

314C

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2007

Resha Matyšková

**Účinky peptidu CART (cocaine and amphetamine regulated transcript),
cholecystokininu a neuropeptidu Y na příjem potravy
v modelech myší obezity**

Resha Matyšková

Školitelka: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Diplomová práce
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha 2007

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovávala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Lenky Maletínské, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha) a garantky prof. RNDr. Danuše Sofrové, CSc. (PřF UK, Praha), a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne *18. 4. 2007*.....

Maletínská
.....
podpis

Úvodem bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lence Maletínské, CSc. (ÚOCHB AV ČR, Praha) za odborné rady, pomoc a trpělivost nejen při experimentální části práce.

Dále děkuji za zájem, obětavou pomoc a cenné rady při psaní mé diplomové práce prof. RNDr. Danuše Sofrové, CSc. (PřF UK, Praha).

Kolektivu oddělení Biochemie a molekulární biologie ÚOCHB AV ČR děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí, Ing. Blance Železné, CSc., Mgr. Janě Maixnerové a Darje Blokešové za pomoc při experimentální části a Aleně Vytejčkové a Haně Vysušilové za péči o laboratorní zvířata.

Děkuji za spolupráci při podání látek do mozku RNDr. Renatě Haugvicové, CSc. (Mikrobiologický ústav, AV ČR) a za provedení histologie mozku Zdenovi Pírníkovi, PhD a RNDr. Alexanderovi Kissovi, DrSc. (Ústav experimentální endokrinologie, SAV, Bratislava).

V neposlední řadě patří mé velké díky mým rodičům a manželovi za jejich podporu a trpělivost při mých studiích.

Tato práce byla podporována Grantovou agenturou ČR, č. grantu 303/05/0614.

OBSAH

Seznam použitých zkratk	6
1. Úvod	7
1.1. Obezita	7
1.1.1. Příčiny vzniku obezity	8
1.1.2. Zdravotní komplikace při obezitě	9
1.2. Příjem potravy	9
1.2.1. Poruchy příjmu potravy	10
1.2.2. Regulace příjmu potravy	10
1.2.3. Centrální mechanismy regulace příjmu potravy	10
1.2.3.1. Hypotalamus	10
1.2.3.1.1. Jádra hypotalamu	11
1.3. Peptidy ovlivňující příjem potravy	12
1.3.1. Leptin	13
1.3.2. Cholecystokinin	15
1.3.3. Peptidy CART	17
1.3.4. Neuropeptid Y	19
1.4. Zvířecí modely	20
1.5. Modely myši obezity	21
1.5.1. <i>Ob/ob</i> myši	21
1.5.2. <i>Db/db</i> myši	21
1.5.3. Obézní <i>agouti</i> myši	21
1.5.4. Geneticky modifikované modely myši obezity	21
1.5.5. Chemicky vyvolaná obezita	22
1.5.6. Dietou vyvolaná obezita	22
2. Cíle diplomové práce	23
3. Materiál	24
4. Metody	25
4.1. Zavedení modelů obezity u myši	25
4.1.1. Kontrolní myši	25
4.1.2. Obezita vyvolaná glutamátem sodným (MSG)	25
4.1.3. Dietou vyvolaná obezita (DIO)	25
4.2. Charakterizace modelů obezity u myši	26
4.2.1. Odběr a hmotnost orgánů a krve/séra	26
4.2.2. Histologie mozku	26
4.2.3. Stanovení biochemických parametrů v séru	27

4.3. Stanovení příjmu potravy	27
4.3.1. Zavedení ICV kanyl	27
4.3.2. IP a ICV podání látek	28
4.3.3. Test příjmu potravy	28
4.3.4. Výpočty a statistika	28
4.4. Vazba 125 I-CCK-8 na buněčné membrány z myších mozků	28
4.4.1. Odběr tkání	28
4.4.2. Izolace membrán z myších mozků	29
4.4.3. Stanovení množství bílkovin	29
4.4.4. Vazebné pokusy	30
4.4.4.1. Kompetice	30
4.4.5. Výpočty a statistika	32
5. Výsledky	33
5.1. Charakterizace modelů obezity u myši	33
5.1.1. Obezita vyvolaná glutamátem sodným (MSG)	33
5.1.2. Dietou vyvolaná obezita (DIO)	35
5.1.3. Hmotnost odebraných orgánů	37
5.1.4. Histologie mozku	39
5.1.5. Stanovení biochemických parametrů v séru	40
5.2. Sledování příjmu potravy u myši	42
5.2.1. Účinky peptidu CART (61 – 102) a CCK-8	42
5.2.2. Účinky peptidu CART (61 – 102), CCK-8 a NPY	46
5.3. Vazba 125 I-CCK-8 na buněčné membrány z myších mozků	50
6. Diskuze	53
6.1. Obezita a příjem potravy	53
6.2. Charakterizace modelů obezity u myši	53
6.3. Sledování příjmu potravy u myši	55
6.3.1. Hladové kontrolní myši	55
6.3.2. Syté kontrolní myši	56
6.3.3. Hladové a syté MSG myši	57
6.3.4. Hladové a syté DIO myši	58
6.4. Vazba 125 I-CCK-8 na buněčné membrány z myších mozků	59
7. Souhrn	61
8. Seznam použité literatury	62

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACTH	– Adrenokortikotropní hormon (Adrenocorticotropic Hormone)
AgRP	– Agouti Related Peptide
ARC	– Nucleus arcuatus
BMI	– Index tělesné hmotnosti (Body Mass Index)
BPTI	– Hovězí pankreatický inhibitor trypsinu (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor)
BSA	– Hovězí sérum albumin (Bovine Serum Albumin)
CART	– Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript
CCK	– Cholecystokinin
CRH	– Kortikoliberin (Corticotropin Releasing Hormone)
CNS	– Centrální nervová soustava
DIO	– Dietou vyvolaná obezita (Diet Induced Obesity)
DMH	– Dorsomediální hypotalamus
ELISA	– Enzymoimunochemické stanovení (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
GIT	– Gastrointestinální trakt
HEPES	– N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonová kyselina)
ICV	– Podání látek do mozkové komory (Intracerebroventricular neboli intracerebroventrikulární podání)
IP	– Nitrobřišní podání látek (Intraperitoneal neboli intraperitoneální podání)
LHA	– Laterální hypotalamus
MCH	– Hormon koncentrující melanin (Melanin Concentrating Hormone)
α -MSH	– Hormon stimulující α -melanocyty (α -Melanocyte Stimulating Hormone)
MSG	– Glutamát sodný (Monosodium Glutamate)
NPY	– Neuropeptid Y
NTS	– Nucleus tractus solitarius
POMC	– Pro-opiomelanokortin (Pro-opiomelanocortin)
PP	– Pankreatický polypeptid
PVN	– Paraventriculární jádro
PYY	– Peptid YY
RIA	– Radioimunochemické stanovení (Radioimmunoassay)
SC	– Podkožní podání látek (Subcutaneous neboli subkutánní podání)
SEM	– Střední chyba průměru (Standard Error of Mean)
TRH	– Tyroliberin (Thyrotropin Releasing Hormone)
VMN	– Ventromediální jádro
WHO	– Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

Dále jsou užívány zkratky podle doporučení IUPAC-IUB [1].

1. ÚVOD

Obezita je závažné onemocnění, které výrazně zkracuje život. Je nejrozšířenější metabolickou nemocí na světě s trvale vzestupným trendem výskytu. V patogenezi tohoto onemocnění se uplatňují vlivy genetické a vlivy prostředí. Oba vlivy se přitom mohou projevovat v regulaci chuti k jídlu. Nadbytečný příjem energie, který je způsoben snadnou dostupností velmi chutné a energeticky bohaté stravy, a současný způsob života, který vede k minimalizaci tělesné aktivity, způsobují obezitu.

Regulace příjmu potravy je složitý proces, který je ovlivňován hormonálními a metabolickými signály z periferie, hormonální regulací na úrovni hypotalamu, skladbou potravy a také psychikou daného jedince. Příklad příjem potravy ovlivňuje celá řada látek, například hormon produkovaný tukovou tkání leptin, neuropeptid cholecystokinin, neuropeptid Y, peptidový neurotransmitter CART (cocaine and amphetamine regulated transcript) atd.

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 geny pro 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.

1.1. OBEZITA

Obezitou nazýváme přebytečné nahromadění tukové tkáně v organismu. Je způsobena dlouhodobou pozitivní energetickou bilancí, tj. více energie se přijímá než vydává, a takto vznikající přebytek se ukládá v tukových rezervách. Procento tuku v lidském organismu bývá vyšší u žen než u mužů [2].

Dříve byla obezita pokládána za převážně estetický a společenský problém, v posledních desetiletích se ukázalo, že představuje na prvním místě závažný zdravotní problém, že zkracuje život a je doprovázena celou řadou různých komplikací znepríjemňujících život [3].

V minulosti se k léčbě obezity využívalo mnoha látek (tyroidální hormony T₃ a T₄, dinitrofenol, amfetamin, fenfluramin a fenylopropanolamin), ale ani jedna z nich nebyla

úspěšná a bez vedlejších účinků. V současné době jsou sibutramin (agonista serotoninu) a orlistat (derivát inhibitoru lipasy) jedinými schválenými látkami k léčbě obezity [4, 5].

Prevalence obezity v posledních 10 – 20 let ve všech vyspělých světových zemích, včetně České republiky, stále stoupá. Oblasti s nejvyšším výskytem obezity jsou USA, celá Evropa, zejména Velká Británie; ostrov Mauritius, Austrálie a Brazílie [6]. V roce 1997 byla prevalence obezity v České republice 22,6 % u mužů a 25,6 % u žen [7]. Obezita rapidně roste i v mnoha rozvojových zemích a zejména u mladistvých a dětí [8].

Vzhledem k tomu, že množství tuku v lidském organismu se obtížně měří a liší se u lidí různého věku, pohlaví a etnického původu [2], byl k určení obezity zaveden tzv. **Body Mass Index (BMI)** (tab. 1). Před více než sto lety jej definoval A. Quetelet jako *podíl tělesné hmotnosti v kg a druhé mocniny výšky v m²*.

Tabulka 1. Klasifikace obezity podle WHO

BMI	Kategorie	Riziko komplikací obezity
méně než 18,5	podváha	nízké
18,5 – 24,9	normální váha	průměrné
25 – 29,9	nadváha	mírně zvýšené
30 – 34,9	obezita	středně zvýšené
35 – 39,9	velká obezita	velmi zvýšené
40 a více	klinická obezita	vysoké

1.1.1. Příčiny vzniku obezity [6]

- Nepoměr mezi příjmem a výdejem energie může být způsoben:
 - a) nadměrným příjmem energie: důvodem nadměrného příjmu energie je porucha regulace příjmu potravy řízená hypotalamem. Na nadměrném příjmu energie se podílejí i vlivy prostředí. Na vznik obezity má velký vliv skladba potravy a zastoupení základních živin – tuků, sacharidů a bílkovin. Z těchto živin má největší význam na vznik obezity nadměrný příjem tuků, které mají sice vysokou energetickou hodnotu (38 kJ/kg oproti 17 kJ/kg u bílkovin a sacharidů), ale malou sytící schopnost.
 - b) nedostatečným výdejem energie: pohybová aktivita ovlivňuje celkový energetický výdej: záleží na jejím typu, intenzitě, délce trvání a trénovanosti jedince.

- **Genetická dispozice:** obezita je podmíněna geneticky zhruba ze 40 – 50 %. Pokud jsou ale oba rodiče obézní, pravděpodobnost výskytu obezity u jejich potomka je asi 80 %.
- **Hormonální vlivy:** především snížená funkce štítné žlázy (hypotyreóza) a zvýšená hladina hormonů kůry nadledvin. Oba tyto faktory a jiné (např. nedostatek estrogenu) mají také vliv na vznik obezity.
- **Metabolické vlivy:** obézní lidé nemusí konzumovat více než ostatní, přesto jsou obézní. To může být způsobeno menší pohybovou aktivitou, ale i hormonální poruchou a genetikou.
- **Léky:** některé léky mohou zvyšovat chuť k jídlu (antidepresiva, psychofarmaka, léky na uklidnění, glukokortikoidy (hormony kůry nadledvin), gestageny (hormonální léčba u žen).

1.1.2. Zdravotní komplikace při obezitě [6, 9]

- Diabetes mellitus II. typu (cukrovka), tj. rezistence k inzulinu
- Zvýšená koncentrace cholesterolu a triglyceridů v krvi
- Kardiovaskulární onemocnění: hypertenze (vysoký krevní tlak), ateroskleróza, arytmie, náhlá smrt, mozkové cévní příhody
- Některé typy nádorů: rakovina tlustého střeva, prsu, ledvin, děložního čípku
- Gynekologické komplikace: poruchy cyklu, neplodnost, komplikace v těhotenství a porodu, pokles dělohy

Kožní komplikace: ekzémy, mykózy, strie, celulitida a další.

1.2. PŘÍJEM POTRAVY

Příjem potravy je činností řízenou a je proto závislý na aktivitě řídicích hypotalamických center sytosti a příjmu potravy. Podle klasické definice: v laterální části hypotalamu je umístěno centrum hladu a je-li stimulováno, dochází k nadměrnému příjmu potravy; ve ventromediální části hypotalamu se nachází centrum sytosti a je-li stimulováno, organismus odmítá příjem potravy [10]. Dnes se ale již ví, že celý proces je komplikovanější a centra jsou mnohočetná a propojená.

Kromě vlivů genetických a zevního prostředí je příjem potravy důležitým faktorem, který ovlivňuje zdraví člověka a jeho tělesnou hmotnost. Příjem potravy je uspokojení chuti k jídlu, které probíhá v průběhu jídla a vede k jeho ukončení. Je dán jídelními zvyklostmi a preferencemi. Přejídání vede ke zvýšenému příjmu energie. Sytost je stav, který brání dalšímu příjmu potravy a objevuje se jako důsledek příjmu potravy [3].

1.2.1. Poruchy příjmu potravy

Mezi poruchy příjmu potravy patří **mentální anorexie** a **mentální bulimie**. Mentální anorexie je charakterizovaná úmyslným snižováním tělesné hmotnosti. Mentální bulimie je charakterizovaná opakujícími se záchvaty přejídání [11].

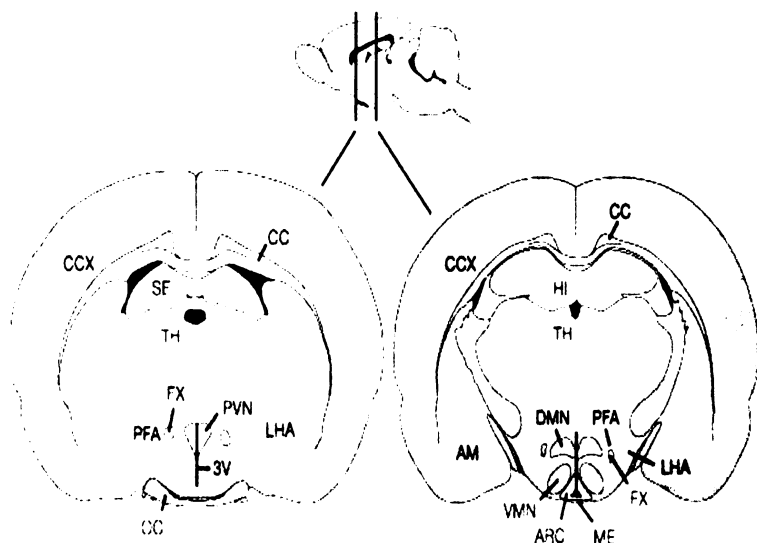
1.2.2. Regulace příjmu potravy

Přežití všech organismů záleží na schopnosti efektivně si zajistit, využít a konzervovat energii. U savců, včetně lidí, se vyvinul systém k zajištění stálého přísunu energie k buňkám i pro období přerušného příjmu potravy (během spánku, hladovění, nemoci). Při každém jídle konzumujeme více kalorií, než je nutné pro metabolické potřeby. Zásoby jídla jsou ukládány v tukové tkáni, která je endokrinním orgánem zapojeným v regulaci příjmu potravy a disponuje neuroendokrinními a metabolickými mechanismy chránícími před energetickými ztrátami vznikajícími při hladovění. Tyto mechanismy mohou být poškozovány přejídáním a vysokotučnou stravou, ale i přísnými dietami a hladověním [3].

1.2.3. Centrální mechanismy regulace příjmu potravy

1.2.3.1. Hypotalamus

Hypotalamus zabezpečuje integrační kontrolu činnosti autonomního nervového systému a endokrinního systému. Činnost hypotalamu je spojována s řízením základních životních funkcí, které udržují stálost vnitřního prostředí organismu: homeostázu – regulace teploty těla, hospodaření s vodou, regulace srdeční činnosti, krevního tlaku nebo aktivity gastrointestinálního traktu (GIT) a s řízením určitých emočních projevů chování (např. zuřivost, vztek...) [12]. Hypotalamus hraje důležitou roli ve složitém řízení chuti k jídlu, hladu a tělesné hmotnosti.



Obr. 1. Schéma mozku:

Hypothalamus 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, LHA – laterální hypothalamus. Ostatní části mozku nesouvisí s mým tématem, a proto nejsou uvedeny jejich zkratky [10].

1.2.3.1.1. Jádra hypothalamu

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

Jádra středního hypothalamu

Nucleus arcuatus (ARC) je jedno z nejdůležitějších jader, které ovlivňuje příjem potravy. Je lokalizován na spodině hypothalamu po obou stranách třetí mozkové komory (obr. 1). V ARC se nacházejí receptory pro řadu látek ovlivňujících příjem potravy: pro leptin, inzulin (obr. 2), kortizol, estrogen, růstový hormon a další [13]. Je také tvořeno receptory pro kyselinu γ -aminomáselnou a glutamát. Toto jádro dále 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 a neurony POMC/CART (POMC – pro-opiomelanokortin, CART – cocaine and amphetamine regulated transcript), které produkují hormony s opačným účinkem [10, 14]. Leptin a inzulin stimulují sekreci a expresi neuronů POMC/CART a potlačují sekreci a expresi neuronů AgRP/NPY (obr. 2). Léze ARC (tj. zničené buňky v ARC) vedou k rozvoji obezity.

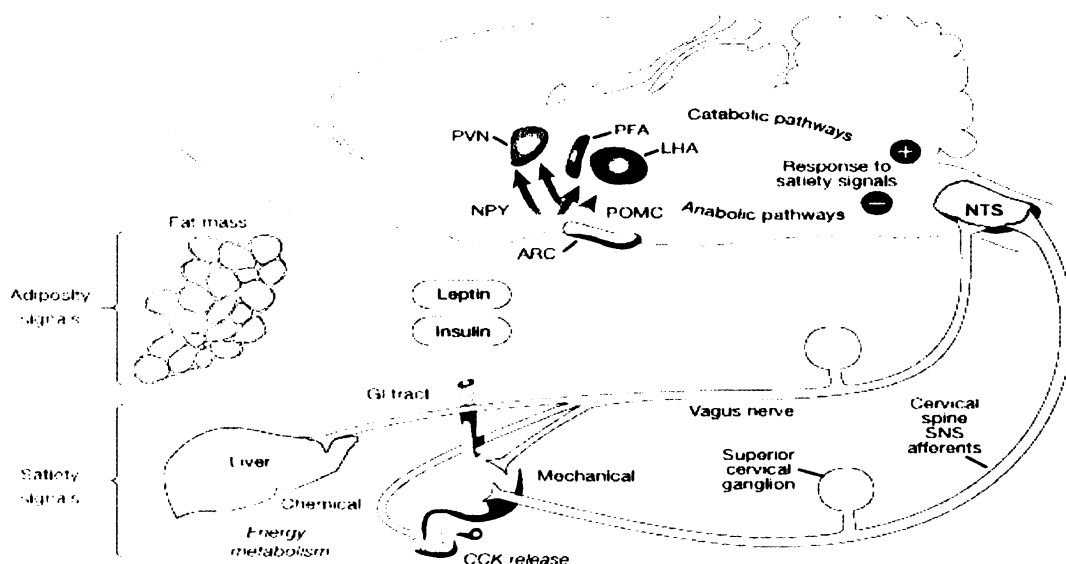
Dále mezi jádra středního hypotalamu patří **ventromediální jádro (VMN)**, **dorsomediální jádro (DMN)** a **laterální hypotalamus (LHA)** (obr. 1). Selektivním poškozením VMN (centra sytosti) dojde k hyperfagii (přejídání) a následnému rozvoji obezity. LHA (centrum hladu) se liší od většiny hypotalamických jader tím, že jeho poškození způsobí hypofagii (snížení příjmu potravy), a tudíž klesá i tělesná hmotnost [10].

Kromě primárních neuronů v ARC existují i tzv. sekundární neurony, které nejsou v ARC a také ovlivňují regulaci příjmu potravy. Sekundární neurony se nacházejí mimo jiné v těchto mozkových oblastech: paraventriculární jádro (PVN) a LHA [10].

1.3. PEPTIDY OVLIVŇUJÍCÍ PŘÍJEM POTRAVY

Mezi orexigenní látky (látky, které zvyšují chuť k jídlu) řadíme neuropeptid Y (NPY) – působí krátkodobě a centrálně, galanin, endogenní opioidy (β -endorfin, dynorfin a enkefaliny), hormon koncentrující melanin (MCH), hypokretiny neboli orexiny, noradrenalin, agouti related peptide (AgRP), ghrelin a další [10, 12].

Anorexigenní látky naopak potlačují chuť k jídlu. Patří sem leptin – působí dlouhodobě a centrálně, hormon stimulující α -melanocyty (α -MSH), tyroliberin (TRH), peptid cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) – působí krátkodobě a centrálně, pro-opiomelanokortin (POMC), kortikoliberin (CRH), interleukin 1- β , cholecystokinin (CCK) – působí krátkodobě a periferně, inzulin – působí dlouhodobě a periferně, bombesin, neuromedin B, glukagon, amylin, somatostatin, enterostatin, peptid YY (PYY) a další [10, 12].



Obr. 2. Model popisující signály ovlivňující příjem potravy: signály z tukové tkáně jsou hormony, jejichž hladiny jsou přímo úměrné tělesné hmotnosti a obsahu tuku v organismu (leptin a inzulin). Jejich receptory se nacházejí v hypotalamu v ARC. Signály sytosti jsou vytvářeny v GIT během příjmu potravy a poskytují informaci o mechanických (pružnost a objem žaludku) a chemických (uvolnění cholecystokininu aj.) vlastnostech příjmu potravy. Signály jsou přenášeny přes nervus vagus a sympatické nervy do části mozkového kmene nazvaného nucleus tractus solitarius (NTS). V mozku pak nervové dráhy spojí informaci z NTS a několika hypotalamických jader (ARC, PVN, LHA) k indikaci příjmu potravy a výdeji energie [10].

1.3.1. Leptin

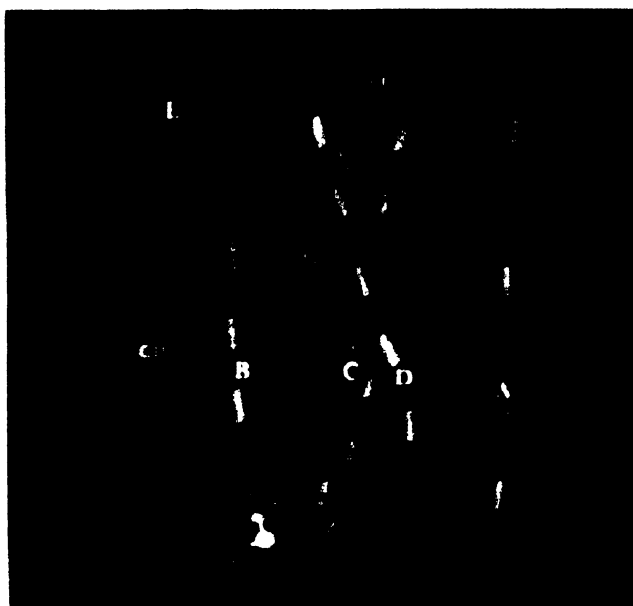
Výskyt, vlastnosti, struktura

Název leptinu pochází od řeckého slova „leptos“, což znamená tenký, štíhlý [15]. Objev leptinu, produktu *ob* genu, byl v roce 1994 jeden z nejvýznamnějších objevů v oblasti regulace příjmu potravy [16]. Mutace *ob* genu u tzv. *ob/ob* myši vede k morbidní obezitě, která je spojená s hyperfagií [16]. *Ob/ob* myši nejsou schopny produkovat leptin, mají rezistenci k inzulinu (a tím sníženou schopnost inzulinu stimulovat utilizaci glukosy) a jsou neplodné. Po podání leptinu *ob/ob* myším došlo k úpravě těchto fenotypických odchylek a také ke snížení jejich hmotnosti [17].

Leptin (obr. 3) je hormon tvořený buňkami tukové tkáně – adipocyty, ale v menší míře i placentou. Obecně se předpokládá, že leptin signalizuje do mozku z tukové tkáně nadměrné hromadění zásob energie a že mozek dá signál ke snížení příjmu potravy a zvýšení energetického výdeje, čímž je bráněno vzniku obezity [17].

Leptin patří do rodiny hematopoetických cytokinů. Zabraňuje **steatóze** (ztučnění) orgánů [18]. U obézních jedinců nastane steatóza jater, když se vyčerpá kapacita tukových buněk k ukládání tuku.

Podle výše uvedeného leptin výrazně ovlivňuje příjem potravy. Leptin tvořený v tukové tkáni je přenášen přes hematoencefalickou bariéru do centrální nervové soustavy (CNS), kde ovlivňuje expresi a sekreci řady orexigenních (např. NPY) i anorexigenních peptidů (např. zvyšuje hladiny peptidů CART), což vede k poklesu příjmu potravy. V hypotalamu leptin ovlivňuje sekreci dalších hormonů ovlivňujících příjem potravy jako např. CRH, POMC, orexiny, MCH a melanokortiny [19].



Obr. 3. Struktura leptinu:
*Leptin obsahuje 167
aminokyselin a jeho molekulová
hmotnost je 16 kD [20].*

Receptory pro leptin

V roce 1995 byly identifikovány **receptory pro leptin (Ob-R)** [21]. Existují tyto formy receptorů pro leptin: tzv. **dlouhá forma (Ob-Rb)** se nachází v mozku, zejména v hypotalamu a NTS, a je zodpovědná za signalizaci do buňky; tzv. **krátké formy (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd a Ob-Re)** se podílejí na transportu leptinu do tkání a udržují jeho

setrvalé hladiny v organizmu [22]. Receptory pro leptin jsou v hypotalamu soustředěny v oblastech, které hrají velkou roli v příjmu potravy, tedy v ARC, VMN, PVN a DMN.

Nejvyšší koncentrace leptinových receptorů u myší nalezneme v plicích a ledvinách [17]. Nižší koncentrace receptorů jsou v srdci, játrech, slezině, příčně pruhovaném svalstvu a mozku. U lidí je nejvyšší koncentrace leptinových receptorů v srdci, játrech, tenkém střevě, prostatě a ovariích. Nižší koncentrace jsou v plicích a ledvinách.

Leptin a obezita

U *ob/ob* myší, které mají nedostatek leptinu, se po aplikaci leptinu snížila jejich hmotnost. Naproti tomu hladiny leptinu jsou u většiny obézních lidí zvýšeny vzhledem k obsahu tuku v organizmu a jeho podání obézním osobám nevede ke snížení jejich hmotnosti [23]. Nefunkčnost leptinu může být způsobena jeho nedostatečným transportem přes hematoencefalickou bariéru. Dalším důvodem může být **rezistence k leptinu**, což znamená, že signalizace leptinu do buňky je poškozena [24].

