

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta
Obor: Biochemie a patobiochemie



Mgr. Jana Maixnerová

**Nové farmakologické intervence ovlivňující příjem potravy se zaměřením
na anorexigenní neuropeptidy: peptid CART (cocaine-and amphetamine-
regulated transcript) a peptid uvolňující prolaktin (PrRP)**

**New pharmacological interventions influencing food intake focused on
effects of CART (cocaine-and amphetamine-regulated transcript) peptide
and prolactin-releasing peptide**

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

Datum obhájení práce:

Praha 2010

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Současně dávám svolení k tomu, aby tato závěrečná práce byla archivována v Ústavu vědeckých informací 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze a zde užívána ke studijním účelům. Za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou přednáškovou nebo publikační aktivitu, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v Digitálním depozitáři Univerzity Karlovy v Praze (<http://repozitar.cuni.cz>). Práce je zpřístupněna pouze v rámci Univerzity Karlovy v Praze.

Souhlasím – Nesouhlasím*

V Praze 22.07.2010

JANA MAIXNEROVÁ

Podpis

* Nehodící se škrtněte

IDENTIFIKAČNÍ ZÁZNAM:

MAIXNEROVÁ Jana: Nové farmakologické intervence ovlivňující příjem potravy se zaměřením na anorexigenní neuropeptidy: peptid CART (cocaine-and amphetamine-regulated transcript) a peptid uvolňující prolaktin (PrRP); [New pharmacological interventions influencing food intake focused on effects of CART (cocaine-and amphetamine-regulated transcript) peptide and prolactin-releasing peptide]. Praha 2010. 127 s., 4 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, lékařská fakulta, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.. Vedoucí práce RNDr. Lenka Maletínská, CSc.

ABSTRAKT

Disertační práce je zaměřena na charakterizaci biologické aktivity dvou nedávno objevených anorexigenních neuropeptidů: peptidu CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) a peptidu uvolňujícího prolaktin (PrRP).

Strukturně-aktivitní studie fragmentů reprezentujících různé části CART(61-102) charakterizovala jak jejich vazbu k feochromocytomálním buňkám PC12, tak jejich schopnost ovlivnit příjem potravy. Výsledky ukázaly, že pro uchování biologické aktivity peptidu CART je nezbytná kompaktní struktura obsahující disulfidické můstky.

V druhé části práce byl prokázán synergistický účinek periferně podaného cholecystokininu (CCK) a centrálně podaného peptidu CART na příjem potravy u hladových myší. Anorexigenní účinek peptidu CART byl zvýšen podprahovou dávkou CCK, zatímco antagonist receptoru CCK₁ účinek blokoval.

Ve třetí části práce byl testován příjem potravy po simultánním podání orexigenního neuropeptidu Y s peptidem CART nebo CCK jak u štíhlých myší, tak u myší obézních po působení glutamát sodným (MSG). U obézních MSG myší s lézemi v nucleu arcuatu bylo prokázáno, že anorexigenní účinek centrálně podaného peptidu CART zůstává zachován, zatímco periferně podaný CCK u těchto myší na příjem potravy nepůsobí z důvodu nefunkční signalizace leptinu.

V závěrečné části byla ve třech hypofyzárních buněčných liniích: potkaních buňkách GH3 a RC-4B/C a myších AtT-20 prokázána přítomnost receptoru pro PrRP a specifická vazba PrRP k těmto receptorům vykazovala K_d v nM oblasti. Zejména vhodná pro studium biologické aktivity PrRP31 a jeho zkrácených analogů se ukázala potkaní buněčná linie RC-4B/C.

Klíčová slova: peptid CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript), peptid uvolňující prolaktin (PrRP), cholecystokinin (CCK), obezita, analogy

ABSTRACT

The thesis was focused on characterization of biological activities of two recently discovered anorexigenic neuropeptides: CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and prolactin-releasing peptide (PrRP).

In order to find a pharmacophore of CART peptide, shorter fragments of CART(61-102) peptide were tested for binding to PC12 cells and inhibition of food intake in fasted mice. The results showed that a compact structure of CART peptide containing three disulphide bridges is necessary for preservation of its full biological activity.

In the second part of the thesis, synergistic and long-lasting effect of centrally administered peptide CART and peripherally administered cholecystokinin (CCK) is described. In fasted C57BL/6 mice, the anorexigenic effect of CART was enhanced by a subthreshold dose of CCK, while CCK₁ receptor antagonist devazepide blocked the effect of CART peptide on food intake.

In the third part of the thesis, food intake in fed lean and MSG (monosodium-glutamate treated) obese male mice with lesions in nucleus arcuatus (ARC) was followed. Anorexigenic action of CART peptide was preserved but satiety effect of CCK was completely lost in MSG obese mice and therefore, effective leptin signaling in ARC is necessary for satiety effect of CCK.

Finally, the PrRP receptor was detected in three rodent tumor pituitary cell lines: rat GH3, mouse AtT-20, and rat RC-4B/C cells both with specific antibody and saturation binding of radioiodinated PrRP31 to intact cells. Biological effects of PrRP31 and its shorter analogs were demonstrated in RC-4B/C cells.

Key words: CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide, prolactin-releasing peptide (PrRP), cholecystokinin (CCK), obesity, analogs

PODĚKOVÁNÍ

Úvodem bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Lence Maletínské, CSc. za skvělé vedení během mého studia, za cenné rady, připomínky a komentáře k mé práci. Dále děkuji svému partnerovi Jindrovi a svým rodičům za jejich podporu a trpělivost při mých studiích, bez nich by tato práce nemohla vzniknout.

Dále bych ráda poděkovala dalším milým spolupracovníkům z našeho ústavu, kteří mi v průběhu práce pomáhali: Ing. Blance Železné, CSc., Mgr. Miloslavu Šandovi za měření hmotnostních spekter, Ing. Miroslavě Blechové za syntézu peptidů, Doc. RNDr. Tomáši Elbertovi, CSc. za jodaci peptidů. Děkuji za spolupráci při podání látek do mozku RNDr. Renatě Haugvicové, CSc. (Chambon a.s.) a za provedení imunohistochemických experimentů Zdenovi Pirníkovi PhD a RNDr. Alexandrovi Kissovi, DrSc. (Ústav experimentální endokrinologie, SAV, Bratislava) a RNDr. Evě Šloncové za cenné rady s buněčnými kulturami (Ústav molekulární genetiky AV ČR v.v.i.).

V neposlední řadě bych ráda poděkovala naší skupině v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v.v.i. a Dr. Jiřímu Jiráčkovi za vytvoření přátelského prostředí, ochotu pomoci a všestrannou podporu.

Tato práce byla provedena v rámci výzkumného záměru AV ČR Z40550506 a byla podporována granty GA ČR 303/05/0614, 305/060427 a P303/10/1368.

OBSAH	
PODĚKOVÁNÍ	6
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	12
1. ÚVOD	14
1.1. Obezita	14
1.1.1. Příčiny vzniku obezity	16
1.1.2. Nemoci spojené s obezitou	17
1.2. Regulace příjmu potravy	17
1.2.1. Centrální regulace příjmu potravy	17
1.2.2. Periferní regulace příjmu potravy	20
1.3. Dlouhodobé a krátkodobé působení peptidů ovlivňujících příjem potravy	22
1.3.1. Peptidy dlouhodobě působící	23
1.3.1.1. Leptin	23
1.3.1.2. Inzulín	26
1.3.1.3. Ghrelin	26
1.3.2. Peptidy krátkodobě působící	27
1.3.2.1. Cholecystokinin (CCK)	27
1.3.2.2. Neuropeptid Y (NPY)	28
1.4. Peptid CART (Cocaine- and amphetamine-regulated transcript)	30
1.4.1. Objev a výskyt	30
1.4.2. Struktura	30
1.4.3. Fyziologická úloha peptidu CART	32
1.4.3.1. Vliv peptidu CART a dalších látek na příjem potravy a jejich vzájemný vztah	32
1.4.3.2. Další účinky peptidu CART	34
1.4.4. Receptor pro peptidy CART a buněčná signalizace	34
1.4.5. Fragmenty peptidu CART	37
1.5. Peptid uvolňující prolaktin (PrRP)	37
1.5.1. Objev a výskyt PrRP a receptor pro PrRP	37
1.5.2. Struktura	38
1.5.3. Fyziologická úloha PrRP	38
1.5.3.1. Vliv PrRP na regulaci příjmu potravy	40
1.5.4. PrRP a buněčná signalizace	40

1.5.5. Myši s vyřazeným genem pro PrRP či GPR10	41
1.5.6. PrRP a reakce na stres a bolest	42
1.5.7. Analogy PrRP	43
1.6. Modely myši obezity	43
1.6.1. Obezita vyvolaná glutamátem sodným (MSG)	43
1.7. Buněčné linie	44
1.7.1. Feochromocytální buňky PC12	44
1.7.2. Hypofyzární buněčné linie (RC-4B/C, GH3 a AtT-20)	44
1.7.2.1. RC-4B/C	44
1.7.2.2. GH3	45
1.7.2.3. AtT-20	45
1.8. Vazebné experimenty	46
1.8.1. Teorie vazebných experimentů	46
1.8.2. Specifická, nespecifická a totální vazba	46
1.8.3. Saturační vazebné experimenty	47
1.8.4. Kompetitivní vazebné experimenty	47
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	48
3. MATERIÁL	49
4. METODY	51
4.1. Peptidy CART a jejich fragmenty a peptidy PrRP	51
4.1.1. Jodace peptidu CART(61-102) a PrRP31	51
4.2. Pěstování buněčných linií	52
4.2.1. Pěstování buněčných linií RC-4B/C, GH3 a AtT-20	52
4.2.2. Pěstování buněčné linie PC12	53
4.3. Izolace membrán z nediferencovaných buněk PC12	53
4.3.1. Stanovení množství bílkovin	53
4.4. Provedení vazebných experimentů	54
4.4.1. Optimalizace podmínek vazebných experimentů	54
4.4.2. Kompetitivní vazebné experimenty	54

4.4.2.1. Kompetitivní vazba peptidu CART(61-102) na buněčné membrány z nediferencovaných buněk PC12	54
4.4.2.2. Kompetitivní vazba na celé buňky PC12 na destičkách	55
4.4.2.3. Kompetitivní vazba na celé buňky RC-4B/C, GH3 a AtT-20 na destičkách	55
4.4.3. Saturační vazba na celé buňky RC-4B/C, GH3 a AtT-20 na destičkách	55
4.4.4. Analýza dat získaných z vazebných pokusů a statistika	56
4.5. Sběr vzorků pro stanovení buněčné signalizace	56
4.5.1. Sběr vzorků pro stanovení receptoru PrRP pomocí Western blotu u buněčných linií RC-4B/C, GH3 a AtT-20	56
4.5.2. Sběr vzorků pro stanovení buněčné signalizace (pMAPK/ERK1/2, pCREB a pAkt) na buněčných liniích RC-4B/C a PC12	56
4.6. Metoda Western blot	57
4.6.1. SDS-PAGE	57
4.6.2. Přenos proteinů na PVDF membránu a nitrocelulózovou membránu	57
4.6.3. Detekce proteinů na PVDF membráně a nitrocelulózové membráně	58
4.7. Stanovení hormonů v mediu buněčných linií RC-4B/C, GH3 a AtT-20	59
4.8. Experimentální zvířata a obezita vyvolaná glutamátem sodným (MSG)	60
4.8.1. Odběr a hmotnost orgánů a krve/séra a biochemické stanovení	60
4.8.2. Histologie mozku	61
4.9. Stanovení příjmu potravy u myší	61
4.9.1. Zavedení ICV kanyl	61
4.9.2. IP a ICV podání látek	62
4.9.3. Test příjmu potravy	63
4.9.4. Výpočty a statistika	63
4.10. Imunohistochemie	65
4.10.1. Podání látek, perfuze a zpracování mozkové tkáně	65
4.10.2. Imunohistochemie a barvení	65
4.10.3. Vyhodnocení	66
4.11. Test pohybu ve volném prostoru „open field“ a analgetické účinky pomocí testu „hot plate“	66
5. VÝSLEDKY	67
5.1. Buněčné linie	67

5.1.1. Buněčná linie PC12	67
5.1.1.1. Pěstování buněčné linie PC12	67
5.1.2. Růstová křivka buněk PC12	68
5.1.1.2. Pěstování hypofyzárních buněčných linií	69
5.2. Strukturně aktivní studie fragmentů peptidu CART	70
5.2.1. Syntéza fragmentů peptidu CART	70
5.2.2. Jodace peptidu CART(61-102)	71
5.2.3. Kompetitivní vazba k nediferencovaným buňkám PC12 a buněčným membránám	72
5.2.4. Kompetitivní vazba k diferencovaným buňkám PC12	75
5.2.5. Vliv fragmentů peptidu CART na příjem potravy	76
5.2.6. Fosforylace MAPK/ERK1/2, CREB a Akt za pomoci metody Western blot na buněčné linii PC12	77
5.3. Synergistický účinek peptidu CART a CCK-8 u myši	78
5.3.1. Vliv na příjem potravy	78
5.3.1.1. Příjem potravy po podání CART peptidu a CCK	78
5.3.1.2. Příjem potravy po podání CART peptidu a antagonistů CCK	79
5.3.2. Synergistický účinek CART peptidu a CCK při aktivaci c-Fos v hypothalamických jádrech	83
5.3.3. Sedativní a analgetické účinky peptidu CART a CCK	86
5.4. Anorektický efekt CCK a peptidu CART v modelu štíhlých a MSG myši	88
5.4.1. Stanovení biochemických parametrů v séru	88
5.4.2. Histologie mozku	89
5.4.3. Účinky peptidu CART(61–102), CCK-8 a NPY na příjem potravy u sytých myších samců C57Bl/6	90
5.5. Charakterizace účinků analogů PrRP na hypofyzární buněčné linie	94
5.5.1. Detekce receptoru pro PrRP na hypofyzárních buněčných liniích pomocí metody Western blot	94
5.5.2. Optimalizace podmínek vazebných pokusů PrRP k hypofyzárním buněčným liniím	94
5.5.3. Saturační vazebné experimenty	96
5.5.4. Kompetitivní vazebné experimenty	99
5.5.5. Fosforylace MAPK/ERK1/2 a CREB za pomoci metody Western blot na buněčné linii RC-4B/C	100

5.5.6. Stanovení uvolňování hypofyzárních hormonů z buněčných liniích	102
6. DISKUZE	103
6.1. Význam nově objevených neuropeptidů	103
6.2. Strukturně-aktivitní studie fragmentů peptidu CART	104
6.3. Synergistický účinek peptidu CART a CCK-8 u štíhlých myši	108
6.4. Anorektický účinek peptidu CART a CCK-8 v modelu štíhlých a obézních MSG myši	111
6.5. Charakterizace účinku analogů PrRP na hypofyzární buněčné linie	113
7. SHRUTÍ	115
LITERATURA	116
PŘÍLOHA	128

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3V	– Třetí mozková komora (Third Ventricle)
ACB	– nucleus accumbens
ACTH	– Adrenokortikotropní hormon
AgRP	– Agouti related peptide
AM	– Amygdala
ANOVA	– Analýza rozptylu (Analysis of Variance)
ARC	– Nucleus arcuatus
BMI	– Index tělesné hmotnosti (Body Mass Index)
BPTI	– Hovězí pankreatický inhibitor trypsinu (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor)
BSA	– Hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumin)
CART	– Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript
CB1	– Kanabinoidní receptory CB1
CB2	– Kanabinoidní receptory CB2
CC	– Corpus callosum
CCK	– Cholecystokinin
CCK ₁	– Receptory cholecystokininu CCK ₁
CCK ₂	– Receptory cholecystokininu CCK ₂
CCX	– Mozková kůra
CNS	– Centrální nervová soustava
CREB	– cAMP Response Element-Binding
CRH	– Kortikoliberin
CRF	– Kortikotropin uvolňující faktor (Faktor uvolňující kortikotropin)
DMN	– Dorsomediální jádro
DMSO	– Dimethylsulfoxid
EGF	– Epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor)
ELISA	– Enzymoimunochemické stanovení (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
FX	– Klenba
GAL	– Galanin
GHRH	– Hormon uvolňující růstový hormon (somatoliberin) (Growth Hormone Releasing Hormone)
GHS	– Skupina syntetických sekretagogenních peptidů (Growth Hormone Secretagogues)
GHS-R1a	– Receptor pro ghrelin typ 1a
GHS-R1b	– Receptor pro ghrelin typ 1b
GIT	– Gastrointestinální trakt
GLP-1	– Peptid-1 podobný glukagonu (Glucagon Like Peptide-1)
GnRH	– Hormon uvolňující gonadotropin (gonadoliberin) (Gonadotropin Releasing Hormone)
HI	– Hipokampus
ICV	– Podání látek do mozkové komory neboli intracerebroventrikulární podání
IP	– Nitrobřišní podání látek (Intraperitoneal)
JAK	– Janus-kináza (Janus Protein Kinase)
KO	– Obecný termín pro jakýkoliv vyřazený gen (Knock-out)

LH	– Luteinizační hormon (Luteinizing Hormone)
LHA	– Laterální hypotalamus
MALDI-TOF	– Matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight
MAPK/ERK1/2	– Mitogen-Activated-Protein Kinases/Extracellular signal-Regulation Kinase 1/2
MCH	– Melanin koncentrující hormon (Melanin Concentrating Hormone)
ME	– Median Eminence
MSG	– Glutamát sodný (Monosodium Glutamate)
α -MSH	– Hormon stimulující α -melanocyty (α -Melanocyte Stimulating Hormone)
NGF	– Nervový růstový faktor (Nerve Growth factor)
NPY	– Neuropeptid Y
NTS	– Nucleus tractus solitarius
Ob-R	– Receptor pro leptin
OC	– Optic chiasm
PACAP	– Pituitary adenylate cyclase-activating peptide
PEI	– Polyethylenimin
PMA	– Phorbol-12-myristate-13-acetate
POMC	– Pro-opiomelanokortin (Pro-opiomelanocortin)
PRL	– Prolaktin
PrRP	– Peptid uvolňující prolaktin
PVN	– Paraventriculární jádro
PVDF	– Polyvinyliden difluoridová
PYY	– Peptid YY
RIA	– Radioimunochemické stanovení (Radioimmunoassay)
RP-HPLC	– Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
SC	– Podkožní (subkutánní) podání látek
SDS	– dodecylsulfát sodný
SE	– Septum
SEM	– Střední chyba průměru (Standard Error of Mean)
STAT	– Signal Transducer and Activator of Transcription
VMN	– Ventromediální jádro
TH	– Talamus
TRH	– Thyrotropin-uvolňující hormon (Thyrotropin Releasing Hormone)
WHO	– Světová zdravotnická organizace (World Health organization)

Dále jsou užívány zkratky podle doporučení IUPAC-IUB. Pokud není uvedeno jinak, jedná se o aminokyseliny v L-formě

1. ÚVOD

Pohled na obezitu prochází v dějinách lidstva různým vývojem. Obezita bývala znakem blahobytu a úspěšnosti jedince, na druhé straně se na ni pohlíželo jako na povahovou chybu vyplývající z lenosti či nedostatku vůle. Obezita je poslední dobou často nazývána jako epidemie 3. tisíciletí. V Evropě nyní žije 150 milionů obezích dospělých a 15 milionů obezích dětí. Vize pro rok 2015, vycházející ze současného trendu, počítá na celém světě se 700 miliony obezích dospělých a 2,3 miliardami lidí s nadváhou [3]. Zvyšující se prevalenci obezity lze částečně přičíst vlivům prostředí a částečně genetickým vlivům. K obeznímu stavu dochází hlavně z důvodu dlouhodobé pozitivní energetické bilance jako důsledku nerovnováhy mezi přijatou a vydanou energií. V průběhu evoluce musel člověk přežít období půstu a někdy i velmi dlouhé hladovění. Přežívali tedy jen ti jedinci, kteří se dovedli přizpůsobit: jednak značným omezením energetického metabolismu (v době hladovění), a jednak vytvořením dostatečných energetických zásob (v době hojnosti). Tvorba zásob především ve formě tuku se zakotvila do lidského genomu. Dnešní člověk v prosperujících zemích není ve způsobu svého života tak fyzicky aktivní jako dříve a hlavně má přístup k potravě, která je pro něho nejen potřebou, ale i potěšením, a která je navíc kaloricky bohatá. Jednoduše řečeno jeho energetický příjem neodpovídá energetickému výdeji.

Příjem potravy je regulován pomocí souhry několika systémů. Jedná se zejména o centrální nervový systém (CNS), gastrointestinální trakt (GIT) a tukovou tkáň. Příjem potravy ovlivňuje celá řada látek, hlavně neurotransmitery (nepeptidové jako serotonin, noradrenalin, GABA a endokanabinoidní látky a peptidové o nichž bude podrobně pojednáno dále v této práci) a hormony jako inzulín a cholecystokinin. Během posledních 20 let vědci objevili celou řadu neuropeptidů a peptidových hormonů, které regulují příjem potravy a představují nové možnosti ve vývoji budoucích antiobezitik. Je ale velice těžké nalézt látku bez vedlejších účinků, která by selektivně pouze snížila příjem potravy a tím způsobila snížení tělesné hmotnosti.

1.1. Obezita

Obezita je nadměrné ukládání tělesného tuku v organismu spojené s nárůstem hmotnosti, a to nad 25 % tuku v těle u mužů a nad 30 % tuku v těle u žen. Nejčastějšími

příčinami je narušená rovnováha mezi příjmem a výdejem energie. Nadváha, a především její těžší forma obezita, poškozuje zdraví. Obezita je chronické onemocnění, které již dávno není problémem jen estetickým, ale především problémem zdravotním. Je statisticky prokázáno, že obézní jedinec má podstatně nižší kvalitu i délku života. Obezita se v poslední době stává dokonce druhou nejčastější příčinou úmrtí hned po kouření [4]. Přestože se velmi pokročilo v léčbě obezity, stále zaostává zejména její prevence.

Prevalence obezity u dospělých je 10 až 25 % ve většině zemí západní Evropy a 20-25 % v některých zemích v Americe, v USA je to 25 - 30 %. Prevalence obezity je větší u některých etnik: např. mezi americkými Indiány, Američany hispánského původu a vysokých hodnot dosahují v Mikronésii a Polynésii [5]. V České republice už je 1,5 miliónu obézních lidí, což je 23 % dospělé populace, a rok od roku jich stále přibývá. Dalších 30 %, tedy zhruba 2,7 milionu lidí, má nadváhu. Za posledních pět let počet lidí s obezitou a nadváhou stoupl o 450 tisíc, takové jsou závěry průzkumu agentury STEM/MARK z prosince 2008. Přebytké kilogramy trápí 64 % českých mužů (41 % má nadváhu a 23 % je obézních) a 49 % českých žen (28 % má nadváhu a 21 % je obézních) [6]. Zvláště alarmující je nárůst nadváhy a obezity v dětské populaci [7].

Pro určení stupně nadváhy a obezity se používají různé metody. Nejvyužívanějším způsobem je výpočet indexu tělesné hmotnosti tzv. Body Mass Index (BMI) (Tabulka 1). BMI byl definován v 19. století Belgičanem Queteletem, a proto bývá někdy označován také jako Queteletův index [8]. $BMI = \text{hmotnost v kg} / (\text{výška v m})^2$.

Tabulka 1. *Klasifikace obezity podle WHO* [9].

BMI	Klasifikace	Riziko komplikací obezity
méně než 18,5	podváha	nízké riziko jiných chorob
18,5 - 24,9	normální váha	průměrné
25 - 29,9	nadváha	mírně zvýšené
30 - 34,9	obezita I. stupně	středně zvýšené
35 - 39,9	obezita II. stupně	velmi zvýšené
40 a více	obezita III. stupně	vysoké

Při léčbě nadváhy a obezity je neúčinnější komplexní přístup: změna stravovacích návyků, zvýšení pohybové aktivity, psychoterapie a farmakoterapie. Farmakoterapie je

indikována pro obezitu s BMI větším než 30 a je doporučena většinou až tehdy, nebyla-li úspěšná dosavadní komplexní redukční a pohybová léčba. V minulosti se pro léčbu obezity užívaly běžně deriváty amfetaminu, např. centrálně působící Fentermin, které potlačovaly chuť k jídlu přes noradrenergní a dopaminergní systém, ale měly řadu nežádoucích účinků (psychostimulační účinky a návykovost). V současné době je v České republice schválen pouze jeden lék pro dlouhodobou léčbu obezity a to Orlistat (Xenical – Hoffman-La Roche, Alli – GlaxoSmithKline), který blokuje činnost střevní lipázy a tím snižuje asi o 1/3 vstřebávání tuků v gastrointestinálním traktu. Letos v lednu byl z farmaceutického trhu stažen Sibutramin (Lindaxa – Zentiva, Meridia – Abbott), inhibitor zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu, který navozuje pocit sytosti. Důvodem bylo zvýšené riziko závažných, nefatálních kardiovaskulárních příhod, jako je cévní mozková příhoda nebo infarkt myokardu. Dalším lékem byl Rimonabant (Acomplia – Sanofi-Aventis), selektivní blokátor kanabinoidních receptorů CB1 [10], který byl ale kvůli závažným vedlejším účinkům (deprese) stažen z trhu v roce 2009.

Pokud nebyla úspěšná ani farmakoterapie, pak je ještě možná bariatrická chirurgie-chirurgická léčba obezity. Tato léčba je určena jenom pro těžkou obezitu III. stupně dle WHO, tzv. morbidní obezitu s BMI nad 40, případně u pacientů s rozvinutými přidruženými nemocemi v důsledku obezity II. st. dle WHO, tj. s BMI nad 35. Nejčastější bariatrickou operací u nás je laparoskopická bandáž žaludku, při níž se kolem horní části žaludku obkrouží silikonový kroužek, který zmenší jeho objem, a tak sníží pocit hladu. Mezi další nejčastěji prováděný chirurgický zákrok patří žaludeční bypass, kdy je zmenšen objem žaludku a tenké střevo je připojeno za vrátníkem [10].

1.1.1. Příčiny vzniku obezity

Příčiny obezity u většiny populace tkví nejčastěji v nadměrném energetickém příjmu a malém energetickém výdeji, který je dán nedostatkem pohybové aktivity anebo na základě poruchy regulace příjmu potravy. Dále se na vzniku obezity významně podílí genetické dispozice (v rozmezí 40-50 %). Jistou úlohu při vzniku obezity sehrávají i hormonální vlivy (snížená funkce štítné žlázy, zvýšená hladina hormonů kůry nadledvin). Emocionální problémy často přispívají ke vzniku a neustálému nárůstu obezity, stejně tak jako některé léky (antidepresiva, psychofarmaka, glukokortikoidy) [11, 12].

1.1.2. Nemoci spojené s obezitou

Nadváha a obezita jsou provázeny významně vyšším rizikem kardiovaskulárních a metabolických onemocnění. Zvyšují riziko vysokého krevního tlaku, vzniku ischemické choroby srdeční, mozkové příhody a anginy pectoris. Jsou rizikovým faktorem u diabetu mellitu II. typu (rezistence k inzulínu) a dyslipidémii. Přispívají i k takovým stavům jako je osteoartróza, protože zatěžují kolena a kyčle, k problémům s dýcháním (spánková apnoe) a vzniku nádorových onemocnění (tlustého střeva, prsu, ledvin, děložního čípku a jiných orgánů). Obézní lidé mají kromě zdravotních problémů i problémy sociální a psychické. Vyskytují se u nich deprese, zakomplexovanost, často mají sníženou sebedůvěru [12].

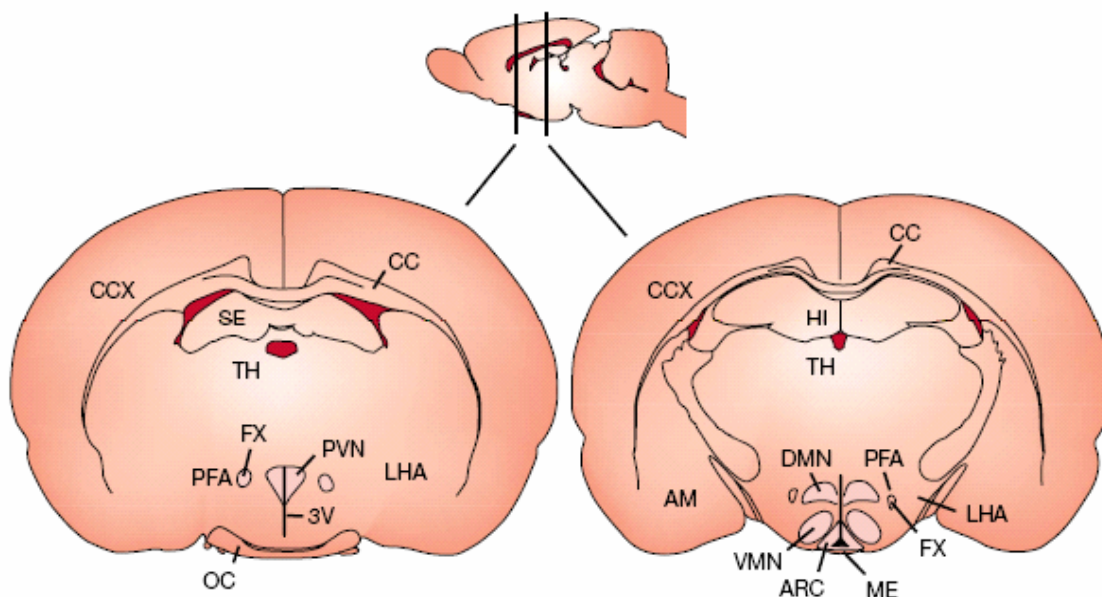
1.2. Regulace příjmu potravy

Příjem potravy je řízen komplexním systémem zahrnujícím jak centrální, tak periferní signály, které se vzájemně ovlivňují. Periferní regulace zahrnuje signály sytosti z GIT, slinivky břišní, nadledvin a z tukové tkáně a ghrelin - jediný signál hladu z GIT. V centrálním nervovém systému se tvoří nepeptidové a peptidové neurotransmitery a endogenní ligandy endokanabinoidních receptorů. Energetická rovnováha je velmi dobře zajištěna krátkodobými a dlouhodobými regulačními mechanismy. Základním centrem regulace je hypotalamus, který obsahuje skupiny neuronů uspořádaných do centra hladu a centra sytosti. Tyto neurony produkují celou řadu orexigenních (látky zvyšující příjem potravy) a anorexigenních (látky snižující příjem potravy) peptidů, kterými se vzájemně ovlivňují hypotalamická centra i ostatní oblasti CNS a koordinuje se komplexní odpověď organismu na příjem potravy [13, 14].

1.2.1. Centrální regulace příjmu potravy

Hypotalamus zajišťuje kontrolu činnosti autonomního nervového systému a endokrinního systému a řídí základní životní funkce: homeostázu - regulaci tělesné teploty, hospodaření s vodou, regulaci srdeční činnosti, aktivitu GIT a emoční projevy [15]. Také je hlavním řídicím centrem regulace příjmu potravy a tělesné hmotnosti. Neurony hypotalamu reagují na periferní regulační peptidy, hladinu krevní glukózy a lipidů a na podněty z aferentních nervů.

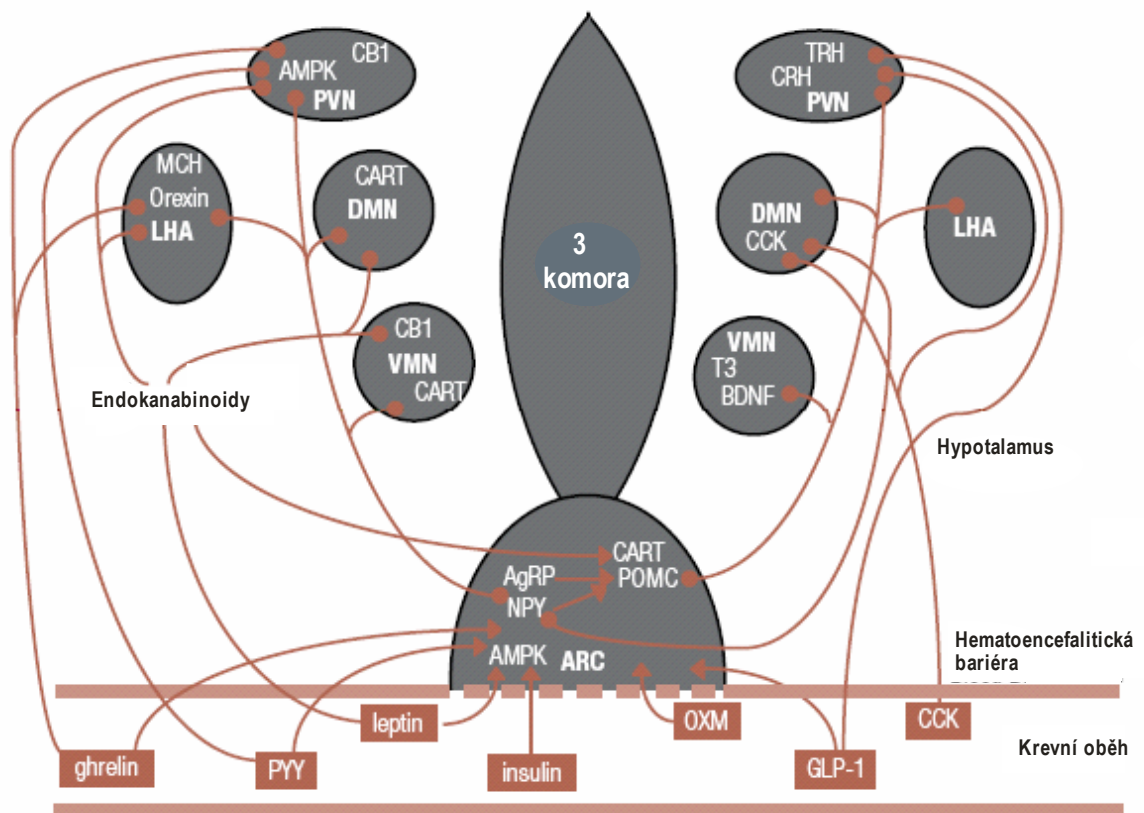
Hypotalamus je rozdělen na několik jader (Obrázek 1), která jsou propojená do komplexní sítě.



Obrázek 1. Řez potkaním mozkem: *Hypotalamus jako hlavní řídicí centrum příjmu potravy a tělesné hmotnosti zahrnuje pro regulaci příjmu potravy tato důležitá jádra: nucleus arcuatus (ARC), paraventrikulární jádro (PVN), ventromediální jádro (VMN), laterální hypotalamus (LHA), dorsomediální jádro (DMN). Vysvětlení dalších zkratk (amygdala (AM), corpus callosum (CC), mozková kůra (CCX), hipokampus (HI), median eminence (ME), optic chiasm (OC), septum (SE), thalamus (TH), třetí komora (3V), klenba (FX), (PFA)[13].*

Nucleus arcuatus (ARC) je hlavním hypotalamickým jádrem podílejícím se na řízení příjmu potravy, je umístěn na spodině hypotalamu po obou stranách třetí mozkové komory (Obrázek 1). V ARC se nacházejí receptory pro řadu hormonů přicházejících z periferie a ovlivňujících příjem potravy: leptin, inzulín, ghrelin, kortikoidní hormony (kortizol, kortikosteron), estrogen, růstový hormon a další [16]. Obsahuje dvě hlavní vzájemně propojené populace primárních neuronů: první populace neuronů produkuje neuropeptid Y – (NPY) a agouti-related peptid (AgRP), které zvyšují příjem potravy (jsou orexigenní). Druhá populace neuronů produkuje pro-opiomelanokortin (POMC) a cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), které snižují příjem potravy (jsou

anorexigenní) [17]. POMC je polypeptidový prekursor několika látek: hormonu stimulujícího α -melanocyty (α -MSH, aktivuje MC3 a MC4 melanokortinové receptory a inhibuje příjem potravy; blokováním MC4 receptoru se zvyšuje příjem potravy), adrenokortikotropního hormonu (ACTH) a β -endorfinů (orexigenní). Oba zmíněné soubory neuronů ARC obsahují mnoho receptorů pro vstupní signály z periferního systému (hlavně leptin, inzulín, a ghrelin). Anorexigenní leptin a inzulín stimulují expresi a sekreci neuronů POMC/CART a také potlačují expresi a sekreci neuronů NPY/AgRP, což vede ke snížení příjmu potravy. Tyto dvě populace neuronů komunikují s ostatními oblastmi hypotalamu jako PVN, DMN a LHA a podílejí se na regulaci chuti k jídlu.



Obrázek 2. Vztah mezi jádry hypotalamu. Cirkulující hormony a neuropeptidy působí přímo na ARC, kde ovlivňují příjem potravy. V ARC jsou dvě populace neuronů: orexigenní neurony NPY/AgRP a anorexigenní neurony POMC/CART. Význam zkratk je vysvětlen u obrázku 1 a v textu [19].

