

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Kateřina Pospíšilová

ÚLOHA STABILNÍHO ANALOGU PEPTIDU  
UVOLŇUJÍCÍHO PROLAKTIN V POTKANÍM MODELU  
OBEZITY

Effect of stable prolactin-releasing peptide analog in rat  
model of obesity

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Praha 2018

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

## Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce RNDr. Lence Maletínské, CSc. za odborné vedení, podporu a trpělivost při psaní této práce. Mé poděkování dále patří hlavně Mgr. Barboře Neprašové za cenné rady nejen při experimentální činnosti. Děkuji i celému kolektivu laboratoře RNDr. Lenky Maletínské, CSc.

V neposlední řadě patří velké díky mým rodičům, kteří mě po celou dobu mých studií plně podporovali.

## ABSTRAKT

Obezita je velmi závažným celospolečenským problémem moderní doby. Dnešní stav již lze považovat za epidemii, protože již zdaleka neplatí, že se obezita vyskytuje jen v rozvinutých zemích světa. Toto onemocnění s sebou nese mnoho dalších poruch a problémů jako je hypertenze, diabetes mellitus 2. typu, hypercholesterolemie, kloubní obtíže nebo i psychické problémy, které dotyčného vyřazují z běžného života. Pochopení mechanismů, které v lidském organismu řídí energetickou rovnováhu, je nezbytné pro další pokrok ve vývoji léků proti této nemoci. Peptid uvolňující prolaktin (PrRP) je anorexigenní (snižující příjem potravy) neuropeptid působící centrálně v hypothalamu. Jeho lipidizované analogy mají velký potenciál právě v léčbě obezity a diabetu mellitu 2. typu.

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem palmitovaného analogu peptidu uvolňujícího prolaktin ( $\text{palm}^{11}$ -PrRP31) při chronickém podávání na dietou indukovaný potkaní model obezity.

U zvířat byla během experimentu sledována hmotnost a příjem potravy. Podávání analogu  $\text{palm}^{11}$ -PrRP31 mělo za následek statisticky významné snížení příjmu potravy u dané skupiny potkanů a v konečném důsledku i snížení hmotnosti vzhledem k obézním kontrolám na vysokotukové dietě. S celkovou hmotností korelovala i hmotnost intraperitoneálního tuku, jehož hmotnost byla u skupiny injikované  $\text{palm}^{11}$ -PrRP31 signifikantně snížena vzhledem ke skupině na vysokotukové dietě.

Nasazení vysokotukové diety zhoršilo u potkanů některé základní metabolické parametry včetně glukózové tolerance a došlo také k poklesu fosforylace některých kinas inzulínové kaskády.  $\text{Palm}^{11}$ -PrRP31 u skupiny experimentálních potkanů signifikantně snížil plazmatickou hladinu leptinu a došlo i k signifikantnímu zlepšení glukózové tolerance. Palmitovaný analog PrRP je tedy možným kandidátem pro vývoj antiobezitik.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Lipidizace

Obezita

Peptid uvolňující prolaktin (PrRP)

Potkaní model obezity

## ABSTRACT

Obesity is a serious worldwide problem of modern society. Current state is at epidemic level not just in the developed world. It is no more „western disease“ or „disease of affluence“ as obesity used to be called. Determination of mechanisms that regulate energy balance in the human organism is necessary for further development of obesity drugs. Prolactin-releasing peptide (PrRP) is anorexigenic (food intake lowering) neuropeptide, which acts centrally in hypothalamus. Lipidized analogs of PrRP are promising tools in obesity and type-two diabetes mellitus treatment.

This work is focused on impact of palmitoylated analog of prolactin-releasing peptide (palm<sup>11</sup>-PrRP31) in a diet induced rat model of obesity after chronic administration.

Body weight and cumulative food intake was monitored during the experiment. Administration of palm<sup>11</sup>-PrRP31 markedly lowered food intake which caused decrease of body weight compared to obese control group on high-fat diet. This reduction correlated with significantly lower amount of intraperitoneal fat compared to group on high fat-diet.

Also, high-fat diet worsened studied metabolic parameters including glucose tolerance. Palm<sup>11</sup>-PrRP31 lowered leptin plasma level and improved glucose tolerance both compared to the high-fat fed. Therefore, palm<sup>11</sup>-PrRP31 is potential anti-obesity compound.

KEY WORDS

Lipidization

Obesity

Prolactin-releasing peptide (PrRP)

Experimental rat model of obesity

## OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	10
1 ÚVOD .....	12
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	13
2.1 Obezita .....	13
2.2 Regulace příjmu potravy .....	14
2.3 Peptidy ovlivňující příjem potravy .....	15
2.3.1 Leptin.....	15
2.3.2 Glukagonu-podobný peptid-1 .....	16
2.3.3 Cholecystokinin .....	16
2.3.4 Ghrelin .....	17
2.4 Peptid uvolňující prolaktin.....	17
2.5 Experimentální modely obezity .....	19
2.5.1 Myší modely obezity .....	19
2.5.2 Potkaní modely obezity .....	19
2.5.3 Dietou indukované modely obezity .....	19
2.6 Signalizační dráhy v hypothalamu.....	20
2.6.1 Leptinová signalizační kaskáda .....	20
2.6.2 Inzulinová signalizační kaskáda .....	21
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	22
3.1 Materiál.....	22
3.1.1 Chemikálie.....	22
3.1.2 Protilátky .....	22
3.1.3 Přístroje a programy .....	25
3.1.4 Syntéza palm <sup>11</sup> -PrRP31 .....	25
3.2 Experimentální zvířata a dieta .....	25
3.2.1 Podávání palm <sup>11</sup> -PrRP31 (intervence).....	25
3.2.2 Odběr krve a orgánů .....	26
3.2.3 Orální glukózový toleranční test.....	26
3.2.4 Metabolické parametry zvířat.....	27
3.2.5 Zpracování potkaních hypothalamů .....	27



---

3.3	Imunodetekce – Metoda Western blot .....	27
3.3.1	Gelová elektroforéza SDS-PAGE .....	27
3.3.2	Přenos proteinu na nitrocelulosovou membránu .....	27
3.3.3	Detekce fosforylovaných a nefosforylovaných proteinů.....	28
3.3.4	Detekce $\beta$ -aktinu a GAPDH .....	28
3.4	Statistické vyhodnocení .....	29
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	30
4.1	Hmotnost a příjem potravy experimentálních zvířat .....	30
4.2	Hmotnost odebraných orgánů .....	33
4.3	Orální glukózový toleranční test (OGTT).....	34
4.4	Metabolické parametry .....	37
4.5	Imunodetekce signalizačních kaskád v hypothalamech potkanů.....	39
5	ZÁVĚR.....	44
	SEZNAM REFERENCÍ .....	45

---

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AgRP	<i>agouti-related peptide</i>
Akt	protein kinasa B
ARC	<i>nucleus arcuatus</i>
BAT	hnědý tuk (brown adipose tissue)
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
BSA	hovězí sérový albumin
CART	– kokainem a amfetaminem regulovaný transkript (cocaine- and -amphetamine regulated transcript)
CCK	cholecystokynin
ERK	extracelulárním signálem regulovaná proteinkinasa (extracellular signal- regulated kinase)
GAPDH	glyceraldehyd-3fosfátdehydrogenáza
GLP-1	peptid podobný glukagonu 1 (glucagon-like peptide 1)
HF	vysokotuková dieta (high fat diet)
IPAT	intraperitoneální tuk (intraperitoneal adipose tissue)
IRS	substrát inzulínového receptoru
IR $\beta$	inzulínový receptor podjednotka $\beta$
JNK	c-Jun N-koncové kinasy
LF	standardní dieta (low fat diet)
$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -melanocyty-stimulující hormon

---

NPY	neuropeptid Y
PBS	phosphate-buffered saline (fyziologický roztok pufrovaný fosfátovým pufrem o pH = 7,4)
PDK 1	fosfoinositid-dependentní proteinkinasa 1
PI3K	fosfatidyl-inositol-3-kinasa
PrRP	prolaktin uvolňující peptid
OGTT	orální glukózový toleranční test
SEM	střední chyba průměru
SDS	dodecylsulfát sodný
STAT3	signální transduktor a aktivátor transkripce 3
TBS	tris-buffered saline (fyziologický roztok pufrovaný TRIS pH = 7,6)
TBS/Tween	TBS s přidavkem 1% Tween-20
Tris	Trizma base

## 1 ÚVOD

Obezita se v dnešním rozvinutém světě řadí na přední místo mezi onemocněními spojená s poruchami výživy a dnes již můžeme říci, že má charakter epidemie. V posledních letech bylo věnováno velké úsilí k pochopení mechanismů, které regulují právě příjem potravy a energetickou rovnováhu. Objasnění těchto drah je klíčové pro výzkum farmakologické léčby obezity.

Tato bakalářská práce se zabývá *in vivo* vlivem jedné z látek, která tento farmakologický potenciál má.

Peptid uvolňující prolaktin (PrRP) je anorexigenní (snižující příjem potravy) neuropeptid působící centrálně v mozku. Po periferním podání není schopený překročit hematoencefalickou bariéru a nemá tedy kýžený účinek. Z tohoto důvodu byla navržena lipidizace jeho analogů. Připojením mastné kyseliny k peptidu dojde k zachování anorexigenního účinku PrRP i při periferním podání.

V této práci byl použit analog PrRP s 31 aminokyselinami palmitovaný v pozici 11 (připojením mastné kyseliny přes  $-NH_2$  skupinu Lysinu). Zkoumán byl vliv tohoto lipidizovaného analogu na dietou indukované obezní potkany kmene Wistar Kyoto.

Cíle práce:

1. Ověřit účinek stabilního analogu palm<sup>11</sup>-PrRP31 na příjem potravy, tělesnou hmotnost, metabolické parametry a glukózovou toleranci *in vivo* v potkaním modelu obezity a prediabetu
2. Charakterizovat signalizace v hypothalamu související s účinkem palm<sup>11</sup>-PrRP31 po jeho podání

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Obezita

Nadváha až obezita má v dnešním rozvinutém světě charakter epidemie, počet postižených neustále nekontrolovaně roste. Do popředí zájmu lékařů se dostávají děti a mladiství, problémy s hmotností se totiž u nemocných vyskytují ve velké většině případů již v dětství. Dříve se obezita téměř nevyskytovala v zemích třetího světa, byl to naopak znak nadbytku a bohatství [1]. Dnes je ovšem její výskyt běžný i ve velmi chudých oblastech [2].

Světová zdravotnická organizace definuje obezitu jako „nadměrnou kumulaci tukové tkáně, která může mít negativní vliv na zdraví“. Hrubým ukazatelem klasifikace nadváhy a obezity je BMI (body mass index), udávající poměr mezi hmotností a druhou mocninou výšky [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ]. Pro dospělé je používanou hranicí hodnota 25, tedy jedinci s vyšší hodnotou BMI než 25 mají nadváhu a jedinci s BMI vyšším než 30 jsou dle tohoto dělení obézní [3].

K nadměrné kumulaci tukové hmoty dochází v důsledku energetické nerovnováhy, tedy nepoměru mezi příjmem a výdejem energie v důsledku relativního nedostatku fyzické aktivity. Z evolučního hlediska je lidské tělo nastaveno spíše na uchovávání energie – v minulosti byla období hladu velmi častá a proto si organismus vytvořil mechanismy, které umožnily nadbytečnou energii uložit v podobě tuků a tato období nedostatku překlenout. Dnes ovšem nastává problém opačný, a sice že potrava je snadno dostupná a energeticky bohatá, ale výše zmíněné mechanismy jsme si uchovali [4].