1.3.2. Cholecystokinin

Výskyt, vlastnosti, struktura

Cholecystokinin (CCK) byl objeven v roce 1928 Ivym a Oldbergem [25]. V roce 1973 Gibbs a jeho spolupracovníci poprvé označili CCK za látku, která ovlivňuje sytost a sníží příjem potravy, když je podána periferně [26].

CCK je jeden z peptidů, které hrají důležitou roli v regulaci krátkodobého příjmu potravy. Je to neuropeptid, který se nachází v mozku a GIT, má tedy funkci centrální a periferní.

V periférii je CCK lokalizován ve sliznici duodena a jejuna [27, 28], kde se vyskytují endokrinní buňky produkující CCK (tzv. I buňky). Naplnění žaludku vede k uvolnění CCK, který inhibuje vyprazdňování žaludku. Tím dochází k pocitu sytosti a k tlumení chuti k jídlu [29]. CCK stimuluje sekreci amylasy v pankreatu a lehce tlumí žaludeční sekreci. CCK se krví dostává do žlučníku, kde působí kontrakce a také zvyšuje pohyblivost tlustého střeva [30].

CCK v mozku plní funkci neurotransmiteru. Mozková kůra, amygdala, hippocampus a septum vykazovaly větší koncentrace CCK [27, 28]. Značné množství

CCK se také nachází v hypotalamu a dorsálním zadním mozku. Jeho účinek v CNS má za následek sedativní a anxiogenní účinek; ovlivňuje spánek (sedace), bolest (analgeze) a zlepšuje paměť.

CCK se v organismu vyskytuje ve více formách označených podle počtu aminokyselin [30]: CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-22, CCK-8 (obr. 4) a CCK-4. V periférii se nejvíce vyskytuje CCK-8 a CCK-33. V CNS jsou přítomny CCK-8 a CCK-4.



Obr. 4. Primární struktura oktapeptidu cholecystokininu (CCK-8)

Receptory CCK

Rozlišujeme dva druhy receptorů CCK: CCK_A (CCK₁) a CCK_B (CCK₂). Receptor CCK_A se nachází hlavně v periférii v GIT („A“ jako „alimentary“ neboli zažívací), ale také byl detekován v mozku v NTS v mozkovém kmeni, hypotalamu, v oblasti postrema a dorsomediálním hypotalamu a obsahuje jej i nucleus accumbens [28, 31]. Receptor CCK_B se vyskytuje v celém mozku („B“ jako „brain“ neboli mozek), jeho největší koncentrace je v mozkové kůře [28].

Nejznámější antagonisty specifický pro receptor CCK_A je **devazepid** neboli **L364,718** a pro receptor CCK_B je to **L365,260** [32, 33]. Účinek na příjem potravy a účinky CCK-8 v periférii souvisí s receptory typu A, zatímco receptor CCK_B souvisí s chováním typickým pro sytost (sedace, analgeze) [33]. Bylo zjištěno, že podání devazepidu samotného vede ke vzrůstu příjmu potravy u potkanů [32]. Účinek exogenně podaného CCK na příjem potravy je blokován antagonistou receptoru CCK_A devazepidem a ne antagonistou receptoru CCK_B L365,260 [33].

1.3.3. Peptidy CART

Výskyt, vlastnosti, struktura

V roce 1981 Spiess a jeho spolupracovníci poprvé identifikovali fragment peptidu CART (cocaine and amphetamine regulated transcript) v hypotalamu [34]. Téměř o 15 let později (v roce 1995) Douglass a kol. zjistili, že nucleus accumbens vykazoval zvýšenou expresi mRNA peptidu CART po podání kokainu a amfetaminu (dle toho také vznikl název peptidu) [35]. Proteinový produkt této mRNA obsahoval sekvenci objevenou Spiessem [36]. V roce 1998 byl popsán účinek peptidů CART na příjem potravy. Bylo zjištěno, že podání peptidů CART centrálně působí snížení příjmu potravy jak u sytých, tak i u hladových hlodavců [37].

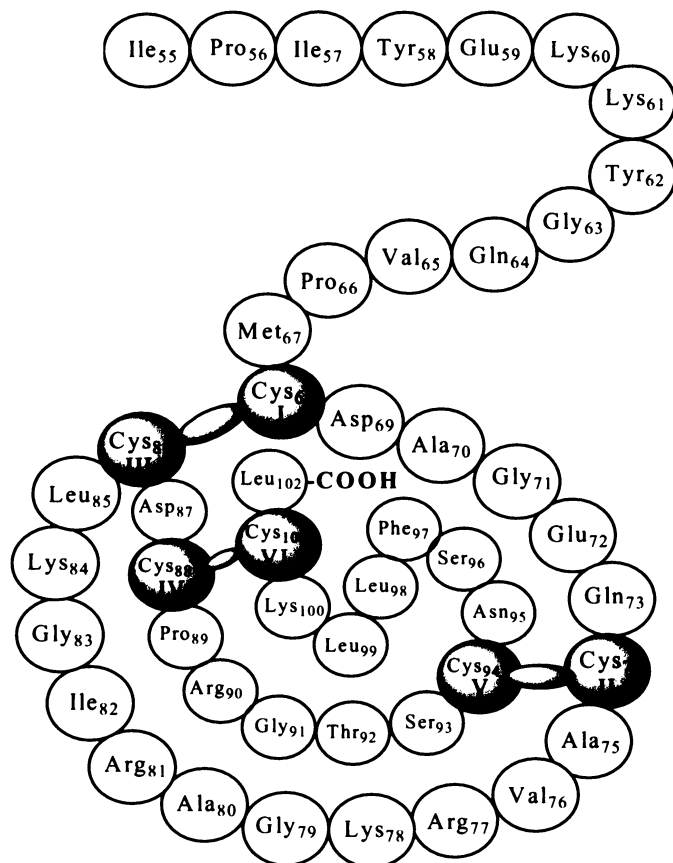
Peptidy CART jsou neurotransmitery, které ovlivňují řadu fyziologických procesů: snižují příjem potravy, ovlivňují stres (anxiogenní účinky) a endokrinní regulaci (např. metabolismus v pankreatu) [36].

Peptidy CART jsou přítomné v CNS a v periférii. Peptid CART je jeden z nejhojnějších peptidů v mozku, vyskytuje se prakticky ve všech jeho částech, i když v různých koncentracích. V periférii se nachází v endokrinních tkáních (v dřeni nadledvin a Langerhansových ostrůvcích) a v trávicím traktu [38]. Role peptidů CART v periférii není příliš objasněna. Bylo pouze zjištěno, že peptid CART v periférii stimuluje pankreatickou sekreci amylasy u potkanů. Jeho účinek byl blokován antagonistou receptoru CCK_A pouze *in vivo*, nikoliv *in vitro* [39]. Aplikace peptidů CART do třetí mozkové komory způsobuje snížení příjmu potravy [37, 40, 41]. Účinek peptidů CART je krátkodobý (v závislosti na dávce několik hodin po jejich podání do mozku). Snížená konzumace potravy může být pozorována již 10 min po injekci peptidů CART [38]. Vyšší dávky peptidů CART způsobují třes [42].

Bylo zjištěno, že u myší s inaktivovaným genem (dále jen knockout) pro peptidy CART je obezita navozena pouze vysokokalorickou stravou (po standardní stravě tyto myši netloustly). To naznačuje, že peptidy CART se podílejí na regulaci energetické homeostázy [43], ale samy o sobě nejsou pro regulaci příjmu potravy zcela nezbytné.

Existuje dlouhá (102 aminokyselin) a krátká (89 aminokyselin) forma peptidů CART, přičemž jejich C – konec je stejný u obou forem. U krys a u myší se vyskytuje dlouhá a krátká forma, zatímco u lidí pouze krátká [40, 42].

Mezi nejvíce zkoumané přirozené fragmenty peptidů CART patří peptid CART (55 – 102) a peptid CART (61 – 102) (obr. 5). Obě formy vykazují biologickou aktivitu (všechny účinky popsané výše) [44].



Obr. 5. Struktura peptidu CART: peptid CART (55 – 102) a peptid CART (61 – 102) obsahují 6 cysteinových zbytků s disulfidovými vazbami I – III, II – V a IV – VI [40].

Receptory peptidů CART

Receptor pro peptidy CART ještě nebyl identifikován. Zatím byla popsána specifická vazba peptidů CART na primárních myších hypothalamických buňkách, potkaních jaterních karcinomových buňkách HepG2 [45], na myších buňkách z karcinomu hypofýzy AtT20 [46] a potkaních buňkách z karcinomu nadledvin PC12 [47].

Peptidy CART ve vztahu k ostatním hormonům

NPY je nejznámějším stimulatorem příjmu potravy. Existuje interakce mezi NPY a peptidy CART. Bylo dokázáno, že peptidy CART blokují orexigenní účinek NPY. [48, 49].

Exprese mRNA peptidu CART v ARC je regulována leptinem [50]. Když obézním *ob/ob* myším (tyto myši nejsou schopny produkovat leptin) byl podáván leptin po dobu

10 dnů, měly poté výrazně snížený příjem potravy a exprese mRNA peptidu CART v ARC byla znovu obnovena [37].

Mezi dalšími důležitými hormony, které by mohly souviset s účinky peptidů CART, je CCK. Bylo zjištěno, že velká část neuronů peptidů CART v nervu vagu také obsahuje receptor CCK_A [13, 51].

1.3.4. Neuropeptid Y

Výskyt, vlastnosti, struktura

Neuropeptid Y (NPY) je neuropeptid objevený v CNS. Jeho jméno vychází z tyrosinu na N- a C- konci (symbol Y) (obr. 6). Podání NPY do třetí mozkové komory způsobuje v závislosti na dávce velkou a dlouhotrvající stimulaci příjmu potravy. Injekce NPY je ještě účinnější, když je podán do paraventriculárního jádra [52].

Neuropeptid Y je ze známých peptidů nejmohutnějším stimulatorem příjmu potravy. Dále zlepšuje paměť, působí proti stresu a jeho centrální podání snižuje krevní tlak [53]. Vyskytuje se v periferním a centrálním nervovém systému. Strukturně patří do skupiny pankreatických polypeptidů; k nim řadíme také peptid YY (PYY) a pankreatický polypeptid (PP) v periférii.

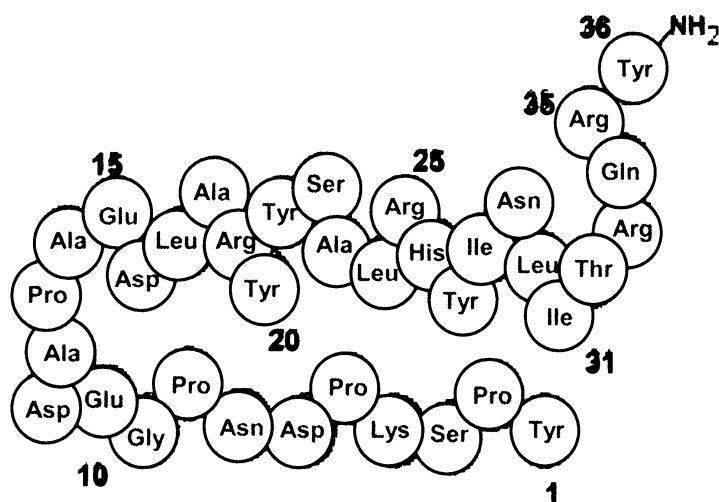
V periférii se NPY nachází v sympatických neuronech a v nadledvinových chromafinových buňkách. Periferní podání NPY snižuje sekreci inzulinu [52].

NPY je účinnější v CNS než v periférii. V mozku se vyskytuje v těchto částech: mozková kůra, mozkový kmen, hypotalamus, amygdala, hippocampus a talamus [54]. Účinek NPY je ovlivňován leptinem a inzulinem; všechny tři hormony se nacházejí mimo jiné v ARC. Je známo, že pokud jsou hladiny leptinu a inzulinu zvýšeny, syntéza NPY je potlačena a příjem potravy je snížen [53].

Účinek NPY dále ovlivňuje účinky CCK a peptidů CART. Bylo zjištěno, že kombinace CCK a NPY způsobuje snížený příjem potravy oproti samotnému NPY u potkanů. Peptidy CART potlačují zvýšený příjem potravy způsobený NPY [55]. Vztah peptidů CART a NPY byl dokázán v hypotalamu histochemicky [56].

U geneticky obézních (*ob/ob*) a geneticky diabetických (*db/db*) myši NPY zvýšil příjem potravy [57]. NPY knockout myši mají normální hmotnost a množství tuku. Tyto

myši nevykazovaly zvýšený příjem potravy ani nárůst hmotnosti v žádném dosud známém modelu obezity (tedy ani v případě chemicky nebo dietou vyvolané obezity) [58].



Obr. 6. Struktura NPY

NPY je peptid skládající se z 36 aminokyselin. NPY má v N- a C-konci tyrosin [59].

Receptory NPY

Receptory NPY patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny. Mají řadu fyziologických funkcí, podílejí se např. na regulaci krevního tlaku, ovlivňují příjem potravy a zlepšují paměť. Je identifikováno celkem šest typů receptorů: Y₁, Y₂, Y₃, Y₄, Y₅ a Y₆. Ne všechny z těchto receptorů regulují příjem potravy. Podle současných znalostí je orexigenní účinek NPY zprostředkován receptory Y₁ a Y₅. Oba dva receptory se nacházejí v CNS. V periférii se receptor Y₁ vyskytuje v cévách, kde způsobuje jejich zúžení. NPY a PYY mají vysokou a PP nízkou afinitu k receptorům Y₁ a Y₅ [53, 60].

1.4. ZVÍŘECÍ MODELY

Užití zvířat jako biologického modelu je jednou z významných složek biologického, lékařského, veterinárního a farmakologického výzkumu. Umožňuje získávat poznatky pro hodnocení různých biologických dějů, zákonitostí, vztahů a účinků látek do biologických dějů vstupujících.

Laboratorní zvířata z hlediska genetického rozlišujeme na dva základní typy: **geneticky definovaná (izogenní) a geneticky nedefinovaná (neizogenní) laboratorní zvířata**. Mezi geneticky definovaná zvířata patří mimo jiné **kmen inbrední**, který vzniká

jako produkt příbuzenské plemenitby mezi bratrem a sestrou po více než 20 generací. U inbredních kmenů je genetická totožnost všech jedinců, můžeme očekávat homozygotnost ve všech pokusech. Mezi neizogenní zvířata patří **outbrední linie**, což je pářící se skupina zvířat geneticky heterogenní s cílem minimální možností příbuzenské plemenitby [61].

1.5. MODEL Y MYŠÍ OBEZITY

1.5.1. *Ob/ob* myši

Díky tomuto modelu byl identifikován leptin. Tyto myši se rodí s normální porodní hmotností a obezita se u nich rozvine v důsledku hyperfagie již po narození. Mají velké množství bílé tukové tkáně, hyperinzulinemii a nejsou schopny produkovat leptin. Podávání rekombinantního leptinu těmto myším vede k úpravě všech fenotypických odchylek a také ke snížení jejich hmotnosti [62, 63].

1.5.2. *Db/db* myši

U těchto myši je typickým rysem diabetes mellitus II. stupně a rozvinutá obezita. *Db/db* myši, na rozdíl od *ob/ob* myši, mají zvýšené hladiny leptinu. Příčinou obezity u nich je nefunkční leptinový receptor, a tudíž podávání leptinu těmto myším neovlivní jejich fenotyp [63].

1.5.3. *Obézní agouti* myši

Obezita je u nich způsobena mutací genu kódujícího *agouti* protein a jejím důsledkem je zvýšená exprese tohoto genu v řadě tkání. Jsou rezistentní k inzulinu (mají vysoké hladiny inzulinu neboli hyperinzulinemii). Tyto myši mají žlutou barvu srsti, která je přímo úměrná stupni obezity. Mechanismus vzniku obezity je dán interakcí *agouti* proteinu s melanokortinovými receptory typu MC4 (MC4 receptor je blokován) [62].

1.5.4. Geneticky modifikované modely myši obezity

Existuje celá řada geneticky modifikovaných myších modelů obezity, hlavně s chybějícími anorexigenními peptidy či jejich receptory. Tyto myši mají zvýšený obsah tuku a u většiny z nich je obezita důsledkem hyperfagie [64].

1.5.5. Chemicky vyvolaná obezita

Sem řadíme mimo jiné obezitu vyvolanou glutamátem sodným (MSG). Subkutánní (SC) neboli podkožní injekce MSG novorozeným myším způsobuje lézi v oblasti ARC v hypotalamu [65]. Jak již bylo výše diskutováno, v ARC se vyskytují látky ovlivňující příjem potravy. Poškození tohoto jádra způsobí těžkou obezitu. Myši, jejichž obezita je vyvolaná MSG (dále jen MSG myši), se vyznačují zmenšením oblasti ARC, rozšířením třetí mozkové komory a zúžením eminentia mediana [66]. Bylo zjištěno, že celkový počet neuronů v ARC u MSG myši byl o 75 % nižší než u kontrolních myši, zatímco MSG neovlivnil počet neuronů v dalších oblastech mozku [67]. MSG snižuje hladiny mRNA pro NPY a AgRP a ničí neurony NPY/AgRP [66].

MSG model myši obezity je hodně podobný *db/db* myším. *Db/db* myši mají zvýšené koncentrace leptinu v krvi stejně jako MSG myši. MSG myši bývají asi o 10 % menší než kontroly a jsou neplodné [65].

1.5.6. Dietou vyvolaná obezita (DIO)

DIO (Diet Induced Obesity) neboli dietou vyvolaná obezita je velmi podobná lidské obezitě. Myši, jejichž obezita je vyvolaná vysokotučnou stravou (dále jen DIO myši), se stanou obézními po dlouhodobém krmení potravou se zvýšením obsahem tuku. Po této dietě jsou rezistentní k leptinu a hyperglykemické [68].

Hladiny leptinu jsou přímo úměrné obsahu tuku v organismu. Po dlouhodobé konzumaci vysokotučné stravy dochází k poruše regulace leptinu (pravděpodobně na úrovni signalizace leptinových receptorů do buňky) [69].

Obezita navozená vysokotučnou dietou je závislá na typu zvířecího kmene [70, 71]. Po 15 – 19 týdnech podávání vysokotučné diety dochází nejprve k vzrůstu produkce leptinu a pak 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 [68].

2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jedním z cílů této diplomové práce je sledovat účinky peptidu CART, cholecystokininu a NPY na příjem potravy u normálních a obézních myší. Konkrétně to znamenalo:

- Zavedení modelů obezity u myší: obezity vyvolané glutamátem sodným (MSG) a dietou vyvolané obezity (DIO)
- Studium příjmu potravy u normálních a obézních (MSG a DIO) myší: výše jmenované látky se podávaly buď centrálně neboli intracerebroventrikulárně (ICV), nebo periferně, tedy intraperitoneálně (IP), podle místa svého účinku
- Vyjasnit vzájemný vztah peptidu CART a cholecystokininu u normálních myší
- Vyjasnit vztah peptidu CART a neuropeptidu Y a cholecystokininu a neuropeptidu Y u normálních a obézních myší

Dalším cílem bylo porovnat vazbu ^{125}I -CCK-8 na buněčné membrány z myších mozků:

- Porovnat počet vazebných míst a afinitu CCK-8 k receptorům pomocí vazby na buněčné membrány z mozků kontrolních, MSG a DIO myší

3. MATERIÁL

Fyziologický roztok	Infusia, Hořátev, ČR
Duracrol	Spofa - Dental, ČR
Ketamin, xylazin	Spofa, ČR
BSA	Serva, Heidelberg, Německo
Běžné chemikálie	Sigma, St. Louis, MO, USA
Complete	Roche Diagnostics, Penzberg, Německo
Glutamát sodný	Sigma, St. Louis, MO, USA
Peptid CART (61 – 102)	Bachem, Bubendorf, Švýcarsko
CCK-8	NeoMPS, Strasbourg, Francie
Devazepid (Devazepide, L364,718)	Dar od ML Laboratories, Liverpool, Velká Británie
NPY	NeoMPS, Strasbourg, Francie
¹²⁵ I-CCK-8	Amersham Biosciences, Vídeň, Rakousko
Filtry GF/C	Whatman, Maidstone, Velká Británie
ELISA kit	BioVendor, Brno, ČR
(kit na stanovení myšního leptinu)	
RIA kit	Linco Research, St. Charles, MI, USA
(kit na stanovení myšního inzulinu)	

4. METODY

4.1. ZAVEDENÍ MODELŮ OBEZITY U MYŠÍ

Pokusy na příjem potravy byly prováděny na dvou myších kmenech: outbredním kmeni NMRI (chov Konárovice, společnost Bio Test, ČR) a inbredním kmeni C57Bl/6 (chov ÚMG, ČR). Zvířata byla chována v akreditovaném zvěřinci ÚOCHB AV ČR při teplotě 22 ± 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.).

4.1.1. Kontrolní myši

Jako kontrolní myši nám sloužily oba výše zmíněné kmeny bez podání jakékoliv chemikálie krmené standardní dietou St-1 (Velaz, Koleč, ČR). Hmotnost myši a příjem potravy byly sledovány pravidelně jednou týdně.

4.1.2. Obezita vyvolaná glutamátem sodným (MSG)

Pro tento model opět sloužily myši kmeny NMRI a C57Bl/6. Novorozeným myším byl injektován glutamát sodný (4 mg/g hmotnosti myši za den) podkožně (SC) od 2. do 8. postnatálního dne. Tyto myši měly stejnou standardní dietu jako kontroly. Jejich potrava a hmotnost byly váženy jednou týdně.

4.1.3. Dietou vyvolaná obezita (DIO)

Jak NMRI, tak i C57Bl/6 myši konzumovaly vysokotučnou dietu od 7. týdne věku (do 7. týdne věku byly na standardní dietě St-1). Vysokotučná dieta obsahovala 13 % proteinů, 27 % sacharidů a 60 % tuků [72]. Byla složena ze 40 % St-1, 34 % sunaru, 25 % slunečnicového oleje a 1 % kukuřičného škrobu [72]. I u těchto myši byl pravidelně jednou týdně sledován jejich příjem potravy a hmotnost.

4.2. CHARAKTERIZACE MODELŮ OBEZITY U MYŠÍ

4.2.1. Odběr a hmotnost orgánů a krve/séra

Myši byly po pokusu na příjem potravy rozdělené na hladové (hladověly 17 hodin před odebráním krve) a syté (měly volný příjem potravy). Dva dny po pokusu na příjem potravy 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 min při 10 °C), které bylo uchováno při – 20 °C.

Z myší byly odebrány tyto orgány: tuk, játra a mozky. Abdominální (břišní), gonadální (u pohlavních orgánů) a perirenální (kolem ledvin) tuk byl spojen a zvážen. Játra byla odebrána, zvážena a vizuálně byla zkoumána jejich struktura. Mozky byly odebrány na kontrolu, zda byly kanyly skutečně zavedeny do třetí mozkové komory. U MSG myší byla navíc změřena nasoanální délka a délka ocasu.

4.2.2. Histologie mozku

Histologie mozku byla provedena u šesti skupin: u kontrolních, MSG a DIO myší (od každé skupiny samci i samice), v každé skupině byly tři myši. Po anestezii (nitrobřišní (dále jen IP) injekce ketaminu/xylazinu: 100 mg/kg ketaminu, 16 mg/kg xylazinu) proběhla perfuze 0,1 M fosfátovým pufrem, pH 7,4, obsahujícím 4% paraformaldehyd, 0,1% glutaraldehyd a 10% kyselinu pikrovou. Mozky byly odebrány a uloženy do výše zmíněného fixačního roztoku na jednu noc při teplotě 4 °C, poté byly inkubovány v 15% roztoku sacharózy v 0,025 M fosfátového pufru, pH 7,4, 48 hodin při 4 °C. Před řezáním byly mozky rychle zmrazeny v izopentanu (– 40 °C), poté byly umístěny do kryostatu (Reichert, Německo) na 1 hodinu při –15 °C. Řezy mozku o tloušťce 35 µm byly prováděny z celého hypotalamu, přeneseny do studeného 0,1 M fosfátového pufru, pH 7,4, naneseny na podložní skla pokrytá poly-L-lysinem a barveny 0,1% roztokem kresolové violeti. Řezy byly analyzovány ve světelném mikroskopu Leica DMLS s použitím atlasu myšího mozku [73]. Reprezentativní řezy mozku byly zachyceny digitálním fotoaparátem Canon (PowerShot S 40).

Histologii mozku prováděli Zdeno Pirník, PhD. a RNDr. Alexander Kiss, DrSc. z Ústavu experimentální endokrinologie, SAV, Bratislava.

4.2.3. Stanovení biochemických parametrů v séru

Koncentrace leptinu v krevním séru byly stanoveny pomocí ELISA kitu a koncentrace inzulinu pomocí RIA kitu. Hladina glukosy byla změřena glukometrem (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japonsko).

4.3. STANOVENÍ PŘÍJMU POTRAVY U MYŠÍ

4.3.1. Zavedení ICV kanyl

Tato metoda byla provedena podle Maletínské a kol. [47]. Myši byly během operace v anestezii (IP 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 předozadní) 2 mm od bregmy, V (vertikální) 3 mm). Okolo kanyly byla aplikovaná zubařská pryskyřice rozpuštěná v duracrolu. Po ztvrdnutí pryskyřice se vsunula vnější kanyla, aby se zabránilo ucpávání (obr. 7).

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

Při zavedení kanyl do třetí mozkové komory (dále jen ICV) jsme spolupracovali s RNDr. Renatou Haugvicovou, CSc. z Mikrobiologického ústavu, AV ČR, Praha.

Vnitřní kanyla zavedená do třetí mozkové komory;
čepička obsahuje vnější kanylu



Obr. 7. Zavedení ICV kanyly

4.3.2. IP a ICV podání látek

CCK-8 (0,2 ml/myš v dávkách 0,4 – 40 µg/kg) a devazepid (0,2 ml/myš v dávce 1 mg/kg) jsou účinnější v periférii a byly podávány nitrobřišně (IP).

Peptid CART (61 – 102) (5 µl/myš v dávkách 0,1 – 0,5 µg/myš) a NPY (5 µl/myš v dávce 5 µg/myš) jsou účinnější v CNS a byly podávány do třetí mozkové komory (ICV).

4.3.3. Test příjmu potravy

Tři dny před pokusem měly myši volný přístup k potravě od 8:00 do 15:00 hod. a v noci hladověly. K pití měly stále volný přístup. Příjem potravy byl měřen od 8:00 do 15:00 hod.

V den pokusu byly myši buď hladové 17 hod (pro objasnění vztahu peptidu CART a CCK-8), nebo syté (pro objasnění vztahu peptidu CART, CCK-8 a NPY). Každá koncentrace peptidu byla testována alespoň dvakrát na 6 – 8 myších. Po 15 min od podání látky se myším podala předem zvážená potrava a odečet příjmu potravy se prováděl pravidelně po 30 min (ke konci pokusu pak pouze po 60 min) po dobu zhruba 7 hod. Během pokusu měly myši volný přístup k vodě.

4.3.4. Výpočty a statistika

Všechny parametry jsou prezentovány v tabulkách a grafech. Výsledky z příjmu potravy jsou vyhodnoceny v grafech příjmu potravy. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány pro zjištění směrodatnosti rozdílů mezi skupinami a jsou uvedeny jako průměrná hodnota ± střední chyba průměru (SEM). Statistika byla prováděna v programu one-way ANOVA, po kterém pak následoval Tukey post hoc test. Hmotnosti myší byly hodnoceny v programu two-way ANOVA, ve kterém se hodnotily dva faktory: model myší obezity a týden věku. Rozdíly byly považovány za významné, pokud $P < 0,05$.

