v buněčných membránách buněk CHO-K1 s transfektovaným lidským receptorem GHS-R1a [93]. [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 vytěsňoval ghrelin v potkaních hypofyzárních tumorových buňkách RC-4B/C a potlačoval uvolnění Ca<sup>2+</sup> vyvolané ghrelinem [94]. Dále [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 inhiboval ghrelinem vyvolanou fosforylaci ERK 1/2 (zkratka pochází z anglického slova Extracellular Signal-Regulated Kinase typ 1/2; tato kinasa patří do rodiny mitogen-aktivovaných proteinkinasy) v buňkách HEK 293 s transfektovaným lidským receptorem GHS-R1a [95]. *In vivo* [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 krátkodobě snižoval příjem potravy u štíhlých myší (nitrobřišní podání a podání do mozku) a myší, jejichž obezita byla vyvolaná vysokotučnou potravou (nitrobřišní podání) [96]. Když byl [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 podáván dlouhodobě (po dobu 6 dnů) nitrobřišně *ob/ob* myším, došlo 5. a 6. den periferního podávání k poklesu jejich tělesné hmotnosti [96]. Po nitrobřišním podání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 snižoval příjem potravy u obézních *fa/fa* potkanů (mají mutaci genu kódujícího receptor pro leptin) [97].

SPa působí spíše jako inverzní agonista, proto tato látka bude zmíněna níže mezi inverzními agonisty.

**Tab. 3. Aminokyselinové sekvence peptidových antagonistů receptoru GHS-R1a**

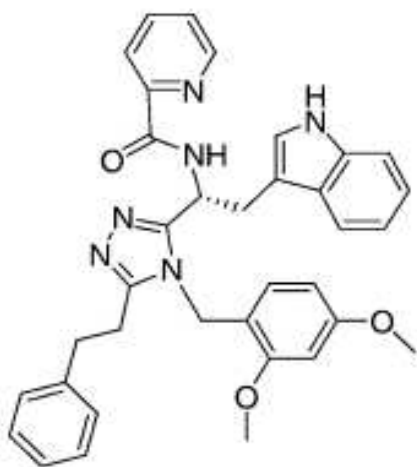
<b>Analog</b>	<b>Sekvence</b>
[D-Lys <sup>3</sup> ]GHRP-6	His-D-Trp-D-Lys-Trp-D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>
SPa	D-Arg-Pro-Lys-Pro-D-Phe-Gln-D-Trp-Phe-D-Trp-Leu-Leu-NH <sub>2</sub>

Z nepeptidových antagonistů receptoru GHS-R1a je známa série látek ve formě isoxazol karboxamidů. Dále byly identifikovány sloučeniny odvozené od tetralin karboxamidů, které měly v *in vivo* testech lepší farmakokinetické vlastnosti než isoxazol karboxamidy [98]. Bylo nalezeno skutečně velké množství nepeptidových antagonistů receptoru GHS-R1a. Laboratoř prof. Martineze v Montpellier ve Francii se zabývá mimo jiné chemií nepeptidových ligandů receptoru GHS-R1a. Tyto látky byly testovány *in vitro* a u některých z nich byl studován jejich účinek na příjem potravy *in vivo*. Ligandy receptoru GHS-R1a, které v literatuře vykazovaly účinek na příjem potravy, jsou JMV 3002 (antagonista, viz obr. 8A), JMV 2959 (antagonista) a JMV 2810 (částečný agonista). Tyto tři látky významně potlačovaly orexigenní účinek ghrelinu na příjem potravy po podání do mozku u štíhlých potkanů. Navíc jednorázové centrální podání těchto látek způsobilo potlačení příjmu potravy u štíhlých hladových potkanů. Není ale známo, zda tyto látky prochází z periferie do mozku a zda by jejich periferní podání mělo podobný vliv na příjem potravy jako centrální podání [99]. Dlouhodobé (po dobu 14 dnů)

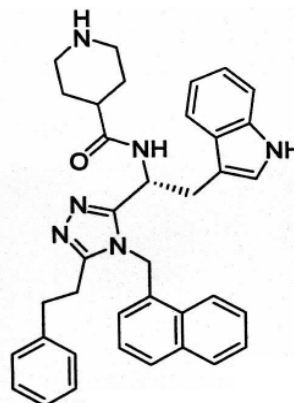


společné podávání JMV 2959 s ghrelinem snížilo tělesnou hmotnost u štíhlých potkanů [100]. *In vivo* JMV 3002 snížil příjem potravy vyvolaný hexarelinem u sytých potkanů [101]. Další nepeptidová látka z laboratoře prof. Martineze je JMV 3414 (obr. 8B). Tato látka se *in vivo* jevila jako antagonistu receptoru GHS-R1a, když potlačila příjem potravy u myši po perorálním podání (Fehrentz JA, Martinez J a kol. – doposud nepublikované výsledky).

A)



B)



**Obr. 8. Struktury některých nepeptidových antagonistů receptoru GHS-R1a:**

**A) JMV 3002 [101]; B) JMV 3414.**

#### 1.4.2.1.3. Inverzní agonisté receptoru GHS-R1a

Receptor GHS-R1a má jednu z nejsilnějších známých konstitutivních aktivit. Hladiny ghrelinu v krvi jsou zvýšené těsně před jídlem, po jídle klesají a asi hodinu po jídle se zase zvýší, a tak je organismus připraven přijímat další stravu. Přítomnost inverzního agonisty může způsobit, že dojde k poklesu konstitutivní aktivity receptoru GHS-R1a, a tak nemáme potřebu pojídat další jídla mezi hlavními jídly. Navíc inverzní agonista může zvýšit citlivost k anorexigenním hormonům, např. k leptinu a inzulinu, a tak dojde k snížení příjmu potravy. Inverzní agonisté tak mohou sloužit jako potenciální terapeutika pro léčbu obezity [84, 102].

Substance P je peptid o 11 aminokyselinách, který vyvolává bolest, stres a úzkost [103]. Působí přes receptor NK1R. Substance P a její receptor se nacházejí v mozkových oblastech,

kteří řídí naše emoce (např. v hypotalamu, amygdale) [103]. Substance P je předmětem zájmu farmaceutického průmyslu, neboť existuje snaha nalézt látky potlačující její účinky, tedy antagonisty receptoru NK1R, kteří by působili jako analgetika a antidepresiva. Byly navrženy různé analogy substance P s antagonistickými účinky [84]. Nejlépe popsány je SPa, jehož aminokyselinová sekvence je uvedena v tab. 3. Tento antagonist se váže na receptor GHS-R1a [84], NK1R [104] a receptor pro bombesin [105]. Z toho vyplývá, že tento antagonist je nespecifický a tato vlastnost je jeho největší nevýhodou. Je znám více jako inverzní agonista receptoru GHS-R1a než antagonist. *In vitro* SPa významně potlačoval konstitutivní aktivitu receptoru GHS-R1a v buňkách CHO s transfektovaným lidským receptorem GHS-R1a, ale nikoliv v potkaních hypofyzárních tumorových buňkách RC-4B/C [94] a dále inhiboval ghrelinem vyvolanou fosforylaci ERK 1/2 v buňkách HEK 293 s transfektovaným lidským receptorem GHS-R1a [95]. *In vivo* po nitrobřišním podání snižoval krátkodobě příjem potravy u štíhlých myší [96]. Po dlouhodobém (po dobu 6 dnů) podávání SPa do mozku došlo k snížení tělesné hmotnosti a příjmu potravy u štíhlých potkanů [106]. Účinkem SPa byla potlačena exprese orexigenního NPY v hypotalamu [106]. Byly popsány také účinky antagonisty receptoru NK1R CJ 012,255, který potlačoval příjem potravy a snižoval tělesnou hmotnost u myší s nedostatkem leptinu, *ob/ob* myší, a myší, jejichž obezita byla vyvolaná vysokotučnou stravou [107].

### 1.4.3. Vzájemný vztah estradiolu a adipokinů a ghrelinu

Přítomnost receptorů pro pohlavní hormony v bílé tukové tkáni nabízí možnost, že pohlavní hormony mohou řídit sekreci a/nebo expresi adipokinů.

Je evidentní, že rozdíly mezi pohlavími v citlivosti na leptin a inzulin souvisejí s množstvím tuku v organismu. Je známo, že potkaní samci jsou citlivější na katabolické účinky inzulinu v mozku, zatímco potkaní samice jsou citlivější na centrální katabolické účinky leptinu [36, 108].

Nedostatek E2 (u ovariektomovaných hlodavců a postmenopauzálních žen) způsobuje centrální rezistenci k leptinu [109]. V souladu s tím periferně nebo centrálně podávaný E2 buď potkaním samcům nebo ovariektomovaným samicím zvyšoval citlivost na leptin v mozku [36, 110]. Dále je známo, že estrogen zvyšuje fosforylaci STAT vyvolanou leptinem. To naznačuje, že signalizační dráha využívající aktivaci STAT je aktivována estrogenem a leptinem [109].

Hladiny adiponektinu v krvi jsou vyšší u žen než u mužů [53, 111]. Na druhou stranu je známo, že podání estrogenu potlačuje hladiny adiponektinu u ovariektomovaných myší [112].

Hladiny mRNA pro rezistin jsou potlačovány estrogenem [113]. Hladiny rezistinu v krvi jsou sníženy u ovariektomovaných myší ve srovnání s neovariektomovanými (tj. s funkčními vaječníky) [114].

Účinky ghrelinu jsou stimulovány při nízké hladině E2, tj. u samců a ovariektomovaných samic, a naopak dodání E2 vede k potlačení orexigenních účinků ghrelinu. To naznačuje, že se ghrelin podílí na vzrůstu hmotnosti po ovariektomii [115]. Na druhou stranu, ovariektomie neměla vliv na expresi a produkci ghrelinu v žaludku, které naopak estrogen zvyšuje [116].

## 1.5. ZVÍŘATA JAKO BIOLOGICKÝ MODEL

Obecně hrají experimentální laboratorní zvířata důležitou roli při studiu lidských onemocnění a účinků látek. Při studiu příčin obezity jsou vhodnými modelovými organismy myši a potkani.

Laboratorní zvířata rozlišujeme na dva typy: **geneticky definovaná (izogenní) a geneticky nedefinovaná (neizogenní)**. Mezi geneticky definovaná zvířata patří mimo jiné **kmen inbrední**, který vzniká jako produkt příbuzenské plemenitby mezi bratry a sestrami po více než 20 generací. U inbredních kmenů je genetická totožnost všech jedinců. Mezi neizogenní zvířata patří **outbrední linie** vzniklá pářením zvířat geneticky heterogenních s cílem minimální možností příbuzenské plemenitby [117].

### 1.5.1. Model myší obezity: Obezita vyvolaná vysokotučnou dietou

V této práci je výraz „dieta“ používán ve významu „strava“ případně „potrava“ a nikoliv ve smyslu „redukční dieta“.

Obezita vyvolaná vysokotučnou dietou (z anglického výrazu „Diet Induced Obesity“, dále jen zkratka DIO) u hlodavců je velmi podobná lidské obezitě. Myši se stanou obézními po dlouhodobém krmení potravou se zvýšeným obsahem tuku.

Dlouhodobá konzumace vysokotučné diety způsobí rezistenci k leptinu a inzulinu. Hladiny leptinu jsou přímo úměrné obsahu tuku v organismu. Obézní lidé a hlodavci mají vysoké hladiny leptinu v krvi a jsou necitliví na účinky leptinu. Dochází u nich k poruše regulačních účinků leptinu (pravděpodobně na úrovni signalizace leptinových receptorů do buňky) [47, 49].

Obezita navozená vysokotučnou dietou je závislá na typu zvířecího kmene, délkou a skladbou vysokotučné stravy. Některé zvířecí kmeny jsou obzvláště náchylné k vysokotučné dietě. Jsou to např. potkani Wistar a Sprague-Dawley nebo myši z kmene AKR/J, SWR/J a C57BL/6 [118, 119]. Tyto zvířecí kmeny jsou vhodné pro studium obezity. Dlouhodobým krmením vysokotučnou dietou dochází k vzrůstu produkce leptinu a k periferní leptinové rezistenci, tj. ačkoliv jsou hladiny leptinu v periférii vysoké, mozek nedostává signál, který by vedl ke snížení příjmu potravy a vysokotučnou dietu kompenzoval [46]. Je známo, že potrava obsahující větší množství živočišného tuku nebo rostlinného oleje přispívá k vývoji obezity [120, 121].

## 2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

- **Charakterizace modelu obezity u myši: Obezita vyvolaná vysokotučnou dietou**

Model obezity vyvolané vysokotučnou dietou je vhodný pro studium lidské obezity obecně, neboť tyto myši se stanou obézními po dlouhodobém krmení potravou se zvýšeným obsahem tuku. Jedním z cílů této práce bylo zavést takový model obezity, charakterizovat jej a nakonec vybrat vhodný myší kmen pro další experimenty *in vivo* na příjem potravy.

- **Charakterizace modelu obézních myších samic:**

- **Ovariektomované myší samice na vysokotučné dietě**

Model ovariektomovaných myších samic na vysokotučné dietě je podobný lidské obezitě při nedostatku estrogenu, což je stav běžný u žen po menopauze. V tomto případě byl cílem práce studovat vliv vysokotučné diety a estradiolu na metabolické parametry u ovariektomovaných samic. Dále jsme vyslovili hypotézu, že citlivost k leptinu, významnému regulátoru příjmu potravy, může být narušena ovariektomií a/nebo vysokotučnou dietou. Dalším cílem tedy bylo studovat citlivost k centrálně podávanému leptinu u ovariektomovaných samic s náhradou estradiolu a bez estradiolu.

- **Studium vlivu antagonistů receptoru ghrelinu na příjem potravy u obézních ovariektomovaných myších samic**

Účinek ghrelinu, tzv. hormonu hladu, je zvýšený u ovariektomovaných samic. Antagonisté nebo inverzní agonisté receptoru ghrelinu, kteří blokují účinky ghrelinu, mohou snížit příjem potravy a tělesnou hmotnost. Vyslovili jsme proto hypotézu, že tyto látky mohou být zvláště účinné u ovariektomovaných samic. Cílem práce bylo studovat krátkodobý vliv antagonistů a inverzního agonisty receptoru ghrelinu na příjem potravy u ničím nedotčených myších samic na standardní dietě, neúčinnější látky pak studovat krátkodobě na příjem potravy u ovariektomovaných myších samic na standardní a vysokotučné dietě, a na základě těchto výsledků vybrat vhodné antagonisty nebo inverzního agonistu receptoru ghrelinu pro studium jejich dlouhodobého účinku na příjem potravy a metabolické parametry u ovariektomovaných samic, krmených standardní nebo vysokotučnou dietou, s nebo bez dodání estradiolu.

### 3. MATERIÁL

#### Chemikálie

- 17 $\beta$ -estradiol-3-benzoát Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Fyziologický roztok Fresenius Kabi (Infusi), Hořátev, ČR
- Dimetylsulfoxid Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Duracrol Spofa - Dental, ČR
- Ketamin, xylazin Spofa, ČR

#### Testované látky

- leptin Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 Syntetizován v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i., Praha, ČR
- [D-Arg<sup>1</sup>, D-Phe<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>]substance P Syntetizován v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i., Praha, ČR
- JMV 1843, JMV3002 a JMV 3414 Dar od prof. Martinezze, Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier, Francie

#### Laboratorní zvířata

- Outbrední linie NMRI Bio Test s. r. o., Konárovice, ČR
- Inbrední kmen C57BL/6 Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky, v.v.i., Praha, ČR
- Velaz s. r. o., Koleč, ČR
- AnLab, Praha, ČR

#### Dieta pro laboratorní zvířata

- Standardní dieta St-1 Mlýn Kocanda, Jesenice, ČR

#### Kity

- ELISA kit BioVendor, Brno, ČR
- na stanovení myšního rezistinu
- ELISA kit Linco Research, St. Charles, MI, USA
- na stanovení myšního leptinu
- RIA kity Linco Research, St. Charles, MI, USA
- na stanovení myšního inzulinu a adiponektinu
- Kit na stanovení triglyceridů Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

#### Přístroje a programy

- Glukometr Glucocard Arkray, Kyoto, Japonsko
- TSE VideoMot 2 TSE Systems, Bad Homburg, Německo
- Graph-Pad Prism 5 San Diego, CA, USA
- Kryomikrotom CM1900 Leica, Brno, ČR

## **4. METODY**

### **4.1. ZAVEDENÍ MODELU OBEZITY VYVOLANÉ VYSOKOTUČNOU DIETOU U MYŠÍ**

#### **4.1.1. Experimentální zvířata a diety**

Model DIO (viz kapitolu 1.5.1.) byl zaveden u outbredních NMRI (Bio Test s. r. o., Konárovice, ČR) a inbredních C57BL/6 (Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky, v.v.i., Praha, ČR) myších samců a samic. Zvířata byla chována v akreditovaném zvěřinci Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i. při teplotě  $22 \pm 2$  °C, měla volný přístup k potravě i pití a rytmus světlo/tma byl 12/12 hodin. Se zvířaty bylo zacházeno podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.).

Myši konzumovaly vysokotučnou dietu (dále jen HF dieta; zkratka HF pochází z anglického výrazu od slova „high fat“) od 7. do 22. týdne věku (do 7. týdne věku byly na standardní dietě; dále jen námi zavedená zkratka St dieta). HF dieta obsahovala 13 % proteinů, 27 % sacharidů a 60 % tuků [120]. Byla složena ze 40 % St-1, 34 % sunaru, 25 % slunečnicového oleje a 1 % kukuřičného škrobu. Energetická hodnota HF diety byla 5,3 kcal/g [120]. I u těchto myší byl pravidelně jednou týdně sledován jejich příjem potravy a hmotnost od 6. do 22. týdne věku.

Jako kontrolní myši nám sloužily oba výše zmíněné kmeny krmené St dietou St-1. St dieta obsahovala 25 % proteinů, 66 % sacharidů a 9 % tuků. Energetická hodnota St diety byla 3,4 kcal/g. Hmotnost myší a příjem potravy byly sledovány pravidelně jednou týdně od 6. do 22. týdne věku.

#### **4.1.2. Charakterizace modelu**

Pro charakterizaci modelu byly odebrány některé orgány a v séru byly stanoveny některé důležité biochemické parametry (viz dále). Před odebráním orgánů a krve byly myši syté. Ráno byly myši usmrceny cervikální dislokací a byla jim odebrána krev. Z celé krve bylo po oddělení krevního koláče získáno sérum (centrifugací 3000 x g, 15 minut při 10 °C), které bylo uchováno při – 20 °C.

Z myší byl odebrán tuk: nitrobřišní, gonadální (kolem pohlavních orgánů) a podkožní. Tuk byl spojen a zvážen.

V séru myší byly stanoveny hladiny leptinu, inzulinu a glukosy. Koncentrace leptinu byly měřeny pomocí ELISA kitu a koncentrace inzulinu pomocí RIA kitu. Hladina glukosy byla změřena glukometrem.

## **4.2. ZAVEDENÍ MODELU OVARIIEKTOMOVANÝCH MYŠÍCH SAMIC NA VYSOKOTUČNÉ DIETĚ**

### **4.2.1. Experimentální zvířata a diety**

Tento model byl zaveden u inbredních myších samic z kmene C57BL/6 (Velaz s.r.o., Koleč, ČR). Zvířata byla chována v akreditovaném zvěřinci Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i. podle výše popsaných podmínek (viz kapitulu 4.1.1.). Všechny myši byly v tomto případě ovariektomované (dále jen námi zavedená zkratka OVX). Polovina OVX samic byla krmena St dietou (viz odstavec 4.1.1.) a druhá polovina HF dietou (viz odstavec 4.1.1. pouze s tím rozdílem, že místo 25 % slunečnicového oleje bylo v této dietě obsaženo 25 % prasečího sádla). OVX samice konzumovaly HF dietu od 8. do 27. týdne věku (do 8. týdne věku byly na St dietě). Příjem potravy a hmotnost všech myší byly sledovány pravidelně jednou týdně od 6. do 27. týdne věku. Před pokusem na příjem potravy byla vyřazena nejlehčí třetina OVX samic na HF dietě.

### **4.2.2. Ovariektomie a dodání estradiolu**

V 5. týdnu věku byly myši ovariektomované (oba vaječníky byly odebrány) podle Gearyho a kol. [122]. Myši byly během operace v anestezii (nitrobřišní injekce ketaminu/xylazinu: 100 mg/kg ketaminu, 16 mg/kg xylazinu).

Polovině OVX myším na St dietě a polovině OVX myším na HF dietě byl podkožně (subkutánně, dále jen SC) podáván E2 ve formě 17 $\beta$ -estradiol-3-benzoátu v dávce 8  $\mu$ g/myš (rozpuštěný v sezamovém oleji) každé 4 dny, 1 měsíc před pokusem na příjem potravy [110], tj. před podáním leptinu (viz níže).

Pro charakterizaci modelu byly zavedeny čtyři skupiny myší:

**OVX/St:** OVX samice na St dietě

**OVX/HF:** OVX samice na HF dietě

**OVX/St + E2:** OVX samice na St dietě s náhradou E2

**OVX/HF + E2:** OVX samice na HF dietě s náhradou E2



#### **4.2.3. Odběr krve/séra a orgánů**

Ve 27. týdnu věku ráno syté OVX samice byly usmrceny cervikální dislokací a byla jim odebrána krev. Z celé krve bylo získáno sérum stejným způsobem, jak je to popsáno v kapitole 4.1.2.

Z OVX samic byl odebrán tuk: nitrobřišní, gonadální (kolem pohlavních orgánů) a podkožní. Tuk byl spojen a zvážen.

#### **4.2.4. Stanovení biochemických parametrů v séru**

V krevním séru OVX samic byly stanoveny hladiny inzulínu a adiponektinu pomocí RIA kitu; koncentrace leptinu a rezistinu pomocí ELISA kitu; hladiny glukosy byly měřeny glukometrem a koncentrace triglyceridů kvantitativní enzymatickou reakcí.

### **4.3. VLIV VYSOKOTUČNÉ DIETY A ESTRADIOLU NA CENTRÁLNÍ ÚČINKY LEPTINU U OVARIKTOMOVANÝCH SAMIC**

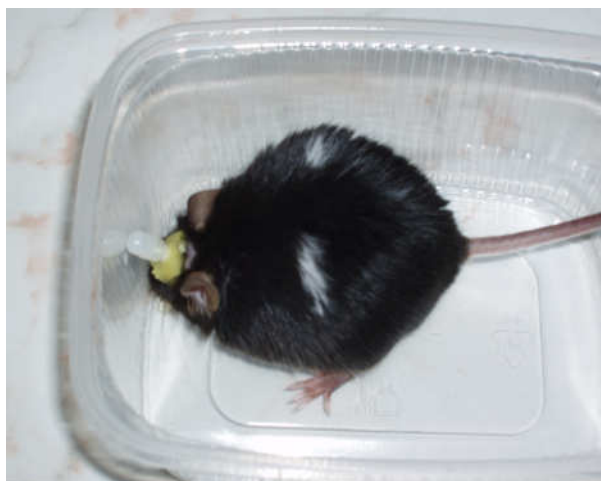
#### **4.3.1. Stanovení příjmu potravy**

Rezistence k leptinu je v literatuře dobře popsána zejména u myších samců, proto byl nejprve proveden pokus na příjem potravy po podání leptinu myším samcům z kmene C57BL/6 (Velaz s.r.o., Koleč, ČR) na St a HF dietě. Samci byli chováni v akreditovaném zvěřinci Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i. Polovina samců byla krmena St dietou (viz odstavec 4.1.1.) a druhá polovina HF dietou (obsah HF diety byl stejný jako v kapitole 4.2.1.). Samci konzumovali HF dietu od 8. do 25. týdne věku (do 8. týdne věku byli na St dietě). Před pokusem na příjem potravy, samci byli charakterizováni: jejich příjem potravy a hmotnost byly sledovány jednou týdně od 6. do 25. týdne věku, ve 25. týdnu věku byli sytí samci usmrceni cervikální dislokací a byl jim odebrán a zvážen tuk (nitrobřišní, gonadální (kolem pohlavních orgánů) a podkožní) a v jejich séru byly stanoveny hladiny glukosy a inzulínu.

Leptin byl podáván samcům na St a HF dietě ve 25. týdnu věku intracerebroventrikulárně (dále jen ICV) do 3V. Zavedení ICV kanyl se provádělo podle Maletínské a kol. [123]. Myši byly během operace v anestezii (nitrobřišní injekce ketaminu/xylazinu: 100 mg/kg ketaminu, 16 mg/kg xylazinu). Hlava myši byla fixovaná ve stereotaxickém přístroji a vnitřní kanyla (Roanoke, VA, USA) se zavedla do třetí mozkové komory (AP (*anterior posterior* neboli

předoždní) 2 mm od bregmy, V (vertikální) 3 mm). Kanyla byla zalita dentální polymetakrylátovou pryskyřicí Duracrol. Po ztvrdnutí pryskyřice se vsunula vnější kanyla, aby se zabránilo ucpávání (obr. 9).

Po operaci byly myši týden v klidu a měly volný přístup k potravě a pití. Po tomto období se prováděl pokus na příjem potravy.



*Obr. 9. Myš s kanylou zavedenou do třetí mozkové komory*

V den pokusu na příjem potravy v 18:00 hodin večer bylo sytým samcům injektováno ICV 5  $\mu$ l fyziologického roztoku nebo leptinu (v dávce 5  $\mu$ g/myš [46, 119], rozpuštěn ve fyziologickém roztoku). Celkem bylo 6 – 8 myší/skupinu. Myším byla poté podána předem zvážená potrava a odečet příjmu potravy a hmotnosti myší se prováděl po 12, 24 a 36 hodin po injekci. Během celého pokusu měly myši volný přístup k vodě. Pro pokus na příjem potravy u samců byly zavedeny dvě skupiny myší:

**samci/St:** samci na St dietě

**samci/HF:** samci na HF dietě

U OVX myších samic z kmene C57BL/6 (Velaz s.r.o., Koleč, ČR; byly chovány v akreditovaném zvěřinci Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i.) byl leptin podáván stejným způsobem jako samcům. OVX samice byly staré 26 týdnů.

Pro pokus na příjem potravy u OVX samicím byly zavedeny čtyři skupiny myší:

**OVX/St:** OVX samice na St dietě

**OVX/HF:** OVX samice na HF dietě

**OVX/St + E2:** OVX samice na St dietě s náhradou E2

**OVX/HF + E2:** OVX samice na HF dietě s náhradou E2

Ovariektomie byla provedena v 5. týdnu věku myší a E2 byl podáván stejným způsobem jak je to popsáno v kapitole 4.2.2. Podmínky pro HF dietu (druh, začátek a konec potravy) byly stejné jako v kapitole 4.2.1.

V den pokusu na příjem potravy v 18:00 hodin večer bylo sycím samicím injektováno ICV 5  $\mu$ l fyziologického roztoku nebo leptinu (v dávce 5  $\mu$ g/myš, rozpuštěn ve fyziologickém roztoku). Celkem bylo 6 – 8 myší/skupinu. Po injekci byly provedeny vaginální výtěry pro zjištění fáze estrálního cyklu u myší. Myším byla poté podána předem zvážená potrava a odečet příjmu potravy a hmotnosti myší se prováděl po 12, 24 a 36 hodin po injekci. Během celého pokusu měly myši volný přístup k vodě.

Po pokusu na příjem potravy byly odebrány mozky myší na kontrolu, zda byly kanyly skutečně zavedeny do třetí mozkové komory. Mozky byly nakrájené na kryomikrotomu a řezy mozků o tloušťce 20-30  $\mu$ m byly barveny kresylovou violetí. Tuto část metodiky provedla RNDr. Renata Haugvicová, CSc.

#### **4.4. Vliv antagonistů a inverzního agonisty receptoru GHS-R1a na příjem potravy u obézních ovariektomovaných samic**

##### **4.4.1. Test krátkodobého příjmu potravy**

###### **1) Vliv antagonistů na účinek agonisty**

Pro tento pokus sloužily ničím nedotčené (dále jen naivní) samice z kmene C57BL/6 (AnLab, Praha ČR) na St dietě. Myši byly chovány v akreditovaném zvěřinci Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky, v.v.i. Byl zkoumán účinek peptidového (Tyr-Ala-GHRP-6) a nepeptidového (JMV 1843) agonisty receptoru GHS-R1a na příjem potravy. Jako peptidoví antagonisté receptoru GHS-R1a byli testováni [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a SPa a jako nepeptidoví JMV 3002 a JMV 3414. Peptidoví antagonisté receptoru GHS-R1a byli

syntetizováni v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i. metodou syntézy na pevné fázi. Nepeptidové látky jsme obdrželi jako dar od prof. Martineze z Institut des Biomolécules, Francie. Peptidy, JMV 1843 a JMV 3414 byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku. JMV 3002 je ve vodě nerozpustný. Byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku s 30% DMSO.

Nejprve byl testován krátkodobý účinek samotného agonisty na příjem potravy. Každá myš dostala 0,15 ml buď fyziologického roztoku, nebo Tyr-Ala-GHRP-6 (o dávce 5 mg/kg), nebo JMV 1843 (o dávce 5 mg/kg). Látky byly podávány SC.

Pro vliv antagonistů na účinek agonisty byl vybrán pouze jeden (účinnější) agonista z výše zmíněných: JMV 1843. Myšim byl vždy podáván fyziologický roztok, samotný agonista (JMV 1843) nebo kombinace JMV 1843 a různých dávek antagonisty receptoru GHS-R1a. Všechny látky byly podávány SC a každá myš dostala 0,15 ml příslušné látky. JMV 1843 byl v jedné jediné dávce 5 mg/kg; [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 (antagonista) a SPa (inverzní agonista) byly podávány v dávkách 5 a 10 mg/kg [96]; JMV 3002 (antagonista) v dávkách 80 a 160 µg/kg [101] a JMV 3414 (antagonista) v dávkách 0,1 a 1 mg/kg. Každá dávka byla testována alespoň dvakrát při 6 myších na skupinu.

V den pokusu na příjem potravy byly myši syté (měly volný přístup k potravě). Pokus se prováděl ráno od 8:00 hodin. Pro případné blokování účinku agonisty receptoru GHS-R1a příslušným antagonistou byl nejprve podáván antagonist receptoru GHS-R1a a 10 minut po jeho injekci byl podáván agonista JMV 1843. Po 10 minutách od injekce JMV 1843 se myšim podala předem zvážená potrava a odečet příjmu potravy se prováděl pravidelně po 30 minutách po dobu 5 hodin. Během pokusu měly myši volný přístup k vodě.

## **2) Výběr vhodného antagonisty a/nebo inverzního agonisty pro dlouhodobý test příjmu potravy**

I pro tento pokus sloužily naivní samice z kmene C57BL/6 (AnLab, Praha, ČR) na St dietě. Myši byly chovány v akreditovaném zvěřinci Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky, v.v.i. Z peptidových látek byly testovány [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 (antagonista) a SPa (inverzní agonista) a z nepeptidových JMV 3002 (antagonista) a JMV 3414 (antagonista). Látky byly rozpuštěny stejným způsobem, jak je výše uvedeno.

Myšim byl podáván buď fyziologický roztok, nebo různé dávky antagonisty receptoru GHS-R1a. Všechny látky byly podávány SC a každá myš dostala 0,15 ml příslušné látky. [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a SPa byly podávány v dávkách 5 a 10 mg/kg [96]; JMV 3002 v dávkách

80 a 160 µg/kg [101] a JMV 3414 v dávkách 0,1 a 1 mg/kg. Každá dávka byla testována alespoň dvakrát při 6 myších na skupinu.

V den pokusu na příjem potravy byly myši 17 hodin hladové. Pokus se prováděl ráno od 8:00 hodin. Po 10 minutách od injekce příslušné látky se myším podala předem zvážená potrava a odečet příjmu potravy se prováděl pravidelně po 30 minutách po dobu 5 hodin. Během pokusu měly myši volný přístup k vodě.

Po tomto pokusu na příjem potravy byli neúčinnější antagonisty receptoru GHS-R1a testováni krátkodobě na příjem potravy u OVX myších samic na St (OVX/St) a HF (OVX/HF) dietě stejným způsobem jako u naivních samic na St dietě. Myši byly v době experimentu dva měsíce na příslušné dietě.

#### **4.4.2. Test dlouhodobého příjmu potravy**

Antagonisté receptoru GHS-R1a, kteří statisticky významně snížili příjem potravy krátkodobě, byli vybráni do dlouhodobého pokusu na příjem potravy. Konkrétně to byl peptidový antagonist receptoru GHS-R1a [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a inverzní agonista SPa.

Pro dlouhodobý pokus na příjem potravy byly testovány čtyři skupiny myších samic z kmene C57BL/6 (AnLab, Praha, ČR; byly chovány v akreditovaném zvěřinci Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky, v.v.i.):

**OVX/St:** OVX samice na St dietě

**OVX/HF:** OVX samice na HF dietě

**OVX/St + E2:** OVX samice na St dietě s náhradou E2

**OVX/HF + E2:** OVX samice na HF dietě s náhradou E2

Ovariektomie byla provedena v 8. týdnu věku myší a E2 byl podáván stejným způsobem jak je to popsáno v kapitole 4.2.2. Obsah HF diety byl stejný jako v kapitole 4.2.1. OVX samice konzumovaly HF dietu od 10. týdne věku (do 10. týdne věku byly na St dietě) po dobu zhruba 21 týdnů. Po této době byla u nich pravidelně jednou týdně sledována jejich tělesná hmotnost a příjem potravy. Před dlouhodobým pokusem na příjem potravy byla vyřazena z pokusu nejlehčí třetina OVX samic na HF dietě.

[D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a SPa byly podávány SC 2x denně ráno a večer po 7 dnů, současně byl sledován příjem potravy a hmotnost myší. Myši dostaly SC injekci buď fyziologického roztoku, nebo [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 (v dávce 10 mg/kg), nebo SPa (v dávce 10 mg/kg). Podle hmotnosti myší bylo podáváno 0,1 – 0,2 ml látky/myš. Peptidy byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku. Celkem bylo testováno 10 myší na každou látku.

Pro zjištění, zda peptidoví antagonisté receptoru GHS-R1a mají účinek na příjem potravy, byla zavedena další skupina myší: tzv. párově krmené (přesněji je anglický výraz „pair-fed“, dále tedy jen pair-fed). Skupina pair-fed dostala 2x denně ráno a večer po 7 dnů přesně takové množství potravy, jaké konzumovala skupina myší po injekci [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 nebo SPa v příslušný den dlouhodobého pokusu na příjem potravy. V každé skupině pair-fed [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a pair-fed SPa bylo 5 myší. Jejich příjem potravy a hmotnost byly sledovány 2x denně ráno a večer po 7 dnů. Všechny myši během celého pokusu měly volný přístup k vodě.

#### **4.4.2.1. Odběr krve/séra a orgánů myším po dlouhodobém příjmu potravy**

Po týdnu podání látek ráno byly hladové myši (17 hodin) usmrčeny cervikální dislokací a byla jim odebrána krev, z které bylo získáno sérum stejným způsobem, jak je to popsáno v kapitole 4.1.2.

Z myší byl odebrán tuk: nitrobřišní, gonadální (kolem pohlavních orgánů) a podkožní. Tuk byl spojen a zvážen.