Obezita s sebou nese další rizika jako je inzulinová rezistence vedoucí až k diabetu mellitu 2. typu, kardiovaskulárním onemocněním (ateroskleróza, infarkt myokardu), abnormální lipidémii (hypertriacylglyceridémie, hypercholesterolémie), hypertenzi, některým druhům onkologických onemocnění ale i ortopedickým či psychickým problémům. Často používaným termínem je metabolický syndrom, jakožto komplexní označení některých výše zmíněných poruch (inzulinová rezistence, hyperinzulinémie, hyperglykémie, hypertenze, hypertriacylglycerolémie a hypercholesterolémie) [5].

Ačkoliv je dnes výzkumu farmakologické léčby obezity věnováno velké úsilí, neexistuje žádný efektivní lék vhodný pro dlouhodobé užívání. Dříve používané analogy neurotransmitérů, které snižovali apetit, byly z trhu staženy pro své nežádoucí účinky (jednalo se např. o psychické nebo kardiovaskulární negativní vlivy [6]. Novou

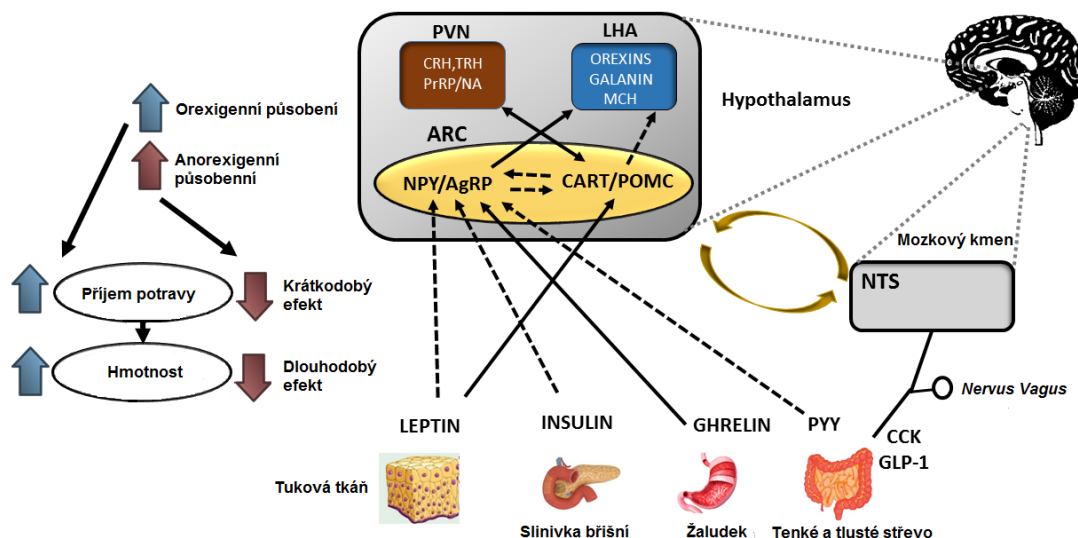
naději představují analogy anorexigenních (snižujících příjem potravy) peptidů, které slibují minimum nežádoucích účinků i při chronickém užívání. Příkladem může být liraglutid, který je syntetickým analogem glukagonu podobného peptidu-1 (GLP-1; glucagon-like peptide-1). Tento lék byl dříve podáván při léčbě diabetu mellitu 2. typu, ale nedávno byl ve Spojených státech amerických schválen i pro léčbu obezity (pod obchodním názvem Saxenda). [7,8].

## 2.2 Regulace příjmu potravy

Příjem potravy a řízení hladu a sytosti je velmi složitý a komplexní proces zahrnující současné působení signálů jak z centrálního nervového systému, tak i z periferie [9] (Obrázek 1). Centrálním orgánem přijímajícím signály z periferie a tedy regulujícím energetickou homeostázu je hypothalamus [10].

Hypothalamus je malý orgán nacházející se v mezimozku poblíž III. mozkové komory. Anatomicky se tento orgán skládá z několika strukturně a funkčně odlišných jader. Pro příjem potravy a kontrolu energetické homeostázy je nejdůležitější *nucleus arcuatus* (ARC), který obsahuje dvě skupiny neuronů se vzájemně opačným vlivem na příjem potravy. První populace neuronů exprimuje neuropeptidy, které zvyšují apetit (tzv. orexigenní neuropeptidy), jedná se např. o neuropeptid Y (NPY) nebo *agouti-related peptide* (AgRP). Druhá skupina neuronů uvolňuje neuropeptidy s opačným, tedy anorexigenním účinkem - $\alpha$ -melanocyty-stimulující hormon ( $\alpha$ -MSH) a *-cocaine- and amphetamine -regulated transcript* (peptid CART) [11].

Oba typy neuronů obsahují receptory pro periferní hormony, jsou tedy schopny přijímat signály např. z pankreatu nebo gastrointestinálního traktu. Tyto periferně produkované hormony jsou schopné řídit příjem potravy na krátkodobé i dlouhodobé úrovni. Mezi krátkodobé hormony s anorexigenním účinkem patří cholecystokinin (CCK), peptid YY a GLP-1, zatímco na dlouhodobé úrovni je toho schopný leptin a inzulín. Opačný (tedy orexigenní) účinek má hormon ghrelin, který je jediným orexigenním peptidem v periférii a působí jak v krátkodobém, tak i v dlouhodobém časovém sledu [12].



**Obrázek 1** Schéma znázorňující kooperaci centrálního a periferního systému při řízení příjmu potravy

Aktivační dráhy jsou značeny plnou čarou, přerušovanou čarou pak dráhy inhibiční. Zkratky: neuropeptid Y (NPY), *agouti-related peptide* (AgRP), proopiomelanokortin (POMC), *-cocaine- and amphetamine -regulated transcript* (CART), paraventriculární jádro (PVN), tyreoliberin (TRH), kortikoliberin (CRH), peptid uvolňující prolaktin (PrRP), noradrenalin (NA), laterální hypotalamus (LHA), hormon koncentrující melanin (MCH). Převzato z [9], upraveno.

## 2.3 Peptidy ovlivňující příjem potravy

### 2.3.1 Leptin

Leptin je hormon produkováný hlavně bílou tukovou tkání (adipocyty), dnes je ale zřejmé, že je tento hormon produkován i v tkáních jiných (např. v hnědé tukové tkáni, placentě či v kosterním svalstvu). Leptin cirkuluje v krvi a do mozku (konkrétně do ARC v hypothalamu) se dostává přes hematoencefalickou bariéru díky svému specifickému přenašeči [13]. Zde se leptin váže na svůj specifický receptor, což spustí kaskádu následujících reakcí: dojde k potlačení chuti k jídlu a zvýšení energetického výdeje aktivací sympatického nervového systému. V konečném důsledku vede právě toto k snížení příjmu potravy a tělesné hmotnosti [14].

Jak bylo již vysvětleno výše, ARC v hypothalamu obsahuje dvě populace neuronů. Leptin mající anorexigenní účinky inhibuje syntézu orexigenních neuropeptidů (NPY a AgRP) a naopak indukuje expresi neuropeptidů  $\alpha$ -MSH a CART peptidu [15].

Jelikož je leptin produkován hlavně bílou tukovou tkání, jeho hladina v krvi koreluje s množstvím tělesného tuku daného jedince [16]. Obézní pacienti ale vykazují zvýšenou potřebu příjmu potravy navzdory abnormálně vysokým hodnotám leptinu v krvi (způsobeným právě velkým podílem tělesného tuku). Tento paradox naznačuje vznik tzv. leptinové rezistence, charakterizovaný sníženou odpovědí na inhibiční efekty leptinu. Ačkoliv bylo navrženo několik možných mechanismů vzniku této rezistence, je proces jejího vývoje stále nejasný [17].

### **2.3.2 Glukagonu-podobný peptid-1**

GLP-1 je inkretin primárně syntetizován enterokrinními L-buňkami tenkého a tlustého střeva, méně pak buňkami slinivky a hypothalamu. Tento peptid se skládá z 30 aminokyselin a má 2 biologicky aktivní formy [18,19].

GLP-1 je uvolňován po jídle, částečně je zodpovědný za sekreci inzulínu ze slinivky. Mezi jeho periferní role tedy patří udržování homeostázy glukózy. Na druhou stranu má i centrální efekt, a sice že reguluje příjem potravy [20]. Tyto centrální účinky byly dále zkoumány periferním podáváním agonistů receptoru pro GLP-1 (liraglutid a exendin-4). Výsledkem bylo snížení příjmu potravy, tedy i poklesu tělesné hmotnosti [21]. Tato zjištění potvrdila farmakologický potenciál GLP-1 v léčbě diabetu mellitu 2. typu a také obezity [22].

### **2.3.3 Cholecystokinin**

Dalším v gastrointestinálním traktu produkováným hormonem je cholecystokinin, který je sekretován buňkami tenkého střeva při přítomnosti tráveniny v duodenu, což stimuluje trávení tuku a proteinů [23]. Vedle této funkce má CCK také centrální anorexigenní efekt. Cholecystokinin funguje jako krátkodobý signál nasycení [24]. I tento inkretin je zkoumán jako možný základ farmakologické léčby obezity a diabetu mellitu 2. typu [25].

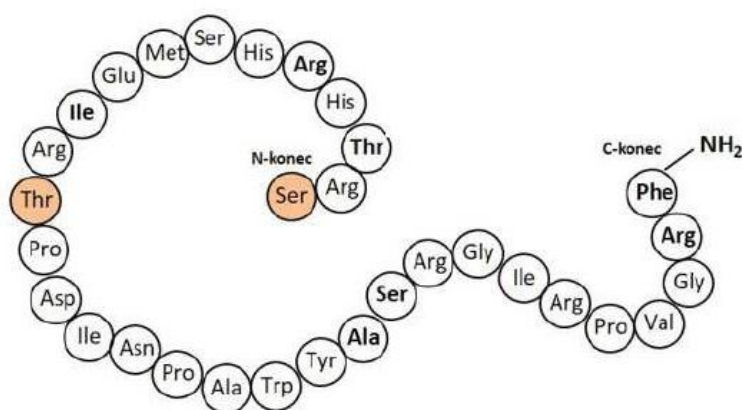


### 2.3.4 Ghrelin

Ghrelin je momentálně jediným známým orexigenním hormonem produkovaným primárně v periférii. V žaludku je sekretován jako odpověď na hlad, je tedy periferním signálem vyslaným do mozku (přes *nervus vagus*) ke stimulaci chuti k jídlu [26,27]. V hypothalamu (konkrétně v ARC) pak ghrelin stimuluje expresi a sekreci NPY a AgRP [28]. Byly provedeny experimenty s myši, kterým byli podáváni agonisté ghrelinu, což mělo za následek zvýšený příjem potravy a indukci tvorby tukové tkáně [29].

### 2.4 Peptid uvolňující prolaktin

Peptid uvolňující prolaktin (PrRP; *prolactin-releasing peptide*) je anorexigenní neuropeptid, který byl původně izolován z hypothalamu. Důvodem jeho izolace byla snaha najít přirozený ligand k sirotčímu receptoru GPR10 (receptor, ke kterému není znám žádný ligand). Původní předpoklad byl, že se jedná o peptid regulující uvolňování prolaktinu z hypofyzálních buněk (odtud také název). PrRP existuje ve dvou biologicky aktivních formách, které vznikají z jednoho prepropeptidu posttranslačními úpravami a to buď s 31 aminokyselinami (PrRP31) nebo s 20 aminokyselinami (PrRP20) (Obrázek 2). Obě tyto isoformy mají stejnou C-koncovou část, která je důležitá pro biologickou aktivitu peptidu [30].