Poškozením ARC (třeba chemicky – glutamátem sodným) dochází k rozvoji obezity. Neurony NPY/AgRP z ARC komunikují s neurony paraventriculárního jádra, které produkují thyrotropin-uvolňující hormon (TRH) a kortikoliberin (CRH), který se také účastní regulace energetické bilance příjmu potravy a výdeje energie. Centrální podání těchto látek snižuje příjem potravy a tělesnou hmotnost [18].

Ventromediální jádro jako „centrum sytosti“ je další důležitou oblastí podílející se na příjmu potravy, je charakterizováno vysokou hustotou receptorů pro centrální i periferní signály. Obsahuje velkou populaci neuronů citlivých vůči glukose a dostává přímé signály z ARC (NPY/AgRP a POMC neuronů). Poškozením VMN dojde k hyperfágii (přejídání) a tak k rozvoji obezity [13].

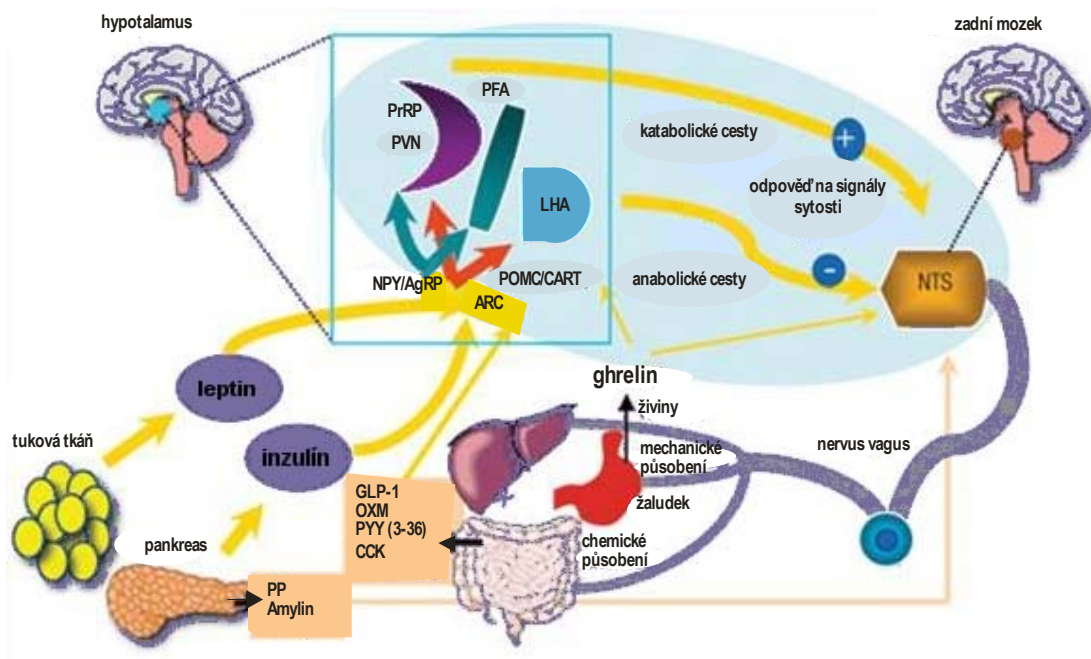
Laterální hypotalamus byl nazván „centrum hladu“, produkuje orexigenní neuropeptidy: melanin-koncentrující hormon (MCH) a orexiny. Melanin-koncentrující hormon je cyklický malý neuropeptid, jehož exprese je zvýšena hladověním a snížena po podání leptinu. Neurony v laterálních, dorsomediálních a perifornikálních oblastech hypotalamu produkují dva orexigenní peptidy: orexin A (hypokretin 1) a orexin B (hypokretin 2), které vznikají ze stejného prekursoru pre-proorexinu. Neurony produkující orexiny reagují přímo na nízkou hladinu glukózy. Orexiny stimulují chuť k jídlu také aktivací opioidních receptorů a účastní se regulace nespavosti. Další orexigenní peptid galanin je produkován zejména v PVN a LHA [20]. Poškození LHA vyvolá hypofágii (snížení příjmu potravy) a tím snížení tělesné hmotnosti [13, 20]. Naopak destrukce dorsomediálního jádra vyvolá hyperfágii a obezitu; přitom DMN obsahuje velké množství nervových zakončení z neuronů produkujících jak NPY tak α -MSH [21] (Obrázek 2).

Příjem potravy významně, ale neselektivně ovlivňují nepeptidové neurotransmitery, jak již bylo zmíněno v kapitole 1.1. o lécích proti obezitě stažených z trhu. Serotonin (5-hydroxytryptamin, 5-HT) je už dlouhou dobu spojován s příjmem potravy a snižováním hmotnosti. Farmakologické látky, které zvyšují aktivitu 5-HT v CNS, inhibují příjem potravy a podporují hubnutí. Naopak chemické zničení serotonergních neuronů nebo zablokování syntézy serotoninu způsobuje hyperfágii [20]. V regulaci příjmu potravy se dále uplatňují dopamin, katecholaminy, histamin a endokanabinoidní systém.

1.2.2. Periferní regulace příjmu potravy

Mezi nejdůležitější periferní orgány regulující krátkodobý příjem potravy patří GIT,

slinivka břišní a nadledviny. Z GIT pocházejí: glukagonu podobný peptid 1 (GLP-1), oxyntomodulin, (OXM), peptid YY (PYY) a cholecystokinin (CCK), kde se uvolňují během jídla či v jeho očekávání. Jediným orexigenním hormonem pocházejícím z GIT je ghrelin. Tyto látky mají velký význam především při krátkodobé regulaci energetické rovnováhy. Přesný způsob, jakým každý z těchto peptidů signalizuje do CNS, se může u jednotlivých látek lišit: mohou buď působit přímo na neurony v CNS po projití nebo obejití hematoencefalitické bariéry, většina z nich ale působí přes nervus vagus a aferentní vlákna do oblasti nucleus tractus solitarius (NTS), která je propojena s nervovými drahami hypotalamických jader ARC, PVN, kde jsou tyto signály sytosti integrovány se signály leptinu a inzulínu z tukové tkáně [13, 15].



Obrázek 3. Centrální a periferní regulace příjmu potravy. *Leptin a inzulín pronikají do mozku přes hematoencefalitickou bariéru do ARC, kde stimulují expresi a sekreci anorexigenních POMC/CART neuronů a potlačují expresi a sekreci orexigenních AgRP/NPY neuronů, což způsobuje snížení příjmu potravy. Orexigenní účinek ghrelinu je zprostředkován AgRP/NPY neurony. Leptin, inzulín a ghrelin ovlivňují dlouhodobou regulaci příjmu potravy. Krátkodobě působící hormony např. CCK a GLP-1 vznikají v GIT a jejich signál je do mozku přenášen přes nervus vagus do mozkového kmene (NTS), kde jsou pak tyto signály spojeny nervovými drahami s hypotalamickými jádry (ARC, PVN a LHA) a dochází k regulaci příjmu potravy a výdeje energie [22].*

Mezi hormony slinivky břišní patří inzulín a amylin, které jsou vylučovány β -buňkami, glukagon je produkován A-buňkami a je funkčním antagonistou inzulinu. Dalším hormonem je pankreatický polypeptid produkovaný PP buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní. Tyto hormony ovlivňují metabolismus glukosy, čímž ovlivňují také příjem potravy a celkový energetický metabolismus [23].

Dlouhodobá regulace příjmu potravy je zajištěna především adipokiny z tukové tkáně (Obrázek 3). Sérové hladiny anorektického adipokinu leptinu významně korelují s množstvím tukové tkáně v organismu. Absence leptinu je vzácná monogenní porucha vedoucích k morbidní obezitě již v časném dětském věku [13, 14, 22].

1.3. Dlouhodobé a krátkodobé působení peptidů ovlivňujících příjem potravy

Peptidové hormony, které regulují příjem potravy, mohou být rozděleny na krátkodobě působící jako jsou CCK, glukagon, GLP-1 a dlouhodobě působící, které jsou ukazateli energetických zásob, jako je leptin a inzulín (Tabulka 2).

Tabulka 2. Přehled peptidů ovlivňující příjem potravy.

Peptid	Místo vylučování	Doba účinku	Chuť k jídlu
Leptin	Tuková tkáň, hypotalamus/mozkový kmen	dlouhodobý	anorexigenní
Inzulín	Pankreas	dlouhodobý	anorexigenní
CCK	GIT	krátkodobý	anorexigenní
PYY	GIT	krátkodobý	anorexigenní
GLP-1	GIT	krátkodobý	anorexigenní
Ghrelin	Periferie, hypotalamus	Dlouhodobý, krátkodobý	orexigenní
CART	Hypotalamus	krátkodobý	anorexigenní
α MSH	Hypotalamus	krátkodobý	anorexigenní
NPY	Hypotalamus	dlouhodobý	orexigenní
AgRP	Hypotalamus	dlouhodobý	orexigenní
MCH	Hypotalamus	krátkodobý	orexigenní
Galanin	Hypotalamus	krátkodobý	orexigenní
Orexin A/ Orexin B	Hypotalamus a GIT	krátkodobý	orexigenní

1.3.1. Peptidy dlouhodobě působící

Mezi dlouhodobě působící peptidy řadíme periferní leptin, inzulín, ghrelin a centrální NPY a AgRP (viz Tabulka 2). Leptin a inzulín jsou anorexigenní peptidy. Leptin signalizuje do mozku z tukové tkáně nadměrné nahromadění zásob energie a tím dává signál ke snížení příjmu potravy a zvýšení energetického výdeje. Ghrelin je jediným orexigenním periferním peptidem s nejvyšší hladinou v krvi právě tehdy, když je žaludek prázdný (před příjmem potravy). Pokles plazmatické hladiny ghreluinu je možné pozorovat krátce po příjmu potravy, tedy po zaplnění žaludku. Ghrelin tak ve své podstatě představuje jakýsi signalizátor pocitu hladu [13].

1.3.1.1. Leptin

Název leptinu pochází z řeckého slova „leptos“ - tenký, štíhlý. Je to cytokin produkovaný buňkami bílé tukové tkáně – adipocyty, ale v menší míře i placentou a žaludkem [24]. Jeho objev byl publikován v roce 1994 [25], ale již dříve byla popsána genová mutace leptinového genu (*ob* gen) u myši, která vede k rozvoji morbidní obezity a diabetu. *Ob/ob* myši nejsou schopny produkovat leptin, mají rezistenci k inzulínu a jsou neplodné [26]. Chronické podávání leptinu *ob/ob* myším vede ke snížení příjmu potravy a k úbytku jejich tělesné hmotnosti. U pacientů s obezitou paradoxně nacházíme vysoké koncentrace leptinu, podání leptinu obézním ale nevede ke snížení hmotnosti. Tento stav se nazývá „leptinová rezistence“: buď signalizace leptinu do buňky není plně funkční, nebo je nedostatečný transport leptinu přes hematoencefalitickou bariéru [26].

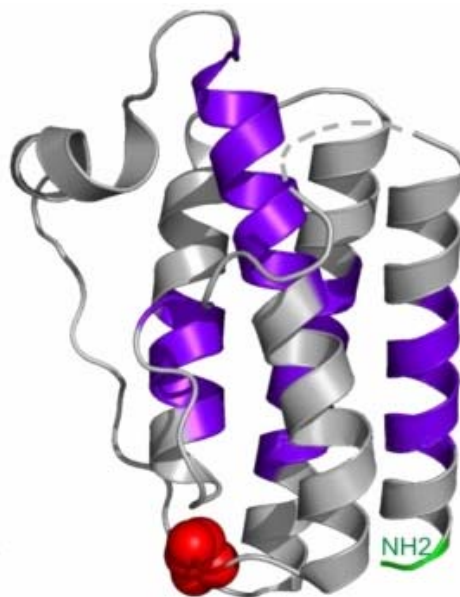
Dalším obezitním fenotypem jsou *db/db* myši, které mají na rozdíl od *ob/ob* myši hladiny leptinu zvýšené. *Db/db* myši mají nefunkční receptor pro leptin a tudíž podávání leptinu těmto myším neovlivní jejich fenotyp [27]. *Fa/fa* potkani, kteří jsou považováni za model pro prediabetes, mají mutaci leptinového receptoru, jež způsobuje hyperfágii, inzulínovou rezistenci, hyperinzulinémii, hyperlipoproteinémii a obezitu [27].

Leptin reguluje energetickou bilanci pomocí negativní zpětné vazby. Leptin z tukové tkáně proniká přes hematoencefalitickou bariéru do CNS, do ARC v hypotalamu, kde potlačuje expresi a sekreci orexigenních NPY/AgRP neuronů a stimuluje expresi a sekreci anorexigenních CART/POMC neuronů; to má za následek snižování příjmu potravy [26, 28].

Leptin plní v organismu početné funkce, jeho hlavním úkolem je adaptace organismu na hladovění. Podílí se na udržování energetické homeostázy, signalizuje množství tuku v organismu, snižuje příjem potravy a zvyšuje energetický výdej, přímo inhibuje koncentraci intracelulárních lipidů, zvyšuje vychytávání glukosy. Náhlé změny jeho hladin jsou spojeny s nástupem puberty a poruchami příjmu potravy (anorexie, bulimie) [26]. Struktura leptinu je uvedena na Obrázku 4 [29].

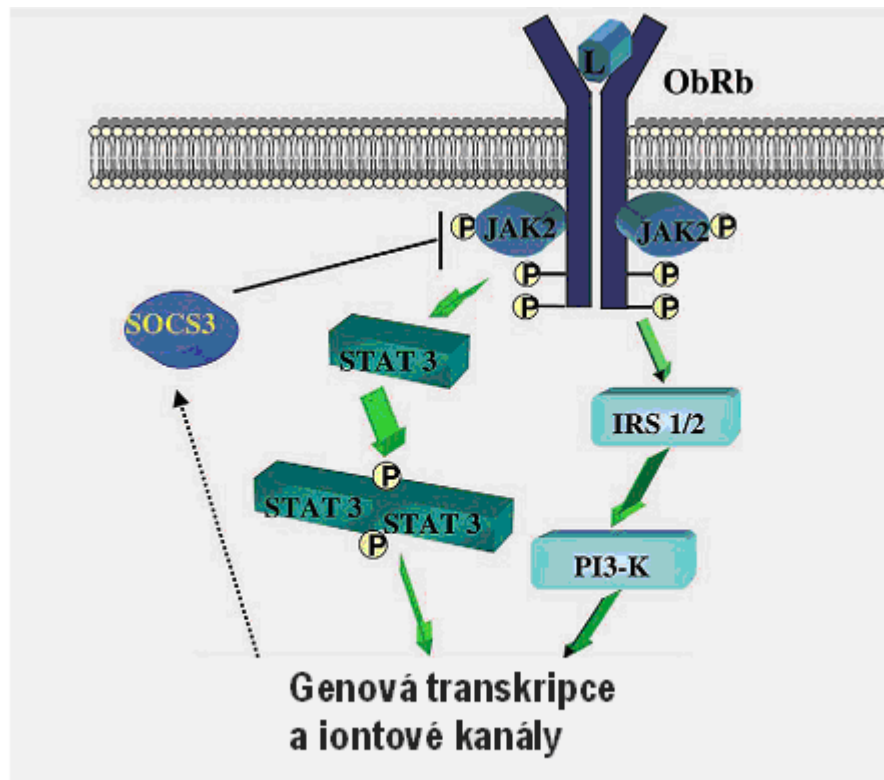
Receptory pro leptin (Ob-R) byly identifikovány v roce 1995 skupinou Tartaglii a kol. [30]. Patří do I. třídy cytokinových receptorů. Všechny popsané izoformy receptoru pro leptin mají stejnou extracelulární část, ale rozdílnou intracelulární část. Existují tyto dvě dlouhé izoformy leptinu: nesignalizující OB-R_L a signalizující OB-R_b, která je hustě zastoupena v hypotalamu (v ARC, VMN, PVN a DMN) [26, 30]. Krátké nesignalizující izoformy Ob-R_a, Ob-R_c, Ob-R_d (izoformy s různou délkou intracelulární domény) se podílejí na aktivním transportu leptinu z periferie přes hematoencefalitickou bariéru do CNS.

Dále byla prokázána existence tzv. cirkulujícího neboli solubilního leptinového receptoru Ob-R_e, tvořeného pouze extracelulární doménou, která slouží jako vazebný protein pro transport leptinu v krvi.



Obrázek 4. Struktura leptinu [29]. Molekula leptinu o 167 aminokyselinách tvořená čtyřmi antiparalelními α -helixy.

Leptin využívá k přenosu signálu do buňky pouze Ob-R_b izoformu, která obsahuje intracelulární strukturu nutnou pro aktivaci JAK-kinázy (Janus Protein kinase) a proteiny STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), které po fosforylaci tyrosinů dimerizují a jsou následně translokovány do jádra, kde stimulují transkripci genů (Obrázek 5). Fosforylace STAT3 je inhibována supresorem signalizace cytokinu (SOCS), konkrétně SOCS3, čímž je zprostředkována negativní zpětná vazba JAK/STAT dráhy, jak je vidět na obrázku 5. Dalším modelem myši leptinové rezistence jsou SOCS3 KO myši - mají vyřazený gen pro SOCS3, což vede k účinnější leptinem indukované fosforylaci STAT3 v hypotalamu, což má za následek potlačení příjmu potravy a z toho plyne větší úbytek hmotnosti [13, 31].



Obrázek 5. Signalizace leptinu. Na Ob-R_b receptor se naváže leptin (L), který aktivuje JAK2 kinázu; ta buď aktivuje STAT3 a nebo substrát inzulinového receptoru (IRS) ten pak fosfatidyl-3 kinázu (PI3-K). V obojím případě dochází ke genové transkripci. Negativní zpětnou vazbu zprostředkovávají SOCS3 (supresor cytokinové signalizace) [32].

1.3.1.2. Inzulín

Inzulín je hormon produkovaný B buňkami Langerhansových ostrůvků pankreatu. Byl izolován v roce 1921 Frederickem Bantingem a Charlesem Bestem [33]. Je to protein, který se skládá ze dvou polypeptidických řetězců (A a B), které jsou spojeny třemi disulfidickými můstky. Inzulín je hormon se širokým spektrem účinků. Přímo i nepřímě ovlivňuje všechny orgány a tkáně v těle. Hlavní funkcí inzulínu je stimulovat anabolické děje pro cukry, proteiny a tuky, přičemž konečný důsledek všech reakcí je snižování hladiny glukosy v těle. Inzulín stimuluje nejen tvorbu glykogenu, ale i triacylglycerolů.

Inzulínový receptor je membránový glykoprotein, patřící do skupiny tyrosinkinasových receptorů tvořený dvěma α - a dvěma β - podjednotkami vzájemně spojenými dvěma disulfidickými můstky [34]. Je lokalizován ve všech tkáních obratlovců.

Plazmatické hladiny inzulínu korelují přímo s tělesnou hmotností a zejména s tělesným tukem [35]. Obézní lidé mají vyšší bazální hladiny inzulínu a vylučují ho více v reakci na jídlo, než lidé s normální hmotností („inzulínová rezistence“) [36]. V CNS se inzulínové receptory nacházejí v ARC [34]. Po podání exogenního inzulínu do mozku se snižuje příjem potravy a zvyšuje výdej energie, a také se zesilují anorektické účinky periferně podávaného CCK [36].

1.3.1.3. Ghrelin

Ghrelin byl objeven v roce 1999 Kojimou a jeho spolupracovníky jako přirozený ligand sirotčího receptoru, který je specifický pro skupinu GHS peptidů (growth-hormone secretagogues) [37]. Ghrelin se vylučuje především v žaludku, dále také v tenkém a tlustém střevě. V menší míře se vyskytuje v pankreatu, ledvinách, hypotalamu (ARC), hypofýze, srdci a placentě [38].

Ghrelin má v organizmu řadu fyziologických funkcí: zvyšuje příjem potravy, stimuluje uvolnění růstového hormonu, zvyšuje motilitu žaludku a žaludeční sekreci, dále ovlivňuje funkci slinivky břišní a metabolismus glukosy, má vliv na metabolismus kostí a má kardioprotektivní účinky [38]. Ghrelin je jedinou periferní orexigenní látkou. Plazmatické hodnoty ghreluinu se zvyšují před jídlem a během hladovění a klesají na nejnižší hodnotu během jedné hodiny po jídle [38].

Ghrelin působí centrálně buď přímým kontaktem s neurony v hypotalamu, nebo

nepřímo přes nervus vagus. ARC je hlavním místem účinku pro ghrelin i leptin. Ghrelin v ARC aktivuje orexigenní neurony NPY/AgRP a potlačuje expresi a sekreci anorexigenních neuronů POMC/CART. Účinek leptinu je opačný, potlačuje sekreci orexigenních peptidů [38]. Leptin je tedy funkčním endogenním antagonistou ghreluinu, potlačuje ghrelinem navozený příjem potravy.

Preproghrelin je tvořen 117 aminokyselinami, z nichž 23 N-terminálních aminokyselin představuje signální peptid. Po odštěpení signální sekvence a odštěpení prosekvence vzniká ghrelin obsahující 28 aminokyselin, který je posttranslačně modifikován, je esterifikován na hydroxylové skupině serinového zbytku v pozici 3 n-oktanovou kyselinou. Tato hydrofobní skupina je nezbytná pro biologickou aktivitu ghreluinu a jeho vazbu na ghrelinový receptor GHS-R [37].

Ghrelinový receptor se exprimuje kromě ARC i ve VMN. Analýza nukleotidové sekvence genu GHS-R odhalila dva typy receptorů, pojmenované jako GHS-R1a a GHS-R1b, oba spřažené s G-proteinem [38].

1.3.2. Peptidy krátkodobě působící

Mezi krátkodobé peptidy řadíme ty, které působí rychle a intenzivně před, či hned po příjmu potravy. Mezi krátkodobě působící anorexigenní řadíme centrální peptidy: CART, α -MSH a periferní, PYY, CCK a GLP-1. GLP-1 se uvolňuje ihned po příjmu potravy a také po neurohormonální stimulaci a jeho hladina klesá s poklesem příjmu potravy. Krátkodobě působící orexigenní centrální peptidy jsou: NPY, MCH, galanin a orexiny.

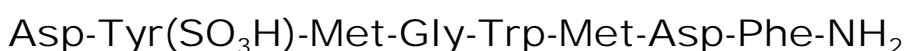
1.3.2.1. Cholecystokinin (CCK)

V roce 1928 vědci Ivy a Oldberg objevili hormon, který působí kontrakce žlučníku - cholecystokinin (CCK) [39, 40]. V roce 1973 Gibbs a jeho spolupracovníci poprvé označili CCK za první střevní hormon, který ovlivňuje sytost a snižuje příjem potravy [41]. 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 i periferní. V periférii je CCK vylučován ze sliznice duodena a jejunu, kde jsou přítomny endokrinní I buňky produkující CCK. CCK stimuluje kontrakci žlučníku, sekreci amylázy ze slinivky

břišní a inhibuje vyprazdňování žaludku [42, 43].

CCK v mozku plní funkci neurotransmiteru. Nejvyšší koncentrace CCK byly prokázány v mozkové kůře, amygdale a hipokampu [42, 43]. Značné množství CCK se také nachází v hypotalamu a dorsálním zadním mozku. Jeho působení v CNS má za následek sedativní a anxiogenní účinek; ovlivňuje spánek (sedace), bolest (analgeze) a zlepšuje paměť [44].

Cholecystokinin má několik molekulárních forem s různými počty aminokyselin: CCK-4, CCK-8, CCK-22, CCK-33, CCK-39 a CCK-54 [44]. V periférii se nejvíce vyskytuje CCK-8 (Obrázek 7) a CCK-33. V CNS jsou přítomny CCK-8 a CCK-4. Signál CCK-8 z periférie je přenášen do mozku prostřednictvím nervu vagu do mozkového kmene. Tento efekt je zprostředkován přes CCK₁ receptory na nervu vagu [45]. CCK působí prostřednictvím dvou receptorů - dříve známé jako CCK_A a CCK_B, dnes často označované jako CCK₁ a CCK₂ receptory, oba jsou spřažené s G-proteinem. Receptor CCK₁ se zdá být mnohem důležitější v regulaci chuti k jídlu [46]. Nenachází se jen v periférii v GIT, ale i v NTS a dorsomediálním hypotalamu [42]. CCK₂ se vyskytuje v celém mozku, jeho největší koncentrace je v mozkové kůře. Matson a kol. dokázali, že centrální podání CCK s leptinem je mnohem účinnější ve snižování hmotnosti než leptin samotný [47], neboť CCK s leptinem působí synergisticky [48].



Obrázek 7. Primární struktura C-koncového oktapeptidu cholecystokininu CCK-8. [46].

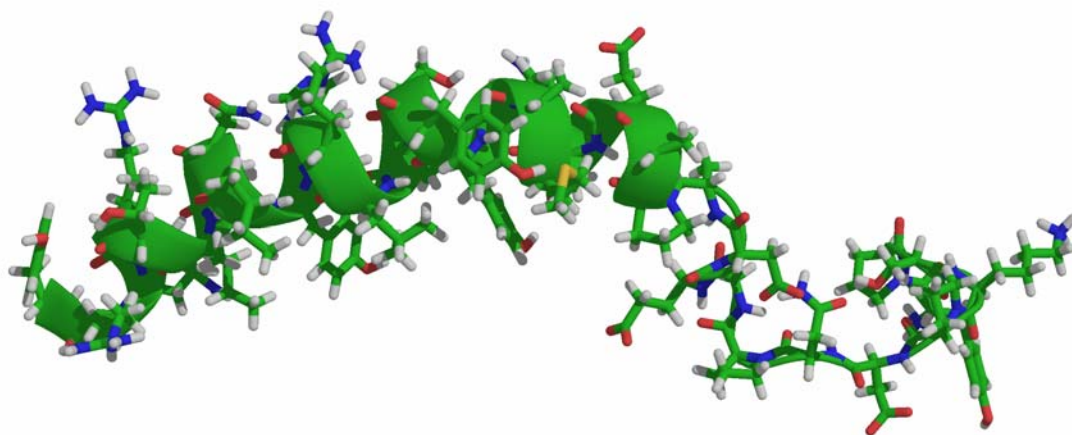
1.3.2.2. Neuropeptid Y

Neuropeptid Y (NPY) byl objeven v CNS v roce 1982 Tatemotem a kol. [49]. Jeho jméno je odvozeno z tyrosinů na N- a C- konci. NPY patří strukturou do skupiny pankreatických polypeptidů a je jedním z význačných hypotalamických orexigenních peptidů [49]. Je složen z 36 aminokyselin a působí jako neurotransmiter [49] (Obrázek 6). NPY je jedním z nejmohutnějších stimulátorů příjmu potravy. Kromě toho způsobuje vazokonstrikci, ovlivňuje motilitu GIT, reguluje reprodukční a endokrinní systém a působí

jako modulátor paměti [50]. V periférii se NPY nachází v sympatických neuronech a v nadledvinových chromafinových buňkách. V CNS se vyskytuje v mozkové kůře, mozkovém kmeni, hypotalamu, amygdale, hipokampu a talamu.

NPY je ovlivňován leptinem a inzulínem; pokud jejich hladiny jsou zvýšeny, syntéza NPY je potlačena a příjem potravy je snížen. CCK a peptidy CART ovlivňují negativně účinek NPY. Kombinace CCK a NPY způsobila snížený příjem potravy oproti samotnému NPY u potkanů [51]. Peptidy CART potlačují příjem potravy zvýšený účinkem NPY [52]. Centrálně podávaný NPY zvýšil příjem potravy u geneticky obézních (*ob/ob*) a geneticky diabetických (*db/db*) myši [53].

Receptory pro NPY patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny. Mají řadu fyziologických funkcí, podílejí se na regulaci krevního tlaku, ovlivňují příjem potravy a zlepšují paměť. Účinek NPY je zprostředkován šesti typy receptorů: nazvanými Y_{1-6} . S regulací příjmu potravy souvisí dva typy receptorů Y_1 a Y_5 . Oba dva receptory se nacházejí v CNS. Selektivní antagonisté NPY s vazbou zejména na receptory Y_5 inhibují příjem potravy a působí snížení tělesné hmotnosti u obézních potkanů [54].



Obrázek 6. Struktura NPY [49]

1.4. Peptidy CART (Cocaine- and amphetamine-regulated transcript)

1.4.1. Objev a výskyt

V roce 1981 Spiess a jeho spolupracovníci izolovali peptid s nejasnou funkcí z ovčího hypotalamu [55]. V roce 1995 Douglas a kol. [56] zjistili, že po podání kokainu a amfetaminu dochází ke zvýšené expresi mRNA pro tento peptid v nucleu accumbens, odtud také pochází název peptidu CART (cocaine-and amphetamine-regulated transcript) [56]. Strukturu peptidu CART a jeho hlavní funkci popsali prvně Kristensen a kol. a Thim a kol. [2, 52].

Peptidy CART se vyskytují v centrální nervové soustavě a také v periférii. V CNS se vyskytují ve všech částech mozku, ale v různé koncentraci; nejvyšší koncentrace CART mRNA je v hypothalamických jádrech: ARC, PVN, DMN a v LHA a také v hypofýze [57]. CART peptidy se vyskytují v periférii v dřeni nadledvin, Langerhansových ostrůvcích, pankreatu a v trávicím traktu [58-60].

1.4.2. Struktura

Lidský gen pro CART je lokalizován na chromosomu 5, má 2,5 kb a obsahuje tři exony a dva introny [61]. Gen peptidu CART je evolučně konzervovaný, což ukazuje na podobnou funkci u různých živočišných druhů, a tedy i velkou důležitost [61]. Transkripce genu vznikají dvě jinak štěpené mRNA, z nichž po odštěpení pre-peptidu vznikají dva různě dlouhé propeptidy CART buď o 102 (myši a potkaní) nebo 89 aminokyselinách (lidský, myši a potkaní) [56]. Aminokyselinová sekvence dlouhé a krátké potkaní formy je na obr. 8A. Krátká forma propeptidu CART (myši a potkaní) je rozdílná od lidské v pozici 42, kde v lidském peptidu je izoleucin vyměněn za valin, přičemž C-koncová sekvence je vždycky stejná [56]. Prohormon-konvertáza 2 (PC2) štěpí dlouhý i krátký propeptid na dvě přirozeně biologicky aktivní formy, CART(55-102/42-89) a CART(62-102/49-89) [62]. Jejich struktura je znázorněna na Obrázku 8A. Pomocí MS a NMR spektroskopie bylo prokázáno, že peptid CART(61-102) obsahuje šest cysteinů, jež tvoří tři disulfidické můstky a to mezi cysteiny v pozici 68 a 86, 74a 94, 88 a 101 [2, 63], což je vidět z Obrázku 8B.

A)

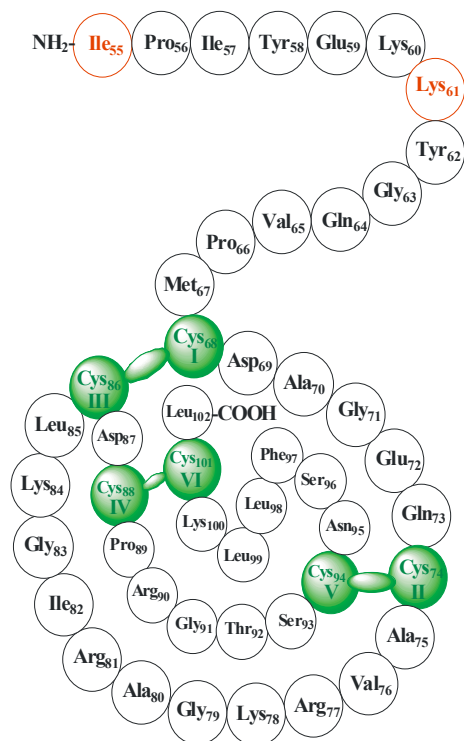
Potkaní dlouhá forma

QEDAE LQPRALDIYSAVDDASHEKEL **LP**RRQLRAPGAVLQIEALQEV LK LKSKR **IP**IYEK KYGQVPMCDAGEQCAVRK GARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL

Potkaní krátká forma

QEDAE LQPRALDIYSAVDDASHEKEL **LI**IEALQEV LK LKSKR **IP**IYEK KYGQVPMCDAGEQCAVRK GARIGKLCDCPRGTSCNSFLLKCL

B)



Obrázek 8. Struktura peptidu CART. A) Aminokyselinová sekvence dlouhé a krátké formy peptidu CART [1]. Biologicky aktivní peptidy CART(55-102) a (62-102), vyštěpené z dlouhého propeptidu CART, jsou totožné s peptidy (42-89) a (49-89), vyštěpenými z krátkého propeptidu. Místa štěpení pro prohormonkonvertázu jsou znázorněna tučně. B) Struktura peptidu CART(55-102) [2]. Červeně zvýrazněné aminokyseliny označují počátek dvou biologicky aktivních forem (55-102) a (61-102).

1.4.3. Fyziologická úloha peptidu CART

Peptidy CART jsou zařazovány mezi peptidové neurotransmitery [1]. V mozku se nacházejí pouze v neuronech (např. ARC) společně s dalšími neurotransmitery jako je γ -aminomáselná kyselina, dopamin a glutamát [2]. Z nich se uvolňují při zvýšené intramolekulární koncentraci vápenatých iontů [64]. Peptidy CART se vyskytují i v periférii, a to hlavně v GIT, patří tedy mezi tzv. „brain-gut“ peptidy, které jsou často i neuropeptidy. Působí v celé řadě fyziologických procesů, ovlivňují příjem potravy (anorexigenní účinek), pocit sytosti, stres, neuroendokrinní regulace, srdeční funkce, bolest a střevní hybnost (motilitu) a ovlivňují funkci pankreatu [1, 64, 65]. Peptidy CART ovlivňují neuroendokrinní systémy, jako hypotalamo-hypofýzo-adrenální osu (HPA), hypotalamo-hypofýzo-tyroidální osu (HPT) a sympato-adrenální systém (SAM) [57, 58, 66].

Peptidy CART jsou přítomny v každé ze tří složek HPA osy a v portální krvi [67]. Centrální podání peptidů CART aktivuje neurony CRH a stimuluje sekreci ACTH a tím i kortikosteronu, tuto sekreci lze blokovat antagonistou CRH astresinem [28]. Adrenalektomie (odnětí nadledvin) snižuje expresi CART mRNA jak v PVN, tak v ARC, následné podání kortikosteronu pak částečně vrací hladiny peptidu CART do stavu před adrenalektomií [68]. Exprese a uvolnění peptidu CART do hypofýzy je regulováno CRH a glukokortikoidy [69].

Peptidy CART z hypotalamických neuronů uvolňované do PVN podporují sekreci TRH, jenž zvyšuje termogenezi v hnědém tuku a svalu. Centrálně podaný peptid CART pak zvyšuje expresi uncoupling proteinu (UCP) [70].

Myši s vyřazeným genem pro CART mají normální hmotnost při standardní stravě, ale obezita u nich může být navozena vysokokalorickou stravou [65, 71].

1.4.3.1. Vliv peptidu CART a dalších látek na příjem potravy a jejich vzájemný vztah

Zanedlouho po objevu peptidů CART byla studována jejich spojitost s regulací příjmu potravy, a to na základě distribuce peptidů CART v mozku, zvláště v hypotalamu (v ARC, LHA, PVN a nucleus accumbens - ACB) a jejich přítomnosti v GIT [69, 72].

Důkaz anorexigenních vlastností peptidů CART provedli Kristensen a kol. [52], kteří ukázali, že exprese mRNA CART v ARC je regulována leptinem, že CART mRNA je

snížena v ARC u hladových zvířat a téměř nesnížena u hladových *ob/ob* myši s nefunkční signalizací leptinu. V nucleu arcuatu jsou peptidy CART společně lokalizovány s α -MSH [52, 73], inhibítozem příjmu potravy. V neuronech nucleu arcuatu, které produkují peptidy CART, byly nalezeny receptory pro leptin, což naznačuje, že peptidy CART mohou zprostředkovávat v hypotalamu účinek leptinu [73].

Podání peptidu CART(61-102) do nucleus accumbens mělo za následek inhibici příjmu potravy u myši [2, 74, 75]. Tato oblast se považuje za jedno z možných míst působení anorexigenní aktivity peptidů CART, které tu jsou hojně zastoupeny.

Kromě toho, ICV a intracisternální podání (podání do prostoru mezi mozečkem a prodlouženou míchou, který je vyplněn mozkomíšním mokem) peptidu CART(55-102) inhibovalo sekreci žaludečních šťáv a vyprazdňování žaludku [76]. Kristensen a kol. zjistili také interakci mezi peptidy CART a NPY, kdy peptid CART tlumil orexigenní aktivitu NPY [52]. Peptidy CART byly rovněž prokázány v GIT [1] a v nervu vazu [77, 78]. Nezdá se však, že by periferní peptidy CART intenzivně ovlivňovaly příjem potravy. IP injekce relativně vysokých dávek peptidu CART(55-102) nesnížila příjem potravy [70, 79].