#### **4.4.2.2. Stanovení biochemických parametrů v séru**

V séru myší byly stanoveny plazmatické hladiny inzulínu a adiponektinu pomocí RIA kitu; koncentrace leptinu pomocí ELISA kitu; hladiny glukosy byly měřeny glukometrem a koncentrace triglyceridů kvantitativní enzymatickou reakcí. Index HOMA (Homeostasis Model Assessment), ukazatel rezistence k inzulínu, byl spočítán jako koncentrace glukosy [mmol/l] x koncentrace inzulínu [pmol/l] / 22,5 [124]. Podmínkou pro výpočet indexu HOMA je, že koncentrace glukosy a inzulínu jsou měřeny u hladových zvířat.

#### **4.4.2.3. Stanovení sedativního a analgetického účinku po podání antagonisty**

##### **a inverzního agonisty receptoru GHS-R1a**

Sedativní účinek byl určován pomocí sledování chování myší při zkoumání nového prostředí. Sedativní účinek látek byl testován v přístroji TSE VideoMot 2 podle Maletínské a kol. [125]. Test se nazýval „open field“ (neboli „test volného prostoru“). Myši před pokusem měly volný přístup k potravě i pití. Myši dostaly SC injekce stejných látek o stejných koncentracích jako v dlouhodobém pokusu na příjem potravy, tedy fyziologický roztok, [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 (v dávce 10 mg/kg) a SPa (v dávce 10 mg/kg). Celkem bylo 6 myší/látku. 10 minut po SC injekci byla myš umístěna do malého otevřeného válce a bylo pozorováno její

chování. Byl zaznamenáván počet vztyčení se na zadní nohy („rearing“) při pětiminutovém pozorování.

Pro stanovení analgetického účinku u myši po podání antagonistů GHS-R1a byl používán test tzv. „hot plate“ (neboli test „horké plotny“). K tomu byl použit přístroj TSE VideoMot 2. V tomto případě se testoval práh bolesti u myši umístěné na kovovou destičku vyhřívanou na 53 °C. Myši před pokusem měly volný přístup k potravě i pití. Myši dostaly SC injekce stejných látek o stejných koncentracích jako v dlouhodobém pokusu na příjem potravy, tedy fyziologický roztok, [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 (v dávce 10 mg/kg) a SPa (v dávce 10 mg/kg). Celkem bylo 6 myší/látku. 10 minut po SC injekci byla myš umístěna na destičku do malého otevřeného válce. Byl měřen čas mezi umístěním myši do válce a jejím prvním skokem z destičky. Analgetický účinek se projevil prodlouženým časem skoku.

Pro určení sedativního a analgetického účinku byly použity dvě skupiny myši: neovarietomované (naivní) samice na St dietě a ovariektomované na HF dietě.

#### 4.5. VÝPOČTY A STATISTIKA

Všechny parametry jsou prezentovány v tabulkách a grafech. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány pro zjištění směrodatnosti rozdílů mezi skupinami a jsou uvedeny jako průměrná hodnota ± střední chyba průměru (SEM). Změna hmotnosti myši po podání leptinu vyjadřuje rozdíl mezi hmotnosti myši před podáním leptinu a hmotnosti myši po 12, 24 a 36 hodinách po injekci. Změna hmotnosti myši po podání antagonistů receptoru GHS-R1a vyjadřuje rozdíl mezi hmotnosti myši před podáním antagonistů a hmotnosti myši po 0,5 až 6,5 dne po injekci. Příjem potravy po podání látek je vyjádřen buď v g, nebo kJ. Statistika byla prováděna v programu Graph-Pad buď metodou one-way ANOVA („jednocestnou analýzou rozptylu“), po které následoval Tukey *post hoc* test, nebo two-way ANOVA („dvoucestnou analýzou rozptylu“), po které následoval Bonferroni *post hoc* test. Metodou one-way ANOVA se hodnotil jeden faktor, v případě two-way ANOVA dva faktory. Rozdíly byly považovány za významné, pokud  $P < 0,05$ .

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. CHARAKTERIZACE MODELU OBEZITY VYVOLANÉ VYSOKOTUČNOU DIETOU U MYŠÍ

Výsledky v této kapitole již byly publikovány [126].

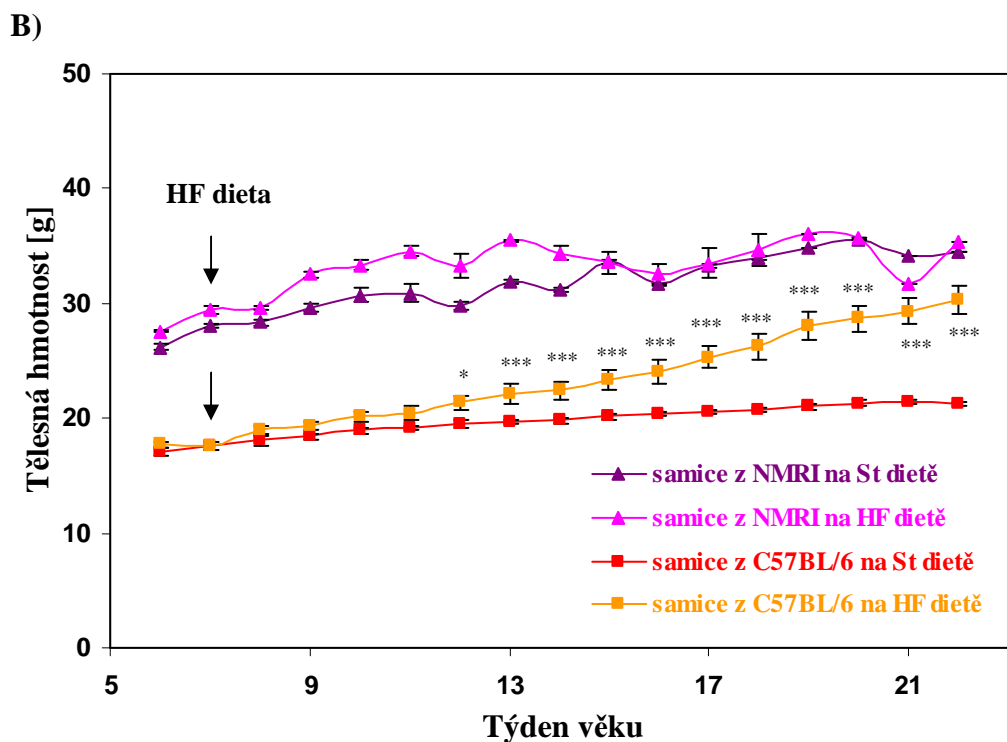
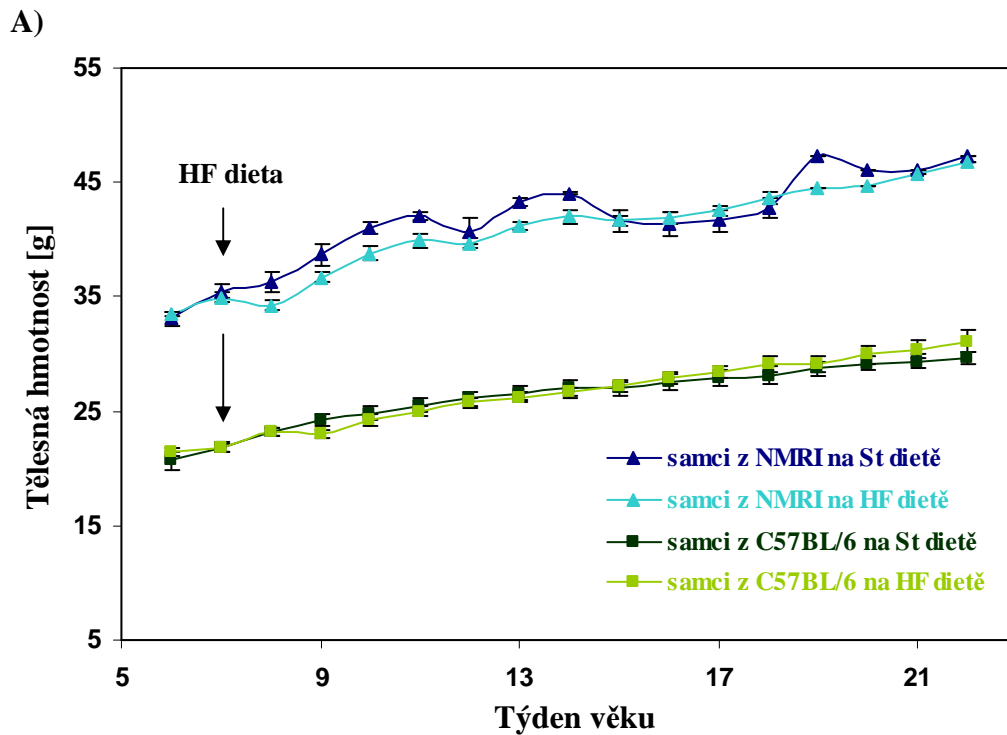
Model DIO byl charakterizován u outbredních NMRI (Bio Test s. r. o., Konárovice, ČR) a inbredních C57BL/6 (Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky, v.v.i., Praha, ČR) myši. Tento model je velmi podobný lidské obezitě, neboť obezita se vyvinula v důsledku HF diety, která obsahovala 60 % tuku. Tyto myši byly po odstavu nejprve na St dietě, která obsahovala 9 % tuku, a od 7. týdne věku byly krmeny HF dietou. Myši na HF dietě byly porovnávány s kontrolními, které byly od odstavu stále na St dietě. Ačkoliv měli samci a samice na HF dietě z linie NMRI a kmene C57BL/6 téměř totožný denní hmotnostní příjem potravy jako jejich kontroly na St dietě, denní energetický příjem měli podstatně vyšší (tab. 4). Tělesná hmotnost samců na HF dietě z linie NMRI a kmene C57BL/6 byla srovnatelná s jejich kontrolami (obr. 10A). Ačkoliv se tělesná hmotnost samic na HF dietě z linie NMRI nelišila od jejich kontrol, samice na HF dietě z kmene C57BL/6 vážily významně více než jejich kontroly (již po 5 týdnech na HF dietě) (obr. 10B).

**Tab. 4. Průměrný denní příjem potravy (g) a odpovídající energie diety (kJ) u myši na HF dietě a jejich příslušných kontrolních myši na St dietě.**

Kmen	Dieta	Samci	Samice
NMRI	St	7,00 ± 0,45 g (99,67 ± 6,74 kJ)	5,82 ± 0,14 g (82,94 ± 2,82 kJ)
	HF	7,34 ± 0,54 g (163,01 ± 8,61 kJ)	4,53 ± 0,16 g (100,68 ± 4,39 kJ)
C57BL6	St	4,07 ± 0,23 g (57,92 ± 1,62 kJ)	3,48 ± 0,14 g (49,62 ± 1,29 kJ)
	HF	3,55 ± 0,27 g (78,82 ± 2,82 kJ)	3,14 ± 0,23 g (69,69 ± 2,96 kJ)

Hodnoty jsou vyjádřeny ve tvaru průměr ± SEM. n = 20 – 25 myši na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (dieta x pohlaví). \*P < 0,05.





**Obr. 10. Tělesná hmotnost myší z linie NMRI a kmene C57BL/6 na St a HF dietě:**  
 A) samci, B) samice.  $n = 20 - 25$  myší na skupinu. Statistika byla provedena v programu two-way ANOVA (dieta  $\times$  týden věku). \* $P < 0,05$  a \*\*\* $P < 0,001$ .

K určení míry obezity byla odebrána bílá tuková tkáň. Z hlediska akumulace tuku je inbrední kmen C57BL/6 náchylnější k obezitě než outbrední linie NMRI, zejména samice z kmene C57BL/6 (tab. 5).

U myší z kmene C57BL/6 byl sledován vliv HF diety na vývoj obezity v průběhu 16 týdnů. Zvýšené množství bílé tukové tkáně u těchto myší bylo pozorováno již v 8. týdnu podávání HF diety. V dalších týdnech diety se množství tuku statisticky významně zvyšovalo: např. ve 12. týdnu krmení HF dietou byly hodnoty tuku vztažené na tělesné hmotnosti:  $3,70 \pm 1,14$  pro samce na St dietě a  $10,76 \pm 2,74$  pro samce na HF dietě;  $2,33 \pm 0,38$  pro samice na St dietě a  $12,04 \pm 4,78$  pro samice na HF dietě,  $P < 0,01$  pro samce a samice). Samice akumulovaly více tuku než samci od začátku podávání diety.

U myší na St a HF dietě z linie NMRI a kmene C57BL/6 byly stanoveny hladiny leptinu, inzulinu a glukosy v séru. Tyto metabolické parametry znázorňuje tab. 5. Samci a samice na HF dietě z kmene C57BL/6 měli statisticky významně zvýšené hladiny leptinu a glukosy v séru ve srovnání s jejich kontrolami na St dietě. Samice na HF dietě z kmene C57BL/6 navíc měly významně zvýšené hladiny inzulinu. Samci a samice na HF dietě z linie NMRI neměli statisticky významně změněné tyto metabolické parametry, pouze samice měly významně vyšší hladiny glukosy v séru než jejich kontroly na St dietě.

**Tab. 5. Metabolické parametry sytých outbredních NMRI a inbredních C57BL/6 myší v 16. týdnu krmení St nebo HF dietou.**

Kmen	Pohlaví	Dieta	Tuk/tělesná hmotnost [%]	Leptin [ng/ml]	Glukosa [mmol/l]	Inzulin [ng/ml]
NMRI	Samci	St	1,74 ± 0,41	0,96 ± 0,19	8,57 ± 0,76	3,07 ± 0,58
		HF	7,63 ± 1,93	4,38 ± 1,56	10,78 ± 0,77	2,34 ± 0,63
	Samice	St	3,47 ± 1,25	1,32 ± 0,22	3,95 ± 0,69	0,84 ± 0,15
		HF	5,40 ± 0,31	2,37 ± 0,30	7,73 ± 0,31	1,15 ± 0,18
C57BL/6	Samci	St	3,09 ± 0,41	1,72 ± 0,39	9,38 ± 0,83	2,16 ± 0,34
		HF	5,93 ± 1,12	4,22 ± 1,17	14,74 ± 0,59	2,68 ± 0,56
	Samice	St	3,63 ± 0,38	3,28 ± 1,06	7,79 ± 0,62	0,83 ± 0,19
		HF	13,10 ± 2,09	8,27 ± 2,41	11,35 ± 0,80	1,82 ± 0,38

Hodnoty jsou vyjádřeny ve tvaru průměr ± SEM. n = 10 – 15 myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (dieta x pohlaví). \*P < 0,05; \*\*P < 0,01 a \*\*\*P < 0,001.

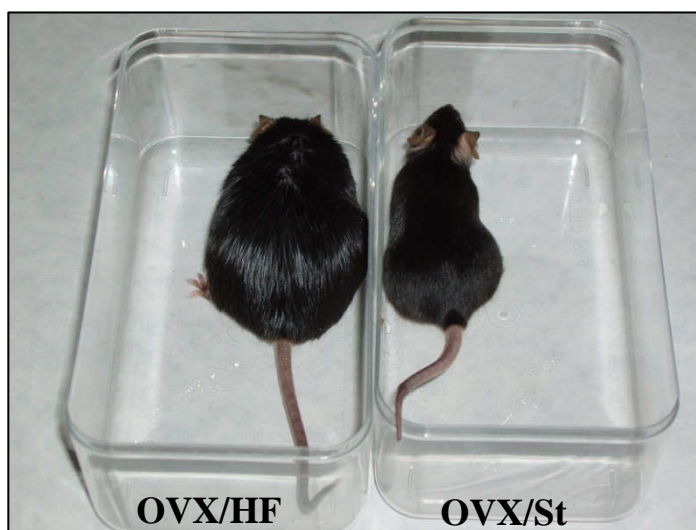
## 5.2. CHARAKTERIZACE MODELU OVARIKTOMOVANÝCH MYŠÍCH SAMIC NA VYSOKOTUČNÉ DIETĚ

Výsledky v této kapitole již byly publikovány [127].

Model OVX myších samic na HF dietě byl charakterizován u inbredních C57BL/6 (Velaz s.r.o., Koleč, ČR) myší (obr. 11). Tento model je podobný ženské lidské obezitě při nedostatku estrogenu a přebytku tuku ve stravě. Obezita se u myší vyvinula v důsledku HF diety, která obsahovala 60 % tuku, a také v důsledku nedostatku estrogenu (myši byly ovariektomované). Tyto myši byly po odstavu nejprve na St dietě, která obsahovala 9 % tuku, a od 8. týdne věku byly krmeny HF dietou po dobu 19 týdnů.

Ačkoliv měly OVX samice na HF dietě statisticky významně snížený denní hmotnostní příjem potravy, jejich denní energetický příjem byl podobný OVX samicím na St dietě (tab. 6). Nicméně statisticky významný nárůst hmotnosti u OVX samic na HF dietě byl pozorován již od 4. týdne krmení HF dietou ve srovnání s OVX samicemi na St dietě (obr. 12). Po 19 týdnech krmení HF dietou OVX samice akumulovaly více než 4x bílé tukové tkáně ve srovnání s OVX samicemi na St dietě (tab. 7).

Dodání E2 po 1 měsíci statisticky významně snížilo denní hmotnostní i energetický příjem u OVX samic na HF (tab. 6). Dále podání E2 snížilo tělesnou hmotnost jak u OVX samic na St dietě, tak i u OVX samic na HF dietě (obr. 12).



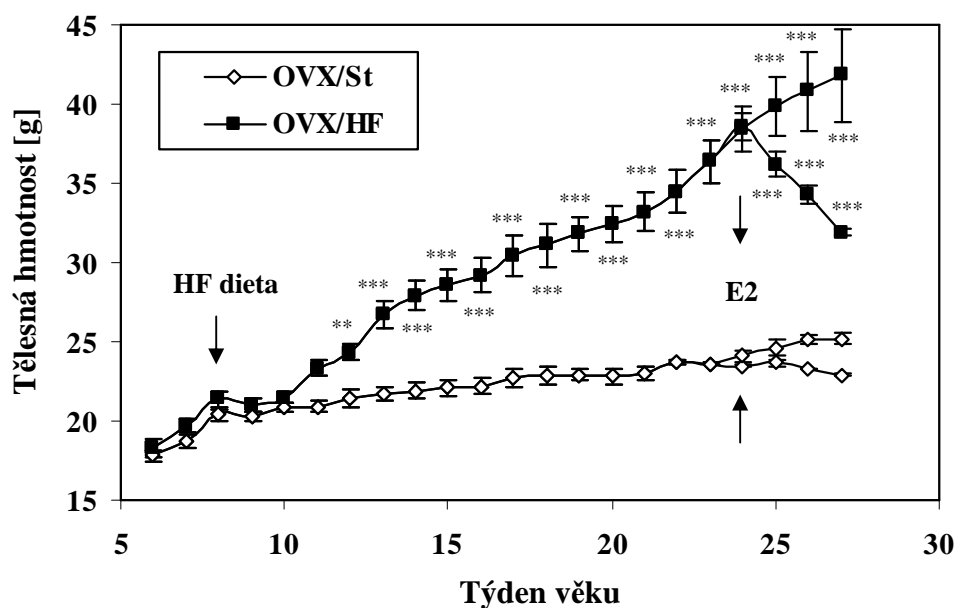
**Obr. 11. Model ovariektomovaných myších samic na St a HF dietě.**

**Samice z kmene C57BL/6.**

**Tab. 6. Průměrný denní příjem potravy (g) a odpovídající energie diety (kJ) u OVX samic na St a HF dietě s náhradou E2 a bez E2**

Skupina	Příjem potravy [g]	Příjem potravy [kJ]
OVX/St	3,20 ± 0,13	45,59 ± 1,87
OVX/HF	2,24 ± 0,05	49,72 ± 1,12
OVX/St + E2	* 2,95 ± 0,12	41,20 ± 2,76
OVX/HF + E2	1,86 ± 0,12	41,96 ± 1,76

Hodnoty jsou vyjádřeny ve tvaru průměr ± SEM. n = 20 myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (dieta x estradiol). \*\*\*P < 0,001.



**Obr. 12. Tělesná hmotnost OVX samic na St a HF dietě s náhradou E2 a bez E2 z kmene C57BL/6. n = 20 myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (dieta x týden věku). \*\*P < 0,01 a \*\*\*P < 0,001.**

U sytých OVX samic na St a HF dietě byly stanoveny hladiny glukosy, inzulinu, leptinu, adiponektinu, rezistinu a triglyceridů v séru. Tyto metabolické parametry jsou znázorněny v tab. 7. OVX samice na HF dietě vykazovaly statisticky významně zvýšené hladiny glukosy, inzulinu a leptinu ve srovnání s OVX samicemi na St dietě. Koncentrace adiponektinu a triglyceridů u OVX samic na HF dietě zůstaly nepozměněné ve srovnání s OVX samicemi na St dietě, ale hladiny rezistinu byly významně sníženy.

Podání E2 statisticky významně snížilo množství tuku a hladiny glukosy, leptinu, adiponektinu a rezistinu u OVX samic na HF dietě ve srovnání s OVX samicemi na HF dietě bez E2. Hladiny inzulinu a triglyceridů byly statisticky nevýznamně sníženy u OVX samic na HF dietě po podání E2 vůči těm bez E2. Všechny OVX samice na HF dietě (s náhradou E2 a bez E2) měly statisticky významně snížené koncentrace rezistinu vůči myším na St dietě.

**Tab. 7. Metabolické parametry OVX samic na St a HF dietě s náhradou E2 a bez E2 po 19 týdnech podávání diety.**

Skupina myši	Tuk/tělesná hmotnost [%]	Glukosa [mmol/l]	Inzulin [ng/ml]	Leptin [ng/ml]	Adiponektin [μg/ml]	Rezistin [ng/ml]	Triglyceridy [mg/dl]
OVX/St	2,59 ± 0,32	5,98 ± 0,18	0,33 ± 0,04	3,35 ± 0,55	22,24 ± 2,34	35,60 ± 4,89	58,20 ± 0,40
OVX/St + E2	1,13 ± 0,09	6,02 ± 0,16	0,86 ± 0,18	2,51 ± 0,54	14,66 ± 2,04	36,85 ± 4,80	66,10 ± 0,37
OVX/HF	11,62 ± 0,66	7,62 ± 0,23	1,33 ± 0,27	17,37 ± 2,58	21,54 ± 1,59	23,06 ± 1,11	70,70 ± 0,47
OVX/HF + E2	3,88 ± 0,73	5,37 ± 0,18	0,79 ± 0,24	2,59 ± 0,59	9,04 ± 1,11	13,34 ± 1,66	68,80 ± 0,34

Hodnoty jsou vyjádřeny ve tvaru průměr ± SEM. n = 6 – 8 myši na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (dieta x estradiol).

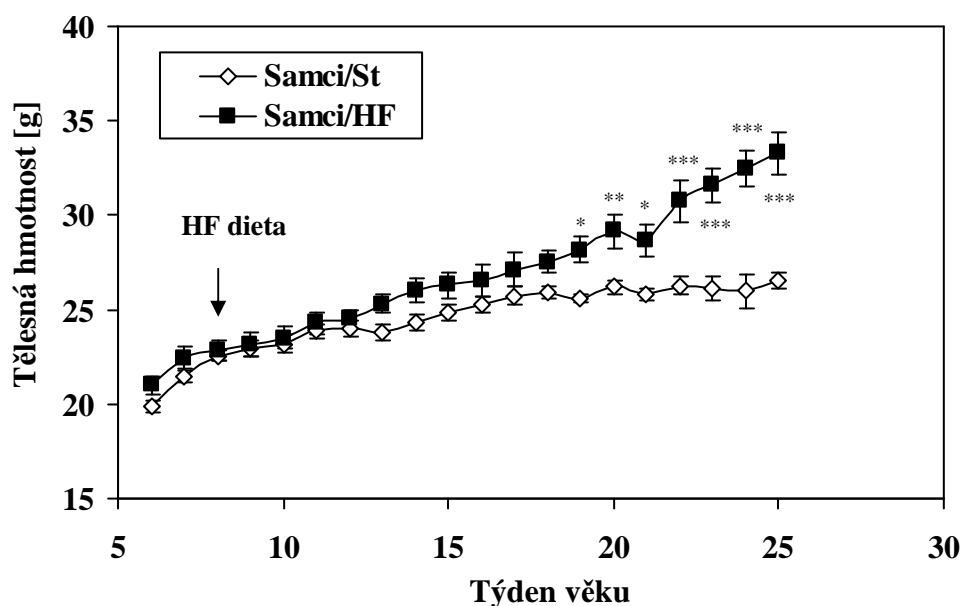
\*P < 0,05; \*\*P < 0,01 a \*\*\*P < 0,001.

### 5.3. VLIV VYSOKOTUČNÉ DIETY A ESTRADIOLU NA CENTRÁLNÍ ÚČINKY LEPTINU U OVARIEKTOMOVANÝCH SAMIC

Výsledky v této kapitole již byly publikovány [127].

Nejprve byl testován účinek leptinu podávaného ICV u samců z inbredního kmene C57BL/6 (Velaz s.r.o., Koleč, ČR) na St a HF dietě pro zopakování výsledků popsanych v literatuře [46, 119] a poté byl testován u OVX samic z kmene C57BL/6 na St a HF dietě s náhradou E2 a bez E2.

Tělesná hmotnost samců na HF dietě byla významně vyšší oproti jejich kontrolám na St dietě po 11 týdnech krmení HF dietou (obr. 13). Ačkoliv měli samci na HF dietě významně snížený denní hmotnostní příjem potravy, akumulovali významně více tuku a jejich příjem energie byl stejný jako jejich kontroly na St dietě (tab. 8). Samci na HF dietě měli statisticky významně zvýšené hladiny glukosy, koncentrace inzulinu byly nevýznamně zvýšené oproti kontrolám na St dietě (tab. 8).



**Obr. 13.** Tělesná hmotnost samců na St a HF dietě z kmene C57BL/6.  $n = 20$  myšů na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (dieta x týden věku).

\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  a \*\*\* $P < 0,001$ .



*Tab. 8. Metabolické parametry samců na St a HF dietě po 17 týdnech podávání diety.*

Dieta	Denní příjem potravy [g]	Denní příjem potravy [kJ]	Tuk/tělesná hmotnost [%]	Glukosa [mmol/l]	Inzulin [ng/ml]
St	3,71 ± 0,08	52,86 ± 1,19	1,25 ± 0,19	5,37 ± 0,35	0,42 ± 0,09
HF	2,34 ± 0,05 ***	52,06 ± 1,03	8,00 ± 0,85 ***	6,73 ± 0,48 *	0,96 ± 0,26

*Hodnoty jsou vyjádřeny ve tvaru průměr ± SEM. n = 6 – 8 myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou one-way ANOVA.*

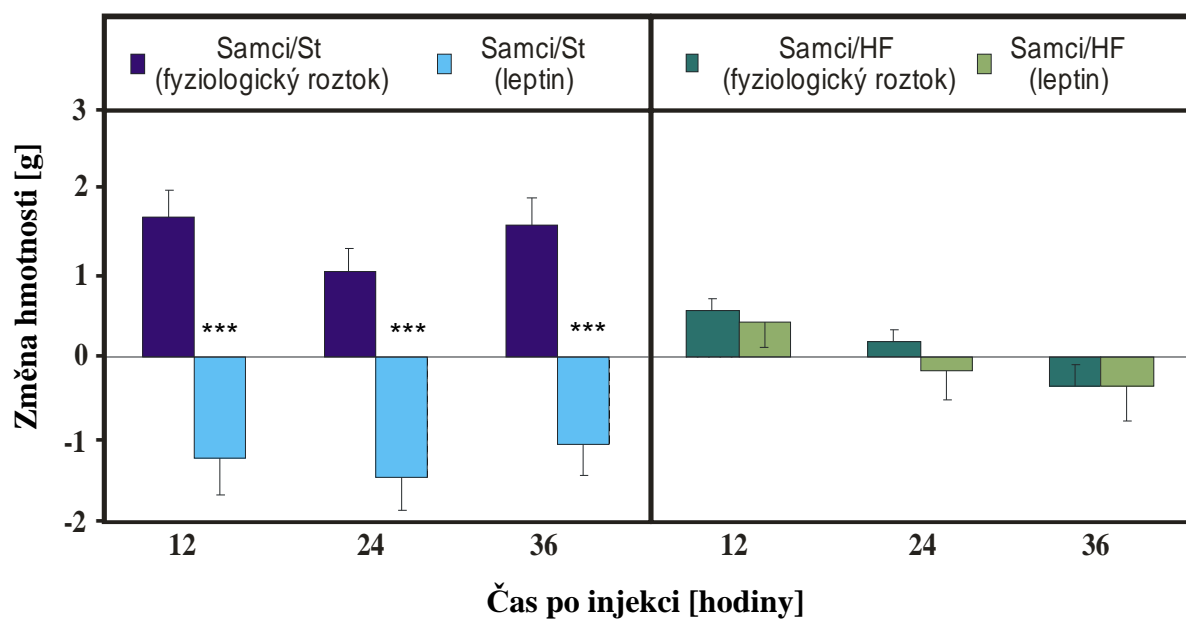
*\*P < 0,05 a \*\*\*P < 0,001 (samci na HF dietě vůči samcům na St dietě).*

Samci na St dietě měli statisticky sníženou tělesnou hmotnost a kumulativní příjem potravy po ICV podání leptinu ve srovnání s fyziologickým roztokem. Pokles hmotnosti a kumulativního příjmu potravy byl patrný po 12 hodinách od injekce a setrval až do 36 hodin po injekci (obr. 14A a 14B). Naproti tomu samci na HF dietě nevykazovali žádný statisticky významný pokles v tělesné hmotnosti ani kumulativním příjmu potravy po podání leptinu, jsou tedy rezistentní na účinky leptinu podávaného ICV (obr. 14A a 14B).

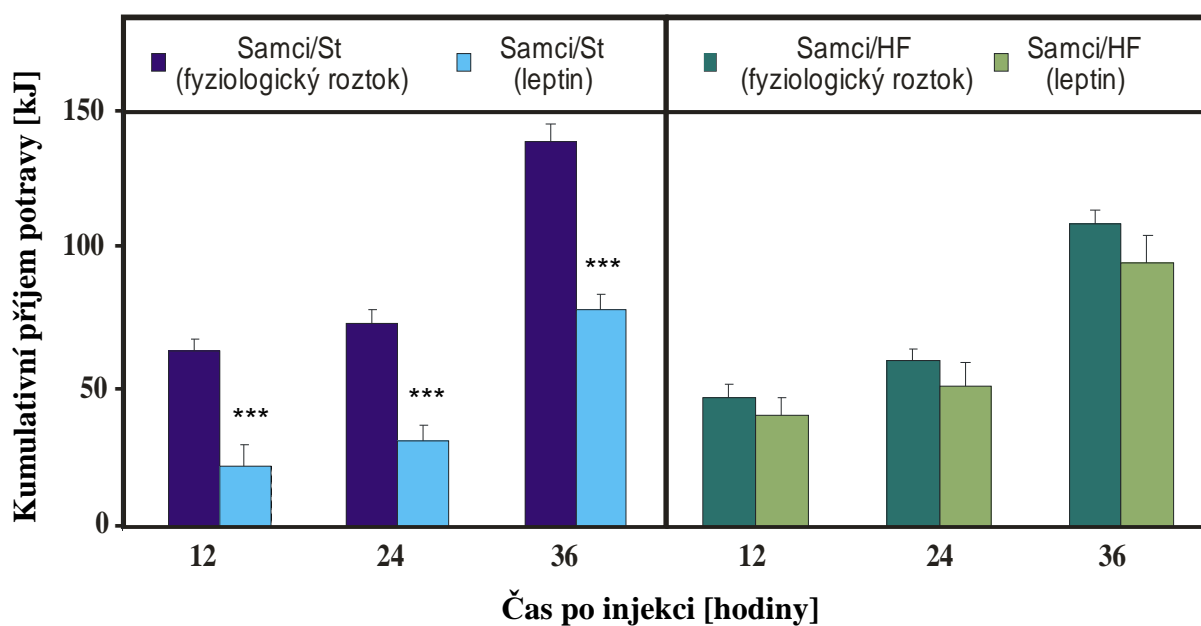
OVX samice na St dietě měly statisticky významně sníženou tělesnou hmotnost po ICV podání leptinu ve srovnání s podáním fyziologického roztoku po 12, 24 a 36 hodinách po injekci (obr. 15A). Jejich kumulativní příjem potravy byl statisticky významně snížen po podání leptinu oproti podání fyziologického roztoku až po 36 hodinách po injekci (obr. 16A). Podání E2 OVX samicím na St dietě zvýšilo citlivost na účinky leptinu podávaného ICV zejména co se týká příjmu potravy, který byl statisticky významně snížený již po 12 hodinách po injekci ve srovnání se samicemi bez E2 (obr. 15B a 16B).

Na rozdíl od OVX samic na St dietě OVX samice na HF dietě měly sice tendenci k poklesu hmotnosti a kumulativního příjmu potravy po ICV podání leptinu, ale tento pokles nebyl statisticky významný ve srovnání s účinkem fyziologického roztoku (obr. 15A a 16A), projevila se tedy u nich rezistence k leptinu podávaného ICV. Naproti tomu dodání E2 navrátilo citlivost k leptinu u OVX samic na HF dietě: OVX samice na HF dietě s náhradou E2 měly statisticky významně sníženou tělesnou hmotnost (po 12, 24 a 36 hodinách po injekci) a kumulativní příjem potravy (po 36 hodinách od injekce) ve srovnání s fyziologickým roztokem (obr. 15B a 16B).