**Obrázek 2** *Struktura lidského PrRP31*

Barevně jsou odlišeny N-koncové aminokyseliny PrRP31 a PrRP20.

Funkce, podle které dostal tento neuropeptid název – tedy regulace sekrece prolaktinu, byla při pozdějších výzkumech zpochybněna. Dnes je jasné, že se nejedná o primární funkci tohoto peptidu. [31].

PrRP a jeho receptory byly nalezeny hned v několika hypothalamických jádrech (tedy v centru regulace energetické rovnováhy) a v hypofýze, proto byly další výzkumy zaměřeny právě na jeho roli v ovlivňování příjmu potravy a tělesné hmotnosti. Bylo zjištěno, že stejně jako u jiných anorexigenních neuropeptidů (jako je např. melanocyty-stimulující hormon a peptid CART) je exprese mRNA potlačena, nachází-li se organismus ve stavu energetické nouze. V neposlední řadě byl anorexigenní účinek podpořen experimentem s potkany, kterým byl intracerebroventrikulárně (do třetí mozkové komory) podáván tento peptid. U pokusných zvířat došlo ke snížení tělesné hmotnosti v důsledku inhibice příjmu potravy [32,33].

Anorexigenní neuropeptidy a zvláště prolaktin uvolňující peptid jsou dnes považovány za potenciální naději v léčbě obezity. Tyto peptidy působí v organismu přirozeně centrálně. Po periferním podání je tedy účinek potlačen neschopností peptidu projít přes hematoencefalickou bariéru k cílovým receptorům v mozku. Další překážkou použití nativního peptidu představuje jeho velmi nízká stabilita ve fyziologických podmínkách [34].

Jednou ze strategií zvýšení biodostupnosti peptidu je jeho lipidizace, tedy připojení řetězce mastné kyseliny přes esterovou nebo amidovou vazbu k peptidu. Tato modifikace sníží biodegradabilitu peptidu a co je hlavní, dovolí substanci projít přes hematoencefalickou bariéru do mozku, tedy do místa jejího působení [35].

Ve studiích bylo opakovaně prokázáno snížení příjmu potravy a tělesné hmotnosti po podávání lipidovaného analogu PrRP u myši i potkanů [36,37] a také zlepšení glukózové tolerance potkaních modelů prediabetu a diabetu [38].

V této práci byl použit analog s 31 aminokyselinami palmitovaný v pozici 11 přes  $-NH_2$  skupinu lysinu (palm<sup>11</sup>-PrRP31).

## **2.5 Experimentální modely obezity**

Velmi často využívanými zvířecími modely při výzkumu (nejen) nových terapeutik jsou drobní hlodavci (myši a potkani). Modely obecně lze rozdělit na dvě velké skupiny a to na zvířata s mutací jednoho či více genů (tzv. transgenní modely) a ta zvířata, u kterých byla obezita vyvolána vystavením obezogenním vlivům (typicky se jedná dietu s vysokým obsahem tuku) [39].

### **2.5.1 Myší modely obezity**

Tzv. ob/ob myši patří mezi monogenní model se spontánní mutací jednoho konkrétního genu. Již název napovídá, o mutaci kterého genu se jedná a sice je to ob gen, jehož produktem je leptin. Tyto myši leptin neprodukují, dochází u nich tedy k výraznému nárůstu hmotnosti již v raném stádiu života v důsledku extrémně zvýšené chuti k jídlu (tzv. hyperfagii) a sníženého výdeje energie. Dalšími zdravotními komplikacemi je pak např. inzulinová rezistence následovaná hyperglykemií [39,40].

Za zmínku dále stojí, že tento typ obezity lze vyléčit podáváním leptinu. V experimentech bylo opakovaně prokázáno zlepšení parametrů spojených s metabolickým syndromem právě po externím podání leptinu [39,41].

Analogii ob/ob myši jsou db/db myši, které mají komplexní defekt v leptinové signalizaci. Zkratka „db“ poukazuje na diabetes, který tento model vykazuje ve větší míře než ob/ob myši. Další charakteristika je velmi podobná [39,42].

### **2.5.2 Potkaní modely obezity**

Fa/fa potkani (od „fatty“) neboli Zucker obézní potkani mají stejně jako db/db myši nefunkční leptinový receptor, zde se konkrétně jedná o mutaci jeho extracelulární domény. Následky jsou opět hyperfagie a snížený výdej energie vedoucí k morbidní obezitě [39,43].

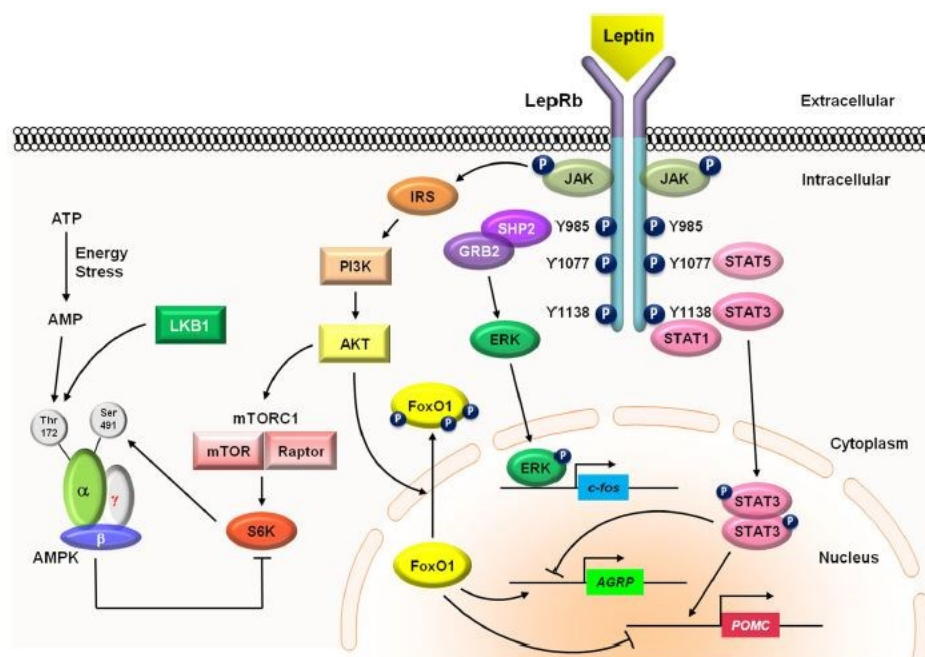
### **2.5.3 Dietou indukované modely obezity**

Tyto modely lze také nazvat polygenními modely. K rozvoji obezity dochází dlouhodobým krmením zvířat potravou se zvýšeným obsahem tuku, po čase se u myši či potkanů vyvine leptinová rezistence následovaná hyperglykemií. Takto vyvolaná nadváha až obezita je velmi podobná té pozorované u lidí, je proto obecně uznáváno, že tento model je pro výzkum léčby této nemoci velmi vhodný [39].

## 2.6 Signalizační dráhy v hypothalamu

### 2.6.1 Leptinová signalizační kaskáda

Po navázání leptinu na receptor jsou aktivovány tři hlavní signalizační kaskády (viz Obrázek 3). Tyto efektorové dráhy vedou k aktivaci transkripčních faktorů, které v konečném důsledku v hypothalamu inhibují expresi orexigenních neuropeptidů (jako je např. AgRP) a naopak dojde k aktivaci neuronů produkujících anorexigenní peptidy (POMC; proopiomelanocortin). [44,45].



**Obrázek 3** Přehled signalizačních kaskád aktivovaných leptinem a inzulinem v hypothalamických neuronech

Po navázání na leptinový receptor dojde k aktivaci JAK-STAT3, PI3K-FoxO1 a ERK kaskád. AgRP agouti-related protein, AMPK 5' AMP-activated protein kinase, FoxO1 forkhead box protein c-Fos proto-oncogen, O1, IRS insulin receptor substrate, JAK Janus kinase, PI3K phosphatidylinositol 3-OH kinase, POMC proopiomelanocortin, PTP1B protein-tyrosine phosphatase 1B, SOCS3 suppressor of cytokine signaling 3, STAT signal transducer and activator of transcription převzato z [40].

### **2.6.2 Inzulínová signalizační kaskáda**

Po navázání inzulínu na transmembránový protein dochází k aktivaci kaskády PI3K-Akt, která je považována za hlavní inzulínem spouštěnou kaskádu. Tento sled fosforylací je indukován autofosforylací inzulínového receptoru ( $IR\beta$ ) konkrétně aktivací jeho tyrosin kinasové aktivity. Poté dochází k fosforylaci IRS-1 (na Tyr465), dalším krokem je již fosforylace zmíněné PI3K (mechanismus: aktivace regulační podjednotky této kinasy způsobí fosforylaci fosfatidyl-inositol-4,5-bisfosfátu na fosfatidyl-inositol-3,4,5-trisfosfát). Tato kinasa fosforylací aktivuje PDK (protein kinasa 1) na Ser241 a ta fosforyluje proteinkinasu B (Akt) na dvou místech a to na Thr308 a Ser473. Proteinkinasa B fosforyluje kinasu GSK-3 (u GSK-3 $\alpha$  na Ser21 nebo u GSK-3 $\beta$  na Ser9). Tato fosforylace způsobí inhibici její kinasové aktivity. Inzulínová a leptinová signalizace je přes IRS úzce spjatá (viz obrázek č. 3) [46,47].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Materiál

Criterion™ TGX™ Precast Gels	Bio-Rad. Herkules, CA, USA
96jamkové destičky	GAMA GROUP, České Budějovice, ČR
96jamkové destičky (UV)	Thermo, Weaverville. NC, USA

#### 3.1.1 Chemikálie

Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Luminata Classico/Crescendo/Forte	Merck Millipore Headquartes, Billerica, MA, USA
β-Merkaptoethanol	Sigma, St. Louis, MO, USA
Methanol	Lach-ner, s.r.o. Neratovice, ČR
NaCl	Sigma, St. Louis, MO, USA
NaF	PENTA, Chrudim, ČR
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma, St. Louis, MO, USA
Trizma base (Tris)	Sigma, St. Louis, MO, USA
Tween-20	Sigma, St. Louis, MO, USA
SDS	Sigma, St. Louis, MO, USA

#### 3.1.2 Protilátky

**Tabulka 1** *Přehled primárních protilátek proti potkaním proteinům*

Základní protilátka	Ředění	Výrobce
Králičí monoklonální protilátka proti Fosfo-Akt (Ser473)	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA

---

Králíčí monoklonální protilátka proti Fosfo-Akt (Thr308)	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Králíčí monoklonální protilátka proti celkové Akt	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Myší monoklonální protilátka proti $\beta$ -aktinu	1:10 000	Sigma, St. Louis, MO, USA
Myší monoklonální protilátka proti Fosfo-Erk (Thr202/Tyr204)	1:2000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Myší monoklonální protilátka pro celkové Erk	1:2000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Myší monoklonální protilátka proti celkové GAPDH	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Králíčí monoklonální protilátka proti celkové IRS 1	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Králíčí monoklonální protilátka proti Fosfo-JNK (Thr183/Tyr185)	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Králíčí monoklonální protilátka proti celkové JNK	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Králíčí monoklonální protilátka proti Fosfo-c-Jun (Ser73)	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Králíčí monoklonální protilátka proti celkové c-Jun	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA

Králíčí monoklonální protilátka proti Fosfo-PDK (Ser241)	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Králíčí monoklonální protilátka proti celkové PDK	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Králíčí monoklonální protilátka proti celkové PI3K	1:1000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA

Králíčí monoklonální protilátky uvedené v Tabulce 1 byly ředěny v 5% BSA TBS/Tween. Myší monoklonální protilátky byly ředěny v 5% netučném mléce TBS/Tween20.