4.4. VAZBA ¹²⁵I-CCK-8 NA BUNĚČNÉ MEMBRÁNY Z MYŠÍCH MOZKŮ

4.4.1. Odběr tkání

Mozky kontrolních, MSG a DIO C57Bl/6 myší byly odebrány asi týden po ukončení pokusů na příjem potravy a vloženy do fyziologického roztoku na ledu. Mozková kůra byla oddělena od celého mozku a dále se pracovalo pouze se zbytkem

mozku obsahujícím střední mozek (včetně hypotalamu) a mozkový kmen. Tkáně byly poté zváženy a uloženy při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do dne, kdy se prováděla izolace buněčných membrán.

4.4.2. Izolace membrán z myších mozků

Buněčné membrány byly připraveny podle Reeve a kol. [74]. Celá izolace byla prováděna při $0 - 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pro izolaci byly použity tyto pufrы:

- Homogenizační pufr
20 mM HEPES o pH 7,4 + 118 mM NaCl , 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂
- Izolační pufr
20 mM HEPES o pH 7,4 + inhibitory proteas (tablety Complete).
1 tableta Complete / 50 ml izolačního pufru.
Izolační pufr se připravil čerstvě těsně před izolací.

Postup:

Množství izolačního pufru pro celou izolaci bylo asi desetinásobkem hmotnosti tkáně. V kádince s malým množstvím izolačního pufru byla tkáň nastříhána na malé kousky. Poté byla tkáň homogenizována v Potterově homogenizátoru při střední rychlosti 6x. Získaný homogenát byl umístěn do centrifugy Jouan (typ C3i/CR3i, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), centrifugace proběhla při $1000 \times g$, 10 min, při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl poté vložen do ultracentrifugy Beckman (typ L8-55, Beckman, Kalifornie, USA) s rotorem Ti55.2. Ultracentrifugace proběhla při $48000 \times g$, 15 min, při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po ultracentrifugaci byl supernatant slit a pelety byly rehomogenizovány v homogenizačním pufru v Potterově homogenizátoru při střední rychlosti 3x. Homogenát byl znovu ultracentrifugován za výše popsaných podmínek. Po ultracentrifugaci byl supernatant slit a sediment byl znovu homogenizován v homogenizačním pufru v Potterově homogenizátoru a uschován při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ v alikvotech.

4.4.3. Stanovení množství bílkovin

Homogenát z mozkových membrán byl použit pro stanovení obsahu proteinů podle Bradfordové [75]. Z kalibrační křivky s použitím hovězího séra albuminu (BSA) jako standardu byla odečtena odpovídající koncentrace a konečná hodnota pak byla určena jako průměr třech koncentrací proteinu.

4.4.4. Vazebné pokusy

Prováděli jsme kompetiční vazebné pokusy. Vazebná radioaktivita neboli celkové množství vázaného radioligandu B_t je tvořeno specifickou (B_{sp}) a nespecifickou (B_{nsp}) vazbou, $B_t = B_{sp} + B_{nsp}$. Specifickou vazbou rozumíme vazbu na receptor, nespecifická vazba představuje všechna vazebná místa různá od receptoru. Specifická vazba je proto určena jako rozdíl mezi celkovou a nespecifickou vazbou, $B_{sp} = B_t - B_{nsp}$ [76].

4.4.4.1. Kompetice

Při kompetičním vazebném pokusu měříme za rovnovážných podmínek vazbu při jediné konstantní koncentraci radioligandu v přítomnosti rostoucího množství neznačeného ligandu (kompetitoru). Koncentrace kompetitoru, při které je vytěsněna polovina vazebných míst, se označuje IC_{50} . U kompetičních pokusů můžeme určit počet vazebných míst (B_{max}) a afinitu ligandu k receptoru (K_d) pouze v případě, že radioligand a kompetitor mají stejnou afinitu k vazebnému místu [76]. Tuto podmínku naše studie splňují, neboť je známo, že jodace CCK-8 pomocí Bolton-Hunterova činidla nemění jeho biologickou aktivitu [77]. O devazepidu to nelze říci, neboť jeho afinita k CCK receptoru typu B je jiná než afinita ^{125}I -CCK-8 [77].

Rovnovážná disociační konstanta kompetujícího ligandu K_i se vypočte podle rovnice Chenga a Prusoffa [78]:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[radioligand]}{K_d}},$$

kde IC_{50} je konstanta určená z experimentu a vypočtená v programu GraphPad Prism, koncentrace radioligandu byla v našem případě 0,02 nM a K_d je rovnovážná disociační konstanta radioligandu, která je pro ^{125}I -CCK-8 1,49 nM [79].

B_{max} vyjadřuje množství vázaného ligandu (počet vazebných míst) vztahované na množství buněčných membrán, obvykle fmol/mg [76]. Převod z cpm na fmol/mg se provádí s použitím přepočtu radioaktivity Curie na $2,22 \cdot 10^{12}$ dpm, účinnosti detektoru (v našem případě γ detektor s účinností 82 %), specifické radioaktivity ligandu (2190 Ci/mmol) a množství proteinu ve zkumavce (v našem případě 0,1 mg):

$$fmol/mg = \frac{cpm}{2,22 \cdot 10^{12} dpm/Ci \cdot 0,82 cpm/dpm \cdot 2190 Ci/mmol \cdot 10^{-12} mmol/fmol \cdot 0,1mg}$$

Postup

Nejprve byla provedena zkouška optimálních podmínek na morčecích mozkových membránách a poté na myších. Na vazebné pokusy byly použity tyto roztoky:

- Vymývací pufr: 20 mM HEPES pH 7,4 + 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂. Tento pufr se používá k ředění membrán a peptidů.
- Vazebný pufr: 20 mM HEPES pH 7,4 + 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂ + inhibitory proteas (0,1 mg/ml BPTI, 0,1 mg/ml bacitracin a 1 mg/ml BSA).
- Mozkové buněčné membrány (100 µg/250 µl)
- ¹²⁵I-CCK-8 (0,02 nM)
- CCK-8 (10⁻⁶ - 10⁻¹⁰ M)
- Devazepid (10⁻⁵ - 10⁻⁹ M)

Jako standard nám sloužily morčecí mozkové membrány. Podmínky jsme optimalizovali podle literatury, která popisuje vazbu CCK-8 na membrány z morčecích membrán z mozkové kůry [80]. Byly zkoušeny různé koncentrace membrán: 600 µg, 150 µg a 100 µg bílkovin o objemu 250 µl a různá doba inkubace: 30 min, 60 min a 90 min. Pokusy proběhly při 22 °C. Jako optimální podmínky pro myší mozkové membrány byly shledány následující kombinace: 100 µg bílkovin o objemu 250 µl, inkubace 60 min při 22 °C; za těchto podmínek byly pokusy rutinně prováděny.

Každé měření se provádělo v duplikátech alespoň třikrát. Nejprve byl napipetován vazebný pufr, pak buď neznačený peptid (v případě stanovení nespecifické vazby (NSB) 10⁻⁶ M CCK-8), nebo vymývací pufr (pro stanovení celkové neboli totální vazby – T), dále radioaktivně značený CCK-8 a v posledním kroku buněčné membrány a tím reakce začala a probíhala 60 min při 22 °C. Po celou dobu inkubace byly zkumavky třepány ve vodní lázni. Filtry GF/C byly předem navlhčeny v pufru (10 mM HEPES pH 7,4 a 1 mg/ml BSA). Inkubace byla ukončena filtrací přes GF/C filtry na přístroji Brandel (Biochemical and Development Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). Radioaktivita byla změřena γ detektorem (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) s účinností 82 %.

4.4.5. Výpočty a statistika

Naměřená experimentální data byla zpracována a vypočtena pomocí softwaru GraphPad Prism 3 (San Diego, USA). Všechny parametry jsou prezentovány v tabulkách a grafech. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány pro zajištění směrodatnosti rozdílů mezi skupinami a jsou uvedeny jako průměrná hodnota \pm střední chyba průměru (SEM). Statistika byla prováděna v programu two-way ANOVA, ve kterém se hodnotily dva faktory: pohlaví a model myši obezity. Rozdíly byly považovány za významné, pokud $P < 0,05$.

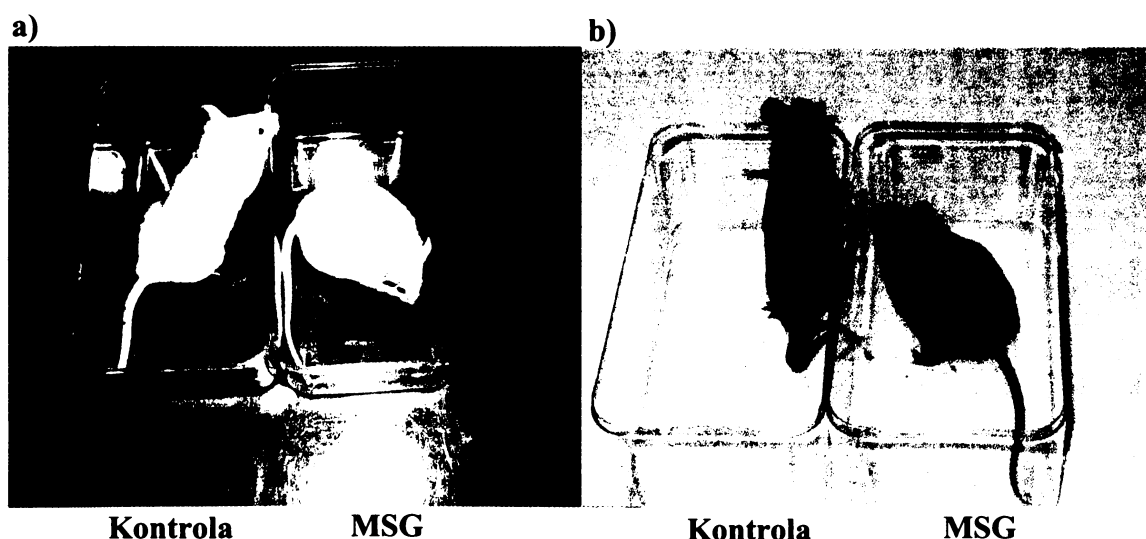
5. VÝSLEDKY

5.1. CHARAKTERIZACE MODELŮ OBEZITY U MYŠÍ

5.1.1. Obezita vyvolaná glutamátem sodným (MSG)

MSG model myší obezity byl charakterizován u outbredních NMRI a inbredních C57Bl/6 myši (obr. 8). MSG myši se staly obézními, ačkoli měly snížený příjem potravy (hypofagii) u samců z kmene C57Bl/6 a linie NMRI, jejichž obezita je vyvolaná MSG (dále jen C57Bl/6 nebo NMRI MSG samci) a stejný příjem potravy u samic z kmene C57Bl/6 a linie NMRI, jejichž obezita je vyvolaná MSG (dále jen C57Bl/6 nebo NMRI MSG samice) proti kontrolám (tab. 2).

Hmotnost MSG samců byla stejná jako u kontrol, ale MSG samice vážily více než jejich kontroly (obr. 9). MSG myši měly zhruba o 15 % kratší tělo a ocas než kontroly.

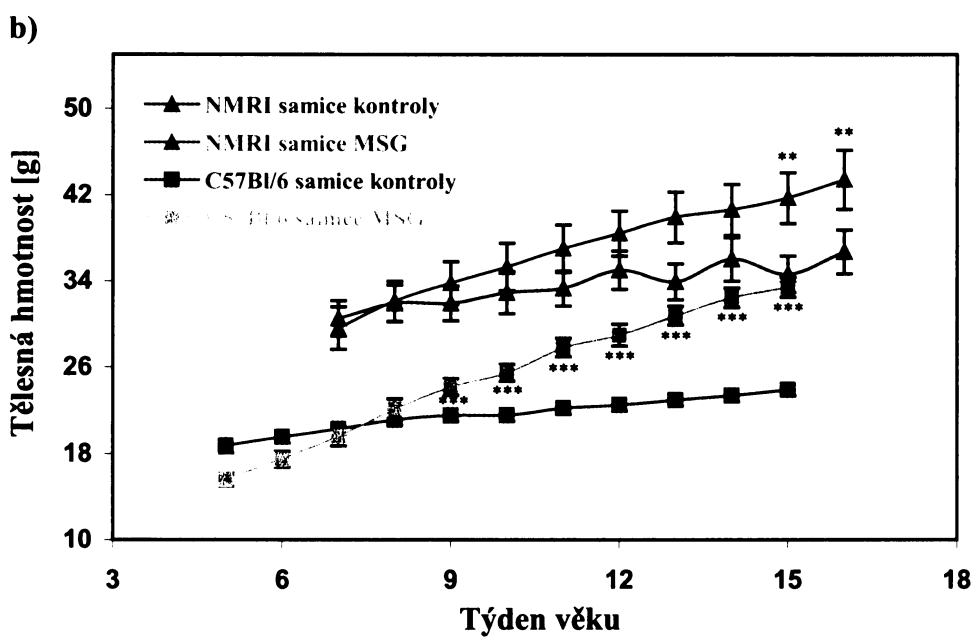
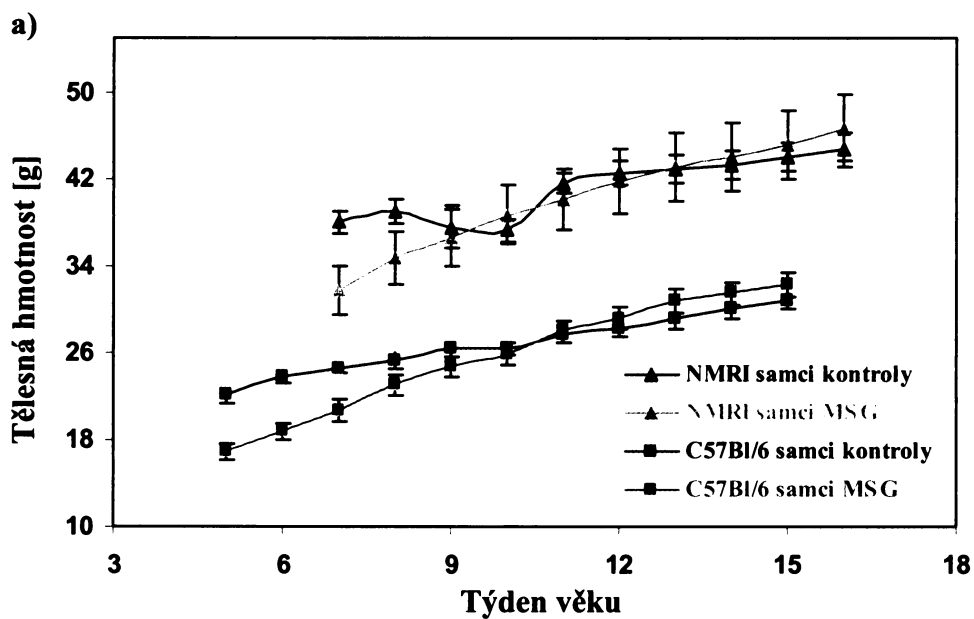


Obr. 8. Model myší obezity: obezita vyvolaná glutamátem sodným (MSG)

a) outbrední NMRI myši, b) inbrední C57Bl/6 myši

Tabulka 2. Průměrný denní příjem potravy (g) u myší po podání glutamátu sodného (MSG) a kontrolních myší. Hodnoty jsou vyjadřovány ve tvaru průměr ± SEM. n = 10 – 25 myši na skupinu

		samci	samice
NMRI	kontroly	7,72 ± 0,76	6,49 ± 0,67
	MSG myši	5,80 ± 0,73	6,15 ± 0,48
C57Bl/6	kontroly	4,07 ± 0,16	3,96 ± 0,29
	MSG myši	3,62 ± 0,23	3,75 ± 0,30



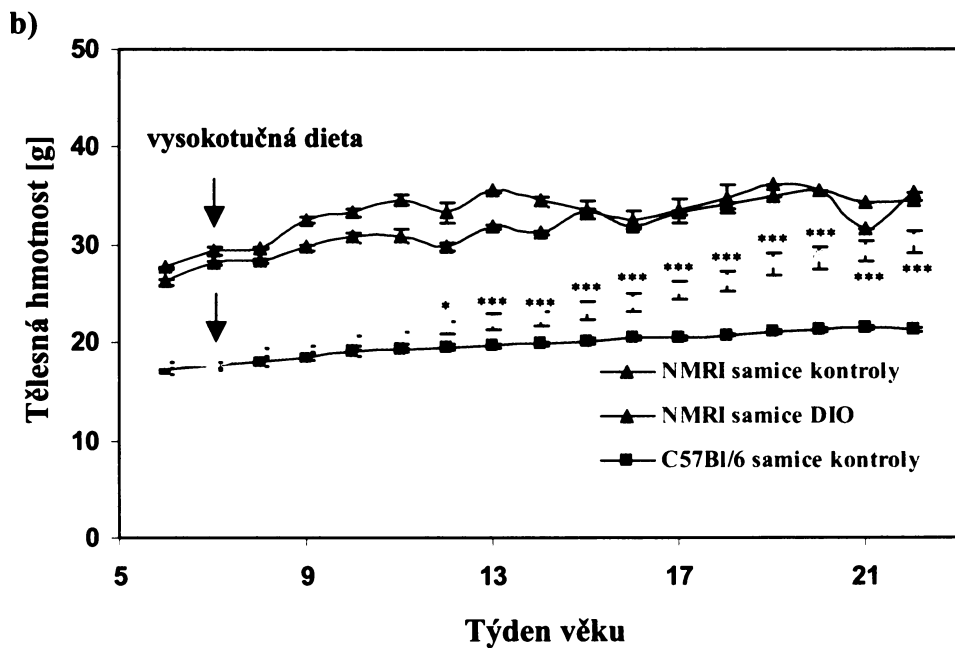
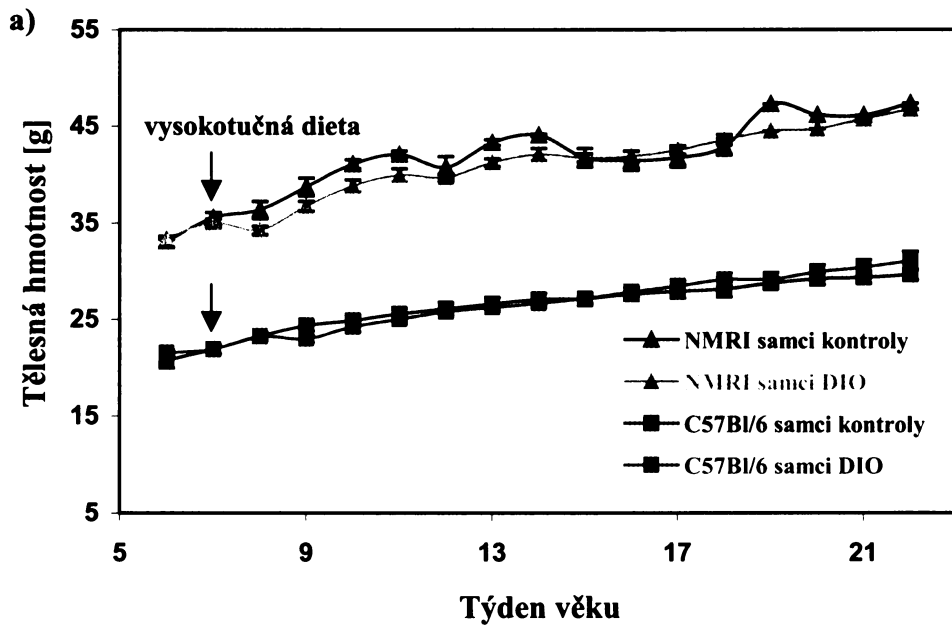
Obr. 9. Hmotnosti outbredních NMRI a inbredních C57Bl/6 kontrolních a MSG myší: a) samci, b) samice. $n = 10 - 15$ myší na skupinu pro NMRI a $n = 20 - 25$ myší na skupinu pro C57Bl/6. Signifikance je $P < 0,01$ a $***P < 0,001$ pro MSG samice vůči kontrolním samicím.**

5.1.2. Dietou vyvolaná obezita (DIO)

DIO model myši obezity byl charakterizován u outbredních NMRI a inbredních C57Bl/6 myši. Tento model je velmi podobný lidské obezitě, neboť obezita se vyvinula v důsledku vysokotučné stravy, která obsahovala 60 % tuku. Tyto myši byly po odstavu nejprve na standardní dietě (St-1, 9 % tuku) a od 7. týdne věku byly krmeny vysokotučnou dietou. DIO myši jsme porovnávali s kontrolními, které byly od odstavu stále na standardní dietě St-1. Hmotnost přijaté potravy samců z linie NMRI, jejichž obezita je vyvolaná vysokotučnou stravou (dále jen NMRI DIO samci) byla shodná s příjmem potravy kontrol, ale samice z linie NMRI, jejichž obezita je vyvolaná vysokotučnou stravou (dále jen NMRI DIO samice), měly snížený příjem potravy (tab. 3). U myši z kmene C57Bl/6, jejichž obezita je vyvolaná vysokotučnou stravou (dále jen C57Bl/6 DIO myši), byl příjem potravy téměř vyrovnaný s příjmem potravy kontrol, pouze C57Bl/6 DIO samci měli poněkud nižší příjem potravy (tab. 3). Ačkoliv měly DIO myši téměř totožný váhový příjem potravy jako kontroly, energetický příjem měly podstatně vyšší (tab. 3). Hmotnost NMRI a C57Bl/6 DIO samců byla srovnatelná s kontrolami. NMRI DIO samice se váhově nelišily od jejich kontrol. C57Bl/6 DIO samice vážily významně více než jejich kontroly již od 12. týdne věku, tj. po 5 týdnech na vysokotučné dietě (obr. 10).

Tabulka 3. Průměrný denní příjem potravy (g) a odpovídající energie diety (kJ) u kontrolních myši a u myši, jejichž obezita je vyvolaná vysokotučnou stravou (DIO myši). Hodnoty jsou vyjadřovány ve tvaru průměr ± SEM. n = 10 – 25 myši na skupinu

		samci	samice
NMRI	kontroly	7,00 ± 0,45 g (99,67 ± 6,74 kJ)	5,82 ± 0,14 g (82,94 ± 2,82 kJ)
	DIO myši	7,34 ± 0,54 g (163,01 ± 8,61 kJ)	4,53 ± 0,16 g (100,68 ± 4,39 kJ)
C57Bl/6	kontroly	4,07 ± 0,23 g (57,92 ± 1,62 kJ)	3,48 ± 0,14 g (49,62 ± 1,29 kJ)
	DIO myši	3,55 ± 0,27 g (78,82 ± 2,82 kJ)	3,14 ± 0,23 g (69,69 ± 2,96 kJ)



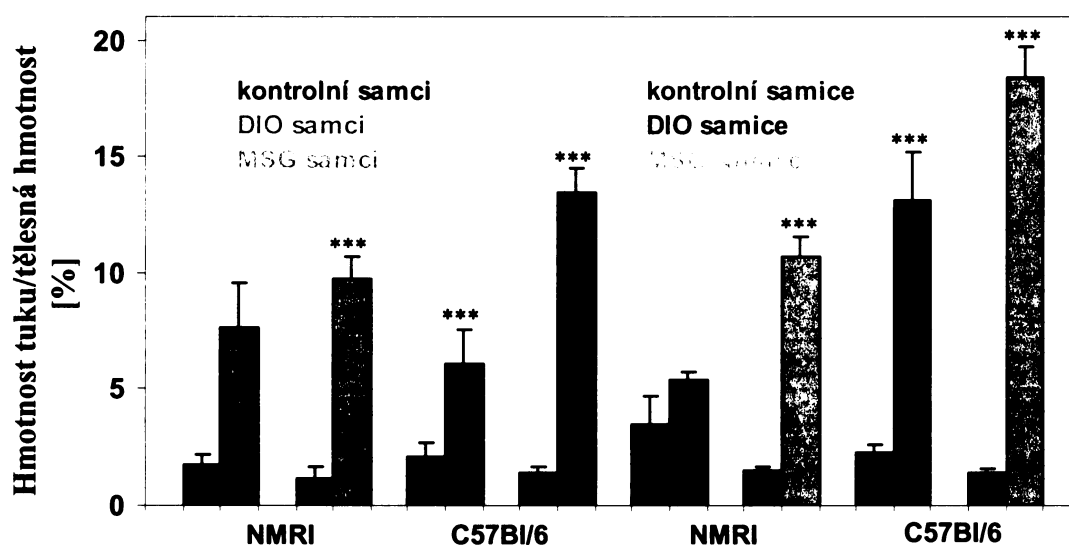
Obr. 10. Hmotnosti outbredních NMRI a inbredních C57Bl/6 kontrolních a DIO myši: a) samci, b) samice. $n = 10$ myši na skupinu pro NMRI a $n = 25$ myši na skupinu pro C57Bl/6. Signifikance je * $P < 0,05$ a * $P < 0,001$ pro C57Bl/6 DIO samice vůči kontrolním samicím.**

5.1.3. Hmotnost odebraných orgánů

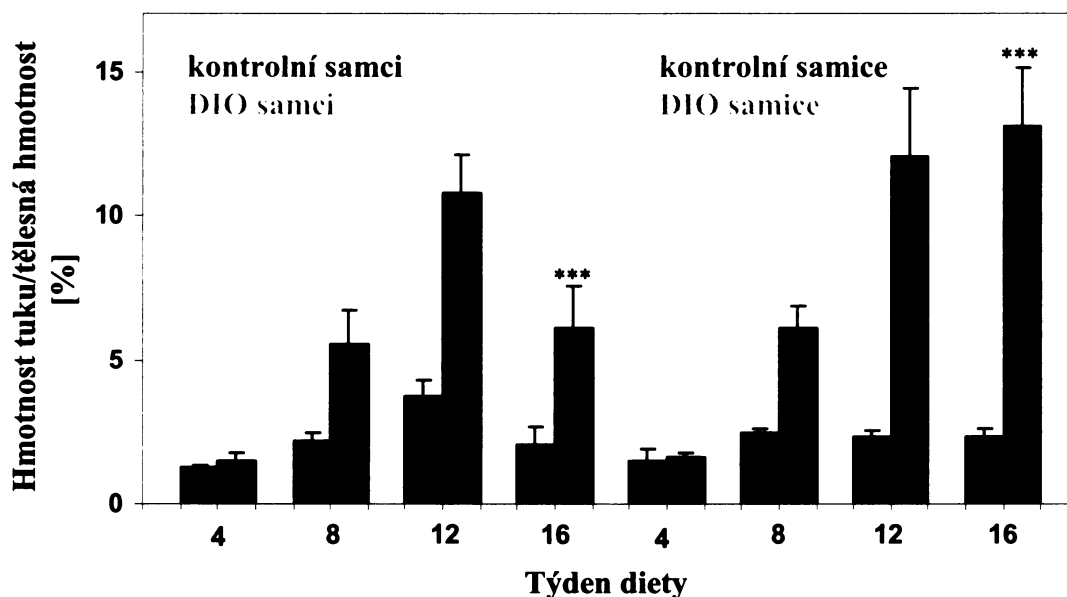
- **Tuk**

K určení míry obezity u obou modelů myši obezity byla odebrána bílá tuková tkáň. Jak MSG, tak i DIO myši nejvíce akumulovaly subkutánní, abdominální a gonadální tuk. NMRI MSG samice a samci akumulovali až 8x více tuku než kontroly; C57Bl/6 MSG samci téměř 10x více než kontroly a samice dokonce až 13x více. NMRI DIO samci akumulovali 4x více tuku než kontroly, samice téměř 2x více; C57Bl/6 DIO samci 3x více tuku a samice až 6x více než kontroly. Z hlediska akumulace tuku je inbrední kmen C57Bl/6 náchylnější k obezitě než outbrední linie NMRI (obr. 11).