A)

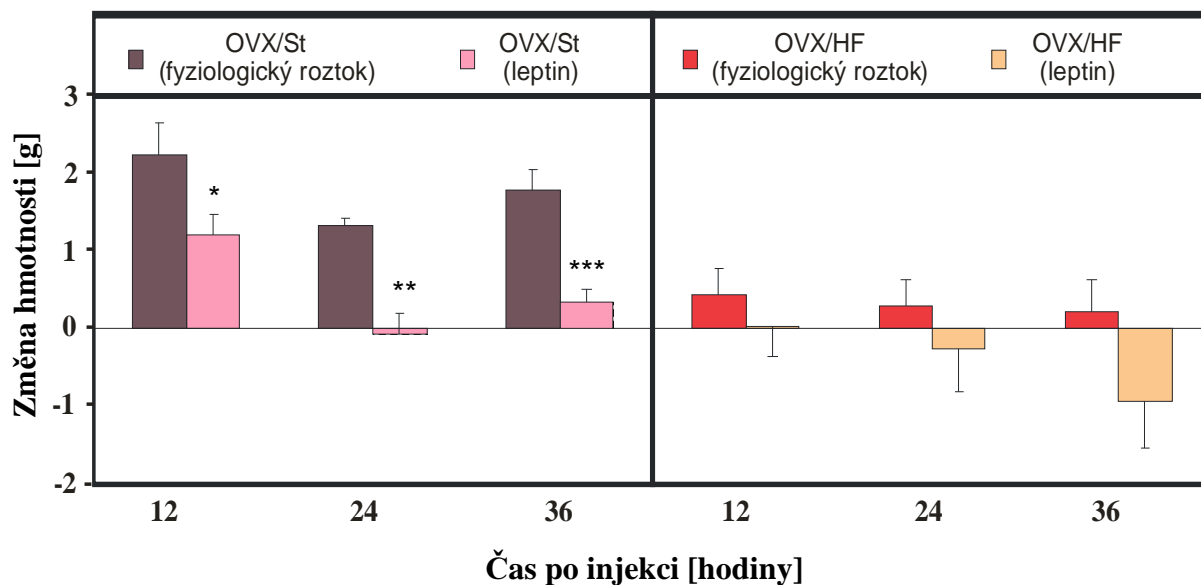


B)

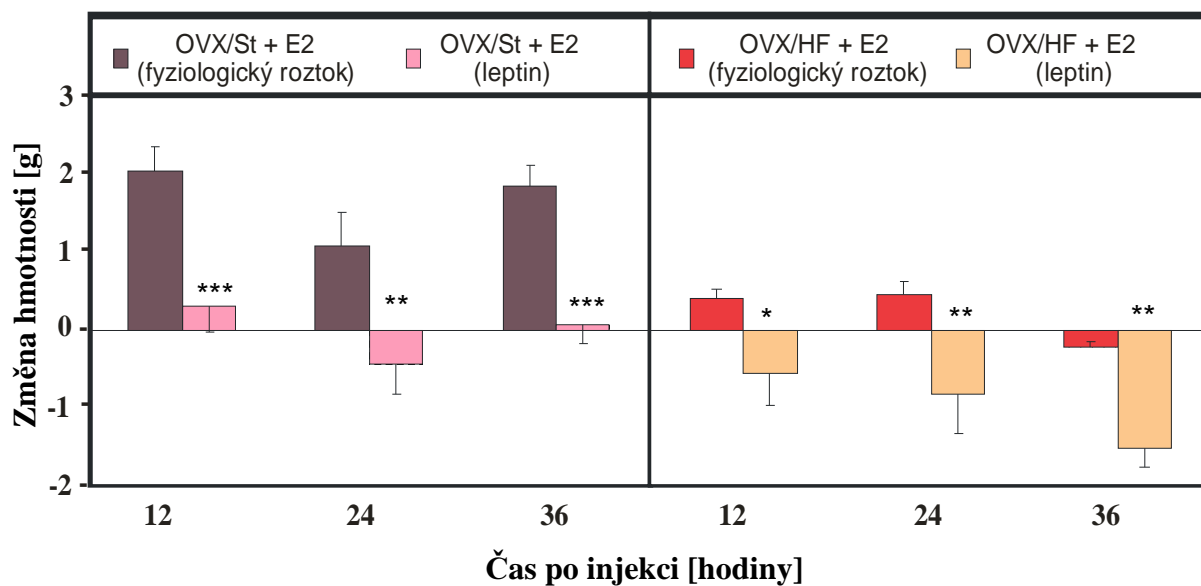


**Obr. 14.** Vliv leptinu podávaného ICV na: A) hmotnost myších samců na St a HF dietě, B) kumulativní příjem potravy myších samců na St a HF dietě.  $n = 6 - 8$  myši na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (látka x čas po injekci). \*\*\* $P < 0,001$ .

A)

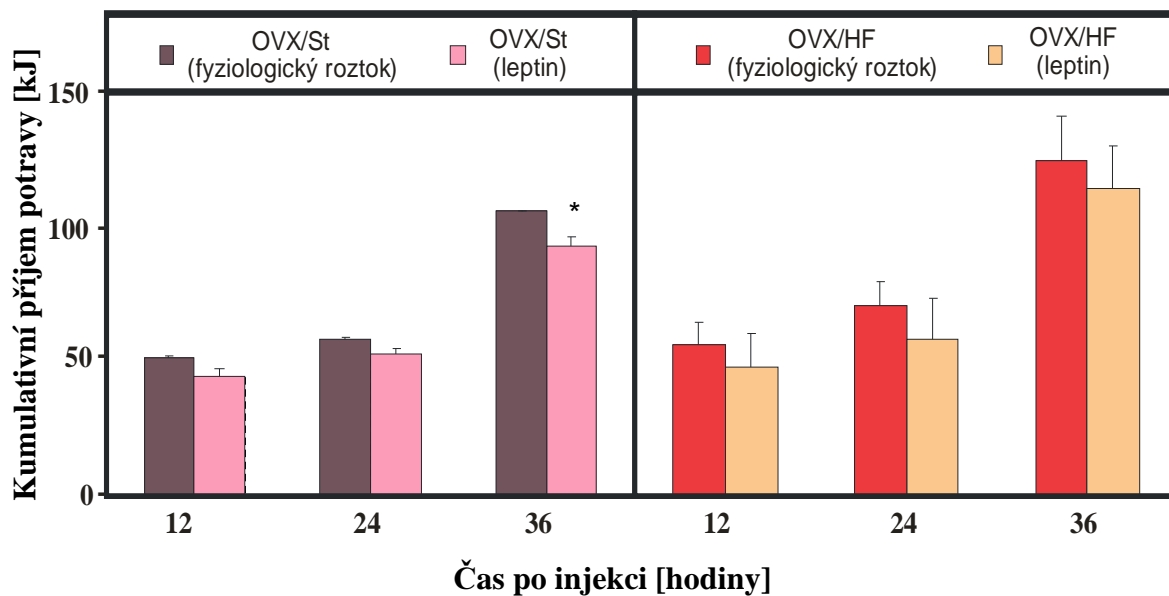


B)

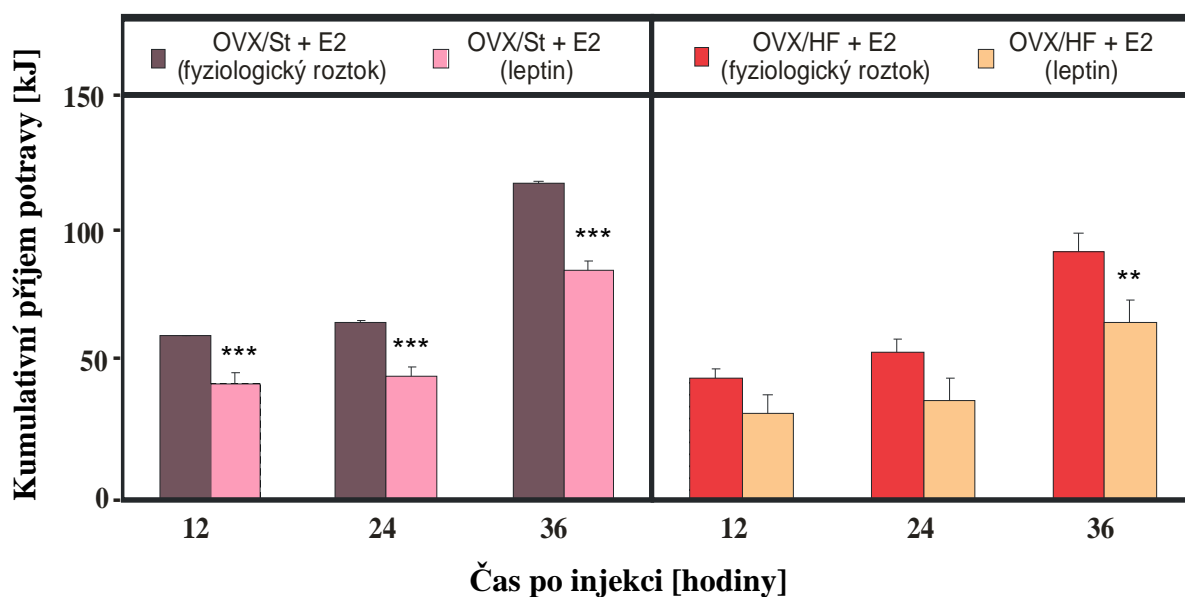


**Obr. 15. Vliv leptinu podávaného ICV na:** A) hmotnost OVX myších samic na St a HF dietě, B) hmotnost OVX myších samic na St a HF dietě s náhradou E2.  $n = 6 - 8$  myši na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (látka x čas po injekci). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  a \*\*\* $P < 0,001$ .

A)



B)



**Obr. 16.** Vliv leptinu podávaného ICV na: A) kumulativní příjem potravy OVX myších samic na St a HF dietě, B) kumulativní příjem potravy OVX myších samic na St a HF dietě s náhradou E2.  $n = 6 - 8$  myši na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (látka x čas po injekci). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  a \*\*\* $P < 0,001$ .

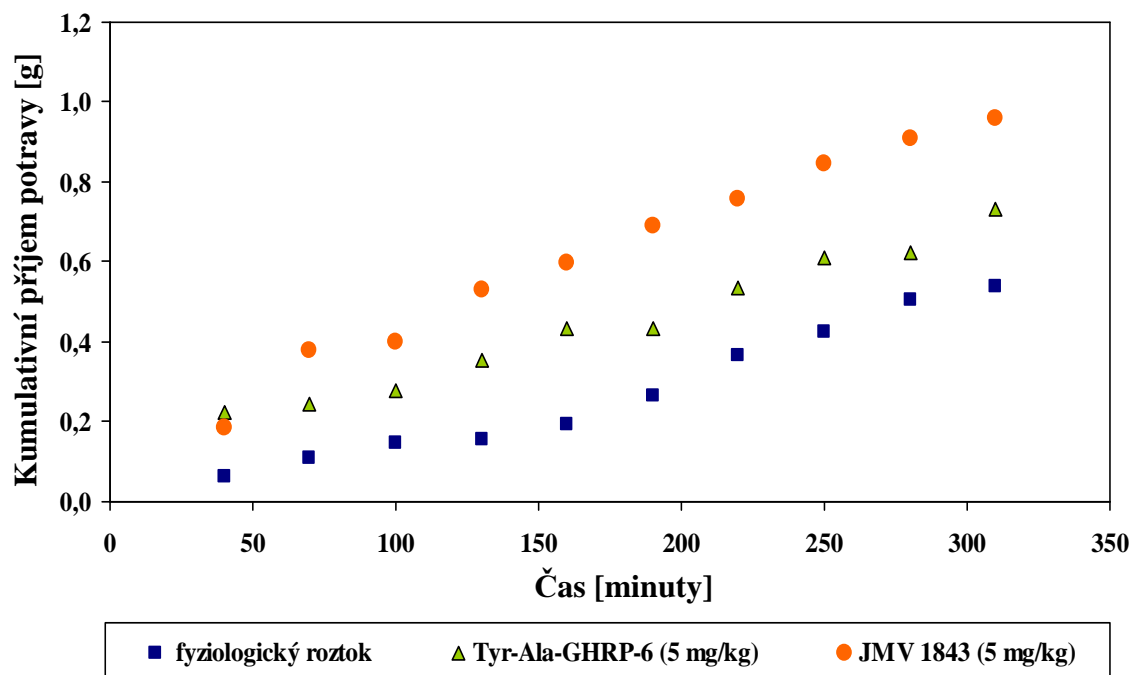
## **5.4. Vliv antagonistů a inverzního agonisty receptoru GHS-R1a na příjem potravy u obézních ovariektomovaných samic**

### **5.4.1. Test krátkodobého příjmu potravy**

#### **1) Vliv antagonistů na účinek agonisty**

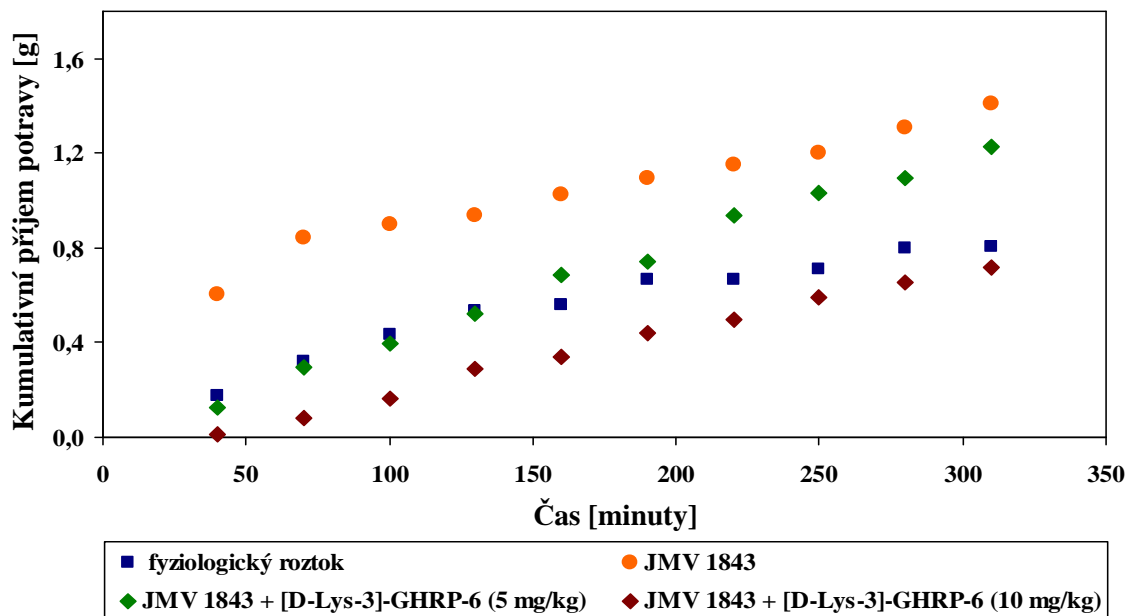
Nejprve byl testován účinek samotného agonisty receptoru GHS-R1a na příjem potravy u naivních sytých samic z kmene C57BL/6 (AnLab, Praha ČR) na St dietě. Byli použiti dva agonisté: peptidový Tyr-Ala-GHRP-6 a nepeptidový agonista JMV 1843. Tento pokus sloužil pro výběr účinného agonisty pro studium vlivu různých antagonistů receptoru GHS-R1a na účinek agonisty. Oba agonisté zvýšili příjem potravy po SC podání u sytých naivních myších samic na St dietě, ale pouze JMV 1843 zvýšil příjem potravy statisticky významně ve srovnání s fyziologickým roztokem (obr. 17). JMV 1843 o koncentraci 5 mg/kg byl vybrán pro další testování, neboť v této dávce se jevil jako účinnější agonista receptoru GHS-R1a než Tyr-Ala-GHRP-6 (také v dávce 5 mg/kg) (obr. 17).

Peptidový antagonist receptoru GHS-R1a [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a inverzní agonista SPa statisticky významně snížili příjem potravy vyvolaný agonistou JMV 1843 ve srovnání se samotným agonistou JMV 1843 po SC podání sytým naivním samicím na St dietě (obr. 18A a 18B). Společné SC podání nepeptidového antagonisty receptoru GHS-R1a JMV 3002 a agonisty JMV 1843 statisticky významně blokovalo orexigenní účinek agonisty JMV 1843 ve srovnání se samotným agonistou JMV 1843 (obr. 19A) stejně tak jako společné SC podání nepeptidového antagonisty receptoru GHS-R1a JMV 3414 a agonisty JMV 1843 u sytých naivních samic na St dietě (obr. 19B).

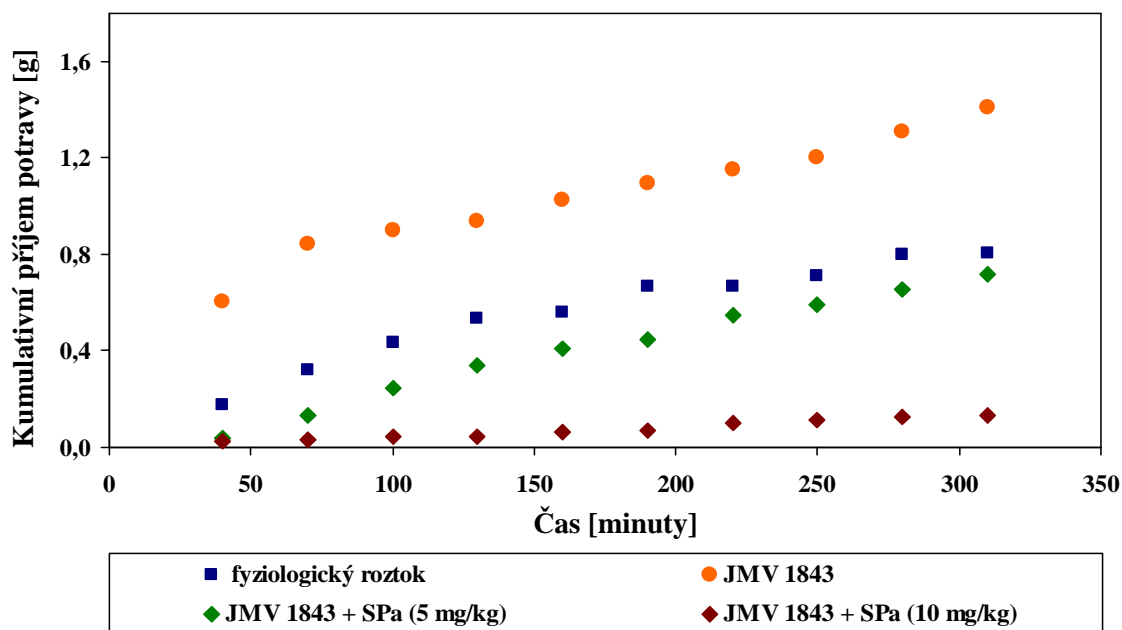


**Obr. 17.** Kumulativní příjem potravy po SC podání fyziologického roztoku, Tyr-Ala-GHRP-6 a JMV 1843 u sytých naivních myších samic na St dietě.  $n = 6$  myši na skupinu. Statistika byla provedena metodou one-way ANOVA.  $P < 0,01$  (JMV 1843 vůči fyziologickému roztoku).

A)

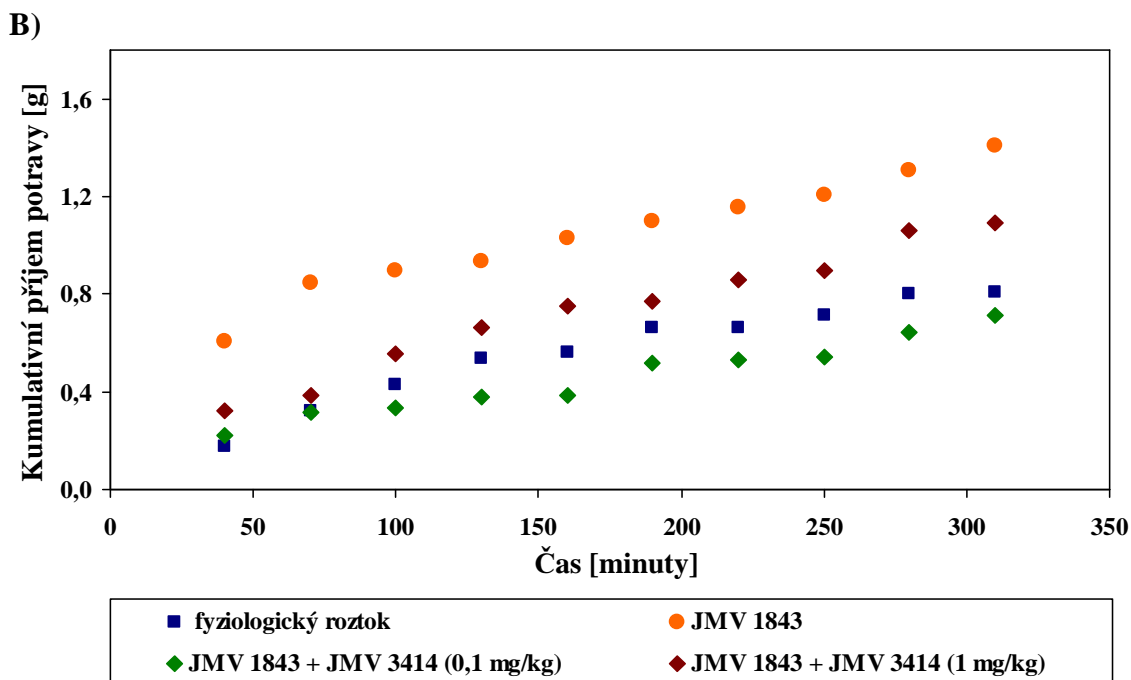
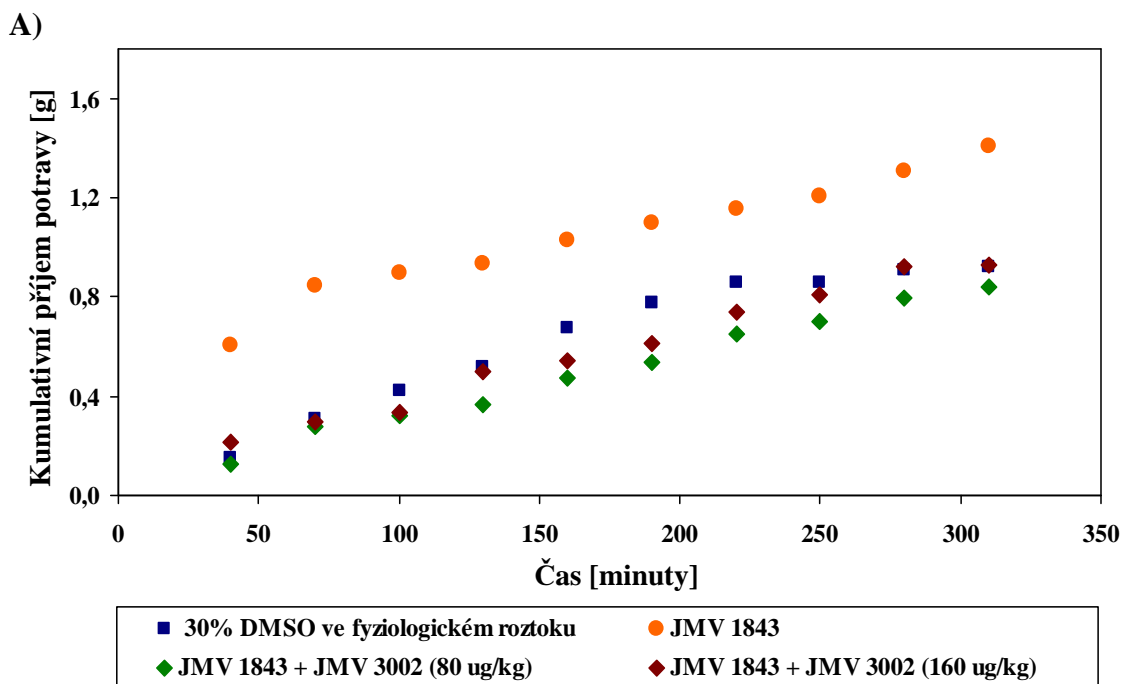


B)



**Obr. 18. Kumulativní příjem potravy po SC podání fyziologického roztoku, agonisty JMV 1843 a kombinace agonisty JMV 1843 s různými dávkami peptidových antagonistů: A) [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6, B) SPa u sytých naivních myších samic na St dietě. Nejprve byl podáván antagonist a 10 minut poté agonista JMV 1843. n = 6 myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou one-way ANOVA. P < 0,01 (fyziologický roztok vůči JMV 1843), P < 0,05 (JMV 1843 + [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 5 mg/kg vůči JMV 1843), P < 0,001 (JMV 1843 + [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 10 mg/kg vůči JMV 1843), P < 0,001 (JMV 1843 + SPa 5 mg/kg vůči JMV 1843) a P < 0,001 (JMV 1843 + SPa 10 mg/kg vůči JMV 1843).**





**Obr. 19. Kumulativní příjem potravy po SC podání fyziologického roztoku, agonisty JMV 1843 a kombinace agonisty JMV 1843 s různými dávkami nepeptidových antagonistů: A) JMV 3002, B) JMV 3414 u sytých naivních myších samic na St dietě. Nejprve byl podáván antagonist a 10 minut poté agonista JMV 1843.  $n = 6$  myšů na skupinu. Statistika byla provedena metodou one-way ANOVA.  $P < 0,01$  (fyziologický roztok vůči JMV 1843),  $P < 0,001$  (JMV 1843 + JMV 3002 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  vůči JMV 1843),  $P < 0,01$  (JMV 1843 + JMV 3002 160  $\mu\text{g}/\text{kg}$  vůči JMV 1843),  $P < 0,001$  (JMV 1843 + JMV 3414 0,1 mg/kg vůči JMV 1843) a  $P < 0,05$  (JMV 1843 + JMV 3414 1 mg/kg vůči JMV 1843).**

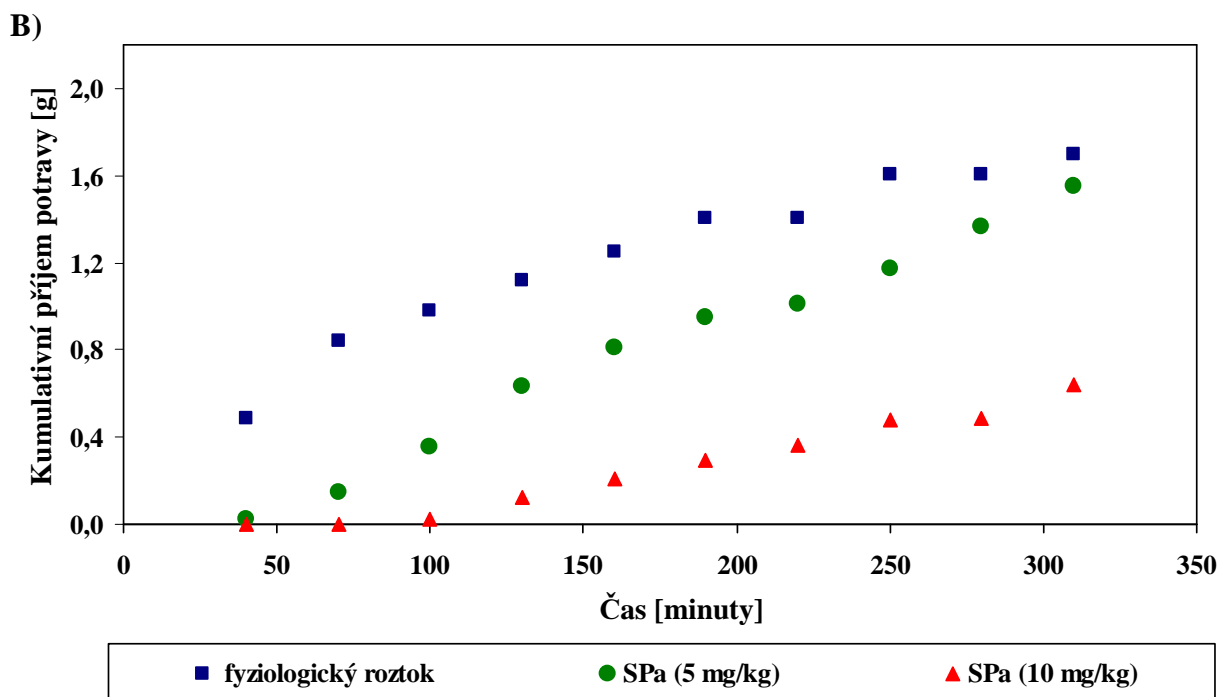
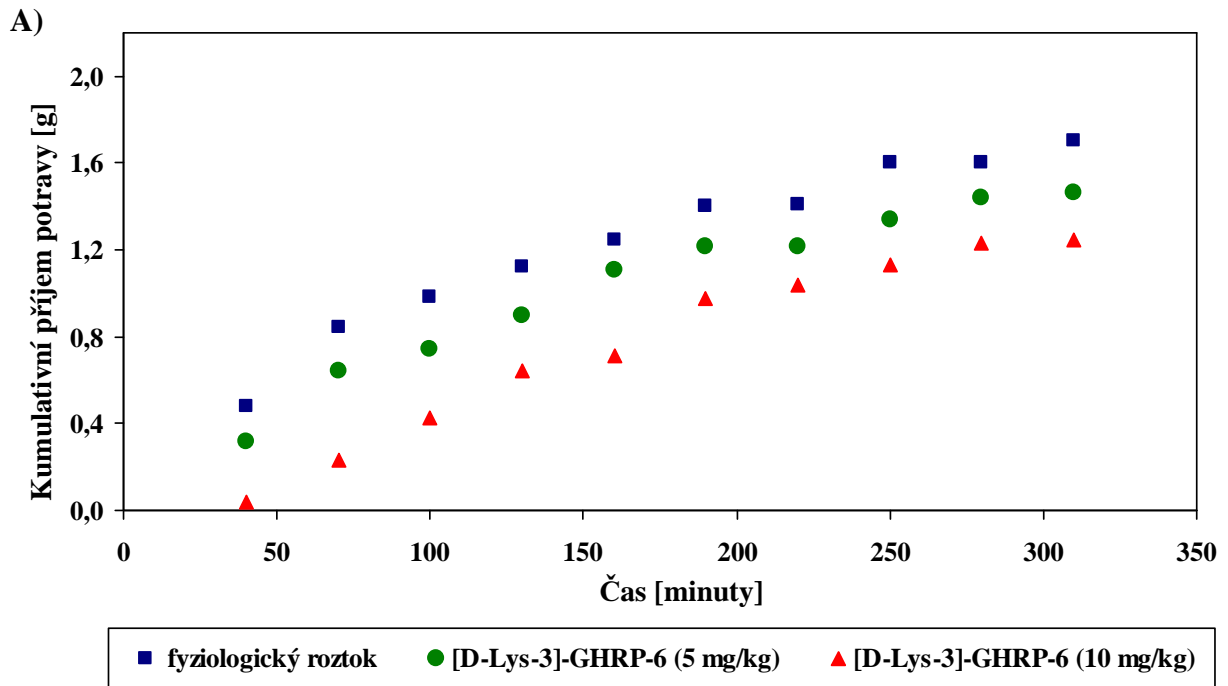
## **2) Výběr vhodného antagonisty a/nebo inverzního agonisty pro dlouhodobý test příjmu potravy**

Tento pokus sloužil pro výběr vhodného(ých) antagonisty(ů) receptoru GHS-R1a pro jeho(jejich) dlouhodobý vliv na příjem potravy. Pro studium účinku antagonistů byly použity 17 hodin hladové naivní samice na St dietě z kmene C57BL/6 (AnLab, Praha, ČR).

Peptidový antagonist receptoru GHS-R1a [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a inverzní agonista SPa, každý v koncentraci 10 mg/kg, statisticky významně snížili příjem potravy u hladových naivních samic na St dietě ve srovnání s fyziologickým roztokem (obr. 20A a 20B). Nicméně SPa ještě významněji snížil příjem potravy než [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 (obr. 20A a 20B).

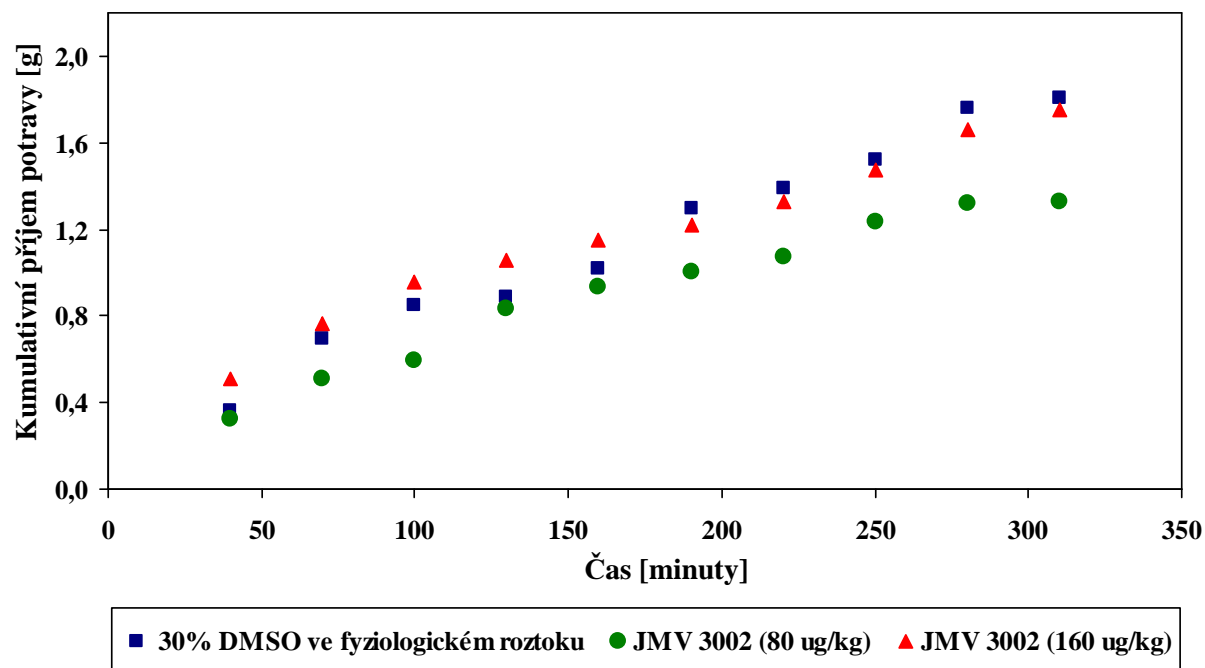
Samotní nepeptidoví antagonisté receptoru GHS-R1a JMV 3002 a JMV 3414 neměli vliv na příjem potravy u hladových naivních samic na St dietě (obr. 21A a 21B).

Nejúčinnější látky, tedy [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a SPa každý o koncentraci 10 mg/kg byly dále testovány krátkodobě na příjem potravy u 17 hodin hladových OVX samic na St a HF dietě. Myši byly dva měsíce na příslušné dietě. [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 významně snížil příjem potravy u OVX samic na St dietě, ale nevýznamně u OVX samic na HF dietě (obr. 22A a 22B). SPa naopak významně potlačil příjem potravy jak u OVX samic na St dietě, tak i u OVX samic na HF dietě (obr. 22A a 22B).

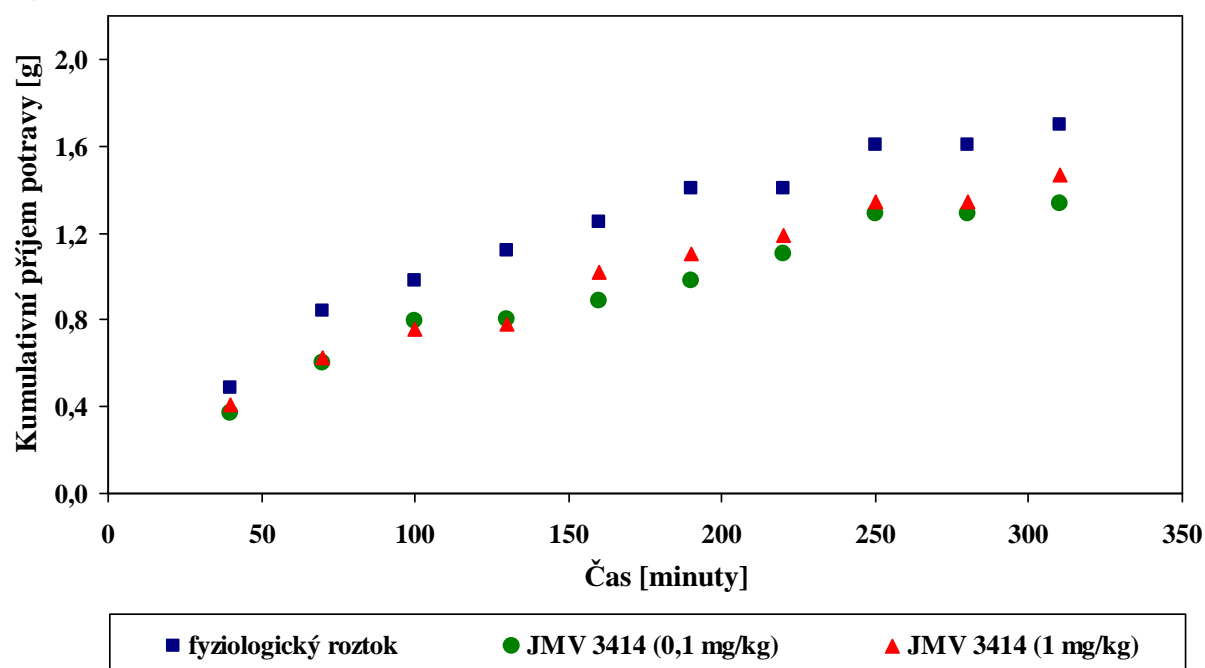


Obr. 20. Kumulativní příjem potravy po SC podání: A) fyziologického roztoku a [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6, B) fyziologického roztoku a SPa u 17 hodin hladových naivních samic na St dietě. n = 6 myši na skupinu. Statistika byla provedena metodou one-way ANOVA. P < 0,05 ([D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 10 mg/kg vůči fyziologickému roztoku) a P < 0,001 (SPa 10 mg/kg vůči fyziologickému roztoku).