**Tabulka 2** *Přehled sekundárních protilátek*

Základní protilátka	Ředění	Výrobce
Konjugát protilátky proti králíčímu IgG připravenému v koze s HRP	1:2000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Konjugát protilátky proti myšímu IgG připravenému v koni s HRP	1:2000	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA

Sekundární protilátky uvedené v Tabulce 2 byly ředěny v promývacím pufru TBS/Tween 20.

Dále byly použity v laboratoři běžně dostupné chemikálie v analytické čistotě dodávané firmou Lachema, a.s. ČR a Sigma-Aldrich, USA. Používané pufrы byly připravovány v deionizované vodě.



### 3.1.3 Přístroje a programy

CCD kamera, Bio-Rad, Herkules, CA, USA

Homogenizátor Bullet Blender, Next Advanced, Inc., Averill Park, NY, USA

Mini-Protean 3, Bio-Rad, Herkules, CA, USA

XCell SureLock (Invitrogen, NY, USA)

### 3.1.4 Syntéza palm<sup>11</sup>-PrRP31

Lidský palmitovaný analog PrRP31 (sekvence: SRTHRHSMEI K (N- $\gamma$ -E (N-palm)) TPDINPAWYASRGIRPVGRF-NH<sub>2</sub>) byl syntetizován v laboratoři peptidové syntézy na ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha Ing. Miroslavou Blechovou. Syntéza probíhala dle způsobu popsaného v předchozí studii [36], posledním krokem syntézy byla lipidizace kyselinou palmitovou, syntéza je popsána v naší publikaci [37].

Přečištění peptidů bylo provedeno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a identifikace za využití hmotnostní spektrometrie Q-TOF micro [37].

## 3.2 Experimentální zvířata a dieta

Samci (n=24) potkaního kmene Wistar Kyoto (získáni z Charles River ve Francii ve věku 3-4 týdnů) byli umístěni v akreditovaném zvěřinci Fyziologického ústavu AV ČR, v.v.i., Praha v areálu ústavů akademie věd v Krči.

K navození obezity byla zvířata (n=16) krmena dietou s vysokým obsahem tuku (energetický obsah: 60 % tuk, 20 % sacharidy a 20 % proteiny, D12492, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA) a poskytnuta voda s přídavkem fruktózy a sacharózy (fruktóza 23 g/l, sacharóza 19 g/l). Kontrolní skupině (n=8) byla podávána standardní strava Ssniff (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Německo). Potkani byli 1x týdně váženi. Tato přípravná fáze trvala 3,5 měsíce.

Se zvířaty bylo zacházeno dle Zákona č. 246/1992 Sb. o ochraně zvířat proti týrání.

### 3.2.1 Podávání palm<sup>11</sup>-PrRP31 (intervence)

Ve 23. - 24. týdnu života zvířat byla po dobu 21 dní zahájena intervence. Zvířata byla rozdělena do tří skupin (n=8): 1. LF – fyziologický roztok (štíhlé kontroly), 2. HF + F fyziologický roztok (obézní kontroly), 3. HF + F palm<sup>11</sup>-PrRP31 (přehled skupin viz Tabulka 3). Do břišní dutiny (intraperitoneálně) bylo potkanům podáváno 1x denně

5 mg/kg palm<sup>11</sup>-PrRP31 (rozpuštěno ve fyziologickém roztoku). Potkani byli dvakrát týdně váženi. Se stejnou časovou frekvencí byla vážena i potrava.

**Tabulka 3** *Přehled rozdělení potkanů na skupiny*

Skupina	Dieta	Počet zvířat	Podávaná látka
1	LF	8	fyziologický roztok
2	HF + F	8	fyziologický roztok
3	HF + F	8	palm <sup>11</sup> -PrRP31

LF značí „low fat“, tedy standardní dietu Ssniff, HF + F pak „high fat + fructose“ vysokotukovou dietou s přidavkem fruktózy a sacharózy do pití.

### 3.2.2 Odběr krve a orgánů

Obézní potkani a jejich kontroly byli ponechání hladoví přes noc. Na konci pokusu byla zvířata zvážena, byla jim odebrána krev (z ní připravena plasma s přidavkem EDTA jako antikoagulantu) a dekapitována. Dále byly odebrány vzorky orgánů (játra, intraperitoneální tuk a hnědý tuk). Orgány byly zváženy, zmrazeny tekutým dusíkem a uchovávány v -80 °C. Na ledu byly vyjmuty hypothalamy, které byly uloženy v chlazeném lyzačním pufru (62,5 mmol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl pH=6,8 s přidavkem 1% deoxycholátu sodného, 1% Triton X-100 Complete, 50 mmol dm<sup>-3</sup> NaF, 1 mmol dm<sup>-3</sup> Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), a dále uchovávány v -20 °C pro metodu Western blot.

### 3.2.3 Orální glukózový toleranční test

Potkani byli na noc před koncem pokusu ponechání hladoví. Potkanům byly podány orálně 2 g/kg roztoku glukózy a hladiny glykémie byly měřeny v časových intervalech 0, 15, 30, 60, 120 a 180 min. Hodnota v bodě nula byla měřena před podáním glukózy, představuje tedy bazální glykémii po nočním hladovění. Vzorky krve byly získány z ocasů zvířat bez anestezie. Glykémie byla měřena glukometrem (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japonsko).

### 3.2.4 Metabolické parametry zvířat

Byly změřeny metabolické parametry zvířat v plazmě. Triglyceridy, cholesterol byly měřeny komerčními kity Erba Lachema, s.r.o, Brno, ČR. Hladina inzulínu v plazmě byla stanovena RIA kitem (Millipore, St. Charles, MI, USA). Plazmatická hladina leptinu pak pomocí ELISA kitu (Millipore, St. Charles, MI, USA).

### 3.2.5 Zpracování potkaních hypothalamů

Vzorky skladované v lyzačním pufru ( $62,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl pH=6,8 s přídavkem 1% deoxycholátu sodného, 1% Triton X-100 Complete,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  NaF,  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) byly homogenizovány (Bullet Blender, Next Advanced, Inc., Averill Park, NY, USA). V každém vzorku byla poté změřena celková koncentrace bílkovin (BCA Protein Assay kit, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Nakonec byly vzorky naředěny vzorkovým lyzačním pufrům ( $62,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris-HCl o pH=6,8 s přídavkem 2% SDS, 10% glycerol, 1% bromfenolová modř, 0,5%  $\beta$ -merkптоethanol,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  NaF,  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$   $\text{Na}_3 \text{VO}_4$ ) do koncentrace  $1 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$  a pro další použití uchovávány v  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 3.3 Imunodetekce – Metoda Western blot

### 3.3.1 Gelová elektroforéza SDS-PAGE

Vzorky byly nejprve 2 minuty zahřívány na  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ , poté 2 minuty sonikovány. Vlastní gelová elektroforéza v 4-15% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (Criterion™ TGX™ Precast Gels, Bio-Rad, Herkules, CA, USA) byla prováděna na přístroji Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Na každý gel byly vždy naneseny všechny tři skupiny po osmi vzorcích (kontrolní skupina na LF, kontrolní skupina na HF + F a skupina na HF léčená palm<sup>11</sup>-PrRP31). Množství nanášeného vzorku do jamky činilo vždy  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Poté byla prováděna elektroforéza za konstantního napětí při 200 V po dobu přibližně 45 minut v elektrodovém pufru ( $25 \text{ mmol dm}^{-3}$  Tris,  $192 \text{ mmol dm}^{-3}$  glycin, 1% SDS).

### 3.3.2 Přenos proteinu na nitrocelulosovou membránu

Po skončení elektroforézy byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulosovou membránu (Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Blotování probíhalo v blotovacím pufru

(25 mmol dm<sup>-3</sup> Tris, 192 mmol dm<sup>-3</sup> glycin, 20% methanol) za konstantního napětí 100 V po dobu 45 minut v přístroji XCell SureLock (Invitrogen, NY, USA).

### 3.3.3 Detekce fosforylovaných a nefosforylovaných proteinů

Po přenosu proteinu byly membrány nejprve promyty třikrát 5 min v promývacím pufru TBS/Tween (20 mmol dm<sup>-3</sup> Tris, 136 mmol dm<sup>-3</sup> NaCl, 0,1% Tween-20). Dále byly po dobu 1 hodiny ponechány v blokovacím pufru TBS/0,1% Tween (s 5% netučným sušeným mlékem nebo s 5% BSA s přidávkem ireverzibilních fosfatázových inhibitorů 1 mmol dm<sup>-3</sup> Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 50 mmol dm<sup>-3</sup> NaF). Následně bylo stejným způsobem provedeno promytí v TBS/Tween promývacím pufru. Takto zablokované a promyté membrány byly inkubovány s primární protilátkou (zředěnou v blokovacím pufru dle návodu od výrobce, viz Tabulka 1) přes noc ve 4°C. Druhý den byly membrány opět promyty (třikrát po pěti minutách) v promývacím pufru a poté ponechány k inkubaci 1 hodinu se sekundární protilátkou značenou peroxidasou (ředění 1:2000 s promývacím pufrům). Po skončení inkubace následovalo promytí třikrát po dobu 5 minut v promývacím pufru. Následně byly membrány ponořeny na 5 min do chemiluminiscenčního činidla Luminata Crescendo a ihned poté byla vzniklá chemiluminescence detekována na CCD kameře (Biorad, Herkulse, CA, USA). Veškeré promývání a inkubace probíhaly za stálého míchání. Konečné vyhodnocení bylo prováděno za pomoci počítačového programu ImageLab (Bio-Rad, Herkules, CA).

### 3.3.4 Detekce β-aktinu a GAPDH

Detekce β-aktinu a GAPDH (glyceraldehyd-3fosfátdehydrogenasa) slouží k porovnání množství signalizačních proteinů ve vzorcích, které byly na gel nanášeny. A to z toho důvodu, že tento protein je v buňce exprimován v konstantním množství (tzv. loading control).

Po detekci chemiluminescence byly membrány opět třikrát po dobu 5 minut promyty v TBS/Tween-20 promývacím pufru a poté inkubovány s primární protilátkou proti β-aktinu nebo proti GAPDH po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě (ředění viz Tabulka 1). Následný postup byl opět několikanásobné promytí a hodinová inkubace se sekundární protilátkou značenou HRP (proti myším a potkaním IgG, ředění v promývacím pufru v poměru 1:2000). Poté následovalo opět promytí a nakonec byla

na membránách detekována chemiluminescence a to stejným způsobem jako je výše popsáno, pouze s tím rozdílem, že bylo použito činidlo Luminata Classico.