Dále peptidy CART regulují mezokortikolimbický dopaminergní systém a mohou tak ovlivňovat reakci a odpověď na působení psychostimulantů. Existují důkazy o interakci mezi peptidy CART a endokanabinoidním systémem [80]. Endokanabinoidy mají orexigenní účinky a inhibují anorexigenní aktivitu peptidů, mezi nimi i peptidu CART. Endokanabinoid anandamid zvyšuje příjem potravy aktivací receptoru CB1, zatímco antagonist receptoru CB1 inhibuje příjem potravy, to naznačuje, že peptidy CART se podílejí na orexigenním účinku anandamidu [81].

Mezi dalšími důležitými hormony, jejichž účinky by mohly souviset s účinky peptidů CART, je CCK. Bylo zjištěno, že velká část neuronů peptidů CART v nervu vazu obsahuje také receptor CCK₁ [77]. CCK reguluje expresi peptidu CART ve vágových aferentních neuronech prostřednictvím aktivace protein kinázy C (PKC) a CREB [78].

Přesná role peptidu CART v regulaci příjmu potravy není úplně objasněna. Peptidy CART působí jako anorexigenní látky, ale zatím zcela není objasněn mechanismus jejich působení. Navíc dosud není znám jeho receptor [1]. Peptidy CART mohou být prospěšné k pochopení metabolických mechanismů vedoucích k obezitě a následně k využití pro její terapii.

1.4.3.2. Další účinky peptidu CART

Peptidy CART mohou být také produkovány buňkami Langerhansových ostrůvků, ale i parasympatickými nervovými vlákny, která inervují tuto tkáň. Peptidy CART inhibují sekreci inzulínu stimulovanou účinkem glukosy [59].

Peptidy CART stimulují sekreci ACTH, CRH i sekreci kortizolu a zároveň CRH a glukokortikoidy zvyšují transkripční aktivitu genu pro CART [68]. Adrenalektomie snižuje koncentraci mRNA pro CART a peptidů CART jak v ARC a v PVN, tak i v krvi. Podáním kortikosteronu se pak částečně vrací hladiny CART do stavu před adrenalektomií [68]. Peptid CART rovněž stimuluje expresi TRH v PVN [57].

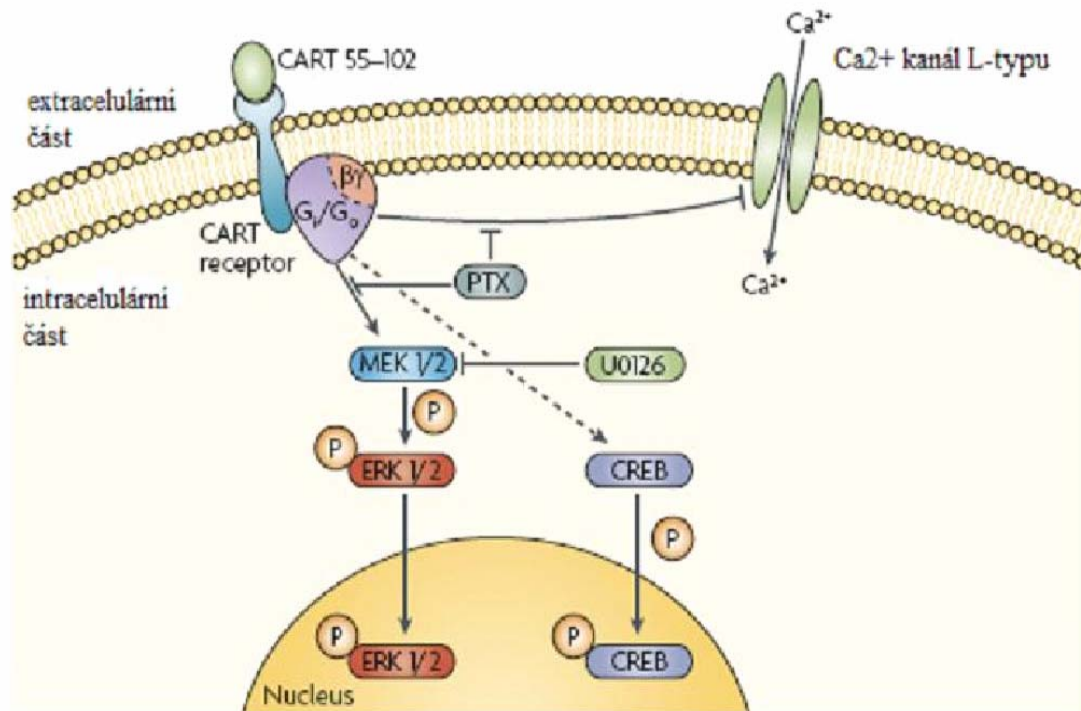
1.4.4. Receptor pro peptidy CART a buněčná signalizace

I když byl peptid CART objeven před více jak 15 lety, zatím se nepodařilo identifikovat jeho receptor. Byly však publikovány studie, které dokazovaly, že receptory pro peptidy CART existují. Například bylo zjištěno, že po centrálním podání peptidů CART potkanům se zvýší hladiny mRNA proteinu c-Fos, který je nepřímým indikátorem aktivity neuronů v mozku [74].

Také se zjistilo, že peptid CART(55-102) inhiboval vápníkové kanály v primární kultuře neuronů hipokampu, a spekulovalo se na jeho vazbu k receptoru spřaženému s inhibičním G-proteinem Gi/Go [82].

Kromě toho bylo publikováno, že po centrálním podání peptidů CART docházelo k fosforylaci CREB v některých neuronech hypotalamu, což by opět potvrzovalo vazbu peptidů CART ke GPCR [83]. Dalším účinkem peptidu CART byla fosforylace MAPK/ERK1/2 v hypofyzární buněčné linii AtT-20 [52, 84] (Obrázek 9). Ve studii Yoon a kol. [85] zabývající se vlivem peptidů CART na chování a lokomoci bylo pozorováno, že fosforylace MAPK/ERK1/2 vyvolaná kokainem byla inhibována peptidem CART(55-102) v ACB [85].

Bylo zjištěno, že ¹²⁵I-CART(61-102) se neváže k řadě známých receptorů (opioidní receptory, receptory pro somatostatin, progesteron, cholecystokinin, NPY, oxytocin, TRH a další) [86]. Byla provedena i vazebná studie s ¹²⁵I-CART(61-102) [86, 87] u hypofyzární nádorové buněčné linie AtT-20.



Obrázek 9. Navržené signální dráhy pro peptid CART, upraveno dle [1]. *Shrnutí ze studií zabývajících se buněčnou signalizací, ve kterých peptidy CART aktivovaly nejméně tři signální mechanismy. CART(55-102) inhiboval vápenaté kanály L-typu v neuronech hipokampu [82]. CART(55-102) aktivoval fosforylaci proteinu CREB v hypothalamických neuronech produkujících CRH u sytých a hladových myší [83]. CART(55-102) aktivoval fosforylaci MAPK/ERK1/2 v linii hypofyzárních buněk AtT-20 [84]. Přerušovaná šipka naznačuje, že u tohoto mechanismu není známo, zda je zprostředkován přes G proteiny. Hypotetický receptor pro peptid CART je zde znázorněn modře jako integrální membránový protein.*

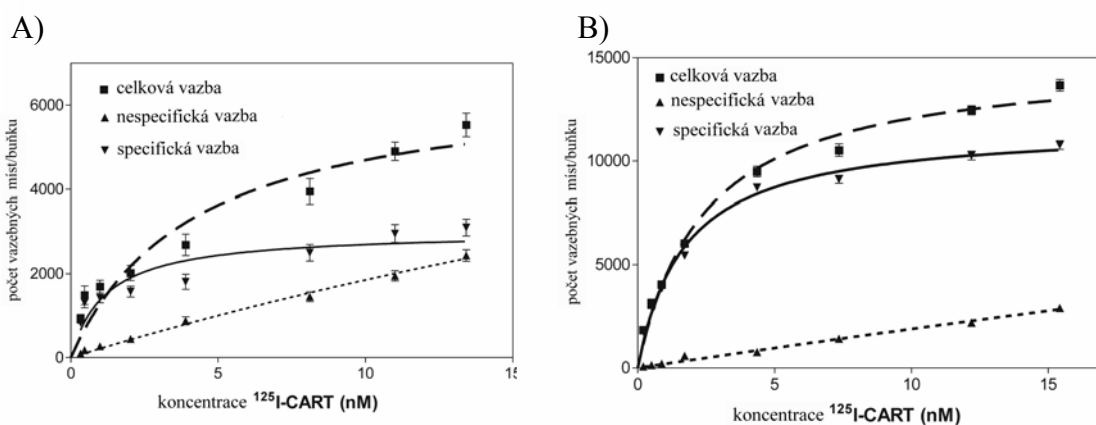
Fúzní protein skládající se z peptidu CART(55-102) a GFP (green fluorescent protein) byl vázán k disociovaným buňkám hypothalamu a hepatocytární buněčné linii HepG2 [88]. Fúzní protein po ICV podání myším významně potlačoval příjem potravy, jeho biologická aktivita tedy zůstala částečně zachována [88].

V naší skupině byla publikována vazba peptidu CART k feochromocytomálním buňkám PC12, jak k nediferencovaným, tak i k diferencovaným v neurální fenotyp a buněčným membránám z těchto buněk [89]. Kompetitivní vazebné experimenty byly provedeny s ^{125}I -CART(61-102), který byl vytěšňován peptidem CART(61-102),

CART(55-102) a diiodovaným peptidem I₂-CART(61-102) u nediferencovaných buněk PC12 a membrán z těchto buněk, a to s rovnovážnou disociační konstantou inhibujícího kompetitoru K_i v nízkém nM rozmezí. Biologická aktivita CART(61-102) zůstala zachována po jeho jodaci na diiodovaný I₂-CART(61-102) [89]. Počet vazebných míst B_{max} u saturačních vazebných experimentů nediferencovaných buněk činil 2228 ± 529 vazebných míst/buňku a pro diferencované byl B_{max} dokonce pětkrát vyšší a to 11194 ± 261 vazebných míst/buňku. Rovnovážná disociační konstanta K_d, určená ze saturačních vazebných pokusů pro nediferencované PC12 buňky, činila 0,48 nM. Pro diferencované buňky měla K_d hodnotu 1,90 nM [89]. Výsledné saturační křivky pro diferencované a nediferencované buňky PC12 lze vidět na Obrázku 10.

V naší vazebné studii [89] s buněčnou linií PC12 nebyl ¹²⁵I-CART(61-102) vytěsněn žádným z následujících peptidů: CCK, α-MSH, TRH, angiotensin II, neurotensin, leptin. Identifikace receptorů peptidů CART, která by umožnila studium mechanismů a funkce peptidu CART, nebyla zatím úspěšná.

Vazba peptidu ¹²⁵I-CART(61-102) k primární buněčné linii připravené z potkaního nucleu accumbens [90] byla snížena v přítomnosti analogů GTP, na rozdíl od analogů ATP, které neměly na afinitu vliv. Toto zjištění může také poukazovat na to, že receptor pro CART je receptor spřažený s G proteinem [90].



Obrázek 10. Saturační vazba ¹²⁵I-CART(61-102) k nediferencovaným a diferencovaným buňkám PC12 [89]. Buňky byly inkubovány s rostoucí koncentrací ¹²⁵I-CART(61-102) v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba) 2x10⁻⁶ M CART(61-102) při 37 °C po 30 minut. Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové a nespecifické vazby. Saturační vazebné křivky byly vypočítány metodou nelineární regrese pro a) nediferencované PC12 a b) buňky PC12 diferencované pomocí NGF v neurony.

1.4.5. Fragmenty peptidu CART

Přirozeně se vyskytujícími biologicky aktivními formami peptidu CART jsou: CART(55-102) a CART(61-102) [2], které vznikají účinkem prohormon konvertázy PC2 z propeptidu CART. V klasické práci Thima a kol. [2] peptidy CART(54-102), (55-102), (61-102) a (62-102) po ICV podání hladovým myším inhibovaly příjem potravy téměř stejně [2]; peptid CART(55-102) byl mírně účinnější než ostatní peptidy [2].

CART(1-26) a CART(1-27) jsou N-koncové fragmenty propeptidové části, které jsou považovány za biologicky neaktivní a slouží jako negativní kontroly pro fyziologickou funkci CART(55-102) [91]. Z nadledvin se podařilo izolovat delší formy peptidů CART, konkrétně CART(1-89) a (10-89) [91]. Peptid CART(10-89) inhiboval příjem potravy u myši po ICV podání [92]. Syntetické N-koncové fragmenty CART(55-76) a (62-76) po ICV podání inhibovaly příjem potravy u laboratorních potkanů, CART(62-76) s větším účinkem než CART(55-76). U C-koncového fragmentu CART(85-102) byla změřena schopnost snižovat lokomoci navozenou morfinem [92].

1.5. Peptid uvolňující prolaktin (PrRP)

1.5.1. Objev a výskyt PrRP a receptor pro PrRP

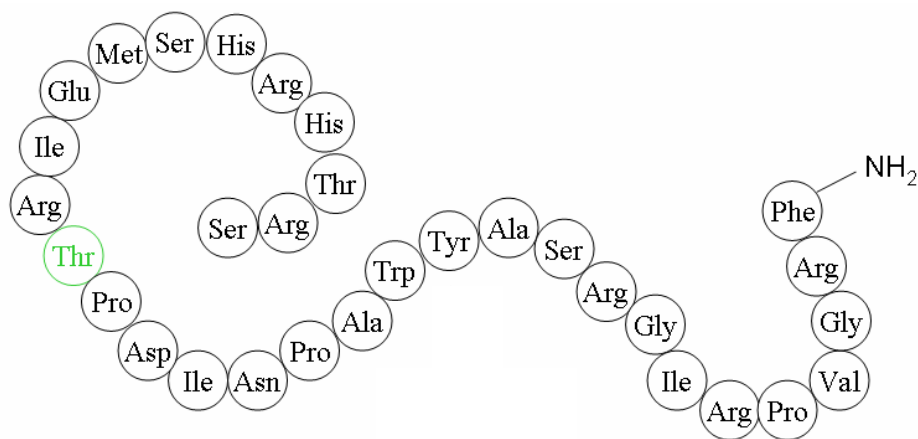
Peptid uvolňující prolaktin (prolactin-releasing peptide - PrRP) byl objeven jako endogenní ligand pro sirotčí receptor GPR10 nebo hGR3 (lidský) spřažený s G-proteinem (potkaní analog UHR-1) v roce 1998 Hinumou a kol. [93]. Byl nalezen v extraktu hovězího hypotalamu pomocí metody „obrácené farmakologie“, jako specifický faktor uvolňující prolaktin (PRL) z adenohypofýzy a proto byl pojmenován peptid uvolňující prolaktin. PrRP je exprimován v neuronech NTS, prodloužené míše a DMH, po aktivaci CCK [94]. Nejvyšší exprese PrRP byla lokalizována v A1/A2 regionech prodloužené míchy a v hypotalamu a pak v NTS, VMN, DMN. V periférii se PrRP nachází v plazmě, dřeni nadledvin [95] v menší míře ve slinivce břišní, varlatech, a v placentě [96]. Hladovění a laktace potlačuje expresi PrRP [97].

Receptor pro PrRP GPR10 je široce zastoupen v celém mozku, ale nejvyšší výskyt je v retikulárním jádru talamu, PVN, periventrikulárním jádru, DMH a NTS a v hypofýze, v periférii jen v dřeni nadledvin. PrRP má také poměrně vysokou afinitu k receptoru

neuropeptidu FF (NPFFR2) [98].

1.5.2. Struktura

PrRP vzniká z preprohormonu, který je u různých živočišných druhů tvořen různým počtem aminokyselin (98 aminokyselin u krávy, 87 u člověka, 83 u krysy a 82 u myši). Preprohormon může být štěpen na dvou různých místech, takže vznikají při posttranslačních úpravách dvě aktivní formy: PrRP31 (složen z 31 aminokyselin) a PrRP20 (složen z 20 aminokyselin). Struktura lidského peptidu je uvedena na Obrázku 11. Potkaní PrRP31 se liší od lidského ve čtyřech aminokyselinách, hovězí PrRP31 ve třech aminokyselinách [99].



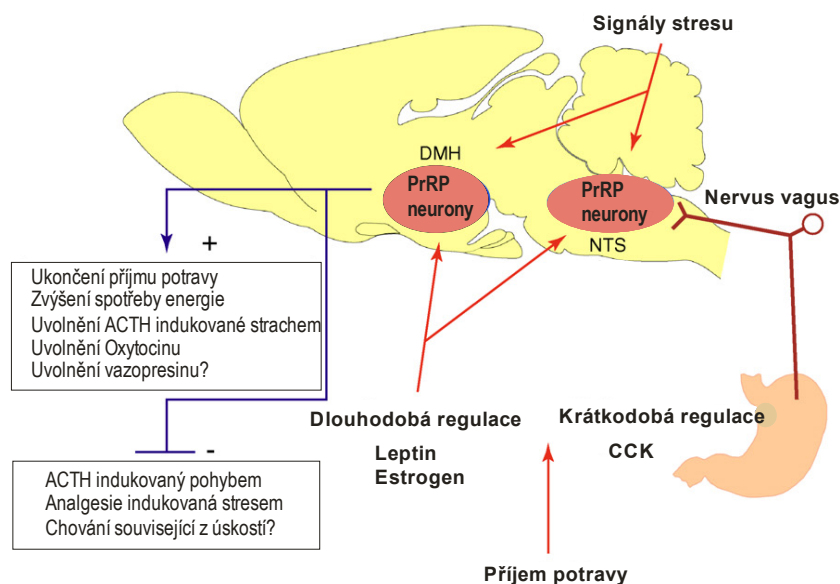
Obrázek 11. Lidský analog PrRP31. Zeleně zvýrazněný threonin označuje počátek PrRP20.

1.5.3. Fyziologická úloha PrRP

V úvodní studii Hinuma a kol. [93] prokázal, že PrRP specificky stimuloval sekreci prolaktinu z buněčné linie RC-4B/C (potkaní hypofyzární linie) a z primárních buněk adenohypofýzy kojících potkaních samic s účinností srovnatelnou s TRH. Morfologické a později fyziologické studie tento poznatek zpochybnily s tím, že PrRP nemůže působit na sekreci prolaktinu přímo, jelikož se nepodařilo prokázat imunoreaktivitu PrRP v eminenci

mediana, odkud se vyplavuje většina hypotalamických neuroendokrinních peptidů do adenohypofýzy [93]. Přesto se ukázalo, že PrRP stimuluje sekreci dalších hypofyzárních hormonů, ACTH, luteinizačního hormonu, hormonu stimulujícího folikuly, ale i oxytocinu a vazopresinu [100].

PrRP má v organismu více funkcí. Nedávno bylo prokázáno, že PrRP inhiboval příjem potravy u laboratorních potkanů [97], což naznačuje, že PrRP hraje roli v regulaci energetické rovnováhy. PrRP má také význam při aktivaci HPA osy, při regulaci stresu, krevního tlaku, při vnímání bolestivých podnětů apod. [101, 102].



Obrázek 12. PrRP v energetickém metabolismu a v reakci na stres. Dlouhodobě působící faktory jako je leptin a estrogen a krátkodobě působící, jako CCK, regulují pozitivně aktivitu neuronů PrRP. Červené šipky označují vstupní signály do PrRP neuronů a modré šipky označují výstupy z PrRP neuronů [94].

1.5.3.1. Vliv PrRP na regulaci příjmu potravy

Neurony se zvýšenou expresí PrRP přijímají nejen krátkodobé signály jako je od CCK, ale i dlouhodobé signály jako je od leptinu a estrogenu (Obrázek 12). Narušení interakce PrRP s GPR10 způsobuje hyperfagii, což vede k obezitě a poruchám metabolismu [94]. PrRP sjednocuje kontrolu energetického metabolismu a reakci na stres.

Vliv PrRP na krátkodobý příjem potravy vyplývá z toho, že CCK aktivuje většinu PrRP/noradrenergických neuronů v NTS a že CCK je neúčinný u myši deficitních na PrRP nebo GPR10 [103].

Bylo prokázáno, že ICV podání PrRP způsobí snížení příjmu potravy, a to nejen u sytých potkanů, ale i u hladových jedinců [97]. Zároveň dochází ke zvýšení tělesné teploty a k vyšší spotřebě kyslíku, což je ukazatelem zvýšeného energetického výdeje [104]. Při současném podání PrRP a leptinu dochází u potkanů k větší redukci příjmu potravy během noci, k většímu úbytku hmotnosti a k vyššímu výdeji energie [105].

Během hladovění a laktace se snižuje exprese PrRP [97]. Většina PrRP neuronů v mozковém kmeni a hypothalamu obsahuje receptory pro leptin [105] a leptin stimuluje fosforylaci STAT3 v PrRP neuronech, zejména v DMH [106] (Obrázek 12). Exprese mRNA pro PrRP je nízká u obézních Zucker potkanů [105], kteří mají nefunkční leptinové receptory.

Estrogen je pravděpodobně také zodpovědný za regulaci PrRP neuronů v prodloužené míše, ale ne v hypothalamu [107]. U diabetických potkanů je exprese mRNA pro PrRP snížena, a podáním inzulínu se exprese mRNA pro PrRP navrácí na původní hladinu [94], což naznačuje, že také inzulín pozitivně reguluje expresi PrRP.

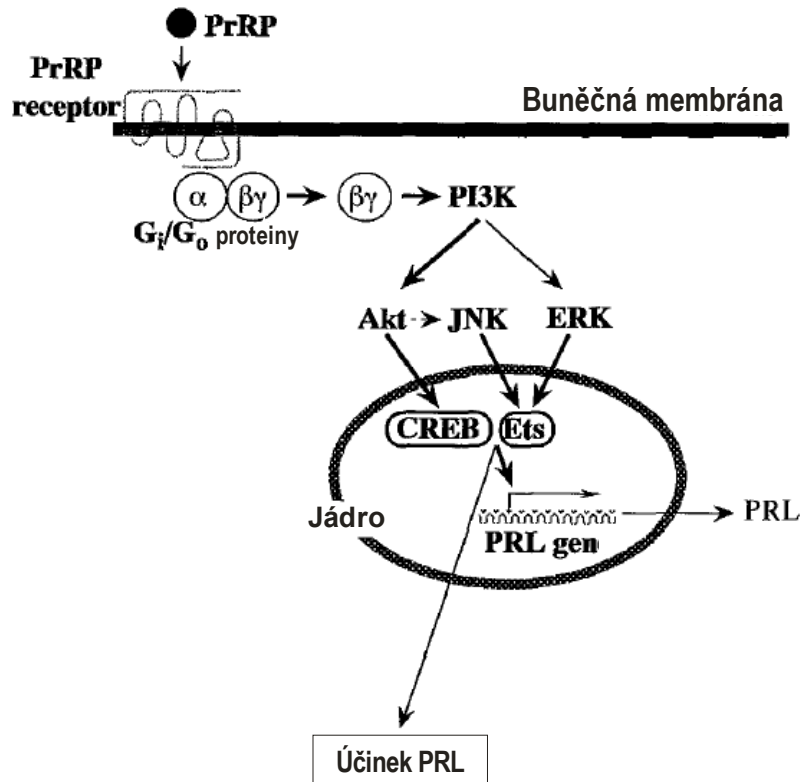
U PrRP-deficientních myši se v hypothalamu neobjevují žádné významné změny v expresi látek, které souvisí s příjmem potravy, jako jsou POMC, CART, AgRP, NPY a orexiny, což naznačuje, že tyto peptidy nemusí být hlavními následnými efektoři PrRP [94].

1.5.4. PrRP a buněčná signalizace

Buněčná signalizace PrRP má dvě hlavní cesty, a to přes tyrosin protein kinázu MAPK/ERK1/2 (Mitogen-Activated-Protein Kinases/Extracellular signal – Regulation Kinase 1/2) a serin/threonin-proteinkinázu (Akt/proteinkinázu B) s následnou aktivací

transkripčních faktorů CREB (cAMP Response Element-Binding) a Ets (E-twenty six) [108, 109] (Obrázek 13).

Akt je hlavní činitel signální kaskády řízené fosfoinositid-3 kinasy (PI3K). Akt signalizace je spojena s přežíváním a růstem buněk, PrRP má funkci nejenom kontroly exprese PRL, ale také zachování počtu buněk produkujících PRL [110].



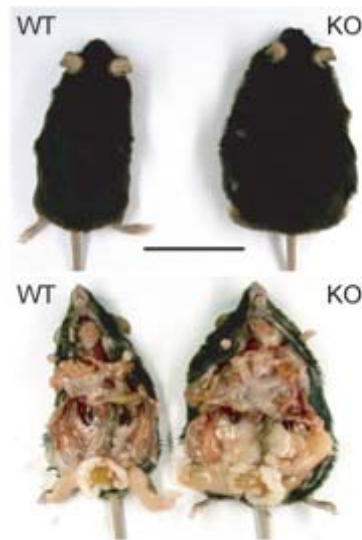
Obrázek 13. Signalizace PrRP [109]. Po aktivaci PrRP receptoru přes Gi/Go proteiny jsou přes PI3K aktivovány MAPK/ERK1/2 a Akt dráhy. Akt může aktivovat JNK (Jun N-terminal kinase), které pak fosforyluje Ets (E-twenty six – transkripční faktor). Ets je přímo aktivován ERK. Kromě toho Akt aktivuje CREB.

1.5.5. Myši s vyřazeným genem pro PrRP či GPR10

Myši s vyřazeným genem pro GPR10 receptor (GPR10 KO) mají v porovnání s normálními jedinci vyšší hmotnost, nižší energetický výdej, více tuku, avšak mají nižší příjem potravy [111]. U myši, které neměly funkční receptory GPR10, nebyl prokázán vliv PrRP, ale ani CCK na příjem potravy. Tento objev vedl k poznatku, že PrRP by prostřednictvím svého receptoru mohl být klíčovým prostředníkem pro funkci CCK, který

navozuje pocit sytosti po jídle [112]. Byl proveden experiment, kde myši (samci a samice) bez GPR10 receptoru měly ve věku 15 týdnů zřetelně vyšší váhu, než stejně staré myši kontrolní. Samice byly obéznější než samci i díky sníženému energetickému výdeji [111].

Myši s vyřazeným genem pro PrRP (PrRP KO) v dospělosti trpí hyperfagií, jsou obéznější než jedinci s funkčním genem pro PrRP a trpí glukosovou intolerancí a rezistencí k inzulínu [106] (Obrázek 14).



Obrázek 14. Myši s modifikovaným genem pro PrRP. *WT (wild type)* – myši s genem pro PrRP; *KO* – myši s vyřazeným genem pro PrRP [106].

1.5.6. PrRP a reakce na stres a bolest

Všechny stresové podněty jsou aktivovány v PrRP neuronech v NTS, DMH a v prodloužené míše (Obrázek 12). PrRP aktivuje vylučování kortikoliberinu (CRH), který pozitivně reguluje vylučování adrenokortikotropního hormonu (ACTH) [101], který dále reguluje vylučování glukokortikoidů (kortizolu a kortikosteronu) z kůry nadledvin.

Je však zřejmé, že úloha PrRP v neuroendokrinní reakci na stres je závislá na povaze stresujícího podnětu. Stresující podněty mohou vyvolat různé reakce a to nejen v neuroendokrinním systému, ale také v dalších systémech: v kardiovaskulárním (zvýšení krevního tlaku), metabolickém (změny v příjmu potravy, zvýšení spotřeby kyslíku, změna v metabolismu glukosy), v bolesti (analgezie nebo hyperalgezie – zvýšená citlivost na bolest) a v behaviorálním (úzkost, poruchy spánku) [94].

1.5.7. Analogy PrRP

V těle se přirozeně vyskytují peptidy PrRP31 a PrRP(13-31) neboli PrRP20, jejichž biologické účinky jsou srovnatelné. Peptidy vzniklé zkrácením PrRP20 od N-konce mají sníženou afinitu k receptoru; při nahrazení amidové skupiny za skupinu karboxylovou na C-konci peptidu pak došlo k úplné ztrátě schopnosti vázat se na receptor [113]. Nejkratší biologicky aktivní fragment je C-koncový PrRP(25-31) – heptapeptid, jeho účinek je však nižší ve srovnání s PrRP31 [113]. Boyle a kol. v zatím jediné strukturně-aktivitní studii analogů PrRP (19-31), neboli PrRP13 ukázali, že zvláště důležité pro biologickou aktivitu PrRP jsou Arg³⁰ a Phe³¹ [114]. Zatím však chybí antagonist PrRP, který by napomohl pochopení fyziologických funkcí PrRP.

1.6. Modely myší obezity

Zvířecí modely jsou jednou z významných složek biologického, lékařského, veterinárního a farmakologického výzkumu. Používají se z důvodů znalosti lidského a myšího genomu jako hlavní nástroj ke studiu obezity. Zvířata nám umožní získat odpovědi v krátkém čase, protože 10 dní v životě potkana či myši je přibližně 1 rok u lidí při srovnávání změny tělesné hmotnosti. Obezitu je možné u zvířat navodit pomocí změn neuroendokrinních, dietních a genetických. Jedním z prvních modelů obezity byl model s lézemi v ARC způsobenými glutamátem sodným u myši a potkanů [115]. Obezitu u zvířat lze dosáhnout také ovariektomií [116], krměním vysokokalorickou stravou (dietou vyvolaná obezita – DIO) [117], a genetickými manipulacemi (např. modely myši s vyřazeným genem) [118].

1.6.1. Obezita vyvolaná glutamátem sodným (MSG)

Subkutánní (SC) - podkožní injekce glutamátu sodného (MSG) novorozeným myším způsobují zničení ARC v hypotalamu, což vede k rozvoji obezity [115]. MSG myši (myši, jejichž obezita je vyvolaná glutamátem sodným) se také vyznačují zmenšením oblasti ARC, rozšířením třetí mozkové komory a zúžením eminentia mediana [119]. Bylo zjištěno, že celkový počet buněk v ARC u MSG myši byl o 75 % nižší než u kontrolních myši, zatímco MSG významně neovlivnil počet buněk v dalších oblastech mozku [120]. MSG

snížil hladiny mRNA pro NPY a AgRP, (následek destrukce NPY/AgRP neuronů) [119]. MSG myši mají zvýšené sérové koncentrace leptinu, bývají asi o 10 % kratší než kontroly a jsou neplodné [115]. V naší studii jsme zjistili, že MSG myši měly až osmkrát více bílého tuku proti kontrolám, také se u nich rozvinula hyperglykemie a hyperinzulinémie [121].

1.7. Buněčné linie související s účinky peptidu CART a PrRP

1.7.1. Feochromocytální buňky PC12

Tato buněčná linie byla získána z potkaního feochromocytomu, nádoru chromafinních buněk z dřeně nadledvin [122]. Za běžných podmínek jsou nediferencované buňky kulovitého tvaru, podobné potkaním chromafinním buňkám. PC12 buňky pěstované v přítomnosti NGF se přestávají dělit, zastavují růst, podobají se sympatickým neuronům a vytvářejí nervovou síť [122]. Diferencované buňky vytvářejí shluky 30 až 120 nm dlouhých granulí a 30 až 70 nm dlouhých váčků (vezikul), které se podobají granulím a váčkům v neuronech, uvolňujících adrenalin a acetylcholin. Diferenciace je reverzibilní, neboť po odstranění NGF buňky do 24 hodin ukončují proces diferenciace a do 72 hodin se začínají opět dělit a vracet se ke svým původním vlastnostem [122].

Diferenciaci této buněčné linie v neurální fenotyp lze docílit i použitím peptidu PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) [123]. Působením syntetického glukokortikoidu dexamethasonu vyzrávají buňky PC12 v typický fenotyp normálních chromafinních buněk dřeně nadledvin, které vykazují zvýšenou aktivitu tyrosin hydroxylázy [124].

1.7.2. Hypofyzární buněčné linie (RC-4B/C, GH3 a AtT-20)

1.7.2.1. RC-4B/C

Epiteliální buněčná linie RC-4B/C byla získána ze tří roky starého nezhoubného nádoru přední hypofýzy potkaních samců [125]. Tato linie zahrnuje všech pět hypofyzárních typů buněk: somatotropy, laktotropy, gonadotropy, adenokortikotropy a tyreotropy, které produkují růstový hormon, prolaktin (PRL), luteinizační hormon (LH),

hormon stimuluje folikuly (FSH), adenokortikotropní hormon (ACTH) a tyreotropin (TSH) [126]. Ze strukturálního hlediska jsou tyto buňky shodné s diferencovanými buňkami přední hypofýzy, avšak oproti hypofyzárním potkaním buňkám obsahuje tato linie o 20 % větší počet buněk produkujících LH a o 12 % méně buněk produkujících růstový hormon [125]. Počet buněk vylučujících PRL, FSH, ACTH a TSH je podobný ve vypěstované linii i potkaní hypofýze. Buněčná linie obsahuje o polovinu méně receptorů pro hormon uvolňující gonadotropiny (gonadotropins-releasing hormon – GnRH), přičemž afinita k jeho receptoru je stejná [126].

1.7.2.2. GH3

Epiteliální buněčná linie GH3 byla získána z potkaního zhoubného nádoru hypofýzy. Linie obsahuje buňky produkující růstový hormon, a to ve větší míře než primární hypofyzární buňky, a dále produkuje PRL [127]. Bylo zjištěno, že PrRP přes GPR10 receptor aktivuje v buňkách GH3 MAPK/ERK1/2, které zprostředkovávají signalizační kaskádu regulující aktivitu mnoha transkripčních faktorů [108].

Přidání epidermálního růstového faktoru (EGF) do živného média ovlivňuje růst buněčné linie [128]. Buňky GH3 exprimují dlouhou signalizující izoformu leptinového receptoru [129]. Tato linie byla hojně využívána pro studie regulace a charakterizace sodíkových, draslíkových a kalciových kanálů [130].

1.7.2.3. AtT-20

Hypofyzární buněčná linie AtT-20 pochází z myšího tumoru přední hypofýzy. Buněčná linie produkuje β -endorfin a ACTH. Přestože se schopnost produkce hormonu ACTH po nějaké době ztrácí, jsou buňky AtT-20 stále schopné vyvolat nádorové bujení u zdravých myší [131]. Buněčná linie AtT-20 je využívána pro zkoumání vylučování ACTH a β -endorfinů [131].

1.8. Vazebné experimenty

1.8.1. Teorie vazebných experimentů

Vazba ligandu na receptor je složitý proces, který zahrnuje také konformační změny. Vazebnými experimenty lze zjišťovat afinitu ligandu k receptoru a počet receptorů. Předpokladem vazebných experimentů je ustanovit rovnováhu mezi ligandem, receptorem a komplexem ligand-receptor [132]. Rovnováhy je dosaženo, když se vyrovná rychlost, při které vzniká komplex ligand-receptor, a rychlost, při které se komplex rozpadá. Veličina vztahující se k tomuto ději se nazývá rovnovážná disociační konstanta K_d [M] [132].

$$K_d = \frac{[ligand] \cdot [receptor]}{[ligand \cdot receptor]}$$

K_d je taková koncentrace ligandu, kdy je obsazena polovina receptorů. Je-li K_d nízká, pak je afinita ligandu k receptoru vysoká a je potřeba pouze malá koncentrace ligandu k navázání na receptor. Vysoká hodnota K_d značí nízkou afinitu ligandu k receptoru [132].

1.8.2. Specifická, nespecifická a totální vazba

Specifická vazba (B_{sp}) odpovídá množství radioligandu navázaného na určitý receptor. Vazba radioligandu na jiné místo než na receptor (převážně jde o interakce s membránou, vazbu na jiné receptory, vazbu na filtry) je označována jako nespecifická vazba (B_{nsp}) a stanovuje se při velkém přebytku neznačeného ligandu proti radioligandu. Po zablokování téměř všech specifických vazebných míst velkým přebytkem neznačeného ligandu se radioligand váže již jen na nespecifická vazebná místa. Celková vazba (B_t) udává celkové množství navázaného radioligandu bez přítomnosti neznačeného ligandu [132].

$$B_t = B_{sp} + B_{nsp}$$

↓

$$B_{sp} = B_t - B_{nsp}$$

1.8.3. Saturační vazebné experimenty

Saturační vazebné experimenty slouží k určení afinity ligandu k receptoru, která je charakterizována rovnovážnou disociační konstantou K_d , a k určení počtu receptorů (B_{max}). Saturační experimenty se provádějí při vzrůstající koncentraci radioligandu [132].

Pro vypočítání B_{sp} je nutné spočítat B_{nsp} pro každou koncentraci radioligandu. Experimentálně se určí B_{nsp} při každé koncentraci radioligandu a specifická vazba se pak vypočte jako celková vazba minus nespecifická vazba.

Hodnota nespecifické vazby by měla činit méně než 50 % z vazby celkové, v ideálním případě méně než 25 %, jinak je nutné upravit podmínky experimentu [132].

1.8.4. Kompetitivní vazebné experimenty

Kompetitivní vazba se provádí při konstantní koncentraci radioligandu v přítomnosti různých koncentrací neznačeného ligandu neboli kompetitoru, a to při splnění rovnovážných podmínek. Pomocí kompetitivních vazebných pokusů je stanovena hodnota EC_{50} (efektivní koncentrace 50, označovaná také jako IC_{50}), která značí koncentraci kompetitoru, při které je vytěsněna polovina radioligandu z vazebných míst [132].