A)

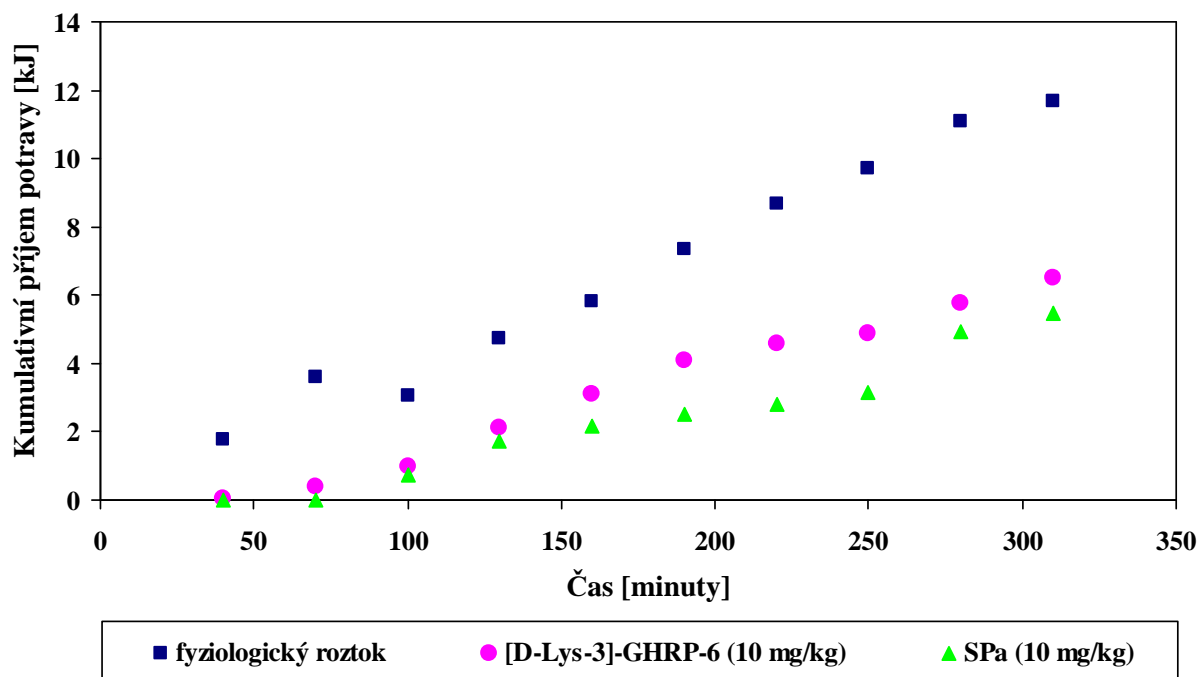


B)

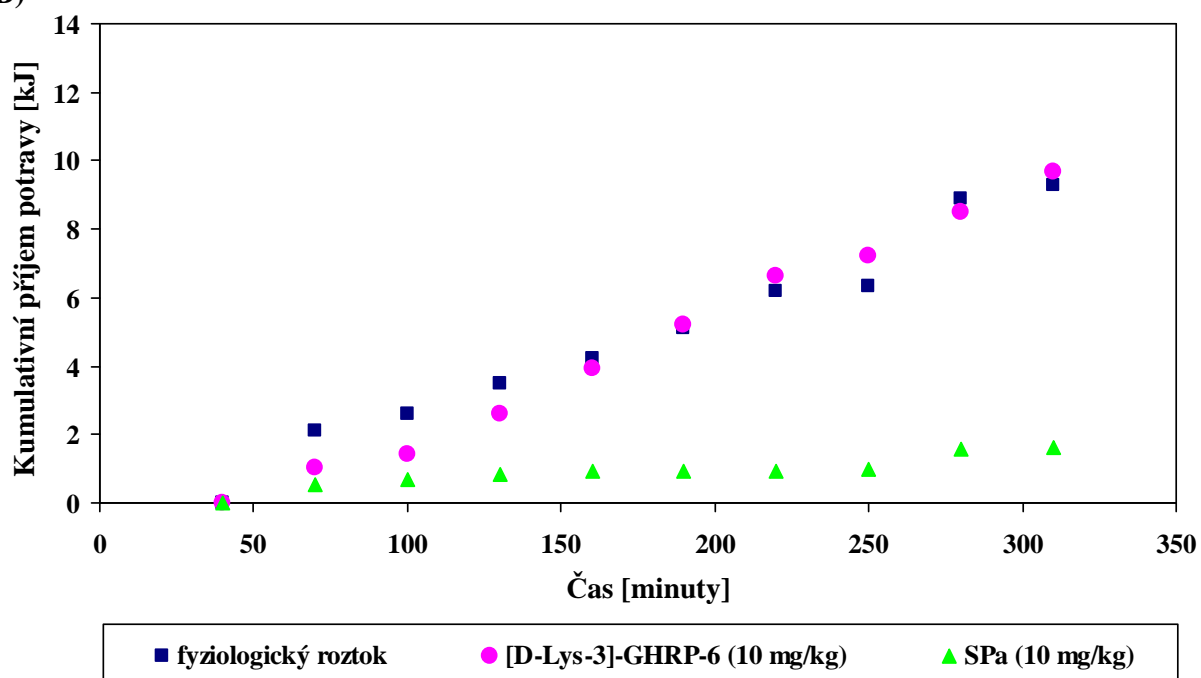


Obr. 21. Kumulativní příjem potravy po SC podání: A) fyziologického roztoku a JMV 3002, B) fyziologického roztoku a JMV 3414 u 17 hodin hladových naivních samic na St dietě.  $n = 6$  myši na skupinu. Statistika byla provedena metodou one-way ANOVA. Žádné statisticky významné rozdíly po podání obou látek nebyly pozorovány.

A)



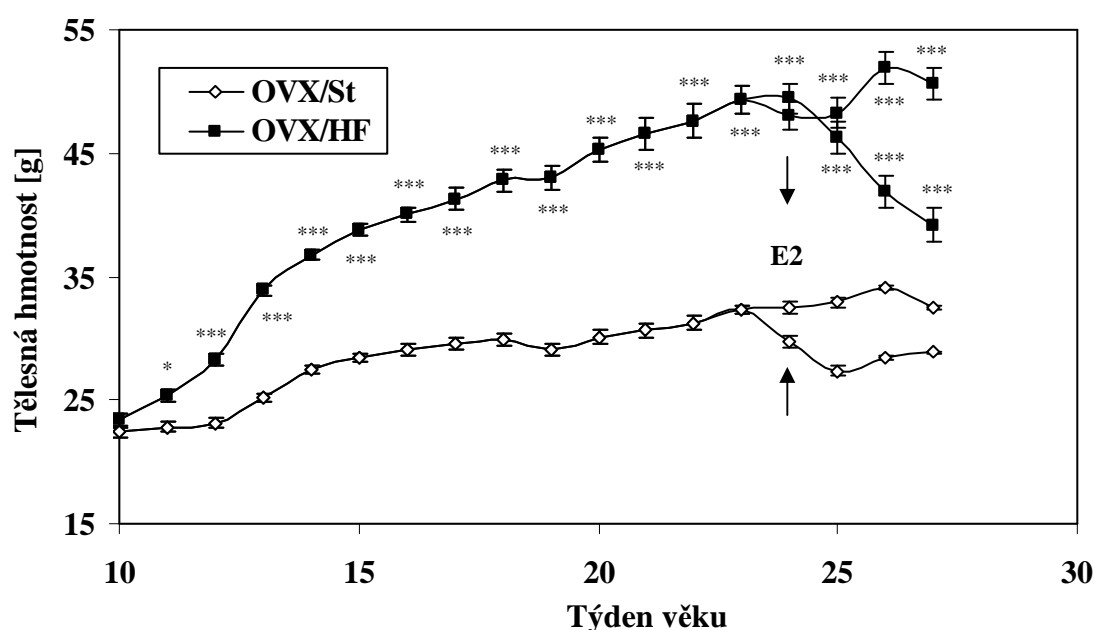
B)



**Obr. 22. Kumulativní příjem potravy po SC podání fyziologického roztoku, [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a SPa u 17 hodin hladových: A) OVX samic na St dietě, B) OVX samic na HF dietě. Myši byly dva měsíce na příslušné dietě. n = 6 myši na skupinu. Statistika byla provedena metodou one-way ANOVA. P < 0,05 ([D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 10 mg/kg vůči fyziologickému roztoku) a P < 0,01 (SPa 10 mg/kg vůči fyziologickému roztoku) u OVX/St. P < 0,01 (SPa 10 mg/kg vůči fyziologickému roztoku) u OVX/HF.**

#### 5.4.2. Test dlouhodobého příjmu potravy

Pro dlouhodobý vliv antagonistů receptoru GHS-R1a na příjem potravy byl znovu zaveden model OVX samic. V tomto případě OVX samice na HF dietě z kmene C57BL/6 (AnLab, Praha, ČR) se staly obézními již po 1. týdnu krmení HF dietou oproti těm na St dietě (obr. 23). Dodání E2 OVX samicím od 24. týdne věku po dobu 1 měsíce statisticky významně snížilo tělesnou hmotnost jak u OVX samic na St dietě (2. a 3. týden podání E2 bylo  $P < 0,001$ ; 4. týden podání E2 bylo  $P < 0,05$ ), tak i u OVX samic na HF dietě (3. a 4. týden podání E2 bylo  $P < 0,001$ ) (obr. 23).



**Obr. 23.** Tělesná hmotnost OVX samic na St a HF dietě s náhradou E2 a bez E2 z kmene C57BL/6.  $n = 40$  myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (dieta  $\times$  týden věku). \* $P < 0,05$  a \*\*\* $P < 0,001$ .

Výsledky z krátkodobého příjmu potravy sloužily pro výběr vhodných látek na testování jejich účinků na příjem potravy dlouhodobě. Pro dlouhodobý pokus na příjem potravy byl tedy vybrán peptidový antagonist receptoru GHS-R1a [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a inverzní agonista SPa, každý o koncentraci 10 mg/kg. Látky byly testovány u OVX samic z kmene C57BL/6 na St a HF dietě s náhradou E2 a bez E2 po dobu 7 dnů dvakrát denně.

#### 5.4.2.1. Dlouhodobý vliv [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 na příjem potravy

Dlouhodobé podání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 vedlo k statisticky významnému snížení tělesné hmotnosti u OVX samic na St a HF dietě (obr. 24A a 24B). Na rozdíl od OVX samic na St dietě, u OVX samic na HF dietě úbytek tělesné hmotnosti v průběhu celého týdne podání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 stále více a více klesal (obr. 24B). U skupin pair-fed u OVX samic jak na St, tak i HF dietě, jimž bylo podáváno množství potravy zkonsumované myšmi, kterým byl podáván [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6, též významně klesla hmotnost (obr. 24A a 24B).

[D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 dlouhodobě také statisticky významně snížil tělesnou hmotnost u OVX samic na HF dietě s náhradou E2, ale nikoliv u OVX samic na St dietě s náhradou E2 (obr. 25B a 25A). Skupina pair-fed u OVX samic na HF dietě s náhradou E2 měla významně sníženou hmotnost (obr. 25B). U OVX samic na St dietě s náhradou E2 skupina pair-fed měla významně sníženou hmotnost až od 5. dne krmení stejné množství potravy jako skupina, které byl podáván [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 (obr. 25A).

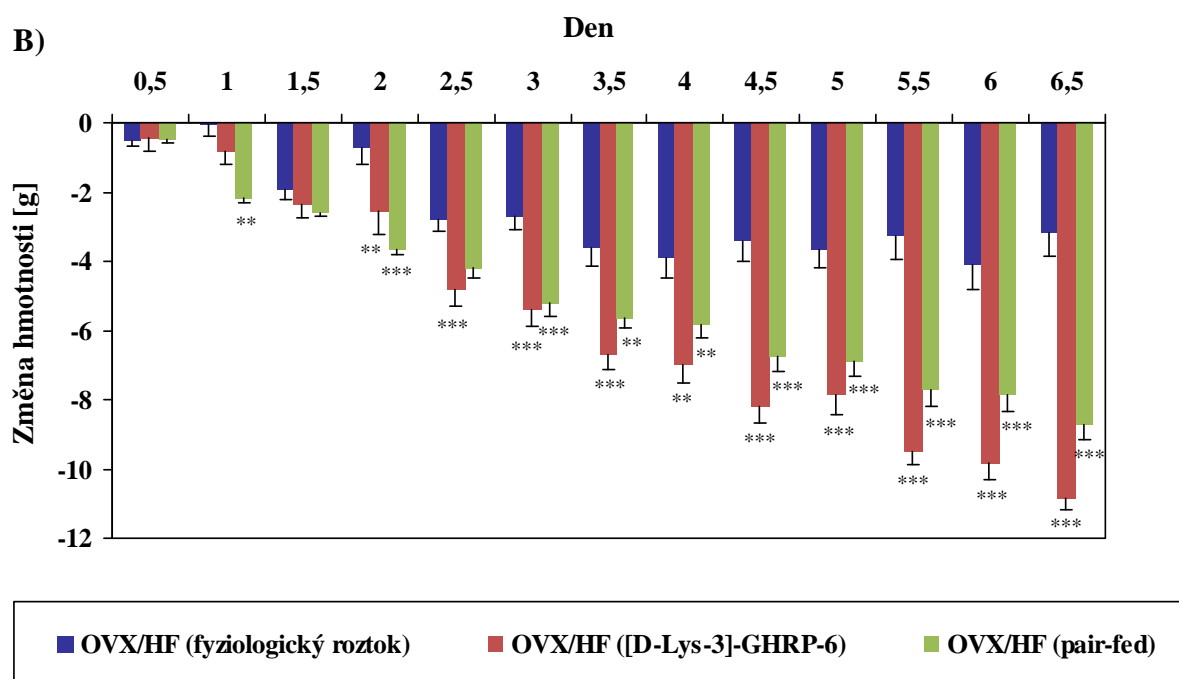
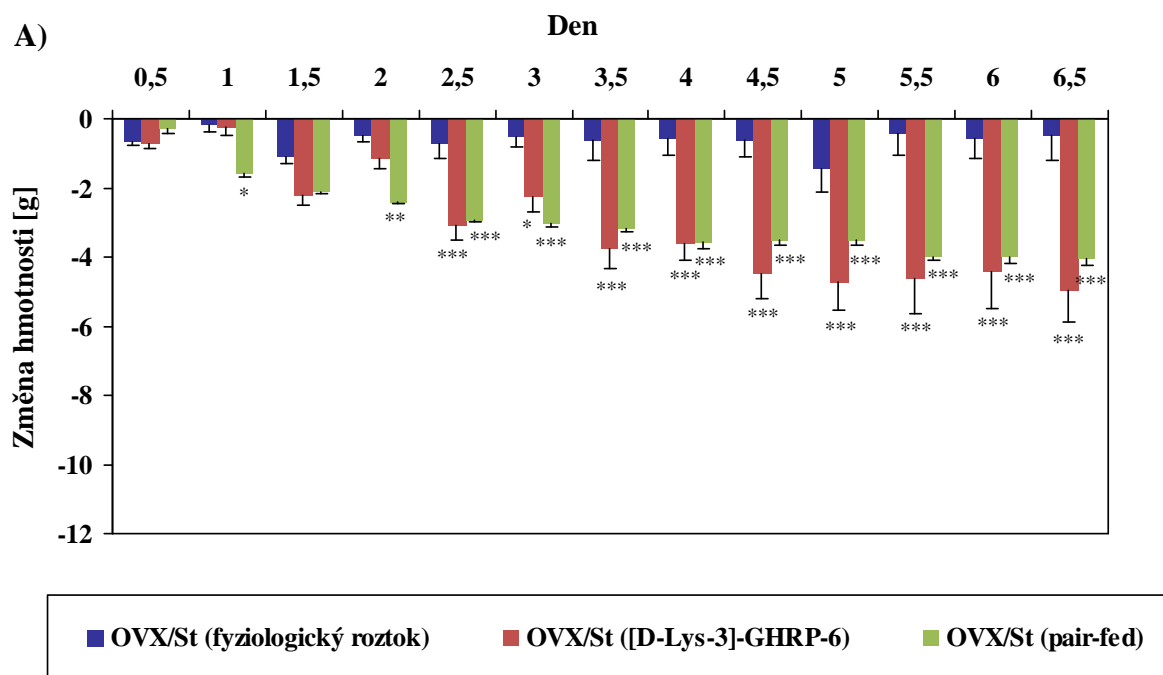
[D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 dlouhodobě významně snížil příjem potravy u OVX samic na St a HF dietě a to s náhradou E2 a bez E2 (obr. 26A a 26B).

Metabolické parametry po dlouhodobém podání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 znázorňují tab. 9 a 10. Podání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 vedlo k zlepšení metabolických parametrů zejména u OVX samic na St a HF dietě. U OVX samic na St dietě se významně snížily hladiny glukosy a naopak zvýšily hladiny adiponektinu ve srovnání se skupinou injikovanou fyziologickým roztokem. Koncentrace inzulinu byly nevýznamně snížené ve srovnání se skupinou, které byl podáván fyziologický roztok. Množství tuku a koncentrace leptinu byly nevýznamně snížené oproti těmto parametrů u skupiny injikovanou fyziologickým roztokem (tab. 9A). Skupina pair-fed u OVX samic na St dietě také měla zlepšené metabolické parametry, zejména byl pozorován statisticky významný pokles sérových hladin glukosy a inzulinu a zvýšených hladin adiponektinu ve srovnání s fyziologickým roztokem (tab. 9A).

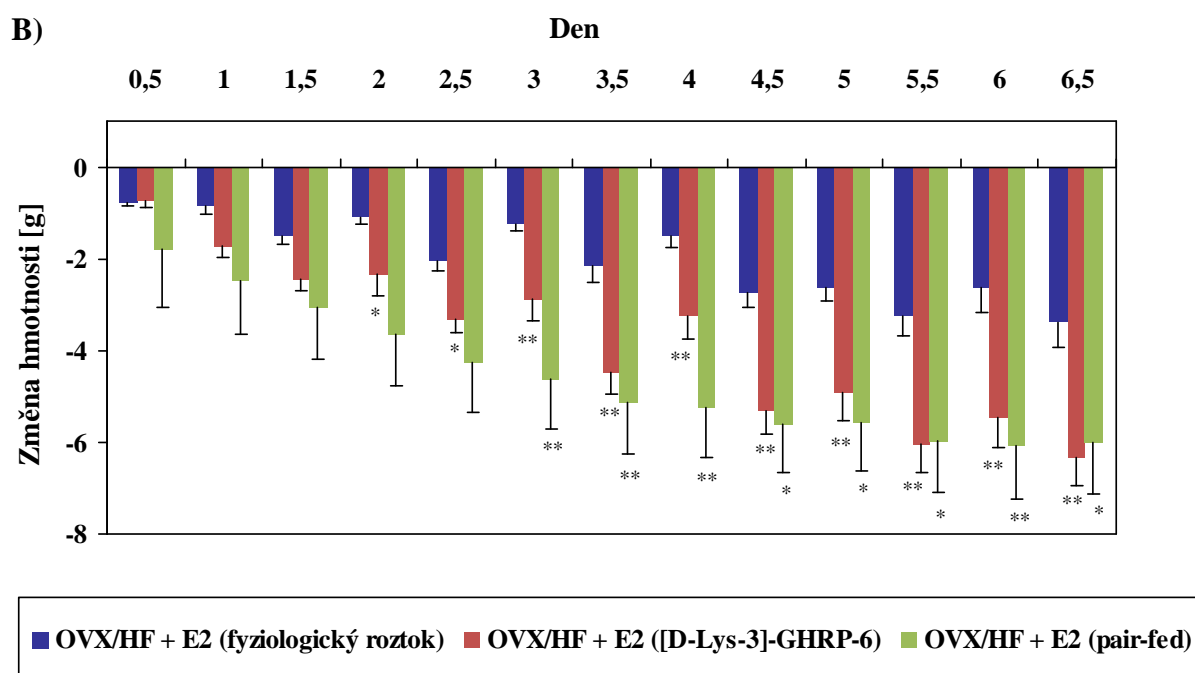
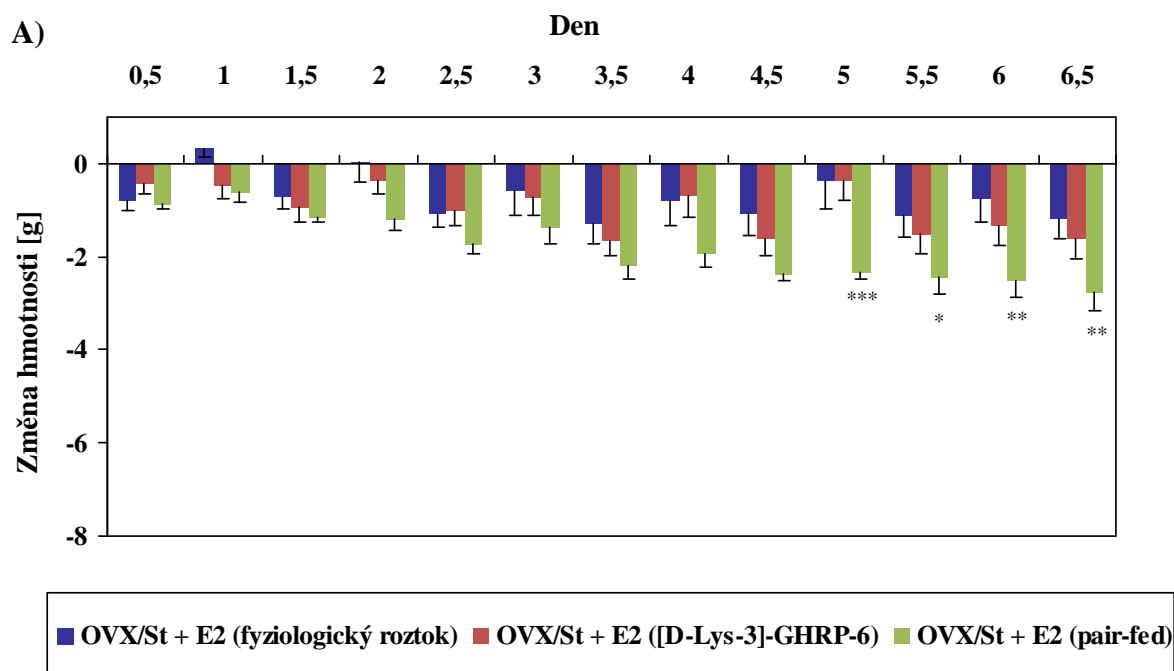
Ve srovnání s OVX samicemi na St dietě, podání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 ještě významněji zlepšilo metabolické parametry u OVX samic na HF dietě. [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 statisticky významně snížil množství tuku, sérových hladin leptinu, glukosy a inzulinu (tab. 9B), stejně tak i indexu HOMA ( $15,67 \pm 4,09$  po [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 vůči  $137,82 \pm 22,70$  po fyziologickém roztoku,  $P < 0,001$ ). Skupina pair-fed u OVX samic na HF dietě ukazovala stejný pozitivní vliv na metabolické parametry jako skupina myší, které byl podáván dlouhodobě [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 (tab. 9B).

Náhrada E2 u OVX samic na St a HF dietě nijak významně neovlivnila metabolické parametry po dlouhodobém podání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 (tab. 10A a 10B), pouze hladiny leptinu byly významně sniženy u OVX samic na St dietě s náhradou E2 ve srovnání s podáním fyziologického roztoku (tab. 10A). Ani u skupin pair-fed nebyly pozorovány významné rozdíly v metabolických parametrech (tab. 10A a 10B), pouze skupina pair-fed u OVX samic na HF dietě s náhradou E2 měla statisticky významně snížené hladiny triglyceridů oproti skupině, které byl podáván fyziologický roztok (tab. 10B).



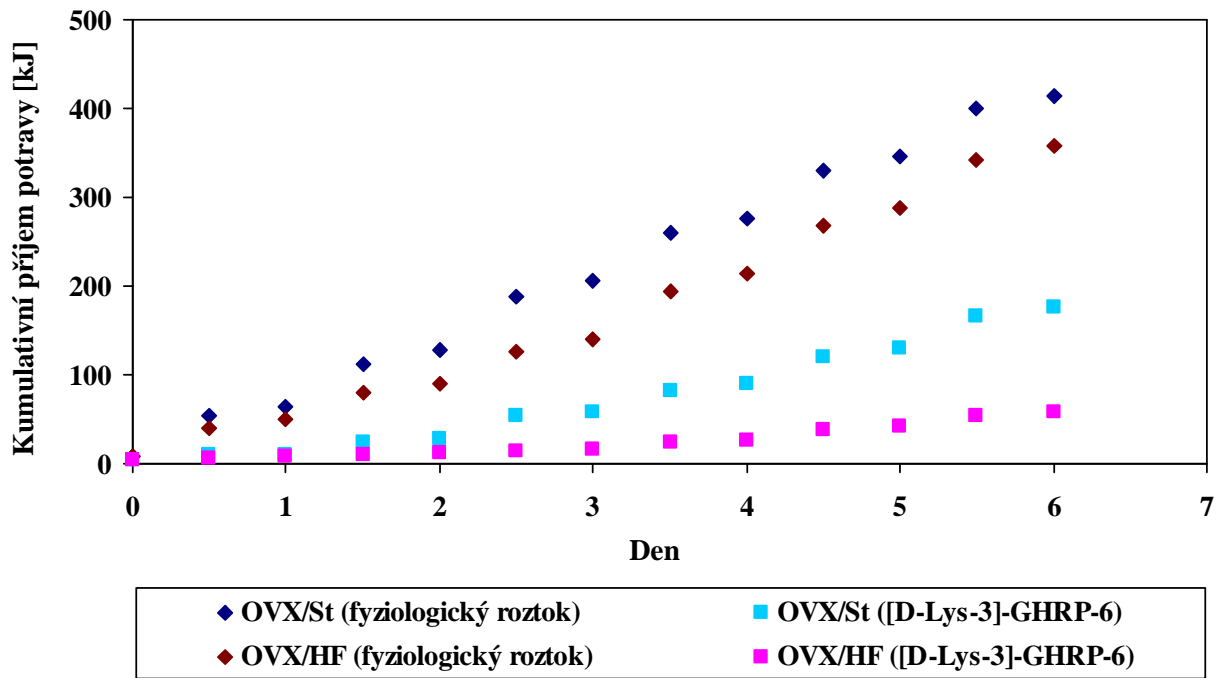


**Obr. 24.** Změna hmotnosti po SC podání fyziologického roztoku a  $[D-Lys^3]GHRP-6$  a změna hmotnosti u skupiny pair-fed od  $[D-Lys^3]GHRP-6$  u: A) OVX myších samic na St dietě, B) OVX myších samic na HF dietě.  $n = 10$  myší na skupinu, pro skupinu pair-fed 5 myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (fyziologický roztok,  $[D-Lys^3]GHRP-6$  nebo skupina pair-fed x den). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  a \*\*\* $P < 0,001$ .

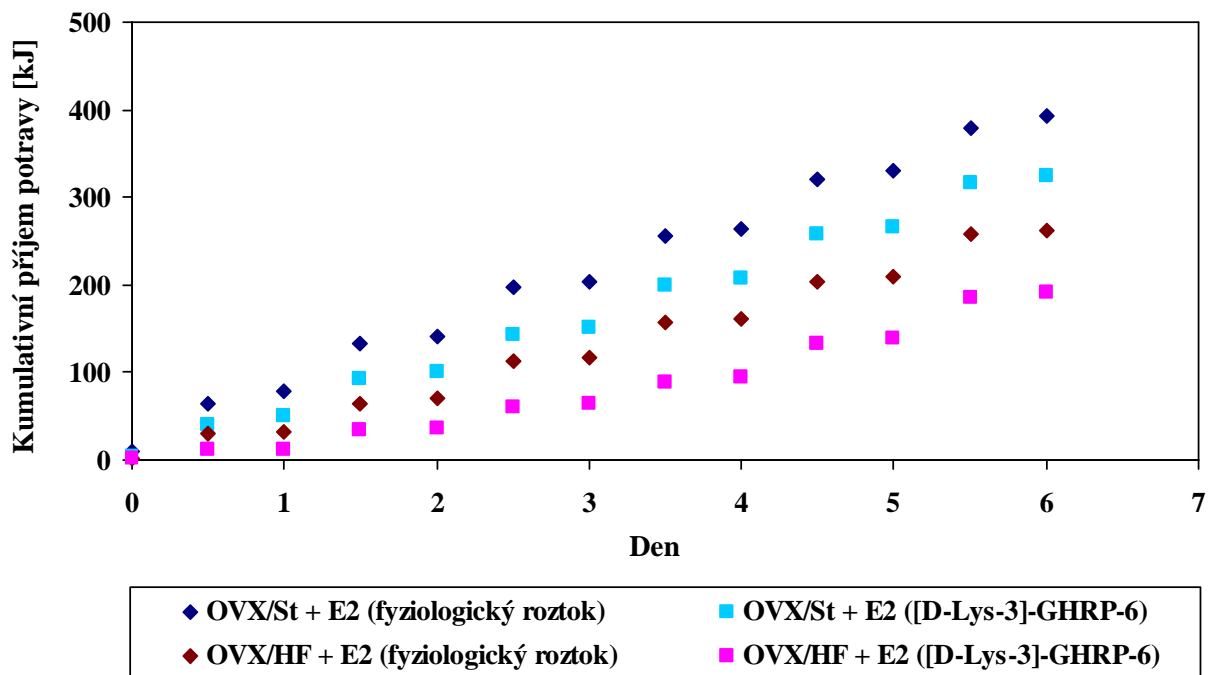


Obr. 25. Změna hmotnosti po SC podání fyziologického roztoku a  $[D-Lys^3]GHRP-6$  a změna hmotnosti u skupiny pair-fed od  $[D-Lys^3]GHRP-6$  u: A) OVX myších samic na St dietě s náhradou E2, B) OVX myších samic na HF dietě s náhradou E2.  $n = 10$  myší na skupinu, pro skupinu pair-fed 5 myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (fyziologický roztok,  $[D-Lys^3]GHRP-6$  nebo skupina pair-fed x den). \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  a \*\*\* $P < 0,001$ .

A)



B)



**Obr. 26. Kumulativní příjem potravy po SC podání fyziologického roztoku a [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 u:** A) OVX myších samic na St a HF dietě, B) OVX myších samic na St a HF dietě s náhradou E2. n = 10 myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (látka x den). P < 0,001 od 1,5 dne podání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 u OVX/St, OVX/HF a OVX/St + E2. P < 0,001 od 2,5 dne podání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 u OVX/HF + E2.

**Tab. 9. Metabolické parametry po SC dlouhodobém podávání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 u 17 hodin hladových:**

**A) OVX samic na St dietě, B) OVX samic na HF dietě**

**A)**

Látka/skupina	Tuk/tělesná hmotnost [%]	Leptin [ng/ml]	Glukosa [mmol/l]	Inzulin [ng/ml]	Adiponektin [μg/ml]	Triglyceridy [mg/dl]
Fyziologický roztok	7,68 ± 1,47	11,81 ± 5,46	6,25 ± 0,77	0,96 ± 0,27	22,70 ± 1,80	75,69 ± 5,84
[D-Lys <sup>3</sup> ]GHRP-6	6,16 ± 0,89	3,72 ± 1,40	4,51 ± 0,19 *	0,38 ± 0,09	28,25 ± 0,93 *	62,97 ± 4,86
pair-fed	7,11 ± 0,48	8,59 ± 1,28	3,90 ± 0,39 ++	0,19 ± 0,01 +	31,54 ± 2,20 ++	72,57 ± 5,22

**B)**

Látka/skupina	Tuk/tělesná hmotnost [%]	Leptin [ng/ml]	Glukosa [mmol/l]	Inzulin [ng/ml]	Adiponektin [μg/ml]	Triglyceridy [mg/dl]
Fyziologický roztok	15,12 ± 0,37	54,97 ± 5,80	7,17 ± 0,28	2,48 ± 0,36	22,77 ± 0,91	83,82 ± 4,14
[D-Lys <sup>3</sup> ]GHRP-6	11,92 ± 0,41 ***	22,65 ± 3,25 ***	4,15 ± 0,33 ***	0,48 ± 0,10 ***	24,43 ± 1,45	69,97 ± 8,49
pair-fed	13,08 ± 0,54 +++	43,66 ± 4,12	3,78 ± 0,15 +++	0,27 ± 0,06 +++	25,35 ± 1,97	67,80 ± 5,84

*Hodnoty jsou vyjádřeny ve tvaru průměr ± SEM. n = 10 myší na skupinu, pro skupinu pair-fed 5 myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou one-way ANOVA. \*P < 0,05; \*\*P < 0,01 a \*\*\*P < 0,001 ([D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 vůči fyziologickému roztoku).*

*+P < 0,05; ++P < 0,01 a +++P < 0,001 (skupina pair-fed vůči fyziologickému roztoku).*

**Tab. 10. Metabolické parametry po SC dlouhodobém podávání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 u 17 hodin hladových:**

**A) OVX samic na St dietě s náhradou E2, B) OVX samic na HF dietě s náhradou E2**

**A)**

Látka/skupina	Tuk/tělesná hmotnost [%]	Leptin [ng/ml]	Glukosa [mmol/l]	Inzulin [ng/ml]	Adiponektin [μg/ml]	Triglyceridy [mg/dl]
Fyziologický roztok	2,80 ± 0,45	3,22 ± 1,13	5,26 ± 0,31	0,20 ± 0,06	14,47 ± 1,86	79,88 ± 11,80
[D-Lys <sup>3</sup> ]GHRP-6	2,25 ± 0,17	0,51 ± 0,07 *	4,91 ± 0,41	0,08 ± 0,01	16,03 ± 2,65	76,69 ± 7,58
pair-fed	1,89 ± 0,62	1,50 ± 0,26	4,70 ± 0,34	0,13 ± 0,03	16,88 ± 3,72	56,03 ± 2,76

**B)**

Látka/skupina	Tuk/tělesná hmotnost [%]	Leptin [ng/ml]	Glukosa [mmol/l]	Inzulin [ng/ml]	Adiponektin [μg/ml]	Triglyceridy [mg/dl]
Fyziologický roztok	8,10 ± 0,58	6,63 ± 1,04	4,95 ± 0,22	0,46 ± 0,05	8,14 ± 0,72	86,42 ± 6,24
[D-Lys <sup>3</sup> ]GHRP-6	7,31 ± 0,46	3,74 ± 1,36	4,70 ± 0,19	0,24 ± 0,04	11,33 ± 1,27	82,74 ± 6,30
pair-fed	8,52 ± 0,89	11,12 ± 2,69	4,42 ± 0,23	0,64 ± 0,25	8,30 ± 0,55	58,82 ± 4,68 ++

Hodnoty jsou vyjádřeny ve tvaru průměr ± SEM. n = 10 myší na skupinu, pro skupinu pair-fed 5 myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou one-way ANOVA. \*P < 0,05 ([D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 vůči fyziologickému roztoku). \*\*P < 0,01 (skupina pair-fed vůči fyziologickému roztoku).