### **3.4 Statistické vyhodnocení**

Pro statistické vyhodnocení hmotnosti a příjmu potravy experimentálních zvířat, orálního glukózového tolerančního testu, metabolických parametrů a míry fosforylace signalizačních proteinů v potkaních hypothalamech bylo použito Studentova t-testu v programu GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). Výsledky jsou uváděny ve formátu průměr  $\pm$  SEM. Hladiny signifikance jsou \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  a \*\*\* $P < 0,001$ , kde P představuje pravděpodobnost chybného zamítnutí nulové hypotézy.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Hmotnost a příjem potravy experimentálních zvířat

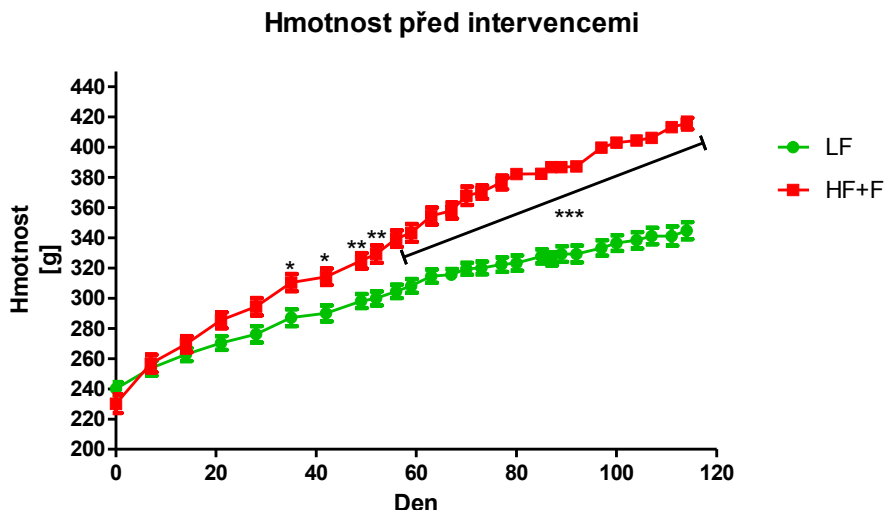
U potkanů kmene Wistar Kyoto byla po celou dobu experimentu měřena hmotnost, poté během intervencí, která trvala 21 dní, i množství přijaté potravy. Po dekapitaci zvířat byla odebrána krev, orgány a ty zváženy.

Obrázek 4 ukazuje nárůst hmotnosti od začátku experimentu (stáří 3 – 4. týdny) do počátku intervencí. Z tohoto obrázku je velmi dobře patrné, že zvířata na dietě se zvýšeným množstvím tuku, přibývala na hmotnosti s větší rychlostí oproti kontrolám na standardní stravě. Na konci tohoto období je pak signifikantní rozdíl mezi hmotnostmi obou skupin. Tento významný nárůst hmotnosti u zvířat na vysokotukové dietě je shodný s poznatky z literatury, jedná se o tzv. dietou indukovanou obezitu [39].

Na konci pokusu byl u skupiny potkanů léčené palm<sup>11</sup>-PrRP31 zaznamenán signifikantní pokles příjmu potravy vzhledem ke skupině HF + F (viz Obrázek 5).

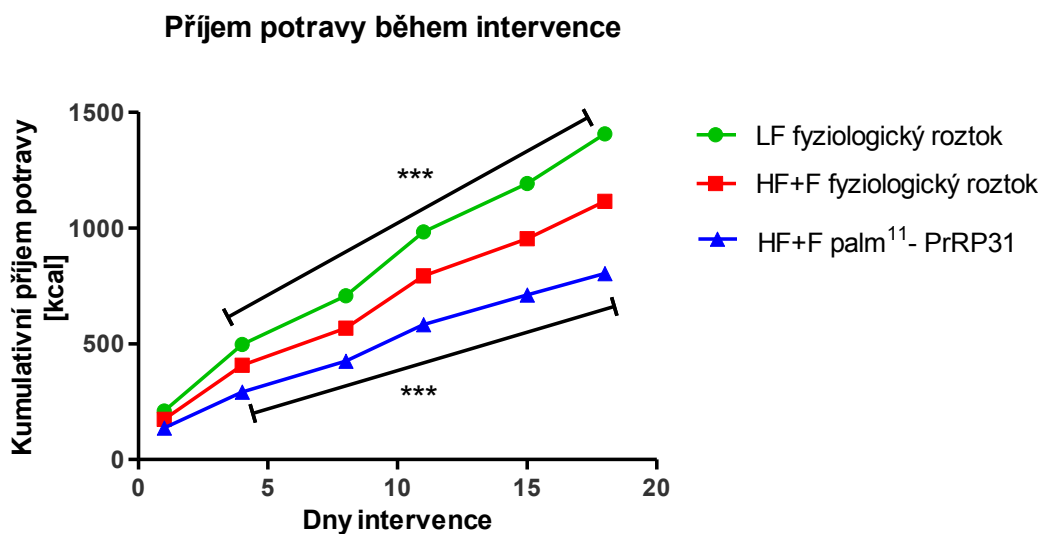
Obrázek 6 pak představuje změnu hmotnosti během doby třítydenních intervencí. Zde je vidět, že obě skupiny kontrol v tomto období dále přibývaly na hmotnosti, přičemž na konci experimentu dosáhly obézní kontroly (zvířata krmená vysokotukovou dietou) hmotnosti vyšší než kontroly štíhlé (zvířata krmená standardní dietou). Naopak skupina zvířat, které byl podáván palm<sup>11</sup>-PrRP31 na hmotnosti ubyla. Na konci experimentu dosáhla tato skupina signifikantně nižší hmotnosti vzhledem k obézním kontrolám.

Z výše uvedeného vyplývá, že podávání palm<sup>11</sup>-PrRP31 experimentálním zvířatům zapříčinilo snížení příjmu potravy a tedy i úbytek tělesné hmotnosti. Tento efekt byl pozorován v předchozích studiích [36,38].



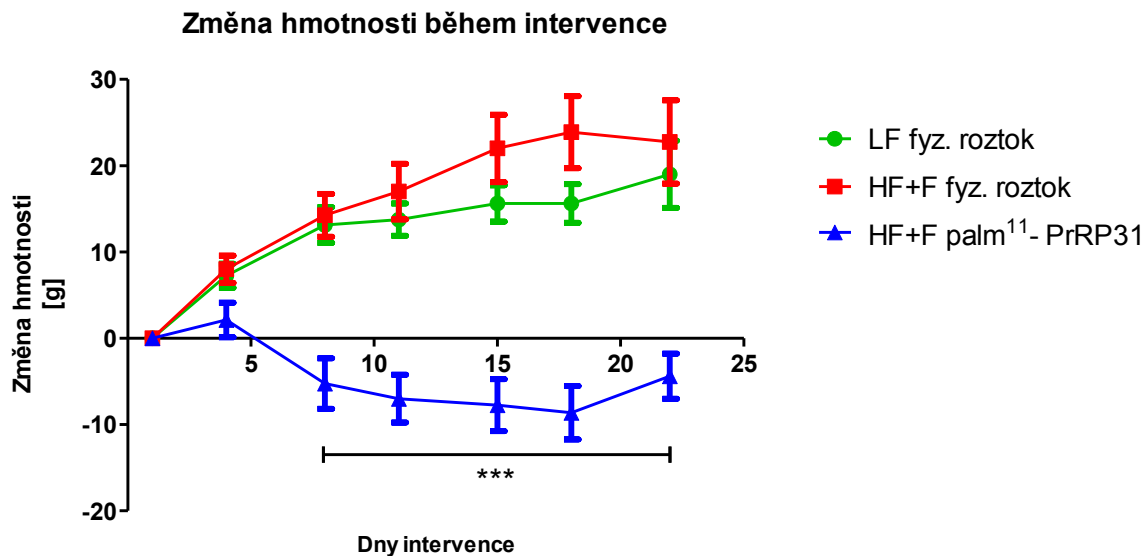
**Obrázek 4** Hmotnosti experimentálních zvířat na standardní a vysokotukové dietě před intervencemi (n=8 skupina LF a n=16 skupina HF + F)

Statistika byla prováděna pomocí metody Two-way ANOVA s následným Bonferroniho testem. Signifikance \*\*\* $P < 0,001$  vzhledem ke kontrolní skupině LF.



**Obrázek 5** Příjem potravy experimentálních zvířat během doby intervence (skupina n=8 potkanů)

Data jsou průměr  $\pm$  SEM, n = 8 potkanů. Statistika byla prováděna pomocí metody Two-way ANOVA s následným Bonferroniho testem. Signifikance \*\*\*  $P < 0,001$  vzhledem ke skupině kontrolní skupině HF + F.



**Obrázek 6** Změna hmotnosti experimentálních zvířat během doby intervence (skupina  $n=8$  potkanů)

Data jsou průměr  $\pm$  SEM,  $n = 8$  potkanů. Statistika byla prováděna pomocí metody Two-way ANOVA. Signifikance \*\*\*  $P < 0,001$  vzhledem ke kontrolní skupině HF + F.



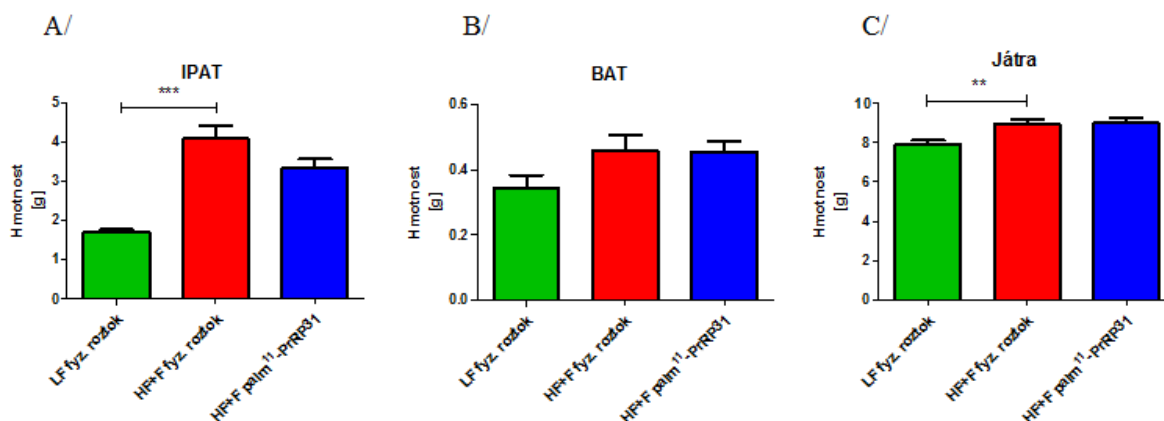
## 4.2 Hmotnost odebraných orgánů

Experimentální zvířatům byl na konci pokusu odebrán intraperitoneální tuk, hnědý tuk a játra. Hmotnosti orgánů jsou vyneseny v grafech A – C na Obrázku 7.

Z grafu A na Obrázku 7 je vidět signifikantní rozdíl množství intraperitoneálního tuku (IPAT; *intraperitoneal adipose tissue*) mezi štíhlými kontrolami na standardní dietě a obézními kontrolami na dietě s vysokým obsahem tuku. Následná intervence palm<sup>11</sup>-PrRP31 měla za následek nesignifikantní pokles hmotnosti břišního tuku u obézních zvířat. Při porovnání s Obrázkem 6 je patrná korelace tělesné hmotnosti a množství intraperitoneálního tuku.

Co se týče hnědého tuku (BAT; *brown adipose tissue*), i zde došlo u zvířat krmených dietou se zvýšeným obsahem tuku k nárůstu jeho hmotnosti oproti potkanům krmeným standardní dietou. Tento nárůst již ale není signifikantní. Zde po intervenci palm<sup>11</sup>-PrRP31 nedošlo k žádné změně hmotnosti oproti obézním kontrolám (viz graf B na Obrázku 7).