K_i označuje rovnovážnou disociační konstantu neznačené látky a vypočte se podle rovnice Chenga a Prusoffa [133], je to koncentrace neznačeného ligandu, která se váže na polovinu vazebných míst v rovnováze za nepřítomnosti radioligandu či jiných kompetitorů [132].

$$K_i = \frac{EC_{50}}{1 + \frac{[radioligand]}{K_d}} \quad [M]$$

Hodnota EC_{50} se stanoví kompetitivními vazebnými experimenty a hodnota K_d saturačními vazebnými experimenty, které byly provedeny za podobných podmínek jako kompetitivní vazebné experimenty [132].

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

- **Studium vztahu mezi strukturou a aktivitou fragmentů peptidu CART**

Peptid CART je neuropeptid vyskytující se v CNS i periférii a účastní se regulace příjmu potravy v hypotalamu, jehož receptor dosud není znám. Jedním z cílů této práce bylo studovat fragmenty tohoto peptidu jak v testech *in vitro* na feochromocytomálních buňkách PC12, tak *in vivo* v testu příjmu potravy u myší, a tak určit význam jednotlivých částí molekuly peptidu CART pro jeho vazbu k potenciálnímu receptoru a uchování biologické aktivity.

- **Studium vztahu mezi účinky peptidu CART a cholecystokininu (CCK-8) u štíhlých myší**

O vztahu peptidu CART a ostatních peptidů je velmi málo známo. CCK-8 je periferní peptid regulující příjem potravy v CNS, kde by mohl interagovat s peptidem CART. Vyslovili jsme hypotézu, že peptid CART a CCK-8 mohou synergisticky spolupracovat v regulaci příjmu potravy i aktivaci proteinu Fos jak v oblasti hypotalamu, tak v mozkovém kmeni. Tyto předpoklady byly testovány u štíhlých myších samců.

- **Studium vztahu mezi účinky peptidu CART, CCK-8 a neuropeptidu Y (NPY) u štíhlých a obézních MSG myší**

Injekce glutamátu sodného (MSG) novorozným myším způsobují selektivní léze v *nucleu arcuato*, které vedou k pozdějšímu vývoji obezity a významným metabolickým změnám a inaktivitě CCK. Cílem práce bylo zjistit účinek peptidu CART a CCK-8 na příjem potravy u obézních MSG myší s nefunkčním ARC.

- **Charakterizace účinku analogů peptidu uvolňujícího prolaktin (PrRP) na hypofyzární buněčné linie**

PrRP je nedávno objevený neuropeptid, jehož hlavní funkce v organismu dosud není plně objasněna. V poslední době je spojován s regulací energetického metabolismu. Cílem práce bylo zjistit, zda hypofyzární buněčné linie GH3, AtT-20 a RC-4B/C obsahují receptor pro PrRP, a poté charakterizovat účinek analogů PrRP ve vazebných a funkčních testech *in vitro*.

3. MATERIÁL

Akt (pan) (C67E7) králičí mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA,USA
BPTI	Sigma, St. Louis, MO, USA
BSA	Serva GmbH, Heidelberg, Německo
Buněčná linie – (PC12, RC-4B/C, GH3 a AtT-20)	Manassas, VA, USA
CART(54-102), (61-102)	Novo Nordisk, Kodaň, Dánsko
CCK-8	NeoMPS, Strasbourg, Francie
CREB (86B10) myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA,USA
Devazepid (Devazepide, L364,718)	Dar od ML Laboratories, Liverpool, VB
DMEM – high glukose (4,5 g/l)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Duracrol	Spofa - Dental, ČR
EDTA	LACHEMA, Brno, ČR
EGF	Sigma, St. Louis, MO, USA
EGTA	Serva GmbH, Heidelberg, Německo
ELISA kit	BioVendor, Brno, ČR
FBS Standard quality	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Femto Pierce SuperSignal	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Fosfo-CREB (S133) (1B6)-myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA,USA
Fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) -myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA,USA
p44/42 MAPK (Erk1/2) (3A7)-myší mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA,USA
Fosfo-Akt (Ser473) (D9E)-králičí mAb	Cell signalling Technology, Beverly MA,USA
Fyziologický roztok	Infusia, Hořátev, ČR
Glutamát sodný	Sigma, St. Louis, MO, USA
Goat serum	Gibco, Grand Island, NY, USA
HAM'S F-10	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
HIS Donor horse serum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
HEPES	Sigma, St. Louis, MO, USA
Iodo-Gen	Pierce Chemicals Co., Rockford, IL, USA
Ketamin	Spofa, ČR
L-glutamin 200mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko

Na(¹²⁵ I)	MP Biomedicals, Illkirch, Francie
NGF	Sigma, St. Louis, MO, USA
NPY	NeoMPS, Strasbourg, Francie
PEI	Sigma, St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd	Sigma, St. Louis, MO, USA
Poly-L-lysin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Penicilin/streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko
Protimyší IgG peroxidázový konjugát	Sigma, St. Louis, MO, USA
Protikráličí IgG peroxidázový konjugát	Sigma, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640	Sigma, St. Louis, MO, USA
SDS-PAGE elektroforéza	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Standard dual color	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Triton X-100	Koch-Light Lab. Colnbrook, Berks, VB
Vector Stain Elite ABC kit	Burlingame, CA, USA
Xylazin	Spofa, ČR

Dále byly používány v laboratoři běžně dostupné chemikálie v analytické čistotě dodávané firmou Lachema, a.s. ČR a Sigma-Aldrich, USA.

4. METODY

4.1. Peptidy CART a jejich fragmenty a peptidy PrRP

Peptidy CART(61-102) a CART(55-102) byly zakoupeny od firmy Bachem (Bubendorf, Švýcarsko). Přehled struktur jejich krátkých fragmentů je v Tabulce 6 v kapitole výsledky 5.2.1. Fragmenty 1, 3, 4 a 6 byly syntetizovány na Univerzitě v Gdaňsku [134], zatímco fragmenty 2, 5 a 7 až 14 byly syntetizovány na pevné fázi [134] v Ústavu organické chemie a biochemie, AVČR, v.v.i., Praha. A jejich sekvence jsou uvedeny v Tabulce 6.

Stejnou metodou zde byly syntetizovány peptidy PrRP31, PrRP20 a PrRP13, jejich struktura je uvedena v Tabulce 3. Všechny zkoumané peptidy byly rozpuštěny v deionizované vodě a uchovány v alikvotech v -20 °C.

Tabulka 3. Přehled testovaných analogů PrRP. Peptidy byly syntetizovány metodou syntézy na pevné fázi.

Analog	Sekvence
PrRP31	S-R-T-H-R-H-S-M-E-I-R-T-P-D-I-N-P-A-W-Y-A-S-R-G-I-R-P-V-G-R-F-NH ₂
PrRP20	T-P-D-I-N-P-A-W-Y-A-S-R-G-I-R-P-V-G-R-F-NH ₂
PrRP13	W-Y-A-S-R-G-I-R-P-V-G-R-F-NH ₂

4.1.1 Jodace peptidu CART(61-102) a PrRP31

Peptidy CART(61-102) a PrRP31 byly jodovány v laboratoři Radioizotopy, ÚOCHB AVČR, v.v.i., Praha. CART(61-102) byl jodován Na¹²⁵I (MP Biomedicals, Illkirch, Francie) s použitím Iodogenu (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) [135] v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,2 obsahujícím 0,15 M NaCl 15 minut při laboratorní teplotě. Separace nejodovaného, mono-jodovaného a di-jodovaného peptidu CART(61-102) byla provedena na RP-HPLC s použitím kolony Luna 3µm fenyl-hexyl 150x4.6mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) a 20 až 25 % gradientem acetonitrilu ve vodě s 0,1% trifluoroctové kyseliny po dobu 60 minut [134]. Molekulové hmotnosti jodovaných

peptidů byly měřeny na MALDI-TOF, Reflex IV hmotnostním spektrometru (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

PrRP31 byl jodován Na^{125}I či NaI s činidlem Iodogen v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,2. Jodace probíhala 15 minut při pokojové teplotě. Radioaktivní nebo neradioaktivní nejodovaný, mono-jodovaný a di-jodovaný PrRP31 byly separovány pomocí RP-HPLC s použitím kolony Agilent Prep-C18 Scalar $5\mu\text{m}$, $250\times 4.6\text{mm}$ (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) a 20 až 30 % gradientu acetonitrilu ve vodě s 0,1% trifluoroctové kyseliny po dobu 60 minut. Jako mobilní fáze byl použit 20 až 30% gradient acetonitrilu ve vodě s 0,05 % kyselinou trifluoroctovou.

Mono-jodovaný ^{125}I -CART(61-102) a ^{125}I -PrRP31 byly uchovávány v alikvotech při $-20\text{ }^\circ\text{C}$ a spotřebovány pro vazebné experimenty v průběhu jednoho měsíce.

4.2. Pěstování buněčných linií

Všechny buněčné linie byly zakoupeny od firmy ATCC (Manassas, VA, USA). Kultivace buněk probíhala za standardních podmínek pro pěstování buněčných linií. Buňky byly pěstovány v CO_2 inkubátoru (MCO 18AIC, Sanyo, Osaka, Japonsko), při teplotě $37\text{ }^\circ\text{C}$ v atmosféře 95 % vzduchu a 5 % CO_2 . Do kultivačního média (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko) byly přidány L-glutamin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko) a penicilin/streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko), obojí do konečné koncentrace 2 mM.

4.2.1. Pěstování buněčných linií RC-4B/C, GH3 a AtT-20

Buněčné linie RC-4B/C a AtT-20 byly pěstovány v růstovém mediu DMEM o pH = 7,4, v mediu pro RC-4B/C bylo přidáno 10% fetální telecí sérum (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Rakousko) a 2,5 ng/ml epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor – EGF) (Sigma, St. Louis, MO, USA) a pro AtT-20 10 % koňského séra (Invitrogen Grand Island, NY, USA). Linie GH3 byla pěstována v růstovém mediu Ham's F-10 o pH = 7,4 s přídatkem 15% koňského séra a 2,5% fetálního telecího séra.

Pro vazebné pokusy jsme použili 24-jamkové destičky s průměrem jamky 15 mm (Nuclon, NUNC, Roskilde, Dánsko), které byly potažené polyethyleniminem (PEI) (Sigma,

St. Louis, MO, USA). Buňky byly pěstovány tři dny do optimální hustoty 4×10^5 buněk na jamku a byly spočítány před pokusem i po něm v Bürkerově komůrce.

4.2.2. Pěstování buněčné linie PC12

Buněčná linie PC12 byla pěstována v růstovém médiu RPMI1640 o pH = 7,4 s přidavkem 10% koňského séra a 5% fetálního telecího séra. Pro dosažení exponenciálního růstu byla buněčná linie pasážována jednou týdně. K vazebným pokusům byly použity buď nediferencované buňky nebo PC12 buňky diferencované na neurony v přítomnosti nervového růstového faktoru o koncentraci 50 ng/ml média (Sigma, St. Louis, MO, USA) po sedm dní.

4.3. Izolace membrán z nediferencovaných buněk PC12

Buněčné membrány nediferencovaných buněk PC12 byly izolovány z buněk, které byly zamrazeny při -70 °C. Buňky (přibližně 25 mil. buněk na izolaci) byly homogenizovány ve 30 ml izolačního pufru (20 mM HEPES pH 7,4, EDTA 2 mM) pomocí skleněného homogenizátoru s teflonovým dříkem desetkrát po dobu 30 sekund. Poté byla suspenze zředěna izolačním pufrům na 60 ml a opět homogenizována šestkrát po 30 sekund a odstředěna (centrifuga Jouan C3i/CR 3 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) po dobu 10 minut při $1000 \times g$ a 4 °C. Supernatant byl pak dále odstředěn (ultracentrifuga Beckmann Optima™ L-00XP-Ultracentrifuga, typ rotoru 90-TI) po dobu 45 minut při $100000 \times g$ a 4 °C. Sediment byl resuspendován v homogenizačním pufru (20 mM HEPES pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂) a alikvoty byly uchovány při -70 °C.

4.3.1. Stanovení množství bílkovin

Koncentrace bílkovin byla stanovena podle Bradfordové [136]. Odpovídající koncentrace byla odečtena z kalibrační křivky hovězího sérového albuminu (BSA). Výsledná hodnota pak byla průměrem tří koncentrací proteinu.

4.4. Provedení vazebných experimentů

4.4.1. Optimalizace podmínek vazebných experimentů

Podmínky vazebných experimentů na buňkách PC12 byly optimalizovány již dříve [89]. Pro vazebné experimenty na buněčných liniích RC-4B/C, GH3 a AtT-20 byla hledána optimální teplota a doba inkubace, optimální počet buněk na jamku a nakonec optimální složení vazebného pufru. Byla zkoušena inkubace při teplotách: 4 °C, 25 °C a 37 °C v časech: 30 až 180 minut s 50 – 500 tisíci buňkami na jamku. Následně byl zkoumán vliv přítomnosti 2 mM Ca²⁺, 2 mM EDTA, nebo 2 mM EGTA a 0,1 mg/ml BPTI ve vazebném pufru (20 mM HEPES pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5mM MgCl₂, 5,5mM glukosa a 1 mg/ml BSA)

4.4.2. Kompetitivní vazebné experimenty

Pro vazebné pokusy na buněčných liniích PC12, RC-4B/C, GH3 a AtT-20 byly použity 24-jamkové destičky s průměrem jamky 15 mm (Nuclon, NUNC, Roskilde, Dánsko), které byly potažené PEI. Buňky PC12 nediferencované dosáhly optimální hustoty 5x10⁵ buněk na jamku za dva dny. Diferencované buňky byly pěstovány na tuto hodnotu sedm dní, médium bylo měněno třetí a pátý den. Dále byly použity buněčné membrány z nediferencovaných buněk PC12. Buňky RC-4B/C, GH3 a AtT-20 byly pěstovány tři dny do optimální hustoty 4x10⁵ buněk na jamku.

Kompetitivní vazebné experimenty byly prováděny podle principů Motulského a Neubiga [132]. Bylo použito duplikátů a pokusy byly provedeny alespoň třikrát pro každý peptid v různých koncentracích.

4.4.2.1. Kompetitivní vazba peptidu CART(61-102) na buněčné membrány z nediferencovaných buněk PC12

Kompetitivní vazebné pokusy byly provedeny v optimalizovaných vazebných podmínkách [89]. Vazebný pokus byl ukončen rychlou filtrací na Brandlově přístroji (Biochemical and Development Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). Byly použity filtry GF/C (Whatman, Maidstone, Velká Británie), které byly předem namočené v promývacím

pufu (10 mM HEPES pH 7,4, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 5 mM MgCl₂ a 5,5 mM glukosa) s PEI (1g PEI/200 ml promývacího pufu). Radioaktivita vázaná na buňkách byla proměřena pomocí gama-čítače (Wizard 1470 Automatic Gamma Counter, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA). Celková vazba činila 3 až 10 % z celkové přidané radioaktivity. Nespecifická vazba v kompetitivních vazebných experimentech činila méně než 15 % z celkové vazby.

4.4.2.2. Kompetitivní vazba na celé buňky PC12 na destičkách

Vazebné pokusy s buňkami byly provedeny za stejných podmínek jako s buněčnými membránami (kapitola 4.4.2.1.). Destičky byly inkubovány s 10^{-10} M ¹²⁵I-CART(61-102) samotným nebo v kombinaci s analogy peptidů CART o koncentraci v rozmezí 10^{-11} – 10^{-3} M ve vazebném pufu o celkovém objemu 250 μ l na jamku po dobu 30 minut při 37 °C. Po inkubaci byla každá jamka promyta promývacím pufrem a buňky solubilizovány v 0,1 M NaOH. Buněčné lyzáty byly odebrány do zkumavek, a radioaktivita vázaná na membrány byla změřena gama-čítačem. B_t činila 2 až 5 % z přidané radioaktivity. B_{nsp} v kompetitivních vazebných experimentech činila méně než 15 % celkové vazby. Linearita fragmentů 8, 12 a 13 (fragmenty s volnými cysteinovými zbytky) byla ověřena v simulovaných podmínkách před i po vazebných pokusech pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie.

4.4.2.3. Kompetitivní vazba na celé buňky RC-4B/C, GH3 a AtT-20 na destičkách

Buňky byly inkubovány s 10^{-10} M ¹²⁵I-PrRP31 samostatným nebo v kombinaci s nezařazenými peptidy: PrRP31, PrRP20 a PrRP13 nebo I-PrRP31 o koncentraci v rozmezí 10^{-10} – 10^{-4} M v optimalizovaných podmínkách ve vazebném pufu o celkovém objemu 250 μ l na jamku po dobu 60 minut při 25 °C. Po inkubaci byla každá jamka promyta promývacím pufrem a buňky solubilizovány jako v kapitole 4.4.2.2.

4.4.3. Saturační vazba na celé buňky RC-4B/C, GH3 a AtT-20 na destičkách

Stanovení B_t bylo provedeno ve vazebném pufu s koncentracemi ¹²⁵I-PrRP31 v rozmezí 0,5 – 8 nM v objemu 250 μ l na jamku. Pro stanovení B_{nsp} pro jednotlivé

koncentrace značeného peptidu byl současně přítomen neznačený peptid PrRP31 v koncentrací 10^{-5} M. Vazba probíhala 60 minut při 25 °C. Po inkubaci byla jamka promyta promývacím pufrem a buňky byly solubilizovány jako v kapitole 4.4.2.2.

4.4.4. Analýza dat získaných z vazebných pokusů a statistika

Vazebné křivky byly vyhodnocovány pomocí programu Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA) s použitím modelu nelineární regrese za předpokladu jednoho vazebného místa. Vyhodnocením vazebných křivek byla získána hodnota IC_{50} . Inhibiční konstanty (K_i) byly spočítány dosazením IC_{50} do rovnice Chenga a Prusoffa [133]. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány a jsou uvedeny jako průměrná hodnota \pm střední chyba průměru (SEM). Statistika vazebných experimentů byla prováděna v metodou one-way ANOVA. Rozdíly byly považovány za významné, pokud $P < 0,05$.

4.5. Sběr vzorků pro stanovení buněčné signalizace

4.5.1. Sběr vzorků pro stanovení receptoru PrRP pomocí Western blotu u buněčných linií RC-4B/C, GH3 a AtT-20

Buňky byly pěstovány po dobu 5 dní v lahvích 75 cm². Buňkám pak bylo odsáto médium a byly třikrát promyty promývacím pufrem (viz. kapitola 4.4.2.1.). Poté byl do každé lahve přidán solubilizační pufr (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% glycerol, 2% dodecylsulfát sodný (SDS), 0,01% bromfenolová modř, 5% β -merkapt ethanol, 50 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4) a po 30 minutách v chladu byl lyzát buněk sklizen do mikrozkušavek a uchován v alikvotech při -70 °C.

4.5.2. Sběr vzorků pro stanovení buněčné signalizace (pMAPK/ERK1/2, pCREB a pAkt) na buněčných liniích RC-4B/C a PC12

Vzorky pro stanovení buněčné signalizace v těchto liniích byly připraveny z lyzátu buněk, které byly napěstovány na 6-jamkových nebo 24-jamkových destičkách potažených polyethyleniminem (PEI). Optimální hustota buněk byla 4×10^5 na jamku (24 jamková destička) a 9×10^5 na jamku (6 jamková destička).

Asi 18 hodin před pokusem bylo buňkám vyměněno médium za médium bez séra. Další den bylo u buněčné linie RC-4B/C do každé jamky přidáno buď samotné médium bez séra nebo PMA (phorbol-myristoyl-acetát; jako pozitivní kontrola), PrRP31, PrRP20, PrRP13, TRH vždy do konečné koncentrace 10^{-5} M. Obsah byl inkubován za stálého míchání při 37 °C 5 minut.

U buněčné linie PC12 bylo do každé jamky přidáno buď samotné médium bez séra nebo CART(61-102) 10^{-6} M, NGF 50 ng/ml, PACAP 10^{-7} M. Obsah byl inkubován za stálého míchání při 37 °C 10 minut. Po inkubaci byla reakční směs odsáta a promyta promývacím pufrem o teplotě 4 °C. Solubilizace byla provedena po dobu 5 minut v lyzačním pufru (viz. kapitola 4.5.1.). U buněk PC12 byl použit lyzační pufr bez NaF a Na_3VO_4 . Poté byly vzorky centrifugovány 15 min při 12000 x g a teplotě 4 °C. Alikvoty byly uchovány při -20 °C.

4.6. Metoda Western blot

4.6.1. SDS-PAGE

Elektroforéza v 4/12% ním polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) byla prováděna na přístroji Mini-Protean 3 (Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Lyzáty buněk byly nejprve sonikovány dvě minuty, poté byly zahřívány při 100 °C dvě minuty a naposled byly centrifugovány pět minut při 500 x g a 25°C. U stanovení MAPK/ERK1/2 byla jako pozitivní kontrolní protein použita fosforylovaná MAPK (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA). Pro stanovení receptoru PrRP (GPR10) byl jako pozitivní kontrola použit lyzáty Jurkat buněk. Následně byla prováděna elektroforéza, která probíhala při konstantním napětí ve dvou krocích, nejprve při 100 V po dobu 10 minut a poté při 150 V po dobu 50-60 minut.

4.6.2. Přenos proteinů na PVDF membránu a nitrocelulózovou membránu

Pro stanovení signalizačních fosforylovaných proteinů byly proteiny přeneseny z gelu na membránu PVDF-ImmobilonTM-P (Sigma-Aldrich, USA), pro stanovení GPR10 na nitrocelulózovou membránu (Bio-Rad, Herkules, CA, USA). Přenos proteinů probíhal v

blotovacím pufru o pH 8,3 (25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% methanol, s přidavkem 0,1% SDS při přenosu GPR10) při konstantním napětí 30 V v 6 °C přes noc.

4.6.3. Detekce proteinů na PVDF membráně a nitrocelulózové membráně

Po přenosu byly membrány promyty v promývacím pufru (TBS) (20 mM Tris, 140 mM NaCl) s 0,1% Tween-20 5 minut při pokojové teplotě. Poté byly membrány inkubovány s blokujícím puftrem (5% netučné sušené mléko, TBS, 0,1% Tween-20, 5 mM Na₃VO₄ a 50 mM NaF) 1 hodinu při pokojové teplotě. Poté byly třikrát promyty promývacím puftrem TBS po 5 minutách. Promyté membrány byly inkubovány 1 hodinu s primární protilátkou (Tabulka 4) zředěnou blokovacím puftrem. Poté byly membrány třikrát promyty promývacím puftrem po 5 minutách. Promyté membrány byly inkubovány se sekundární protilátkou (Tabulka 4). Následně byly membrány opět promyty třikrát po 5 minutách v promývacím pufru TBS. Postup byl proveden podle doporučeného protokolu firmy Cell signalling technology (Beverly MA, USA).

Chemiluminiscence po aplikaci činidla Femto (Pierce SuperSignal, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), byla detekována v CCD kameře LAS-3000 (Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf, Germany).

Tabulka 4. Přehled protilátek a ředění pro stanovení pMAPK/ERK1/2, pAkt, pCREB a GPR10.

Protilátky	Základní látka
Primární GPR10	Myší-GPR10 králičí polyklonální Ab (Novus Biological, Littleton, CO, USA); ředění: 1:1000
Primární Fosfo MAPK	Fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) myší mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:2000
Primární MAPK	p44/42 MAPK (Erk1/2) (3A7) myší mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:2000
Primární Fosfo Akt	Fosfo-Akt (Ser473) (D9E) králičí mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:500
Primární Akt	Akt (pan) (C67E7) králičí mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:500
Primární Fosfo-CREB	Fosfo-CREB (S133) (1B6) myší mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:1000
Primární CREB	CREB (86B10) myší mAb (Cell signalling Technology, Beverly MA, USA); ředění: 1:1000
Sekundární proti myší	Peroxidázový konjugát připravený v králíku (Sigma, St.Louis, MO, USA); ředění: 1:1200
Sekundární proti králičí	Peroxidázový konjugát připravený v koze (Sigma, St.Louis, MO, USA); ředění: 1:12000

4.7. Stanovení hormonů v mediu buněčných linií RC-4B/C, GH3 a AtT-20

Buněčné linie RC-4B/C, GH3 a AtT-20 byly pěstovány tři dny na hustotu 5×10^5 buněk/jamku. U buněčných linií GH3 a RC-4B/C bylo vyměněno médium za médium bez séra 2 h před pokusem. Poté bylo do každé jamky přidáno buď samotné médium bez séra, nebo PrRP31 či TRH na konečnou koncentraci 10^{-5} M, vždy v duplikátech. Inkubace probíhala 1h při teplotě 37 °C.

Po inkubaci bylo médium odebráno do zkumavek a centrifugováno 5 min při 500 x g a 4 °C (Jouan centrifuge C3i/CR 3 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Alikvoty byly uchovány v -20 °C. Vzorky byly po celou dobu práce uchovávány na ledu.

Stanovení uvolněných hypofyzárních hormonů v kultivačním médiu bylo provedeno pomocí kitu MILLIPLEX™ MAP (Millipore, St Charles MO, USA) podle pracovních protokolů od výrobce. Prolaktin byl dále měřen s pomocí RIA kitu rPRL (Izotop, Budapešť, Maďarsko).

4.8. Experimentální zvířata a obezita vyvolaná glutamátem sodným (MSG)

Myši samci C57Bl/6 byli chováni v akreditovaném zvěřinci ÚOCHB AV ČR při teplotě 22 ± 2 °C, měli volný přístup k potravě i pití; rytmus světlo/tma byl 12/12 hodin. Se zvířaty bylo zacházeno podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.).

Inbrední samci C57Bl/6 sloužili jako model štíhlých myši. Pro model obezity vyvolané glutamátem sodným byl novorozeným myším C57Bl/6 (chov ÚMG AV, ČR, Praha) injikován podkožně (SC) glutamát sodný (Sigma, St. Louis, USA) v dávce 4 mg/g hmotnosti myši denně od 2. do 8. postnatálního dne. Jako kontroly myši s obezitou vyvolanou MSG sloužily stejně staré myši. Myši byly krmeny standardní dietou St-1 (Mlýn Kocanda, Praha, ČR), která obsahovala 66 % sacharidů, 25 % proteinů a 9 % tuků a jejíž energetická hodnota byla 3,4 kcal/g. Hmotnost myši a příjem potravy byly zaznamenávány pravidelně jednou týdně od 6. do 16. týdnu věku.

4.8.1. Odběr a hmotnost orgánů a krve/séra a jejich biochemické stanovení

Myši byly usmrceny cervikální dislokací a byla jim odebrána krev. Z celé krve bylo po oddělení krevního koláče získáno sérum po centrifugaci 15 minut při 3000 x g a 10 °C bylo sérum uchováno v alikvotech při -20 °C.

Z myši byly odebrány tyto orgány: játra, mozky a tuk: nitrobřišní, gonadální a podkožní, tento tuk byl zvážen a spojen. 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 myši byla navíc změřena nasoanální délka a délka ocasu. Koncentrace leptinu v krevním séru byly stanoveny pomocí ELISA kitu

(BioVendor, Brno, Česká republika). Hladina glukosy byla změřena glukometrem (Glucocard, Arkray, Kyoto, Japonsko).

4.8.2. Histologie mozku

Histologie mozku byla provedena u třech kontrolních a třech MSG myší. Po anestezii (IP ketamin/xylazin) (dávky viz kapitola 4.9.1.) proběhla perfuze perfuzním roztokem (0,1 M fosfátový pufr pH 7,4, obsahující: 4% paraformaldehyd, 0,1% glutaraldehyd a 10% kyselina pikrová). 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 o 7,4, 48 hodin při 4 °C. Před krájením byly mozky rychle zmrazeny v izopentanu (– 40 °C), poté byly umístěny do kryostatu (Reichert, Německo) na 1 hodinu při –17 °C. Řezy mozku o tloušťce 35 µm byly krájeny z celého hypotalamu pak přeneseny do studeného 0,1 M fosfátového pufru o 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 [137]. 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.

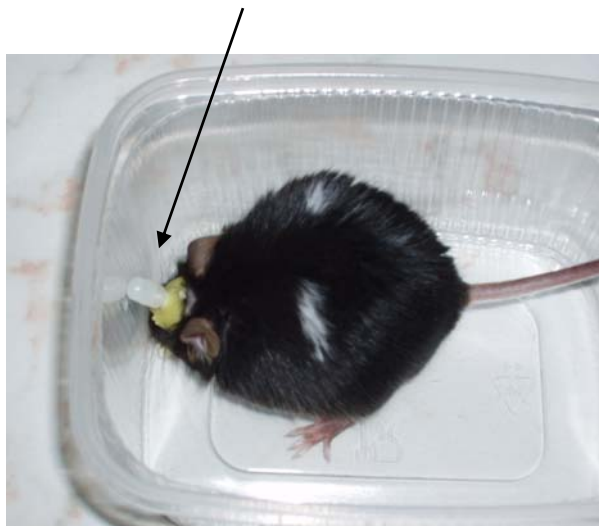
4.9. Stanovení příjmu potravy u myší

4.9.1. Zavedení ICV kanyl

Tato metoda byla provedena podle Maletínské a kol. [121]. Ve věku 16 týdnů byla kontrolním a MSG myším zavedena kanyla. Myši byly během operace v anestezii (IP injekce ketaminu/xylazinu: 100 mg/kg ketaminu, 16 mg/kg xylazinu (Spofa, ČR)). K fixaci hlavy byl použit stereotaxický přístroj a kanyla (Plastic One, Roanoke, VA, USA) byla zavedena do třetí mozkové komory (AP (*anterior posterior*) 2 mm od bregmy, V (vertikální) 3 mm). Okolo kanyly byla aplikovaná dentální pryskyřice (Spofa-Dental, ČR), rozpuštěná v duracrolu (Spofa-Dental, ČR). Po ztvrdnutí pryskyřice byla vsunuta vnitřní kanyla, a to z důvodu ucpávání vnější kanyly (Obrázek 15).

Po operaci byly myši umístěny do samostatných klecí a měly týden na zotavení s volným přístupem k potravě a pití. Poté se prováděl pokus na příjem potravy. Při zavedení ICV kanyl do třetí mozkové komory jsme spolupracovali s RNDr. Renatou Haugvicovou, CSc., Chambon a. s. Praha.

Vnitřní kanyla zavedená do třetí mozkové komory.



Obrázek 15. Zavedení ICV kanyly do třetí mozkové komory

4.9.2. IP a ICV podání látek

Všechny látky byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku. CCK-8 a jeho analogy podány IP individuálně nebo kombinovaně, CCK-8 - v dávkách 0,4 – 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0,2 ml/myš), devazepid a L365, 260 v dávce 1 mg/kg (0,2 ml/myš).

Individuální a kombinované ICV podání peptidu CART a nebo NPY bylo pro peptid CART(61–102) v dávkách 0,1 – 0,5 $\mu\text{g}/\text{myš}$ (5 $\mu\text{l}/\text{myš}$) a NPY v dávce 5 $\mu\text{g}/\text{myš}$ (5 $\mu\text{l}/\text{myš}$).

Kombinované podání NPY a CCK bylo provedeno tak, že nejdříve se NPY podával v dávce 5 $\mu\text{g}/\text{myš}$ (5 $\mu\text{l}/\text{myš}$) a následně po 45 minutách se podával IP CCK-8 v dávkách 0,4 – 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0,2 ml/myš). Dávkování látek je popsáno v Tabulce 5.

Všechny peptidy byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku a byly injikovány za pomoci infuzní pumpy po dobu 20 sekund. Vnitřní kanyla byla ponechána na místě (ve třetí komoře) po dobu dalších 20 sekund, aby se zabránilo zpětnému refluxu.

4.9.3. Test příjmu potravy

Před pokusem byly myši v jednotlivých klíčkách a měly volný přístup k potravě i vodě. Před zahájením pokusu byly myši náhodně rozděleny do skupin po 6-8 myších.

V den pokusu byly myši buď hladové 17 hod (pokus 1) nebo syté (pokus 2) a pokus byl vždy zahájen zhruba v 8:00. Po ICV, IP nebo kombinované injekci (viz Tabulka 5) byla myším podána předem zvážená potrava a odečet příjmu potravy se prováděl pravidelně po 30 nebo 60 min po dobu zhruba 6 hod. Během pokusu měly myši volný přístup k vodě. Každá koncentrace peptidu byla testována alespoň dvakrát. Každé zvíře bylo použito pouze jednou a pokus byl opakován s novou sadou myší.

4.9.4. Výpočty a statistika

Všechny parametry jsou prezentovány v tabulkách a grafech. Výsledky z příjmu potravy jsou vyhodnoceny v grafech příjmu potravy na myš. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány pro zjištění směrodatnosti rozdílů mezi skupinami a jsou uvedeny jako průměrná hodnota \pm střední chyba průměru (SEM). Statistika byla prováděna metodou one-way ANOVA, po které pak následoval Tukey post hoc test. Hmotnosti myší byly hodnoceny metodou two-way ANOVA, ve které se hodnotily dva faktory: model myší obezity a týden věku. Pro výpočty byl použit program Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA). Rozdíly byly považovány za významné, pokud $P < 0,05$.

Tabulka 5: Schéma podání látek u myši v experimentu na příjem potravy. Čas = 0 min. – čas kdy byla myšim dána vážená peleta.

Pokus 1: myši byly 17h hladové. Pokus 2: myši byly syté.

Pokus č.1		Schéma podávání látek hladovým myším						
Látka	Dávka IP podání	Čas podání	Látka	Dávka ICV podání	Čas podání	počet zvířat		
Fyz. roztok		-20 min				8		
CCK-8	0.4 µg/kg	-20 min				6		
	4	-20 min				6		
			Fyz. roztok		-15 min	8		
			CART	0.1 µg/myš	-15 min	6		
				0.5	-15 min	6		
CCK-8	0.4 µg/kg	-20 min	CART	0.1 µg/ myš	-15 min	6		
	4	-20 min		0.1	-15 min	6		
	0.4 µg/kg	-20 min		0.5 µg/ myš	-15 min	6		
	4	-20 min		0.5	-15 min	7		
devazepid	1 mg/kg	-45 min				6		
	1	-45 min	CART	0.1 µg/ myš	-15 min	6		
	1	-45 min		0.5	-15 min	6		
L365,260	1 mg/kg	-45 min				6		
	1	-45 min		0.5	-15 min	7		
Pokus č.2		Schéma podávání látek sytým myším						
Látka	Dávka ICV podání	Čas podání	Látka	Dávka ICV podání	Čas podání	Látka	Dávka IP podání	Čas podání
Fyz. roztok		-15 min						
			NPY	5 µg/ myš	-15 min			
CART	0.1 µg/myš	-15 min						
	0.5 µg/myš	-15 min						
CART	0.1 µg/ myš	-15 min	NPY	5 µg/ myš	-15 min			
	0.5 µg/ myš	-15 min	NPY	5 µg/ myš	-15 min			
						Fyz. roztok		-20 min
						CCK-8	0.4 µg/kg	-20 min
							4	-20 min
			NPY	5 µg/ myš	-15 min	CCK-8	0.4 µg/kg	+30 min
							4	+30 min

4.10. Imunohistochemie

4.10.1. Podání látek, perfuze a zpracování mozkové tkáně

Pro stanovení Fos pomocí imunohistochemie byly myši přes noc hladové. Ráno jim byly podány látky: IP CCK-8, a nebo ICV CART (61-102) v dávkách a v časovém harmonogramu, jak je popsáno v kapitole 4.9.2. (n = 5). Šedesát minut po ICV podání byla myším IP podána anestezie (pentobarbital 50 mg/kg) a myši byly perfundovány perfuzním roztokem (viz. kapitola 4.8.2.). Pak byly mozky vyjmuty a zafixovány v perfuzním roztoku přes noc při teplotě 4 °C. Poté byly mozky vloženy na 48 hodin do 0,1 M fosfátového pufru s 30% sacharózou při teplotě 4 °C. Před krájením byly mozky rychle zmrazeny (20 sec) v izopentanu (– 40 °C), poté byly umístěny do kryostatu (Reichert, Německo) na 1 hodinu při – 17 °C. Umístění ICV kanyly ve třetí komoře bylo ověřeno při krájení. Řezy mozku o tloušťce 30 µm byly přeneseny do studeného 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4 a uchovány jako volně plovoucí v chladu při 4 °C.

4.10.2. Imunohistochemie a barvení

Řezy mozku jako volně plovoucí sekce byly třikrát promyty v chladném 0,1 M fosfátovém pufru a následně byly inkubovány s 3% H₂O₂ po dobu 40 min při pokojové teplotě. Řezy byly opět promyty v 0,1 M fosfátovém pufru a dále inkubovány s králičí primární polyklonální protilátkou proti Fos proteinu (1:2000) v 0,1 M fosfátovém pufru (obsahujícím: 4% normální kozí sérum (Gibco, Grand Island, NY, USA), 0,5% Triton X-100 (Koch-Light Lab. Ltd, Colnbrook, Berks, Anglie), a 0,1% azid sodný) po dobu 48 hodin při 4 °C. Poté byly promyty fosfátovým pufrům. Promyté řezy byly inkubovány se sekundární biotinylovanou kozí protilátkou proti králičí IgG protilátce (1:500, VectorStain Elite ABC, vektorové Lab., Burlingame, CA, USA) po 90 min při pokojové teplotě. Opět byly promyty v fosfátovém pufru a pak následně inkubovány s avidin-biotin peroxidázovým komplexem (1:250) po dobu 90 min při pokojové teplotě. Poté byly promyty fosfátovým pufrům a pak 0,05 M acetátovým pufrům o pH 6.0. Následovala vizualizace Fos-IgG-ABC komplexu

pomocí 0,0266% 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochloridu (DAB) (0,0042% H₂O₂ a 2,5% síranu niklu amonného) v prostředí 0,05 M acetátového pufru.