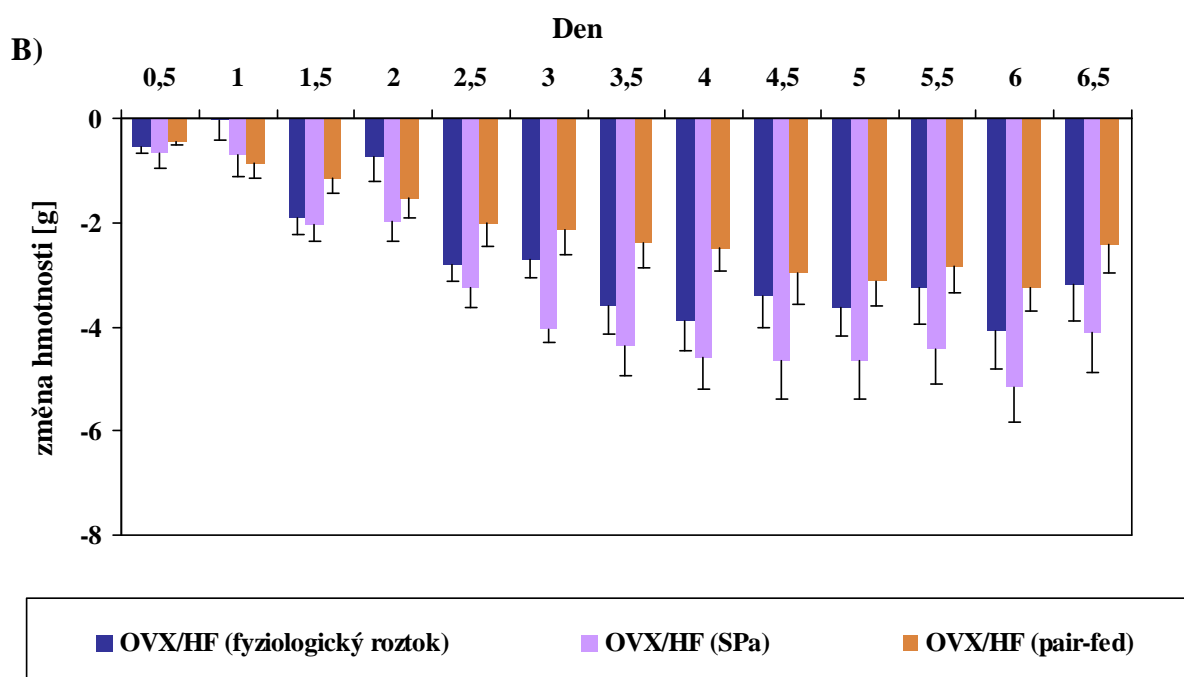
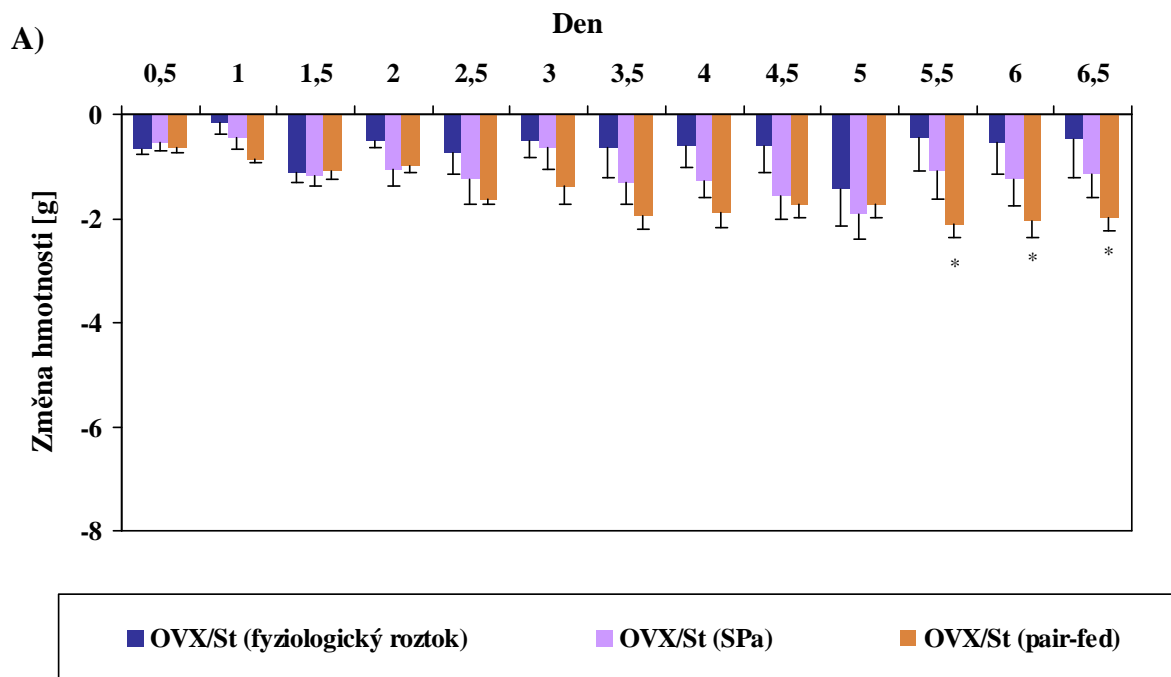
#### **5.4.2.2. Dlouhodobý vliv SPa na příjem potravy**

Na rozdíl od [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6, dlouhodobé podání SPa nemělo významný vliv na hmotnost a příjem potravy u OVX samic na St a HF dietě s náhradou E2 a bez E2 (obr. 27, 28 a 29). Pouze u OVX samic na St dietě byl statisticky významný vliv dlouhodobého podání SPa na příjem potravy, ale až od 4,5 dne podání (obr. 29A). Obdobné výsledky byly u skupiny pair-fed u OVX samic na St dietě. Tato skupina myší měla od 5,5 dne krmení stejným množstvím potravy jako skupina myší, které byl podáván SPa, statisticky sníženou hmotnost (obr. 27A).

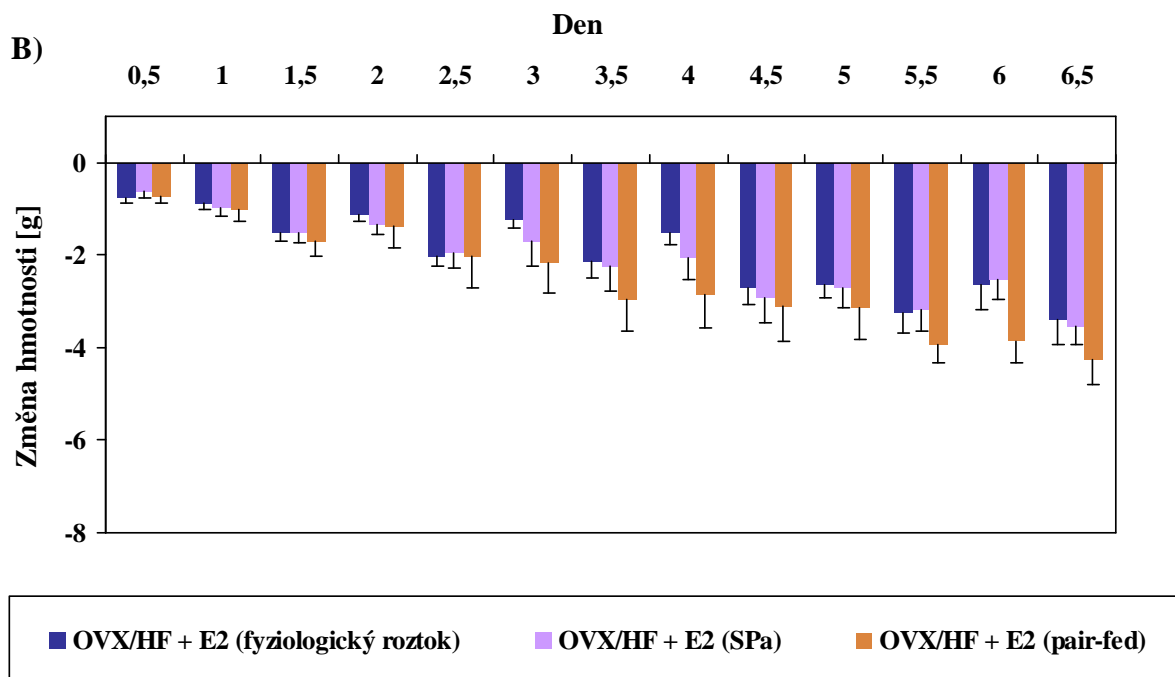
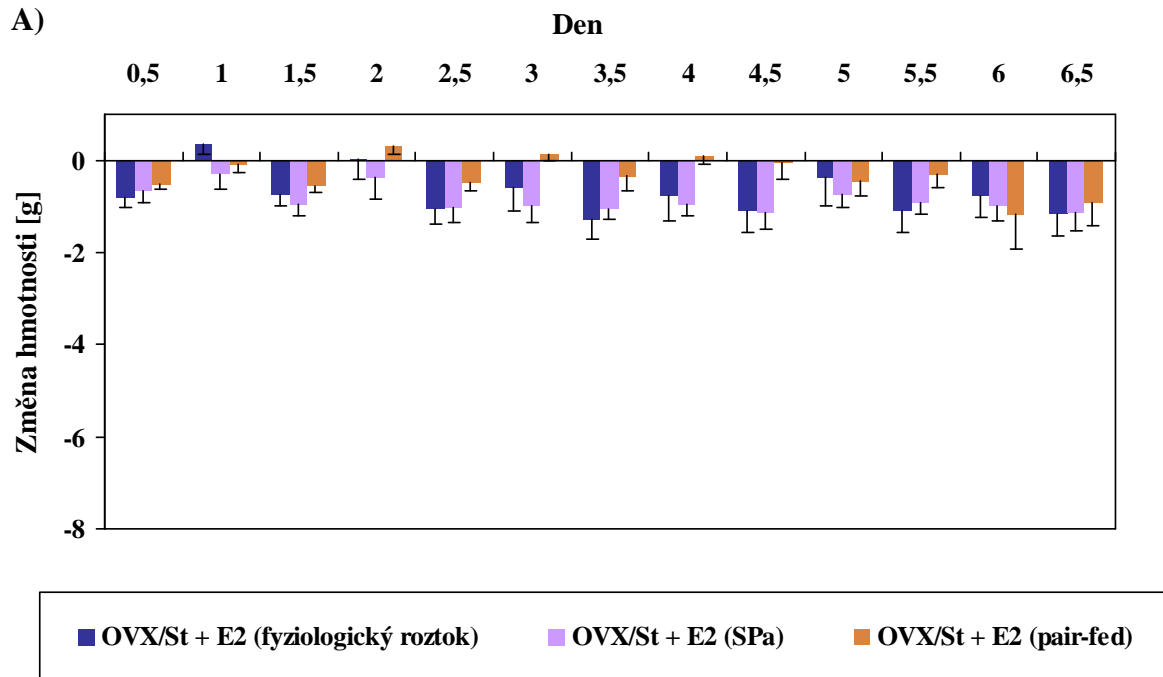
Metabolické parametry po dlouhodobém podání SPa znázorňují tab. 11 a 12. Podání SPa tolik neovlivnilo metabolické parametry u OVX samic na St a HF dietě s náhradou E2 a bez E2 ve srovnání s [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6, pouze hladiny adiponektinu byly významně zvýšené u OVX samic na St dietě ve srovnání s podáním fyziologického roztoku (tab. 11A). Skupina pair-fed u OVX samic na St dietě měla významně snížené hladiny inzulínu a naopak zvýšené koncentrace adiponektinu ve srovnání se skupinou, které byl podáván fyziologický roztok (tab. 11A). Skupina pair-fed u OVX samic na HF dietě s náhradou E2 měly významně snížené koncentrace triglyceridů ve srovnání se skupinou, které byl podáván fyziologický roztok (tab. 12B).

#### **5.4.2.3. Sedativní a analgetický účinek po podání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a SPa**

Byly také zkoumány sedativní a analgetické účinky po podání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a SPa. Podání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 vedlo k silným sedativním a analgetickým účinkům u naivních samic na St dietě a OVX samic na HF dietě ve srovnání s účinky po podání fyziologického roztoku (obr. 30A a 30B). Podání SPa mělo za následek zejména silné sedativní účinky, ale téměř žádné analgetické účinky, u naivních samic na St dietě a OVX samic na HF dietě ve srovnání s fyziologickým roztokem (obr. obr. 30A a 30B).



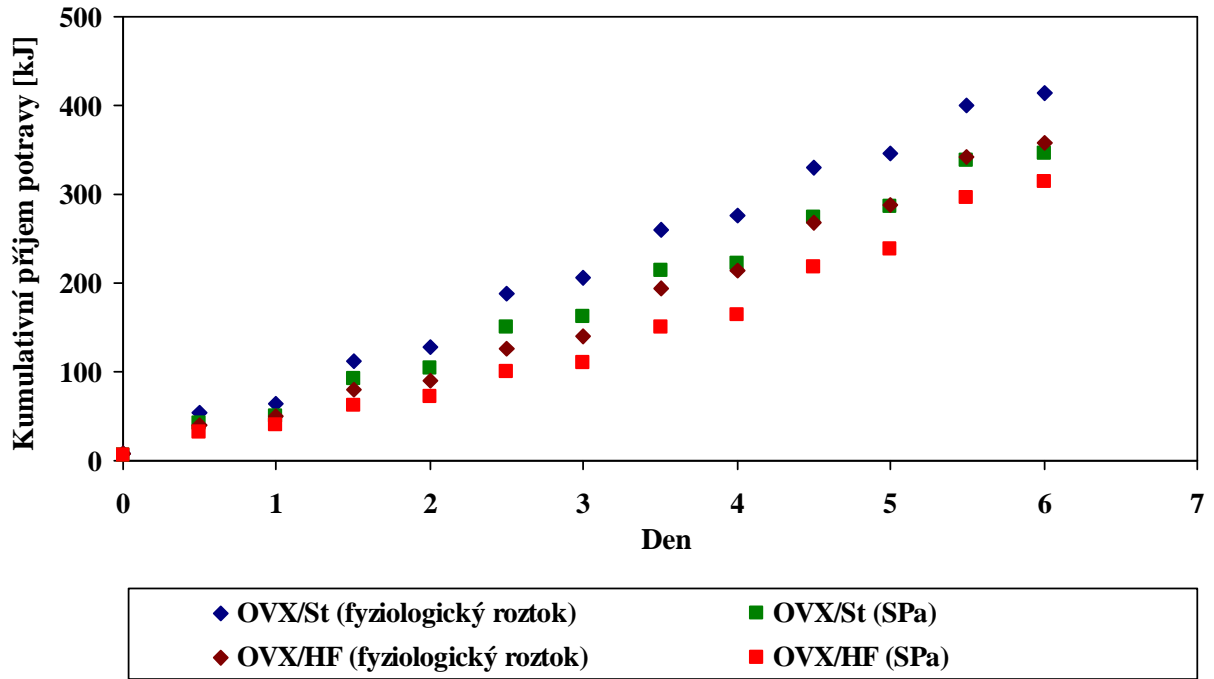
**Obr. 27. Změna hmotnosti po SC podání fyziologického roztoku a SPa a změna hmotnosti u skupiny pair-fed od SPa u: A) OVX myších samic na St dietě, B) OVX myších samic na HF dietě.  $n = 10$  myší na skupinu, u skupiny pair-fed 5 myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (fyziologický roztok, SPa nebo skupina pair-fed x den). \* $P < 0,05$ .**



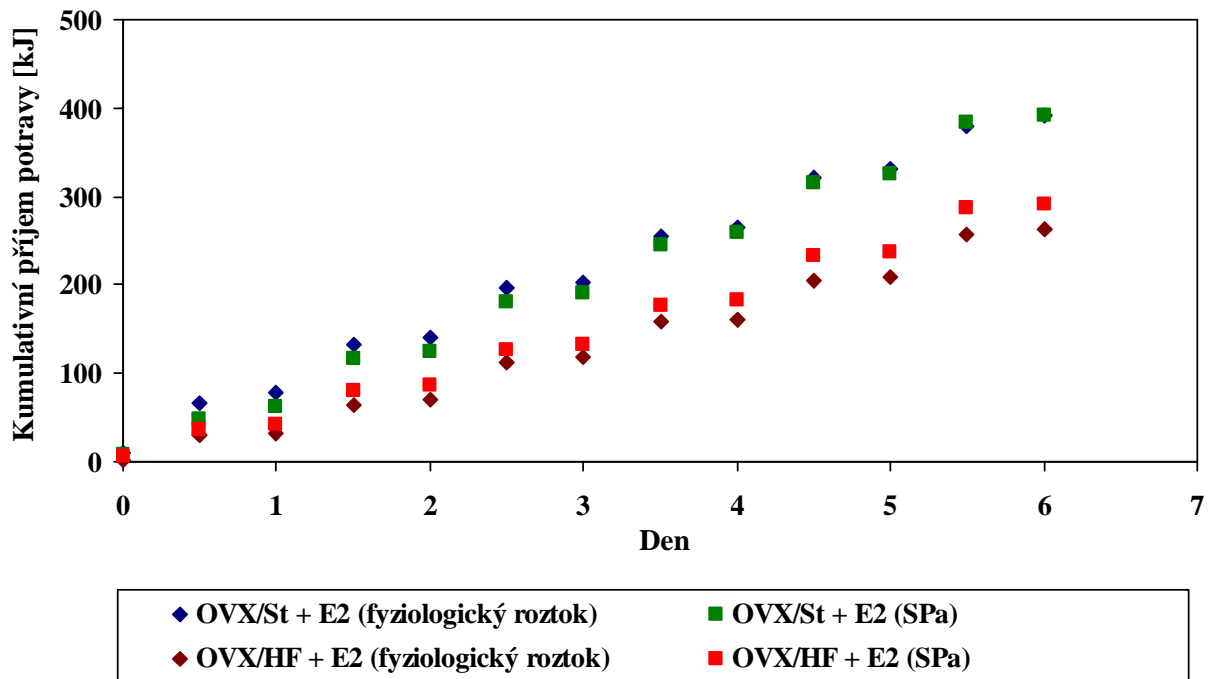
**Obr. 28. Změna hmotnosti po SC podání fyziologického roztoku a SPa a změna hmotnosti u skupiny pair-fed od SPa u:** A) OVX myších samic na St dietě s náhradou E2, B) OVX myších samic na HF dietě s náhradou E2.  $n = 10$  myší na skupinu, u skupiny pair-fed 5 myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (fyziologický roztok, SPa nebo skupina pair-fed x den). Žádné statisticky významné rozdíly nebyly pozorovány.



A)



B)



**Obr. 29. Kumulativní příjem potravy po SC podání fyziologického roztoku a SPa u: A) OVX myších samic na St a HF dietě, B) OVX myších samic na St a HF dietě s náhradou E2.  $n = 10$  myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou two-way ANOVA (látka x den).  $P < 0,05$  od 4,5 dne podání SPa u OVX/St.**

**Tab. 11. Metabolické parametry po SC dlouhodobém podávání SPa u 17 hodin hladových:**

**A) OVX samic na St dietě, B) OVX samic na HF dietě**

**A)**

Látka/skupina	Tuk/tělesná hmotnost [%]	Leptin [ng/ml]	Glukosa [mmol/l]	Inzulin [ng/ml]	Adiponektin [μg/ml]	Triglyceridy [mg/dl]
Fyziologický roztok	7,68 ± 1,47	11,81 ± 5,46	6,25 ± 0,77	0,96 ± 0,27	22,70 ± 1,80	75,69 ± 5,84
SPa	6,37 ± 0,53	4,97 ± 0,74	5,44 ± 0,55	0,49 ± 0,12	29,52 ± 1,13 *	67,62 ± 4,67
pair-fed	7,68 ± 0,52	7,94 ± 1,41	5,46 ± 0,61	0,27 ± 0,03 +	32,10 ± 2,13 ++	73,15 ± 7,40

**B)**

Látka/skupina	Tuk/tělesná hmotnost [%]	Leptin [ng/ml]	Glukosa [mmol/l]	Inzulin [ng/ml]	Adiponektin [μg/ml]	Triglyceridy [mg/dl]
Fyziologický roztok	15,12 ± 0,37	54,97 ± 5,80	7,17 ± 0,28	2,48 ± 0,36	22,77 ± 0,91	83,82 ± 4,14
SPa	13,89 ± 0,54	40,90 ± 6,72	5,75 ± 0,56	1,96 ± 0,27	23,49 ± 0,53	64,45 ± 2,87
pair-fed	13,72 ± 0,56	59,35 ± 7,71	7,12 ± 0,45	1,58 ± 0,41	24,77 ± 2,68	76,92 ± 9,32

Hodnoty jsou vyjádřeny ve tvaru průměr ± SEM. n = 10 myší na skupinu, u skupiny pair-fed 5 myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou one-way ANOVA. \*P < 0,05 (SPa vůči fyziologickému roztoku). +P < 0,05 a ++P < 0,01 (skupina pair-fed vůči fyziologickému roztoku).

**Tab. 12. Metabolické parametry po SC dlouhodobém podávání SPa u 17 hodin hladových:**

**A) OVX samic na St dietě s náhradou E2, B) OVX samic na HF dietě s náhradou E2**

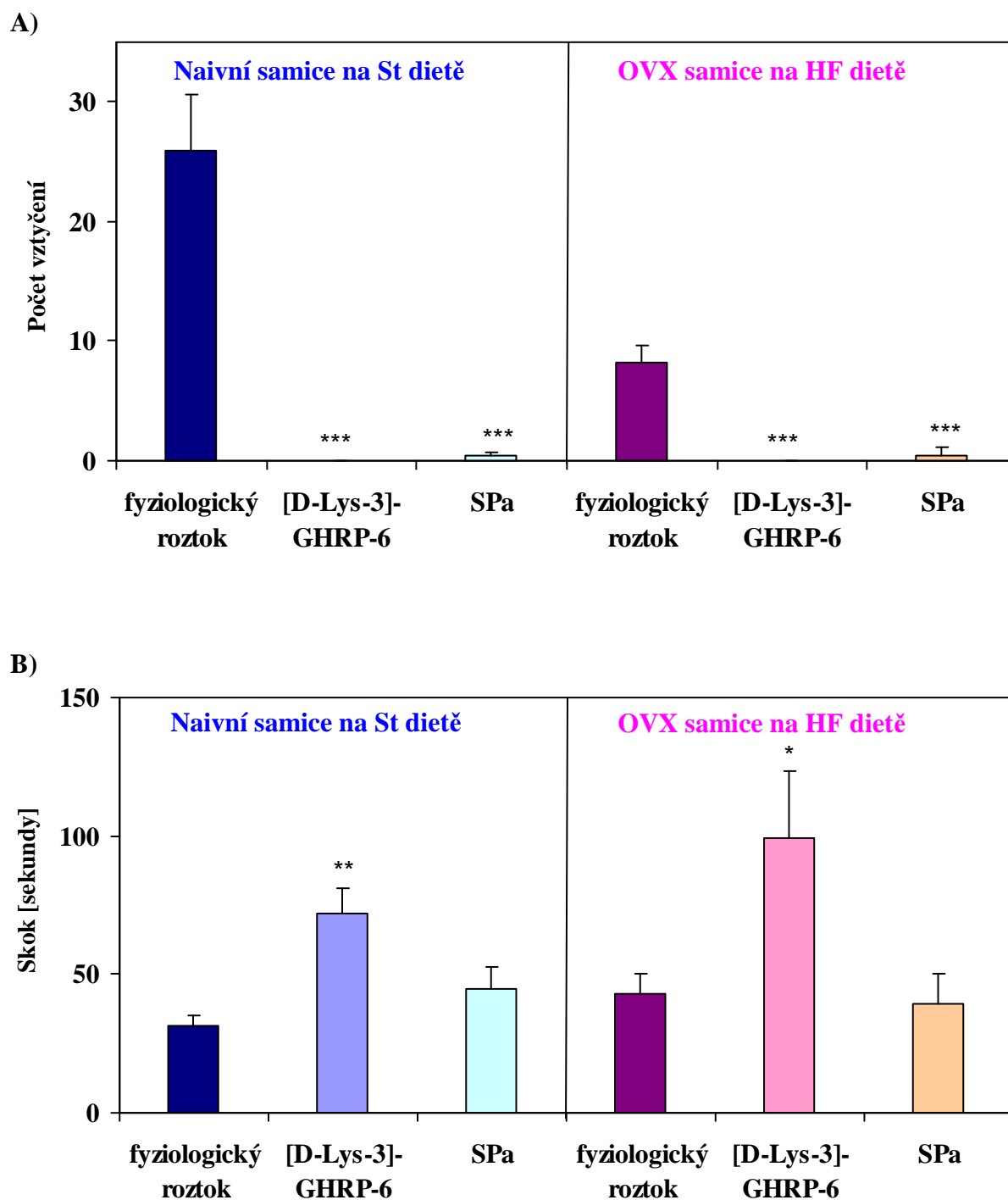
**A)**

Látka/skupina	Tuk/tělesná hmotnost [%]	Leptin [ng/ml]	Glukosa [mmol/l]	Inzulin [ng/ml]	Adiponektin [μg/ml]	Triglyceridy [mg/dl]
Fyziologický roztok	2,80 ± 0,45	3,22 ± 1,13	5,26 ± 0,31	0,20 ± 0,06	14,47 ± 1,86	79,88 ± 11,80
SPa	2,52 ± 0,41	1,75 ± 0,66	5,20 ± 0,32	0,21 ± 0,05	19,06 ± 3,67	75,76 ± 5,40
pair-fed	3,64 ± 0,40	1,97 ± 0,38	4,90 ± 0,29	0,68 ± 0,29	11,22 ± 2,09	56,67 ± 2,48

**B)**

Látka/skupina	Tuk/tělesná hmotnost [%]	Leptin [ng/ml]	Glukosa [mmol/l]	Inzulin [ng/ml]	Adiponektin [μg/ml]	Triglyceridy [mg/dl]
Fyziologický roztok	8,10 ± 0,58	6,63 ± 1,04	4,95 ± 0,22	0,46 ± 0,05	8,14 ± 0,72	86,42 ± 6,24
SPa	7,97 ± 0,83	6,10 ± 2,38	5,43 ± 0,35	0,34 ± 0,06	8,59 ± 2,78	68,33 ± 7,61
pair-fed	8,31 ± 0,95	9,11 ± 1,50	5,62 ± 0,31	1,19 ± 0,27 ++	12,80 ± 1,83	56,44 ± 2,23 ++

Hodnoty jsou vyjádřeny ve tvaru průměr ± SEM. n = 10 myší na skupinu, u skupiny pair-fed 5 myší na skupinu. Statistika byla provedena metodou one-way ANOVA. \*\*P < 0,01 (skupina pair-fed vůči fyziologickému roztoku).



**Obr. 30. Stanovení: A) sedativního (pomocí testu „volného prostoru“) a B) analgetického (pomocí testu „horké plotny“) účinku po podání [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a SPa u naivních samic na St dietě a OVX samic na HF dietě.  $n = 6$  myši na skupinu. Statistika byla provedena metodou one-way ANOVA.  $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$  a  $***P < 0,001$  (látka vůči fyziologickému roztoku).**

## 6. DISKUZE

### 6.1. OBEZITA A PŘÍJEM POTRAVY

Obezita je závažný zdravotní problém, není jen kosmetickou vadou, za kterou byla v minulosti považována. Obezita zvyšuje výskyt diabetu II. typu, vysokého krevního tlaku, úmrtnost na choroby kardiovaskulárního systému a také množství nádorových onemocnění [2]. Množství obézních lidí celosvětově neustále stoupá, a to i v České republice. Dnes máme k dispozici pouze jeden jediný lék, orlistat, který v kombinaci s úpravou diety a životního stylu pomáhá snižovat hmotnost. Nové objevy v oblasti regulace příjmu potravy vedly k závěru, že je tato regulace daleko složitější, než jsme se domnívali.

Dnes již existuje dlouhý seznam látek ovlivňujících příjem potravy. Nejvýznamnější byl roku 1994 objev leptinu [29], hormonu produkovaného zejména buňkami bílé tukové tkáně – adipocyty, který podnítl intenzivní výzkum v regulaci příjmu potravy. Leptin, jakožto látka snižující příjem potravy, vyvolal velké naděje, že se stane lékem pro léčbu obezity. Brzy se ale ukázalo, že právě obézní jedinci mají vysoké hladiny leptinu v krvi a přes to jsou necitliví na jeho účinky [45]. Takto byla objevena tzv. rezistence k leptinu. Ghrelin, přirozený ligand receptoru GHS-R1a, je dalším z hormonů regulujících příjem potravy. Je vylučován zejména žaludkem a účastní se hormonální regulace hlavně v mozku a hypofýze [66]. Protože jedním z účinků ghreluinu je zvyšování příjmu potravy, látky, které blokují jeho účinek, mohou sloužit jako potenciální antiobezitika. Jsou to antagonisté a zejména inverzní agonisté receptoru GHS-R1a. Receptor GHS-R1a vykazuje tzv. konstitutivní aktivitu, tzn., že receptor i bez přítomnosti ligandu vysílá signál do buňky. To by mohlo vést k soustavnému požívání mezi hlavními denními jídly. Inverzní agonisté blokují tuto konstitutivní aktivitu, zabraňují příjmu dalšího jídla mezi hlavními a mohou zvýšit citlivost k anorexigenním hormonům, např. k leptinu a inzulinu. Antagonisté receptoru GHS-R1a nemají vliv na jeho konstitutivní aktivitu, nýbrž „pouze“ snižují účinek agonisty [84].

Pro studium látek ovlivňujících příjem potravy byly v naší studii použity myši. Je třeba zdůraznit, že v každém pokusu byl jiný zdroj myšního kmene C57BL/6, který je uveden v metodách a výsledcích. To mělo vliv na míru obezity. Není pochyb, že kmen C57BL/6 je vhodným pro studium obezity u myši, ale bohužel míra tloustnutí se v každém pokusu trochu lišila. Dle zdroje odběru myši se do budoucna jeví jako vhodný zdroj kmene C57BL/6 společnost AnLab, Praha, ČR. Myši od společnosti AnLab opakovaně přibíraly stejně v našich

experimentech. Tato společnost je navíc mezinárodně uznávaná (obchodní kontakty s Charles River Laboratories v Německu).

## **6.2. CHARAKTERIZACE MODELU OBEZITY VYVOLANÉ VYSOKOTUČNOU DIETOU U MYŠÍ**

Model obezity vyvolané HF dietou u myši je vhodný pro studium lidské obezity, neboť tyto myši se podobně jako lidé stanou obézními v důsledku konzumace vysokotučné potravy. Tento model byl zaveden u oubredních NMRI a inbredních C57BL/6 samců a samic dlouhodobým kmením HF dietou, která obsahovala 60 % tuku.

Obezita navozená HF dietou je závislá mimo jiné na typu zvířecího kmene [118, 119]. Kmen C57BL/6 je široce užíván pro studium obezity u myši [119, 121, 128]. Lin a kol. ukázali, že samci z kmene C57BL/6 po 19 týdnech krmení HF dietou měli vyšší tělesnou hmotnost, množství bílé tukové tkáně, hladiny leptinu v krvi než myši krmené St dietou a vyvinula se u nich rezistence k leptinu [119]. V naší studii samci z kmene C57BL/6 na HF dietě neměli významně zvýšenou tělesnou hmotnost (obr. 10A), ale i přesto akumulovali statisticky významně více tuku než jejich kontroly na St dietě (tab. 5). Na rozdíl od samců, samice na HF dietě z kmene C57BL/6 měly významně zvýšenou tělesnou hmotnost již po 5 týdnech krmení HF dietou (obr. 10B) a akumulovaly významně více tuku (tab. 5) než jejich kontroly na St dietě. Je známo, že sérové hladiny leptinu jsou obecně vyšší u žen než u mužů. Souvisí to s vyšší akumulací podkožního tuku u žen než u mužů (exprese mRNA pro leptin je vyšší v podkožním tuku než v nitrobřišním) a s faktem, že estrogeny zvyšují produkci a expresi leptinu [34, 35, 36]. Naši samci a samice na HF dietě z kmene C57BL/6 měli významně zvýšené hladiny leptinu v séru ve srovnání s jejich kontrolami na St dietě (tab. 5). Důvody pro hyperleptinemii nejsou zatím známy, má se ale za to, že dochází k poruše účinnosti leptinu na úrovni signalizace leptinovými receptory [47, 49]. Samci a samice na HF dietě z kmene C57BL/6 dále měli významně zvýšené hladiny glukosy ve srovnání s jejich kontrolami na St dietě, avšak pouze samice měly ještě navíc významně zvýšené hladiny inzulínu v séru (tab. 5).

Ve studii Huanga a kol. dlouhodobé krmení HF dietou nijak významně neovlivnilo tělesnou hmotnost u myši z linie NMRI [129]. Je to v souladu s naší studií, která ukázala, že samci a samice na HF dietě z linie NMRI neměli statisticky významně zvýšenou hmotnost

(obr. 10A a 10B) ani významně změněné metabolické parametry s výjimkou zvýšených hladin glukosy u samic ve srovnání s jejich kontrolami na St dietě (tab. 5).

Naše výsledky vedou k závěru, že myši z inbredního kmene C57BL/6 jsou náchylnější k obezitě vyvolané HF dietou než myši z outbrední linie NMRI, zejména samice z kmene C57BL/6, které dlouhodobým krmením HF dietou vykazovaly statisticky vyšší tělesnou hmotnost, množství bílé tukové tkáně, sérové hladiny leptinu, glukosy a inzulinu ve srovnání s jejich kontrolami na St dietě. Tyto výsledky již byly publikovány [126].

### **6.3. CHARAKTERIZACE MODELU OVARIKTOMOVANÝCH MYŠÍCH SAMIC NA VYSOKOTUČNÉ DIETĚ**

Z našich předchozích výsledků je zřejmé, že samice na HF dietě z kmene C57BL/6 jsou extrémně náchylné k obezitě. Pro další studie byly pokusy provedeny pouze na samicích z kmene C57BL/6.

OVX samice na HF dietě představuje model obezity vyvolané HF potravou za stavu nedostatku estrogenu. Tento model je podobný obezitě u žen po menopauze, které konzumují nadbytek tuku ve stravě.

Tento model byl zaveden u inbredních C57BL/6 samic. Tyto myši byly dlouhodobě krmeny HF dietou, která obsahovala 60 % tuku. V naší studii byly všechny samice ovariektomovány kvůli snížení endogenních hladin E2. Ačkoliv měly OVX samice na HF dietě podobný denní energetický příjem jako jejich OVX kontroly na St dietě (tab. 6), od 4. týdne krmení HF dietou vážily významně více (obr. 12) a po 19 týdnech na HF dietě akumulovaly více než 4x bílé tukové tkáně než OVX samice na St dietě (tab. 7).

Polovině OVX samic na St a HF dietě ve 24. týdnu věku (do 27. týdne věku) byl podáván SC E2 každé 4 dny (pro obnovení jejich estrálního cyklu [20, 110]) a druhá polovina myší zůstala nedotčena (tedy s nedostatkem E2). Dodání E2 snížilo denní energetický příjem (tab. 6), tělesnou hmotnost (obr. 12) a množství bílé tukové tkáně (tab. 7) u OVX samic na HF dietě ve srovnání s OVX samicemi na HF dietě bez dodání E2. Tyto výsledky jsou v souladu s literaturou, která říká, že ovariektomie způsobuje vzrůst příjmu potravy a tukové tkáně u hlodavců a dodání E2 navrátí jejich tělesnou hmotnost a množství přijaté potravy do normálu [20, 110].