V grafu C na Obrázku 7 je patrné signifikantní zvýšení hmotnosti jater u obézních kontrol oproti kontrolám štíhlým. Lze tedy říci, že HF + F dieta měla negativní dopad i na stav jater, ve kterých se ve větší míře začal ukládat tuk (počínající steatosa). Ani zde nedošlo po podávání palm<sup>11</sup>-PrRP31 obézním potkanům k snížení hmotnosti jater.



**Obrázek 7** Grafy znázorňující hmotnosti odebraných orgánů

Data jsou průměr ± SEM, n = 8 potkanů. Statistika byla prováděna pomocí metody Studentova t-testu. Signifikance je \*\*P<0,01 a \*\*\*P<0,001.

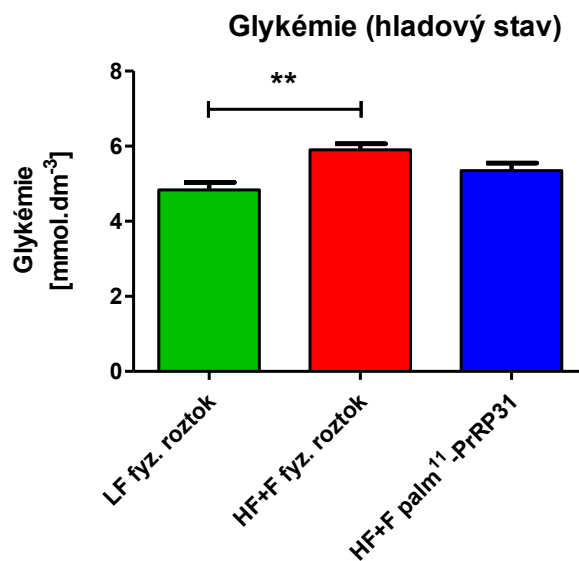
### 4.3 Orální glukózový toleranční test (OGTT)

V den konce pokusu byla hladovým potkanům, změřena bazální hladina glukózy v krvi. Poté jim byl podán roztok glukózy (2 g/kg) a v daných časových intervalech byla měřena glykémie.

Hodnoty glykémie před zahájením OGTT jsou zaznamenány v grafu na Obrázku 8. Obézní kontroly měly hladiny počáteční glykémie oproti těm štíhlým signifikantně zvýšené. U zvířat injikovaných palm<sup>11</sup>-PrRP31 došlo k viditelnému, ale nesignifikantnímu snížení hladiny glukózy v krvi.

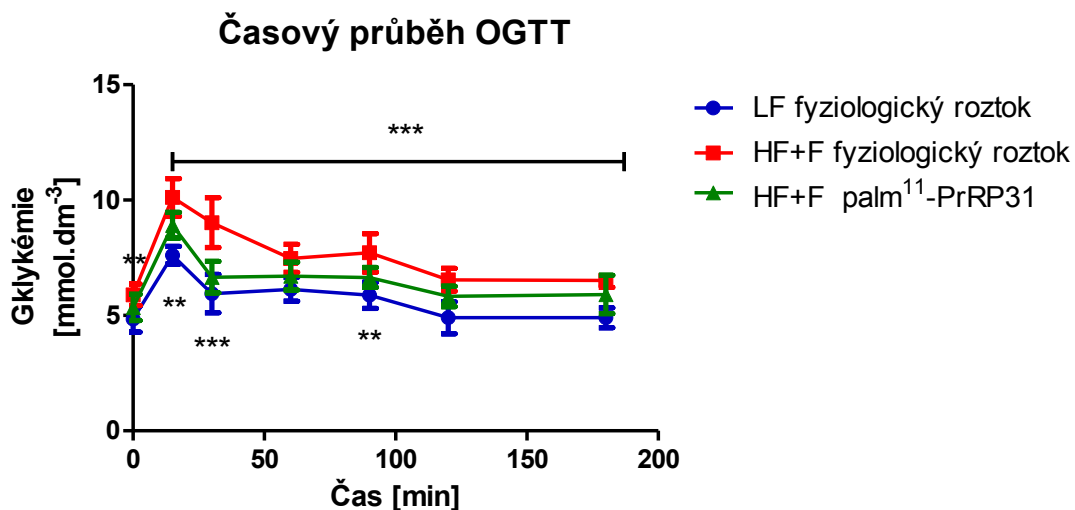
Jednotlivé zaznamenané hodnoty jsou vyneseny v grafu na Obrázku 9. Je zde jasné vidět počáteční zvýšení plazmatického hodnoty glukózy a opětovný návrat do standardních hodnot. Na nejvyšší hodnoty vystoupala glykémie u neléčených zvířat na vysokotukové dietě. Stejně tak lze vidět, že pokles hladiny glukózy byl u této skupiny pomalejší než u zbývajících dvou skupin a konečná glykémie (po třech hodinách od podání glukózy) se ustálila opět na nejvyšší hodnotě ze všech tří sledovaných skupin.

Poslední graf vztahující se k OGTT (Obrázek 10) představuje vynesení plochy pod křivkou grafu (AUC; *area under curve*) na Obrázku 9. Zde lze vidět nejprve signifikantní zvýšení hladiny glykémie u potkanů na HF + F dietě oproti těm na LF dietě. U skupiny léčené palm<sup>11</sup>-PrRP31 je vidět signifikantní snížení vzhledem k obézním kontrolám. Pozitivní vliv palm<sup>11</sup>-PrRP31 na glukózovou toleranci byl již pozorován v předchozích studiích u potkaních modelů obesity nebo prediabetu [38].



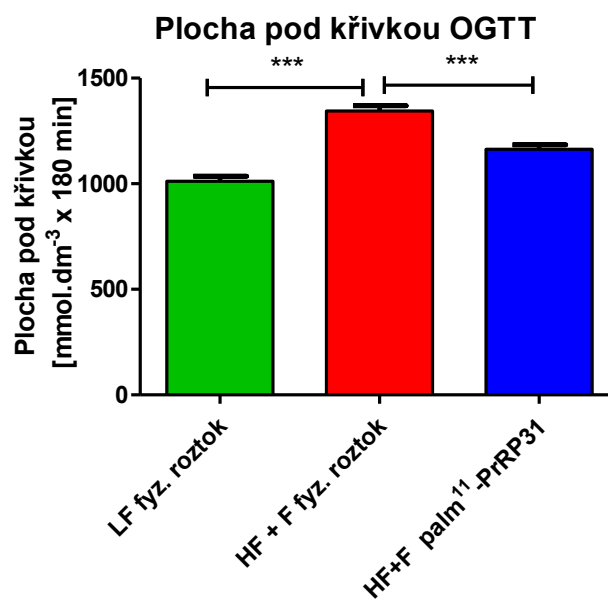
**Obrázek 8** Hodnoty glykémie hladových potkanů před zahájením OGTT

Data jsou průměr ± SEM, n = 8 potkanů. Statistika byla prováděna pomocí metody Studentova t-testu. Signifikance je \*\*P<0,01.



**Obrázek 9** Graf znázorňující hodnoty glykémie v průběhu OGTT

Data jsou průměr ± SEM, n = 8 potkanů. Statistika byla prováděna pomocí metody Two-way ANOVA s následným Bonferroniho testem. Signifikance je \*\*P<0,01 a \*\*\*P<0,001 vzhledem ke skupině kontrolní skupině HF + F.



**Obrázek 10** Plochy pod křivkami průběhu OGTT

Data jsou průměr  $\pm$  SEM,  $n = 8$  potkanů. Statistika byla prováděna pomocí metody Studentova t-testu. Signifikance je  $*P < 0,05$ .

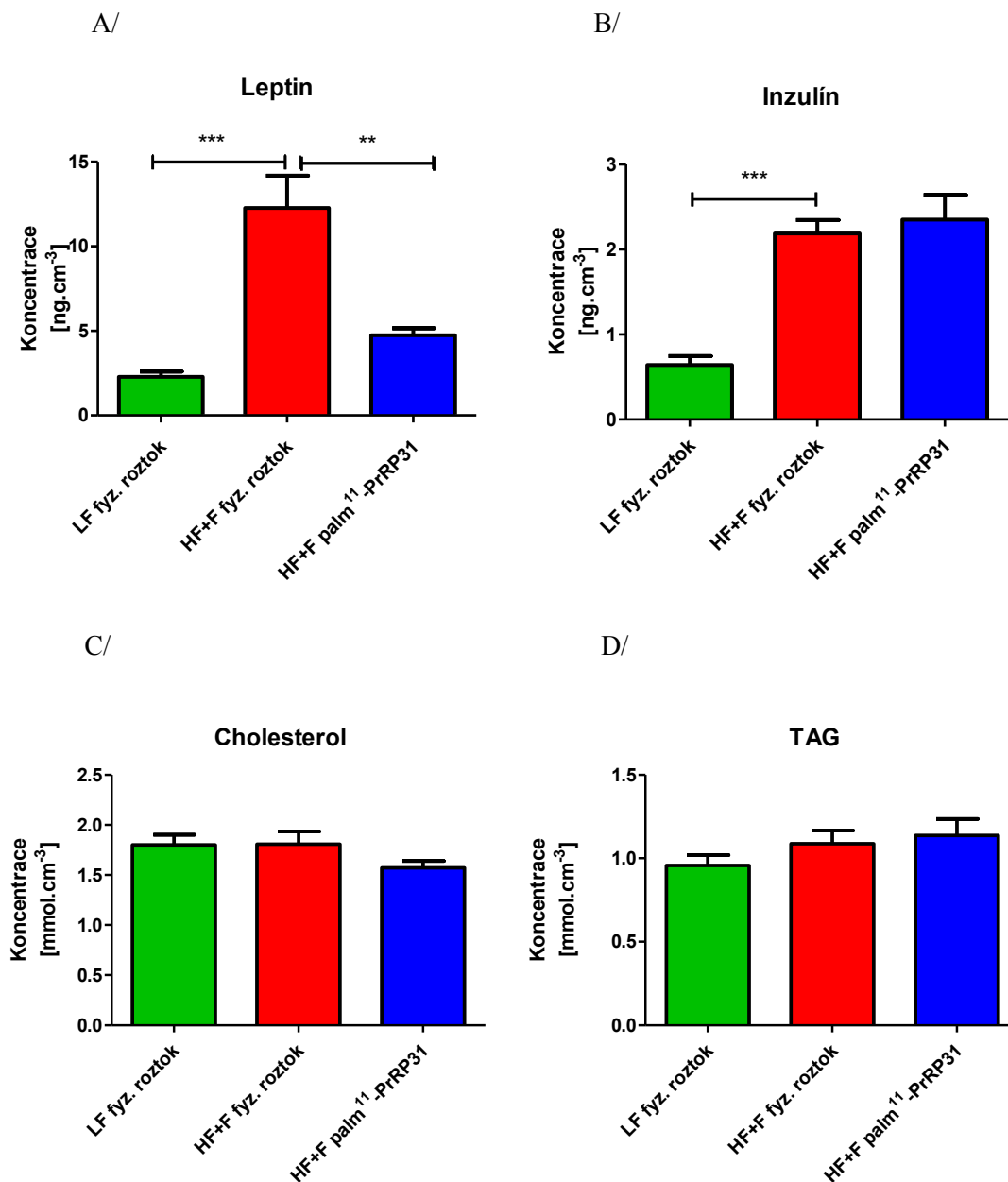
#### 4.4 Metabolické parametry

U experimentálních potkanů byly změřeny základní metabolické parametry v plazmě.