4.10.3. Vyhodnocení

Pro vyhodnocení Fos imunoreaktivity v NTS, PVN, a DMH byl použit identický soubor myší. Fos imunoreaktivní buňky byly počítány v rámci NTS z Bregma - 7.48 mm do Bregma -7.32 mm, v PVN z Bregma -0,7 mm až -0.94 mm a v DMH z Bregma -1.46 mm na - 1.82 mm podle atlasu myšího mozku [137], a to zvláště v každé sadě řezů. Kvantitativní hodnocení bylo provedeno ze snímků pořízených digitálním fotoaparátem Canon (PowerShot S40) a světelným mikroskopem Leica DML. Sčítání Fos-pozitivních neuronů bylo provedeno manuálně dle popsaných podmínek (od každého zvířete byly počítány a analyzovány nezávislé a náhodné snímky).

4.11. Test pohybu ve volném prostoru „open field“ a analgetické účinky pomocí testu „hot plate“

Vzdálenost, kterou myši urazily ve volném prostoru (ukazuje sedativní účinek látek), byla měřena pomocí systému VideoMot (TSE Systems, Bad Homburg, Německo). Myši měly před pokusem volný přístup k potravě i pití, byly umístěny samostatně ve volném prostoru (rozměry dna 1 x 1 m) a jejich pohybová činnost (tj. celková vzdálenost, kterou myš urazila), byla měřena po dobu 10 min. Myšim byl IP podáván CCK-8 (4 g/kg), devazepid (1 mg/kg) a ICV podáván CART(61-102) (0,1 a 0,5 µg/myš), nebo jejich kombinace s časovým harmonogramem, jak je popsáno v kapitole 4.9.2. (5 myší/skupinu).

Analgetická aktivita „hot plate“ horké plotny testuje bolest vyvolanou tepelným drážděním všech čtyř končetin. Myšim byly podávány stejné látky o stejné koncentraci a se stejným harmonogramem jako u testu pohybu ve volném poli (viz výše).

Statistika byla prováděna metodou one-way ANOVA, po které následoval Tukey post hoc test. Pro výpočty byl použit program Graph-Pad Prism Software (San Diego, CA, USA).

5. VÝSLEDKY

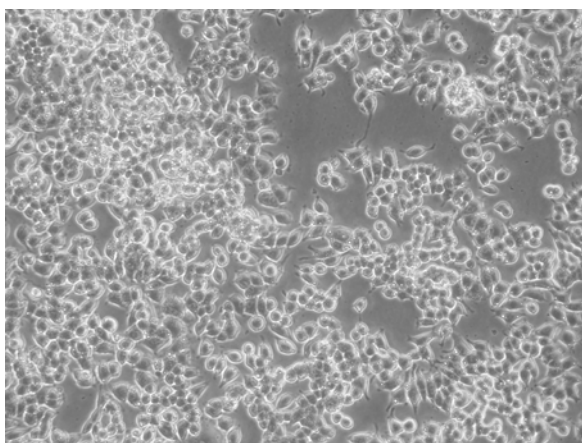
5.1. Buněčné linie

Buněčné kultury byly pěstovány za konstantních podmínek: sterilní prostředí, optimální teplota 37 °C , atmosféra 95 %vzduchu a 5% CO₂ a vhodné médium. Vazebné experimenty byly prováděny na celých buňkách pěstovaných na 24-jamkových destičkách. Pro sběr buněk na stanovení MAPK/ERK1/2, Akt a CREB byly použity 24-jamkové a 6-jamkové destičky. Pro dobrou adhezi buněk byly destičky potaženy PEI, čímž bylo po adhezi buněk na dně jamek zajištěno jejich homogenní rozložení a vyšší odolnost buněk při pokusu.

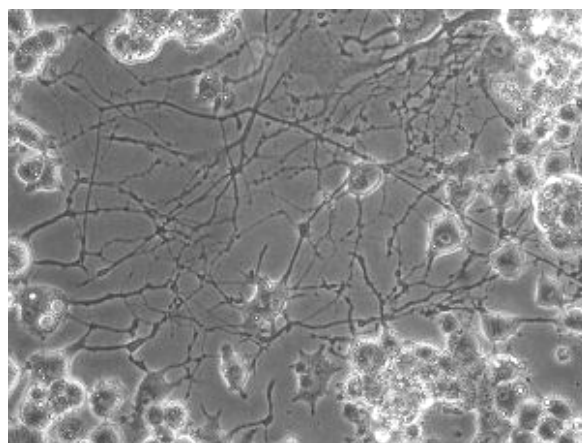
5.1.1. Buněčná linie PC12

5.1.1.1. Pěstování buněčné linie PC12

Buňky PC12 měly kulatý nebo polygonální tvar a sklon růst v malých shlucích, jak je vidět na Obrázku 16A. Buňky PC12 jsou citlivé na přítomnost NGF, po jeho přidání buňky tvořily axony a měnily se v neurální fenotyp (Obrázek 16B). Účinky NGF na PC12 buňky jsou reverzibilní. Diferencované buňky ztrácejí schopnost se měnit v neurální síť po 24 hodinách růstu v mediu bez NGF.



(A)

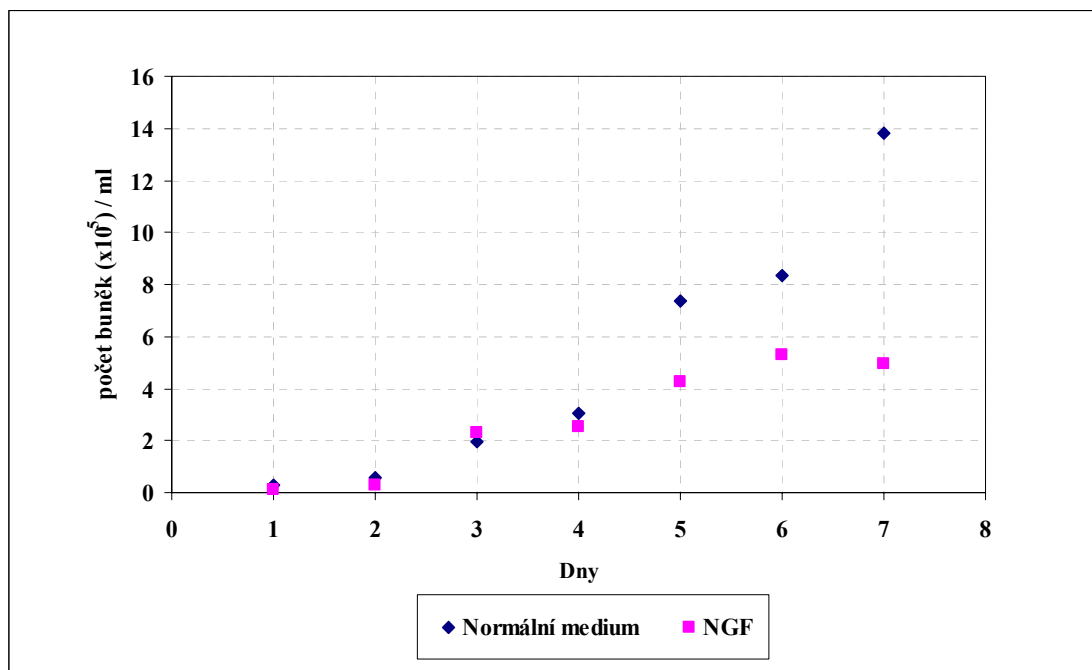


(B)

Obrázek 16. Buněčná linie PC12. (A) Nediferencované PC12, 6. den růstové křivky, hustota buněk 8×10^5 buněk/ml média. (B) Diferencované PC12, 6. den růstové křivky, hustota buněk 5×10^5 buněk/ml média (zvětšeno 20x).

5.1.2. Růstová křivka buněk PC12

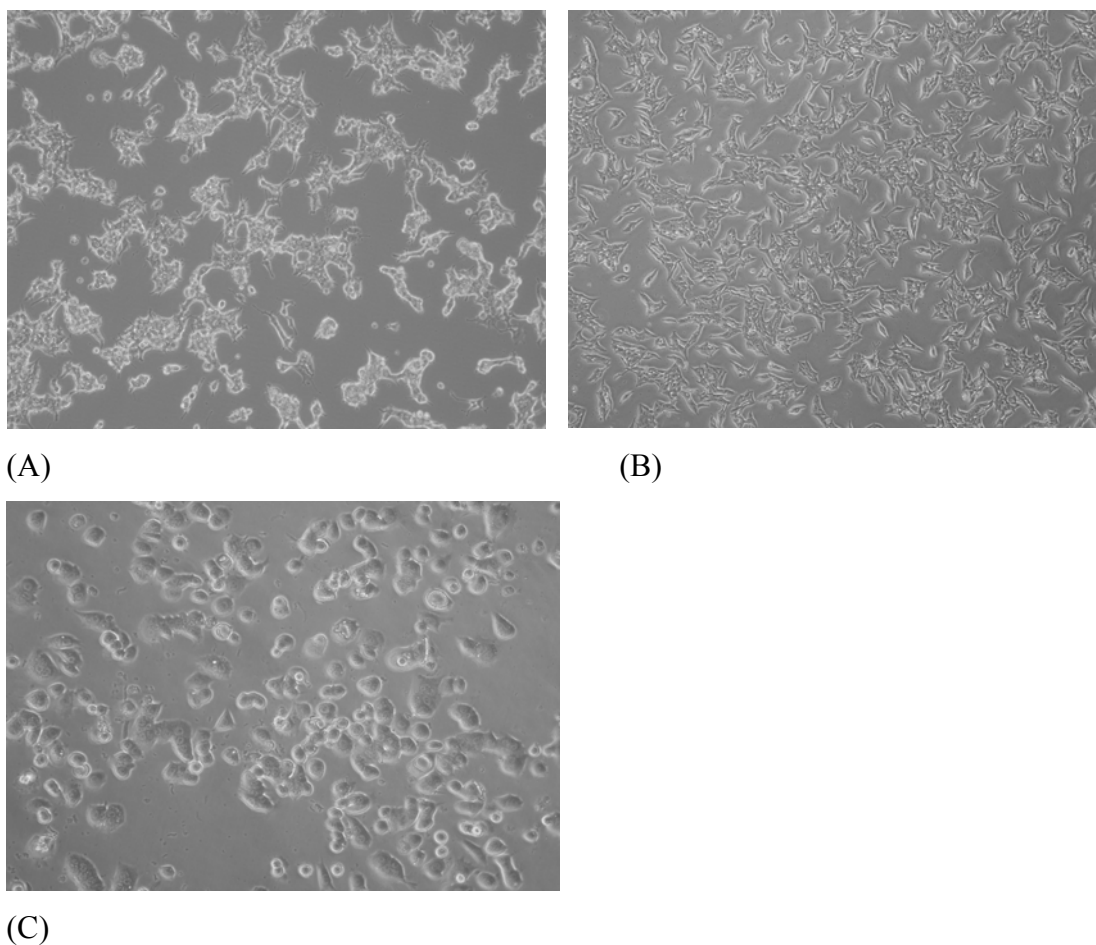
Byly měřeny růstové křivky buněk PC12 nediferencovaných a PC12 diferencovaných pomocí NGF (50 ng/ml). První den bylo do každé jamky nasazeno 40 tisíc buněk. Růstová křivka byla měřena po sedm dní. Nediferencované buňky rostly kontinuálně po celou dobu. Diferencované buňky rostly od čtvrtého dne pomaleji než nediferencované buňky a od šestého dne zastavily růst, jak je vidět na Obrázku 17.



Obrázek 17. Růstová křivka buněk PC12 nediferencovaných a diferencovaných pomocí NGF. Graf znázorňuje závislost počtu buněk/ml média na čase. Růstová křivka nediferencovaných buněk PC12 a diferencovaných buněk PC12 byla měřena od druhého do sedmého dne.

5.1.1.2. Pěstování hypofyzárních buněčných linií

Buňky hypofyzárních buněčných linií RC-4B/C, AtT-20 a GH3 jsou znázorněny na Obrázku 18. Buňky RC-4B/C obsahují pět různých druhů buněk s různými tvary. Při dosažení vysoké hustoty rostly buňky ve vrstvách. Buňky AtT-20 byly protáhlého trojúhelníkového tvaru a tvořily shluky, při vysoké hustotě rostly ve vrstvách. GH3 buňky měly kulovitý tvar a sdružovaly se.



Obrázek 18. Buněčné linie RC-4B/C, AtT-20 a GH3. *Buněčná linie (A) RC-4B/C hustota buněk byla 3×10^5 buněk/ml média; (B) AtT-20 hustota buněk byla 5×10^5 buněk/ml média; (C) GH3 hustota buněk byla 4×10^5 buněk/ml média. Buňky byly vyfoceny po čtyřech dnech růstu (zvětšeno 20x).*

5.2. Strukturně aktivní studie fragmentů peptidu CART

5.2.1. Syntéza fragmentů peptidu CART

Přehled struktur fragmentů peptidu CART použitých v této studii je znázorněn v Tabulce 6 (viz níže) a jejich fyzikálně-chemické vlastnosti jsou publikovány v článku [134]. Peptidy byly syntetizovány metodou na pevné fázi za použití běžných protokolů [134]. Nalezené molekulové hmotnosti peptidů byly shodné s teoretickými a jejich čistota byla vyšší než 90%.

Peptid 1 je N-terminální hexapeptid CART(61-68). Peptidy 2-5 mají sekvenci části peptidu CART(61-102) odpovídajících úsekům mezi cysteiny 68-74, 74-86, 88-94, 94-101, kde byly cysteiny nahrazeny glyciny (peptidy 2-4) nebo glycinem a alaninem (peptid 5) (viz Tabulka 6). Peptidy 6 a 7 jsou cyklické analogy peptidu 3, které mají cysteiny jak na N-, tak na C-konci, liší se pouze v jejich C-koncové skupině, která je buď amid nebo volný karboxyl. Peptidy 9 a 10 mají sekvenci odpovídající úsekům 62 - 86, obsahují tři cysteinové zbytky, jeden z nich je chráněn trvale S- acetamidomethylem (Acm), tj. Cys (Acm)⁶⁸ v peptidu 10 a Cys (Acm)⁷⁴ v peptidu 9, tak je umožněn vznik disulfidových můstků ve dvou různých pozicích (Tabulka 6, Obrázek 21). Peptid 8 je lineární verze peptidu 9. Dalšími lineárními peptidy jsou peptidy 11 a 12, které se skládají z 15 aminokyselin a byly již publikovány [138, 139]. Peptid 11 obsahuje dva volné cysteiny, peptid 12 má cysteiny v pozicích 68 a 74 chráněny skupinou Acm, která tím zabezpečuje linearitu peptidu. A konečně, lineární peptid 13 a jeho cyklický derivát 14 odpovídá C-koncové části CART(87-102), oba tyto peptidy byly již publikovány Dylagem a kol. [92] a byly resyntetizovány na našem ústavu.

Tabulka 6. Přehled fragmentů peptidu CART. Číslování je odvozeno od pre-pro-peptidu CART, červeně jsou označeny cysteiny tvořící disulfidickou vazbu. Acm je zkratka pro acetamidomethyl, Abu pro kyselinu aminomáselnou.

	55	61	68	74	86	88	94	101		
CART (55-102)	VPIYEK	KYGQVPM	CDAGEQ	CAVRK	GARIGKL	CD	CPRGTS	CNSFLLK	CL	
			└──────────────────┘		└──────────┘		└──────────┘			
CART (61-102)		KYGQVPM	CDAGEQ	CAVRK	GARIGKL	CD	CPRGTS	CNSFLLK	CL	
			└──────────────────┘		└──────────┘		└──────────┘			
1.		YGQVPM	-NH ₂							
2.			GDAGEQ	G-NH ₂						
3.				GAVRKG	GARIGKL	G-NH ₂				
4.						GPRGTS	G-NH ₂			
5.								GNSFLLK	AL-OH	
6.				CAVRK	GARIGKL	C-NH ₂				
				└──────────┘						
7.				CAVRK	GARIGKL	C-OH				
				└──────────┘						
8.		62	YGQVPM	CDAGEQ	C(Acm)	AVRKG	GARIGKL	C-NH ₂		
9.			YGQVPM	CDAGEQ	C(Acm)	AVRKG	GARIGKL	C-NH ₂		
				└──────────────────────────────────┘						
10.			YGQVPM	C(Acm)	DAGEQ	CAVRK	GARIGKL	C-NH ₂		
					└──────────┘					
11.			YGQVPM	CDAGEQ	CAV	-OH				
12.			YGQVPM	C(Acm)	DAGEQ	C(Acm)	AV	-OH		
13.							LA	buDCPRGTS	AbuNSFLLK	CL-OH
14.							LA	buDCPRGTS	AbuNSFLLK	CL-OH
							└──────────────────────────────────┘			

5.2.2. Jodace peptidu CART(61-102)

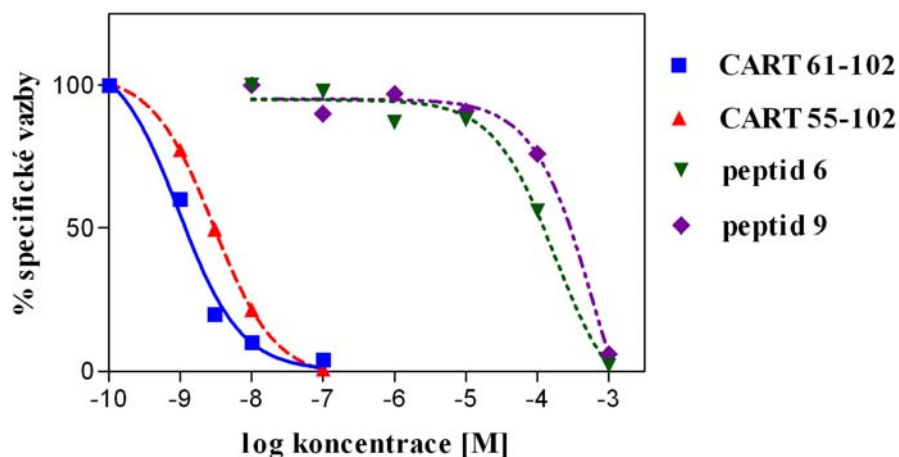
Peptid CART(61-102) byl jodován na Tyr⁶² radioaktivním izotopem ¹²⁵I nebo stabilním neradioaktivním jódem s použitím iodogenu. Pomocí HPLC byly nalezeny čtyři hlavní píky jak pro radioaktivně, tak neradioaktivně jodovaný CART(61-102). Píky byly identifikovány jako mono-jodovaný peptid s oxidovaným methioninem (v pozici 67), mono-

jodovaný peptid, di-jodovaný peptid s oxidovaným methioninem (v pozici 67) a di-jodovaný peptid, a to pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), kde mono-jodovaný CART(61-102) tvořil 50% z celkového množství peptidu. Původní peptid CART(61-102) nebyl ve směsi peptidů po proběhnutí reakce přítomen. Analýza jodovaného a nejodovaného peptidu CART(61-102) pomocí LC-MS/MS potvrdila oxidaci methioninu v pozici 67. Methionin se v průběhu jodace CART(61-102) iodogenem oxidoval na sulfoxid methioninu [134].

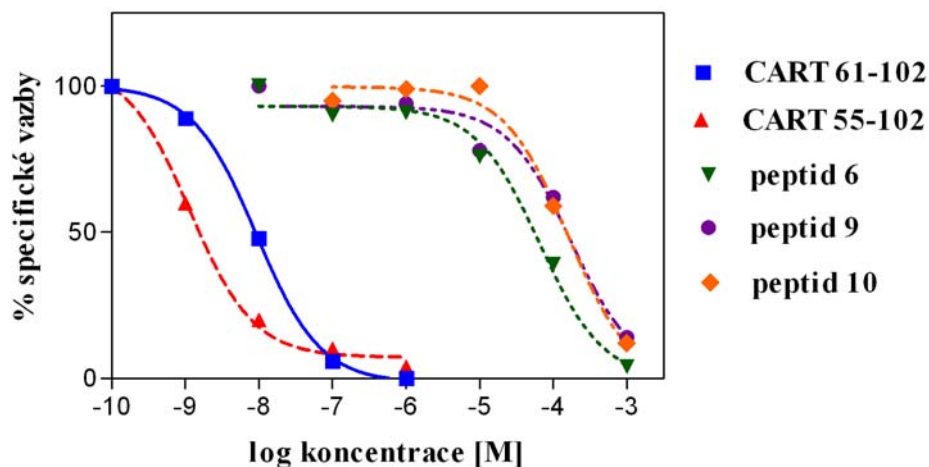
5.2.3. Kompetitivní vazba k nediferencovaným buňkám PC12 a buněčným membránám

Optimalizace podmínek pro kompetitivní vazebné pokusy na buňkách PC12 byla provedena již dříve [89]. Pro kompetitivní vazebné studie byly zachovávány stále stejné podmínky, tedy inkubace při teplotě 37 °C, 30 min s 50 µg proteinu zkumavku/(buněčné membrány) nebo 5x10⁵ buněk/jamku (celé buňky na destičkách). Typické vazebné křivky na buněčných membránách z nediferencovaných buněk a nediferencovaných celých buněk jsou zobrazeny na Obrázcích 19 a 20. Výsledky experimentů vytěsnění radioaktivního ¹²⁵I-CART(61-102) pomocí CART(61-102), CART(55-102) a fragmentů peptidů CART je popsáno v Tabulce 7.

V kompetitivních vazebných pokusech u nediferencovaných buněk PC12 a buněčných membrán se analogy CART(61-102) a CART(55-102) vázaly s inhibiční konstantou K_i v nízkých hodnotách v rozmezí 10⁻⁸ M, peptid 6 v rozmezí 10⁻⁵ M a peptidy 9 a 10 v rozmezí 10⁻⁴ M (viz Tabulka 7, Obrázek 19 a 20). Na Obrázku 21 jsou znázorněny struktury peptidů 6 a 9. Zbývající testované analogy nevytěsnilly ¹²⁵I-CART(61-102) ani v koncentraci 10⁻⁴ M.

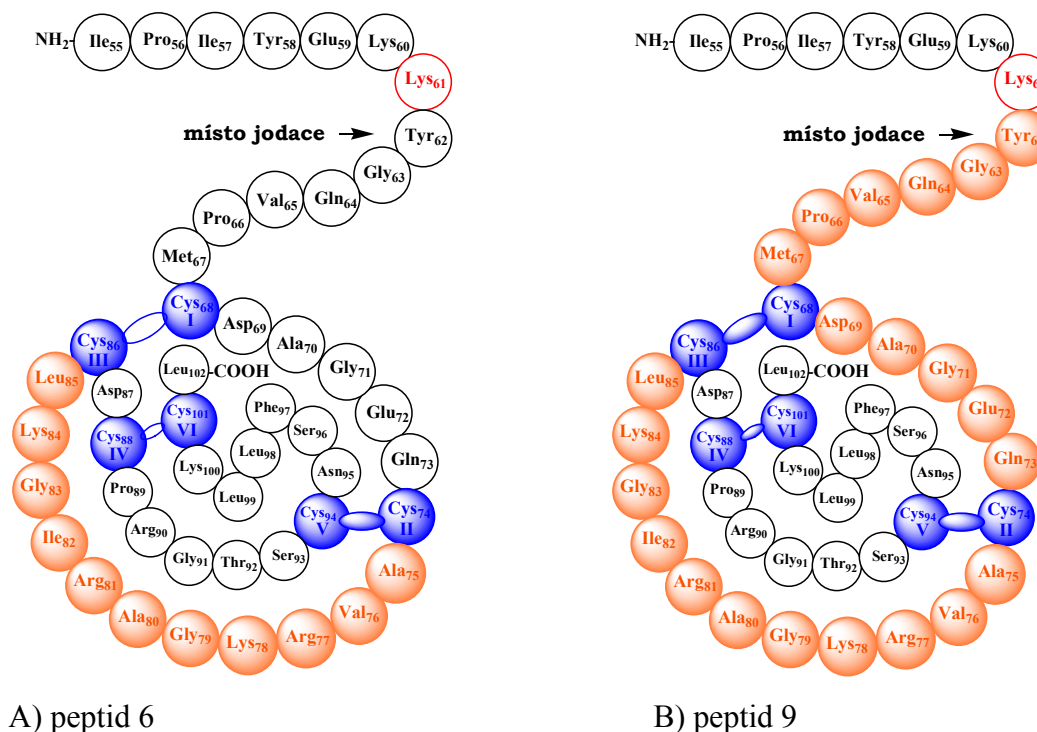


Obrázek 19. Kompetitivní vazebné křivky peptidů CART a jejich fragmentů k membránám z nediferencovaných buněk PC12. ¹²⁵I-CART(61-102) v koncentraci 10⁻¹⁰ M byl vytěsněn vzrůstající koncentrací analogů peptidu CART (30 min inkubace při 37 °C). Výsledky jsou uvedeny v % specifické vazby (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti 10⁻⁶ M CART(61-102)). Reprezentativní křivky z alespoň tří experimentů v duplikátech.



Obrázek 20. Kompetitivní vazebné křivky peptidů CART a jejich fragmentů k nediferencovaným buňkám PC12 ¹²⁵I-CART(61-102) v koncentraci 10⁻¹⁰ M byl vytěsněn vzrůstající koncentrací analogů peptidu CART (30 min inkubace při 37 °C). Výsledky jsou uvedeny v % specifické vazby (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti 10⁻⁶ M CART(61-102)). Reprezentativní křivky z alespoň tří experimentů v duplikátech.

Pomocí hmotnostní spektrometrie byla kontrolována před i po pokusu tvorba disulfidických můstků u peptidů CART a jejich fragmentů, která byla způsobená spontánní oxidací. Po inkubaci bylo pomocí hmotnostní spektrometrie naměřeno přibližně 10 % oxidované formy v látkách 8 a 11 a 20 % v případě peptidu 13.



Obrázek 21. Struktura fragmentů CART. (A) Struktura peptidu 6. Oranžovou barvou je znázorněna vnější strukturální smyčka mezi cysteiny 74 a 86, které jsou spojeny disulfidickou vazbou. (B) Struktura peptidu 9. Oranžovou barvou je znázorněna vnější strukturální smyčka mezi cysteiny, cysteiny v pozici 68 a 86 tvoří disulfidický můstek. Peptid 10 má stejnou strukturu jako peptid 9, neobsahuje však disulfidický můstek.

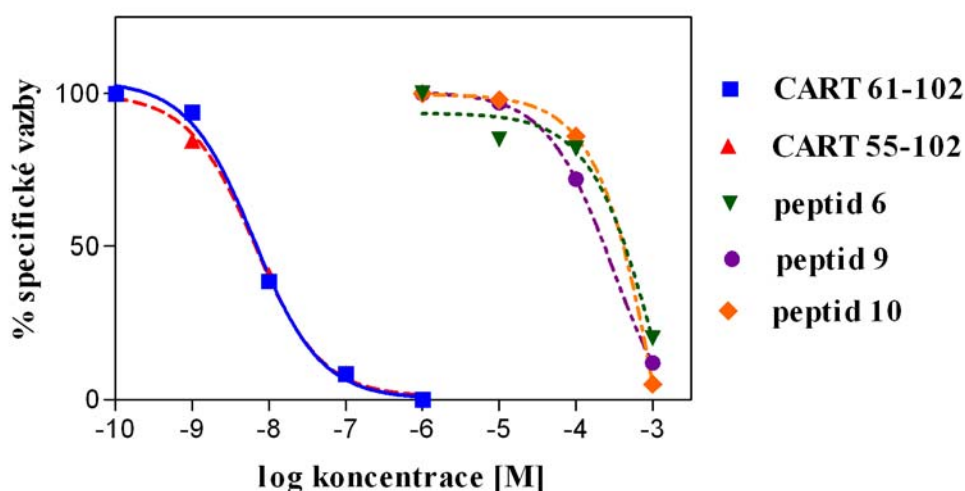
Tabulka 7. Vytěsnění radioaktivního ^{125}I -CART(61-102) pomocí CART(61-102), CART (55-102) a fragmentů peptidu CART na buňkách PC12. Průměr \pm SEM z alespoň tří experimentů. K_i bylo vypočítáno z Cheng-Prusoffovy rovnice (K_d bylo 0,48 nM pro nediferencované buňky a 1,9 nM pro diferencované buňky [89]).

Peptid	K_i (M)		
	Membrány z nediferencovaných buněk PC12	Nediferencované buňky PC12 na destičkách	Diferencované buňky PC12 na destičkách
CART(61-102)	$(2.99 \pm 0.65) \times 10^{-9}$	$(1.36 \pm 2.62) \times 10^{-8}$	$(8.01 \pm 2.14) \times 10^{-9}$
CART(55-102)	$(2.98 \pm 0.33) \times 10^{-9}$	$(1.29 \pm 1.65) \times 10^{-8}$	$(5.40 \pm 0.44) \times 10^{-9}$
1	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
2	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
3	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
4	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
5	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
6	$(1.08 \pm 0.38) \times 10^{-5}$	$(7.29 \pm 2.64) \times 10^{-5}$	$(5.00 \pm 0.26) \times 10^{-4}$
7	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
8	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
9	$(3.98 \pm 0.49) \times 10^{-4}$	$(3.96 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	$(4.09 \pm 0.06) \times 10^{-4}$
10	$(4.14 \pm 0.56) \times 10^{-4}$	$(1.62 \pm 0.49) \times 10^{-4}$	$(1.26 \pm 0.35) \times 10^{-4}$
11	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
12	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
13	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$
14	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$	$\gg 10^{-4}$

5.2.4. Kompetitivní vazba k diferencovaným buňkám PC12

Buněčná linie PC12 byla úspěšně diferencovaná v neurální fenotyp pomocí NGF, jak bylo popsáno dříve [122]. CART(61-102), CART(55-102) a fragmenty peptidů 9 a 10 se

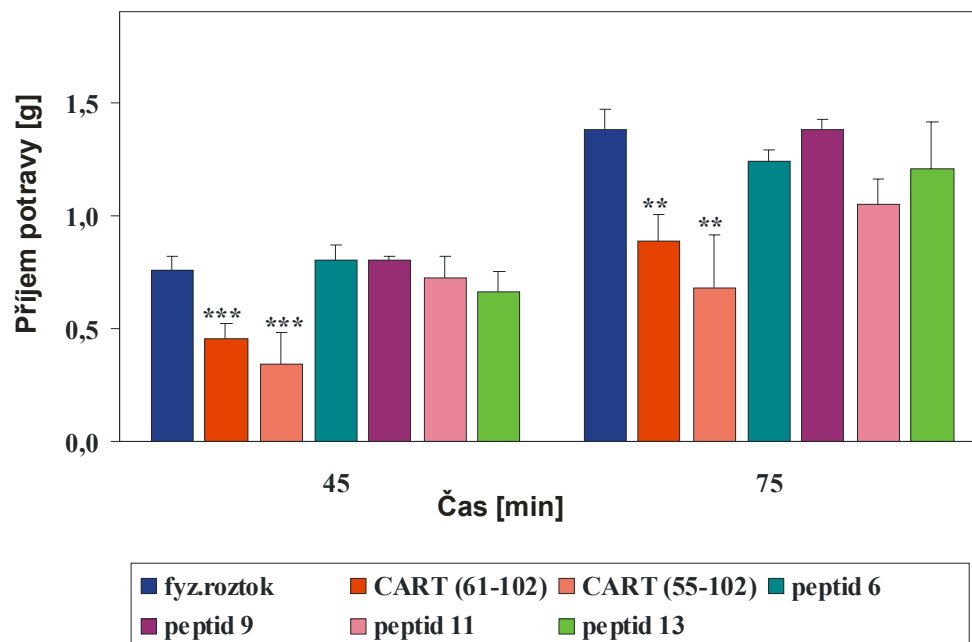
k diferencovaným buňkám vázaly s inhibiční konstantou K_i srovnatelnou s nediferencovanými buňkami, jak je vidět v Tabulce 7 a na Obrázku 22. Peptid 6 vytěsňoval vazbu ^{125}I -CART (61-102) na diferencovaných buňkách s K_i o jeden řád vyšší než pro nediferencované buňky (Tabulka 7).



Obrázek 22. Kompetitivní vazebné křivky peptidů CART a jejich fragmentů k diferencovaným buňkám PC12. ^{125}I -CART(61-102) v koncentraci 10^{-10} M byl vytěsňován vzrůstající koncentrací analogů peptidu CART (30 min inkubace při 37 °C). Výsledky jsou uvedeny v % specifické vazby (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti 10^{-6} M CART(61-102)). Reprezentativní křivky z alespoň tří experimentů v duplikátech.

5.2.5. Vliv fragmentů peptidu CART na příjem potravy

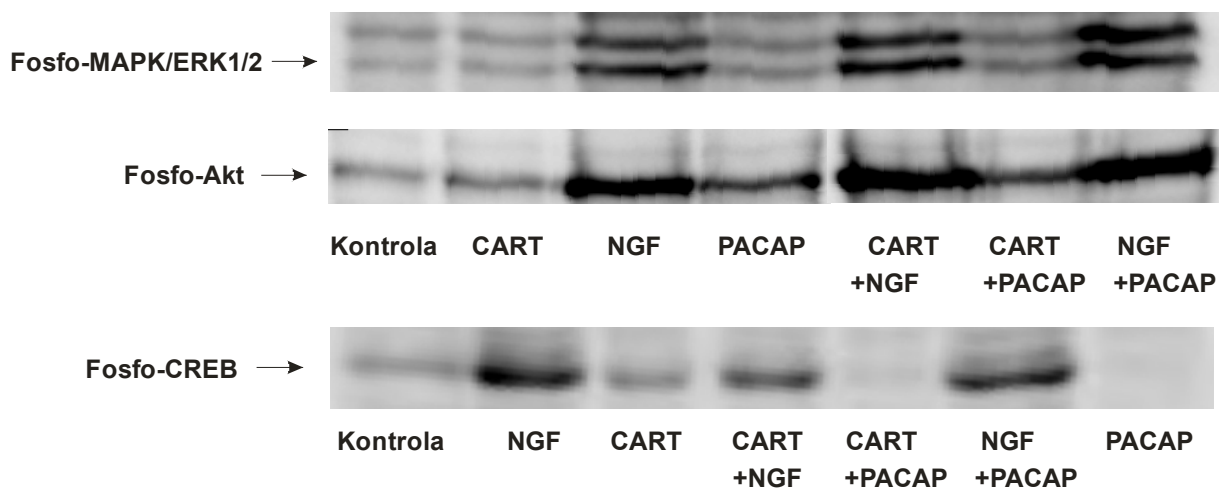
Účinky peptidu CART(61-102), CART(55-102) a peptidů 6, 9, 11 a 13 byly sledovány na myších samcích kmene C57Bl/6 po 17 hodinovém hladovění, jak je vidět na Obrázku 23. Peptidy byly podávány do třetí mozkové komory. ICV podání peptidu CART(61-102) v dávce 0,1 nmol/myš způsobilo pokles příjmu potravy, které odpovídalo již dříve publikovaným hodnotám [89]. Žádné z testovaných fragmentů peptidu CART neprokázaly žádné anorexigenní účinky i při 40krát vyšších dávkách, tj. 4 nmol / myš.



Obrázek 23. Účinek CART(61-102) a CART(55-102) a některých vybraných fragmentů peptidu CART na příjem potravy u hladových myšiček samců. *Příjem potravy byl sledován 45 a 75 min po ICV podání látek (největší účinek látek). CART(61-102) a CART(55-102) byly podávány v dávkách 0,1 nmol / myš, peptidy 6, 9, 11 a 13 v dávce 4 nmol / myš. n = 6-8 myši na skupinu. Signifikance je ** P < 0,01 a *** P < 0,001 (látka vůči fyziologickému roztoku).*

5.2.6. Fosforylace MAPK/ERK1/2, CREB a Akt za pomoci metody Western blot na buněčné linii PC12

Buněčná linie PC12 byla pěstována za podmínek popsaných v metodách viz kapitola 4.2.2. Pro stimulaci buněk byly použity látky CART(61-102), NGF, PACAP a jejich kombinace. Buňky PC12 byly inkubovány s příslušnými látkami 10 minut při 37 °C. U stanovení pMAPK/ERK1/2, pAkt a p CREB byl jako pozitivní kontrola použit NGF a PACAP. Peptidy CART neměly zvýšenou fosforylaci oproti kontrole, jak je znázorněno na Obrázku 24.