Je známo, že potrava obsahující větší množství živočišného tuku nebo rostlinného oleje přispívá k vývoji obezity [120, 121]. Na začátku našich experimentů byl ve HF dietě myši použit rostlinný olej, ale později se ukázalo, že prasečí sádlo je pro manipulaci vhodnější, a proto bylo sádlo použito jako součást HF diety v dalších našich pokusech. Navíc se v literatuře sádlo ukázalo jako jeden z neúčinnějších druhů tuků ve vývoji obezity u hlodavců [130]. Obdobně jako v této studii naše OVX samice na HF dietě měly statisticky významně zvýšené hladiny leptinu, inzulinu a glukosy ve srovnání s OVX samicemi na St dietě (tab. 7).

Dodání E2 nevýznamně ovlivnilo hladiny leptinu, inzulinu a glukosy u OVX samic na St dietě ve srovnání s OVX samicemi bez E2 (tab. 7). Obdobně je to ve studii Bryzgalové a kol., kde byly koncentrace leptinu, inzulinu a glukosy nezměněné u starých neovariektomovaných myši s náhradou E2 ve srovnání se samicemi bez E2 [131]. V naší studii dodání E2 OVX samicím na HF dietě navrátilo hladiny leptinu, inzulinu a glukosy do hladin pozorovaných u OVX samic na St dietě, stejně jako ve studii Bryzgalové a kol. [131].

Rezistin je adipokin s velmi kontroverzně popsányými účinky. Není jasné, zda exprese a sekrece rezistinu jsou při obezitě zvýšené [55, 57] nebo snižené [58, 59, 60, 61]. Na druhou stranu plazmatické koncentrace adiponektinu jsou sníženy u obézních jedinců a zvýšeny u štíhlých [53]. V naší studii podání E2 statisticky významně snížilo sérové hladiny adiponektinu a rezistinu u OVX samic na HF dietě ve srovnání s těmi bez E2 (tab. 7), pravděpodobně důsledkem snížení množství bílé tukové tkáně po dodání E2. Podobně je tomu i v literatuře, kde E2 způsobil snížení hladin adiponektinu a rezistinu u starých samic [131] a potlačil koncentrace adiponektinu u OVX samic [112]. Je známo, že adiponektin má pozitivní vliv na citlivost k inzulinu [28, 51]. V naší studii sérové koncentrace adiponektinu byly sniženy u OVX samic na HF dietě s náhradou E2 oproti těm bez dodatku E2 jako důsledek snížení množství bílé tukové tkáně po dodání E2.

Naše výsledky vedou k závěru, že OVX samice na HF dietě představují vhodný model pro studium obezity u žen po menopauze. OVX samice na HF dietě s nedostatkem E2 byly v naší studii extrémně náchylné k HF dietě: měly významně zvýšenou tělesnou hmotnost, množství bílé tukové tkáně a symptomy metabolického syndromu. Dodání E2 těmto myším zlepšilo většinu těchto parametrů. Tyto výsledky již byly publikovány [127].



#### **6.4. VLV VYSOKOTUČNÉ DIETY A ESTRADIOLU NA CENTRÁLNÍ ÚČINKY LEPTINU U OVARIEKTOMOVANÝCH SAMIC**

Z literatury je známo, že po dlouhodobém krmení HF potravou dojde k rezistenci k leptinu a poruše signalizace leptinu do buňky [46, 47, 49, 119]. Z našich předchozích výsledků vyplývá, že OVX samice na HF dietě jsou náchylné k obezitě. Z literatury ale není příliš objasněno, zda za vznik obezity u těchto myší není zodpovědná rezistence k leptinu, zásadního regulátoru příjmu potravy.

Pro tento pokus sloužily inbrední C57BL/6 OVX samice na St a HF dietě s náhradou E2 a bez E2. Nejprve byla studována citlivost leptinu u samců z kmene C57BL/6 na St a HF dietě. Citlivost leptinu u samčích hlodavců je v literatuře dobře prozkoumána [46, 119], proto dávka centrálně podávaného leptinu byla nejprve testována na myších samcích. V naší studii citlivost k leptinu podávaného ICV byla charakterizována jako změna tělesné hmotnosti a kumulativní příjem potravy po 12, 24 a 36 hodinách po injekci leptinu. Samci na St dietě měli statisticky významně sníženou tělesnou hmotnost a příjem potravy po ICV podání leptinu (po celých 36 hodinách od injekce) oproti skupině, které byl podáván fyziologický roztok, zatímco samci na HF dietě nevykazovali žádný statisticky významný pokles v tělesné hmotnosti ani příjmu potravy (obr. 14). Tyto výsledky ukazují, že samci na HF dietě jsou rezistentní na účinky leptinu podávaného ICV, což je v souladu s literaturou: Lin a kol. ukázali, že samci z kmene C57BL/6 jsou náchylní k obezitě, po 8 týdnech na HF dietě byli rezistentní k leptinu podávanému nitrobřišně a po 19 týdnech na dietě byli necitliví na nižší koncentrace leptinu podávaného ICV [119]. Van Heek a kol. naopak ukázali, že samci z kmene C57BL/6 byli citliví na účinky leptinu podávaného ICV a necitliví na leptin podávaný nitrobřišně [46]. Nesrovnalosti ve výsledcích jsou pravděpodobně způsobené složením HF diety, délkou jejího podávání a koncentrací podávaného leptinu. Nicméně je známo, že dlouhodobé krmení HF dietou způsobuje poruchu v signalizaci leptinu do buňky, tedy rezistenci k leptinu [47, 49].

Stejná dávka leptinu podávaného ICV samcům byla testována i u OVX samic na St a HF dietě s náhradou E2 a bez E2. Polovině OVX samic na St a HF dietě byl podáván SC E2 každé 4 dny jeden měsíc před pokusem na příjem potravy a druhá polovina myší zůstala nedotčena (tedy s nedostatkem E2). Po podání leptinu byly provedeny vaginální výtěry, které ukázaly, že OVX samice, kterým byl podáván E2, byly na začátku pokusu na příjem potravy v estru. Pro vyloučení vlivu hormonů estrálního cyklu na příjem potravy během pokusu je důležité, aby byly všechny myši před začátkem experimentu ve stejné fázi estrálního cyklu, která se

synchronizuje dodáním E2. V naší studii dodání E2 OVX samicím na St dietě zvýšilo citlivost na účinky leptinu podávaného ICV (obr. 15B a 16B). Obdobně podání E2 ICV nebo SC po dobu 1 měsíce OVX potkaním samicím zvýšilo citlivost na centrální anorexigenní účinky leptinu [110]. Bylo zjištěno, že dodání E2 zvýšilo sníženou expresi receptorů pro leptin v mozku u OVX potkanů [110, 132]. To by mohlo sloužit jako vysvětlení k naším výsledkům, že přítomnost E2 zvyšovala citlivost na účinky leptinu v mozku.

Na rozdíl od OVX samic na St dietě OVX samice na HF dietě měly sníženou citlivost na účinky leptinu v mozku (obr. 15A a 16A). Domníváme se, že v naší studii je rezistence k leptinu u OVX samic na HF dietě způsobena jak nedostatkem E2, tak i těžkou obezitou vyvolanou dlouhodobým krmením HF dietou. Na druhou stranu dodání E2 OVX samicím na HF dietě snížilo tělesnou hmotnost (obr. 12), množství tuku (tab. 7) a vrátilo citlivost na anorexigenní účinky leptinu v mozku (obr. 15B a 16B) bez ohledu na pokračující příjem HF diety. Dodání E2 zlepšilo expresi receptorů pro leptin v mozku u OVX potkanů [110, 132]. Toto zjištění je v souladu s našimi výsledky, že náhradou E2 u OVX samic na HF dietě bylo dosaženo zvýšené citlivosti k leptinu v mozku i přes snížené hladiny leptinu v séru způsobené snížením množstvím tuku (tab. 7).

Naše výsledky vedou k závěru, že OVX samice na HF dietě s nedostatkem E2 byly náchylné k obezitě a vyvinula se u nich rezistence k centrálnímu leptinu. Dodání E2 navrátilo jejich citlivost k leptinu podávaného ICV. Tato studie je první, která se zabývá účinky leptinu v mozku u OVX myších samic na HF dietě s nedostatkem E2. Tyto výsledky již byly publikovány [127].

## **6.5. Vliv antagonistů a inverzního agonisty receptoru GHS-R1a na příjem potravy u obézních ovariektomovaných samic**

Ghrelín, jediný periferní stimulátor chuti k jídlu, hraje významnou roli v dlouhodobé regulaci příjmu potravy a energetického metabolismu: zvyšuje příjem energie a omezuje její výdej a tím dochází k vzrůstu tělesné hmotnosti. Účinek ghrelínu na příjem potravy je zprostředkován specifickým receptorem GHS-R1a vykazujícím konstitutivní aktivitu. Jak již bylo výše řečeno (viz kapitolu 6.1.), antagonisté a zejména inverzní agonisté snižující konstitutivní aktivitu receptoru GHS-R1a mohou sloužit jako potenciální antiobezitika.

V naší předchozí studii [127] jsme ukázali, že OVX samice na HF dietě jsou obzvláště náchylné k obezitě. Nedávno bylo dokázáno, že vzrůst hmotnosti u OVX potkanů je spojen s orexigenním ghrelinem: účinky ghrelinu jsou stimulovány u OVX hlodavců při nedostatku E2 [115]. Model OVX samic na HF dietě je tedy vhodným modelem pro studium účinků antagonistů a inverzních agonistů receptoru GHS-R1a jakožto potenciálních antiobezitik. Nejprve byl studován krátkodobý a později dlouhodobý vliv těchto látek na příjem potravy u OVX samic bez E2 a s náhradou E2.

### 6.5.1. Test krátkodobého příjmu potravy

Byli testováni peptidoví a nepeptidoví agonisté a antagonisté receptoru GHS-R1a krátkodobě na příjem potravy na samicích z kmene C57BL/6. Účinek agonistů receptoru GHS-R1a na příjem potravy lze dobře měřit u sytých zvířat, u nichž se očekává nízká hladina endogenního ghrelinu. Opačně je to u antagonistů receptoru GHS-R1a – jejich účinek se měří u hladových zvířat.

Pro měření orexigenního účinku jsme používali následující dva agonisty receptoru GHS-R1a: Tyr-Ala-GHRP-6, jehož sekvenci ukazuje tab. 2, a JMV 1843, jehož strukturu ukazuje obr. 7B. Tyr-Ala-GHRP-6 je jeden z analogů synteticky připravených agonistů receptoru GHS-R1a. Jeho účinky jsou lépe popsány *in vitro*: byla určena specifická vazba Tyr-Ala-GHRP-6 k receptoru GHS-R1a na membránách buněk izolovaných z přední hypofýzy a hypotalamu potkana [89] než *in vivo* na příjem potravy. Nepeptidový agonista receptoru GHS-R1a JMV 1843 byl dosud testován pouze na uvolnění růstového hormonu u hlodavců i u lidí [91, 92]. V naší studii byl testován účinek těchto dvou látek na příjem potravy po SC podání sytým naivním samicím na St dietě. Obě látky vykazovaly orexigenní účinek na příjem potravy, přičemž JMV 1843 významněji zvýšil příjem potravy u sytých samic na St dietě (obr. 17), proto byl vybrán pro další testy.

Nejprve byl studován vliv peptidových a nepeptidových antagonistů na orexigenní účinek agonisty JMV 1843 po jeho SC podání sytým naivním samicím na St dietě. Peptidový antagonist receptoru GHS-R1a [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a inverzní agonista SPa, jejichž sekvence ukazuje tab. 3, významně potlačili orexigenní účinek JMV 1843 na příjem potravy u sytých naivních samic na St dietě v závislosti na dávce (obr. 18). I nepeptidový antagonist receptoru GHS-R1a JMV 3002 a JMV 3414, jejichž struktury ukazuje obr. 8A a 8B, blokovali příjem potravy vyvolaný JMV 1843 u sytých naivních samic na St dietě (obr. 19). Krátkodobé účinky [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 jsou v literatuře dobře popsány *in vitro* i *in vivo*. *In vitro* [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6

vytěsnil ghrelin v buněčných membránách buněk CHO-K1 s transfektovaným lidským receptorem GHS-R1a a potkaních hypofyzárních tumorových buňkách RC-4B/C [93, 94]. Dále potlačoval ghrelinem vyvolanou signalizaci do buňky [94, 95]. *In vivo* [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 snižoval příjem potravy jak sám o sobě (u naivních a obézních myší na HF dietě) [96], tak i v přítomnosti agonisty: potlačoval ghrelinem vyvolaný příjem potravy u naivních potkanů [133]. Stejně tak úspěšně i v naší studii [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 významně snížil příjem potravy vyvolaný agonistou JMV 1843. V případě nepeptidového antagonisty JMV 3002 bylo prokázáno, že potlačoval orexigenní účinek ghreluinu a hexarelinu (synteticky připravený agonista receptoru GHS-R1a) na příjem potravy u naivních potkaních samců [99, 101]. My jsme tyto výsledky potvrdili. JMV 3414, stejně jako JMV 3002 a JMV 1843, byl dar od laboratoře prof. Martineze v Montpellier ve Francii. Tato laboratoř má dlouholetou zkušenost v navrhování nepeptidových agonistů a antagonistů receptoru GHS-R1a a dále v jejich testování zejména *in vitro*. V naší laboratoři byly tyto nepeptidové sloučeniny testovány *in vivo*. JMV 3414 je nově navržená nepeptidová látka, která *in vitro* vykazovala agonistickou aktivitu, zatímco *in vivo* se chovala jako antagonist receptoru GHS-R1a: potlačovala příjem potravy u myší po perorálním podání (Fehrentz JA, Martinez J a kol. – doposud nepublikované výsledky). V naší studii *in vivo* JMV 3414 blokoval příjem potravy vyvolaný agonistou JMV 1843 (obr. 19B).

Dále byl v naší studii testován krátkodobý vliv samotných peptidových i nepeptidových antagonistů receptoru GHS-R1a po SC podání hladovým naivním samicím na St dietě. [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a SPa významně snížily příjem potravy u hladových naivních samic na St dietě (obr. 20). SPa se v krátkodobém testu ukázal být jako mocnější antagonist než [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 (obr. 20B). *In vitro* [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a SPa snížily ghrelinem vyvolanou signalizaci do buňky [95]. *In vivo* [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 snižoval příjem potravy krátkodobě u naivních myších samic (nitrobřišní a centrální podání) a myších samců, jejichž obezita byla vyvolaná HF dietou (nitrobřišní podání) [96]. Obdobné výsledky *in vivo* vykazoval krátkodobě na příjem potravy i SPa, který jej snižoval u naivních myších samců po nitrobřišním podání [96]. My jsme tyto výsledky potvrdili. Na druhé straně jsme zjistili, že ačkoliv nepeptidoví antagonisté receptoru GHS-R1a JMV 3002 a JMV 3414 potlačili příjem potravy vyvolaný agonistou JMV 1843, samotní antagonisté neměli vliv na příjem potravy (obr. 21), i když jinde bylo popsáno, že jednorázové podání JMV 3002 do mozku snižovalo příjem potravy u naivních hladových potkanů [99]. Musíme ale vzít v úvahu, že JMV 3002 byl ve zmíněné studii podáván ICV a v naší studii SC. Účinek samotných nepeptidových látek na příjem potravy po ICV a SC podání může být odlišný. Není totiž znám osud těchto látek v organismu po podání do periferie.

Je evidentní, že účinní antagonisté receptoru GHS-R1a po přímém ICV podání snižují příjem potravy, neboť receptor GHS-R1a se vyskytuje v hypotalamu. Je třeba zdůraznit, že přítomnost ghrelinu v mozku je nezbytná pro jeho účinek na příjem potravy. Kromě jeho přímého působení na neurony v mozku může ghrelin působit cestou nervu vagu [78] přes mozkový kmen do hypotalamu. Myší ghrelin, na rozdíl od lidského, zřejmě neprochází hematoencefalickou bariérou [79].

Problém některých nepeptidových látek je jejich horší rozpustnost ve vodě. JMV 3414 byl ve vodě dobře rozpustný, ale JMV 3002 se rozpouští ve fyziologickém roztoku s 30% DMSO. Dále je známo, že JMV 3002 nevykazuje největší účinek při vyšších koncentracích, ale paradoxně při nižších [101]. Může to být způsobeno jeho zhoršenou rozpustností ve fyziologickém roztoku: při vyšších koncentracích v organismu může precipitovat a tudíž je účinek nižší.

[D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a SPa, jakožto látky vykazující silný anorexigenní účinek v krátkodobém testu na příjem potravy, snížily krátkodobý příjem potravy i u hladových OVX samic na St a HF dietě (ty byly na HF dietě 2 měsíce). Tyto naše výsledky poprvé popisují účinek antagonistů receptoru GHS-R1a u obézních OVX samic.

Nepeptidové látky jakožto potenciální terapeutika mají oproti peptidovým své výhody: mají prodloužený účinek tím, že jsou odolné vůči rychlé enzymatické degradaci. Nepeptidoví antagonisté receptoru GHS-R1a, kteří byli k dispozici v naší studii, nesnižovali příjem potravy sami o sobě, ale pouze tlumili orexigenní účinek agonisty receptoru GHS-R1a, takže jsme je nepoužili v dlouhodobém testu na příjem potravy. V budoucnu plánujeme testování dalších nepeptidových antagonistů receptoru GHS-R1a.

Na druhou stranu peptidový antagonist [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 a inverzní agonista SPa snížili příjem potravy u naivních samic na St dietě, a tudíž byli použiti v dlouhodobém testu na příjem potravy.

### **6.5.2. Test dlouhodobého příjmu potravy**

Na rozdíl od krátkodobého pokusu na příjem potravy, kde byl prokázán jak anorexigenní účinek inverzního agonisty receptoru GHS-R1a SPa, tak i antagonisty [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6, při dlouhodobém podání pouze [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 způsobil statisticky významné snížení tělesné hmotnosti a příjmu potravy a zlepšení metabolických parametrů zejména u OVX samic na HF dietě (obr. 24B, 26A a tab. 9B), které jsou podobné modelu lidské obezity při nedostatku estrogenu (ženy po menopauze) a zvýšené konzumaci vysokokalorické stravy. Účinek [D-

Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 na příjem potravy, tělesnou hmotnost a metabolické parametry byl výrazný u OVX samic na HF dietě ve srovnání s OVX samicemi na St dietě a OVX samicemi s náhradou E2 na St a HF dietě. To podporuje naši hypotézu, že antagonisté receptoru GHS-R1a by mohli být zvláště účinní u žen s nedostatkem estrogenu, které navíc konzumují stravu bohatou na tuky. U skupiny pair-fed u OVX samic na HF dietě, jimž bylo podáváno množství potravy zkonzumované myšmi, kterým byl podáván [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6, významně klesla hmotnost (obr. 24B) a došlo u nich k zlepšení metabolických parametrů (tab. 9B). Tyto výsledky naznačují, že hlavní účinek [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 byl potlačení příjmu potravy, který pozitivně přispíval k zlepšení většiny parametrů metabolického syndromu.

Signalizační dráha využívající aktivaci STAT je aktivována jak leptinem, tak i estrogenem [109]. Bylo zjištěno, že účinek estrogenu na příjem potravy je nezávislý na leptinu a dokonce může nahradit anorexigenní účinek leptinu na příjem potravy u hlodavců, kteří jsou rezistentní k leptinu nebo mají vyřazený gen pro leptin nebo jeho receptor [134]. Obdobně je to i v naší studii, kde dodání E2 OVX samicím po dobu 1 měsíce statisticky významně snížilo tělesnou hmotnost u OVX samic na HF dietě, které jsou rezistentní k leptinu (obr. 23, více o rezistenci k leptinu u OVX samic na HF dietě viz článek č. 127 v kapitole 8).

Ghrelin tvoří s leptinem antagonistický funkční pár [66, 72]. Dodání E2 vede k potlačení orexigenního účinku ghreluinu na příjem potravy [115]. V naší studii byl antagonist receptoru GHS-R1a [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 zvláště účinný u modelu rezistence k leptinu (důsledkem obezity vyvolané vysokotučnou stravou) za současného nedostatku estrogenu (po ovariektomii). Zdá se, že inaktivace signalizační dráhy jak leptinu, tak i estrogenu přispívá k citlivosti organismu na účinky antagonistů receptoru GHS-R1a. To vysvětluje, proč OVX samice na St dietě, které jsou citlivé na účinky leptinu, a OVX samice s náhradou E2 jak na St, tak i HF dietě, neměly tak významnou odezvu na anorexigenní účinky [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 jako OVX samice na HF dietě, které nejsou citlivé na účinky leptinu a mají nedostatek E2. Ačkoliv byl [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 nedávno zařazen jako nespecifický antagonist receptoru GHS-R1a [135], v naší studii byl pozorován významný anorexigenní účinek [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 na příjem potravy zejména u OVX samic na HF dietě bez ohledu na jeho zpochybněnou specifitu podobně jako v předchozí studii Asakawy a kol., která prokázala dlouhodobý anorexigenní účinek [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 *in vivo* u *ob/ob* myších samců [96].

Na druhou stranu dlouhodobé podávání SPa, který je považován za inverzního agonistu receptoru GHS-R1a, nemělo významný vliv na příjem potravy navzdory jeho silnému anorexigennímu účinku v krátkodobém testu. Přestože je SPa inverzní agonista receptoru GHS-

R1a, a tak může zcela potlačit konstitutivní aktivitu receptoru GHS-R1a [84], nebyl v naší studii pozorován statisticky významný anorexigenní účinek na příjem potravy v dlouhodobém měřítku. Ačkoliv účinek SPa způsobil jak snížení příjmu potravy, tak pokles hmotnosti u OVX samic na HF dietě ve srovnání se skupinou, které byl podáván fyziologický roztok, tento účinek nebyl statisticky významný (obr. 29A a 27B). Následně pak také parametry metabolického syndromu byly vlivem SPa změněny pouze statisticky nevýznamně (tab. 11B). Jedním z důvodů může být fakt, že SPa působí nespecificky: kromě receptoru GHS-R1a se váže také k receptoru NK1R [104] a receptoru pro bombesin [105]. Inverzní agonismus SPa byl navíc testován hlavně *in vitro* [94, 95] a dlouhodobé účinky *in vivo* mohou být odlišné. Petersen a kol. [106] ukazují snížení tělesné hmotnosti a příjmu potravy po dlouhodobém (6 dnů) podání SPa, avšak jde o centrální podání štíhlým samcům, takže výsledky nelze srovnávat s naším modelem obézních samic a periferním podáním.

Závěrem lze tedy říci, že naše studie potvrdila velký potenciál antagonistů receptoru pro ghrelin jako látek zlepšujících parametry metabolického syndromu. Jednou z velkých výhod těchto látek je jak možnost periferního podání, tak působení nejen v centrálním nervovém systému, ale i v periférii (pankreas, trávicí trakt). V budoucnu se chceme zaměřit na účinky nepeptidových antagonistů GHS-R1a a dále na vliv těchto antagonistů na další parametry související s obezitou a diabetem II. typu. Věříme, že by se tato skupina látek mohla stát novým typem antiobezitních léků.

## 7. ZÁVĚRY

- Samice z kmene C57BL/6 byly náchylné k obezitě způsobené vysokotučnou dietou; vykazovaly největší tendenci k akumulaci tuku a měly významně zvýšené hladiny leptinu, glukosy a inzulínu. Samice z kmene C57BL/6 krmené vysokotučnou dietou jsou vhodným modelem metabolického syndromu způsobeného obezitou a rezistencí k leptinu.
- Ovariectomované myší samice na vysokotučné dietě jsou vhodným modelem pro studium obezity vyvolané vysokotučnou dietou při nedostatku estradiolu jako je běžná obezita u žen po menopauze. Ovariectomované myší samice s nedostatkem estradiolu byly extrémně náchylné k vysokotučné dietě a vyvinula se u nich centrální rezistence k leptinu. Dodání estradiolu snížilo jejich tělesnou hmotnost, množství tuku, hladiny leptinu, glukosy a inzulínu a vrátilo citlivost na účinky leptinu podávaného centrálně.
- Peptidový antagonist receptoru pro ghrelin, [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6, byl zvláště účinný u myší, které jsou rezistentní k leptinu důsledkem krmení vysokotučnou dietou a mají nedostatek estradiolu způsobený ovariectomií: dlouhodobé podání tohoto antagonisty snížilo tělesnou hmotnost a příjem potravy a zlepšilo metabolické parametry u ovariectomovaných myších samic na vysokotučné dietě. [D-Lys<sup>3</sup>]GHRP-6 by tedy mohl být zvláště účinný v případě léčby metabolického syndromu u žen po menopauze a mužů, kteří konzumují stravu bohatou na tuky.



## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Matyšková R, Maixnerová J, Maletínská L. Epidemie obezity a regulace příjmu potravy. *Vesmír* 2008/6; 87: 410.
2. Halford JCG. Pharmacology of appetite suppression: Implication for the treatment of obesity. *Curr Drug Targets* 2001; 2: 353-370.
3. Weigle SD. Pharmacological therapy of obesity: Past, present, and future. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2462-2469.
4. Bray GA, Tartaglia LA. Medicinal strategies in the treatment of obesity. *Nature* 2000; 404: 672-677.
5. Cawthorne MA. Opportunities and challenges for the development of pharmacological therapies for obesity treatment. *Obes Rev* 2007; 8: 131-136.
6. International Obesity Taskforce. <http://www.ietf.org/>
7. Svačina Š. Počet obézních Čechů stoupl za čtyři roky o 450 tisíc. To je varující, říká obezitolog. <http://novinky.cz> Článek ze dne 17. 8. 2009.
8. Newman C. *National Geographic* srpen 2004, str. 36-49.
9. Haluzík M. Definice obezity a její prevalence v populaci, v knize *Poruchy výživy a leptin*, Grada Publishing, Praha, 2002, str. 58-59.
10. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404: 635-643.
11. Hainer V. Přehled zdravotních komplikací obezity, v knize *Základy klinické obezitologie* (Hainer V. a kol.), Grada Publishing, Praha, 2004, str. 42-44.
12. Burns KH, Matzuk MM. Minireview: Genetic models for the study of gonadotropin actions. *Endocrinology* 2002; 143: 2823-2835.
13. Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1251-1263.
14. Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 335-376.
15. Ratner S, Ofri D. Menopause and hormone replacement: Part 1. Evaluation and treatment. *West J Med* 2001; 174: 400-404.

16. Al-Azzawi F, Palacios S. Hormonal changes during menopause. *Maturitas* 2009; 63: 135-137.
17. Hewitt SC, Harrell JC, Korach KS. Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. *Annu Rev Physiol* 2005; 67: 285-308.
18. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: What have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 1999; 20: 358-417.
19. Jones MEE, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, Simpson ER. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12735-12740.
20. Asarian L, Geary N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav* 2002; 42: 461-471.
21. Geary N. Estradiol, CCK and satiation. *Peptides* 2001; 22: 1251-1263.
22. Eckel LA, Houpt TA, Geary N. Estradiol treatment increases CCK-induced c-Fos expression in the brains of ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: R1378-R1385.
23. Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661-671.
24. Wilding JPH. Neuropeptides and appetite control. *Diabet Med* 2002; 19: 619-627.
25. Broberger C, Hökfelt T. Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiol Behav* 2001; 74: 669-682.
26. Broberger C. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Intern Med* 2005; 258: 301-327.
27. Zanella MT, Filho FFR. Emerging drugs for obesity therapy. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2009; 53: 271-280.
28. Koerner A, Kratzsch J, Kiess W. Adipocytokines: leptin - the classical, resistin - the controversial, adiponectin - the promising, and more to come. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 525-546.
29. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse *obese* gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432.
30. Walder K, de Silva A. Leptin and the treatment of obesity. *Drug Dev Res* 2000; 51: 66-79.

31. Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schoner BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP, Schevitz RW. Crystal structure of the *obese* protein leptin-E100. *Nature* 1997; 387: 206-209.
32. Porte Jr D, Baskin DG, Schwartz MW. Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev* 2002; 60: S20-S29.
33. Haluzík M. Regulace exprese leptinového genu, v knize *Poruchy výživy a leptin*, Grada Publishing, Praha, 2002, str. 12-15.
34. Havel PJ, Kasim-Karakas S, Dubuc GR, Mueller W, Phinney SD. Gender differences in plasma leptin concentrations. *Nat Med* 1996; 2: 949-950.
35. Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 2002; 77: 433-444.
36. Shi H, Clegg DJ. Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behav* 2009; 97: 199-204.
37. Hainer V, Bendlová B. Leptin, orgánová steatóza a inzulinorezistence, v knize *Základy klinické obezitologie* (Hainer V. a kol.), Grada Publishing, Praha, 2004, str. 85.
38. Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1023-1028.
39. Gonzalez LC, Pinilla L, Tena-Sempere M, Aguilar E. Leptin<sub>116-130</sub> stimulates prolactin and luteinizing hormone secretion in fasted adult male rats. *Neuroendocrinology* 1999; 70: 213-220.
40. Caprio M, Fabbrini E, Isidori AM, Averas A, Fabbri A. Leptin in reproduction. *Trends in Endocrinol Metab* 2001; 12: 65-72.
41. Hoggard N, Hunter L, Trayhurn P, Williams LM, Mercer JG. Leptin and reproduction. *Proc Nutr Soc* 1998; 57: 421-427.
42. Tortoriello DV, McMinn J, Chua SC. Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice. *Endocrinology* 2004; 145: 1238-1247.
43. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; 83: 1263-1271.
44. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997; 272: 6093-6096.

45. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395: 763-770.
46. Van Heek M, Compton DS, France CF, Tedesco RP, Fawzi AB, Graziano MP, Sybertz EJ, Strader CD, Davis Jr HR. Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* 1997; 99: 385-390.
47. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjørbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2000; 105: 1827-1832.
48. Banks WA, Farrell CL. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. *Am J Physiol* 2003; 285: E10-E15.
49. Münzberg H, Flier JS, Bjørbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 2004; 145: 4880-4889.
50. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose-specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221: 79-83.
51. Matsuzawa Y. Adiponectin: identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. *Atheroscler Suppl* 2005; 6: 7-14.
52. Haluzík M. Adiponectin and its potential in the treatment of obesity, diabetes and insulin resistance. *Curr Opin Investig Drugs* 2005; 6: 988-993.
53. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 79-83.
54. Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, Nelson C, Lowman HB, Wright BD, Skelton NJ, Frantz GD, Tumas DB, Peale FV, Shelton DL, Hébert CC. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J* 2000; 19: 4046-4055.
55. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307-312.
56. Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2001; 276: 11252-11256.

57. Stepan CM, Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends in Endocrinol Metab* 2002; 13: 18-23.
58. Way JM, Görgün CZ, Tong Q, Uyasal KT, Brown KK, Hrrington WW, Oliver Jr WR, Willson TM, Kliewer SA, Hotamisligil GS. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists. *J Biol Chem* 2001; 276: 25651-25653.
59. Lay SL, Boucher J, Rey A, Castan-Laurell I, Krief S, Ferré P, Valet P, Dugail I. Decreased resistin expression in mice with different sensitivities to a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 564-267.
60. Juan CC, Au LC, Fang VS, Kang SF, Ko YH, Kuo SF, Hsu YP, Kwok CF, Ho LT. Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 1328-1333.
61. Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, Sinha MK, Gingerich RL, Scherer PE, Ahima RS. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 2004; 53: 1671-1679.
62. McTernan P, Kusminski CM, Kumar S. Resistin. *Curr Opin Lipidol* 2006; 17: 170-175.
63. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.
64. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 2008; 132: 387-396.
65. Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by posttranslational processing. *J Biol Chem* 2003; 278: 64-70.
66. Kojima M, Kangawa AK. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 2005; 85: 495-522.
67. Inhoff T, Wiedenmann B, Klapp BF, Mönnikes H, Kobelt P. Is desacyl ghrelin a modulator of food intake? *Peptides* 2009; 30: 991-994.
68. Inhoff T, Mönnikes H, Noetzel S, Stengel A, Goebel M, Dinh QT, Riedl A, Bannert N, Wisser AS, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Kobelt P. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides* 2008; 29: 2159-2168.

69. Dornonville de la Cour C, Lindström E, Norlén P, Håkanson R. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regul Pept* 2004; 120: 23-32.
70. Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 2005; 54: 18-24.
71. Van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 2004; 25: 426-457.
72. Kojima M, Kangawa K. Drug insight: the functions of ghrelin and its potential as a multitherapeutic hormone. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2: 80-88.
73. Lorenzi T, Meli R, Marzioni D, Morroni M, Baragli A, Castellucci M, Gualillo O, Muccioli G. Ghrelin: a metabolic signal affecting the reproductive system. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20: 137-152.
74. Ambrogi M, Volpe S, Tamarini C. Ghrelin: central and peripheral effects a novel peptidyl hormone. *Med Sci Monit* 2003; 9: RA217-RA224.
75. Hataya J, Akamizu T, Takaya K, Kanamoto N, Ariyasu H, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4552-4555.
76. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407: 908-913.
77. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194-198.
78. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123: 1120-1128.
79. Banks WA, Tschöp M, Robinson SM, Heiman ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 822-827.

80. McCowen KC, Maykel JA, Bistrrian BR, Ling PR. Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J Endocrinol* 2002; 175: R7-R11.
81. Nogueiras R, Perez-Tilve D, Wortley KE, Tschöp M. Growth hormone secretagogue (ghrelin-) receptors – A complex drug target for the regulation of body weight. *CNS Neurol Disord - Drug Targets* 2006; 5: 335-343.
82. Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Davanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 2001; 50: 707-709.
83. Tritos NA, Kokkotou GE. The physiology and potential clinical applications of ghrelin, a novel peptide hormone. *Mayo Clin Proc* 2006; 81: 653-660.
84. Chollet C, Meyer K, Beck-Sickinger AG. Ghrelin – a novel generation of anti-obesity drug: design, pharmacomodulation and biological activity of ghrelin analogues. *J Pept Sci* 2009; 15: 711-730.
85. Depoortere I. Targeting the ghrelin receptor to regulate food intake. *Regul Pept* 2009; 156: 13-23.
86. Bednarek MA, Feighner SD, Pong SS, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Howard AD, Van der Ploeg LHY, Heck JV. Structure–function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: Minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem* 2000; 43: 4370-4376.
87. Matsumoto M, Hosoda H, Kitajima Y, Morosumi N, Minamitake Y, Tanaka S, Matsuo H, Kojima M, Hayashi Y, Kangawa K. Structure-activity relationship of ghrelin: pharmacological study of ghrelin peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 287: 142-146.
88. Ghigo E, Arvatt E, Muccioli G, Camanni F. Growth hormone-releasing peptides. *Eur J Endocrinol* 1997; 136: 445-460.
89. Sethumadhavan K, Veeraragavan K, Bowers CY. Demonstration and characterization of the specific binding of growth hormone-releasing peptide to rat anterior pituitary and hypothalamic membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 31-37.
90. Muccioli G, Ché C, Ghigo MC, Papotti M, Arvat E, Boghen MF, Nilsson MHL, Deghenghi R, Ong H, Ghigo E. Specific receptors for synthetic GH secretagogues in the human brain and pituitary gland. *J Endocrinol* 1998; 157, 99-106.