U C57Bl/6 DIO myši byl sledován vliv vysokotučné stravy na vývoj obezity v průběhu 16 týdnů. Zvýšené množství bílé tukové tkáně u těchto myši bylo pozorováno již v 8. týdnu podávání vysokotučné diety. V dalších týdnech diety se množství tuku stále zvyšovalo (obr. 12). Samice akumulovaly více tuku než samci od začátku podávání diety.



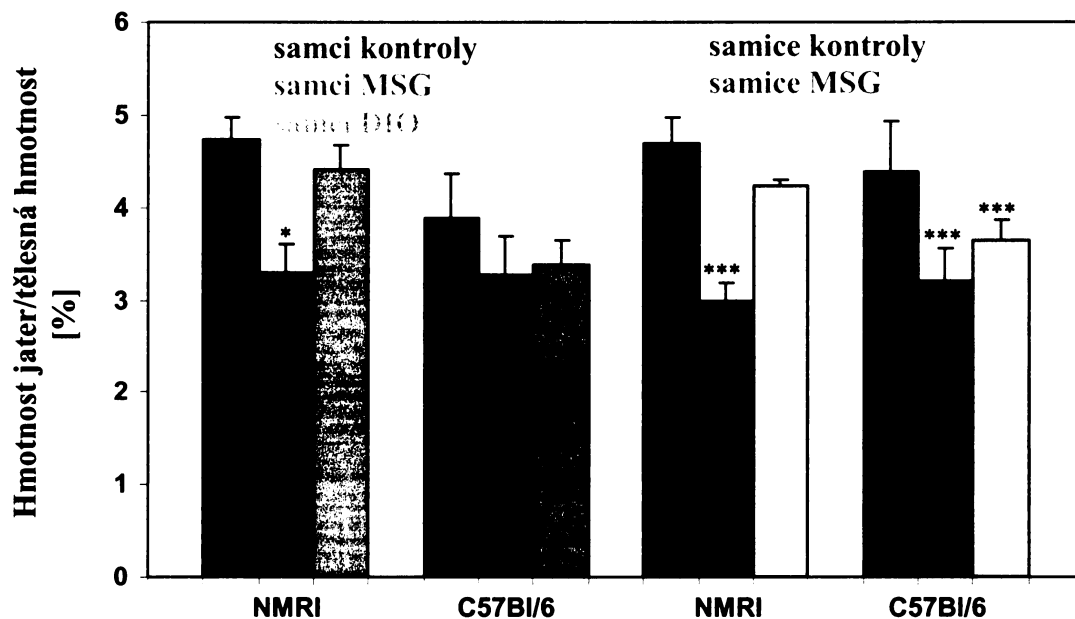
Obr. 11. Poměr hmotnosti tuku k tělesné hmotnosti outbredních NMRI a inbredních C57Bl/6 myši. MSG myši a jejich kontroly byly v 16. týdnu věku. DIO myši a jejich kontroly byly ve 23. týdnu věku. $n = 3 - 15$ myši na skupinu. Signifikance je $*P < 0,001$ (myši model obezity vůči kontrolám).**



Obr. 12. Vývoj obezity u C57Bl/6 DIO myši v průběhu vysokotučné diety. $n = 3 - 15$ myši na skupinu. Signifikance je $***P < 0,001$ (DIO model obezity vůči kontrolám).

- **Játra**

Játra jsou nejvýznamnějším místem syntézy mastných kyselin a obezita je může nepříznivě ovlivnit, proto byla játra odebrána u obou modelů myši obezity. Kontrolní myši měly zdravá játra, kdežto u MSG a DIO myši se objevila steatóza (ztučnění) jater. Játra těchto myši měla houbovitou strukturu a hnědou nebo růžovou barvu (podle toho, zda byla steatóza počínající nebo v pokročilém stavu). Hmotnost jater MSG i DIO myši byla snížena ve srovnání s kontrolami, ale u MSG myši byl rozdíl významnější: NMRI MSG samci měli o 30 % nižší hmotnost jater než kontroly a samice o 37 %; C57Bl/6 MSG samci o 15 % nižší hmotnost jater a samice o 27 %. NMRI DIO samci měli o 7 % nižší hmotnost jater než kontroly a samice o 10 %; C57Bl/6 DIO samci měli o 13 % menší játra a samice o 17 % (obr. 13).

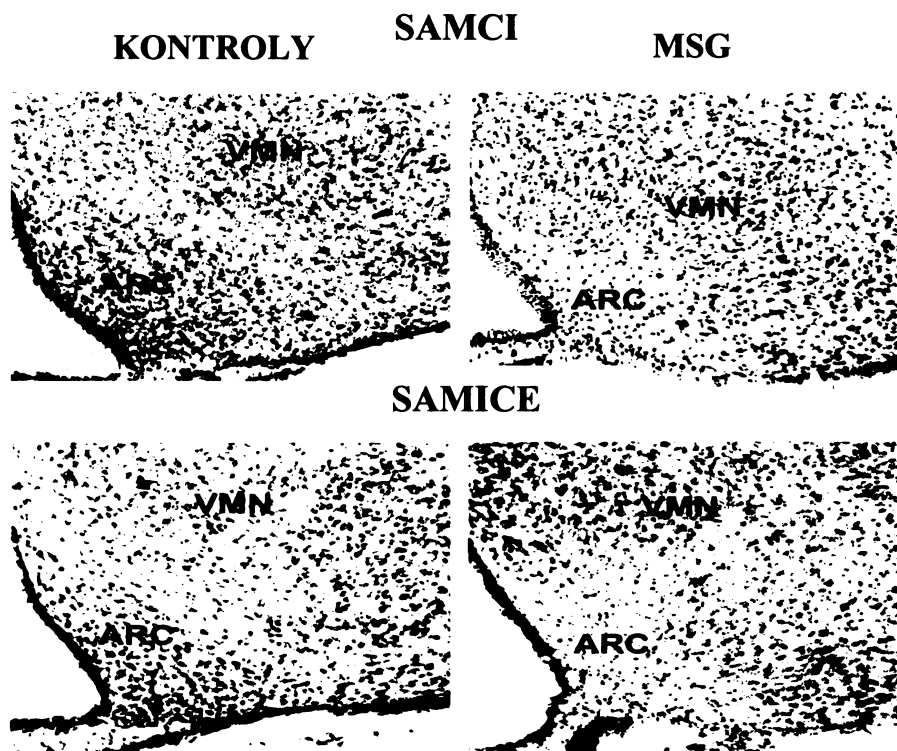


Obr. 13. Poměr hmotnosti jater k tělesné hmotnosti outbredních NMRI a inbredních C57Bl/6 myši. MSG myši a jejich kontroly byly v 16. týdnu věku. DIO myši a jejich kontroly byly ve 23. týdnu věku. $n = 3 - 15$ myši na skupinu. Signifikance je * $P < 0,05$ a *** $P < 0,001$ (myši model obezity vůči kontrolám).

5.1.4. Histologie mozku

Histochemie na řezech mozku u MSG myši prokázala, že buňky v ARC u těchto myši jsou zničené ve srovnání s kontrolami, tj., že existují specifické léze v ARC (obr. 14). U kontrolních myši byl ARC beze změny.

Mezi kontrolami a DIO myšmi nebyl žádný rozdíl v histologickém obrazu v oblasti ARC.



Obr. 14. Histologie mozku u samců a samic kontrolních a MSG myši. Léze v oblasti ARC u MSG myši: tyto myši mají zničené neurony v ARC oproti kontrolám. $n = 3$ myši na skupinu. ARC – nucleus arcuatus, VMN – ventromediální jádro.

5.1.5. Stanovení biochemických parametrů v séru

U NMRI a C57Bl/6 kontrolních, MSG a DIO myši byly stanoveny hladiny leptinu, inzulínu a glukosy v séru. NMRI MSG myši mají hyperleptinémii (zvýšenou hladinu leptinu), která je významnější u samic. Samci jsou rezistentní k inzulínu, neboť mají po 17 hod hladovění hyperinzulinémií a hyperglykémii (zvýšenou hladinu inzulínu a glukosy). C57Bl/6 MSG myši mají také hyperleptinémii, která je významnější u samic, mírně zvýšenou glukosu, ale nevýznamnou změnu v hladině inzulínu (tab. 4).

NMRI a C57Bl/6 DIO myši mají hyperleptinémii, C57Bl/6 DIO samci mají významnou hyperglykémii provázenou mírnou hyperinzulinémií (tab. 4).

Tabulka 4. Sérové koncentrace leptinu, inzulinu a glukosy

u 17 hod hladových a sytých outbredních NMRI a inbredních C57Bl/6 kontrolních, MSG a DIO myši. Hodnoty jsou vyjadřovány ve tvaru průměr ± SEM. Signifikance je

***P < 0,05; **P < 0,01 a ***P < 0,001 (myši model obezity vůči kontrolám).**

n = 3 – 15 myši na skupinu.

		Leptin [ng/ml]	Inzulin [ng/ml]	Glukosa [mmol/l]
hladoví samci NMRI	kontroly	0,45 ± 0,14	0,20 ± 0,04	5,55 ± 1,88
	MSG myši	30,94 ± 10,96 ***	3,31 ± 3,00	9,50 ± 2,56 *
hladové samice NMRI	kontroly	0,96 ± 0,32	0,33 ± 0,10	5,65 ± 0,86
	MSG myši	37,70 ± 11,70 ***	0,52 ± 0,10	5,75 ± 0,94
hladoví samci C57Bl/6	kontroly	0,37 ± 0,14	0,38 ± 0,09	3,48 ± 0,54
	MSG myši	15,87 ± 3,70 ***	0,65 ± 0,31	3,19 ± 0,55
	kontroly	0,30 ± 0,06	0,48 ± 0,09	3,57 ± 0,62
	DIO myši	2,50 ± 0,80 **	0,68 ± 0,17	8,74 ± 1,15 ***
hladové samice C57Bl/6	kontroly	0,85 ± 0,18	0,26 ± 0,02	4,59 ± 0,28
	MSG myši	44,07 ± 3,78 ***	0,64 ± 0,23	2,98 ± 0,75
	kontroly	0,61 ± 0,13	0,57 ± 0,05	4,37 ± 0,45
	DIO myši	10,09 ± 3,87 ***	0,66 ± 0,09	5,83 ± 0,63 *
sytí samci NMRI	kontroly	0,94 ± 0,54	1,41 ± 0,72	7,73 ± 1,24
	MSG myši	31,92 ± 13,52 ***	12,18 ± 6,78 ***	16,11 ± 9,24
	kontroly	0,96 ± 0,19	3,07 ± 0,58	8,57 ± 0,76
	DIO myši	4,38 ± 1,56	2,34 ± 0,63	10,78 ± 0,77
syté samice NMRI	kontroly	2,62 ± 1,08	0,64 ± 0,22	7,90 ± 0,96
	MSG myši	77,05 ± 17,72 ***	6,34 ± 4,70 *	10,68 ± 4,30
	kontroly	1,32 ± 0,22	0,84 ± 0,15	3,95 ± 0,69
	DIO myši	2,37 ± 4,70	1,15 ± 0,18	7,73 ± 4,30 **
sytí samci C57Bl/6	kontroly	7,00 ± 1,21	1,97 ± 0,62	8,20 ± 0,64
	MSG myši	45,55 ± 6,54 ***	1,37 ± 0,31	7,88 ± 0,62
	kontroly	1,72 ± 0,39	2,16 ± 0,34	9,38 ± 0,83
	DIO myši	4,22 ± 1,17 *	2,68 ± 0,56	14,74 ± 0,59 ***
syté samice C57Bl/6	kontroly	5,06 ± 0,89	0,42 ± 0,11	7,94 ± 0,93
	MSG myši	63,98 ± 6,41 ***	1,62 ± 0,43 *	8,76 ± 0,58
	kontroly	3,28 ± 1,06	0,83 ± 0,19	7,79 ± 0,62
	DIO myši	8,27 ± 2,41 *	1,82 ± 0,38 *	11,35 ± 0,80 ***

5.2. SLEDOVÁNÍ PŘÍJMU POTRAVY U MYŠÍ

5.2.1. Účinky peptidu CART (61 – 102) a CCK-8

HLADOVÍ SAMCI Z KMENE C57Bl/6

Účinky peptidu CART (61 – 102) a CCK-8 byly sledovány u C57Bl/6 kontrolních, MSG a DIO samců po 17 hod hladovění. Látky se myším podávaly podle místa svého účinku, tedy CCK-8 nitrobřišně (IP) a peptid CART (61 – 102) do třetí mozkové komory (ICV). Abychom zjistili, zda CCK-8 a peptid CART (61 – 102) se vzájemně ovlivňují, myším byly podávány obě látky najednou, popřípadě v kombinaci s antagonistou receptoru CCK_A devazepidem a poté peptid CART (61 – 102).

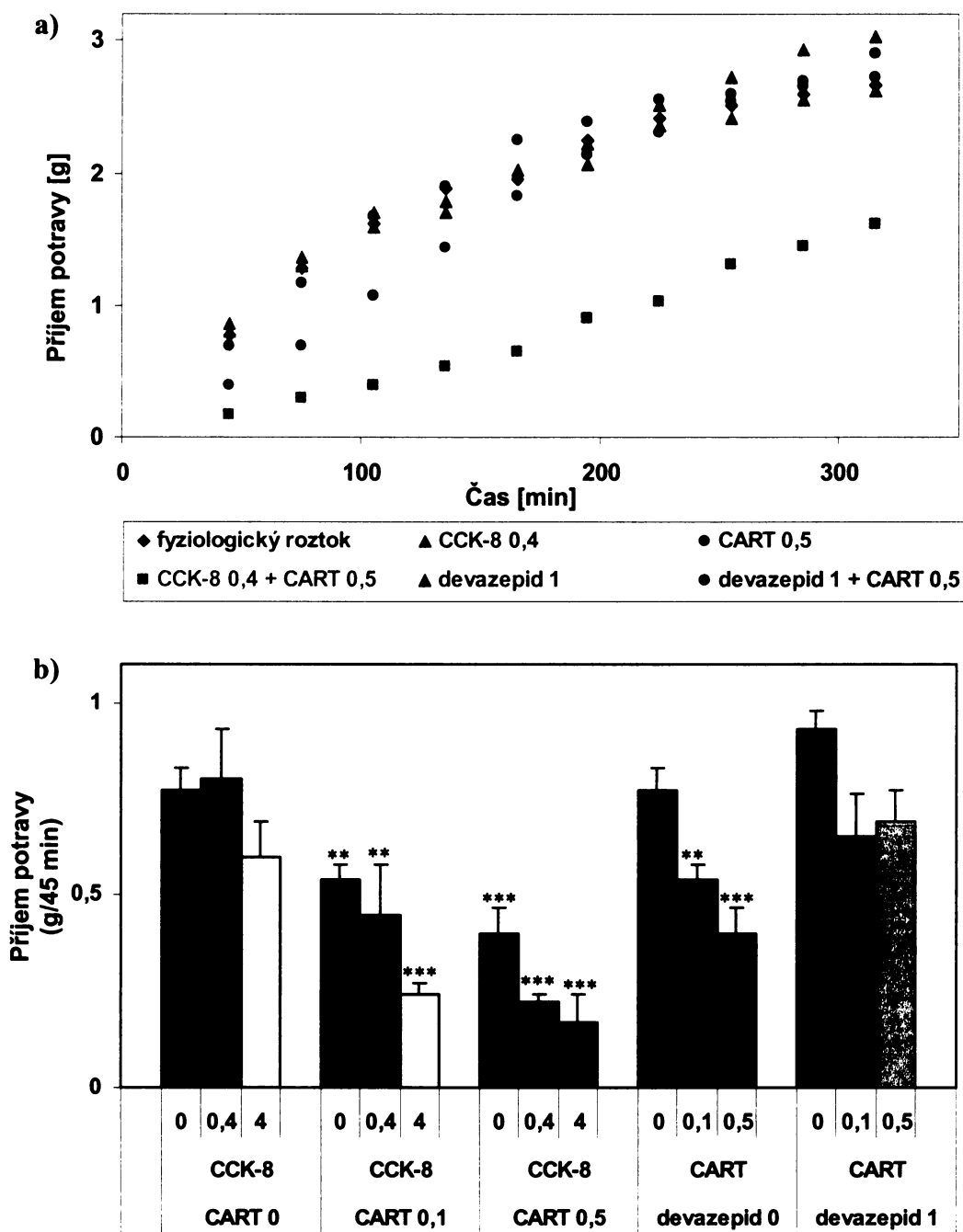
IP injekce CCK-8 (0,4 a 4 µg/kg) nevýznamně snížila příjem potravy u hladových kontrol ve srovnání s účinkem po injekci fyziologického roztoku (obr. 15), zatímco CCK-8 v dávce 4 µg/kg významně snížil příjem potravy u hladových DIO myší ve srovnání s účinkem po injekci fyziologického roztoku (obr. 16). Účinek CCK-8 byl krátkodobý, zhruba do 150 min, poté se vyrovnal kontrolám. U MSG myší neměl CCK-8 žádný účinek (obr. 17).

IP injekce devazepidu (1 mg/kg) nevýznamně zvýšila příjem potravy u hladových kontrol ve srovnání s účinkem po injekci fyziologického roztoku (obr. 15), kdežto u hladových DIO myší měla zhruba stejný účinek na příjem potravy jako fyziologický roztok (obr. 16). Devazepid neměl žádný účinek na příjem potravy u MSG myší (obr. 17).

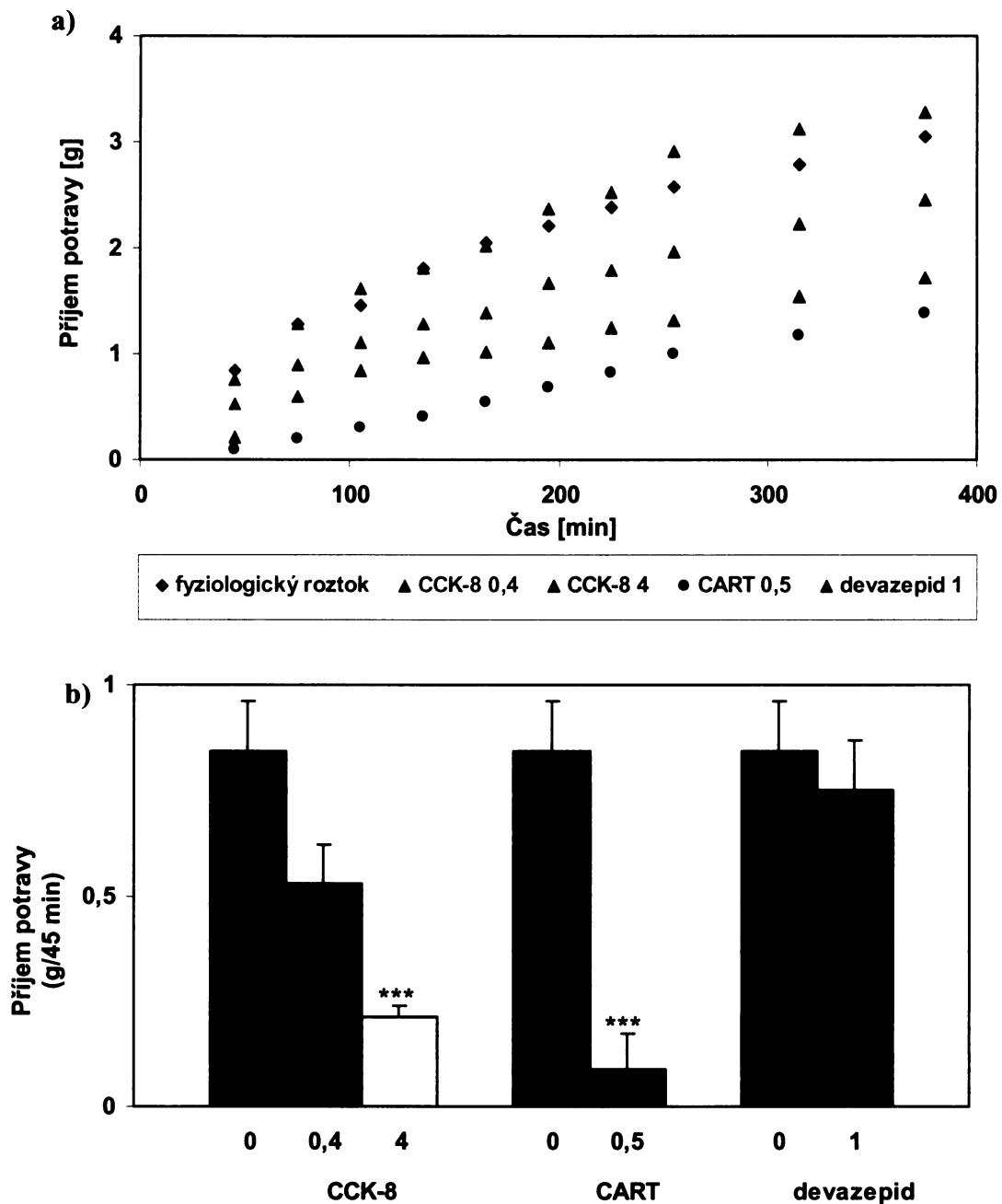
ICV injekce peptidu CART (61 – 102) (0,1 a 0,5 µg/myš) významně snížila příjem potravy u hladových kontrol a hladových DIO myší v dávce 0,5 µg/myš (obr. 15 a 16). Účinek peptidu CART byl krátkodobý, zhruba do 200 min po podání. Ani peptid CART neměl vliv na příjem potravy u hladových MSG myší (obr. 17).

Kombinace CCK-8 (IP injekce) s peptidem CART (61 – 102) (ICV injekce, 5 min po IP injekci CCK-8) ještě více snížila příjem potravy u hladových kontrol než samotný CCK-8 nebo peptid CART (obr. 15). Společný účinek těchto dvou látek byl dlouhodobý. Ukazuje to na synergistický účinek obou látek.

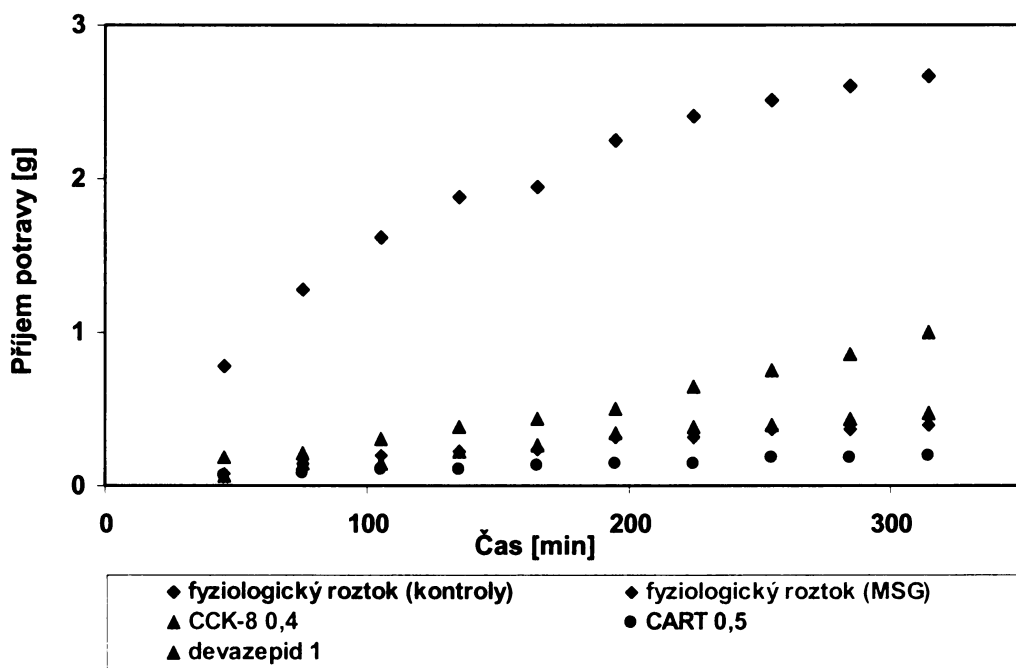
Abychom zjistili, jestli devazepid blokuje anorektický účinek peptidu CART, byla hladovým kontrolním myším podávána kombinace devazepidu (IP injekce, 1 hod před ICV injekcí peptidu CART) a peptidu CART (61 – 102) (ICV injekce). Devazepid způsobil, že peptid CART po ICV podání nesnižoval příjem potravy, tedy blokoval anorektický účinek peptidu CART u hladových kontrol (obr. 15).



Obr. 15. Příjem potravy u hladových kontrolních C57Bl/6 samců v 16. týdnu věku:
 a) kumulativní příjem potravy; b) příjem potravy 45 min po podání látek (největší účinek látek). CCK-8 (IP podání, 0,4 a 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$), peptid CART (61 – 102) (ICV podání, 0,1 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{myš}$), devazepid (IP podání, 1 mg/kg). $n = 6 - 8$ myši na skupinu. Signifikance je ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$ (látka vůči fyziologickému roztoku).



Obr. 16. Příjem potravy u hladových DIO C57Bl/6 samců ve 23. týdnu věku:
 a) kumulativní příjem potravy; b) příjem potravy 45 min po podání látek (největší účinek látek). CCK-8 (IP podání, 0,4 a 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$), peptid CART (61 – 102) (ICV podání, 0,5 $\mu\text{g}/\text{myš}$), devazepid (IP podání, 1 mg/kg). $n = 6 - 8$ myši na skupinu. Signifikance je *** $P < 0,001$ (látka vůči fyziologickému roztoku).



Obr. 17. Kumulativní příjem potravy u hladových MSG C57Bl/6 samců v 16. týdnu věku: CCK-8 (IP podání, 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$), peptid CART (61 – 102) (ICV podání, 0,5 $\mu\text{g}/\text{myš}$), devazepid (IP podání, 1 mg/kg). $n = 6 - 8$ myši na skupinu.

5.2.2. Účinky peptidu CART (61 – 102), CCK-8 a NPY

SYTÍ SAMCI Z KMENE C57Bl/6

Pro další objasnění vztahu peptidu CART k látkám ovlivňujících příjem potravy byl sledován příjem potravy u sytých C57Bl/6 kontrolních, MSG a DIO samců po podání peptidu CART (61 – 102) do třetí mozkové komory (ICV), CCK-8 nitrobřišně (IP) a NPY do třetí mozkové komory (ICV) nebo kombinace peptidu CART (61 – 102) a NPY nebo kombinace NPY a CCK-8.