Obrázek 24. Fosforylace MAPK/ERK1/2, Akt a CREB účinkem peptidu CART(61-102) a látek NGF, PACAP a jejich kombinací v nediferencovaných buňkách PC12. Buňky byly stimulovány CART(61-102) 10^{-5} M, NGF 50 ng/ml a PACAP 10^{-7} M po 10 minut při 37 °C. Lyzace buněk a metoda Western blot probíhala, jak je popsáno v metodách v kapitole 4.5.2. a 4.6.

5.3. Synergistický účinek peptidu CART a CCK-8 u myši

5.3.1. Vliv na příjem potravy

Synergistický účinek peptidu CART(61-102) a CCK-8 na příjem potravy byl sledován u myších samců kmene C57Bl/6 po 17 hodinovém hladovění. CCK-8 byl podáván IP a peptid CART(61-102) do třetí mozkové komory (ICV).

5.3.1.1. Příjem potravy po podání CART peptidu a CCK

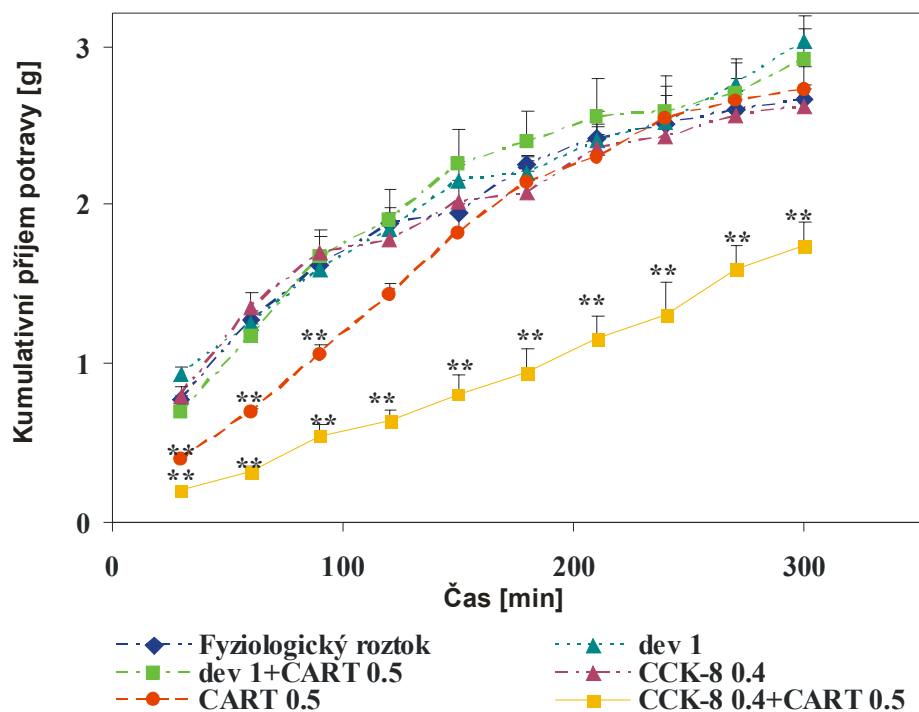
Kumulativní příjem potravy u hladových samců C57Bl/6 myši byl měřen po podání látek CART(61-102) a CCK-8 (všechny dávky a jejich kombinace látek jsou popsány v Tabulce 8) a je znázorněn na Obrázku 25. Příjem potravy po ICV a IP podání fyziologického roztoku nevykazoval žádný signifikantní rozdíl.

ICV podání peptidu CART(61-102) v dávce 0,5 µg/myš významně snížilo příjem potravy. Účinek peptidu CART byl krátkodobý, přibližně do 105 min po jeho podání, s maximálním účinkem mezi 45 a 75 minutami po ICV podání, tj. po prvním a druhém odečtu hmotnosti podávané potravy (Obrázek 25). Anorexigenní účinek peptidu CART(61-102) je závislý na dávce, jak je zřejmé na Obrázku 26A

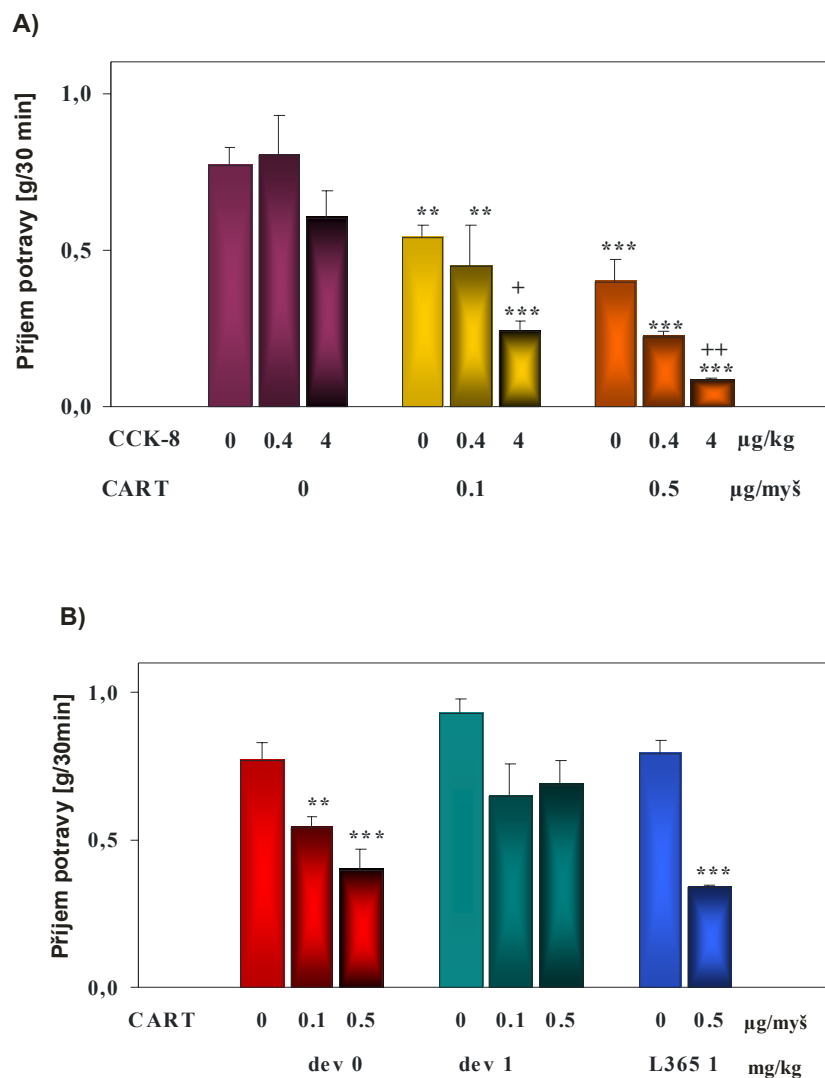
IP injekce CCK-8 v dávkách 0,4 a 4 g/kg nevýznamně snížila příjem potravy u hladových samců C57Bl/6, jednalo se tedy o dávky pod prahem účinku (Obrázek 26A). Kombinace CCK-8 (IP podání) s peptidem CART(61-102) (ICV podání, 5 minut po IP podání CCK-8) signifikantně snížila příjem potravy u hladových myší ve srovnání se samostatným peptidem CART(61-102) nebo CCK-8 (Obrázek 25 a 26A). Společný účinek těchto dvou látek trval déle než pět hodin (Obrázek 25), což ukazuje na synergistický účinek obou látek. V Tabulce 8 jsou shrnuty hodnoty pro příjem potravy v době maximálního účinku po podání peptidů (30 minut po přidání potravy).

5.3.1.2. Příjem potravy po podání CART peptidu a antagonistů CCK

Vyřazení CCK₁ receptoru jeho antagonistou devazepidem blokovalo anorektický účinek peptidu CART(61-102) (ICV podání, 0,1 a 0,5 µg/myš), zatímco specifický antagonist receptoru CCK₂ L-365, 260 neovlivnil peptid CART snížení v příjmu potravy (Obrázek 26B a Tabulka 8).



Obrázek. 25. Kumulativní příjem potravy u hladových myších samců. *Myším byly podány: CCK-8 (IP podání, 0,4 µg/kg), devazepid (IP podání, 1 mg/kg) nebo fyziologický roztok (ICV), CART(61-102) (ICV podání, 0,5 µg/myš) a CCK-8 (IP podání, 0,4 µg/kg), CART(61-102) (ICV podání, 0,5 µg/myš) a devazepid (IP podání, 1 mg/kg), CART(61-102) (ICV podání, 0,5 µg/myš), n = 6-8 myši na skupinu. Signifikace je ** P < 0,01 (látka vůči fyziologickému roztoku).*



Obrázek. 26. Příjem potravy u hladových myších samců: Myším byly podány: **A)** CCK-8 (IP podání, 4 a 4 g/kg) nebo fyziologický roztok (ICV podání), CART(61-102) (ICV podání 0,1 a 0,5 µg/myš), CCK-8 (IP podání, 0,4 a 4 g/kg) a CART(61-102) (ICV podání, 0,1 a 0,5 µg/myš), nebo **B)** devazepid (IP podání, 1 mg/kg) samostatně nebo s CART(61-102) (ICV podání, 0,1 a 0,5 µg/myš) a L365, 260 (IP podání, 1 mg/kg) samostatně nebo s CART(61-102) (ICV podání, 0,5 µg/myš). $n = 6-8$ myši na skupinu. Signifikace je ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ (látka proti fyziologickému roztoku), + $P < 0,05$ proti CART(61-102) 0,1 µg/myš, ++ $P < 0,05$ proti CART(61-102) 0,5 µg/myš. CART - CART(61-102), dev - devazepid, L365 - L365, 260.

Tabulka 8. Příjem potravy u hladových C57Bl/6 samců během prvních 30 min (maximální efekt) v experimentu 1 a 2. Signifikance je ** $P < 0,01$, * $P < 0,001$ proti fyziologickému roztoku. + $P < 0,05$ proti skupině CART, 0,1 $\mu\text{g}/\text{myš}$, ++ $P < 0,01$ proti skupině CART, 0,5 $\mu\text{g}/\text{myš}$.**

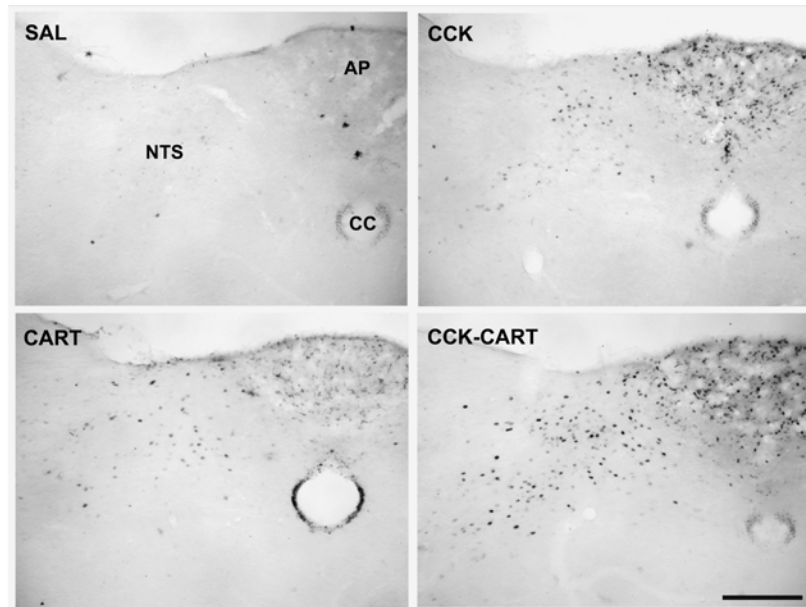
Látka/dávka				Příjem potravy/30 min (g \pm SEM)
IP podání		ICV podání		
Fyz. roztok				0.77 \pm 0.06
		Fyz. roztok		0.73 \pm 0.07
CCK-8	0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$			0.80 \pm 0.13
	4			0.60 \pm 0.09
		CART	0.1 $\mu\text{g}/\text{myš}$	0.54 \pm 0.04 **
			0.5	0.40 \pm 0.07 ***
CCK-8	0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	CART	0.1 $\mu\text{g}/\text{myš}$	0.45 \pm 0.13 **
	4		0.1	0.24 \pm 0.03 *** +
CCK-8	0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	CART	0.5 $\mu\text{g}/\text{myš}$	0.22 \pm 0.02 ***
	4		0.5	0.08 \pm 0.01 *** ++
devazepid	1 mg/kg			0.93 \pm 0.05
	1	CART	0.1 $\mu\text{g}/\text{myš}$	0.65 \pm 0.11
	1		0.5	0.69 \pm 0.08
L365,260	1			0.79 \pm 0.05
	1		0.5	0.34 \pm 0.01 ***

5.3.2. Synergistický účinek CART peptidu a CCK při aktivaci c-Fos v hypothalamických jádrech

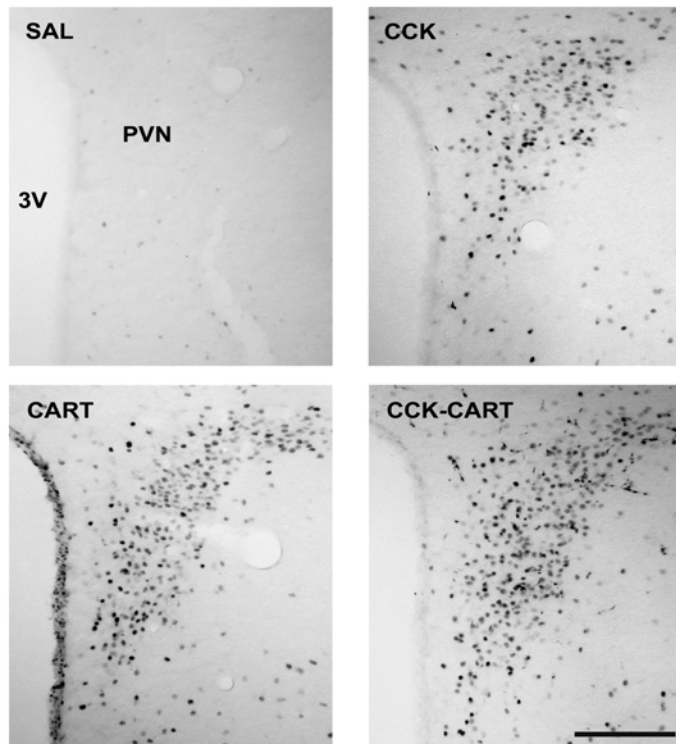
Pro stanovení proteinu Fos po působení CCK, CART peptidu nebo jejich kombinace v hypothalamických jádrech byla použita imunohistochemie. Byly použity dávky CCK-8 (IP podání, 4 g/kg) a CART(61-102) (ICV podání, 0,1 µg/myš), stejně jako v testech příjmu potravy (Tabulka 9) [140, 141]. Statistická analýza, která byla provedena testem one-way ANOVA, ukazuje vliv jednotlivého podání látek CCK-8, CART(61-102) a jejich kombinace. Fos imunopozitivní buňky byly detekovány v NTS ($F_{3, 16} = 26,23$, $p < 0,000001$), PVN ($F_{3, 13} = 100,35$, $p < 0,000001$), a DMH ($F_{3, 12} = 58,19$, $p < 0,000001$) (Obrázek 27). Počet imunoreaktivních buněk v NTS po podání fyziologického roztoku u kontrol byl minimální, jak je vidět na obrázku 27A. Počet Fos imunoreaktivních buněk se výrazně zvýšil po IP podání CCK-8 (0,4 µg/kg) v porovnání s podáním fyziologického roztoku ($P < 0,05$) (Obrázek 27 A, D). Podobný, ale statisticky nevýznamný nárůst byl pozorován po ICV podání CART(61-102) (0,1 µg/myš).

Post hoc test ukázal významný vliv na aktivaci Fos buněk ($P < 0,01$) po společném podání CCK-8 a peptidu CART v NTS ve srovnání s účinkem na všechny ostatní podané látky (Obrázek 27 A, D). Fos imunoreaktivita v PVN a DMH měla podobný trend jako v NTS. U kontrolních myši byl Fos signál slabý (Obrázek 27 B, C). Zvýšení Fos imunoreaktivity bylo po aplikaci CCK-8 ($p < 0,01$), peptidu CART(61-102) ($p < 0,01$), a nebo po společném podání CCK-8 a CART(61-102) ($p < 0,01$) ve srovnání s kontrolní skupinou (fyziologickým roztokem) myši signifikantní (Obrázek 27 B, D). Post hoc test odhalil výrazně vyšší zvýšení počet Fos-imunopozitivních buněk v PVN a DMH po podání peptidu CART(61-102) ve srovnání s aplikací CCK-8 (Obrázek 27 B, C); souběžné použití výše uvedených peptidů ($p < 0,01$) aktivuje Fos v PVN a DMH výrazněji než každý peptid sám ($p < 0,01$).

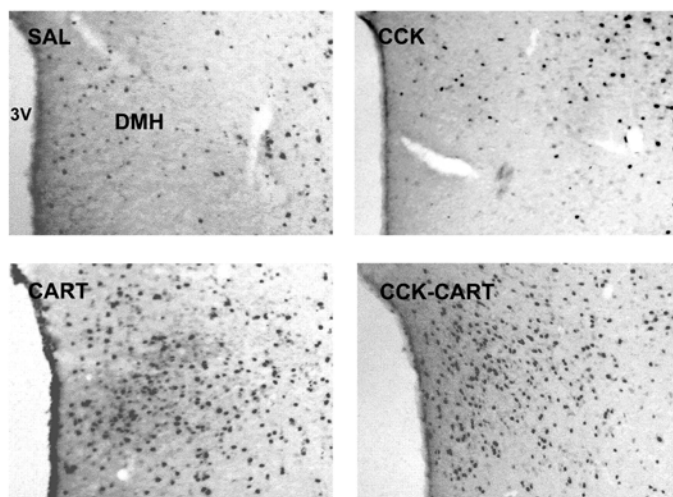
A)



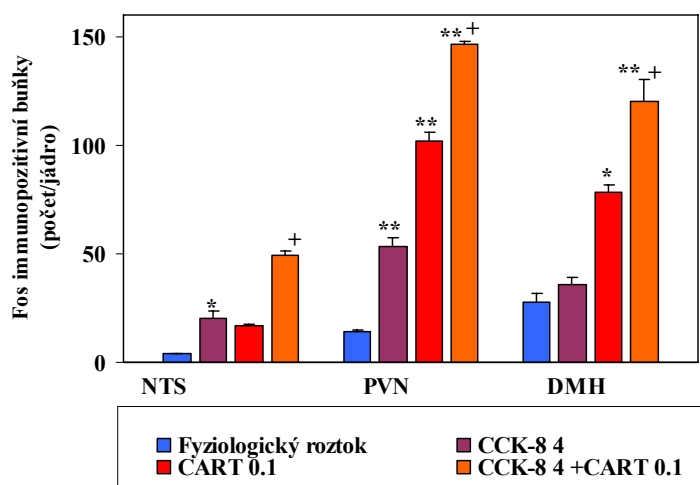
B)



C)



D)

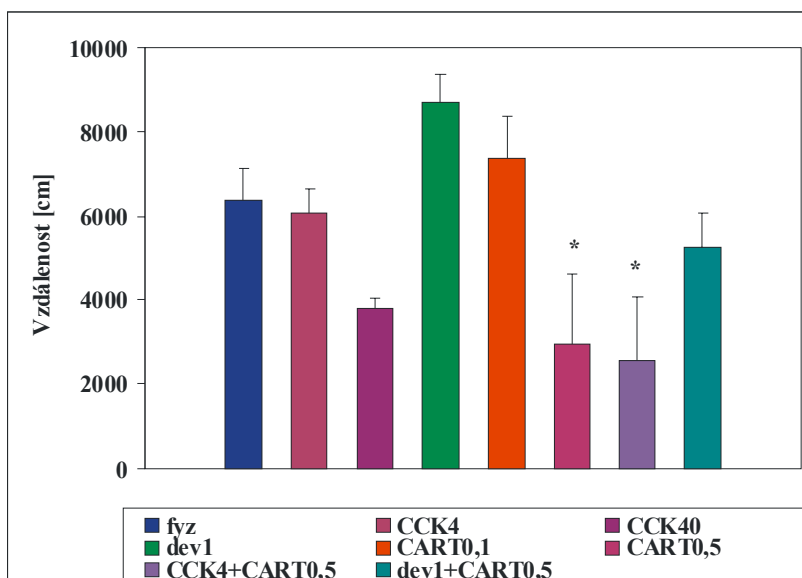


Obrázek 27. Fos imunoreaktivita: Fos-imunobarvení buněk v koronální části A) NTS, B) PVN, C) DMH, D) Počet Fos-imunopozitivních buněk v NTS, PVN a DMH po 60 minutách po podání látek, fyziologického roztoku (SAL, ICV podání), CCK-8 (IP podání, 4 g/kg), CART(61-102) (ICV podání, 0,1 μ g/myš), a jejich kombinace ($n = 4-5$ myši na skupinu a $n = 5-6$ sekci na skupinu). Signifikance je + $P < 0,01$ proti fyz. roztoku, CCK a CART, * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$ proti fyz. roztoku. SAL – fyziologický roztok, AP - area postrema, úsečka = 100 μ m.

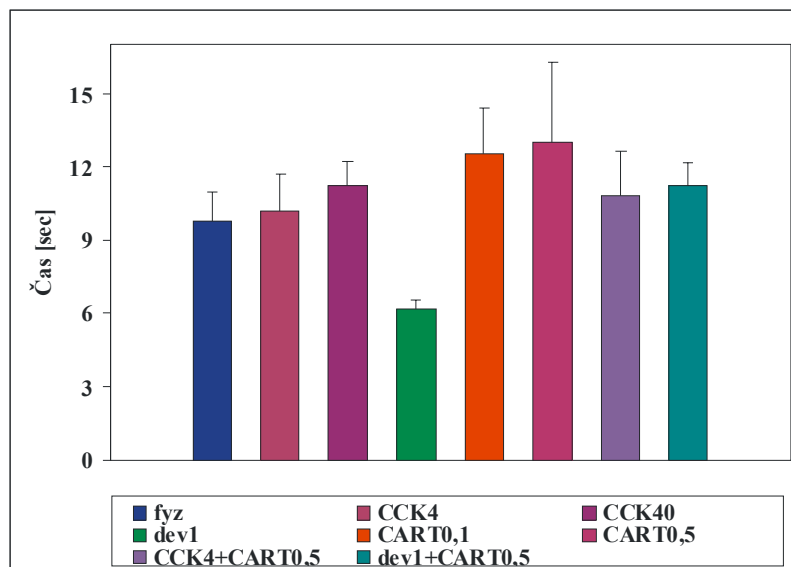
5.3.3. Sedativní a analgetické účinky peptidu CART a CCK

Behaviorální účinky byly měřeny po podání peptidu CART a CCK-8 – každého zvlášť a jejich kombinaci. Pomocí testu open field (pohyb v otevřeném poli) a analgetickém testu hot plate (horká plotna) byly měřeny na myších po 10 minutách po ICV podání peptidu CART(61-102), po IP podání CCK-8 a devazepidu nebo jejich kombinace (viz Výsledky kapitola 5.3.). Cílem této metody bylo zjistit, jaký další vliv na chování mají peptidy CART a CCK-8 kromě účinku na příjem potravy. Výsledky jsou znázorněny na Obrázku 28A, kde je vidět, že peptid CART (0,5 µg/myš) samostatně nebo v kombinaci s CCK-8 (4 g/kg) výrazně snížil uběhnutou vzdálenost v sledovaném poli ve srovnání se skupinou injikovanou fyziologickým roztokem. Na Obrázku 28B je znázorněno, za jak dlouho myš vyskočí v reakci na test horkou plotnu. Antagonista CCK₁ receptoru devazepid potlačil sníženou pohybovou činnost po aplikaci peptidu CART, jak je vidět na obrázku 28A.

A)



B)



Obrázek 28. Behaviorální účinky u kontrolních myši A) test otevřeného pole, celková vzdálenost, kterou myši urazí za 10 min a B) analgetický test na horké plotně po IP podání CCK-8 (4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) nebo devazepid (1 mg/kg), po ICV podání fyziologického roztoku nebo peptidu CART(61-102) (0,1 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{myš}$), nebo po kombinaci injekcí IP CCK-8 nebo devazepidu a následně ICV podání peptidu CART(61-102). Signifikace je ** $P < 0,01$ oproti fyziologickému roztoku. Peptid CART - CART(61-102), dev - devazepide, L365 - L365, 260.

5.4. Anorektický efekt CCK a peptidu CART v modelu štíhlých a MSG myší

5.4.1. Stanovení biochemických parametrů v séru

MSG model myší obezity byl charakterizován u samců inbredních C57Bl/6 myší (Obrázek 29). Samci C57Bl/6 byli po narození injikováni po dobu 1 týdne glutamátem sodným. Ve věku 16 týdnů byli MSG samci těžce obézní, i když jejich průměrný denní příjem potravy byl nižší než u neošetřených kontrol (3.62 ± 0.23 g proti 4.07 ± 0.16 g). MSG myši nejvíce akumulovaly subkutánní, abdominální a gonadální tuk, až 8krát více než kontroly. MSG myši měly zhruba o 15 % kratší tělo a ocas než kontroly.

U C57Bl/6 kontrolních a MSG myší byly stanoveny sérové hladiny leptinu, a glukosy. Hladiny leptinu byly významně zvýšeny u MSG samců oproti kontrolním myším. Na druhou stranu, hladiny glukózy u MSG myší se nijak nelišily od kontroly (Tabulka 9).

Tabulka 9. Metabolické parametry u C57Bl/6 MSG samců ve věku 16 týdnů. *Všechny hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM ($n = 20-25$). Signifikace je *** $P < 0,001$ proti kontrolám.*

Charakterizace	Průměr tuk/tělesná hmotnost	Glukosa (mM)	Leptin (ng/ml)
Kontroly	1.41 ± 0.41	8.20 ± 0.64	7.00 ± 1.21
MSG	13.48 ± 0.99 ***	7.88 ± 0.62	45.55 ± 6.54 ***

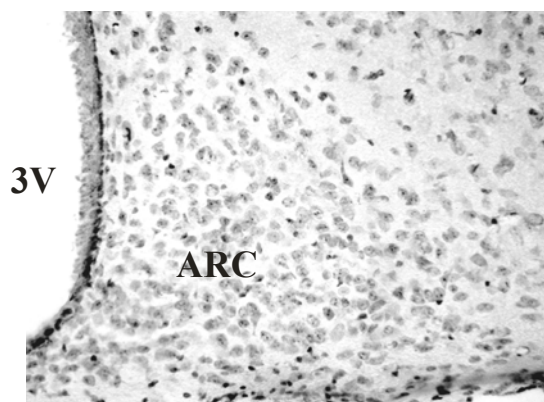


Obrázek 29. Model myší obezity na kmeni C57Bl/6 vyvolaný glutamátem sodným (MSG)

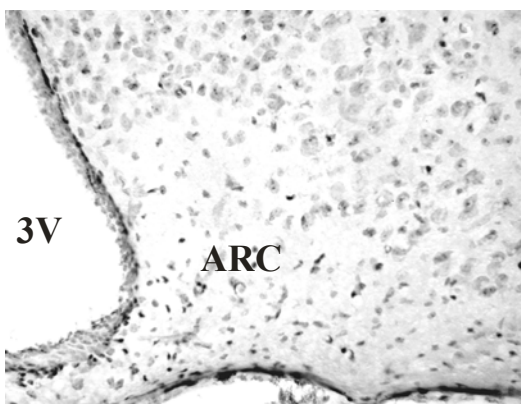
5.4.2. Histologie mozku

Histochemie koronálních sekcí hypotalamu u MSG myši prokázala zánik neuronů v oblasti ARC ve srovnání s kontrolami, tj. že existují specifické léze v ARC u MSG myši (Obrázek 30), zatímco v přilehlých hypotalamických jádrech nebyly žádné známky poškození. U kontrolních myši byl ARC beze změny.

KONTROLY



MSG



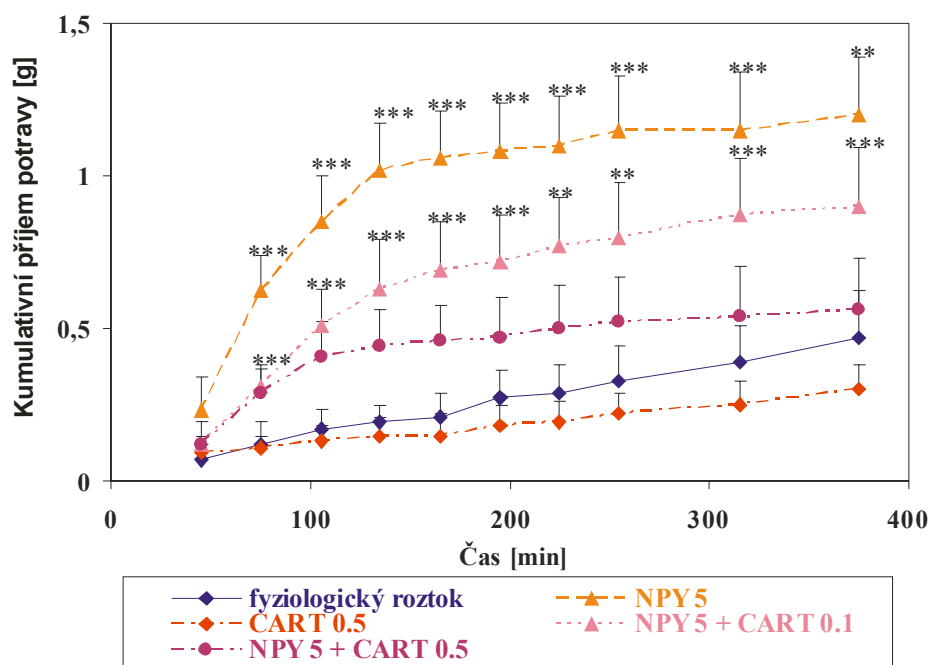
Obrázek 30. Imunohistochemie neuronů v mozku u samic kontrolních a MSG myši. Léze v oblasti nucleu arcuatu u MSG myši. Koronální části hypotalamu z MSG myši ukazují zničené neurony v ARC v porovnání s kontrolní skupinou myši. $n = 3$ myši na skupinu.

5.4.3. Účinky peptidu CART(61–102), CCK-8 a NPY na příjem potravy u sytých myších samců C57Bl/6

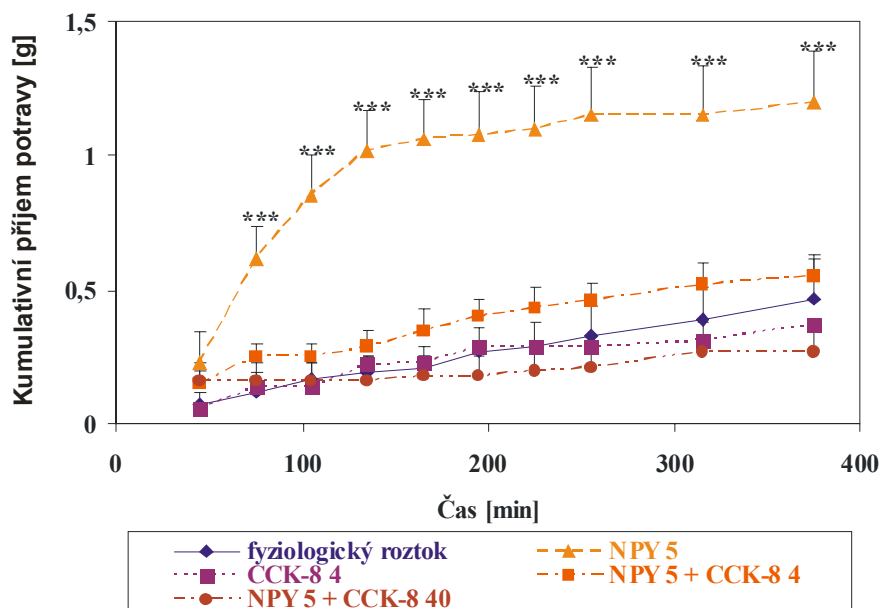
Pro objasnění vztahu peptidu CART k látkám ovlivňujících příjem potravy byl sledován příjem potravy u sytých C57Bl/6 kontrolních a MSG myší po podání peptidu CART(61–102) a NPY do třetí mozkové komory (ICV) a CCK-8 IP nebo kombinace peptidu CART(61–102) a NPY nebo kombinace NPY a CCK-8.

IP podání CCK-8 (4 a 40 µg/kg) u sytých kontrolních a MSG myší nemělo účinek na příjem potravy ve srovnání s účinkem po podání fyziologického roztoku (Obrázek 31 B, C). Peptid CART(61-102) (ICV podání, 0,5 µg/myš) u sytých kontrolních a MSG myší neměl významný účinek na příjem potravy ve srovnání s účinkem po podání fyziologického roztoku (Obrázek 31 A, C). Po podání NPY (ICV podání, 5 µg/myš) se významně zvýšil příjem potravy u sytých kontrolních a MSG myší ve srovnání s účinkem po podání fyziologického roztoku (Obrázek 31 A, B, C a 31). Kombinace NPY (ICV podání) a CCK-8 (IP podání, 45 min po ICV podání NPY) způsobila, že CCK-8 snížil příjem potravy navozený NPY u sytých kontrolních myší (Obrázek 31 B a 31 A). U MSG myší CCK-8 nesnížil příjem potravy vyvolaný pomocí NPY (Obrázek 31 C a 31 B). ICV podání peptidu CART současně s NPY způsobilo, že peptid CART(61-102) snížil příjem potravy navozený NPY u sytých kontrolních a MSG myší (Obrázek 31 A, C).