91. Guerlavais V, Boeglin D, Mousseaux D, Oiry C, Heitz A, Deghenghi R, Locatelli V, Torsello A, Ghé C, Catapano F, Muccioli G, Galleyrand JC, Fehrentz JA, Martinez J. New active series of growth hormone secretagogues. *J Med Chem* 2003; 46: 1191-1203.
92. Piccoli F, Degen L, MacLean C, Peter S, Baselgia L, Larsen F, Beglinger C, Drewe J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics effects of an oral ghrelin agonist in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 1814-1820.
93. Traebert M, Riediger T, Whitebread S, Scharrer E, Schmid HA. Ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol* 2002; 14: 580-586.
94. Falls HD, Dayton BD, Fry DG, Ogiela CA, Schaefer VG, Brodjian S, Reilly RM, Collins CA, Kaszubska W. Characterization of ghrelin receptor activity in a rat pituitary cell line RC-4B/C. *J Mol Endocrinol* 2006; 37: 51-62.
95. Chu KM, Chow KBS, Leung PK, Lau PN, Chan CB, Cheng CHK, Wise H. Over-expression of the truncated ghrelin receptor polypeptide attenuates the constitutive activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by ghrelin receptors but has no effect on ghrelin-stimulated extracellular signal-regulated kinase 1/2 activity. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 752-764.
96. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Katsuura G, Fujimiya A, Fujino MA, Kasuga M. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 2003; 52: 947-952.
97. Beck B, Richy S, Stricker-Krongrad A. Feeding response to ghrelin agonist and antagonist in lean and obese Zucker rats. *Life Sci* 2004; 76: 473-478.
98. Moulin A, Ryan J, Martinez J, Fehrentz J. A. Recent developments in ghrelin receptor ligands. *Chem Med Chem* 2007; 2: 1242-1259.
99. Salomé N, Haage D, Perrissoud D, Moulin A, Demange L, Egecioglu E, Fehrentz JA, Martinez J, Dickson SL. Anorexigenic and electrophysiological actions of novel ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonists in rats. *Eur J Pharmacol* 2009; 612: 167-173.
100. Salomé N, Hansson C, Taube M, Gustafsson-Ericson L, Egecioglu E, Karlsson-Lindahl L, Fehrentz JA, Martinez J, Perrissoud D, Dickson SL. On the central mechanism underlying ghrelin's chronic pro-obesity effects in rats: new insights from studies exploiting a potent ghrelin receptor antagonist. *J Neuroendocrinol* 2009; 21: 777-785.



101. Moulin A, Demange L, Ryan J, Mousseaux D, Sanchez P, Bergé G, Gagne D, Perrissoud D, Locatelli V, Torsello A, Galleyrand JC, Fehrentz JA, Martinez J. New trisubstituted 1,2,4-triazole derivatives as potent ghrelin receptor antagonists. 3. synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations. *J Med Chem* 2008; 51: 689-693.
102. Holst B, Schwartz TW. Ghrelin receptor mutations – too little height and too much hunger. *J Clin Invest* 2006; 116: 637-641.
103. Ebner K, Singewald N. The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino acids* 2006; 31: 251-272.
104. Djanani A, Kaneider N, Sturn D, Wiedermann C. Agonist function of the neurokinin receptor antagonist, [D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11]substance P, in monocytes. *Regul Pept* 2003; 115: 123-129.
105. MacKinnon A, Waters C, Jodrell D, Haslett C, Sethi T. Bombesin and substance P analogues differentially regulate G-protein coupling to the bombesin receptor. Direct evidence for biased agonism. *J Biol Chem* 2001; 276: 28083-28091.
106. Petersen PS, Woldbye DPD, Madsen AN, Egerod KL, Jin C, Lang M, Rasmussen M, Beck-Sickinger AG, Holst B. In vivo characterization of high basal signaling from the ghrelin receptor. *Endocrinology* 2009; 150: 4920-4930.
107. Karagiannides I, Torres D, Tseng YH, Bowe C, Carvalho E, Espinoza D, Pothoulakis C, Kokkotou E. Substance P as a novel anti-obesity target. *Gastroenterology* 2008; 134: 747-755.
108. Clegg DJ, Riedy CA, Smith KAB, Benoit SC, Woods SC. Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes* 2003; 52, 682-687.
109. Gao Q, Horvath TL. Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294: E817-E826.
110. Clegg DJ, Brown LM, Woods SC, Benoit SC. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes* 2006; 55: 978-987.
111. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ, Retzlaff BM, Knopp RH, Brunzell JD, Kahn SE. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 2003; 46: 459-469.

112. Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 2003; 52: 268-276.
113. Huang SW, Seow KM, Ho LT, Chien Y, Chung DY, Chang CL, Lai YH, Hwang JL, Juan CC. Resistin mRNA levels are downregulated by estrogen in vivo and in vitro. *FEBS Letters* 2005; 579: 449-454.
114. Gui Y, Silha JV, Murphy LJ. Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obes Res* 2004; 12: 1481-1491.
115. Clegg DJ, Brown LM, Zigman JM, Kemp CJ, Strader AD, Benoit SC, Woods SC, Mangiaracina M, Geary N. Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes* 2007; 56: 1051-1058.
116. Sakata I, Tanaka T, Yamazaki M, Tanizaki T, Zheng Z, Sakai T. Gastric estrogen directly induces ghrelin expression and production in the rat stomach. *J Endocrinol* 2006; 90: 749-757.
117. Kolektiv: Chov a využití pokusných zvířat, 1. díl, skriptum Společnosti pro vědu o laboratorních zvířatech, Ediční středisko Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, 1999, str. 98-102.
118. West DB, Waguespack J, McCollister S. Dietary obesity in the mouse: interaction of strain with diet composition. *Am J Physiol* 1995; 268: R658-R665.
119. Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes* 2000; 24: 639-646.
120. Kopecký J, Hodný Z, Rossmeisl M, Syrový I, Kozak LP. Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: physiology and adipose tissue distribution. *Am J Physiol* 1996; 270: E768-E775.
121. Buettner R, Schölmerich J, Bolheimer LC. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 2007; 15: 798-808.
122. Geary N, Asarian L, Korach KS, Pfaff DW, Ogawa S. Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER- $\alpha$  null mice. *Endocrinology* 2001; 142: 4751-4757.

123. Maletínská L, Maixnerová J, Matyšková R, Haugvicová R, Šloncová E, Elbert T, Slaninová J, Železná B. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur J Pharmacol* 2007; 559: 109-114.
124. Lansang MC, Williams GH, Carroll JS. Correlation between the glucose clamp technique and the homeostasis model assessment in hypertension. *Am J Hypertens* 2001; 14: 51-53.
125. Maletínská L, Maixnerová J, Matyšková R, Haugvicová R, Pirnik Z, Kiss A, Železná B. Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice. *BMC Neurosci* 2008; 9: 101-110.
126. Matyšková R, Maletínská L, Maixnerová J, Pirnik Z, Kiss A, Železná L. Comparison of the obesity phenotypes related to monosodium glutamate effect on arcuate nucleus and/or the high fat diet feeding in C57Bl/6 and NMRI mice. *Phys Res* 2008; 57: 727-734.
127. Matyšková R, Železná B, Maixnerová J, Koutová D, Haluzík M, Maletínská L. Estradiol supplementation helps overcome central leptin resistance of ovariectomized mice on a high fat diet. *Horm Metab Res* 2010; 42: 182-186.
128. Thupari JN, Kim EK, Moran TH, Ronnett GV, Kuhajda FP. Chronic C57 treatment of diet-induced obese mice increases fat oxidation and reduces food intake to reduce adipose mass. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287: E97-E104.
129. Huang X, Hansson M, Laurila E, Ahrén B, Groop L. Fat feeding impairs glycogen synthase activity in mice without effects on its gene expression. *Metabolism* 2003; 52: 535-539.
130. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 2006; 36: 485-501.
131. Bryzgalova G, Lundholm L, Portwood N, Gustafsson J-A, Khan A, Efendic S, Dahlman-Wright K. Mechanism of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295: E904-E912.
132. Kimura M, Irahara M, Yasui T, Saito S, Tezuka M, Yamano S, Kamada M, Aono T. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 1349-1353.
133. Wang Y, Dong L, Cheng Y, Zhao P. Effects of ghrelin on feeding regulation and interdigestive migrating complex in rats. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 447-453.

134. Gao Q, Mezei G, Nie Y, Rao Y, Choi C, Bechmann I, Leranth C, Toran-Allerand D, Priest C, Roberts J, Gao X, Mobbs C, Shulman G, Diano S, Horvath T. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med* 2007; 13: 89-94.
135. Castañeda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschöp MH. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31: 44-60.

## SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

### Publikace týkající se tématu dizertační práce (s IF):

1. **Matyšková R**, Maletínská L, Maixnerová J, Pirnik Z, Kiss A, Železná B. Comparison of the obesity phenotypes related to monosodium glutamate effect on arcuate nucleus and/or the high fat diet feeding in C57BL/6 mice. *Physiol Res* 2008; 57: 727-734. **IF = 1,430 (2009)**
2. **Matyšková R**, Železná B, Maixnerová J, Koutová D, Haluzík M, Maletínská L. Estradiol supplementation helps overcome central leptin resistance of ovariectomized mice on a high fat diet. *Horm Metab Res* 2010; 42: 182-186. **IF = 2,686 (2009)**

### Publikace týkající se tématu dizertační práce (bez IF):

1. **Matyšková R**, Maixnerová J, Maletínská L. Epidemie obezity a regulace příjmu potravy. *Vesmír* 2008/6; 87: 410.

### Publikace týkající se jiných témat (s IF):

1. Maletínská L, **Shamas Toma R\***, Pirnik Z, Kiss A, Slaninová J, Haluzík M, Železná B. Effect of cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice. *Regul Pept* 2006; 136: 58-63. **IF = 2,160 (2009)**
2. Maletínská L, Maixnerová J, **Matyšková R**, Haugvicová R, Šloncová E, Elbert T, Slaninová J, Železná B. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur J Pharmacol* 2007; 559: 109-114. **IF = 2,585 (2009)**
3. Maletínská L, Maixnerová J, **Matyšková R**, Haugvicová R, Pirnik Z, Kiss A, Železná B. Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice. *BMC Neurosci* 2008; 9: 101-110. **IF = 2,744 (2009)**

---

\* Resha Matyšková rozená Shamas Toma

4. Železná B, Maixnerová J, **Matyšková R**, Haugvicová R, Blokešová D, Maletínská L. Anorexigenic effect of cholecystokinin is lost but that of CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice. *Physiol Res* 2009; 58: 717-723. **IF = 1,430 (2009)**
5. Pirnik Z, Maixnerová J, **Matyšková R**, Koutová D, Železná B, Maletínská L, Kiss A. Effect of anorexigenic peptides, cholecystokinin (CCK) and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) peptide, on the activity of neurons in hypothalamic structures of C57Bl/6 mice involved in the food intake regulation. *Peptides* 2010; 31: 139-144. **IF = 2,705 (2009)**

# PŘÍLOHY

## **Příloha 1:**

Matyšková R, Maletínská L, Maixnerová J, Pirník Z, Kiss A, Železná B. Comparison of the obesity phenotypes related to monosodium glutamate effect on arcuate nucleus and/or the high fat diet feeding in C57BL/6 mice. *Physiol Res* 2008; 57: 727-734.

## **Příloha 2:**

Matyšková R, Železná B, Maixnerová J, Koutová D, Haluzík M, Maletínská L. Estradiol supplementation helps overcome central leptin resistance of ovariectomized mice on a high fat diet. *Horm Metab Res* 2010; 42: 182-186.

# Comparison of the Obesity Phenotypes Related to Monosodium Glutamate Effect on Arcuate Nucleus and/or the High Fat Diet Feeding in C57BL/6 and NMRI Mice

R. MATYŠKOVÁ<sup>1</sup>, L. MALETÍNSKÁ<sup>1</sup>, J. MAIXNEROVÁ<sup>1</sup>, Z. PIRNÍK<sup>2</sup>, A. KISS<sup>2</sup>,  
B. ŽELEZNÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic and <sup>2</sup>Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic

Received April 26, 2007

Accepted August 14, 2007

On-line October 11, 2007

## Summary

In this study, susceptibility of inbred C57BL/6 and outbred NMRI mice to monosodium glutamate (MSG) obesity or diet-induced obesity (DIO) was compared in terms of food intake, body weight, adiposity as well as leptin, insulin and glucose levels. MSG obesity is an early-onset obesity resulting from MSG-induced lesions in arcuate nucleus to neonatal mice. Both male and female C57BL/6 and NMRI mice with MSG obesity did not differ in body weight from their lean controls, but had dramatically increased fat to body weight ratio. All MSG obese mice developed severe hyperleptinemia, more remarkable in females, but only NMRI male mice showed massive hyperinsulinemia and an extremely high HOMA index that pointed to development of insulin resistance. Diet-induced obesity is a late-onset obesity; it developed during 16-week-long feeding with high-fat diet containing 60 % calories as fat. Inbred C57BL/6 mice, which are frequently used in DIO studies, both male and female, had significantly increased fat to body weight ratio and leptin and glucose levels compared with their appropriate lean controls, but only female C57BL/6 mice had also significantly elevated body weight and insulin level. NMRI mice were less prone to DIO than C57BL/6 ones and did not show significant changes in metabolic parameters after feeding with high-fat diet.

## Key words

C57BL/6 • NMRI • Mouse • Monosodium glutamate obesity • Diet-induced obesity

## Corresponding author

Blanka Železná, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Prague, Czech Republic. E-mail: zelezna@uochb.cas.cz

## Introduction

Obesity is associated with conditions such as insulin resistance, dyslipidemia and steatosis hepatitis. Appropriate animal models are crucial for studies on the pathogenesis and therapy of this complex metabolic disorder. Several mouse models of obesity have been established, above them models examining monogenic (such as *ob/ob* or *db/db* mice), chemically induced (such as monosodium glutamate-induced (MSG) obesity) or diet-induced obesity (DIO) are widely used (for review see Butler and Cone 2001, Buettner *et al.* 2007).

In this study, outbred (NMRI) and inbred (C57BL/6) mice of both sexes with either MSG obesity or DIO were compared in terms of anatomic and metabolic parameters.

Monosodium glutamate (MSG) obesity with an early onset can be induced to newborn mice with subcutaneous administration of MSG (Olney 1969), which causes lesions in hypothalamic arcuate nucleus (ARC) and impairs leptin and insulin signaling in this region (Broberger *et al.* 1998, Dawson *et al.* 1997; Maletínská *et al.* 2006) resulting in hyperleptinemia and hyperinsulinemia. Although the MSG animals are rather hypophagic (Morris *et al.* 1998), they have a dramatic increase in body fat, which could be explained rather by a lower metabolic rate than by an elevated food intake (Djajazery *et al.* 1979). A marked shrinkage of the ARC in the MSG-treated mice impairs production of growth hormone releasing hormone (GHRH) which results in



shorter body length, atrophied pituitaries, gonads, and optical nerves (Tamura *et al.* 2002).

Diet-induced obesity (DIO) has a late onset and is developed after feeding mice with high-fat diet (HF diet). It is similar to common human obesity resulting from over-consumption of food and sedentary style of life. Depending on animal strain, gender, as well as composition and duration of feeding with high-fat diet, DIO mice developed increased adiposity that resulted in hyperleptinemia and peripheral leptin insensitivity already at 8 weeks on HF diet (Buettner *et al.* 2007, van Heek *et al.* 1997). Later on, failure in down-regulation of food intake by leptin gradually caused central leptin insensitivity (Lin *et al.* 2000, Zhang and Scarpace 2006). Inbred strains of mice prone to DIO such as C57BL/6, AKR/J or DBA/2J were selected previously (West *et al.* 1992). C57BL/6J mice were found useful for development of metabolic syndrome (Collins *et al.* 2004) and altered insulin secretion (Andrikopoulos *et al.* 2005). However, little is known about DIO development and consequences in female mice. Outbred Wistar and Sprague-Dawley rats were used mostly as standard rodents for studying DIO and insulin resistance (Buettner *et al.* 2007). On the contrary, DIO in outbred mice is rarely studied.

In this study, we compared predisposition of outbred NMRI and inbred C57BL/6 mice of both sexes to MSG and DIO obesity in terms of possible leptin and/or insulin resistance which could be used for future pharmacological studies concerning food intake regulation.

## Methods

### *Experimental animals*

NMRI mice (Bio Test, Konárovice, Czech Republic) and C57BL/6 mice (Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic) were housed at a temperature of 23 °C and a daily cycle of 12 h light and dark (light from 6:00). They were given *ad libitum* water and standard chow diet that contained 25, 9 and 66 % calories as protein, fat and carbohydrate, its energy content was 3.4 kcal/g (ST-1, Velaz, Koleč, Czech Republic). All experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and the law of the Czech Republic No. 246/1992.

For MSG obesity, newborn mice were administered with MSG (4 mg/g body weight, s.c.) from postnatal day 2 to 8. "Osmolality" controls were treated

with saline of osmolality corresponding to the MSG solution (Ježová *et al.* 1998).

For DIO development, mice were fed with HF diet (13, 60 and 27 % calories as protein, fat and carbohydrate, respectively (Kopecký *et al.* 1996)) from 7 weeks of age. The HF diet was composed of 40 % of the chow diet, 34 % powdered cow milk for human neonates, 25 % sunflower oil and 1 % corn starch. Energy content of HF diet was 5.3 kcal/g.

Food consumption and body weight were monitored every week. Daily food intake (24-h food intake) was determined regularly every week from 6 to 15-16 weeks of age in MSG mice and from 8 to 22 weeks of age in mice with DIO (when mice were on HF). In smaller groups (n=3) of 4-, 8- and 12-week-old DIO mice on HF diet, and of their respective controls, fat and body weight were determined.

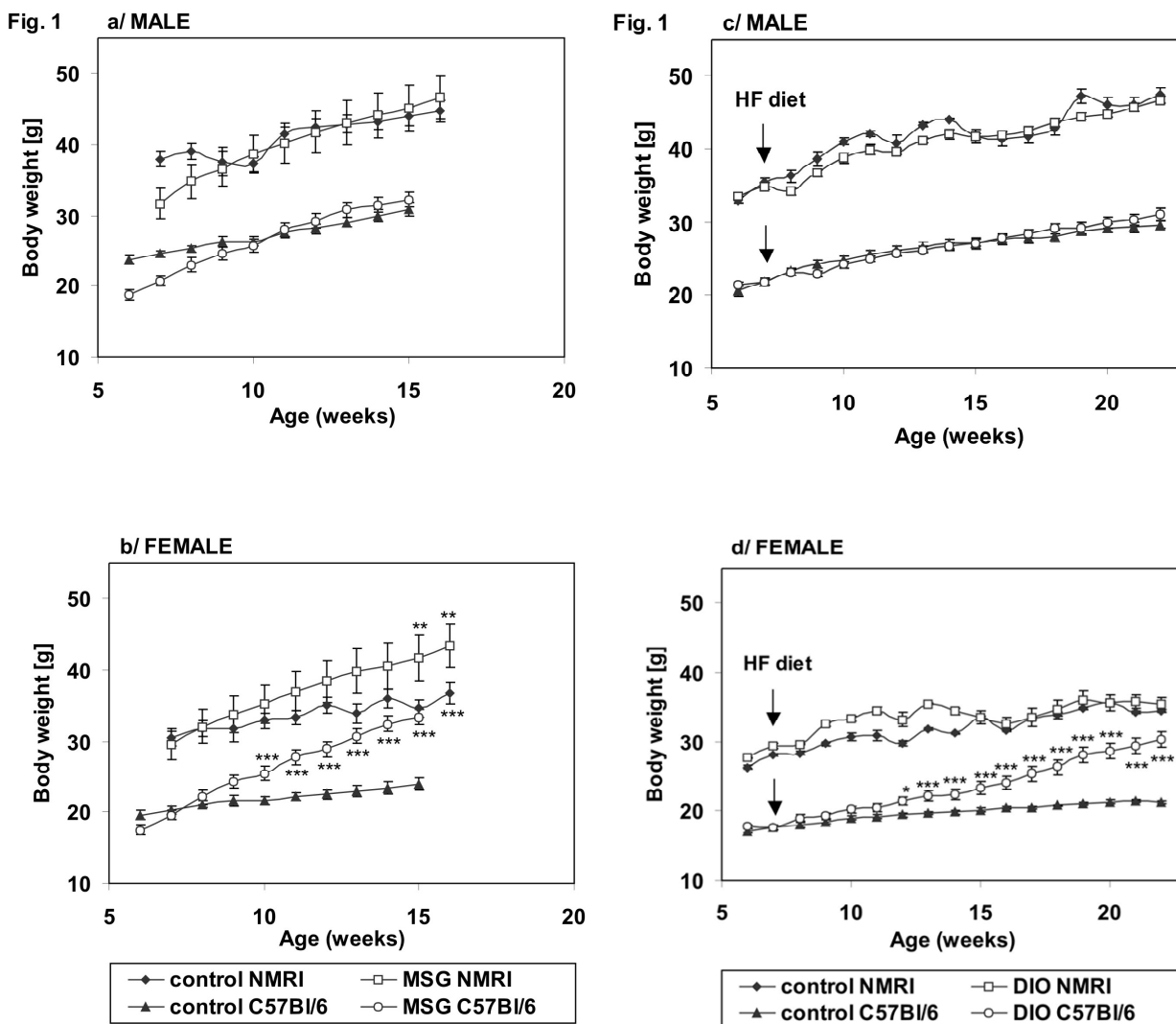
MSG treated mice at 16 weeks of age (n=20-25 for each sex), their age-related naive and "osmolality" controls, DIO mice after 16 weeks on HF diet (n=20-25 for each sex), and their age-related controls on standard diet were divided into two subgroups of 10-15 mice. One subgroup was fasted overnight and mice sacrificed next morning between 8:00 and 9:00 a.m. In their blood sera, glucose and insulin levels were determined and HOMA index, i.e. fasting plasma glucose [mmol/l] x fasting plasma insulin [pmol/l] / 22.5, was calculated (Lansang *et al.* 2001). Mice from the other group with free access to food were also sacrificed between 8:00 and 9:00 a.m. In their blood sera, leptin, glucose and insulin levels were determined. White adipose tissue (subcutaneous, abdominal, and gonadal), and liver of all mice were dissected and weighed.

### *Brain histology*

Three male and three female MSG-treated mice of 16 weeks of age and their age-related controls were used for the experiment. They were deeply anesthetized and rapidly perfused transcardially with fixative; coronal sections from their hypothalami were prepared and stained as described earlier (Maletínská *et al.* 2006).

### *Blood serum components*

Leptin and insulin concentrations in sera were quantified by ELISA assay (BioVendor, Brno, Czech Republic) and by RIA assay (Linco Research, St. Charles, MI, USA), respectively. Serum glucose levels were measured by a glucometer (GlucoCard, Arkray, Kyoto, Japan).



**Fig. 1.** Increase in body weight of control, MSG-treated and DIO NMRI and C57BL/6 mice: a/ MSG male, b/ MSG female, c/ DIO male, d/ DIO female (n = 20-25 per group). Significance is \* P<0.05, \*\* P<0.01 and \*\*\* P < 0.001 vs. controls for female mice.

### Statistics

Data are presented as means  $\pm$  SEM for the number of animals indicated in the Figures and Tables. They were analyzed by two-way ANOVA (obesity  $\times$  gender) followed by Bonferroni post hoc test using Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA). P<0.05 was considered statistically significant.

## Results

### MSG obesity

Serial coronal sections of the hypothalami both of inbred NMRI and outbred C57BL/6 mice showed that the MSG treatment caused disappearance of neurons exclusively in ARC and did not affect adjacent hypothalamic nuclei, which was in concordance with our previous study (Maletinská *et al.* 2006). Naive and

“osmolality” controls of the MSG obese mice did not display any histological alterations in their hypothalami (data not shown).

Generally, food consumption of robust NMRI mice was higher than that of subtle C57BL/6 mice which resulted from the fact that NMRI mice had about 50 % higher weight than C57BL/6 at the beginning of the experiment (Fig. 1a-d). Average daily food intake was insignificantly lower in the MSG-treated males and females of both strains compared with their controls (Table 1). Body weight of male MSG obese NMRI and C57BL/6 mice did not differ from that of their controls (Fig. 1a). On the other hand, a significant increase in body weight was obvious in female MSG mice from 15 weeks of age (NMRI) or 9 weeks of age (C57BL/6) (Fig. 1b).

All mice with MSG obesity excessively

**Table 1.** Average daily food intake (g and/or kJ) of control, MSG-treated and DIO male and female NMRI and C57BL/6 mice

Obesity model	Strain	Group	Sex	
			Male	Female
MSG	NMRI	Control	7.72 ± 0.76 g	6.49 ± 0.67 g
		MSG	5.80 ± 0.73 g	6.15 ± 0.48 g
	C57BL/6	Control	4.07 ± 0.16 g	3.96 ± 0.29 g
		MSG	3.62 ± 0.23 g	3.75 ± 0.30 g
DIO	NMRI	Control	7.00 ± 0.45 g (99.67 ± 6.74 kJ)	5.82 ± 0.14 g (82.94 ± 2.82 kJ)
		DIO	7.34 ± 0.54 g (163.01 ± 8.61 kJ) *	4.53 ± 0.16 g (100.68 ± 4.39 kJ)
	C57BL/6	Control	4.07 ± 0.23 g (57.92 ± 1.62 kJ)	3.48 ± 0.14 g (49.62 ± 1.29 kJ)
		DIO	3.55 ± 0.27 g (78.82 ± 2.82 kJ) *	3.14 ± 0.23 g (69.69 ± 2.96 kJ) *

All values are expressed as mean ± SEM (n = 20-25 per group). Significance is \* P<0.05 (mouse model of obesity vs. respective control).

accumulated subcutaneous, abdominal and gonadal fat and showed dramatically enhanced fat and body weight (Table 2). The liver weight was insignificantly lowered in the MSG obese females and males of both strains, partial steatosis was seen in all MSG animals (Table 2).

All non-fasted mice with MSG obesity had massively increased leptin levels in their blood sera (Fig. 2a,b). NMRI male mice with MSG obesity developed extreme hyperinsulinemia (Fig. 2a); this was in agreement with their HOMA index (Table 3), which was dramatically enhanced in MSG NMRI males compared with their controls (241.9±59 vs. 8.5±0.6) (Table 3). HOMA index is an indicator of relative insulin resistance and was calculated from glucose and insulin levels after 17-h fasting. Insignificantly enhanced HOMA index was also registered in MSG females of both strains (Fig. 2b, Table 3). However, in fed MSG females of both strains, glucose level did not differ significantly from controls, although insulin level was significantly elevated (Fig. 2b).

#### DIO obesity

As shown in Table 1, the amount of food consumed per day by DIO and control C57BL/6 mice did not differ significantly, but logically, energetic intake was higher in mice fed with HF diet compared with controls consuming standard diet, except of NMRI females (Table 1). NMRI mice of both sexes on HF diet (Fig.

1c,d) did not show any significant alterations in their body weight during development of DIO compared with their controls. Female C57BL/6 mice with DIO had significantly increased body weight compared with their controls since 6 weeks on the HF diet, i.e. since 13 weeks of age (Fig. 1d). The increase in body weight of C57BL/6 males was insignificant compared with their controls.

Both male and female C57BL/6 mice with DIO excessively accumulated subcutaneous, abdominal, and gonadal fat (Table 2); after 12 weeks on HF diet the fat to body weight ratio was substantially enhanced (percent of body fat ratio was 3.7±1.14 for male controls and 10.76±2.74 for DIO males; 2.33±0.38 for female controls and 12.04±4.78 for DIO females, P<0.01 for both males and females). In DIO C57BL/6 females, liver had significantly pronounced steatosis (Table 2). On the contrary, increase in fat weight was not significant in NMRI DIO mice of both sexes after 16 weeks on HF diet (Table 2).

Leptin and glucose levels but not insulin level were significantly enhanced in C57BL/6 mice of both sexes with DIO (Fig. 2a,b). Significant increase in insulin level was registered only in female C57BL/6 mice but was not accompanied with an increase in HOMA index. Metabolic parameters of NMRI mice with DIO did not show significant differences compared with lean controls, except of glucose level in females (Fig. 2b).

**Table 2.** Characterization of control, MSG-treated and DIO NMRI and C57BL/6 mice subjected to 17 h fasting at 16 weeks (for MSG) or at 23 weeks (for DIO) of age

Obesity model	Strain	Sex	Group	Body weight (g)	Fat weight (g)	Liver weight (g)
MSG	NMRI	Male	Control	44.7 ± 1.54	0.50 ± 0.25	1.82 ± 0.24
			MSG	46.7 ± 3.03	4.54 ± 0.42 ***	1.53 ± 0.10
		Female	Control	36.7 ± 2.03	0.54 ± 0.05	1.50 ± 0.14
			MSG	43.4 ± 2.75 **	4.64 ± 0.38 ***	1.20 ± 0.09
	C57BL/6	Male	Control	30.9 ± 0.90	0.43 ± 0.06	1.20 ± 0.15
			MSG	32.3 ± 1.10	4.35 ± 0.32 ***	1.06 ± 0.13
		Female	Control	23.9 ± 0.57	0.33 ± 0.05	1.23 ± 0.13
			MSG	33.4 ± 0.92 ***	6.25 ± 0.42 ***	1.11 ± 0.11
DIO	NMRI	Male	Control	47.3 ± 0.99	0.82 ± 0.19	1.88 ± 0.11
		DIO	46.7 ± 0.50	3.56 ± 0.90	2.06 ± 0.12	
	Female	Control	34.5 ± 0.19	1.19 ± 0.43	1.35 ± 0.09	
		DIO	35.4 ± 1.05	1.91 ± 0.11	1.50 ± 0.02	
C57BL/6	Male	Control	29.6 ± 0.52	0.61 ± 0.19	1.20 ± 0.15	
		DIO	31.1 ± 0.96	1.88 ± 0.46 ***	1.11 ± 0.08	
	Female	Control	21.3 ± 0.19	0.49 ± 0.07	1.01 ± 0.11	
		DIO	30.3 ± 1.14 ***	3.97 ± 0.62 ***	1.13 ± 0.07	

All values are expressed as mean ± SEM (n = 20-25 per group). Significance is \*\* P<0.01 and \*\*\* P<0.001 (mouse model of obesity vs. respective control).

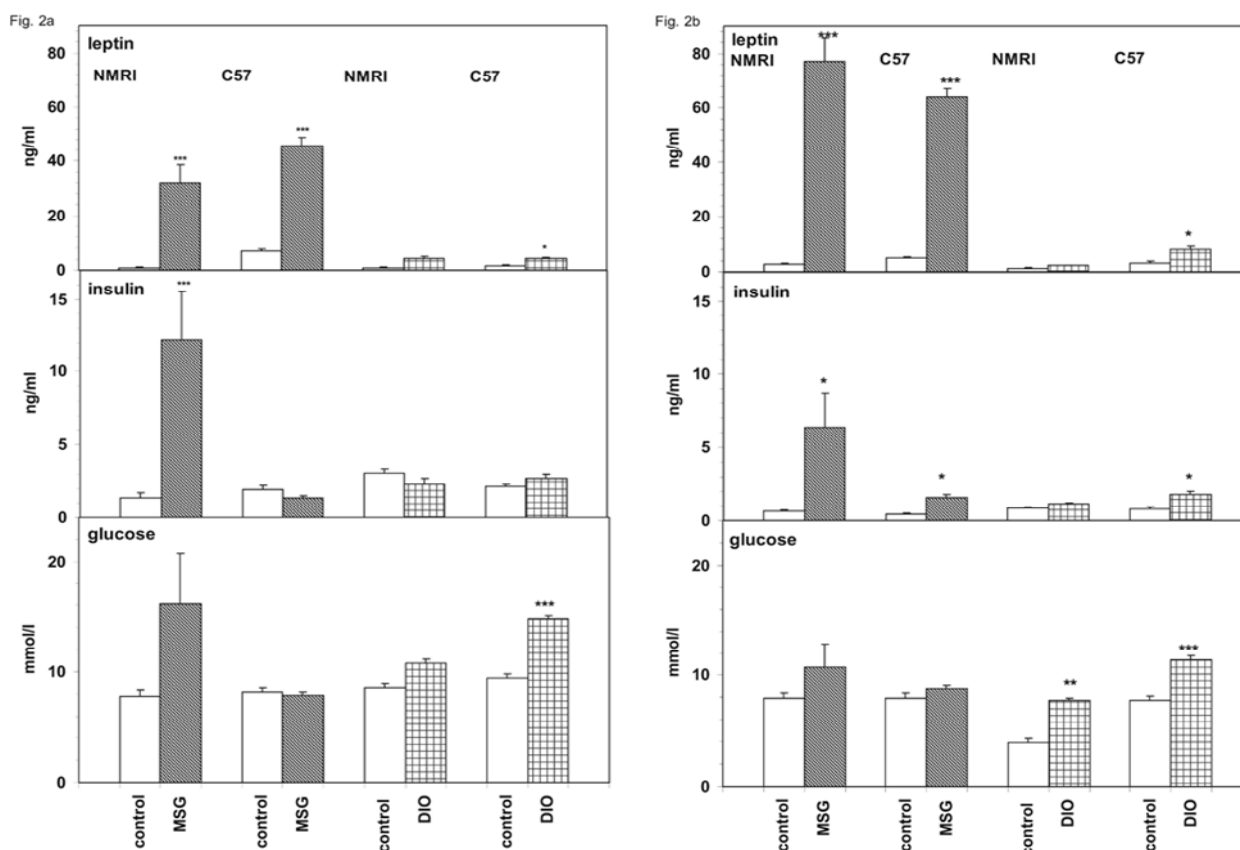
## Discussion

### MSG obesity

In mice with MSG-induced obesity, the number of cells was decreased by 75 % in the ARC, but it was unchanged in other hypothalamic areas (Elefteriou *et al.* 2003). The relationship between MSG-induced damage of the ARC and the metabolic changes that produce obesity at mild hypophagia is poorly understood, one of the basic factors is probably the lack of leptin receptors in ARC (Dawson *et al.* 1997). In this study, MSG treatment of both NMRI and C57BL/6 males resulted in massive enhancement of adipose tissue despite an insignificantly lower food intake and no significant difference in body weight compared with their respective controls. On the other hand, female mice of both strains significantly increased their body weight after the MSG treatment. At 16 weeks of age, fat to body weight ratio of C57BL/6 mice was about 10 times (males) to 20 times (females) higher compared to control mice, whereas in NMRI strain, it was about 8 times higher than in controls both in

males and females. Our findings are in agreement with previous data on C57BL/6 mice with MSG obesity (Matsuki *et al.* 2003, Hollopeter *et al.* 1998). Although the liver had obvious steatosis, its weight was lowered most probably because of lower production of GHRH resulting in smaller organs similarly as it was described for pituitary and gonads (Tamura *et al.* 2002).

Markedly elevated leptin levels in both MSG obese C57BL/6 and NMRI mice pointed to a severe hyperleptinemia, which was more pronounced in females whose leptin level is usually higher than in males. In fed NMRI mice, levels of insulin and glucose were enhanced, but those after 17 h of fasting persisted only in NMRI MSG male mice. It is evident from HOMA index, which was 28 times higher for MSG males compared with lean controls, that the male NMRI mice were more prone to insulin resistance than the female ones and C57BL/6 mice of both sexes. C57BL/6 mice with MSG obesity of both sexes did not show significantly elevated levels of glucose and insulin, unlike Matsuki *et al.* (2003) who found elevated insulin level in C57BL/6J male mice.