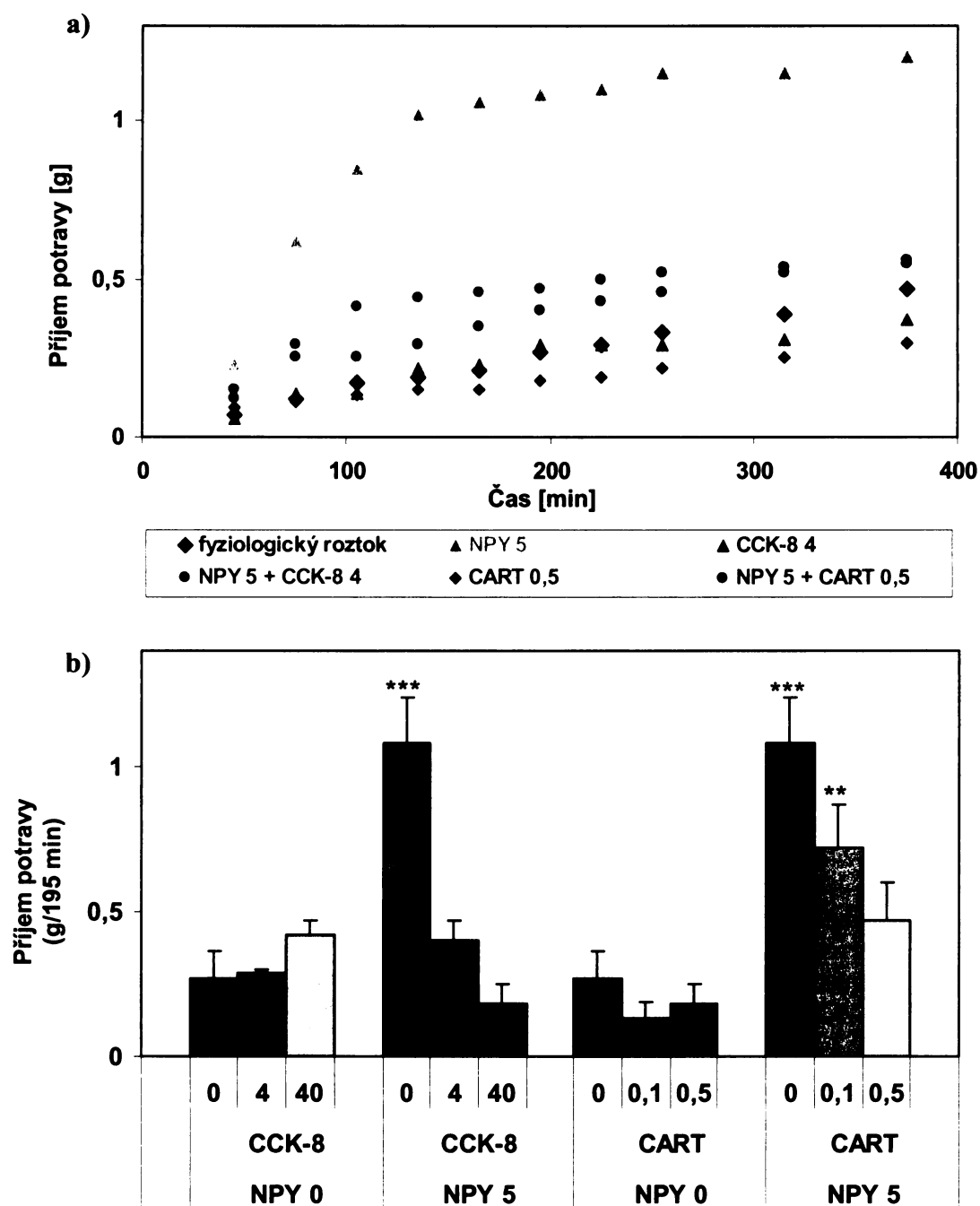
IP injekce CCK-8 (4 a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) u sytých kontrolních, DIO a MSG myší neměla účinek na příjem potravy ve srovnání s účinkem po injekci fyziologického roztoku (obr. 18, 19 a 20).

ICV injekce peptidu CART (61 – 102) (0,1 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{myš}$) u sytých kontrolních, DIO a MSG myší neměla významný účinek na příjem potravy ve srovnání s účinkem po injekci fyziologického roztoku (obr. 18, 19 a 20).

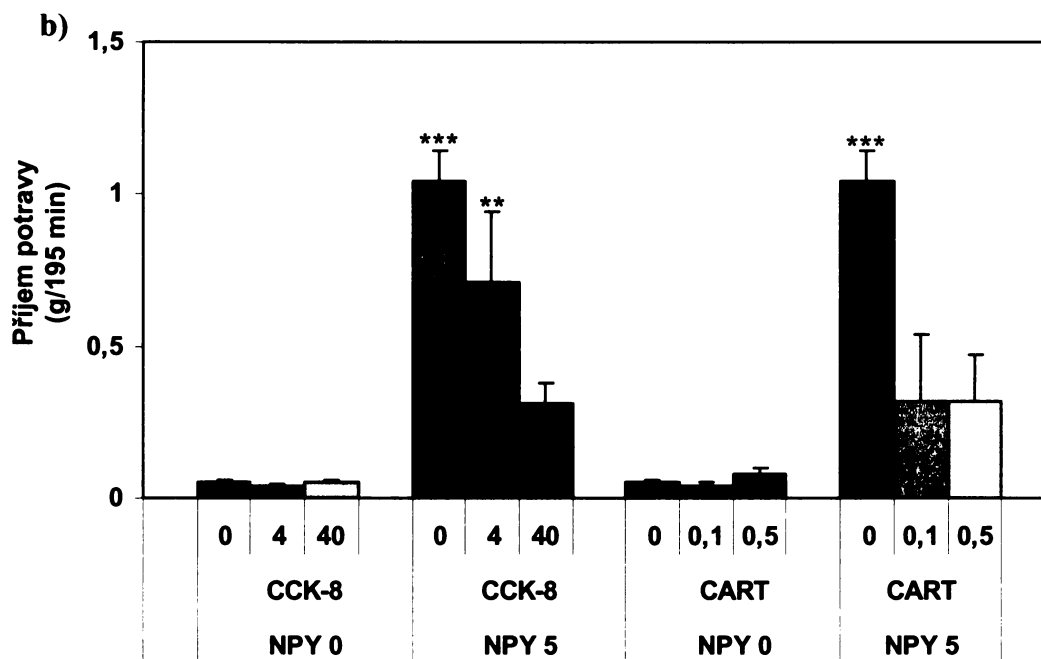
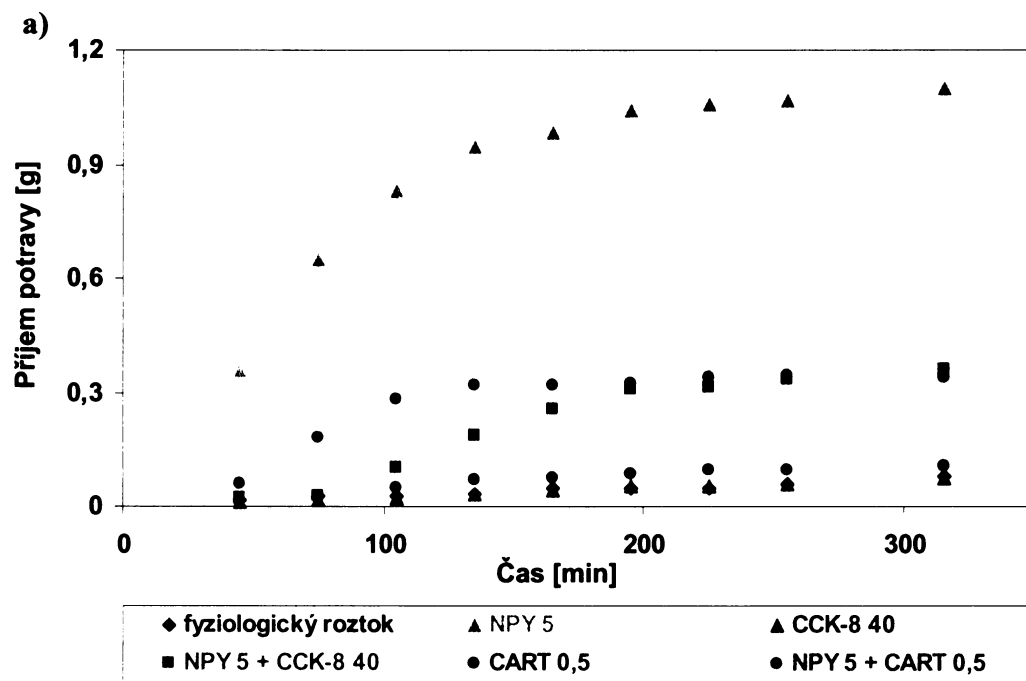
ICV injekce NPY (5 $\mu\text{g}/\text{myš}$) významně zvýšila příjem potravy u sytých kontrolních, DIO a MSG myší ve srovnání s účinkem po injekci fyziologického roztoku (obr. 18, 19 a 20). Největší účinek NPY byl 195 min po injekci.

Kombinace NPY (ICV injekce) a CCK-8 (IP injekce, 45 min po ICV injekci NPY) způsobila, že CCK-8 snížil příjem potravy navozený NPY u sytých kontrolních a DIO myší (obr. 18 a 19). U MSG myší CCK-8 nesnížil příjem potravy vyvolaný pomocí NPY (obr. 20).

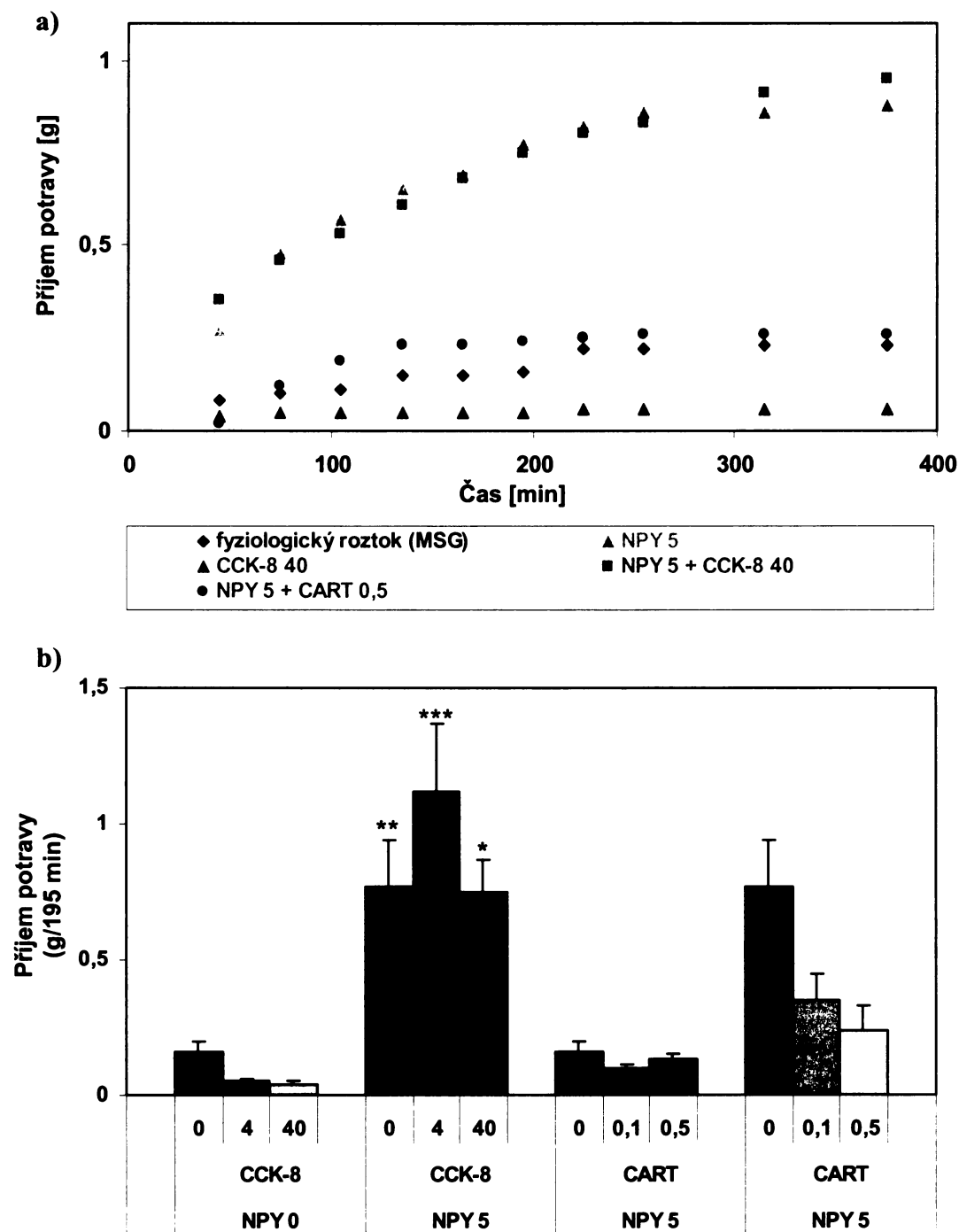
ICV injekce peptidu CART (61 – 102) podaná současně s NPY způsobila, že peptid CART (61 – 102) snížil příjem potravy navozený NPY u sytých kontrolních, DIO a MSG myší (obr. 18, 19 a 20).



Obr. 18. Příjem potravy u sytých kontrolních samců v 16. týdnu věku: a) kumulativní příjem potravy; b) příjem potravy 195 min po podání látek (největší pozorovaný účinek NPY). NPY (ICV podání, 5 $\mu\text{g}/\text{myš}$), CCK-8 (IP podání, 4 a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$), peptid CART (61 – 102) (ICV podání, 0,1 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{myš}$). $n = 6 - 8$ myši na skupinu. Signifikance je $P < 0,01$ a $***P < 0,001$ (látka vůči fyziologickému roztoku).**



Obr. 19. Příjem potravy u sytých DIO C57BU/6 samců ve 23. týdnu věku.
 a) kumulativní příjem potravy; b) příjem potravy 195 min po podání látek (největší pozorovaný účinek NPY). NPY (ICV podání, 5 µg/myš), CCK-8 (IP podání, 4 a 40 µg/kg), peptid CART (61 – 102) (ICV podání, 0,1 a 0,5 µg/myš). n = 6 – 8 myši na skupinu. Signifikance je **P < 0,01 a ***P < 0,001 (látka vůči fyziologickému roztoku).

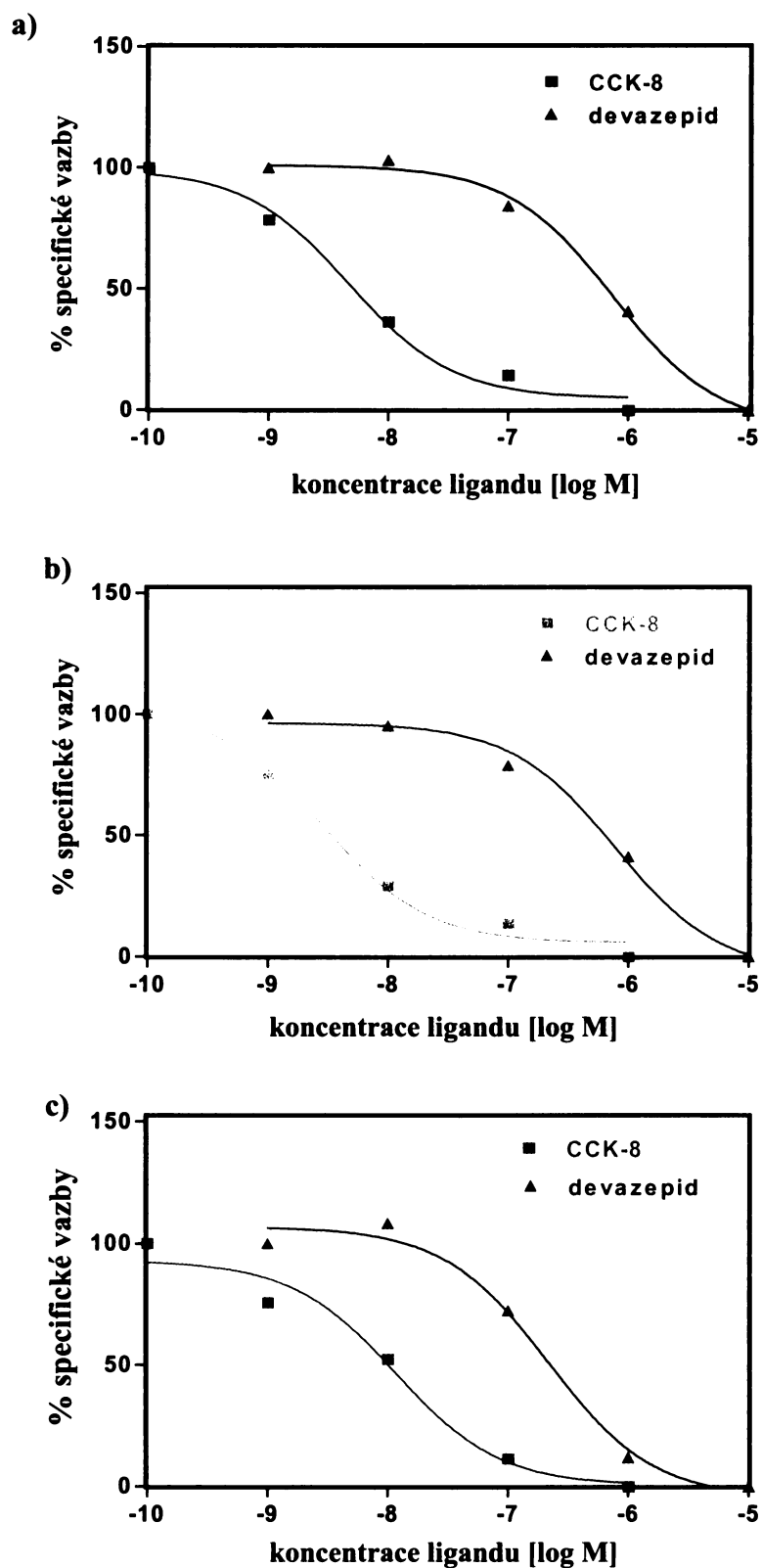


Obr. 20. Přijem potravy u sytých MSG C57Bl/6 samců v 16. týdnu věku.
 a) kumulativní příjem potravy; b) příjem potravy 195 min po podání látek (největší pozorovaný účinek NPY). NPY (ICV podání, 5 $\mu\text{g}/\text{myš}$), CCK-8 (IP podání, 4 a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$), peptid CART (61 – 102) (ICV podání, 0,1 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{myš}$). $n = 6 - 8$ myši na skupinu. Signifikance je * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$ (látka vůči fyziologickému roztoku).

5.3. VAZBA ^{125}I -CCK-8 NA BUNĚČNÉ MEMBRÁNY Z MYŠÍCH MOZKŮ

Byly změřeny kompetiční vazebné křivky CCK-8 a antagonisty receptoru CCK_A , devazepidu, nejprve na membrány z morčecích mozků bez mozkové kůry a poté z mozků kontrolních, MSG a DIO myší, opět bez mozkové kůry (obr. 21). Morčecí mozkové membrány sloužily jako standard, na kterém se optimalizovaly podmínky pro pokus na membrány z myších mozků. Podmínky jsme optimalizovali podle literatury, která popisuje vazbu CCK-8 na membrány z morčecích membrán z mozkové kůry [80]. Zkoušeli jsme různé koncentrace membrán: 600 μg , 150 μg a 100 μg bílkovin o objemu 250 μl , různou dobu inkubace: 30 min, 60 min a 90 min. Pokusy proběhly při 22 °C. Porovnávali jsme mezi sebou membrány z mozkové kůry a zbytku mozku bez mozkové kůry. Z toho vplynuly optimální podmínky pro myší mozkové membrány, které byly: 100 μg bílkovin/250 μl , doba inkubace 60 min a teplota 22 °C.

V kompetičních vazebných pokusech soutěžil ^{125}I -CCK-8 s CCK-8 o jedno vazebné místo. Protože ^{125}I -CCK-8 má k receptoru CCK_A i k receptoru CCK_B stejnou afinitu [79], jednalo se o homologní vazbu a mohli jsme stanovit B_{max} a K_d . Tyto parametry jsme porovnávali u vazby na membrány z mozků kontrolních, MSG a DIO myší. Počet vazebných míst ve vzorku byl u kontrolních, MSG a DIO myší nízký (průměry naměřených B_{max} u samců a samic kontrolních, MSG a DIO myší byly: 24,72 \pm 3,08 fmol/mg, 24,63 \pm 2,42 fmol/mg a 22,97 \pm 1,01 fmol/mg) (tab. 5a). Mezi B_{max} kontrolních, MSG a DIO myší nebyly významné rozdíly. Ani v afinitě CCK-8 k receptorům nebyly významné rozdíly mezi kontrolními, MSG a DIO myšmi (průměry naměřených K_d u samců a samic kontrolních, MSG a DIO myší byly: 1,88 \pm 0,69 nM, 2,43 \pm 0,45 nM a 5,13 \pm 3,06 nM) (tab. 5a). Získané hodnoty pro IC_{50} a K_i CCK-8 a devazepid jsou uvedeny v tab. 5a, b.



Obr. 21. Kompetiční vazebné křivky ^{125}I -CCK-8 vytěsněného CCK-8 a devazepidem na myši mozkové membrány: a) kontroly, b) MSG myši, c) DIO myši. Vazebné křivky byly sestrojeny s použitím nelineární regrese. Každá křivka reprezentuje příklad z alespoň tří měření v duplikátech.

Tabulka 5. Získané experimentální hodnoty pro IC_{50} , K_i , K_d a B_{max} : vazebné křivky ^{125}I -CCK-8 vytěsněného: a) CCK-8, b) devazepidem na membrány z morčecích a myších mozků.

Hodnoty jsou vyjadřovány ve tvaru průměr \pm SEM. IC_{50} , K_i , K_d a B_{max} byly vysvětleny v kapitole 4.4.4.1.

a)

<i>Křivka CCK-8</i>	IC_{50} [nM]	K_i [nM]	K_d [nM]	B_{max} [fmol/mg]
morče	3,31 \pm 0,61	3,27 \pm 0,60	3,12 \pm 0,58	25,85 \pm 0,85
myši samci kontroly	2,69 \pm 0,74	2,66 \pm 0,73	2,59 \pm 0,70	24,85 \pm 1,93
myši samice kontroly	1,20 \pm 0,69	1,19 \pm 0,69	1,17 \pm 0,68	24,59 \pm 4,22
myši samci MSG	3,26 \pm 0,60	3,22 \pm 0,59	3,21 \pm 0,57	25,59 \pm 1,59
myši samice MSG	1,69 \pm 0,33	1,67 \pm 0,33	1,65 \pm 0,32	23,66 \pm 3,25
myši samci DIO	4,44 \pm 2,24	4,38 \pm 2,21	4,20 \pm 2,11	22,87 \pm 0,88
myši samice DIO	6,25 \pm 4,05	6,17 \pm 4,00	6,05 \pm 4,00	23,06 \pm 1,14

b)

<i>Křivka devazepidu</i>	IC_{50} [10^{-7} M]	K_i [10^{-7} M]
morče	8,62 \pm 1,85	8,50 \pm 1,82
myši samci kontroly	4,13 \pm 1,86	4,07 \pm 1,83
myši samice kontroly	3,76 \pm 2,03	3,71 \pm 2,00
myši samci MSG	4,27 \pm 1,55	4,21 \pm 1,53
myši samice MSG	7,82 \pm 1,61	7,73 \pm 1,61
myši samci DIO	7,67 \pm 4,74	7,30 \pm 4,41
myši samice DIO	1,99 \pm 0,71	1,96 \pm 0,70

6. DISKUZE

6.1. OBEZITA A PŘÍJEM POTRAVY

Dnes již víme, že obezita není jen kosmetickou vadou, za kterou byla v minulosti považována, ale jde o závažný zdravotní problém. Obezita významně zvyšuje výskyt cukrovky spojené se sníženou citlivostí na účinek inzulínu, vysokého krevního tlaku, úmrtnost na choroby kardiovaskulárního systému a také množství nádorových onemocnění [3]. Množství obézních lidí celosvětově stoupá nesmírně rychlým tempem, a to i v České republice [8]. Dnes máme k dispozici dva léky, které v kombinaci s úpravou diety a životního stylu pomáhají snižovat hmotnost – sibutramin a orlistat. Ale ani jeden z nich není bez vedlejších účinků.

Nové objevy v oblasti regulace příjmu potravy vedly k závěru, že je tato regulace daleko složitější, než jsme se domnívali. Hlavní oblast mozku zodpovědná za regulaci příjmu potravy je hypotalamus. Podařilo se i určit konkrétní neuronová jádra v hypotalamu, která jsou zapojená do tohoto procesu – především nucleus arcuatus (obr. 1).

Dnes již existuje dlouhý seznam látek ovlivňujících příjem potravy. Vědci věnují velkou pozornost peptidům CART, neboť tyto peptidy mimo jiné snižují příjem potravy, ale jejich role v regulaci příjmu potravy není příliš objasněna, a to ani jejich vztah k dalším látkám ovlivňujících příjem potravy (např. cholecystokininu). Receptor(y) pro peptidy CART dosud ještě není (nejsou) známý(é). Nalezení receptoru(ů) peptidů CART je velmi důležité pro další výzkum a využití biologických vlastností peptidů CART k výrobě potenciálních farmakologických léčiv.

6.2. CHARAKTERIZACE MODELŮ OBEZITY U MYŠÍ

Ve své diplomové práci se zabývám studiem účinků peptidu CART (61 – 102), oktapeptidu cholecystokininu (CCK-8) a neuropeptidu Y (NPY) na příjem potravy v modelech myší obezity. Zavedli jsme proto dva modely obézních myší, tj. s obezitou vyvolanou glutamátem sodným (MSG) nebo s obezitou vyvolanou vysokotučnou dietou (DIO).

MSG model myši obezity, který je charakterizován lézemi v ARC (obr. 14), je vhodný model pro studium rezistence k leptinu. V ARC se nacházejí receptory pro řadu látek ovlivňujících příjem potravy: pro leptin, inzulin (obr. 2), růstový hormon a další. Toto jádro dále obsahuje tzv. primární neurony související s regulací příjmu potravy: neurony AgRP/NPY, které produkují hormony zvyšující chuť k jídlu a neurony POMC/CART produkující hormony s opačným účinkem [14]. Jejich nepřítomnost v MSG modelu myši obezity má za následek nerovnováhu v regulaci příjmu potravy a výdeji energie. To vede sice k snížení příjmu potravy (tab. 2), ale patrně i k vyššímu výdeji energie a k většímu ukládání bílé tukové tkáně (obr. 11). Váhově se MSG samci příliš nelišili od kontrol, ale MSG samice vážily více než jejich kontroly (obr. 9). U MSG myši je malá produkce růstového hormonu [65], což vysvětluje kratší délku těla, ocasu, menší orgány (např. játra viz obr. 13) a nadměrné ukládání tukové tkáně (růstový hormon má lipolytickou aktivitu). Obezita u MSG myši má za následek neplodnost (jejich pohlavní orgány nejsou dobře vyvinuty) a steatózu jater. Metabolické změny, které způsobují obezitu i přes snížený příjem potravy u MSG myši, nejsou příliš objasněny. Jedno z možných vysvětlení je, že u těchto myši chybí receptory pro leptin a inzulin.

Je známo, že obecně mají samice vyšší hladinu leptinu než samci [81]. Outbrední NMRI a inbrední C57Bl/6 hladové i syté MSG myši měly významně zvýšené koncentrace leptinu (tab. 4). Tato hyperleptinémie byla ještě významnější u samic. Příčinou vyšších hladin leptinu u těchto myši je zřejmě nepřítomnost jeho receptorů v ARC, a tudíž porušení signalizace leptinu v mozku. MSG myši jsou svými metabolickými parametry velmi podobné *db/db* myšim, které mají nefunkční leptinový receptor a hyperleptinémii [63].

NMRI hladoví MSG samci mají zvýšené hladiny inzulinu (jsou rezistentní k inzulinu) a glukosy (tab. 4). NMRI hladové MSG samice nemají hyperinzulinémii ani hyperglykémii (tab. 4). Obecně je známo, že samci jsou náchylnější k rezistenci k inzulinu než samice [82]. NMRI sytí MSG samci a samice mají zvýšené hladiny inzulinu a glukosy (tab. 4). Tyto výsledky jsme již publikovali [83].

Na rozdíl od NMRI MSG myši nejsou C57Bl/6 MSG myši rezistentní k inzulinu a nemají zvýšené hladiny glukosy (tab. 4). Tento kmen je zřejmě odolnější k vývoji rezistence k inzulinu, naproti tomu citlivější k akumulaci tuku (obr. 11).