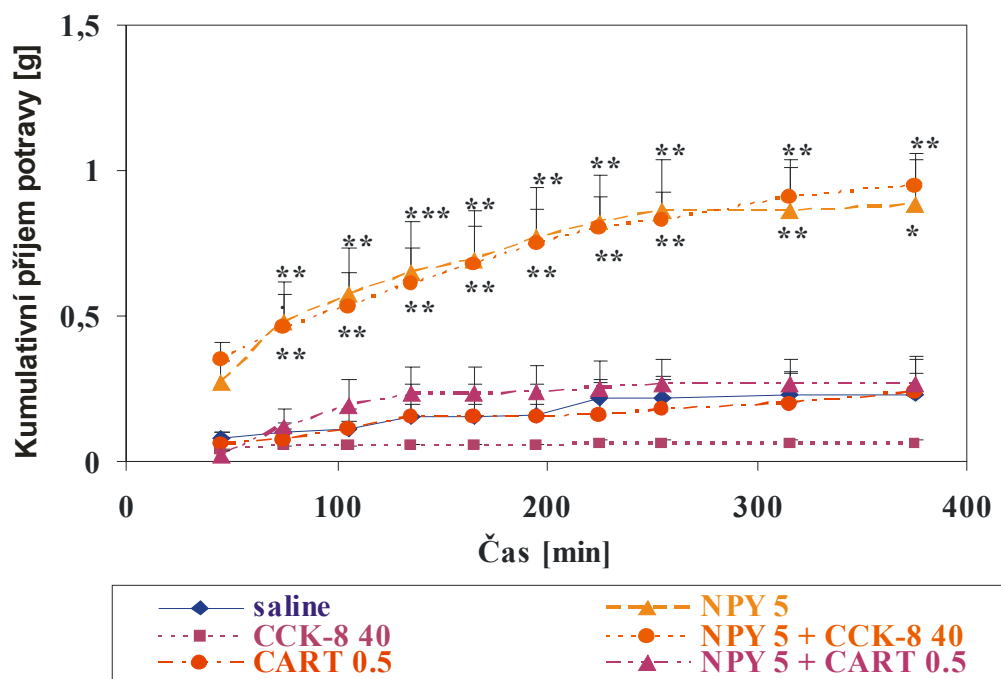
A)



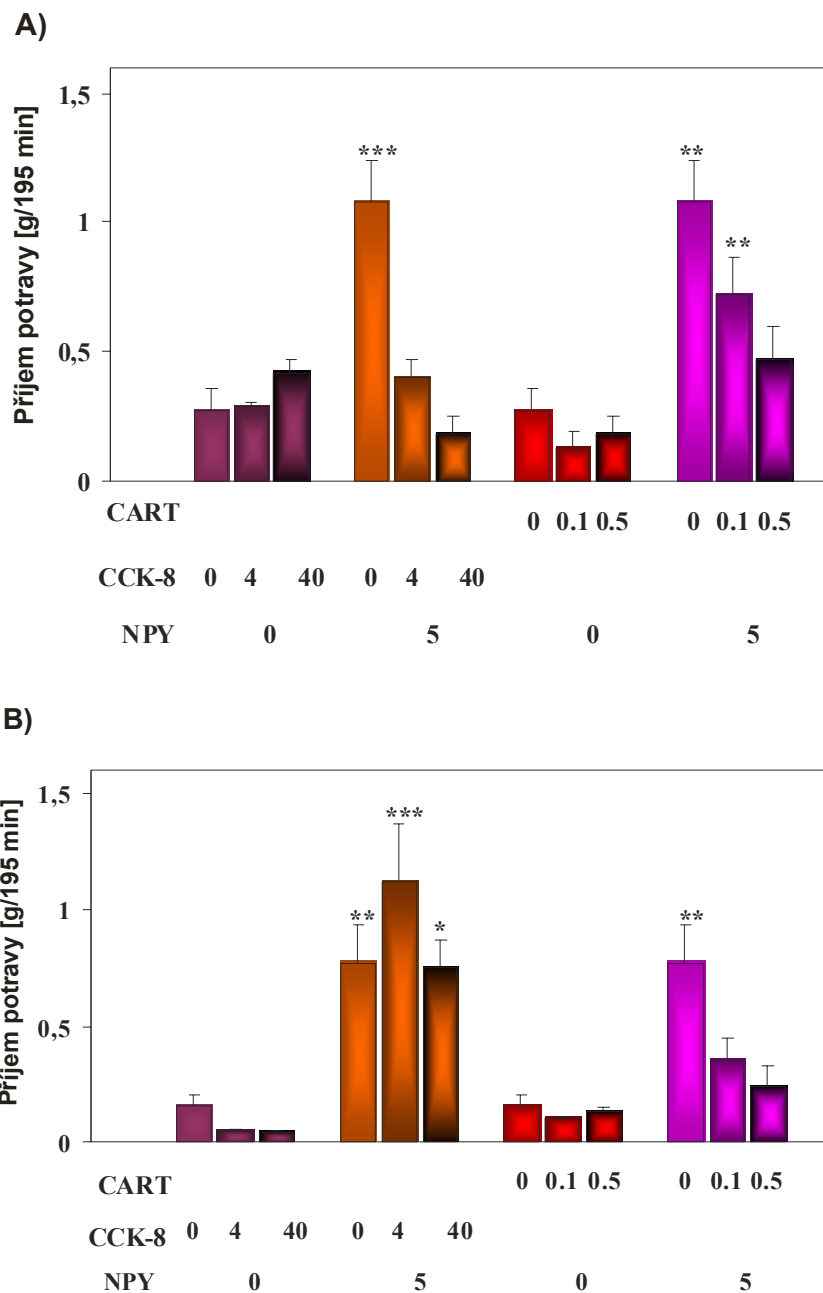
B)



C)



Obrázek 31. Kumulativní příjem potravy u sytých A,B) kontrolních myší C) MSG myší po podání NPY (ICV podání, 5 $\mu\text{g}/\text{myš}$) a NPY (ICV podání, 5 $\mu\text{g}/\text{myš}$) s CCK-8 (IP podání, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$); po NPY (ICV podání, 5 $\mu\text{g}/\text{myš}$) a NPY (ICV podání, 5 $\mu\text{g}/\text{myš}$) s CART(61-102) (ICV podání, 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). $n = 6-8$ myší na skupinu. Signifikace je * $P < 0,001$ proti skupině s injikované fyziologickým roztokem (ICV podání).**



Obrázek 32. Příjem potravy u A) kontrolních a B) MSG myši 195 minut po ICV podání. Inhibice NPY (ICV podání, 5 μg/myš), pomocí CART(61-102), (ICV podání, 0,1 a 0,5 μg/myš) nebo CCK-8 (IP podání, 4 a 40 μg/kg), 195 min po podání NPY. n = 6-8 myši na skupinu. Signifikace je * P < 0,05, ** p < 0,01, * P < 0,001 proti příslušné skupině injikované fyziologickým roztokem (ICV podání).**

5.5. Charakterizace účinků analogů PrRP na hypofyzární buněčné linie

5.5.1. Detekce receptoru pro PrRP na hypofyzárních buněčných liniích pomocí metody Western blot.

Pro stanovení receptoru pro PrRP v hypofyzárních buněčných liniích RC-4B/C, GH3 a AtT-20 pomocí metody Western blot byly použity lyzáty buněk a jako pozitivní kontrola byly použity Jurkat buňky (Obrázek 33). Western blot prokázal protein v oblasti 41 kDa, tudíž všechny tři linie obsahují receptor pro PrRP.

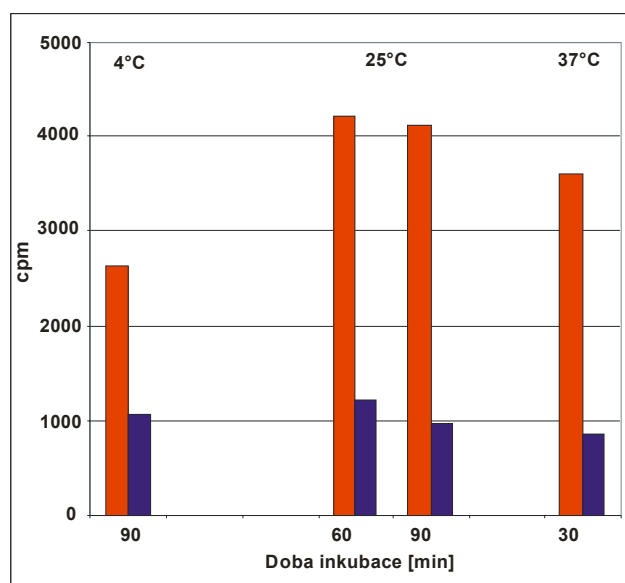


Obrázek 33. Stanovení receptoru pro PrRP na buněčných liniích AtT-20, GH3 a RC-4B / C. Receptor pro PrRP byl detekován pomocí protilátek proti receptoru GPR10. Jurkat buňky byly použity jako pozitivní kontrola.

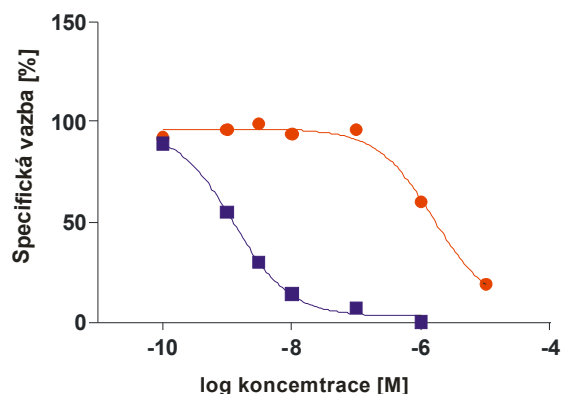
5.5.2. Optimalizace podmínek vazebných pokusů PrRP k hypofyzárním buněčným liniím

Pomocí závislosti totální a nespecifické vazby na buňkách RC-4B/C, GH3 a AtT-20 byly optimalizovány vazebné podmínky. Buňky na destičkách byly inkubovány při různých teplotách (4°C, 25°C a 37°C) a době inkubace (30, 60, 90, 120 či 180 minut). Bylo zjištěno, že při inkubaci při teplotě 4 °C činila nespecifická vazba více než 50 % z celkové vazby, proto tato teplota není optimální pro vazebné pokusy. Dalším krokem byla inkubace při 37 °C po dobu 30 minut, kde nespecifická vazba činila více jak 50% z celkové, což bylo nejspíše způsobeno v důsledku degradace peptidu PrRP. Závěrem bylo konstatováno, že optimální vazebné podmínky pro všechny buněčné linie jsou 25°C a doba inkubace je 60 minut, jak vyplývá z Obrázku 34 pro linii RC-4B/C. Vazba byla při 25°C stabilní v rozmezí 30-120 minut. Jako optimální počet buněk pro vazebné pokusy bylo prokázáno rozmezí 400 -500 tisíc buněk na jamku pro buňky RC-4B/C a GH3 a 300 až 400 tisíc buněk na jamku pro buněčnou

linii AtT-20. Přidání EDTA i EGTA do vazebného pufru nemělo žádný vliv na specifickou vazbu, stejně tak přidání vápenatých iontů. Přidání BPTI do vazebného pufru výrazně snížilo hodnotu EC_{50} . Vazebné křivky jsou uvedeny na Obrázku 35. Stabilita peptidu PrRP31 po inkubaci s buňkami RC-4B/C, GH3 a AtT-20 byla také ověřována pomocí hmotnostní spektrometrie. Výsledky prokazují, že při inkubaci ve vazebném pufru bez BPTI se PrRP31 štěpí asi z 30 % na kratší fragmenty.



Obrázek 34. Grafy závislosti specifické a celkové vazby na různých dobách a teplotách inkubace na buněčné linii RC-4B/C. Vazebné pokusy probíhaly při různé teplotě (4 °C, 25 °C, 37 °C) a době inkubace (30, 60, 90minut) červená – totální vazba, modrá – nespecifická vazba.



Obrázek 35. Graf závislosti EC_{50} na přidavku BPTI do vazebného pufru u buněčné linie RC-4B/C. Červená – inkubace ve vazebném pufru bez BPTI, modrá – inkubace ve vazebném pufru s BPTI (1 mg/ml). Vazebné pokusy probíhaly 60 minut při 25 °C. Vazebný pufr o pH 7,4 obsahoval 20 mM HEPES, 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl a 5 mM MgCl₂, 4 2 mg/ml glukózy, 1 mg/ml BSA, a buď bez přítomnosti nebo s přítomnosti 0,1 mg/ml BPTI.

5.5.3. Saturační vazebné experimenty

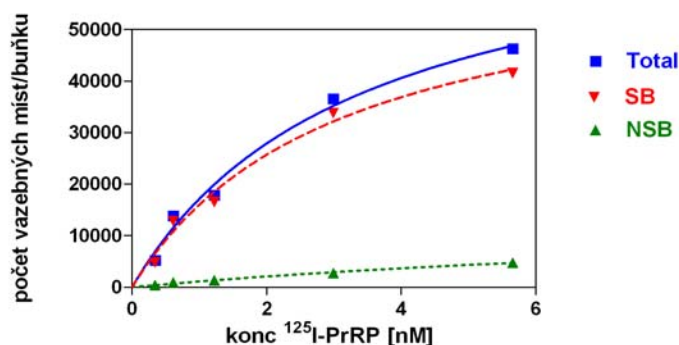
Saturační vazebné pokusy na buněčných liniích RC-4B/C, GH3 a AtT-20 byly provedeny při optimalizovaných podmínkách, viz kapitola 5.5.2. U všech třech hypofyzárních buněčných linií nespecifická vazba lineárně stoupala se zvyšující se koncentrací radioligandu a nepřesáhla 50 % celkové vazby.

Saturační vazebné experimenty s ¹²⁵I-PrRP31 u všech třech buněčných linií prokázaly K_d v nM oblasti a B_{max} řádově v desetitisících vazebných míst/buňku. Nespecifická vazba byla u GH3 a RC nižší než 11%. Nelineární regresní analýza ukázala jedno vazebné místo, jak je znázorněno na Obrázku 36A, B. V případě buněk AtT-20 byla nespecifická vazba nižší než 22%, reprezentativní křivka je znázorněna na Obrázku 36C. V Tabulce 10 jsou uvedeny hodnoty K_d a B_{max} .

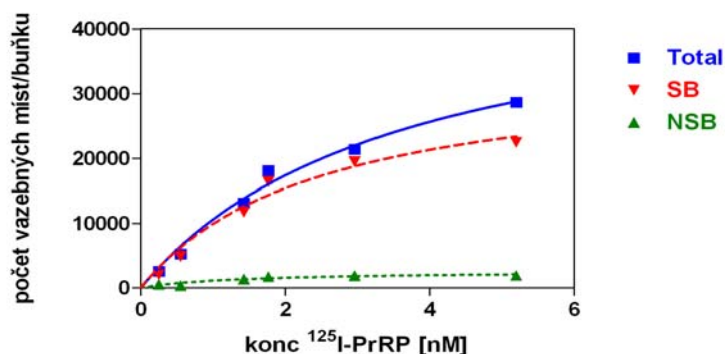
Tabulka 10. Saturační vazba ^{125}I -PrRP31 k hypofyzárním buňkám. *Obě hodnoty pro všechny buněčné linie byly zjišťovány při saturačních vazebných experimentech, probíhajících 60 minut při teplotě 25 °C, s vazebným pufrům s přidavkem 0,1 mg/ml BPTI.*

buněčná linie	B_{\max} [vazebná místa/buňku]	K_d [nM]
RC-4B/C	67400 ± 14500	4,21 ± 0,66
GH3	88300 ± 12100	5,72 ± 1,08
AtT-20	22800 ± 1100	3,97 ± 1,38

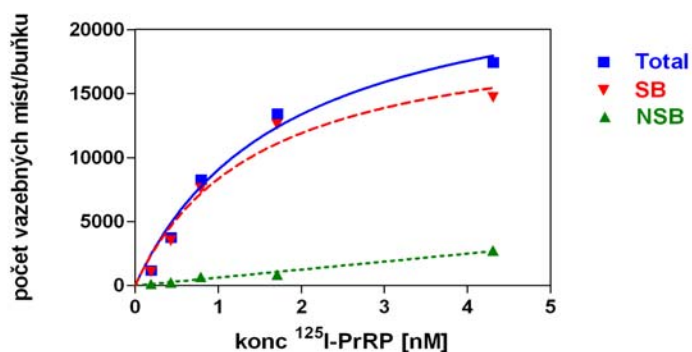
A) Buněčná linie GH3



B) Buněčná linie RC-4B/C



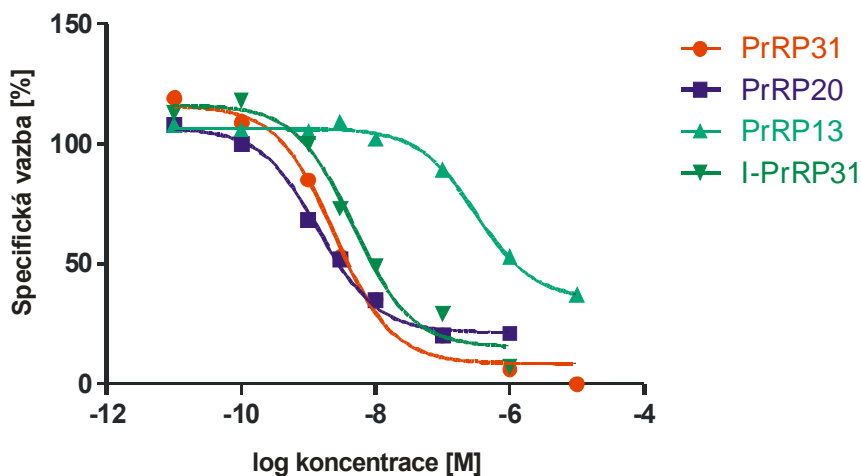
C) Buněčná linie AtT20



Obrázek 36. Reprezentativní křivky saturačních vazebných pokusů. Saturační vazebné experimenty na buněčných liniích GH3, RC-4B/C a AtT-20 probíhaly při teplotě 25 °C po dobu 60 minut, s rostoucím množstvím $^{125}\text{I-PrRP31}$ v nepřítomnosti (celková vazba) nebo přítomnosti (nespecifická vazba) 10^{-5}M PrRP31 . Specifická vazba byla vypočítána jako rozdíl celkové vazby a nespecifické vazby. Křivky byly vyneseny pomocí nelineární regrese.

5.5.4. Kompetitivní vazebné experimenty

Kompetitivní vazebné pokusy na buňkách RC-4B/C byly provedeny při optimálních podmínkách viz kapitola 5.5.2. Vazba ^{125}I -PrRP31 na buňky RC-4B/C byla vytěsněna analogy PrRP31, PrRP20, PrRP13 a I-PrRP31. K_i je rovnovážná disociační konstanta neznačeného ligandu, která byla vypočítána dosazením do rovnice Chenga a Prusoffa [133] (za K_d byla dosazena hodnota 2,49 nM a koncentrace radioligandu byla 0,1 nM). Pro analogy PrRP31, PrRP20, PrRP13 a I-PrRP31 jsou hodnoty K_i uvedeny v Tabulce 11. Kompetitivní pokusy potvrzují, že PrRP31 se váže k receptoru pro PrRP se srovnatelnou afinitou jako PrRP20 a I-PrRP31 s K_i řádově 10^{-9}M . Peptid PrRP13 má nižší afinitu k receptoru pro PrRP a to s K_i řádově 10^{-7}M , jak je vidět na obrázku 37 a v Tabulce 11.



Obrázek 37. Kompetitivní vazebné křivky analogů PrRP k buněčné linii RC-4B/C.

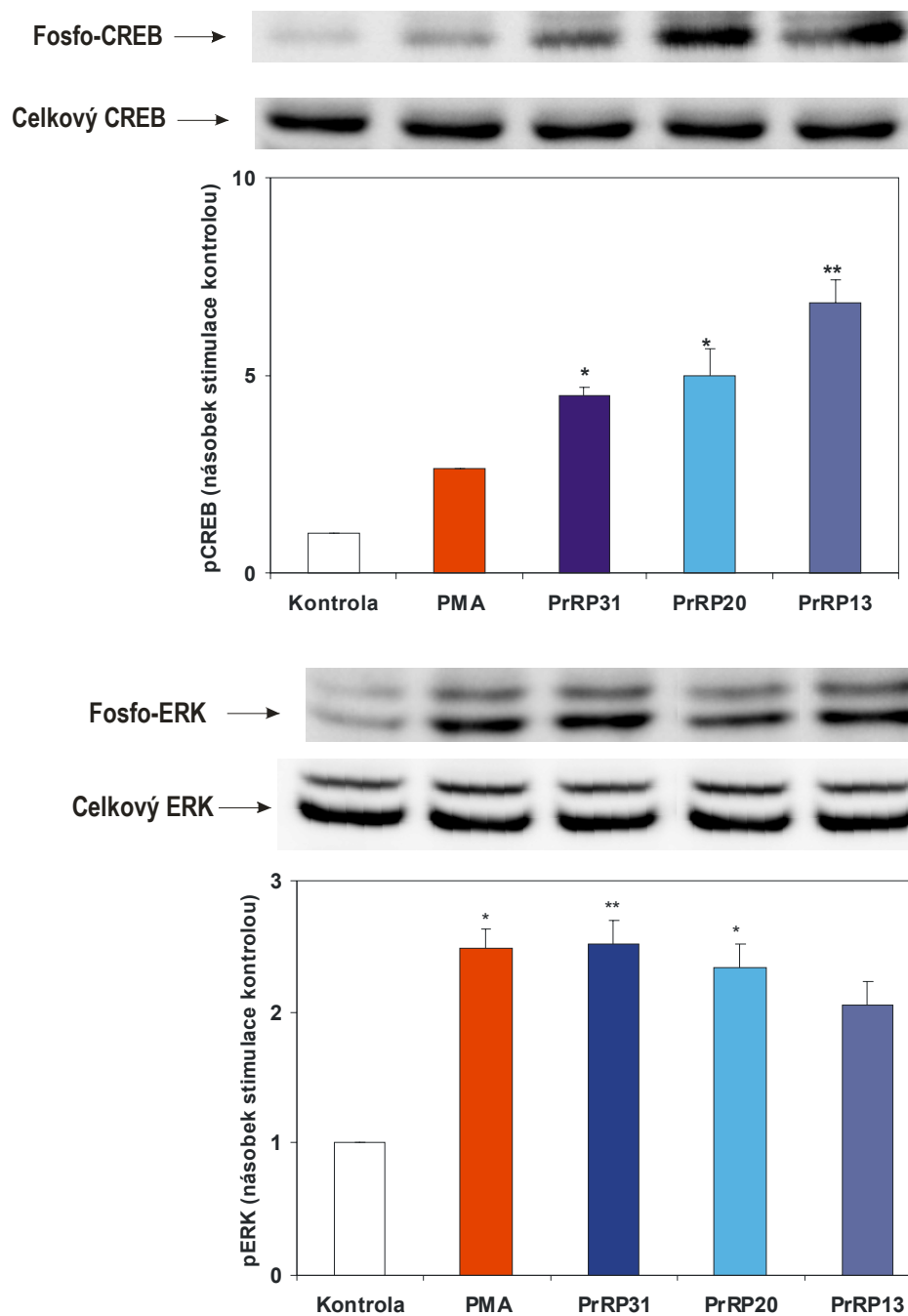
^{125}I -PrRP v koncentraci 10^{-10}M byl vytěsněn vzrůstající koncentrací analogů PrRP (60 min inkubace při 25 °C). Výsledky jsou uvedeny v % specifické vazby (po odečtení nespecifické vazby v přítomnosti 10^{-5}M PrRP31). Reprezentativní křivky z alespoň tří experimentů v duplikátech.

Tabulka 11. Výsledky kompetitivních vazebných experimentů pro buněčnou linii RC-4B/C. Průměr ± S.E.M. ze tří až pěti samostatných experimentů. Kompetitivní vazebné pokusy probíhaly 60 min při 25°C. K_i bylo vypočteno z rovnice Chenga-Prusoffova (K_d bylo 4,21 nM [142]).

Analog	K_i [M]
PrRP31	$(4,52 \pm 0,79) \times 10^{-9}$
PrRP20	$(3,20 \pm 1,24) \times 10^{-9}$
PrRP13	$(4,84 \pm 2,35) \times 10^{-7}$
I-PrRP31	$(3,66 \pm 0,49) \times 10^{-9}$

5.5.5. Fosforylace MAPK/ERK1/2 a CREB za pomoci metody Western blot na buněčné linii RC-4B/C

Pro funkční charakterizaci účinků analogů PrRP byla zvolena metoda buněčné signalizace a detekce fosforylovaného MAPK/ERK1/2 a CREB. Buňky RC-4B/C byly pěstovány a ošetřeny, jak je popsáno v metodách, viz kapitola 4.5.2. Pro stimulaci buněk byly použity látky PMA, nebo PrRP31, PrRP20 a PrRP13. Buňky RC-4B/C byly inkubovány ke stanovení fosforylovaného MAPK/ERK1/2 a CREB se třemi látkami po dobu 5 a 30 min při 37 °C. Při inkubaci 5 min bylo pozadí mnohem nižší než při inkubaci po dobu 30 min. Na tomto základě byla zvolena inkubace 5 min a dále byla používána. PrRP31, PrRP20 a PrRP13 stimulovaly fosforylaci jak MAPK/ERK1/2, tak CREB, ovšem s různou intenzitou účinku, jak je znázorněno na Obrázku 38. Analogy PrRP31 a PrRP20 způsobily významně zvýšenou fosforylaci MAPK/ERK1/2 oproti kontrole. Účinek PrRP31 byl signifikantní v případě fosforylace CREB a nesignifikantní v případě fosforylovaného MAPK/ERK1/2 (Obrázek 38). PMA sloužil jako kontrola maximální fosforylace (odpovědi).

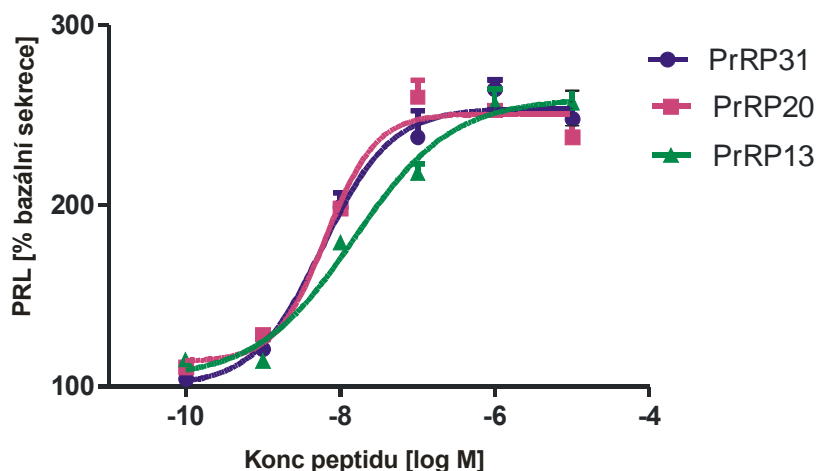


Obrázek 38. Fosforylace MAPK/ERK1/2 a CREB účinkem analogů PrRP. Buňky RC-4B/C byly stimulovány PMA a analogy PrRP v koncentraci 10^{-5} M po dobu 5 min při 37 °C. Lyzace buněk a metoda Western blot probíhala, jak je popsáno v metodách v kapitole 4.5.2. a 4.6. Data jsou průměr \pm S.E.M. $n = 3$ pokusy. Úroveň fosforylace kontroly buněk byla stanovena jako 1. Signifikace je * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve srovnání s kontrolou.

5.5.6. Stanovení uvolňování hypofyzárních hormonů z buněčných linií

Jako další funkční test s analogy PrRP bylo stanoveno uvolňování hormonů hypofýzy do media na buněčných liniích RC-4B/C, GH3 a AtT-20. Nejdříve byla testována schopnost analogů PrRP působit na uvolňování hormonů do media pomocí potkaního hypofyzárního kitu MILLIPLEX (na bázi ELISA). Buněčné linie RC-4B/C a GH3 byly ponechány v mediu bez séra 2 hodiny a buněčná linie AtT-20 byla ponechána v mediu bez séra přes noc. Buňky byly inkubovány s PrRP31 a standardy (TRH pro GH3 buňky, CRH pro AtT-20 buňky) po dobu 1-3 hodin při teplotě 37°C. Poté byl sebrán supernatant, ve kterém byly stanoveny hypofyzární hormony. Médium buněčné linie GH3 bylo testováno na přítomnost GH a PRL, linie AtT-20 uvolňuje hormon ACTH a linie RC-4B/C všechny hormony předního laloku hypofýzy. Bylo zjištěno, že z buněčné linie RC-4B/C byl vylučován PRL po 1 a 3 hodinách působení PrRP.

Proto byla dále použita linie RC-4B/C ke stanovení uvolňování PRL po působení PrRP31, PrRP20 a PrRP13, jak je znázorněno na Obrázku 39. Hodnoty EC_{50} pro PrRP31 byly $(5,90 \pm 1,43) \times 10^{-9}$ M a PrRP20 $(6,52 \pm 1,10) \times 10^{-9}$ M a PrRP13 $(1,51 \pm 1,35) \times 10^{-8}$ M.



Obrázek 39. Produkce PRL po působení analogů PrRP na buněčnou linii RC-4B/C. Na buňky RC-4B/C bylo působeno PrRP31, PrRP20 a PrRP13 po dobu 1 hodiny. V supernatantu, tj. v mediu byla změřena koncentrace PRL pomocí RIA metody. Zobrazené výsledky jsou v procentech \pm S.E.M. proti kontrole (100%). $n = 3$ (nezávislé pokusy prováděné v duplikátech). Bazální hladina PRL byla 2,9 ng/ml.

6. DISKUZE

6.1. Význam nově objevených neuropeptidů

Energetická rovnováha organismu (vztah energetického příjmu a výdeje) je složitý děj regulovaný celou řadou metabolických procesů, kterých se účastní jak složky příjmu potravy (jako glukosa, proteiny, lipidy), tak látky vylučované v periférii (gastrointestinálním traktu) anebo centrální nervové soustavě, které spolu navzájem interagují. V CNS je za oblast odpovídající za regulaci příjmu potravy považován hypotalamus, který je řídicím centrem a zprostředkovává ostatní podněty z CNS i periférie. Těchto procesů se účastní mnoho neuropřenašečů a hormonů, jejichž významnou část tvoří hormony peptidové. V posledních 15 letech bylo objeveno velké množství nových peptidů regulujících příjem potravy, které mnohdy působí paralelně vedle sebe a jejichž přesná funkce v organismu není dosud plně objasněna [143, 144].

K centrálně působícím neuropeptidům patří také peptid CART, jehož receptor dosud není znám, a PrRP, jehož hlavní funkce v organismu je stále nejasná. Oba anorexigenní neuropeptidy jsou hojně sekretovány v hypotalamu na podněty související jak s krátkodobou, tak s dlouhodobou regulací energetického metabolismu (jejich exprese a sekrece je regulována např. leptinem).

Tato práce se zabývá účinky těchto dvou peptidů a jejich fragmentů jak *in vitro* na buněčných liniích obsahujících (potenciální) receptor, tak, v případě peptidu CART a jeho fragmentů, *in vivo* u myší. Snaha nalézt minimální biologicky aktivní fragment těchto látek a metodiku k testování těchto analogů by mohla v budoucnu vést k vývoji nových selektivně účinných a dlouhodobě působících analogů, potenciálních antiobezitních látek.

Vzhledem k tomu, že role těchto neuropeptidů v regulaci příjmu potravy, stejně jako jejich vztah k ostatním látkám ovlivňujícím příjem potravy není přesně známa, byl také zkoumán vzájemný vztah peptidu CART, anorexigenního CCK-8 a orexigenního NPY jak u štíhlých, tak u obézních MSG myší. Objasnění základních mechanismů regulace příjmu potravy může v budoucnu také přispět k léčbě obezity a chorob s ní spojených.

6.2. Strukturně-aktivitní studie fragmentů peptidu CART

Ačkoliv bylo od doby objevu peptidu CART věnováno velké úsilí tomu, aby byl identifikován jeho receptor(y) [1, 86], dosud bylo publikováno pouze několik prací popisujících vazbu peptidu CART k buněčným liniím a receptor pro peptid CART je stále neznámý. Specifická vazba ^{125}I -CART(61-102) k myším hypofyzárním buňkám AtT-20 byla publikována Vicentic a kol. [87] a k potkaním feochromocytomálním buňkám PC12 naší skupinou [89]. Jiné peptidy jako např. CCK-8, α MSH, TRH, angiotensin II, neurotensin a leptin nebyly schopny vytěsnit vazbu ^{125}I -CART(61-102) k buňkám PC12 nebo membránám z nich i v koncentraci 10^{-5}M [89].

Byla také testována signalizace v buňkách PC12 po stimulaci peptidem CART(61-102). Pomocí metody Western blot byla stanovena fosforylace MAPK/ERK1/2, CREB a Akt. Jako pozitivní kontrola sloužil NGF. Na rozdíl od práce Lakatos a kol. [84], kteří našli zvýšenou fosforylaci ERK po působení CART(55-102) v hypofyzárních buňkách AtT-20, v naší studii nebyla zvýšená fosforylace v buňkách PC12 po působení CART(61-102) (Obrázek 24) ačkoli NGF zvyšovalo v souladu s literaturou fosforylaci jak MAPK/ERK1/2, tak Akt a CREB signifikantně ve srovnání s kontrolním vzorkem.

Vazebné studie s fragmenty peptidu CART jsou velmi vhodné pro porovnání afinity různých částí molekuly a k hledání minimální biologicky aktivní struktury peptidu CART. Naše práce [134] představuje první podrobnou strukturně-aktivitní studii zahrnující několik farmakologických testů za srovnatelných experimentálních podmínek. Byla zde vybrána série fragmentů peptidu CART, které postupně zahrnují části struktury CART(61-102), a testována jejich vazebná afinita k buňkám PC12. Peptidy, které ukázaly významnou afinitu k buňkám PC12, byly pak testovány z hlediska vlivu na příjem potravy.

Většina *in vivo* studií s peptidy CART popisuje přirozeně se vyskytující peptidy CART(55-102) a CART(61-102) se zaměřením na příjem potravy po centrálním podání látek [92] [52, 145]. Thim a kol. [2] byli první, kdo publikovali studii s několika analogy peptidu CART: CART(54-102), CART(55-102), CART(61-102) a CART(62-102). Analogy byly podávány ICV hladovým myším a způsobily snížení příjmu potravy v závislosti na dávce a se srovnatelným efektem, ačkoliv CART(55-102) byl o něco účinnější než ostatní peptidy [2]. Další rozsáhlá studie srovnávala účinky ICV podaných CART(55-102) a CART(62-102)

hladovým myším a ukázala, že CART(62-102) pětkrát účinněji než CART(55-102) snižoval příjem potravy při stejné injikované dávce [75].

V naší studii snižoval ICV podaný CART(61-102) významně příjem potravy u hladových myší, a to v závislosti na dávce, jak jsme již publikovali dříve [89]. ICV podání (0.1 nmol/myš) jak CART(55-102), tak CART(61-102) snížilo příjem potravy ve srovnatelném rozsahu a tyto hodnoty byly signifikantní ve srovnání s příjmem potravy kontrolních myší injikovaných fyziologickým roztokem ($P < 0.001$) (Obrázek 23).

CART(61-102) byl jodován s použitím radioaktivního a stabilního izotopu. Pomocí HPLC byly izolovány 4 píky odpovídající mono- a di-jodovaným peptidem s nemodifikovaným nebo oxidovaným Met⁶⁷ (methionin sulfoxid). Hmotnostní spektrometrie potvrdila, že v průběhu jodace dochází k částečné oxidaci Met⁶⁷. Kompetitivní vazebný experiment ukázal, že tyto čtyři peptidy měly stejnou vazebnou afinitu k buňkám PC12 (naše nepublikované výsledky). Tento poznatek je v souladu s našimi předchozími výsledky, které dokázaly, že jodace CART(61-102) nezměnila vazebnou afinitu peptidu k buňkám PC12 [89]. Dijodovaný CART(61-102) se vázal k buňkám PC12 a jejich membránám s afinitou stejnou jako CART(61-102), také jsme potvrdili částečné uchování anorexigenní aktivity di-jodovaného CART(61-102) [89]. V této studii byly všechny vazebné experimenty prováděny s monojodovaným ¹²⁵I-CART(61-102), který tvořil hlavní frakci při jodaci CART(61-102).

N-terminální peptid 1 a peptidy 2-5 (Tabulka 6), které odpovídají sekvenci aminokyselin mezi cysteiny v CART(61-102), mají Cys nahrazeny glycinem (nebo Ala v pozici 101). Tyto peptidy se nevázaly k buňkám PC12 ani jejich membránám v rozmezí testovaných koncentrací (Tabulka 6).

Peptidy 6 a 7 jsou cyklické analogy peptidu 3, oba obsahují Cys na N- a C-konci (Tabulka 6). Ačkoliv se liší pouze v C-koncové funkční skupině, chovaly se velmi rozdílně. Zatímco látka 7 se skupinou COOH na C-konci nevytěsnila vazbu ¹²⁵I-CART(61-102) na buňky PC12, látka 6 s amidem na C-konci se vázala k nediferencovaným buňkám a jejich membránám s K_d řádově 10^{-4} M (Tabulka 7). Afinita peptidu 6 k diferencovaným buňkám byla 7krát nižší ve srovnání s nediferencovanými. Možným vysvětlením je, že po diferenciaci na neurony se může prostředí vazebného místa změnit a tím se změnit i vazba ¹²⁵I-CART(61-

102) k těmto buňkám. Receptor pro peptid CART však ještě nebyl identifikován, takže není možné popsat další detaily vazby.

Látky 9 a 10 jsou prodlouženou verzí látky 6, liší se jen pozicí jejich disulfidických můstků (pozice 68-86 nebo 74-86) (Tabulka 6). Jejich vazebná afinita k nediferencovaným i diferencovaným buňkám PC12 byla srovnatelná a mírně nižší než afinita peptidu 6 (Tabulka 6). Peptid 8, který je lineární analog peptidu 9 a 10, nevykazoval žádnou vazebnou afinitu v rozmezí testovaných koncentrací. To ukazuje, že uchování kompaktní struktury s disulfidickými můstky (struktura „uzlů“) je zcela nezbytné pro biologickou aktivitu peptidu CART k potenciálnímu receptoru na buňkách PC12.

Proto také nebylo velkým překvapením, že v testu příjmu potravy fragmenty 6 a 9 nesnižovaly příjem potravy u hladových myší po ICV podání až do koncentrace 4 nmol/myš, tj. 40krát vyšší dávky než jaká byla použita u CART(55-102) a CART(61-102) (Obrázek 23). Dávka, kterou jsme použili u fragmentů peptidu CART, byla zároveň nejvyšší dávka, která byla použita v předchozích studiích [138, 139]. V případě peptidů 6 a 9 nemůžeme také zcela vyloučit možný antagonistický, tj. orexigenní efekt. Couceyro a Fritz [146] ukázali, že CART(55-102) bez disulfidických můstků zvyšoval příjem potravy u sytých potkanů. Nicméně v našem testu jsme žádný signifikantní vzrůst příjmu potravy nepozorovali.

Lineární fragment 11 a jeho derivát 12 (Tabulka 6) byly odvozeny od fragmentu CART(62-76), jehož biologická aktivita byla publikována již dříve [138, 139]. Podle této studie peptidy CART(55-76) a (62-76) snižovaly po ICV podání příjem potravy u potkanů. Nebylo ale popsáno, zda se SH skupiny peptidů během pokusu oxidují nebo nikoliv. V naší studii měl fragment 11 volné cysteiny, fragment 12 měl cysteiny v pozici 68 a 74 chráněné skupinou AcM. Linearita tohoto fragmentu byla potvrzena hmotnostní spektrometrií [134]. Žádný z těchto dvou fragmentů se k nediferencovaným ani diferencovaným buňkám PC12 a membránám nevázal. Navíc nebyl peptid 11 ani schopen inhibovat příjem potravy po ICV podání hladovým myším. Rozpor mezi našimi a výsledky dříve publikovanými Lambertem a kol. [138] a Kaskem a kol. [139] je možno vysvětlit různými druhy použitých zvířat (myši *versus* potkani) a experimentálního uspořádání (hladová nebo volně žeroucí zvířata). Na druhé straně naše výsledky testu příjmu potravy jsou v souladu s výsledky naší vazebné studie.