Obézní kontroly měly oproti štíhlým kontrolám velmi vysokou hladinu leptinu v plazmě. Tyto signifikantní rozdíly jsou patrné v grafu A na Obrázku 11. Skupina léčená palm<sup>11</sup>-PrRP31 měla naopak oproti obézním kontrolám hladinu leptinu v plazmě signifikantně sníženou. Data v tomto grafu korelují s hmotností intraperitoneálního tuku zvířat (Obrázek 11, graf A).

Dalším měřeným parametrem byla plazmatická hodnota inzulínu (viz graf B Obrázek 11). I v tomto případě měli oproti potkanům na standardní dietě potkani na vysokotukové dietě tento parametr signifikantně zvýšený. U skupiny léčené palm<sup>11</sup>PrRP se hladina inzulínu signifikantně nelišila. Porovnání zvýšené plazmatické hladiny inzulínu u potkanů na HF + F dietě a zhoršené glukózové toleranci vzhledem k potkanům na LF dietě (viz Obrázky 8 – 10) indikuje vznik inzulínové rezistence.

U hladin cholesterolu ani triglyceridů v plazmě nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly mezi kontrolními skupinami ani v porovnání se skupinou léčenou palm<sup>11</sup>PrRP (viz grafy C a D na Obrázku 11). Za pozitivní zjištění lze považovat trend snížení hodnoty cholesterolu u potkanů, kterým byl podáván palm<sup>11</sup>-PrRP31 oproti štíhlým i obézním kontrolám (viz Obrázek 11, graf D).



**Obrázek 11** Grafy s hodnotami metabolických parametrů v plazmě experimentálních potkanů

Data jsou průměr ± SEM, n = 8 potkanů. Statistika byla prováděna pomocí metody Studentova t-testu. Signifikance je \*\*P<0,01 a \*\*\*P<0,001.

#### 4.5 Imunodetekce signalizačních kaskád v hypothalamech potkanů

V hypothalamech experimentálních potkanů byly pomocí metody Western blot a imunodetekce specifických protilátek detekovány kinasy vnitrobuněčných signalizačních kaskád v hypothalamu. V Tabulce 4 jsou ukázány Western bloty těchto proteinů. Na Obrázku 12 a 13 jsou pak tyto hodnoty kvantifikovány (hodnoty jsou uvedeny jako poměr fosforylovaného a celkového proteinu, obě formy vztaženy na  $\beta$ -aktin).

Celkový inzulinový receptor byl stanoven protilátkou proti podjednotce  $\beta$ . Zde nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl jak mezi kontrolami, tak ani mezi obézními potkany a potkany léčenými palm<sup>11</sup>-PrRP31 (viz Obrázek 12, graf A).

Míra fosforylace PI3K i PDK po nasazení vysokotukové diety signifikantně klesla (vzhledem ke skupině potkanů na standardní dietě) a po intervenci palm<sup>11</sup>-PrRP31 nedošlo k signifikantní změně vzhledem k potkanům na HF + F dietě. (viz Obrázek 12, grafy B a C). U detekce PI3K bylo nanesené množství proteinu vztaženo na GAPDH z důvodu dosažení konzistentnějšího výsledku oproti použití  $\beta$ -aktinu.

Dále byly detekovány dva fosforylované epitopy proteinu Akt, přiložen je i graf kvantifikace celkového Aktu (viz Obrázek 12, graf D). Na grafech E a F na Obrázku 12 je patrný stejný trend. Oproti skupině zvířat na standardní dietě byla fosforylace obou epitopů kinasy nesignifikantně zvýšená jak u potkanů na vysokotukové dietě, tak i u skupiny, které byl podáván palm<sup>11</sup>-PrRP31.

Na grafu B a C (Obrázek 13) je kvantifikována míra fosforylace proteinu ERK a JNK. Oproti štíhlým kontrolám došlo u kontrol obézních ke snížení aktivity těchto kinas. Skupina potkanů léčená palm<sup>11</sup>-PrRP31 nevykázala oproti obézním kontrolám ve fosforylaci rozdíl. Pouze u kinasy JNK je vzhledem k potkanům na HF + F dietě u potkanů léčených palm<sup>11</sup>-PrRP31 patrný trend zvýšení fosforylace.

Detekce fosforylované i nefosforylované formy c-Jun neukázala žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami (graf D, Obrázek 13).

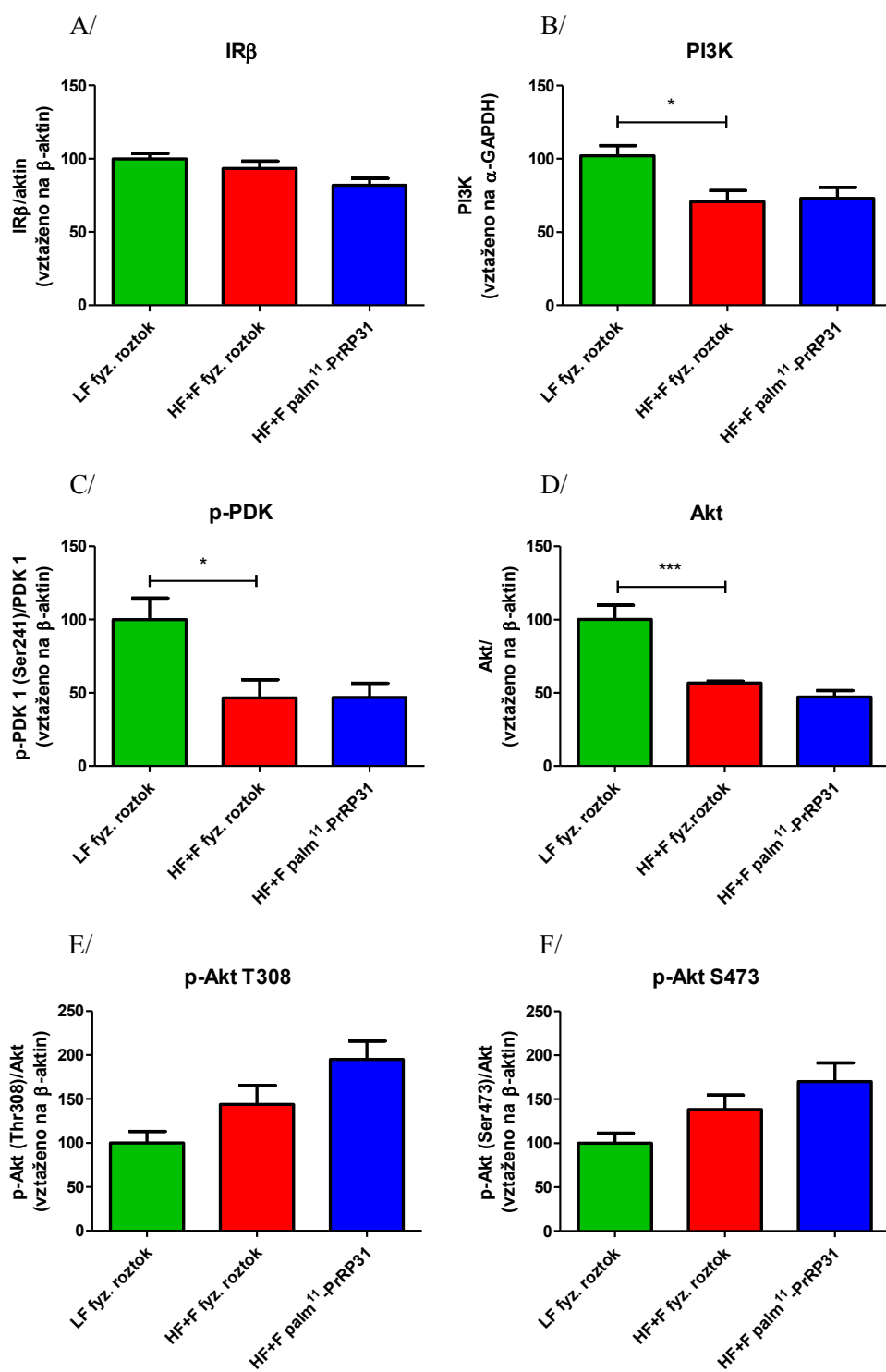
Tyto výsledky ukazují, že u řady kinas došlo k poklesu fosforylace v důsledku nasazení vysokotukové diety vzhledem ke skupině potkanů na dietě standardní. Signifikantní změny v signalizačních kaskádách v hypothalamu naznačující jejich aktivaci nebyly po intervenci palm<sup>11</sup>-PrRP31 v této studii detekovány tak jako tomu bylo v experimentech s obézními hypertenzními Koletského potkany [38] a DIO myši

[48], kde byly také sledovány fosforylace proteinů jako např. IR $\beta$ , PI3K a ERK. V těchto experimentech došlo po intervenci palm<sup>11</sup>-PrRP31 k statistickému zvýšení fosforylace sledovaných proteinů vzhledem k obézním kontrolám. Důvodem, který zpříčinil nesignifikantní výsledky v této studii oproti výše zmíněným experimentům, je pravděpodobně příliš krátká doba intervence.



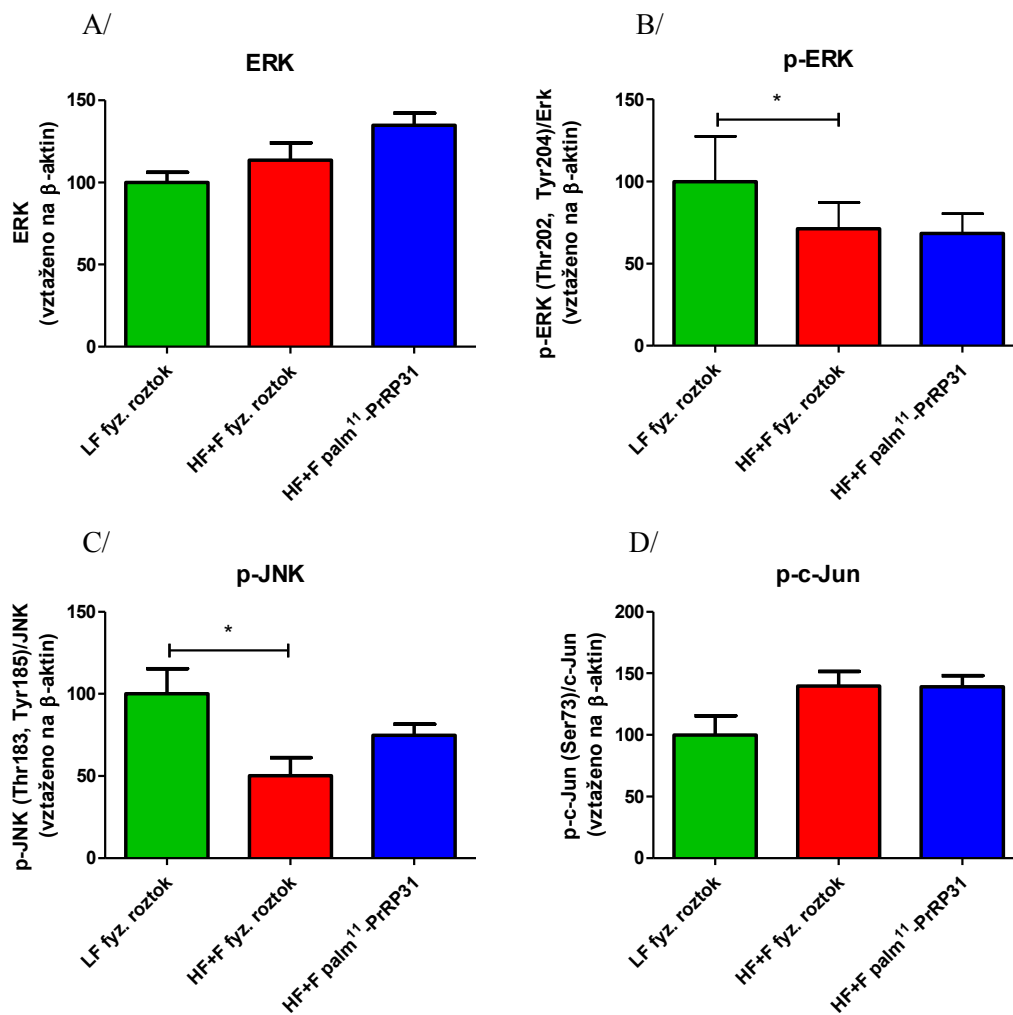
**Tabulka 4** Western bloty fosforylace proteinů účastnících se vnitrobuněčné signalizace v hypothalamech WKY potkanů léčených palm<sup>11</sup>-PrRP31 a jejich štíhlých a obézních kontrol (n=8 potkanů)