DIO model myši obezity je velmi podobný lidské obezitě získané v důsledku konzumace vysokokalorické potravy. DIO myši byly dlouhodobě krmeny vysokotučnou dietou, která obsahovala 60 % tuků [72]. V důsledku konzumace této stravy DIO myši

akumulovaly zvýšené množství tuku, ale samice se ukázaly být náchylnější k obezitě než samci (obr. 11 a 12). Samci se váhově příliš nelišili od jejich kontrol, ale samice vážily významně více než jejich kontroly (obr. 10). Ačkoliv měly DIO myši téměř totožný váhový příjem potravy jako kontroly, jejich příjem energie z vysokotučné diety byl vyšší (tab. 3). Obezita navozená vysokotučnou dietou je závislá na typu zvířecího kmene [70, 71]. Inbrední kmen C57Bl/6 je náchylnější k obezitě než řada jiných inbredních kmenů nebo outbrední linie NMRI (obr. 11).

Z literatury je známo, že po dlouhodobém kmení vysokotučnou stravou dojde k rezistenci k leptinu [68]. Naše DIO myši mají zvýšené hladiny leptinu (tab. 4). Důvody pro hyperleptinemii nejsou zatím známy, v poslední době byla vyslovená hypotéza, že dochází k poruše regulace leptinu na úrovni signalizace leptinovými receptory. DIO myši nemají významně zvýšené hladiny inzulínu, ale pouze zvýšené hladiny glukózy (tab. 4).

Naše výsledky vedou k závěru, že myši z kmene C57Bl/6 jsou náchylnější k obezitě než myši z outbrední linie NMRI. C57Bl/6 MSG i DIO myši mají vysoké hladiny leptinu. NMRI MSG samci jsou rezistentní k inzulínu, kdežto myši z kmene C57Bl/6 nejsou.

6.3. SLEDOVÁNÍ PŘÍJMU POTRAVY U MYŠÍ

Příjem potravy jsme stanovili u hladových nebo sytých kontrolních, MSG a DIO samců i samic z kmene C57Bl/6, ale mezi pohlavími nebyly výrazné rozdíly, a tudíž jsme do této diplomové práce vybrali výsledky z příjmu potravy pouze u samců.

6.3.1. Hladové kontrolní myši

Účinky peptidu CART (61 – 102) a CCK-8 jsme studovali u 17 hod hladových kontrolních samců z kmene C57Bl/6.

CCK je krátkodobý signál sytosti a snižuje příjem potravy u hladových hlodavců po jeho periferním podání [26]. IP injekce CCK-8 (0,4 a 4 µg/kg) nevýznamně snížila příjem potravy u hladových kontrolních samců ve srovnání s účinkem po injekci fyziologického roztoku (obr. 15). Je to proto, že CCK-8 byl podáván v prahových dávkách.

Devazepid je antagonist specifický pro receptor CCK_A, a tudíž spíše zvyšuje příjem potravy po jeho periferním podání [32]. IP injekce devazepidu (1 mg/kg)

nevýznamně zvýšila příjem potravy u hladových kontrolních samců ve srovnání s účinkem po injekci fyziologického roztoku (obr. 15). Tyto výsledky jsou srovnatelné s literaturou [84].

Je známo, že peptidy CART snižují příjem potravy po jejich centrálním podání [37, 40, 41]. My jsme též pozorovali výrazné snížení příjmu potravy po podání peptidu CART (61 – 102) (v dávkách 0,1 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{myš}$) do třetí mozkové komory u hladových kontrolních samců (obr. 15).

Bylo zjištěno, že velká část neuronů CART v nervu vagu také obsahuje receptor CCK_A [13, 51], vyslovili jsme tudíž hypotézu, že účinky peptidů CART na příjem potravy mohou souviset s účinky CCK. V naší studii jsme dokázali, že skutečně existuje synergistický vztah peptidu CART (61 – 102) a CCK-8 na příjem potravy u hladových kontrolních myší, neboť kombinace těchto dvou látek ještě více snížila příjem potravy u těchto myší, než samotný CCK-8 nebo peptid CART (61 – 102) (obr. 15). Jejich společný účinek byl navíc dlouhodobý (obr. 15a).

Pro další objasnění vztahu peptidu CART a CCK-8 byla myším podávána kombinace devazepidu a peptidu CART (61 – 102). Zjistili jsme, že devazepid blokoval anorektický účinek peptidu CART (61 – 102) na příjem potravy u hladových kontrol (obr. 15).

Z těchto výsledků vyplývá, že CCK-8 v prahových dávkách (0,4 a 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) a peptid CART (61 – 102) v dávkách, které jsou nižší, ale již významně snižují příjem potravy (0,1 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{myš}$), mají synergistický vztah s dlouhodobým účinkem.

6.3.2. Syté kontrolní myši

Účinky peptidu CART (61 – 102), CCK-8 a NPY jsme zkoumali u sytých kontrolních samců z kmene C57Bl/6.

CCK-8 a peptid CART (61 – 102) jsou anorexigenní látky, jejichž účinek na příjem potravy lze dobře měřit u hladových hlodavců, u nichž jsou nízké hladiny přirozeného peptidu CART a CCK. Naopak sytí hlodavci mají vysoké hladiny endogenního peptidu CART i CCK. Proto IP injekce CCK-8 (4 a 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) neměla účinek na příjem potravy u sytých kontrolních samců ve srovnání s účinkem po injekci fyziologického roztoku (obr. 18); stejně tak jako ICV injekce peptidu CART (61 – 102) (0,1 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{myš}$) (obr. 18).

NPY je mohutným stimulatorem příjmu potravy. Jeho největší účinek na příjem potravy je pozorován u sytých hlodavců, kdy jsou přirozené hladiny NPY minimální, proto

ICV injekce NPY (5 µg/myš) významně zvýšila příjem potravy u sytých kontrolních samců ve srovnání s účinkem po injekci fyziologického roztoku (obr. 18).

Bylo dokázáno, že u krys CCK-8 snížil příjem potravy vyvolaný pomocí NPY [55]. Naše studie potvrdily tyto výsledky z literatury na myších; CCK-8 (4 a 40 µg/kg) u sytých kontrolních myší skutečně snížil příjem potravy navozený NPY (5 µg/myš) (obr. 18).

Vztah peptidu CART a NPY byl popsán v hypotalamu pomocí imunohistochemie [56]. Dále bylo dokázáno, že u krys peptid CART snížil příjem potravy vyvolaný pomocí NPY [48]. V našich studiích jsme zjistili, že kombinace NPY (5 µg/myš) a peptidu CART (61 – 102) (buď s 0,1 µg/myš, nebo s 0,5 µg/myš) způsobila, že u sytých kontrolních myší peptid CART (61 – 102) snížil příjem potravy navozený NPY (obr. 18).

Výsledky vedou k závěru, že samotný CCK-8 nebo peptid CART (61 – 102) neměly účinek na příjem potravy u sytých kontrolních myší, ale oba snižovaly příjem potravy navozený orexigenním NPY.

6.3.3. Hladové a syté MSG myši

CCK-8, devazepid (byl podáván pouze hladovým myším) a peptid CART (61 – 102) neměly účinek na příjem potravy ani u 17 hod hladových ani u sytých MSG myší z kmene C57Bl/6 (obr. 17 a 20). MSG myši mají narušený rytmus příjmu potravy v důsledku poškození optického nervu; nerozeznávají den a noc [83]. Poškozením neuronů v ARC u těchto myší je porušena signalizace leptinem a inzulinem, které ovlivňují příjem potravy. Porušena je i regulace exprese a sekrece peptidu CART a ostatních neuropeptidů primárními neurony.

Překvapivé bylo zjištění, že ICV injekce NPY (5 µg/myš) významně zvýšila příjem potravy u sytých MSG myší (obr. 20). Pravděpodobným vysvětlením je, že receptory pro NPY se nenacházejí pouze v ARC, jehož orexigenní neurony AgRP/NPY a anorexigenní neurony POMC/CART jsou u MSG myší zničené, nýbrž i v dalších mozkových oblastech ovlivňujících příjem potravy, např. v PVN [52], proto byl účinek exogenně podaného NPY zachován.

CCK-8 (4 a 40 µg/kg) podaný IP neovlivnil příjem potravy navozený NPY (ICV injekce, 5 µg/myš) u sytých MSG myší (obr. 20). Možné vysvětlení pro to je, že u normálních myší existuje synergistický vztah CCK-8 a leptinu [55, 84]. Jelikož u MSG myší chybí v ARC receptor pro leptin, účinek CCK-8 je minimální v důsledku nefunkční interakce mezi CCK-8 a leptinem v mozkovém kmeni a hypotalamu. CCK-8

tudíž nesnižoval příjem potravy vyvolaný pomocí NPY a injekce NPY a následně podaného CCK-8 měla stejný účinek jako samotný NPY. Naše výsledky tedy dokazují, že pro anorexigenní účinek CCK-8 je nezbytný nepoškozený ARC a funkční leptinový receptor.

Na rozdíl od kombinace NPY a CCK-8 způsobilo společné ICV podání NPY (5 µg/myš) a peptidu CART (61 – 102) (buď s 0,1 µg/myš, nebo s 0,5 µg/myš), že u sytých MSG myši peptid CART snížil příjem potravy navozený NPY (obr. 20). Poškozením ARC jsou sice zničeny primární neurony (neurony AgRP/NPY a neurony POMC/CART), ale my jsme dokázali, že sekundární neurony, které se nacházejí mimo jiné v PVN a LHA, zůstanou nedotčeny, a tudíž mohou u MSG myši zprostředkovat anorektický účinek exogenně podaného peptidu CART (61 – 102) na příjem potravy vyvolaný pomocí NPY.

Z výsledků vyplývá, že CCK-8, devazepid a peptid CART (61 – 102) neměly účinek na příjem potravy u hladových MSG myši. U sytých MSG myši neměl CCK-8 vliv na příjem potravy navozený NPY, ale peptid CART (61 – 102) jej snižoval.

6.3.4. Hladové a syté DIO myši

DIO samci z kmene C57Bl/6 po 17 hod hladovění reagovali na peptidy ovlivňující příjem potravy podobně jako 17 hod hladoví kontrolní samci. Účinek CCK-8 (4 µg/kg) a peptidu CART (61 – 102) (0,5 µg/myš) na příjem potravy byl však větší než u kontrol (obr. 16). Již dávka 4 µg/kg pro CCK-8 měla významnější účinek než u normálních myši. Vysvětlením pro to by mohlo být, že DIO myši mají zvýšené hladiny leptinu po hladovění a v důsledku synergistického účinku CCK-8 a leptinu čím vyšší jsou hladiny leptinu, tím je CCK-8 citlivější [55, 84]. Leptin stimuluje sekreci a expresi peptidu CART [37]. Hyperleptinémie u těchto myši znamená vyšší expresi a sekreci peptidu CART. Peptid CART (61 – 102) by tedy mohl působit větší anorektický účinek u DIO myši také v důsledku hyperleptinémie.

Syté DIO myši reagovaly na peptidy ovlivňující příjem potravy podobně jako syté kontroly. Stejně jako u sytých kontrol, NPY u sytých DIO myši zvýšil příjem potravy (obr. 19). I u DIO myši jsme zjistili, že CCK-8 (4 a 40 µg/kg) a peptid CART (61 – 102) (0,1 a 0,5 µg/myš) snížily příjem potravy navozený NPY (5 µg/myš) (obr. 19).

Z výsledků vyplývá, že hladové DIO myši jsou citlivější k peptidu CART (61 – 102) v důsledku hyperleptinemie. U sytých DIO myší peptid CART (61 – 102) snížil příjem potravy vyvolaný pomocí NPY, stejně tak jako CCK-8 navozený NPY.

6.4. VAZBA ^{125}I -CCK-8 NA BUNĚČNÉ MEMBRÁNY Z MYŠÍCH MOZKŮ

CCK působí na dva typy receptorů, přičemž jeho periferní typ receptoru, receptor CCK_A , úzce souvisí s příjmem potravy. Počet vazebných míst ve vzorku buněčných membrán byl u kontrolních, MSG a DIO myší nízký a to proto, že receptor CCK_A se nachází převážně v periférii, ale jeho malá část je i v mozku, zejména v hypotalamu a v NTS [31]. Receptor CCK_B je všude v mozku ve velkém množství, ale jeho největší koncentrace je v mozkové kůře [28]. Použili jsme mozkové membrány bez mozkové kůry z toho důvodu, že právě hypotalamus je hlavním centrem kontroly příjmu potravy a mozková kůra hraje jinou roli v příjmu potravy (její role souvisí s chováním při příjmu potravy). V mozku bez mozkové kůry se tedy nachází jak receptor CCK_B , tak i CCK_A , ten ale v nízkém množství (tab. 5). V pokusech jsme použili 100 μg membrán/250 μl . Toto množství bylo maximální možné vzhledem k nízkému množství tkáně získané z myších mozků. Nespecifická vazba byla relativně vysoká, ale nižší než 50 % [76]. Porovnali jsme množství receptorů CCK (B_{max}) a afinitu ^{125}I -CCK-8 k receptorům (K_d) v mozku proto, abychom si ověřili, zda u myších modelů obezity nedochází k změně účinků CCK-8 na příjem potravy v důsledku změny B_{max} nebo K_d . Ani v počtu vazebných míst, ani v afinitě CCK-8 k receptorům jsme nenašli významné rozdíly mezi kontrolními, MSG a DIO myšmi (tab. 5). CCK-8 vytěsňoval ^{125}I -CCK-8 podobnou afinitou k membránám z tkání kontrolních, MSG a DIO myší. Výsledky kompetičních vazeb CCK-8 ukazují souhrn vazby na receptory CCK_A i CCK_B , které jsou přítomny v celém mozku, nejen v mozkové kůře.

Devazepid je antagonist receptoru CCK_A . Také se váže na receptor CCK_B , ale mnohem slaběji než na receptor CCK_A [77], proto z rovnovážné disociační konstanty (K_i) řádově (u devazepidu asi 100x nižší K_i než u CCK-8) vyplývá, že v systému se nachází spíše receptory CCK_B (tab. 5). K_i pro devazepid jsou relativně vysoké, řádově 10^{-7} M, zatímco v systému s vysokou koncentrací receptoru CCK_A (pankreas) je to řádově 10^{-9} M [79].

Naše výsledky vedou k závěru, že jsme nenalezli změny ve vazebné afinitě CCK-8 k receptorům ani v počtu vazebných míst pro CCK-8 u membrán z mozků bez mozkové kůry (tkáň obsahující NTS a hypotalamus s vyšší koncentrací receptoru CCK_A) u MSG a DIO myši ve srovnání s kontrolními myši. Vyvozujeme z toho, že změny v anorexigenních účincích CCK-8 u těchto modelů (CCK-8 bez účinku u MSG myši, ale se zvětšenou citlivostí u DIO myši) jsou patrně důsledkem změny hladin jiných hormonů, zejména leptinu (MSG myši mají nefunkční leptinový receptor, DIO myši mají hyperleptinemii), které ovlivňují synergistický účinek CCK-8.

7. SOUHRN

- **Zavedení modelů obezity u myši z kmene C57Bl/6 a linie NMRI**

Všechny MSG myši měly nižší příjem potravy než kontroly. Samci se váhově nelišili od kontrol, ale samice vážily významně více než jejich kontroly. Samci a samice akumulovali větší množství tuku, samice významně více. Všechny MSG myši měly hyperleptinemii, která byla významnější u samic. MSG samci z linie NMRI měly hyperinzulinemii a hyperglykemií.

DIO myši měly podobný příjem potravy i hmotnost jako kontroly. Akumulovaly velké množství tuku, samice opět více než samci. Měly hyperleptinemii, hyperglykemií a mírnou hyperinzulinemii.

- **Účinky peptidu CART (61 – 102), CCK-8 a NPY**

U hladových kontrolních myší byl dokázán synergistický vztah peptidu CART (61 – 102) a CCK-8.

CCK-8 snižoval příjem potravy vyvolaný pomocí NPY u sytých kontrolních a DIO myší. U sytých MSG myší neměl CCK-8 vliv na příjem potravy navozený NPY.

Peptid CART (61 – 102) snižoval příjem potravy vyvolaný pomocí NPY u sytých kontrolních, DIO a MSG myší.

- **Vazba 125 I-CCK-8 na buněčné membrány z myších mozků**

Počet vazebných míst pro CCK-8 byl u kontrolních, MSG a DIO myší nízký. Mezi normálními a obézními myšmi nejsou rozdíly v počtu vazebných míst ani v afinitě CCK-8 k receptorům.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Abbreviations and Symbols: *Eur. J. Biochem.* **74**, 1 – 6 (1977).
2. Haluzík, M.: Poruchy výživy a leptin, *Grada Publishing*, Praha, str. 58 – 59 (2002).
3. Halford, J. C.G.: *Curr. Drug Targets* **2**, 353 – 370 (2001).
4. Weigle, S. D.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 2462 – 2469 (2003).
5. Bray, G. A., Tartaglia, L. A.: *Nature* **404**, 672 – 677 (2000).
6. Kopelman, P. G.: *Nature* **404**, 635 – 643 (2000).
7. Hainer, V.: Trendy v prevalenci obezity u nás a ve světě, v knize *Základy klinické obezitologie* (Hainer, V. a kol.), *Grada Publishing*, Praha, str. 32 – 33 (2004).
8. Newman, C.: *National Geographic*, str. 36 – 49, srpen (2004).
9. Hainer, V.: Přehled zdravotních komplikací obezity, v knize *Základy klinické obezitologie* (Hainer, V. a kol.), *Grada Publishing*, Praha, str. 42 – 44 (2004).
10. Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte Jr, D., Seeley, R. J., Baskin, D. G.: *Nature* **404**, 661 – 671 (2000).
11. Krch, F. D.: Poruchy příjmu potravy, v knize *Základy klinické obezitologie*, (Hainer, V. a kol.) *Grada Publishing*, Praha, str. 305 – 309 (2004).
12. Wilding, J. P. H.: *Diabet. Med.* **19**, 619 – 627 (2002).
13. Broberger, C., Hökfelt, T.: *Physiol. Behav.* **74**, 669 – 682 (2001).
14. Broberger, C.: *J. Intern. Med.* **258**, 301 – 327 (2005).
15. Haluzík, M.: Poruchy výživy a leptin, *Grada Publishing*, Praha, str. 11 (2002).
16. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J. M.: *Nature* **372**, 425 – 432 (1994).
17. Walder, K., de Silva, A.: *Drug Dev. Res.* **51**, 66 – 79 (2000).
18. Hainer, V., Bendlová, B.: Leptin – regulační a metabolické působení, v knize *Základy klinické obezitologie* (Hainer, V. a kol.), *Grada Publishing*, Praha, str. 84 – 85 (2004).
19. Porte Jr, D., Baskin, D. G., Schwartz, M. W.: *Nutr. Rev.* **60**, S20 – S29 (2002).
20. Zhang, F., Basinski, M. B., Beals, J. M., Briggs, S. L., Churgay, L. M., Clawson, D. K., DiMarchi, R. D., Furman, T. C., Hale, J. E., Hsiung, H. M., Schoner, B. E., Smith, D. P., Zhang, X. Y., Wery, J. P., Schevitz, R. W.: *Nature* **387**, 206 – 209 (1997).

21. Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K. J., Smutko, J. S., Mays, G. G., Woolf, E. A., Monroe, C. A., Temper, R. I.: *Cell* **83**, 1263 – 1271 (1995).
22. Lisá, L.: Leptin a obezita, v knize *Základy klinické obezitologie*, (Hainer, V. a kol.) *Grada Publishing*, Praha, str. 296 – 297 (2004).
23. Friedman, J. M.: *Nature* **404**, 632 – 634 (2000).
24. Haluzík, M.: Poruchy výživy a leptin, *Grada Publishing*, Praha, str. 51 – 52 (2002).
25. Ivy, A. C., Oldberg, E.: *Am. J. Physiol.* **86**, 599 – 613 (1928).
26. Gibbs, J., Young, R. C., Smith, G. P.: *Comp. Physiol. Psychol.* **84**, 488 – 495 (1973).
27. Moran, T. H.: *Nutrition* **16**, 858 – 865 (2000).
28. Moran, T. H., Kinzig, K. P.: *Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.* **286**, G183 – G188 (2004).
29. Woods, S. C.: *Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.* **286**, G7 – G13 (2004).
30. Little, T. J., Horowitz, M., Feinle-Bisset, C.: *Obes. Rev.* **6**, 297 – 306 (2005).
31. Lodge, D. J., Lawrence, A. J.: *Regul. Pept.* **99**, 191 – 201 (2001).
32. Reidelberger, R. D., O'Rourke, M. F.: *Am. J. Physiol.* **257**, R1512 – R1518 (1989).
33. Moran, T. H., Ameglio, P. J.: *Am. J. Physiol.* **262**, R46 – R50 (1992).
34. Spiess, J., Villarreal, J., Vale, W.: *Biochemistry* **20**, 1982 – 1988 (1981).
35. Douglass, J., McKinzie, A., Couceyro, P.: *J. Neurosci.* **15**, 2471 – 2481 (1995).
36. Hunter, R. G., Philpot, K., Vicentic, A., Dominguez, G., Hubert, G. W., Kuhar, M. J.: *Trends Endocrinol. Metabol.* **15**, 454 – 459 (2004).
37. Kristensen, P., Judge, M. E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K. N., Wulff, B. S., Clausen, J. T., Jensen, P. B., Madsen, O. D., Vrang, N., Larsen, P. J., Hastrup, S.: *Nature* **393**, 72 – 76 (1998).
38. Broberger, C.: *Drug Dev. Res.* **51**, 124 – 142 (2000).
39. Cowles, R. A., Segura, B. J., Mulholland, M. W.: *Regul. Pept.* **99**, 61 – 68 (2001).
40. Thim, L., Nielsen, P. F., Judge, M. E., Andersen, A. S., Diers, I., Egel-Mitani, M., Hastrup, S.: *FEBS Lett.* **428**, 263 – 268 (1998).
41. Bannon, A. W., Seda, J., Carmouche, M., Francis, J. M., Jarosinski, M. A., Douglass, J.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**, 1021 – 1026 (2001).

42. Kuhar, M. J., Adams, S., Dominguez, G., Jaworski, J., Balkan, B.: *Neuropeptides* **36**, 1 – 8 (2002).
43. Asnicar, M. A., Smith, D. P., Yang, D. D., Heiman, M. L., Fox, N., Yun-Fei, C., Hsiung, H. M., Köster, A.: *Endocrinology* **142**, 4394 – 4400 (2001).
44. Dylag, T., Kotlinska, J., Rafalski, P., Pachuta, A., Silberring, J.: *Peptides* **27**, 1926 – 1933 (2006).
45. Keller, P. A., Compan, V., Bockaert, J., Giacobino, J. P., Charnay, Y., Bouras, C., Assimacopoulos-Jeannet, F.: *Peptides* **27**, 1328 – 1334 (2006).
46. Vicentic, A., Lakatos, A., Kuhar, M. J.: *Eur. J. Pharmacol.* **528**, 188 – 189 (2005).
47. Maletínská, L., Maixnerová, J., Matyšková, R., Haugvicová, R., Šloncová, E., Elbert, T., Slaninová, J., Železná, B.: *Eur. J. Pharmacol.* **559**, 109 – 114 (2007).
48. Lambert, P. D., Couceyro, P. R., Mcgirr, K. M., Vechia, S. E. D., Smith, Y., Kuhar, M. J.: *Synapse* **29**, 293 – 298 (1998).
49. Wang, C. F., Billington, C. J., Levine, A. S., Kotz, C. M.: *Neuroreport* **11**, 3251 – 3255 (2000).
50. Elmquist, J. K.: *Int. J. Obes.* **25**, S78 – S82 (2001).
51. Broberger, C., Holmberg, K., Kuhar, M. J., Hökfelt, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 13506 – 13511 (1999).
52. White, J. D.: *Regul. Pept.* **49**, 93 – 107 (1993).
53. Hillebrand, J. J. G., de Wied, D., Adan, R. A. H.: *Peptides* **23**, 2283 – 2306 (2002).
54. Allen, J. S., Adrian, T. E., Allen, J. M., Tatemoto, K., Crow, T. J., Bloom, S. R., Polak, J. M.: *Science* **221**, 877 – 879 (1983).
55. McMinn, J. E., Sindelar, D. K., Havel, P. J., Schwartz, M. W.: *Endocrinology* **141**, 4442 – 4448 (2000).
56. Broberger, C.: *Brain Res.* **848**, 101 – 113 (1999).
57. Morley, J. E., Hernandez, E. N., Flood, J. F.: *Am. J. Physiol.* **253**, R516 – R522 (1987).
58. Herzog, H.: *Eur. J. Pharmacol.* **480**, 21 – 29 (2003).
59. Brennauer, A.: http://www.chemie.uni-regensburg.de/GK/MedChem/graduates/projects/project_brennauer.htm (březen 2007).
60. Blomqvist, A. G., Herzog, H.: *Trends Neurosci.* **20**, 294 – 298 (1997).

61. Kolektiv: Chov a využití pokusných zvířat, 1. díl, skriptum Společnosti pro vědu o laboratorních zvířatech, *Ediční středisko Veterinární a farmaceutické univerzity Brno*, str. 98 – 102 (1999).
62. Beck, B.: *Nutrition* **16**, 916 – 923 (2000).
63. Haluzík, M.: Poruchy výživy a leptin, *Grada Publishing, Praha*, str. 60 – 63 (2002).
64. Butler, A. A., Cone, R. D.: *Trends Genet.* **17**, S50 – S54 (2001).
65. Olney, J. W.: *Science* **164**, 719 – 721 (1969).
66. Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., Hökfelt, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15043 – 15048 (1998).
67. Eleftheriou, F., Takeda, S., Liu, X., Armstrong, D., Karsenty, G.: *Endocrinology* **144**, 3842 – 3847 (2003).
68. Van Heek, M., Compton, D. S., France, C. F., Tedesco, R. P., Fawzi, A. B., Graziano, M. P., Sybertz, E. J., Strader, C. D., Davis Jr, H. R.: *J. Clin. Invest.* **99**, 385 – 390 (1997).
69. Kunešová, M.: Lipidy, v knize *Základy klinické obezitologie*, (Hainer, V. a kol.) *Grada Publishing, Praha*, str. 176 (2004).
70. West, D. B., Boozer, C. N., Moody, D. L., Atkinson, R. L.: *Am. J. Physiol.* **262**, R1025 – R1032 (1992).
71. West, D. B., Waguespack, J., McCollister, S.: *Am. J. Physiol.* **268**, R658 – R665 (1995).
72. Kopecký, J., Hodný, Z., Rossmeisl, M., Syrový, I., Kozak, L. P.: *Am. J. Physiol.* **270**, E768 – E775 (1996).
73. Franklin, K. B. J., Paxinos, G.: *The Mouse brain in stereotaxic coordinates*, *Academic Press, Kalifornie* (1997).
74. Reeve Jr, J. R., McVey, D. C., Bunnett, N. W., Solomon, T. E., Keire, D. A., Ho, F. J., Davis, M. T., Lee, T. D., Shively, J. E., Vigna, S. R.: *Pancreas* **25**, e50 – e55 (2002).
75. Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.* **72**, 248 – 254 (1976).
76. Motulsky, H., Neubig, R.: *Current. Protoc. Neurosci.* **19**, 7.5.1. – 7.5.55
77. Chang, R. S. L., Lotti, V. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4923 – 4926 (1986).
78. Chang, C. H., Cheng, Y. C.: *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099 – 3188 (1978).
79. Harhammer, R., Schäfer, U., Henklein, P., Ott, T., Repke, H.: *Eur. J. Pharmacol.* **209**, 263 – 266 (1991).