**Fig. 2.** Serum leptin, insulin and glucose levels in fed a/ male and b/ female NMRI and C57BL/6 mice with MSG obesity and DIO and their controls (n = 10-15 per group). \* P<0.05, \*\* P<0.01 and \*\*\* P<0.001 (mouse model of obesity vs.respective controls).

**Table 3.** Metabolic parameters of control and MSG-treated NMRI and C57BL/6 mice subjected to 17 h fasting at 16 weeks of age

Strain	Sex	Group	Glucose (mmol/l)	Insulin (ng/ml)	HOMA
NMRI	Male	Control	5.55 ± 1.88	0.20 ± 0.04	8.5 ± 0.6
		MSG	9.50 ± 2.56 *	3.31 ± 3.00 **	241.9 ± 59.0 ***
	Female	Control	5.65 ± 0.86	0.33 ± 0.10	9.2 ± 0.1
		MSG	5.75 ± 0.94	0.52 ± 0.10	14.7 ± 1.3
C57BL/6	Male	Control	3.48 ± 0.54	0.38 ± 0.09	10.2 ± 0.4
		MSG	3.19 ± 0.55	0.65 ± 0.31	15.9 ± 1.3
	Female	Control	4.59 ± 0.28	0.26 ± 0.02	14.3 ± 0.7
		MSG	2.98 ± 0.75	0.64 ± 0.23	23.0 ± 0.7

All values are expressed as mean ± SEM (n = 10-15 per group). Significance is \* P<0.05, \*\* P<0.01 and \*\*\* P<0.001 (mouse model of obesity vs. respective control).

C57BL/6 mouse strain is widely used for development of diet-induced obesity (Lee *et al.* 2005, Thupari *et al.* 2004, for review see Buettner *et al.* 2007). Lin *et al.* (2000) described that DIO C57BL/6 male mice showed increased body weight, adiposity and leptin and developed leptin resistance after 19 weeks on HF diet.

However, they were later divided into obesity-resistant (without changes in body weight after HF diet) and obesity-susceptible groups (Huang *et al.* 2003). In this study, C57BL/6 male mice with DIO obesity did not show a significant increase in their body weight compared with their lean controls (about 1.5 g, Table 2)

although their increase in fat weight was significant (increase about 1.3 g, Table 2) and corresponded to the increase in body weight. It means that the lean weight remained unchanged. Park *et al.* (2005) also found no change in lean mass at an increased fat mass in C57BL/6 mice after 20 weeks on HF diet. However, their study lacked the data between 5 and 20 weeks on HF diet. Unlike males, female C57BL/6 DIO mice in our study substantially increased body weight already after 5 weeks on HF diet (in agreement with Huang *et al.* (2003)) and accumulated seven times more adipose tissue. Both C57BL/6 females and males significantly increased leptin and glucose level compared with their lean controls, but only females had also significantly elevated insulin level. HOMA index in all fasted DIO mice did not show any significant difference from that of fasted controls.

HF diet up to 6 months did not significantly alter body weight in female NMRI mice (Huang *et al.* 2003). In our study, NMRI DIO mice of both sexes did not show any changes in anatomical and metabolic parameters, except of elevated glucose level in males.

## Conclusions

The early-onset MSG obesity resulted in substantially increased fat to body weight ratio in both strains and both sexes. MSG obese males and females of both strains had dramatically increased leptin levels resulting from attenuated leptin signaling in ARC and being a good model of ARC-located leptin resistance.

## References

- ANDRIKOPOULOS S, MASSA CM, ASTON-MOURNEY K, FUNKAT A, FAM BC, HULL RL, KAHN SE, PROIETTO J: Differential effect of inbred mouse strain (C57BL/6, DBA/2, 129T2) on insulin secretory function in response to a high fat diet. *J Endocrinol* **187**: 45-53, 2005.
- BROBERGER C, JOHANSEN J, JOHANSSON C, SCHALLING M, HOKFELT T: The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 15043-15048, 1998.
- BUETTNER R, SCHOLMERICH J, BOLHEIMER LC: High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* **15**: 798-808, 2007.
- BUTLER AA, CONE RD: Knockout models resulting in the development of obesity. *Trends Genet* **17**: S50-S54, 2001.
- COLLINS S, MARTIN TL, SURWIT RS, ROBIDOUX J: Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiol Behav* **81**: 243-248, 2004.
- DAWSON R, PELLEYMOUNTER MA, MILLARD WJ, LIU S, EPPLER B: Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. *Am J Physiol* **273**: E202-E206, 1997.
- DJAZAYERY A, MILLER DS, STOCK MJ: Energy balances in obese mice. *Nutr Metab* **23**: 357-367, 1979.
- ELEFTERIOU F, TAKEDA S, LIU X, ARMSTRONG D, KARSENTY G: Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone mass. *Endocrinology* **144**: 3842-3847, 2003.

Only outbred NMRI MSG male mice developed complex diabetes-obesity syndrome similar to the (*db/db*) genotype mutation (Harris *et al.*, 2001) and thus showed up as a favorable model for studies of insulin resistance.

In C57BL/6 animals but not in NMRI mice, late-onset DIO resulted in substantially increased fat to body weight ratio. Unlike inbred C57BL/6, outbred NMRI females did not significantly tend to fat accumulation and development of changes in the metabolic parameters after being on high-fat diet. DIO obesity resulted in significant hyperleptinemia and hyperglycemia in C57BL/6 of both sexes but not in NMRI mice; insulin level was significantly elevated only in C57BL/6 females. Female C57BL/6 DIO mice showed the most significant fat accumulation besides significantly elevated leptin, glucose and insulin levels. We therefore consider them useful for study of obesity, obesity-related metabolic syndrome and leptin resistance based on gender differences.

## Conflict of Interest

There is no conflict of interest.

## Acknowledgements

The study was supported by grants 303/05/0614 of the Grant Agency of the Czech Republic and Z4 055 0506 of the Academy of Sciences of the Czech Republic. We are indebted to A. Vytejčková and H. Vysušilová for their excellent technical assistance.

- HARRIS RBS, MITCHELL TD, YAN X, SIMPSON JS, REDMANN JR SM: Metabolic responses to leptin in obese db/db mice are strain dependent. *Am J Physiol* **281**: R115-R132, 2001.
- HOLLOPETER G, ERICKSON JC, PALMITER RD: Role of neuropeptide Y in diet-, chemical and genetic-induced obesity of mice. *Int J Obes* **22**: 506-512, 1998.
- HUANG X, HAN M, SOUTH T, STORLIEN L: Altered levels of POMC, AgRP and MC4-R mRNA expression in the hypothalamus and other parts of the limbic system of mice prone or resistant to chronic high-energy diet-induced obesity. *Brain Res* **992**: 9-19, 2003.
- HUANG X, HANSSON M, LAURILA E, AHREN B, GROOP L: Fat feeding impairs glycogen synthase activity in mice without effects on its gene expression. *Metabolism* **52**: 535-539, 2003.
- JEŽOVÁ D, KISS A, TOKAREV D, ŠKULTÉTYOVÁ I: Stress hormone release and propiomelanocortin mRNA levels in neonatal rats treated with monosodium glutamate to induce neurotoxic lesions. *Stress Medicine* **14**: 255-260, 1998.
- KOPECKÝ J, HODNÝ Z, ROSSMEISL M, SYROVÝ I, KOZAK LP: Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: physiology and adipose tissue distribution. *Am J Physiol* **270**: E768-E775, 1996.
- LANSANG MC, WILLIAMS GH, CARROLL JS: Correlation between the glucose clamp technique and the homeostasis model assessment in hypertension. *Am J Hypertens* **14**: 51-53, 2001.
- LEE JH, BULLEN JW, JR, STOYNEVA VL, MANTZOROS CS: Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia. *Am J Physiol* **288**: E625-E632, 2005.
- LIN S, THOMAS TC, STORLIEN LH, HUANG XF: Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* **24**: 639-646, 2000.
- MALETÍNSKÁ L, SHAMAS TOMA R, PIRNIK Z, KISS A, SLANINOVÁ J, HALUZÍK M, ŽELEZNÁ B: Effect of cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice. *Regul Pept* **136**: 58-63, 2006.
- MATSUKI T, HORAI R, SUDO K, IWAKURA Y: IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions. *J Exp Med* **198**: 877-888, 2003.
- MORRIS MJ, TORTELLI CF, FILIPPIS A, PROIETTO J: Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. *Regul Pept* **75-76**: 441-447, 1998.
- OLNEY JW: Brain lesions, obesity and others disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **164**: 719-721, 1969.
- PARK SY, CHO YR, KIM HJ, HIGASHIMORI T, DANTON C, LEE MK, DEY A, ROTHERMEL B, KIM YB, KALINOWSKI A, RUSSEL KS, KIM JK. Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57Bl/6 mice. *Diabetes* **54**: 3530-3540, 2005.
- TAMURA H, KAMEGAI J, SHIMIZU T, ISHII S, SUGIHARA H, OIKAWA S. Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats. *Endocrinology* **143**: 3268-3275, 2002.
- THUPARI JN, KIM E, MORAN TH, RONNETT GV, KUHAJDA FP: Chronic C75 treatment of diet-induced obese mice increases fat oxidation and reduces food intake to reduce adipose mass. *Am J Physiol* **287**: E97-E104, 2004.
- VAN HECK M, COMPTON DS, FRANCE CF, TEDESCO RP, FAWZI AB, GRAZIANO MP, SYBERTZ EJ, STRADER CD, DAVIS HR JR: Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J Clin Invest* **99**: 385-390, 1997.
- WEST DB, BOOZER CN, MOODY DL and ATKINSON RL: Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am J Physiol* **262**: R1025-R1032, 1992.
- ZHANG Y, SCARPACE PJ: The role of leptin in leptin resistance and obesity. *Physiol Behav* **88**: 249-256, 2006.
-

# Estradiol Supplementation Helps Overcome Central Leptin Resistance of Ovariectomized Mice on a High Fat Diet

## Authors

R. Matyšková<sup>1</sup>, B. Železná<sup>1</sup>, J. Maixnerová<sup>1</sup>, D. Koutová<sup>1</sup>, M. Haluzík<sup>2</sup>, L. Maletínská<sup>1</sup>

## Affiliations

<sup>1</sup>Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic  
<sup>2</sup>Third Department of Medicine, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

## Key words

- leptin
- estrogen deficiency
- obesity
- adipokines

## Abstract

Ovariectomized mice on a high fat diet represent a model of diet-induced obesity during estrogen deficiency. Here, we tested the hypothesis that sensitivity to centrally administered leptin in ovariectomized mice with diet-induced obesity could be restored by estrogen supplementation. Ovariectomized C57BL/6 female mice were fed either a standard or high fat diet until they were 27 weeks old. Ovariectomized mice on a high fat diet developed extreme obesity and hyperleptinemia and moderate hyperinsulinemia compared to those on a standard diet. For the last 4 weeks, 17 $\beta$ -estradiol-3-benzoate or its vehicle was administered subcutaneously in a 4-day cyclic regimen. Finally, leptin or saline was injected into the third ventricle, and food intake and body weight were measured for 36h.

In ovariectomized mice fed a standard diet, the decrease in food intake and body weight was significant and was pronounced in 17 $\beta$ -estradiol-3-benzoate-supplemented mice. The response to centrally injected leptin in ovariectomized mice on a high fat diet was insignificant, whereas in 17 $\beta$ -estradiol-3-benzoate-supplemented mice, the effect was significant, particularly with respect to body weight. We showed for the first time that central insensitivity to leptin in ovariectomized diet-induced obese mice was restored with 17 $\beta$ -estradiol-3-benzoate supplementation, which also attenuated most of the parameters of metabolic syndrome. Only circulating adiponectin, a peripheral insulin sensitivity marker, was lowered following 17 $\beta$ -estradiol-3-benzoate administration in both high fat and standard diet-fed ovariectomized mice, despite of decreased or unchanged glycemia, respectively.

received 21.07.2009  
accepted 17.11.2009

## Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1243250>  
Published online:  
January 4, 2010  
Horm Metab Res 2010;  
42: 182–186  
© Georg Thieme Verlag KG  
Stuttgart · New York  
ISSN 0018-5043

## Correspondence

**Dr. Lenka Maletínská**

Institute of Organic Chemistry  
and Biochemistry  
Academy of Sciences of the  
Czech Republic  
Flemingovo n. 2  
166 10 Prague  
Czech Republic  
Tel.: +42 0220183525  
Fax: +42 0220183571  
maletin@uochb.cas.cz

## Introduction

In females, changing states of reproductive functions are accompanied by eating disorders and obesity. Menopause is especially associated with the accumulation of abdominal fat and increased risk of cardiovascular diseases [1].

Body fat storage in mammals is reflected by leptin, an adipocyte-born cytokine (adipokine), which decreases food intake through its specific receptors located in the hypothalamus. Leptin-deficient *ob/ob* mice and leptin receptor-deficient *db/db* mice or *fa/fa* rats show increased food intake and suffer from severe obesity [2–4]. However, the majority of humans with simple obesity have their circulating leptin levels elevated, which points to leptin resistance [5] characterized by an increased circulating leptin and a decreased response to exogenous leptin. The causes of leptin resistance remain unclear. Potential causes are disrupted leptin transport through

the blood-brain-barrier and impaired leptin intracellular signaling [6,7].

In females, leptin is closely associated with the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis: leptin stimulates the release of a gonadotropin-releasing hormone from the hypothalamus [8] and enhances the secretion of a luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the anterior pituitary [9]. Ovariectomy, which almost completely eliminates circulating estradiol, disrupts the HPG axis and causes an increase in feeding and body adiposity. Estradiol supplementation normalized both feeding and body weight in ovariectomized (OVX) rodents [10,11]. Clegg et al. showed that estradiol subcutaneously administered to OVX female or male rats enhanced central leptin anorexigenic action, and centrally administered estradiol increased sensitivity to leptin and lowered insulin sensitivity [12]. Recently, a revolutionary study showed that proopiomelanocortin neurons in the arcuate



nucleus, which are normally activated by leptin, were given excitatory input by estradiol in *ob/ob* and *db/db* mice. Despite failed leptin receptor signaling in these mice, estrogen reduced body weight via the estrogen receptor ER $\alpha$  through the activation of signal transducer and activator of transcription 3, which is the common target of estrogen and leptin signaling [13].

In this study, we hypothesized that estradiol could normalize central leptin resistance in OVX mice with diet-induced obesity (DIO). DIO in C57BL/6 female mice is accompanied by hyperleptinemia and hyperinsulinemia [14], which makes it similar to common human obesity caused by overconsumption of high fat food. In this study, we examined the hypothesis that estradiol supplementation could restore the central sensitivity to leptin and positively affect metabolic parameters in DIO OVX mice.

## Materials and Methods



### Experimental animals and diets

Inbred C57BL/6 female mice (Velaz, Koleč, Czech Republic) were housed at 23 °C and a daily cycle of 12 h light and dark (light from 6:00 AM). They were provided water ad libitum and fed a standard (St) diet that contained 25, 9, and 66% calories as protein, fat, and carbohydrate, respectively. Its energy content was 3.4 kcal/g (St-1, Mlýn Kocanda, Jesenice, Czech Republic). All experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and the laws of the Czech Republic No. 246/1992.

DIO mice were fed a high fat (HF) diet (containing 13, 60, and 27% calories as protein, fat and carbohydrate, respectively [15]) from 8 to 27 weeks of age. The HF diet was composed of 40% chow St-1 diet, 34% powdered cow milk for human neonates, 25% lard, and 1% cornstarch. The energy content of the HF diet was 5.3 kcal/g.

Food consumption and body weight were monitored every week from 6 to 27 weeks of age. One-third of the mice were resistant to the HF diet (did not exhibit changes in body weight after a HF diet) and were withdrawn from the experiment.

### Ovariectomy and 17 $\beta$ -estradiol-3-benzoate supplementation

At 5 weeks of age, mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (100 mg/kg ketamine, 16 mg/kg xylazine, Spofa, Prague, Czech Republic) and bilaterally ovariectomized according to Geary and Asarian [16].

17 $\beta$ -Estradiol-3-benzoate (E2) was randomly subcutaneously administered to half of the OVX mice (8  $\mu$ g/mouse, dissolved in sesame oil; Sigma, St. Louis, USA) every 4 days, one month before the food intake experiment [12].

In the pair-feeding experiment, OVX mice fed the HF diet were given food amount consumed by OVX mice supplemented with E2. Their body weight was measured every week for one month.

### Central administration of leptin and food intake experiment

At 26 weeks of age, mice were implanted with intracerebroventricular (ICV) cannulas (Plastics One, Roanoke, USA) into the third ventricle (AP 2 mm, V 3 mm) as described previously [17]. The animals were placed in separate cages with free access to food and water and allowed at least 7 days to recover from surgery before being used in the experiment.

Food intake experiment was performed with 4 groups, each of 20 mice:

1. OVX/St: OVX mice fed a St diet,
2. OVX/HF: OVX mice fed a HF diet,
3. OVX/St + E2: OVX mice fed a St diet with E2 supplementation,
4. OVX/HF + E2: OVX mice fed a HF diet with E2 supplementation.

On the day of the experiment at 18:00 PM, freely fed mice were injected ICV with 5  $\mu$ l of saline or leptin at a dose of 5  $\mu$ g/mouse (dissolved in saline). The solutions were infused in 20 seconds, and the infusion cannula was left in place for an additional 20 seconds to prevent reflux. Immediately after injection, vaginal smears were taken to determine the phase of the estrous cycle. Mice were given St or HF diet weighed food pellets. The mice and pellets were weighed 12, 24, and 36 h after ICV injection. The animals had free access to water during the experiment.

Mice with free access to food were sacrificed 36 h after the saline or leptin ICV injection, and blood serum samples were collected. The white adipose tissue (subcutaneous, abdominal, and gonadal) of all mice was dissected and weighed.

### Blood serum components

The biochemical parameters were measured in fed saline-treated mice at the end of the food intake experiment. Insulin and adiponectin concentrations in sera were quantified by RIA and leptin concentrations by ELISA (Linco Research, St. Charles, MI, USA). The resistin concentrations in sera were quantified by ELISA (BioVendor, Brno, Czech Republic). The serum glucose levels were measured using a glucometer (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japan). The serum triglycerides levels were measured by quantitative enzymatic reactions (Sigma, St. Louis, USA).

### Statistical analysis

The data are presented as means  $\pm$  SEM for the number of animals indicated in the Figures and Table. They were analyzed by two-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test using Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA). p-values <0.05 were considered statistically significant.

## Results



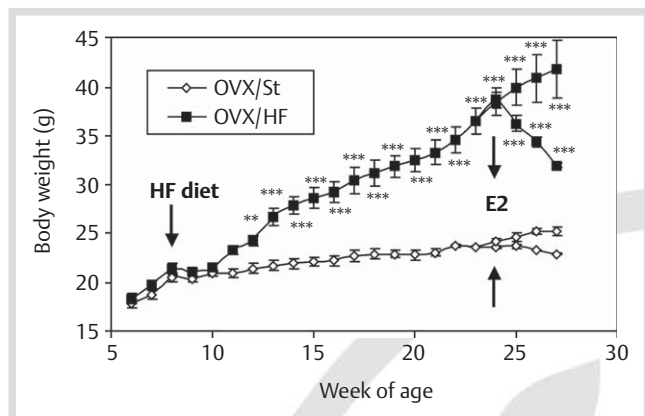
### Characterization of female obese mice

In this study, OVX mice on the St diet had similar energetic intake to those on the HF diet: 45.59  $\pm$  1.87 kJ and 49.72  $\pm$  1.12 kJ, respectively. However, 4 weeks of feeding on the HF diet significantly increased the body weight of the OVX mice compared with those on the St diet ( $\circ$  Fig. 1). After 19 weeks on the HF diet, OVX mice accumulated more than 4 times the white adipose tissue of those on the St diet (Table 1).

E2 supplementation lowered energetic intake to a similar extent in both HF and St diet-fed OVX mice: 41.96  $\pm$  1.76 kJ and 41.20  $\pm$  2.76 kJ, respectively. After 1-month-long E2 treatment, the body weight of OVX mice on the HF diet supplemented with E2 was 31.88  $\pm$  0.19 g whereas that of pair-fed OVX mice on the HF diet 35.50  $\pm$  1.25 g.

### Central administration of leptin and food intake experiment

OVX mice on the St diet responded to centrally injected leptin with a significant attenuation of their body weight within 36 h.



**Fig. 1** Increase in body weight of OVX mice on a St and HF diet (n = 20 animals per group). Mice were fed a HF diet from 8 to 27 weeks of age. E2 was administered from 24 to 27 weeks of age. The data were analyzed by two-way ANOVA (diet × week of age). The significance is \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001.

Their cumulative food intake decreased significantly after only 36 h compared with their saline-treated controls (○ Fig. 2A and 3A). E2 supplementation to OVX mice fed the St diet increased sensitivity to centrally administered leptin (○ Fig. 2B and 3B). In contrast to OVX mice on the St diet, those fed the HF diet were insensitive to central anorexic action of leptin: both their loss of body weight and decrease in cumulative food intake were statistically insignificant compared with saline-treated controls (○ Fig. 2A and 3A). However, OVX mice fed the HF diet supplemented with E2 had restored central leptin sensitivity in terms of body weight over the whole time interval following central leptin injection and a cumulative food intake in the 36 h observation period (○ Fig. 2B and 3B).

### Biochemical parameters

The biochemical parameters were measured in fed saline-treated mice after the food intake experiment and are summarized in Table 1. OVX mice on the HF diet developed significant hyperglycemia and hyperinsulinemia, and extreme hyperleptinemia compared with those on the St diet. Their adiponectin and triglycerides levels were similar to mice fed the St diet. E2 supplementation significantly lowered leptin, adiponectin, and resistin levels in HF-fed OVX mice in parallel with a very significant decrease in fat/body weight. Interestingly, OVX mice on the HF diet had lower resistin levels than those on the St diet.

### Discussion and Conclusions

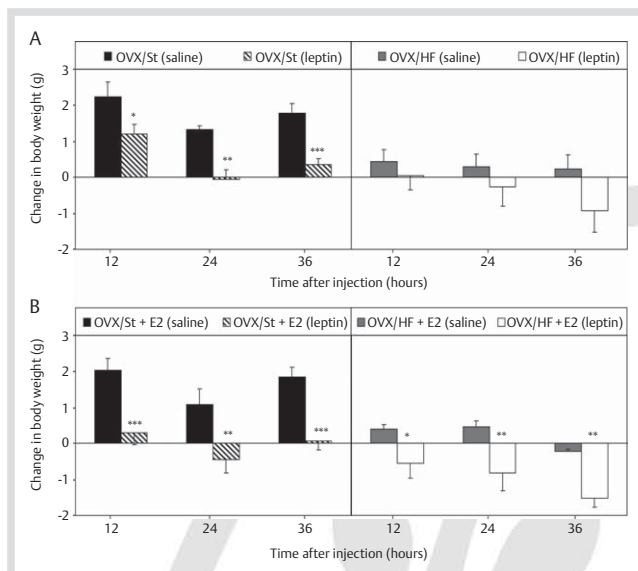
Mice fed a HF diet for more than 4 weeks were reported to develop DIO with leptin resistance similar to common human obesity caused by overconsumption of HF food and low energy expenditure [6, 18]. AKR/J, SWR/J, and C57BL/6 mice were found to be especially susceptible to DIO [18, 19]. In a previous study, we demonstrated that after 19 weeks on a HF diet, male C57BL/6 mice developed severe obesity accompanied with hyperleptinemia, and in females pronounced hyperinsulinemia was also observed [14].

In this study, all mice were OVX to eliminate endogenous circulating E2. Although OVX mice on the HF diet did not differ in

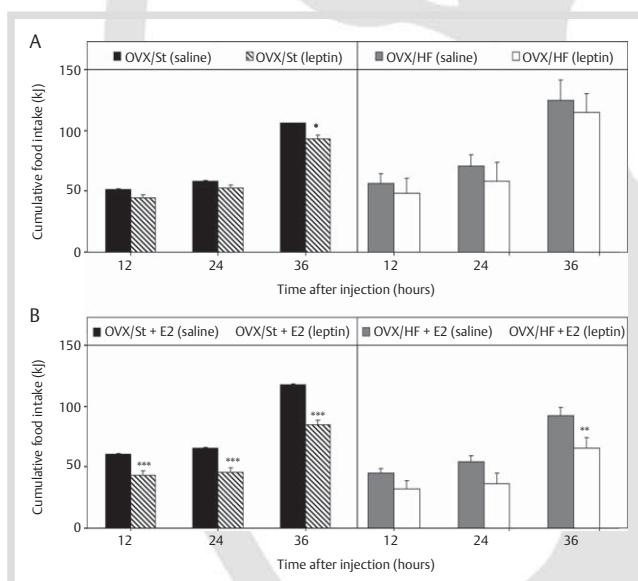
**Table 1** The metabolic parameters of saline-treated OVX mice and OVX mice with E2 supplementation on both the St and HF diet<sup>a</sup>

Groups of mice	Fat/body mass (%)	Glucose (mmol/l)	Insulin (ng/ml)	Leptin (ng/ml)	Adiponectin (μg/ml)	Resistin (ng/ml)	Triglycerides (mg/dl)
OVX/St	2.59 ± 0.32	5.98 ± 0.18	0.33 ± 0.04	3.35 ± 0.55	22.24 ± 2.34	35.60 ± 4.89	58.2 ± 0.40
OVX/St + E2	1.13 ± 0.09	6.02 ± 0.16	0.86 ± 0.18	2.51 ± 0.54	14.66 ± 2.04	36.85 ± 4.80	66.1 ± 0.37
OVX/HF	11.62 ± 0.66	7.62 ± 0.23	1.33 ± 0.27	17.37 ± 2.58	21.54 ± 1.59	23.06 ± 1.11	70.7 ± 0.47
OVX/HF + E2	3.88 ± 0.73	5.37 ± 0.18	0.79 ± 0.24	2.59 ± 0.59	9.04 ± 1.11	13.34 ± 1.66	68.8 ± 0.34

<sup>a</sup>All values are expressed as the mean ± SEM (n = 6–8 animals per group). The metabolic parameters of the mice were analyzed by two-way ANOVA (diet × E2 treatment). The significance is \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, and \*\*\*p < 0.001.



**Fig. 2** The effect of centrally administered leptin on body weight after saline or leptin (5  $\mu$ g/mouse) administration to: **(A)** OVX mice on a St and HF diet and **(B)** OVX mice on a St and HF diet after E2 administration (n=6–8 animals per group). The change in body weight is presented at 12, 24, and 36 h after saline or leptin injection. The data were analyzed by two-way ANOVA (compound  $\times$  time after injection). The significance is \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, and \*\*\* $p$ <0.001.



**Fig. 3** The effect of centrally administered leptin on the cumulative food intake after saline or leptin (5  $\mu$ g/mouse) administration to: **(A)** OVX mice on a St and HF diet and **(B)** OVX mice on a St and HF diet after estrogen E2 administration (n=6–8 animals per group). The data were analyzed by two-way ANOVA (compound  $\times$  time after injection). The significance is \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, and \*\*\* $p$ <0.001.

their caloric intake from those on the St diet, they accumulated more than 4 times the white adipose tissue (Table 1).

At 24 weeks of age, HF and St diet-fed OVX mice were either supplemented with E2 or treated with a vehicle. E2 supplementation was performed in a 4-day cyclic regimen for the last 4 weeks to restore the estrous cycle. Vaginal smears showed that all mice

supplemented with E2 were in estrus at the beginning of the food intake experiment.

In our study, sensitivity to centrally administered leptin was followed by a loss of body weight and decrease in food intake within 36 h. E2 supplementation to OVX mice fed the St diet increased sensitivity to centrally administered leptin especially regarding cumulative food intake, which became significant after 12 h (○ Fig. 2B and 3B). Analogously, a 1-month-long subcutaneous or intracerebroventricular E2 supplementation was reported to increase sensitivity to leptin anorexic action in the brain of OVX rats [12]. The finding that E2 supplementation normalized the decreased expression of leptin receptors in the brain of OVX rats might explain this phenomenon [12,20].

Unlike OVX mice on the St diet, those on the HF diet had decreased sensitivity to centrally administered leptin (○ Fig. 2A and 3A). We propose that insensitivity to central leptin of OVX mice on the HF diet in this study resulted from both lacking E2 and severe DIO; E2 supplementation lowered body weight and fat/body weight ratio and restored sensitivity to leptin regardless of continual HF feeding. Normalized expression of leptin receptors in the brain of OVX rats after E2 supplementation found by others [12,20] could explain the increased central leptin sensitivity after lowered peripheral leptin levels resulting from a decrease in fat. In addition, it has been shown that intravenous leptin infusion increased fatty acid oxidation in the liver of OVX rats [21]. However, it was shown that E2 supplementation reduced food intake and body weight in *ob/ob* mice, suggesting that the effect of E2 occur, at least in part, independent of leptin signaling [22].

Lard that was used as a fat component of the HF diet in this study was previously shown to be a powerful type of fat in the development of pronounced obesity with insulin resistance in rats [23]. Analogously in this study, OVX mice on the HF diet consisting of lard developed extreme hyperleptinemia, significant hyperinsulinemia, and hyperglycemia compared with those on the St diet (Table 1).

E2 supplementation did not significantly affect glucose, insulin, and leptin levels in OVX mice on the St diet, corroborating the results of Bryzgalova et al., where old mice were supplemented with estrogen to levels observed in young mice [24]. In the present study, E2 treatment of OVX mice on the HF diet normalized glucose, insulin, and leptin levels to those of OVX mice fed the St diet similar to the observations of Bryzgalova et al. [24]

The physiological aspects of resistin are highly controversial: it is not clear whether resistin expression and secretion are increased [25,26] or decreased during the development of obesity [27–29]. On the other hand, plasma adiponectin levels are generally higher in lean individuals than in obese ones [30]. In our study, E2 treatment significantly lowered both adiponectin and resistin levels in OVX mice on the HF diet (Table 1), probably due to an overall decrease in white adipose tissue resulting from E2 treatment. Similarly, E2 supplementation lowered both adiponectin and resistin levels in old mice [24] and suppressed adiponectin levels in OVX mice [31]. However, E2 did not alter plasma resistin levels in normal female rats [32]. Generally, a positive correlation between adiponectin levels and insulin sensitivity is accepted. In this study, after E2 treatment in OVX mice on the HF diet, circulating adiponectin decreased as a result of lost fat weight, and blood glucose levels were very significantly lowered. On the other hand, it should be considered that estrogen was shown to decrease insulin sensitivity in the brain [12].

In conclusion, OVX mice on a HF diet represent a suitable model for the study of obesity in postmenopausal females. OVX mice with E2 deficiency in this study were extremely prone to a HF diet and developed central leptin resistance. E2 supplementation restored their sensitivity to centrally administered leptin and lowered their fat/body mass ratio that normalized circulating levels of leptin, glucose, and insulin. We showed here for the first time that OVX DIO mice suffered from central insensitivity to leptin that was restored with E2 supplementation.

### Acknowledgements

This work was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (No. 305/06/0427 and 303/09/0744), the Academy of Sciences of the Czech Republic (No. Z40550506), and the Ministry of Health of the Czech Republic (No. MZOVFN2005). We would like to thank Renata Haugvicová for performing the animal surgeries, and Alena Vytejčková and Hedvika Vysušilová for their excellent technical assistance.

### References

- Mayes JS, Watson GH. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev* 2004; 5: 197–216
- Mistry AM, Swick AG, Romsos DR. Leptin rapidly lowers food intake and elevates metabolic rates in lean and ob/ob mice. *J Nutr* 1997; 127: 2065–2072
- Harris RBS, Mitchell TD, Yan X, Simpson JS, Redmann SM Jr. Metabolic responses to leptin in obese db/db mice are strain dependent. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281: R115–R132
- Morton GJ, Niswender KD, Rhodes CJ, Myers MG Jr, Blevins JE, Baskin DG, Schwartz MW. Arcuate nucleus-specific leptin receptor gene therapy attenuates the obesity phenotype of Koletsky (fa/fa) rats. *Endocrinology* 2003; 144: 2016–2024
- Münzberg H, Flier JS, Bjorbaek C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 2004; 145: 4880–4889
- El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest* 2000; 105: 1827–1832
- Banks WA, Farrell CL. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. *Am J Physiol* 2003; 285: E10–E15
- Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 1023–1028
- Gonzalez LC, Pinilla L, Tena-Sempere M, Aguilar E. Leptin 116–130 stimulates prolactin and luteinizing hormone secretion in fasted adult male rats. *Neuroendocrinology* 1999; 70: 213–220
- Asarian L, Geary N. Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav* 2002; 42: 461–471
- Asarian L, Geary N. Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 1251–1263
- Clegg DJ, Brown LM, Woods SC, Benoit SC. Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes* 2006; 55: 978–987
- Gao Q, Horvath TL. Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294: E817–E826
- Matyšková R, Maletínská L, Maixnerová J, Pirník Z, Kiss A, Železná B. Comparison of the obesity phenotypes related to monosodium glutamate effect on arcuate nucleus and/or the high fat diet feeding in C57Bl/6 and NMRI mice. *Physiol Res* 2008; 57: 727–734
- Kopecký J, Hodný Z, Rossmeisl M, Syrový I, Kozak LP. Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: physiology and adipose tissue distribution. *Am J Physiol* 1996; 270: E768–E775
- Geary N, Asarian L, Korach KS, Pfaff DW, Ogawa S. Deficits in E2-dependent control of feeding, weight gain, and cholecystokinin satiation in ER- $\alpha$  null mice. *Endocrinology* 2001; 142: 4751–4757
- Maletínská L, Maixnerová J, Matyšková R, Haugvicová R, Ioncová E, Elbert T, Slaninová J, Železná B. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur J Pharmacol* 2007; 559: 109–114
- Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes* 2000; 24: 639–646
- West DB, Waguespack J, McCollister S. Dietary obesity in the mouse: interaction of strain with diet composition. *Am J Physiol* 1995; 268: R658–R665
- Kimura M, Irahara M, Yasui T, Saito S, Tezuka M, Yamano S, Kamada M, Aono T. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 1349–1353
- Paquette A, Chapados NA, Bergeron R, Lavoie JM. Fatty acid oxidation is decreased in the liver of ovariectomized rats. *Horm Metab Res* 2009; 41: 511–515
- Gao Q, Mezei G, Nie Y, Rao Y, Choi CS, Bechmann I, Leranth C, Toran-Allerand D, Priest CA, Roberts JL, Gao XB, Mobbs C, Shulman GI, Diano S, Horvath TL. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med* 2007; 13: 89–94
- Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 2006; 36: 485–501
- Bryzgalova G, Lundholm L, Portwood N, Gustafsson J-A, Khan A, Efendic S, Dahlman-Wright K. Mechanism of anti-diabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295: E904–E912
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001; 409: 307–312
- Steppan CM, Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends in Endocrinol Metab* 2002; 13: 18–23
- Lay SL, Boucher J, Rey A, Castan-Laurell I, Krief S, Ferré P, Dugail I. Decreased resistin expression in mice with different sensitivities to a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 564–567
- Juan CC, Au LC, Fang VS, Kang SF, Ko YH, Kuo SF, Hsu YP, Kwok CF, Ho LT. Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 1328–1333
- Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, Sinha MK, Gingerich RL, Scherer PE, Ahima RS. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 2004; 53: 1671–1679
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 79–83
- Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 2003; 52: 268–276
- Caja S, Puerta M. Control by reproduction-related hormones of resistin expression and plasma concentration. *Horm Metab Res* 2007; 39: 501–506