Protein	Kontroly na LF dietě	Kontroly na HF+F dietě	Skupina léčená palm <sup>11</sup> -PrRP31	Molekulová hmotnost [kDa]
IRβ				95
PI3K				85
PDK 1				58-68
p-PDK 1				58-68
celkový Akt				60
p-Akt T308				60
p-Akt S473				60
ERK				42,44
p-ERK				42,44
JNK				46,54
p-JNK				46,54
c-Jun				43,48
p-c-Jun				43,48



**Obrázek 12** Grafy proteinů inzulinové signalizační kaskády

Data jsou průměr ± SEM, n = 8 potkanů. Statistika byla prováděna pomocí metody Studentova t-testu. Signifikance je \* P<0,05 a \*\*\*P<0,001.



**Obrázek 13** Grafy proteinů kinas účastnících se vnitrobuněčné signalizace  
 Data jsou průměr  $\pm$  SEM, n = 8 potkanů. Statistika byla prováděna pomocí metody Studentova t-testu. Signifikance je \*P<0,05.

## 5 ZÁVĚR

Samci potkaního kmene Wistar Kyoto měli po nasazení diety s vysokým obsahem tuku po 3,5 měsících signifikantně vyšší hmotnost oproti potkanům krmným standardní stravou. Po intervenci palm<sup>11</sup>-PrRP31 po 21 dní (1x denně dávka 5 mg/kg) experimentálním zvířatům došlo u injikované skupiny ke snížení příjmu potravy a signifikantnímu úbytku hmotnosti vzhledem k potkanům na HF dietě.

Na konci experimentu byl zvířatům odebrán intraperitoneální tuk, hnědý tuk a játra. Statisticky významné rozdíly byly pozorovány u intraperitoneálního tuku, a sice signifikantní snížení u léčené skupiny vzhledem k obézním kontrolám na HF dietě. S hodnotami hmotnosti intraperitoneálního tuku zvířat korelovala plazmatická hladina leptinu, která byla signifikantně vyšší u obézních kontrol vzhledem ke kontrolám štíhlým a u skupiny injikované palm<sup>11</sup>-PrRP31 pak signifikantně nižší oproti obézním kontrolám.

V den konce pokusu byl na experimentálních potkanech proveden orální glukózový toleranční test. Vysokotuková dieta zapříčinila signifikantní zvýšení glykémie (u hladových zvířat) a došlo i zhoršení samotné glukózové tolerance (vznik prediabetu). Bylo pozorováno statistické významné zlepšení glukózové tolerance u skupiny injikované palm<sup>11</sup>-PrRP31 (vzhledem k obézním kontrolám).

Metabolické parametry měřené v plazmě poukázaly na možný vznik inzulinové rezistence (obézní kontroly měly signifikantně zvýšenou plazmatickou hladinu inzulinu vzhledem ke kontrolám krmným standardní stravou) a steatosy jater u obézních kontrol (vzhledem ke kontrolám na LF dietě).

U skupiny obézních kontrol byly nalezeny snížené fosforylace kinas (PI3K, PDK 1, ERK, JNK) vzhledem ke štíhlým kontrolám na LF dietě. Statisticky významné změny, naznačující aktivaci signalizačních kaskád po intervenci palm<sup>11</sup>-PrRP31, nebyly nalezeny. Důvodem je pravděpodobně příliš krátká doba intervence.

SEZNAM REFERENCÍ

- 1 Khan LK, Bowman BA. Obesity: a major global public health problem. *AnnuRevNutr* 1999; **19**: xiii-xvii
- 2 Aizawa T, Helble M. Socioeconomic inequality in excessive body weight in Indonesia. *Econ Hum Biol* 2017; **27**: 315-327
- 3 WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2000; **894**: 1-253
- 4 Gajda AM, Pellizzon MA, D P, *et al.* Diet-induced metabolic syndrome in rodent models. *Strain* 2007
- 5 Vaněčková I, Maletínská L, Behuliak M, *et al.* Obesity-related hypertension: Possible pathophysiological mechanisms. *J Endocrinol* 2014; **223**: R63-R78
- 6 Kuneš J, Pražienková V, Popelová A, *et al.* Prolactin-releasing peptide: A new tool for obesity treatment. *J Endocrinol* 2016; **230**: R51-R58
- 7 Bray GA, Ryan DH. Update on obesity pharmacotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 2014; **1311**: 1-13
- 8 Patel D. Pharmacotherapy for the management of obesity. *Metabolism* 2015; **64**: 1376-1385
- 9 Mikulášková B, Maletínská L, Zicha J, *et al.* The role of food intake regulating peptides in cardiovascular regulation. *Mol Cell Endocrinol* 2016; **436**: 78-92
- 10 Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity - A review. *Neuropeptides* 2006; **40**: 375-401
- 11 Harrold JA, Dovey TM, Blundell JE, *et al.* CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology* 2012; **63**: 3-17
- 12 Yu JH, Kim M-S. Molecular Mechanisms of Appetite Regulation. *Diabetes Metab J* 2012; **36**: 391-398
- 13 Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, *et al.* Leptin: A review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes* 2002; **26**: 1407-1433
- 14 Grill HJ, Schwartz MW, Kaplan JM, *et al.* Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology* 2002; **143**: 239-246
- 15 Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 2002; **967**: 379-388
- 16 Maffei M, Halaas J, Ravussin E, *et al.* Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995; **1**: 1155-1161
- 17 de Git KCG, Adan RAH. Leptin resistance in diet-induced obesity: The role of hypothalamic inflammation. *Obes Rev* 2015; **16**: 207-224
- 18 Marathe CS, Rayner CK, Jones KL, *et al.* Glucagon-like peptides 1 and 2 in health and disease: A review. *Peptides* 2013; **44**: 75-86

- 19 Gardiner SM, March JE, Kemp PA, *et al.* Possible involvement of GLP-1(9-36) in the regional haemodynamic effects of GLP-1(7-36) in conscious rats. *Br J Pharmacol* 2010; **161**: 92-102
- 20 Small CJ, Bloom SR. Gut hormones as peripheral anti obesity targets. *CurrDrug TargetsCNSNeurolDisord* 2004; **3**: 379-388
- 21 Kanoski SE, Fortin SM, Arnold M, *et al.* Peripheral and central GLP-1 receptor populations mediate the anorectic effects of peripherally administered GLP-1 receptor agonists, liraglutide and exendin-4. *Endocrinology* 2011; **152**: 3103-3112
- 22 Cariou B. Harnessing the incretin system beyond glucose control: Potential cardiovascular benefits of GLP-1 receptor agonists in type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2012; **38**: 298-308
- 23 Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 2006; **444**: 854-859
- 24 Washington MC, Williams K, Sayegh AI. The feeding responses evoked by endogenous cholecystokinin are regulated by different gastrointestinal sites. *Horm Behav* 2016; **78**: 79-85
- 25 Pathak V, Flatt PR, Irwin N. Cholecystokinin (CCK) and related adjunct peptide therapies for the treatment of obesity and type 2 diabetes. *Peptides* 2018; **100**: 229-235
- 26 Crespo CS, Cachero AP, Jiménez LP, *et al.* Peptides and food intake. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2014; **5**
- 27 Nass R, Gaylinn BD, Thorner MO. The role of ghrelin in GH secretion and GH disorders. *Mol Cell Endocrinol* 2011; **340**: 10-14
- 28 Hidekitamura JK, Shimizu T, Ishii S, *et al.* Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* 2000; **141**: 4797-4800
- 29 Holubová M, Špolcová A, Demianová Z, *et al.* Ghrelin agonist JMV 1843 increases food intake, body weight and expression of orexigenic neuropeptides in mice. *Physiol Res* 2013; **62**: 435-444
- 30 Hinuma S, Habata Y, Fujii R, *et al.* A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 1998; **393**: 272-276
- 31 Taylor MM, Samson WK. The prolactin releasing peptides: RF-amide peptides. *Cell Mol Life Sci* 2001; **58**: 1206-1215
- 32 Lawrence CB, Celsi F, Brennand J, *et al.* Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake. *Nat Neurosci* 2000; **3**: 645-646
- 33 Ellacott KLJ, Lawrence CB, Rothwell NJ, *et al.* PRL-releasing peptide interacts with leptin to reduce food intake and body weight. *Endocrinology* 2002; **143**: 368-374
- 34 Malavolta L, Cabral FR. Peptides: Important tools for the treatment of central nervous system disorders. *Neuropeptides* 2011; **45**: 309-316

- 35 Witt KA, Gillespie TJ, Huber JD, *et al.* Peptide drug modifications to enhance bioavailability and blood-brain barrier permeability. *Peptides* 2001; **22**: 2329-2343
- 36 Maletínská L, Nagelová V, Tichá A, *et al.* Novel lipidized analogs of prolactin-releasing peptide have prolonged half-lives and exert anti-obesity effects after peripheral administration. *Int J Obes* 2015; **39**: 986-993
- 37 Pražienková V, Holubová M, Pelantová H, *et al.* Impact of novel palmitoylated prolactin-releasing peptide analogs on metabolic changes in mice with diet-induced obesity. *PLoS One* 2017; **12**
- 38 Mikulášková B, Holubová M, Pražienková V, *et al.* Lipidized prolactin-releasing peptide improved glucose tolerance in metabolic syndrome: Koletsky and spontaneously hypertensive rat study. *Nutr Diabetes* 2018; **8**
- 39 Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol* 2012
- 40 Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 1950; **41**: 315-317
- 41 Pellemounter M, Cullen M, Baker M, *et al.* Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science (80- )* 1995; **269**: 540-543
- 42 Coleman DL. Obese and diabetes: Two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 1978; **14**: 141-148
- 43 Bray GA. The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc* 1977; **36**: 148-153
- 44 Heim MH. The Jak-Stat Pathway: Cytokine Signalling from the Receptor to the Nucleus. *J Recept Signal Transduct* 1999; **19**: 75-120
- 45 Kwon O, Kim KW, Kim MS. Leptin signalling pathways in hypothalamic neurons. *Cell Mol Life Sci* 2016; **73**: 1457-1477
- 46 Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; **414**: 799-806
- 47 Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 2002; **45**: 1475-1483
- 48 Holubová M, Zemenová J, Mikulášková B, *et al.* Palmitoylated PrRP analog decreases body weight in DIO rats but not in ZDF rats. *J Endocrinol* 2016; **229**: 85-96