80. Maletínská, L., Lignon, M. F., Galas, M. C., Bernad, N., Pírková, J., Hlaváček, J., Slaninová, J., Martinez, J.: *Eur. J. Pharmacol.* **222**, 233 – 240 (1992).
81. Haluzík, M.: Poruchy výživy a leptin, *Grada Publishing*, Praha, str. 36 – 37 (2002).
82. Havener, A., Reichart, D., Janez, A., Olefsky, J.: *Diabetes* **51**, 1907 – 1912 (2002).
83. Maletínská, L., Shamas Toma, R., Pirník, Z., Kiss, A., Slaninová, J., Haluzík, M., Železná, B.: *Regul. Pept.* **136**, 58 – 63 (2006).
84. Barrachina, M. D., Martínez, V., Wang, L., Wei, J. Y., Taché, Y.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10455 – 10460 (1997).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka

Effect of cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice

Lenka Maletínská^a, Resha Shamas Toma^a, Zdeno Pírník^b, Alexander Kiss^b, Jiřina Slaninová^a,
Martin Haluzík^c, Blanka Železná^{d,*}

^a Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic

^b Institute of Experimental Endocrinology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia

^c First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

^d Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 37 Praha 6, Czech Republic

Received 8 December 2005; received in revised form 13 April 2006; accepted 28 April 2006

Available online 19 June 2006

Abstract

Treatment of newborn mice with monosodium glutamate (MSG) is neurotoxic for hypothalamic arcuate nucleus (ARC) and causes obesity. In the MSG-treated 16-week-old NMRI mice, we detected specific ablation of ARC neuronal cells, 8 times higher fat to body mass ratio but unchanged body mass compared to controls, advanced hyperglycemia and hyperinsulinemia — both more pronounced in males, and hyperleptinemia — more severe in females. After fasting, the MSG-treated mice showed attenuated food intake compared to controls. Cholecystokinin octapeptide, which decreased food intake in a dose-dependent manner in 24 h fasted controls, did not significantly affect food intake in the MSG-treated animals. We propose that the obesity-related changes in the feeding behavior of the MSG-treated obese mice were the result of missing leptin and insulin receptors in ARC and consequent altered neuropeptide signaling. This makes the MSG model suitable for clarifying generally the central control of food intake.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Monosodium glutamate; Obesity; Cholecystokinin; Feeding behavior

1. Introduction

Arcuate nucleus (ARC) of the hypothalamus is accessible to adiposity signals of leptin and insulin, which circulate in blood in amounts proportional to body fat. The ARC represents the first order neurons, which contain leptin and insulin receptors and produce either neuropeptide Y (NPY) plus agouti-related protein (AgRP) or proopiomelanocortin (POMC) plus cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART) [1–3]. The first order neurons project to the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), where POMC splits to α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH); α -MSH and AgRP bind to melanocortin receptors 3 and 4 (MC3R/MC4R) with a diverse action and NPY acts as an agonist of its own receptors. The competition between AgRP and α -MSH for MC4R binding site in the PVN is considered to be the most critical interaction in food intake regu-

lation [2]. From the PVN, the second order neurons project to the nucleus of the solitary tract of the hindbrain, where short-term satiety signals are mediated by cholecystokinin (CCK) and where leptin receptors are also expressed. Thus, local interactions between leptin and CCK in the hindbrain are possible [4].

Efferent projections of the ARC neurons can be impaired in rodents by monosodium glutamate (MSG) treatment in the first days of their life [5,6]. The MSG-treated mice showed marked shrinkage of the ARC area, widening of the third ventricle, and thinning of the median eminence [7]. The number of cells was decreased by 75% in their arcuate nuclei but stayed unchanged in other hypothalamic areas [8]. MSG treatment lowered the hypothalamic gene expression at the m-RNA level for NPY and AgRP to less than 10% [9] and erased both NPY/AgRP cell bodies and terminals in ARC [7].

Owing to an impaired GHRH production [9], the MSG mice and rats display stunted growth, atrophied pituitaries, gonads, and optical nerves. The damage of the cells in the inner retina of the MSG rodents results in undifferentiated feeding under both light

* Corresponding author. Tel.: +420 220183345; fax: +420 233331274.
E-mail address: zelezna@img.cas.cz (B. Železná).

and dark periods [10,11]. An increase in body fat without any change in body weight in rather hypophagic animals [12] was explained by a lower metabolic rate rather than by an elevated food intake [13].

In this paper, besides the basic physiological parameters and feeding behavior, we describe, for the first time, the effect of exogenous cholecystokinin octapeptide on the food intake in the MSG-treated obese mice.

2. Materials and methods

2.1. Experimental animals

Male and female NMRI mice obtained from Bio Test (Konárovice, 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 (ST-1, Velaz, Koleč, Czech Republic). All experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and the law of the Czech Republic Nr. 246/1992.

For hypothalamic lesion-induced obesity, newborn mice were administered with monosodium glutamate (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 [14]. Control mice were left without any treatment.

Body weight and food intake were monitored once a week up to 16 weeks of age, when food intake experiments were performed. Male and female experiments were performed separately. Two days after the experiment, both controls and MSG-treated animals were divided into groups ($n=7-10$ per group): the fed group was allowed to feed ad libitum, the fasted groups were fasted for 15 (food removed at 17:00) or 24 h (food removed at 8:00). The next day, the mice were sacrificed between 8:00 and 9:00, samples of blood serum were collected, and white adipose tissue (subcutaneous, abdominal and gonadal) and liver were dissected and weighed.

Smaller groups of animals of both sexes including intact controls, osmolality controls, and MSG-treated animals ($n=3-5$ mice per group) were killed at the age of 8 weeks between 8:00 and 9:00 (without fasting) and their blood samples and white adipose tissue were collected.

Obesity rate was expressed by Lee index [15] defined as cube root of body mass (g) divided by nasoanal length (cm).

2.2. Brain histology

Three male and three female controls and three male and three female MSG-treated mice were at 16 weeks of age deeply anesthetized with 2.5 mg/100 g hypnomidate i.p. (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium), and rapidly perfused transcardially with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, containing 4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde, and 10% saturated picric acid. Then the brains were removed, postfixed in the described fixative overnight at 4 °C, and infiltrated with 15% sucrose in 0.025 M phosphate buffer, pH 7.4 for 48 h at 4 °C. Before sectioning, the brains were rapidly frozen in cold isopentane (−40 °C), additionally cooled in dry ice and placed into a Reichert cryocut device for 1 h at −15 °C.

Coronal sections (35 μm thick) were cut from the whole hypothalamus [16] collected in cold 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, mounted on poly-L-lysine-coated glasses, and stained with 0.1% cresyl violet acetate (Sigma) dissolved in distilled water and analyzed under a Leica DMLS light microscope using the atlas of Mouse brain [16]. Representative sections were captured by computerized system that included a microscope equipped with a Canon digital camera (PowerShot S 40).

2.3. Food intake experiments

One week before the experiment, mice were placed into separate cages; they had free access to food and water. Before the test, 16-week-old mice (male, female, control and MSG-treated) were fasted for 24 h (from 8:00 morning) with free access to water. Fasted mice were injected i.p. with either saline or 0.2 ml of cholecystokinin octapeptide (CCK-8, Asp–Tyr(SO₃H)–Met–Gly–Trp–Met–Asp–Phe–NH₂, Neosystem, Strasbourg, France) in a dose range 4–40 μg/kg ($n=6-8$ mice per group). Ten minutes after the injection, animals were given weighed food pellets. The pellets were weighed at 30 min intervals and replaced with fresh ones. Food intake was followed for 3.5 hod. Experiments were performed between 8:30 and 12:00. Animals had free access to water during the experiment. The results are expressed in grams of food consumed.

2.4. Blood serum components

Leptin and insulin concentrations in serum were quantified by ELISA assay (BioVendor, Brno, Czech Republic) and by

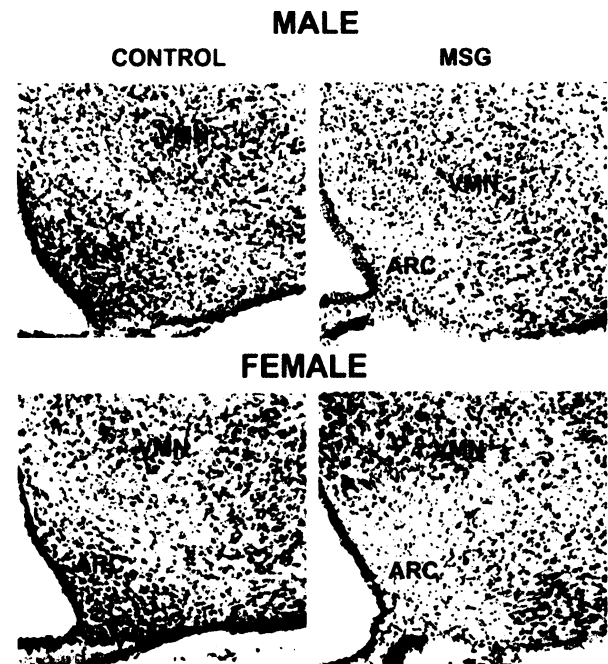


Fig. 1. MSG lesions in hypothalamic arcuate nucleus (ARC). Coronal sections of the hypothalamus of MSG-treated mice stained with 0.1% cresyl violet acetate show disappearance of neurons in ARC compared to control mice (VMN ---- ventromedial hypothalamic nucleus) ($n=3$ per group).

RIA assay (Linco Research, St. Charles, MI, USA), respectively. Serum glucose levels were measured by a glucometer (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japan). Rate of insulin resistance was expressed by homeostatic model assessment (HOMA) calculated as (fasting glucose level, mmol/l) \times (fasting insulin level, pmol/l) divided by 22.5 [17].

2.5. Statistics

Data are presented as means \pm SEM for the number of animals indicated in the Figures and Tables. They were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey post hoc test (food intake experiments) and two-way ANOVA (comparison of body mass of control and MSG-treated animals) using Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and discussion

The ARC is considered to be a major site of leptin resistance. The MSG model of obesity, which is characterized by specific ARC lesions, could be an appropriate model for the study of severe leptin resistance. Absence of the neurons producing orexigenic (e.g. NPY and AgRP) or anorexigenic (e.g. POMC and CART) [9,18] compounds causes imbalance in food intake and energy expenditure regulation leading to hypophagia and fat accumulation. It has been proposed that growth hormone defi-

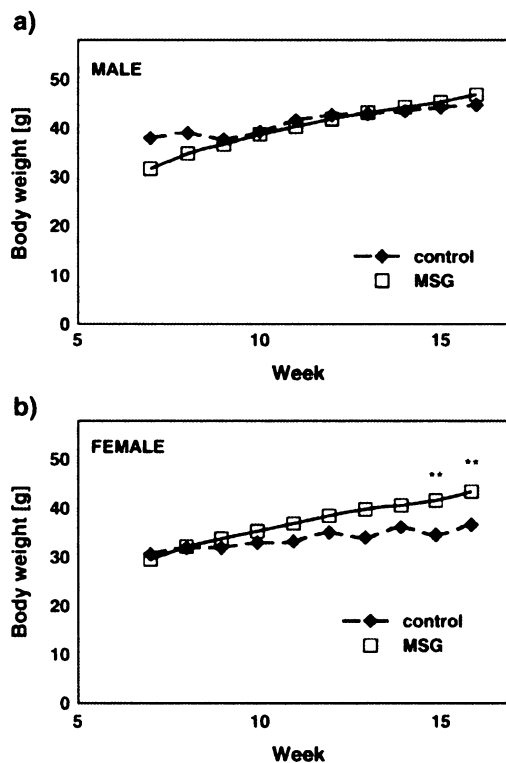


Fig. 2. Increase in body weight of control and MSG-treated mice: a/ males, b/ females ($n = 10$ – 15 per group). Significance is $**P < 0.01$ versus controls for female mice.

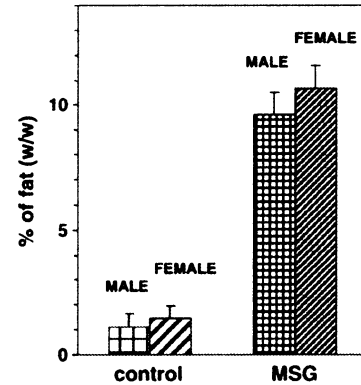


Fig. 3. Percentage of fat in the body mass of 16-week-old male and female control and MSG-treated mice ($n = 20$ – 25 per group).

ciency, which explains the reduction in body length, may also explain an excessive fat accumulation because growth hormone is known to possess lipolytic activity [12,19,20].

The relationship between MSG-induced ARC damage and the metabolic changes that result in obesity at mild hypophagia is poorly understood. One of the pivotal factors of this imbalance is probably the lack of leptin receptors. Obese *db/db* mice lacking functional leptin receptors are also hyperleptinemic [21] and represent an obesity model similar to the MSG one. However, data concerning the effect of cholecystokinin, a brain–gut peptide regulating food intake [22], on short-term food intake of *db/db* or MSG-treated mice have not been published yet.

3.1. MSG obesity model: lesions, fat, leptin, insulin, and glucose levels

As observed on the serial coronal sections of the hypothalamus of perfused brains, MSG treatment induced marked disappearance of neurons only in ARC (Fig. 1) while the adjacent hypothalamic nuclei, in concordance with our previous study [23], did not show any marks of MSG damage either in males or females. As expected, neurons in ARC of normal and osmolality control mice did not display any histological alterations.

MSG treatment induced maturity-onset obesity despite a lower food intake in males (average daily food intake was 7.72 ± 0.76 g for controls, 5.80 ± 0.73 g for MSG-treated animals, $n = 15$) and equal food intake in females (average daily food intake was 6.49 ± 0.67 g for controls, 6.15 ± 0.48 g for MSG-treated, $n = 10$ – 15).

Table 1
Metabolic parameters of control and MSG-treated male and female mice at 8 weeks of age

Sex	Characterization	Rate of fat/body mass	Glucose (mmol/l)	Insulin (ng/ml)	Leptin (ng/ml)
Male	Control fed	1.39 ± 0.26	7.97 ± 1.12	1.12 ± 0.26	3.07 ± 0.34
	MSG fed	6.30 ± 0.93	9.33 ± 1.26	1.85 ± 0.40	11.81 ± 4.44
Female	Control fed	3.85 ± 0.20	8.40 ± 0.92	1.55 ± 0.72	4.50 ± 1.10
	MSG fed	7.18 ± 1.10	8.70 ± 0.54	1.07 ± 0.38	17.21 ± 4.94

All values are expressed as the mean \pm SEM ($n = 3$ – 5 animals per group).

Table 2
Metabolic parameters of control and MSG-treated male and female mice at 16 weeks of age

Sex	Characterization	Rate of fat/body mass	Lee index	Glucose (mmol/l)	Insulin (ng/ml)	HOMA	Leptin (ng/ml)
Male	Control fed			7.73 ± 1.24	1.41 ± 0.72	—	0.94 ± 0.54
	Control 15 h fasted	1.13 ± 1.11 ⁿ	319.79 ± 7.40 ⁿ	5.55 ± 1.88	0.20 ± 0.04	8.51 ± 0.58	0.45 ± 0.14
	Control 24 h fasted			3.68 ± 0.82	0.47 ± 0.24	13.25 ± 1.51	0.49 ± 0.12
	MSG fed			16.11 ± 9.24	12.18 ± 6.78	—	31.92 ± 13.52
	MSG 15 h fasted	9.61 ± 1.80 ⁿ	341.43 ± 5.39 ⁿ	9.50 ± 2.56	3.31 ± 3.00	240.96 ± 58.82	30.94 ± 10.96
Female	MSG 24 h fasted			6.50 ± 1.28	0.71 ± 0.40	35.36 ± 3.93	14.85 ± 3.96
	Control fed			7.90 ± 0.96	0.64 ± 0.22	—	2.62 ± 1.08
	Control 15 h fasted	1.42 ± 0.88 ⁿ	316.34 ± 11.82 ⁿ	5.65 ± 0.86	0.33 ± 0.10	14.29 ± 0.66	0.96 ± 0.32
	Control 24 h fasted			4.45 ± 0.74	0.37 ± 0.12	12.62 ± 0.68	0.96 ± 0.26
	MSG fed			10.68 ± 4.30	6.34 ± 4.70	—	77.05 ± 17.72
MSG 15 h fasted		11.00 ± 1.63 ⁿ	356.04 ± 10.63 ⁿ	5.75 ± 0.94	0.52 ± 0.10	22.91 ± 0.72	37.70 ± 11.70
	MSG 24 h fasted			4.43 ± 0.50	0.33 ± 0.14	11.20 ± 1.86	16.38 ± 6.90

All values are expressed as the mean ± SEM ($n = 7-10$ animals per group). ⁿAverage of values for fed, 15 h and 24 h fasted animals.

Even though no significant difference in body mass of the MSG and control mice was detected (except of females at 15 and 16 weeks of age, Fig. 2a, b), the adipose tissue mass of the MSG mice at 16 weeks of age was about 8 times higher than that of controls, both in males and females (Fig. 3, Table 2). Lee index of obesity differed only slightly in controls and the MSG mice (Table 2). Highly elevated adiposity of MSG-treated mice was apparent already at 8 weeks of age and was more pronounced at 16 weeks of age (Tables 1 and 2). Females showed higher content of adipose tissue than males. MSG-treated mice had about 15% shorter body and tail length compared to the controls; their liver had about 30% lower mass and showed partial steatosis, and the gonads were poorly developed. Stunted growth and smaller organs have also been described in other studies with MSG Swiss albino mice [5].

Dramatically elevated leptin levels, both in the fed and fasted MSG mice, pointed to a severe hyperleptinemia, which was even more pronounced in the females (Table 2). In control mice, our results confirm a well-known fact that females have higher levels of leptin than males (2–2.8 times higher, under both fed and fasted condition). In MSG-treated fed females, leptin levels were 2.4 times higher than those of males. After fasting (15 or 24 h), leptin levels in both sexes were lowered to a similar value, however still much higher than that of respective controls (Table 2).

On the contrary, enhanced levels of insulin and glucose persisted after fasting only in the 16-week-old male MSG mice (glucose levels were about 2 times higher both in fed and fasted male MSG mice compared to their respective controls), which indicates that the male mice were more prone to insulin resistance than the female ones in this outbred strain of mice (see Table 2). HOMA index also confirms high insulin resistance in MSG males (Table 2).

At 8 weeks of age, glucose and insulin levels both in the fed MSG males and females were comparable with controls, but leptin levels were already highly elevated (4 times in both sexes compared to control, see Table 1). At this age, the mentioned metabolic parameters of osmolality controls did not show any difference from those of intact controls (results not shown).

All the above-mentioned facts confirmed a correct functioning of the MSG-induced obesity model in our mouse outbred NMRI strain. Moreover, more pronounced hyperleptinemia in the females and more apparent insulin resistance in the males

showed a usual pattern of sex diversity in metabolic consequences of obesity. Interestingly, markedly increased insulin levels were found in both male and female MSG-treated mice under fed conditions, while fasting normalized insulin levels in MSG-treated females but not males. We do not have a clear explanation for this gender-related difference in insulin resistance and its response to fasting. However, it has been demonstrated previously in both rodent models and humans that males

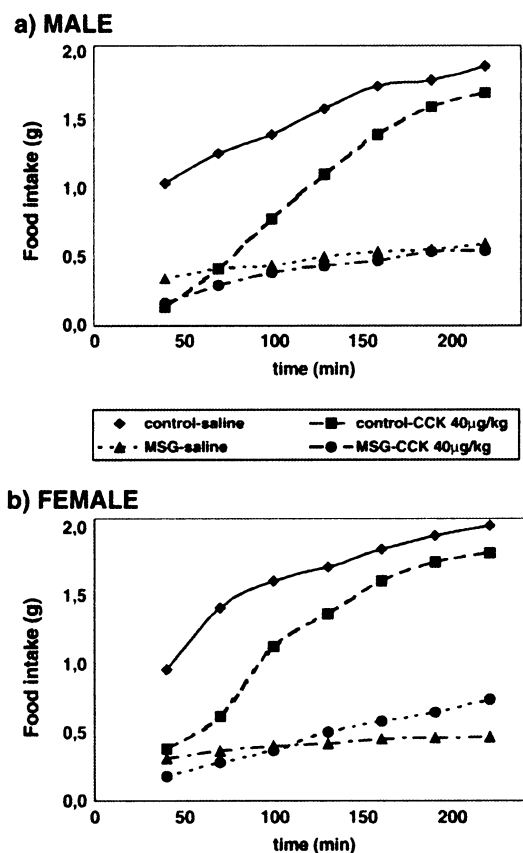


Fig. 4. Cumulative food intake of 24 h fasted 16-week-old control and MSG-treated mice after i.p. administration of saline or 40 µg/kg CCK-8. Food intake is expressed in grams of food consumed: a/ male mice, b/ female mice ($n = 6-8$ per group).

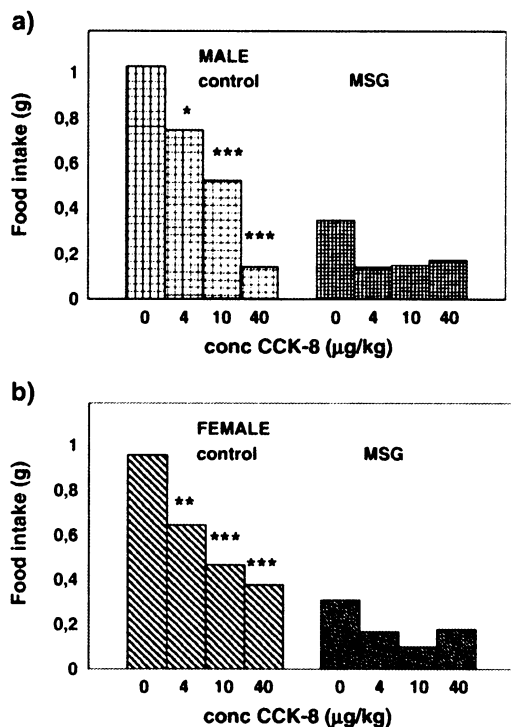


Fig. 5. Effect of CCK-8 on food intake of 24 h fasted 16-week-old control and MSG-treated mice. Dose-response relationship of CCK-8: 40 min after i.p. administration of 4, 10, and 40 µg/kg CCK-8. Food intake is expressed in grams of food consumed: a/ male mice, b/ female mice. Significance is * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus the respective saline-treated group ($n = 6-8$ mice per group).

are more prone to insulin resistance induced by high fat feeding or fatty acid infusion than females [24].

3.2. CCK-8 as a short-term satiety signal and the MSG obese mice

All food intake experiments were performed with 16-week-old animals after 24 h of fasting. Typical cumulative food intake curves for groups treated with saline or with CCK-8 (40 µg/kg) are shown in Fig. 4a, b (data of cumulative food intake for injected doses of CCK-8 4 and 10 µg/kg are not shown). CCK-8 affected food intake as a short-term satiety signal up to 150 min depending on a dose injected. In the intact controls of both sexes, CCK-8 typically suppressed food intake after fasting with its maximal effect up to 40 min. The response was significantly dose-dependent in both the male and female mice in all doses tested (Fig. 5a, b).

Compared to the controls, the MSG mice displayed substantially attenuated food intake after fasting, which was only negligibly lowered by CCK-8 (Figs. 4 and 5). Both male and female MSG mice did not show any significant dose-dependent responses to CCK-8 (see Fig. 5). MSG-treated mice had disrupted circadian rhythm of food intake [10], and 24 h fasting did not influence their appetite. The main reason for that could be the lack of leptin receptors and short-term satiety signals in ARC. MSG-treated rats were found unresponsive to

leptin treatment after both i.p. and i.c.v. administration [25,26]. Leptin receptors were found also in parts of the hypothalamus other than arcuate nucleus and in brainstem [27,28]. The effect of leptin on reducing body mass and resisting diet-induced obesity in ventromedial hypothalamus has just been recently revealed [29]. Leptin was shown to induce Fos immunoreactivity in several brainstem sites, including CCK neurons in the parabrachial nucleus [28,30]. We propose that in the MSG mice, signaling via leptin and insulin receptors and anorectic and orexigenic neuropeptides in efferent ARC neurons was eliminated while in other brain parts it was preserved. The changed pattern of leptin signaling together with disturbed food intake control probably attenuated the CCK-8 effect in the MSG mice.

4. Conclusions

White outbred NMRI mice with MSG-induced lesion of ARC neurons accumulated 8 times more of white adipose tissue than controls and developed hyperglycemia and hyperinsulinemia, both more pronounced in males, and severe hyperleptinemia, which was more apparent in females.

Surprisingly, the MSG mice showed a very low food intake after fasting which was not significantly affected by peripherally administered CCK-8 and was probably a result of the lack of leptin and insulin signaling system in the ARC.

The present MSG model showed up as favorable for clarifying the central control of food intake, specifically the relationship between arcuate nucleus and CCK-8.

Acknowledgements

The study was supported by grants 303/05/0614 of the Grant Agency of the Czech Republic and Z 20550514 and Z 40550506 of the Academy of Sciences of the Czech Republic. The authors are indebted to Mrs. A. Vytečková and H. Vysušilová for their excellent technical assistance.

References

- [1] Schwartz MW, Woods SC, Porte Jr D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404:661–71.
- [2] Horvath TL. The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat Neurosci* 2005;8:561–5.
- [3] Broberger C. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Intern Med* 2005;258:301–27.
- [4] Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *J Endocrinol* 2005;184:291–318.
- [5] Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969;164:719–21.
- [6] Olney JW, Adamo NJ, Ratner A. Monosodium glutamate effects. *Science* 1971;172:294.
- [7] 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 U S A* 1998;95:15043–8.
- [8] Eleftheriou F, Takeda S, Liu X, Armstrong D, Karsenty G. Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone mass. *Endocrinology* 2003;144:3842–7.
- [9] 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* 2002;143:3268–75.

- [10] Edelstein K, Pfau JG, Rusak B, Amir S. Neonatal monosodium glutamate treatment prevents effects of constant light on circadian temperature rhythms of adult rats. *Brain Res* 1995;675:135–42.
- [11] Mistlberger RE, Anthe MC. Neonatal monosodium glutamate alters circadian organization of feeding, food anticipatory activity and photic masking in the rat. *Brain Res* 1999;842:73–83.
- [12] 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* 1998;75–76:441–7.
- [13] Djazavery A, Miller DS, Stock MJ. Energy balances in obese mice. *Nutr Metab* 1979;23:357–67.
- [14] Jezova D, Kiss A, Tokarev D, Skultetyova I. Stress hormone release and propiomelanocortin mRNA levels in neonatal rats treated with monosodium glutamate to induce neurotoxic lesions. *Stress Med* 1998;14:255–60.
- [15] Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 1968;40:527–8.
- [16] Franklin KBJ, Paxinos G. *The Mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, California: Academic Press; 1997.
- [17] Lansang MC, Williams GH, Carroll JS. Correlation between the glucose clamp technique and the homeostasis model assessment in hypertension. *Am J Hypertens* 2001;14:51–3.
- [18] Broberger C. Hypothalamic cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res* 1999;848:101–13.
- [19] Haluzik M, Yakar S, Gavrilova O, Setser J, Boisclair Y, LeRoith D. Insulin resistance in the liver-specific IGF-1 gene-deleted mouse is abrogated by deletion of the acid-labile subunit of the IGF-binding protein-3 complex. *Diabetes* 2003;52:2483–9.
- [20] Haluzik M, Colombo C, Gavrilova O, Chua S, Wolf N, Chen M, Stannard B, Dietz KR, LeRoith D, Reitman ML. Genetic background (C57BL/6J versus FVB/N) strongly influences the severity of diabetes and insulin resistance in *ob/ob* mice. *Endocrinology* 2004;145:3248–64.
- [21] 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* 2001;281:R115–32.
- [22] Maletinská L, Lignon M-F, Galas M-C, Bernard N, Pirková J, Hlavacek J, Slaninová J, Martínez J. Full pharmacological characterization of four new analogues of CCK-8. *Eur J Pharmacol* 1992;222:233–40.
- [23] Kiss A, Skultetyova I, Jezova D. Corticotropin-releasing hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of rats neonatally treated with monosodium glutamate can respond to different stress paradigms. *Neurol Res* 1999;21:775–80.
- [24] Hevener A, Reichart D, Janez A, Olefsky J. Female rats do not exhibit free fatty acid-induced insulin resistance. *Diabetes* 2002;51:1907–12.
- [25] Tang-Christensen M, Holst JJ, Hartmann B, Vrang N. The arcuate nucleus is pivotal in mediating the anorectic effects of centrally administered leptin. *Neuroreport* 1999;10:1183–7.
- [26] 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* 1997;273:E202–6.
- [27] Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 1998;395:535–47.
- [28] Elmquist JK, Coppari R, Balthasar N, Ichinose M, Lowell BB. Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J Comp Neurol* 2005;493:63–71.
- [29] Dhillon H, Zigman JM, Ye C, Lee CE, McGovern RA, Tang V, Kenny CD, Christiansen LM, White RD, Edelstein EA, Coppari R, Balthasar N, Cowley MA, Chua Jr S, Elmquist JK, Lowell BB. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* 2006;49:191–203.
- [30] Elias CF, Kelly JF, Lee CE, Ahima RS, Drucker DJ, Saper CB, Elmquist JK. Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 2000;423:261–81.



Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12

Lenka Maletínská^a, Jana Maixnerová^a, Resha Matyšková^a, Renata Haugvicová^c, Eva Šloncová^b, Tomáš Elbert^a, Jiřina Slaninová^a, Blanka Železná^{b,*}

^a Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

^b Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

^c Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

Received 17 August 2006; received in revised form 5 December 2006; accepted 11 December 2006

Available online 17 January 2007

Abstract

CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides have been studied for ten years. We report specific binding of ¹²⁵I-CART(61-102) to the rat adrenal pheochromocytoma PC12 cell line, both intact cells and cell membranes. Saturation binding to intact plated cells resulted in K_d of 0.48 ± 0.16 nM and B_{max} of 2228 ± 529 binding sites/cell. ¹²⁵I-CART(61-102) was also bound to PC12 cells differentiated using nerve growth factor to the neuronal phenotype with non-specific binding below 20%, and K_d of 1.90 ± 0.27 nM and B_{max} of 11194 ± 261 binding sites/cell. In competitive binding experiments, CART(61-102), CART(55-102) and di-iodinated CART(61-102) were bound to PC12 cell membranes with K_i in low nM range; their affinity to intact non-differentiated and differentiated cells was in low 10^{-8} M range. In order to prove that iodination did not eliminate the pharmacological properties of CART, we tested the biological activity of di-iodinated CART(61-102). It decreased food intake in *in vivo* feeding experiment on fasted mice in a dose of 1 μ g/mouse to the same extent as CART(61-102) in a dose of 0.5 μ g/mouse. © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Radioligand binding; CART; PC12 cells; Food intake

1. Introduction

CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides were described ten years ago (Douglass et al., 1995) and linked to a previously isolated hypothalamic peptide with unknown function (Spiess et al., 1981). The entire issue of Peptides (Kuhar, 2006) is dedicated to the ten-year anniversary of CART discovery.

CART peptides are involved in reward and reinforcement, feeding and satiety, stress, endocrine regulation, and sensory processing (for reviews, see Broberger, 2000; Hunter et al., 2004, and the above-mentioned issue of Peptides).

CART is evolutionarily conserved across species. ProCART of rat and mouse is identical, consists of 102 amino acids and is

processed to two main active CART peptides, *i.e.* to CART(55-102) and CART(61-102), which are mostly used in CART research. Human proCART lacks sequence 27–39 of the mouse and rat proCART and has valine instead of isoleucine in the position 55 (Douglass et al., 1995; Douglass and Daoud, 1996).

CART is one of the most abundant hypothalamic transcripts (Gautvik et al., 1996) and both CART mRNA and CART immunoreactivity were found in specific nuclei throughout brain, pituitary, adrenals, islets of Langerhans and gut. However, no receptors for CART have been cloned to date. Specific binding of [¹²⁵I]-CART(61-102) to the AtT20 mouse pituitary tumor cell line (Vicentic et al., 2005, 2006) has been reported recently. Keller et al. (2006) described binding of a fusion protein consisting of CART(55-102) and green fluorescent protein to dissociated hypothalamic cells. A possible role of CART in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis was suggested (Iloff et al., 2005).

In this study, we report specific binding of [¹²⁵I]-CART(61-102) to pheochromocytoma cells PC12, both non-differentiated

* Corresponding author. Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Flemingovo nám. 2, 166 37 Praha 6, Czech Republic. Tel.: +420 220183345; fax: +420 233331274.

E-mail address: zeleznab@img.cas.cz (B. Železná).

and differentiated into a neuronal phenotype. Biological activity of the non-radioactive di-iodinated CART(61-102) was confirmed in *in vivo* feeding test.

2. Materials and methods

2.1. Iodination of CART(61-102)

CART(61-102) (Bachem, Bubendorf, Switzerland) was iodinated at Tyr⁶² either with Na[¹²⁵I] (MP Biomedicals, Illkirch, France) or non-radioactive NaI (Sigma, St. Luis, MO, USA) using Iodo-Gen (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) (Fraker and Speck, 1978) in 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.15 M NaCl for 15 min at room temperature according to manufacturer's instructions. For mono-iodination, 3 equivalents of peptide were used for 1 equivalent of non-radioactive NaI or Na[¹²⁵I]. For di-iodination, 10-fold excess of non-radioactive NaI to the peptide was used. Non-, mono- and di-iodinated CART(61-102) were separated by RP-HPLC using an Agilent Prep-C18, 5 μ m, 250 \times 4.6 mm column (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) applying 20–28% gradient of acetonitrile in H₂O with 0.1% trifluoroacetic acid in 45 min (flow rate 1 ml/min, UV detection at 215 and 275 nm and gamma detection of radioactive peptide). The molecular weights of the iodinated peptides were confirmed by MALDI-TOF, Reflex IV mass spectrometry (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Specific activity of ¹²⁵I-CART(61-102) was about 2000 Ci/mmol. [¹²⁵I]-CART(61-102) was kept in aliquots at –20 °C and used for saturation and competition binding studies within 1 month.

2.2. Food intake experiments

Male C57Bl/6 mice from the 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 (St-1, Velaz, Kolec, Czech Republic). All experiments followed the ethical guidelines for animal experiments and the Act of the Czech Republic Nr. 246/1992.

At the age of three months, mice were implanted with intracerebroventricular (i.c.v.) cannulas. Briefly, mice were anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine/xylazine (100 mg/kg ketamine, 16 mg/kg xylazine, Spofa, Prague, Czech Republic). Once anesthesia had been established, the head of the mouse was fixed in a stereotaxic frame and a single guide cannula (26 gauge, Plastics One Inc., Roanoke, VA, USA) was implanted just above the third ventricle (AP 2 mm, V 3 mm). A stainless steel screw was attached to the skull and the cannula was fixed in place using Duracrol resin (Spofa-Dental, Prague, Czech Republic) applied around the screw and cannula. An appropriate dummy cannula (Plastics One Inc.) was inserted into the cannula to prevent blockage. Animals were placed into separate cages and allowed at least seven days to recover from surgery before being used in the experiment.

For three days before the food intake experiment, mice were fasted overnight with access to food from 8:00 to 15:00 h and

free access to water for 24 h. The amount of food consumed was monitored. On the day of the experiment at 8:00, fasted mice were injected i.c.v. with 5 μ l of saline or CART(61-102) at doses 0.5 and 1 μ g/5 μ l or I₂-CART(61-102) at a dose 1 μ g/5 μ l (all dissolved in saline), using an infusion pump. All solutions were infused in 20 s and the infusion cannula was left in place for a further 20 s to prevent reflux. Fifteen min after injection, mice were given weighed food pellets. The pellets were replaced with fresh ones every 30 min and weighed. Animals had free access to water during the experiment. The results are expressed in grams of food consumed. The placement of cannula was verified histologically after the experiment.

2.3. Cell culture

Rat pheochromocytoma cell line PC12 was from ATCC (Manassas, VA, USA). The cells were grown in RPMI 1640 medium (Sigma, St. Luis, MO, USA) supplemented with 10% horse serum, 5% fetal bovine serum, 4.5 g/l glucose, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 1.5 g/l sodium bicarbonate, pH 7.4, and passaged once a week to maintain the cells in exponential growth. For binding studies, cells were seeded on polyethylene imine-coated 24-well plates (Corning, NY, USA), diameter 15 mm/well. To reach the density of 5×10^5 cells/well that was found optimal for binding experiments, non-differentiated cells were allowed to grow for 2 days. Differentiation of cells was performed by the addition of the nerve growth factor (NGF, 50 ng/ml of medium) to the fresh medium on days 1, 3, and 5. On day 7, the cells at a density of 5×10^5 cells/well were used in the experiment. The differentiation was checked microscopically and the number of cells/well was counted before and after the experiment.

2.4. Binding to intact plated cells

Saturation and competition binding experiments were performed according to Motulsky and Neubig (1997). Plated cells were incubated with 0.25–16 nM [¹²⁵I]-CART(61-102) in saturation experiments or with 0.1 nM [¹²⁵I]-CART(61-102) and 10^{-11} – 10^{-6} M non-radioactive ligands in competitive binding experiments, in a total volume of 0.25 ml of binding buffer (20 mM HEPES buffer pH 7.4, 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl and 5 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 1 mg/ml BSA, and 0.1 mg/ml basic pancreatic trypsin inhibitor) for 30 min at 37 °C. Non-specific binding was determined using CART(61-102) in concentrations 10^{-6} M (competitive experiments) or 2×10^{-6} M (saturation experiments). After incubation, cells were washed and then solubilized in 0.1 N NaOH. Bound radioactivity was determined by γ -counting (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA). The total binding was 2–5% of the radioactivity added. Non-specific binding in competitive binding experiments amounted to less than 15% of the total binding unless otherwise stated. Experiments were carried out in triplicates at least three times. For competition experiments, CART(55-102) and CART(61-102) from Bachem (Bubendorf, Switzerland), and di-

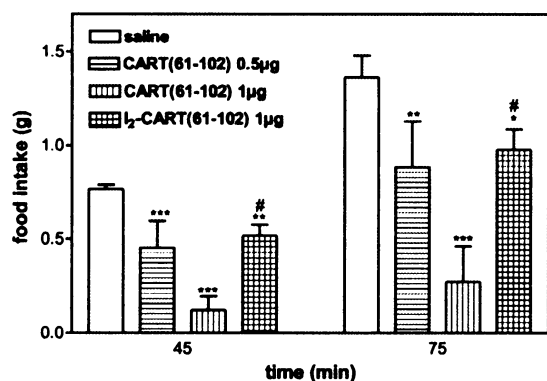


Fig. 1. Effect of CART(61-102) and I₂-CART(61-102) on food intake of overnight fasted mice. CART(61-102) was administered i.c.v. in doses of 0.5 and 1 µg/mouse and I₂-CART(61-102) in a dose of 1 µg/mouse. Food intake was monitored 45 and 75 min after injection and is expressed in grams of food consumed. Significance is **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001 versus the respective saline-treated group (*n* = 6–8 mice per group). #*P*<0.01 versus group treated with CART(61-102), 1 µg/mouse.

iodinated CART(61-102) (I₂-CART(61-102), see the second paragraph above) were used.

2.5. Binding to cell membranes

Cell membranes from non-differentiated PC12 cells were isolated from cells stored frozen at –70 °C. The cells were suspended in 20 mM HEPES, pH 7.4, with 2 mM EDTA, homogenized with a Teflon-glass homogenizer and centrifuged at 500 ×g for 10 min. The supernatant was centrifuged at 100 000 ×g for 45 min, the sediment was re-suspended and its aliquots stored at –70 °C.

Binding experiments were performed with 12.5–100 µg of membrane protein in a total volume of 0.25 ml under conditions described in the previous paragraph for the intact cells, only glucose was omitted in the binding buffer. Binding was terminated by quick filtration in a Brandel cell harvester (Biochemical and Development Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). The total binding was 3–10% of the radioactivity added. Non-specific binding in competitive binding experiments amounted to less than 15% of the total binding unless otherwise stated. The assays were performed in duplicates at least three times. Competitive binding of [¹²⁵I]-CART(61-102) with cholecystokinin octapeptide (CCK-8, Neosystem, Strasbourg, France), α-melanocyte stimulating hormone (α-MSH), thyroxin releasing hormone (TRH), angiotensin II (ATII), neurotensin (NT) and leptin (Sigma, St. Luis, MO, USA) was also tested.

This procedure was also used in the competitive binding experiment to floating intact cells, only the binding buffer contained glucose. Floating cells were cells that were detached from the support before passaging.

2.6. Analysis of binding data and statistics

Data are presented as means ± S.E.M. of 3–6 independent experiments. Saturation and competitive binding curves were plotted using Graph-Pad Software (San Diego, CA, USA)

comparing the best fit for single or two binding site models (*K*_d, *B*_{max} and *IC*₅₀ values were obtained from non-linear regression analysis). Inhibition constants (*K*_i) were calculated from *IC*₅₀ using Cheng–Prusoff equation (Chang and Cheng, 1978).

Food intake data were analyzed by one-way ANOVA (analysis of variance) followed by Tukey *post hoc* test using Graph-Pad Software; *P*<0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Iodination of CART(61-102)

CART(61-102) was mono-iodinated with radioactive and stable isotope. One major peak was found both in radioactive and non-radioactive preparation; it was identified as mono-iodinated peptide by mass spectrometry. By HPLC analysis, [¹²⁵I]-CART(61-102) was proven to stay stable under conditions of the binding experiments (results not shown).

To prove that iodination did not eliminate the biological activity of CART, we needed a rather high amount of non-radioactive iodinated CART(61-102). As it was easier to prepare the di-iodinated derivative, we decided to use non-labeled di-iodinated CART(61-102) in our experiments. Its molecular weight was confirmed by mass spectrometry.

3.2. Biological activity of I₂-CART(61-102)

CART(61-102) administered i.c.v. lowered food intake in fasted mice significantly and dose-dependently (see Fig. 1) until about 120 min after injection, with the highest effect measured 45 and 75 min after injection. I₂-CART(61-102) at the dose of 1 µg/mouse reduced food intake to 67% of food intake of saline-treated group; this value was significantly different from the food intake after administration of CART(61-102), dose 1 µg/mouse (Fig. 1).

3.3. Optimization of binding experiments

In binding experiments to PC12 cell membranes, specific binding of [¹²⁵I]-CART(61-102) at 37 °C was linear from

Table 1
Displacement of [¹²⁵I]-CART(61-102) binding by CART peptides on PC12 cells

Peptide	<i>K</i> _i (nM)		
	Membranes from non-differentiated cells	Non-differentiated cells on plates	Differentiated cells on plates
CART(61-102)	2.99 ± 0.65	13.61 ± 2.62	8.01 ± 2.14
CART(55-102)	2.98 ± 0.33	12.94 ± 1.65	5.40 ± 0.44
I ₂ -CART(61-102)	1.27 ± 0.20	3.00 ± 0.89	4.46 ± 1.05
CCK-8, α-MSH, TRH, AT II, NT, leptin	> 10000		

Mean ± S.E.M. of three to six separate experiments.

*K*_i was calculated using Cheng–Prusoff equation (concentration of the radioligand was 0.1 nM and *K*_d taken from saturation experiments was 0.48 nM for non-differentiated cells and 1.90 nM for differentiated cells).

12.5 µg to 100 µg of protein. It reached the maximum at 15 min and remained constant at least for the next 100 min. Binding of [¹²⁵I]-CART(61-102) to floating PC12 cells at 37 °C was linear in a range of 1.25×10^5 to 10^6 cells/tube, the binding reached maximum at 15 min and was constant at least for an additional 60 min. Specific binding at 4 °C reached the maximum at 60 min and was constant for further 4 h of incubation; non-specific binding at this temperature, however, amounted to 40% of total binding.

After optimization of binding conditions, 30 min incubation at 37 °C with 50 µg of protein (cell membranes) or 5×10^5 cells (floating or plated intact cells) was routinely used.

3.4. Competitive binding to non-differentiated PC12 cells and cell membranes

CART(61-102), CART(55-102), and I₂-CART(61-102) competed with [¹²⁵I]-CART(61-102) for binding to PC12 cell membranes with K_i in the low nM range (see Table 1). Non-related peptides such as CCK-8, α-MSH, TRH, AT II, neurotensin, and leptin did not displace [¹²⁵I]-CART(61-102) binding to the cell membranes even at a concentration of 10^{-5} M.

Specific binding of [¹²⁵I]-CART(61-102) to floating cells was displaced by CART(61-102) with $K_i = 3.00 \pm 0.51$ nM.

In competitive binding experiments to plated PC12 cells, non-differentiated cells bound CART(61-102) and CART(55-102) with K_i in low 10^{-8} M range and I₂-CART(61-102) in 10^{-9} M range (see Table 1).

3.5. Saturation binding to non-differentiated PC12 cells and cell membranes

The saturable, specific binding of [¹²⁵I]-CART(61-102) to non-differentiated plated PC12 cells exhibited K_d of 0.48 ± 0.16 nM and B_{max} 2228 ± 529 binding sites/cell. Non-specific

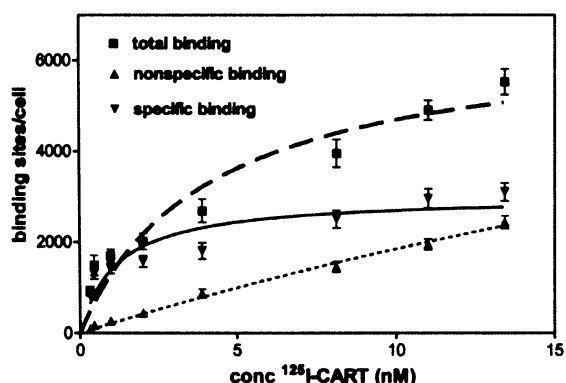


Fig. 2. [¹²⁵I]-CART(61-102) saturation binding to non-differentiated PC12 cells on plates (in all experiments, 5×10^5 cells/well were used). The cells were incubated at 37 °C for 30 min with increasing amount of [¹²⁵I]-CART(61-102) in the absence (total binding) or presence (non-specific binding) of 2×10^{-6} M CART(61-102). Specific binding was calculated by subtracting the nonspecific from total binding. Binding curves were plotted using nonlinear regression. The figure is a representative example of five experiments carried out in triplicates.

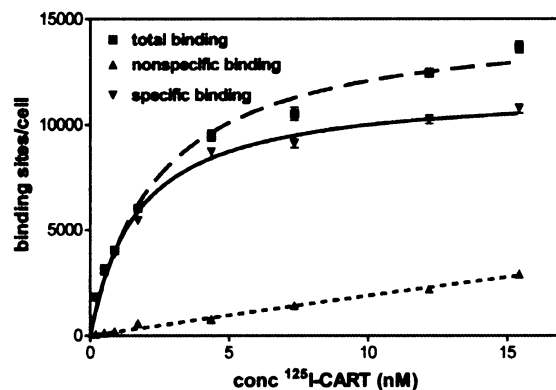


Fig. 3. [¹²⁵I]-CART(61-102) saturation binding to NGF-differentiated PC12 cells on plates (in all experiments, 5×10^5 cells/well were used). The cells were incubated at 37 °C for 30 min with increasing amount of [¹²⁵I]-CART(61-102) in the absence (total binding) or presence (non-specific binding) of 2×10^{-6} M CART(61-102). Specific binding was calculated by subtracting the nonspecific from total binding. Binding curves were plotted using nonlinear regression. The figure is a representative example of three experiments carried out in triplicates.

binding was about 40% and never exceeded 50% of the total binding. Non-linear regression analysis showed one binding site (see Fig. 2). The saturation binding to cell membranes gave K_d of 0.60 ± 0.16 nM and B_{max} 155 ± 8 fmol/mg of membrane protein, but the non-specific binding slightly exceeded 50% of the total binding.

3.6. Differentiation of PC12 cells

The PC12 cell line was successfully differentiated using NGF treatment to the neuronal phenotype, as described earlier (Greene and Tischler, 1976). A fully developed net of neurons and axons was clearly visible using a phase contrast microscope. CART(61-102), CART(55-102) and I₂-CART(61-102) were bound to differentiated cells with K_i comparable with that of non-differentiated cells (Table 1).

3.7. Saturation binding to differentiated plated PC12 cells

The specific binding of [¹²⁵I]-CART(61-102) to non-differentiated plated PC12 cells was saturable, with non-specific binding less than 20%, with K_d 1.90 ± 0.27 nM, and B_{max} 11194 ± 261 binding sites/cell (Fig. 3).

4. Discussion

The CART receptor molecule(s) has not been characterized yet. Binding studies using radiolabeled CART were mostly unsuccessful due to the high background attributed to disruption of the binding site of the active ligand during the iodination reaction (Keller et al., 2006; Vicentic et al., 2006). Just recently, specific binding of ¹²⁵I-CART (61-102) to AtT20 mouse pituitary tumor cells has been reported (Vicentic et al., 2005, 2006) and linked to CART-induced activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway via a putative G-protein-coupled receptor (Lakatos et al., 2005).

Lakatos et al. (2005) registered a negligible response to CART(55-102) in pheochromocytoma PC12 in terms of ERK phosphorylation. However, dense CART immunostaining was reported in chromaffin cells of adrenal medulla (Dun et al., 2006) and thus could also be expected in PC12 cells because the line is derived from chromaffin cells and keeps the original character.

In our competition binding experiments with cell membranes and intact floating PC12 cells, the equilibrium binding was reached already after 15 min and was stable at least for the next 60 min. CART(61-102), CART(55-102) and I₂-CART(61-102) were bound to cell membranes with a similar affinity in a low nM range and to plated non-differentiated and differentiated cells with a lower affinity than to cell membranes (Table 1).

The di-iodinated derivative of CART had the highest binding affinity of all tested ligands both to cell membranes and plated non-differentiated and differentiated PC12 cells. It is not a rare phenomenon that iodinated compounds have higher affinity to the receptors than non-iodinated ones. Enhancement of ligand affinity after iodination has already been described in the literature, e.g. for the specific oxytocin receptor antagonist (Elands et al., 1988).

In this study, all K_d and B_{max} determined were in usual common range (Motulsky and Neubig, 1997). [¹²⁵I]-CART(61-102) was specifically bound to intact plated non-differentiated PC12 cells, with K_d 0.48±0.16 nM (Fig. 2). The results of the saturation experiment with cell membranes confirmed the K_d value. Under identical experimental conditions [¹²⁵I]-CART(61-102) was specifically bound to differentiated PC12 cells with K_d 1.90±0.27 nM (Fig. 3). Differentiated cells displayed lower non-specific binding than non-differentiated cells (20% versus 40%). We calculated that if non-specific binding to non-differentiated cells were also 20%, K_d for non-differentiated would have been similar to the value for differentiated cells. In AtT20 pituitary tumor cells, specific binding of [¹²⁵I]-CART(61-102) with K_d only of 21.9±8.0 pM was reported (Vicentic et al., 2005). It could be explained by the fact that binding experiments with AtT20 cells were done at 4 °C while ours with PC12 cells at 37 °C.

Interestingly, B_{max} for differentiated cells, 11,194±261 binding sites/cell (Fig. 3), was 5 times higher than B_{max} for non-differentiated cells, 2228±529 binding sites/cell (Fig. 2).

Detection of CART peptide binding sites in both non-differentiated and differentiated PC12 cells pointed to a possible role of CART in the sympatho-adreno-medullary system (Dun et al., 2006) and in response to stress (Koylu et al., 2006).

We have not succeeded in detecting any specific [¹²⁵I]-CART(61-102) binding to dissociated cells and cell membranes of hypothalamus and gastrointestinal tract or to stable neuroglial cell line NG 108-15 (not shown). The reason might be the presence of different CART receptor(s) in normal and tumor cells or much lower density of the binding sites in tissues than in cultured cells.

Using feeding test with mice, we confirmed partial preservation of the biological activity of CART(61-102) after its iodination (Fig. 1). I₂-CART(61-102) in a dose of 1 µg/mouse lowered food intake to the same extent as CART(61-102) in a

dose of 0.5 µg/mouse. Together with the specific binding of [¹²⁵I]-CART(61-102) to PC12 cells, it proved that [¹²⁵I]-radiolabeling did not change to a great extent the pharmacological properties of CART.

The finding of binding sites for [¹²⁵I]-CART(61-102) on PC12 cells, both non-differentiated and differentiated, and the fact that di-iodinated CART(61-102) retained biological activity could be used in further studies aiming at characterization of potential CART receptor molecule(s).

Acknowledgements

The study was supported by grants 303/05/0614 of the Grant Agency of the Czech Republic and Z20550514 and Z40550506 of the Academy of Sciences of the Czech Republic.

We gratefully acknowledge the generous help of M. Šanda for providing the mass spectra. We are also indebted to A. Vytejková and H. Vysušilová for their excellent technical assistance.

References

- Broberger, C., 2000. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and food intake: behavior in search of anatomy. *Drug Dev. Res.* 51, 124–142.
- Chang, C.H., Cheng, Y.C., 1978. Ribonucleotide reductase isolated from human cells. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099–3188.
- Douglass, J., Daoud, S., 1996. Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript. *Gene* 169, 241–245.
- Douglass, J., McKinzie, A.A., Couceyro, P., 1995. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J. Neurosci.* 15, 2471–2481.
- Dun, S.L., Brailoiu, C.G., Yang, J., Chang, J.K., Dun, N.J., 2006. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and sympatho-adrenal axis. *Peptides* 27, 1949–1955.
- Elands, J., Barberis, C., Jard, S., Tribollet, E., Dreifuss, J.J., Bankowski, K., Manning, M., Sawyer, W.H., 1988. 125I-labelled d(CH2)5[Tyr(Me)2,Thr4,Tyr-NH2(9)]OVT: a selective oxytocin receptor ligand. *Eur. J. Pharmacol.* 147, 197–207.
- Fraker, P.J., Speck, J.C., 1978. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80, 849–857.
- Gautvik, K.M., de Lecea, L., Gautvik, V.T., Danielson, P.E., Tranque, P., Dopazo, A., Bloom, F.E., Sutcliffe, J.G., 1996. Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8733–8738.
- Greene, L.A., Tischler, A.S., 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 2424–2428.
- Hunter, R.G., Philpot, K., Vicentic, A., Dominguez, G., Hubert, G.W., Kuhar, M.J., 2004. CART in feeding and obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 454–459.
- Iloff, J.J., Alkayed, N.J., Gloshani, K.J., Traystman, R.J., West, G.A., 2005. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide: a vasoactive role in the cerebral circulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 1376–1385.
- Keller, P.A., Compan, V., Bockaert, J., Giacobino, J.P., Charnay, Y., Bouras, C., Assimacopoulos-Jeannet, F., 2006. Characterization and localization of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) binding sites. *Peptides* 27, 1328–1334.
- Kuhar, M.J. (Ed.), 2006. *Peptides*, vol. 27. whole issue.
- Koylu, E.O., Balkan, B., Kuhar, M.J., Pogun, S., 2006. Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) and the stress response. *Peptides* 27, 1956–1969.

- Lakatos, A., Prinster, S., Vicentic, A., Hall, R.A., Kuhar, M.J., 2005. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors. *Neurosci. Lett.* 384, 198–202.
- Motulsky, H., Neubig, R., 1997. Analyzing radioligand binding data. *Current. Protoc. Neurosci. (Suppl. 19)*, 7.5.1–7.5.55.
- Vicentic, A., Lakatos, A., Kuhar, M.J., 2005. CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide receptors: specific binding in AtT20 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 528, 188–189.
- Vicentic, A., Lakatos, A., Jones, D., 2006. The CART receptors: background and recent advances. *Peptides* 27, 1934–1937.
- Spiess, J., Villarreal, J., Vale, W., 1981. Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus. *Biochemistry* 20, 1982–1988.