C-koncové fragmenty 13 a 14 (Tabulka 6) byly syntetizovány, abychom ověřili studii provedenou Dylagem a kol. v r. 1996 [92, 147]. V této studii byla popsána biologická aktivita

derivátů CART(55-102) s redukovánými thiolovými skupinami v lineární a cyklické formě: [Abu^{86,94}]CART(85-102) a [Abu^{86, 88, 94, 101}]CART(85-102). Oba lineární analogy peptidu CART byly schopny inhibovat pohybovou aktivitu vyvolanou po centrálním podání kokainu a amfetaminu myším [147]. Je také známo, že CART(55-102) snižuje pohybovou aktivitu zvýšenou po podání kokainu [148] nebo amfetaminu [149] do oblasti nucleu accumbens potkanů. Srovnání těchto studií navzájem je ovšem obtížné, protože byly použity rozdílné zvířecí modely i podání do odlišných oblastí mozku.

V naší práci jsme resyntetizovali [Abu^{86,94}]CART(85-102) jako lineární peptid 13 a jeho cyklický derivát 14 (Tabulka 6). Linearita peptidu 13 byla kontrolována v průběhu vazebného experimentu, protože tento peptid je velmi náchylný ke spontánní oxidaci. Skutečně bylo nalezeno asi 20% oxidované formy po 30 min inkubace peptidu s buňkami PC12. Výsledky ukazují, že se oba fragmenty 13 a 14 nevázaly k buňkám PC12 v rozmezí testovaných koncentrací (Tabulka 7). Navíc peptid 13 nevykázal žádnou biologickou aktivitu v testu příjmu potravy v dávce 4 nmol/myš po ICV podání (Obrázek 23). V práci Dylaga a kol. [92, 147] byla naznačena důležitost C-koncové části peptidu CART pro interakci s opioidním systémem. Naše studie však ukazuje, že pro uchování anorexigenní aktivity peptidu CART(61-102) je nezbytná struktura obsahující disulfidické můstky a jeho C-koncová část snížení příjmu potravy nezpůsobuje.

Výsledky naší studie tedy ukazují, že pro uchování vysoké vazebné afinity k buňkám PC12, stejně jako pro anorexigenní aktivitu jsou zásadně důležité disulfidické můstky ve struktuře „uzlu“ peptidu CART. Z výsledku měření týkajících se N-koncových fragmentů, které tvořily vnější smyčku, se dá usuzovat, že biologická aktivita peptidů CART je do jisté míry spojena s N-koncovou smyčkou molekuly spíše než s C-koncovou.

Vzhledem k tomu, že peptid CART se hojně vyskytuje jak v CNS, tak v periférii, je možno předpokládat jeho mnohočetné role v organismu. To může také znamenat, že existuje více typů receptorů pro peptid CART, a tak i vazebná místa s různou afinitou pro fragmenty peptidu CART. Vazba ke specifickým tumorovým buňkám obsahujícím vysoké množství vazebných míst pro peptid CART, stejně jako použití fragmentů peptidu CART tak může pomoci identifikovat receptory peptidu CART a objasnit fyziologickou úlohu peptidu CART v organismu.

6.3. Synergistický účinek peptidu CART a CCK-8 u štíhlých myší

Hypotéza naší studie o možném synergistickém účinku peptidu CART a CCK-8 je založena na již dříve zjištěném synergistickém účinku leptinu a CCK v regulaci příjmu potravy [48] a faktu, že peptid CART je v nervu vazu kolokalizován s receptory CCK₁ [77]. Vycházeli jsme tudíž z předpokladu, že peptid CART a CCK mohou být v rámci vlivu na příjem potravy součástí neurochemického propojení mezi hypotalamem (ARC) a mozkovým kmenem (NTS). Potenciální spolupráce mezi centrálním peptidem CART a periferním CCK-8 byla sledována v testu krátkodobého příjmu potravy u štíhlých hladových myší a pomocí aktivace c-Fos ve třech oblastech mozku důležitých pro regulaci příjmu potravy: PVN, DMH a NTS [150]. Navíc byly sledovány parametry doplňující chování při příjmu potravy – pohybová aktivita a analgeze. Látky byly podávány jednotlivě nebo simultánně, peptid CART centrálně do třetí mozkové komory (zde je nejvýraznější účinek na příjem potravy [151]), CCK-8 intraperitoneálně (periferní podání vyvolává také největší účinek [152]).

Intracerebroventrikulární podání CART(61-102) hladovým myším C57Bl/6 (Obrázek 25) způsobilo snížení příjmu potravy v závislosti na dávce podobně jako ve studiích Thima a kol. [2], Bannona a kol.[75] a Vranga a kol. [74]. CCK-8 v dávkách 0.4 a 4 µg/kg nevykazoval žádný signifikantní efekt na příjem potravy u hladových myší kmene C57Bl/6 (EC₅₀ byla v tomto uspořádání experimentu 15 µg/kg, jak jsme určili v předběžné studii), zatímco outbrední myši NMRI byly citlivé k dávce CCK-8 4 µg/kg (s EC₅₀ přibližně 9 µg/kg [89]). Hladina leptinu v séru myší po 17h hladovění byla u robustních myší kmene NMRI asi o 50% vyšší než u subtilních myší C57Bl/6 (0,45 ng/ml u NMRI myší [89] a 0,30 ng/ml u samců C57Bl/6 (naše nepublikovaná data)). To bylo patrně hlavním důvodem, proč prahová dávka CCK-8 pro účinek na příjem potravy byla vyšší u myší C57Bl/6 ve srovnání s kmenem NMRI (4 *versus* 0,4 µg/kg).

Při hladovění dlouhém 48 hodin byl účinek CCK-8 potlačen v důsledku snížených hladin leptinu [51]. Barrachina a kol. [48] popsali synergistický účinek leptinu a CCK u myší, které hladověly 24h. V našem experimentu tedy můžeme předpokládat, že společný účinek leptinu a CCK byl zachován u myší hladovějících 17h, ačkoliv hladiny leptinu byly po hladovění sniženy.

V této studii jsme prokázali, že nízké dávky CCK prohloubily anorexigenní účinek peptidu CART v závislosti na dávce a prodloužily významně dobu účinku peptidu CART na příjem potravy (Obrázek 25,26). To je v souladu s naší hypotézou týkající se synergistického účinku CART(61-102) a CCK-8 na příjem potravy. Dále jsme dokázali významný vliv receptoru CCK₁ v tomto procesu. Selektivní antagonist receptoru CCK₁ devazepid [153] totiž blokoval účinek CART(61-102) na příjem potravy (Obrázek 25, 26B). Podobným způsobem byl anorexigenní účinek peptidu CART inhibován antagonistou receptoru pro GLP-1 [154]. Naopak selektivní antagonist receptoru CCK₂, který neovlivňuje příjem potravy [153], nezměnil pokles v příjmu potravy navozený peptidem CART. To podpořilo teorii o účasti výlučně receptoru CCK₁ v tomto ději.

Simultánní podání leptinu a CCK-8 v dávce 3.5 µg/kg IP, která byla podprahová, navozovalo sytost a aktivovalo neurony v mozkovém kmeni u štíhlých samců C57Bl/6, stejně jako zvyšovalo počet neuronů pozitivních na Fos v oblasti PVN [48]. V naší studii byla imunoreaktivita proteinu Fos po injekci peptidu CART a/nebo CCK-8 detekována v oblastech NTS, PVN a DMH (Obrázek 27), což jsou známe oblasti, kde působí peptid CART [74, 155] i CCK [51, 140, 156] [48, 157]. Byl zaznamenán vysoký vzrůst počtu buněk pozitivních na Fos při dávkách peptidu CART, které významně snižovaly příjem potravy, podávaných s podprahovou dávkou CCK-8 (Obrázek 27). Tato neuronální odpověď byla významně silnější než odpověď jednotlivě podaných peptidů. Tento výsledek podpořil ideu kooperace mezi peptidem CART a CCK-8 jak v mozkovém kmeni, tak v hypothalamických oblastech PVN a DMH, kde jsou zpracovávány signály jak z periferie, tak z nucleu arcuatu. PVN je vysoce inervovaný a propojený s DMH. Bylo publikováno, že CCK může aktivovat neurony produkující CRH v DMH [140] pomocí noradrenergní projekce z NTS [158]. Tuto studii doplňuje naše nejnovější publikace [159], která popisuje zvýšení proteinu Fos v ARC a snížení proteinu Fos v orexinových neuronech LHA po společném podání CART peptidu a CCK.

Předchozí data byla navíc doplněna o behaviorální testy, které s příjmem potravy souvisí. Již dříve byl popsán vliv peptidu CART na lokomoční (pohybovou) aktivitu ve volném poli a na analgesii [75, 139]. Velikost účinku se ale lišila u různých studií. V naší studii také testy lokomoční aktivity sledovaly trend popsáný u příjmu potravy (Obrázek 28A). Dávka CCK-8, která nesnížila významně příjem potravy (4 µg/kg IP), neměla vliv ani na test volného pole (lokomoční aktivitu), zatímco CART(61-102) v dávce 0.5 µg/myš a

kombinace CCK-8 a CART(61-102) signifikantně potlačovala lokomoční aktivitu myší v porovnání s myši injikovanými fyziologickým roztokem. Podobně jako v testu příjmu potravy, i zde devazepid samotný neovlivnil lokomoční aktivitu myší, ale blokoval účinek peptidu CART (Obrázek 28A). Toto zjištění opět ukazuje, že účinek peptidu CART byl prohloubený pomocí aktivace receptoru CCK₁ a ukazuje na sedativní účinky látek související s pocitem sytosti. Analgetický test horké plotny, který byl také prováděn, pak neukázal žádnou signifikantní změnu po podání výše jmenovaných látek jednotlivě i v kombinaci (Obrázek 28B).

Dlouhotrvající synergistický účinek CCK a peptidu CART může být interpretován také s poukázáním na výsledky de Lartigue a kol. [78], které popisují expresi CART indukovanou CCK a následný účinek endogenně produkovaného peptidu CART. Na druhé straně Broberger a kol. uvádějí, že exprese receptoru CCK₁ nezávisí na metabolickém stavu organismu [77]. Naše výsledky byly potvrzeny v letos vyšlé publikaci autorů de Lartigue a kol. [160] zabývající se synergistickým účinkem CCK a peptidu CART na aktivitu neuronů v nervu vagu a na příjem potravy.

Nervová osa mezi oblastmi ARC-PVN-DVC (dorsální komplex nervu vagu, jehož součástí je NTS) má patrně integrační roli při synergistickém vlivu leptinu a CCK na snížení příjmu potravy [48]. Příjem potravy byl ovlivněn podáním leptinu a CCK a trval více než 7 hodin. Aktivace nervových cest pro leptin a CCK se překrývá ve třech jádrech: PVN, parabrachiálním jádru a NTS [51]. Z naší studie vyplývá, že peptid CART spolu s CCK může fungovat jako mediátor anorexigenního účinku v hypotalamu i mozgovém kmeni. Dalšímu poznávání mechanismu účinku peptidu CART a jiných peptidů by značně pomohla identifikace receptoru pro peptid CART, popřípadě nalezení antagonisty peptidu CART.

6.4. Anorektický účinek peptidu CART a CCK-8 v modelu štíhlých a obézních MSG myši

Obezita způsobená účinky glutamátu sodného v prvních dnech života hlodavců (MSG obezita) vede ke specifickým lézím v nucleu arcuatu [115], ale ostatní hypotalamická jádra zůstávají nedotčena [120, 121]. Metabolické a fyzické změny spojené s lézemi v ARC u MSG myši ukazují na zásadní roli, kterou ARC v regulaci energetické i hormonální regulace organismu hraje. V ARC u MSG hlodavců je nefunkční signalizace jak leptinu, tak inzulínu [121] [161] a produkce anorexigenního peptidu CART i orexigenního NPY je inhibována [77, 119]. Jak NPY, tak peptid CART jsou produkovány také v jiných hypotalamických oblastech, jako je PVN a LHA. Imunoreaktivita NPY zůstala u MSG myši zachována v PVN [119], pravděpodobně v důsledku lokální exprese NPY [162]. CART je exprimován vedle ARC také v mozковém kmeni a nervu vazu [77]. To vše dokazuje, že existují zdroje NPY a peptidu CART vně ARC, které při obezitě vyvolané MSG zůstávají zachovány.

Hlodavci po působení MSG nerozlišují příjem potravy za světla a tmy, protože mají degradované buňky oční sítnice [120, 163] a dochází u nich k vývoji obezity a akumulace tuku [164], který je spíše důsledkem menšího energetického výdeje než zvýšeného příjmu potravy [165]. Možným důvodem je snížený účinek anorexigenních peptidů, které mají místo účinku nebo jsou zároveň i produkovány v ARC. Po 24h hladovění vykazovaly MSG obézní myši kmene NMRI stále snížený příjem potravy ve srovnání s kontrolami, a tudíž bylo velmi obtížné sledovat odpověď jak na periferně injikovaný CCK-8 [121], tak na centrálně podaný peptid CART (naše předběžné výsledky).

K překonání problému, jak měřit krátkodobý příjem potravy u MSG myši, jsme použili následující poznatky:

- 1/ u štíhlých sytých myši bylo dokázáno, že jak CCK, tak peptid CART snižuje orexigenní účinek centrálně podaného NPY [52, 138].
- 2/ u MSG potkanů byl zachován orexigenní účinek NPY [166].

V naší studii [167] byl sledován příjem potravy u volně žeroucích samců myši C57Bl/6 jak štíhlých, tak MSG obézních, po paralelním centrálním podání orexigenního NPY buď s peptidem CART(61-102), nebo s periferně podaným CCK-8. Cílem práce bylo najít, zda anorexigenní peptid CART a CCK mají uchovanou biologickou funkci u myši s MSG

obezitou a obecně, zda funkční ARC je nezbytný pro anorexigenní účinek CCK a peptidu CART.

NPY vykazuje účinek na příjem potravy na úrovni PVN a LHA, které jsou bohatě inervovány z ARC a kde jsou exprimovány receptory Y1 [16]. Naše studie ukázala, že ačkoliv u MSG myši byly prakticky všechny nervové dráhy z ARC přerušeny, orexigenní účinek NPY a anorexigenní účinek peptidu CART po podání látek do třetí mozkové komory zůstaly zachovány (Obrázek 31C). Exogenní peptid CART snížil orexigenní účinek NPY pravděpodobně působením na specifická vazebná místa peptidu CART [89], která jsou umístěna vně ARC. Je možné, že u MSG myši může NPY a peptid CART signalizovat přes PVN a LHA, kde jsou intaktní neuronální dráhy.

Anorexigenní účinek CCK je navozen přes receptory CCK_1 lokalizované jak v CNS, tak v periférii. CCK se účastní regulace sytosti a hladu ve dvou oblastech mozku: v NTS v mozkovém kmeni a v mediobazálním hypotalamu [50]. Ačkoliv žádná z těchto oblastí nebyla glutamát sodným poškozena, CCK-8, který u kontrolních myši snižoval účinek NPY, nebyl schopen u MSG myši orexigenní účinek NPY ovlivnit (Obrázek 31C). To je v souladu s naší předchozí studií s MSG myšmi kmene NMRI [121]. Již dříve bylo dokázáno, že MSG obézní hlodavci mají potlačenou odezvu na periferně i centrálně podaný leptin [168] [161] podobně jako u obézních Koletsky fa^k/fa^k potkanů [169, 170] nebo db/db myši [170, 171]. Hlavním důvodem ve všech těchto případech je nefunkční nebo chybějící leptinový receptor. Zároveň všechny tyto zvířecí modely s nefunkční signalizací leptinu nebyly schopny reagovat na CCK [121]. U obézních Koletsky potkanů byla obnovena signalizace leptinu v ARC použitím injekce lidského lepr^b adenoviru do ARC, a tím byl také aktivován účinek CCK v mozkovém kmeni, kde jsou procesovány sytostní impulzy z periferie [171]. To ukazuje, že funkční leptinové receptory v ARC jsou zcela nezbytné pro to, aby byla navozena sytosti pomocí CCK. Zároveň to také vysvětluje, proč nebyl CCK funkční u MSG myši v naší studii. Zdá se tedy, že zatímco pro účinek peptidu CART na příjem potravy nejsou nezbytné funkční receptory pro leptin v ARC, odpověď periferního CCK je na nich přímo závislá.

6.5. Charakterizace účinku analogů PrRP na hypofyzární buněčné linie

Peptid uvolňující prolaktin, jehož název byl odvozen z jeho předpokládané funkce, je nyní považován za látku s odlišnou úlohou v organismu, jako je např. sekrece hormonů a regulace příjmu a výdeje energie. Protože dosud není znám žádný antagonist PrRP, který by pomohl objasnit přesnou fyziologickou funkci tohoto peptidu, a zároveň je velmi málo poznatků týkajících se vazby analogů PrRP k receptoru [114] [113], rozhodli jsme se provést vazebnou a funkční studii analogů PrRP s buňkami, které spontánně exprimují receptor pro PrRP a jsou tudíž velmi vhodným materiálem [142]

Vazbu a funkční vlastnosti dvou přirozeně se vyskytujících analogů PrRP- PrRP31 a PrRP20, stejně jako C-koncového fragmentu PrRP13 jsme sledovali u tří hypofyzárních buněčných linií: myších adenokortikotropů AtT-20, potkaních buněk GH3 obsahujících somatotropy a laktotropy a potkaních buněk RC-4B/C obsahujících somatotropy, laktotropy, adenokortikotropy a gonadotropy. U všech tří linií byla dokázána přítomnost receptoru pro PrRP pomocí imunodetekce metodou western blotu (Obrázek 33).

Specifická vazba ^{125}I -PrRP31 byla charakterizována v buňkách s transfektovaným GPR10 [93] [113] nebo UHR-1 [93, 99] a byla nalezena K_d v pM a nM oblasti. Potkaní membrány z hypotalamu a hypofýzy vykazovaly specifickou vazbu ^{125}I -PrRP31 s K_d v nM oblasti [172]. V naší studii byly nalezeny ve všech hypofyzárních liniích K_d v nM oblasti, což je obvyklé pro vazbu endogenního ligandu k receptoru [132]. Všechny tři buněčné linie vykazovaly poměrně vysoký – ale možný [132] počet vazebných míst na buňku (B_{\max}) – řádově v desetitisících. Buňky tedy jsou vhodné pro následné vazebné a funkční studie.

Vazebná afinita všech tří analogů, PrRP31, 20 a 13, byla porovnáвана v kompetitivním vazebném experimentu na buňkách RC-4B/C. PrRP31 a 20 měly podobnou K_i v oblasti nM, srovnatelnou s publikovanými údaji [113]. PrRP13 měl ale K_i o dva řády vyšší, tedy vazebnou afinitu k receptoru slabší (Tabulka 11). Vazebná afinita I-PrRP31 byla srovnatelná s afinitou PrRP31, takže jodace peptidu nezměnila vlastnosti PrRP (Tabulka 11).

PrRP byl původně považován za látku, která vyvolává sekreci prolaktinu jak v potkaních buňkách RC-4B/C, tak v primárních hypofyzárních buňkách laktujících potkaních samic [93]. Později bylo však zjištěno, že tento efekt je slabší než účinek jiných hormonů jako TRH nebo vasoaktivního intestinálního peptidu [173, 174]. Dokonce bylo popsáno, že PrRP

pouze zvýšil produkci PRL vyvolanou TRH [175], ale neovlivnil přímo sekreci PRL v primárních potkaních hypofyzárních buňkách [176] nebo *in vivo* [177]. Takže bylo zpochybněno, že vliv na sekreci PRL je primární úloha PrRP v organismu [178]. Na druhé straně bylo zjištěno, že PrRP vyvolává sekreci růstového hormonu, ale ne PRL v lidských hypofyzárních adenomech [173]. U potkanů způsobily centrální injekce PrRP uvolňování GH, LH a ACTH [179, 180]. V důsledku rozporupných výsledků předchozích studií jsme se rozhodli testovat vliv PrRP31 na sekreci všech hypofyzárních hormonů z příslušných tří buněčných linií. Bylo použito ELISA testu MILLIPLEX pro potkaní hypofyzární hormony. Ze všech tří použitých linií jsme pozorovali velmi silnou sekreci PRL jen u linie RC-4B/C tak, jak bylo původně popsáno v práci Hinumy a kol. [93].

Tuto linii jsme dále použili k podrobnějšímu testování sekrece PRL a bylo zjištěno, že PrRP31 i 20 i 13 uvolňují PRL dávkově závisle se srovnatelnou EC_{50} v nM oblasti (Obrázek 39).

Neurotransmitery, které se účastní regulace energetického metabolismu a působí na receptory spřažené s G-proteinem, jako je i PrRP, obvykle aktivují MAPK/EKR1/2 a následně genovou transkripci navozenou aktivací CREB [181]. Bylo popsáno, že PrRP stimuluje fosforylaci jak MAPK/ERK1/2 [108], tak CREB [182] v buňkách GH3, a tak ovlivňuje zvýšení aktivity promotoru PRL.

V naší studii jsme zjistili, že PrRP31, 20 a 13 ekvivalentně zvyšují fosforylaci jak MAPK/ERK1/2 (v cytosolu), tak CREB (v jádře) a stimuluje uvolňování PRL v buňkách RC-4B/C. To naznačuje, že jsou v této linii laktotropy aktivovány cestou signalizace MAPK/ERK1/2 a CREB. Tato buněčná linie je tudíž vhodným modelem pro testování analogů PrRP *in vitro* a PrRP20 je vhodným výchozím analogem pro další strukturně-aktivitní studie. Cílem budoucí studie by mohlo být jak nalezení antagonisty PrRP, tak agonistů PrRP se selektivně anorexigenními účinky a dlouhodobým působením.

7. SHRnutí

1/ Strukturně-aktivitní studie fragmentů reprezentujících různé části CART(61-102) charakterizovala jak jejich vazbu k feochromocytomálním buňkám PC12, tak jejich schopnost ovlivnit příjem potravy u hladových myší. Výsledky ukázaly, že pro uchování biologické aktivity peptidu CART je nezbytná kompaktní struktura obsahující disulfidické můstky. Ze všech testovaných fragmentů pouze CART(74-86) a (62-86) vykazovaly nízkou afinitu k vazebnému místu v buňkách PC12.

2/ Byl prokázán synergistický účinek CCK a peptidu CART na příjem potravy u hladových myší, který aktivoval neurony v hypotalamických oblastech PVN a DMH, stejně jako v mozgovém kmeni v NTS. Peptid CART by tak mohl působit jako mediátor anorexigenního účinku leptinu v obou těchto místech mozku.

3/ U MSG obézních myší s lézemi v ARC bylo prokázáno, že anorexigenní účinek centrálně podaného peptidu CART zůstává zachován, zatímco periferně podaný CCK u těchto myší na příjem potravy nepůsobí. Důvodem je patrně nefunkční signalizace leptinu v ARC, která je nezbytná pro zprostředkování účinku CCK na příjem potravy.

4/ Ve třech hypofyzárních buněčných liniích byla prokázána přítomnost receptoru pro PrRP a specifická vazba **PrRP** k těmto receptorům vykazovala K_d v nM oblasti. Zejména vhodná pro studium analogů PrRP se ukázala potkaní buněčná linie RC-4B/C. PrRP31 a PrRP20 měly srovnatelnou vazebnou afinitu k PrRP receptoru, PrRP13 měl afinitu řádově nižší. Nicméně všechny tři analogy stimulovaly uvolnění prolaktinu z této buněčné linie, stejně jako aktivaci MAPK/ERK1/2 a CREB v buňce.

LITERATURA

1. Rogge G, Jones D, Hubert G, Lin Y, Kuhar M: **CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions.** *Nat Rev Neurosci* 2008, **9**(10):747-758.
2. Thim L, Nielsen P, Judge M, Andersen A, Diers I, Egel-Mitani M, Hastrup S: **Purification and characterisation of a new hypothalamic satiety peptide, cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), produced in yeast.** *FEBS Lett* 1998, **428**(3):263-268.
3. WHO: http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS09_Full.pdf.
4. Halford J: **Pharmacology of appetite suppression: implication for the treatment of obesity.** *Curr Drug Targets* 2001, **2**(4):353-370.
5. IOTF: <http://www.iotf.org/>.
6. Svačina Š: **Počet obézních Čechů stoupl za čtyři roky o 450 tisíc. To je varující, říká obezitolog.** <http://novinky.cz>, 17.8.2009
7. Han J, Lawlor D, Kimm S: **Childhood obesity.** *Lancet* 2010, **375**(9727):1737-1748.
8. Hainer V: **Obezita.** Praha: Triton; 2003.
9. Padwal R, Majumdar S: **Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant.** *Lancet* 2007, **369**(9555):71-77.
10. Strader A, Woods S: **Gastrointestinal hormones and food intake.** *Gastroenterology* 2005, **128**(1):175-191.
11. Pi-Sunyer X: **The medical risks of obesity.** *Postgrad Med* 2009, **121**(6):21-33.
12. Kopelman P: **Obesity as a medical problem.** *Nature* 2000, **404**(6778):635-643.
13. Schwartz M, Woods S, Porte DJ, Seeley R, Baskin D: **Central nervous system control of food intake.** *Nature* 2000, **404**(6778):661-671.
14. Atkinson T: **Central and peripheral neuroendocrine peptides and signalling in appetite regulation: considerations for obesity pharmacotherapy.** *Obes Rev* 2008, **9**(2):108-120.
15. Wilding J: **Neuropeptides and appetite control.** *Diabet Med* 2002, **19**(8):619-627.
16. Broberger C, Hökfelt T: **Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake.** *Physiol Behav* 2001, **74**(4-5):669-682.
17. Bouret S, Draper S, Simerly R: **Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice.** *J Neurosci* 2004, **24**(11):2797-2805.
18. Martin N, Smith K, Bloom S, Small C: **Interactions between the melanocortin system and the hypothalamo-pituitary-thyroid axis.** *Peptides* 2006, **27**(2):333-339.
19. Simpson K, Martin N, Bloom S: **Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications.** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009, **53**(2):120-128.
20. Meister B: **Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight.** *Physiol Behav* 2007, **92**(1-2):263-271.
21. Bernardis L, Bellinger L: **The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update.** *Brain Res* 1987, **434**(3):321-381.
22. Zanella M, Ribeiro Filho F: **Emerging drugs for obesity therapy.** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009, **53**(2):271-280.

23. Murphy K, Dhillo W, Bloom S: **Gut peptides in the regulation of food intake and energy homeostasis.** *Endocr Rev* 2006, **27**(7):719-727.
24. M H: **Poruchy výživy a leptin.** Praha: Grada Publishing; 2002.
25. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J: **Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.** *Nature* 1994, **372**(6505):425-432.
26. Walder K, de Silva A: **Leptin and the treatment of obesity.** *Drug Development Research* 2000:66-79.
27. Truett G, Bahary N, Friedman J, Leibel R: **Rat obesity gene fatty (fa) maps to chromosome 5: evidence for homology with the mouse gene diabetes (db).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(17):7806-7809.
28. Porte DJ, Baskin D, Schwartz M: **Leptin and insulin action in the central nervous system.** *Nutr Rev* 2002, **60**(10 Pt 2):S20-29; discussion S68-84, 85-27.
29. Zhang F, Basinski M, Beals J, Briggs S, Churgay L, Clawson D, DiMarchi R, Furman T, Hale J, Hsiung H *et al*: **Crystal structure of the obese protein leptin-E100.** *Nature* 1997, **387**(6629):206-209.
30. Tartaglia L: **The leptin receptor.** *J Biol Chem* 1997, **272**(10):6093-6096.
31. Howard J, Cave B, Oksanen L, Tzamelis I, Bjørbaek C, Flier J: **Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3.** *Nat Med* 2004, **10**(7):734-738.
32. Harvey J, Ashford M: **Leptin in the CNS: much more than a satiety signal.** *Neuropharmacology* 2003, **44**(7):845-854.
33. Blundell T, Cutfield J, Cutfield S, Dodson E, Dodson G, Hodgkin D, Mercola D, Vijayan M: **Atomic positions in rhombohedral 2-zinc insulin crystals.** *Nature* 1971, **231**(5304):506-511.
34. White M, Kahn C: **The insulin signaling system.** *J Biol Chem* 1994, **269**(1):1-4.
35. Bagdade J, Bierman E, Porte DJ: **The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects.** *J Clin Invest* 1967, **46**(10):1549-1557.
36. Woods S, Seeley R, Baskin D, Schwartz M: **Insulin and the blood-brain barrier.** *Curr Pharm Des* 2003, **9**(10):795-800.
37. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K: **Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach.** *Nature* 1999, **402**(6762):656-660.
38. Kojima M, Kangawa K: **Ghrelin: structure and function.** *Physiol Rev* 2005, **85**(2):495-522.
39. Sartor D, Verberne A: **Abdominal vagal signalling: a novel role for cholecystokinin in circulatory control?** *Brain Res Rev* 2008, **59**(1):140-154.
40. Moran T, Kinzig K: **Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, **286**(2):G183-188.
41. Gibbs J, Young R, Smith G: **Cholecystokinin decreases food intake in rats.** *J Comp Physiol Psychol* 1973, **84**(3):488-495.
42. Moran T: **Cholecystokinin and satiety: current perspectives.** *Nutrition* 2000, **16**(10):858-865.

43. Woods S: **Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, **286**(1):G7-13.
44. Little T, Horowitz M, Feinle-Bisset C: **Role of cholecystokinin in appetite control and body weight regulation.** *Obes Rev* 2005, **6**(4):297-306.
45. Smith G, Jerome C, Cushin B, Eterno R, Simansky K: **Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat.** *Science* 1981, **213**(4511):1036-1037.
46. Asin K, Bednarz L, Nikkel A, Gore PJ, Nadzan A: **A-71623, a selective CCK-A receptor agonist, suppresses food intake in the mouse, dog, and monkey.** *Pharmacol Biochem Behav* 1992, **42**(4):699-704.
47. Matson C, Reid D, Cannon T, Ritter R: **Cholecystokinin and leptin act synergistically to reduce body weight.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000, **278**(4):R882-890.
48. Barrachina M, Martínez V, Wang L, Wei J, Taché Y: **Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**(19):10455-10460.
49. Tatemoto K: **Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982, **79**(18):5485-5489.
50. Cummings D, Overduin J: **Gastrointestinal regulation of food intake.** *J Clin Invest* 2007, **117**(1):13-23.
51. McMinn J, Sindelar D, Havel P, Schwartz M: **Leptin deficiency induced by fasting impairs the satiety response to cholecystokinin.** *Endocrinology* 2000, **141**(12):4442-4448.
52. Kristensen P, Judge M, Thim L, Ribel U, Christjansen K, Wulff B, Clausen J, Jensen P, Madsen O, Vrang N *et al*: **Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin.** *Nature* 1998, **393**(6680):72-76.
53. Morley J, Hernandez E, Flood J: **Neuropeptide Y increases food intake in mice.** *Am J Physiol* 1987, **253**(3 Pt 2):R516-522.
54. Stephens T, Basinski M, Bristow P, Bue-Valleskey J, Burgett S, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung H, Kriauciunas A: **The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product.** *Nature* 1995, **377**(6549):530-532.
55. Spiess J, Villarreal J, Vale W: **Isolation and sequence analysis of a somatostatin-like polypeptide from ovine hypothalamus.** *Biochemistry* 1981, **20**(7):1982-1988.
56. Douglass J, McKinzie A, Couceyro P: **PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine.** *J Neurosci* 1995, **15**(3 Pt 2):2471-2481.
57. Fekete C, Lechan R: **Neuroendocrine implications for the association between cocaine- and amphetamine regulated transcript (CART) and hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH).** *Peptides* 2006, **27**(8):2012-2018.
58. Dun S, Brailoiu G, Yang J, Chang J, Dun N: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide and sympatho-adrenal axis.** *Peptides* 2006, **27**(8):1949-1955.
59. Wierup N, Björkqvist M, Kuhar M, Mulder H, Sundler F: **CART regulates islet hormone secretion and is expressed in the beta-cells of type 2 diabetic rats.** *Diabetes* 2006, **55**(2):305-311.
60. Ekblad E: **CART in the enteric nervous system.** *Peptides* 2006, **27**(8):2024-2030.

61. Dominguez G: **The CART gene: structure and regulation.** *Peptides* 2006, **27(8):**1913-1918.
62. Stein J, Steiner D, Dey A: **Processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) precursor proteins by prohormone convertases (PCs) and its implications.** *Peptides* 2006, **27(8):**1919-1925.
63. Ludvigsen S, Thim L, Blom A, Wulff B: **Solution structure of the satiety factor, CART, reveals new functionality of a well-known fold.** *Biochemistry* 2001, **40(31):**9082-9088.
64. Murphy K, Abbott C, Mahmoudi M, Hunter R, Gardiner J, Rossi M, Stanley S, Ghatei M, Kuhar M, Bloom S: **Quantification and synthesis of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (79-102)-like immunoreactivity and mRNA in rat tissues.** *J Endocrinol* 2000, **166(3):**659-668.
65. Wierup N, Sundler F: **CART is a novel islet regulatory peptide.** *Peptides* 2006, **27(8):**2031-2036.
66. Koylu E, Couceyro P, Lambert P, Ling N, DeSouza E, Kuhar M: **Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland.** *J Neuroendocrinol* 1997, **9(11):**823-833.
67. Larsen P, Seier V, Fink-Jensen A, Holst J, Warberg J, Vrang N: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript is present in hypothalamic neuroendocrine neurones and is released to the hypothalamic-pituitary portal circuit.** *J Neuroendocrinol* 2003, **15(3):**219-226.
68. Koylu E, Balkan B, Kuhar M, Pogun S: **Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) and the stress response.** *Peptides* 2006, **27(8):**1956-1969.
69. Couceyro P, Paquet M, Koylu E, Kuhar M, Smith Y: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide immunoreactivity in myenteric plexus neurons of the rat ileum and co-localization with choline acetyltransferase.** *Synapse* 1998, **30(1):**1-8.
70. Wang C, Billington C, Levine A, Kotz C: **Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression.** *Neuroreport* 2000, **11(14):**3251-3255.
71. Asnicar M, Smith D, Yang D, Heiman M, Fox N, Chen Y, Hsiung H, Köster A: **Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet.** *Endocrinology* 2001, **142(10):**4394-4400.
72. Wierup N, Gunnarsdóttir A, Ekblad E, Sundler F: **Characterisation of CART-containing neurons and cells in the porcine pancreas, gastro-intestinal tract, adrenal and thyroid glands.** *BMC Neurosci* 2007, **8:**51.
73. Vrang N, Kristensen P, Tang-Christensen M, Larsen P: **Effects of leptin on arcuate pro-opiomelanocortin and cocaine-amphetamine-regulated transcript expression are independent of circulating levels of corticosterone.** *J Neuroendocrinol* 2002, **14(11):**880-886.
74. Vrang N, Tang-Christensen M, Larsen P, Kristensen P: **Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour.** *Brain Res* 1999, **818(2):**499-509.
75. Bannon A, Seda J, Carmouche M, Francis J, Jarosinski M, Douglass J: **Multiple behavioral effects of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)**

- peptides in mice: CART 42-89 and CART 49-89 differ in potency and activity.** *J Pharmacol Exp Ther* 2001, **299**(3):1021-1026.
76. Okumura T, Yamada H, Motomura W, Kohgo Y: **Cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART) acts in the central nervous system to inhibit gastric acid secretion via brain corticotropin-releasing factor system.** *Endocrinology* 2000, **141**(8):2854-2860.
77. Broberger C, Holmberg K, Kuhar M, Hökfelt T: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rat vagus nerve: A putative mediator of cholecystokinin-induced satiety.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(23):13506-13511.
78. De Lartigue G, Dimaline R, Varro A, Dockray G: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript: stimulation of expression in rat vagal afferent neurons by cholecystokinin and suppression by ghrelin.** *J Neurosci* 2007, **27**(11):2876-2882.
79. Jensen P, Kristensen P, Clausen J, Judge M, Hastrup S, Thim L, Wulff B, Foged C, Jensen J, Holst J *et al*: **The hypothalamic satiety peptide CART is expressed in anorectic and non-anorectic pancreatic islet tumors and in the normal islet of Langerhans.** *FEBS Lett* 1999, **447**(2-3):139-143.
80. Stanek L: **Cocaine- and amphetamine related transcript (CART) and anxiety.** *Peptides* 2006, **27**(8):2005-2011.
81. Osei-Hyiaman D, Depetrillo M, Harvey-White J, Bannon A, Cravatt B, Kuhar M, Mackie K, Palkovits M, Kunos G: **Cocaine- and amphetamine-related transcript is involved in the orexigenic effect of endogenous anandamide.** *Neuroendocrinology* 2005, **81**(4):273-282.
82. Yermolaieva O, Chen J, Couceyro P, Hoshi T: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide modulation of voltage-gated Ca²⁺ signaling in hippocampal neurons.** *J Neurosci* 2001, **21**(19):7474-7480.
83. Sarkar S, Wittmann G, Fekete C, Lechan R: **Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript increases phosphorylation of cAMP response element binding protein in corticotropin-releasing hormone-producing neurons but not in prothyrotropin-releasing hormone-producing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus.** *Brain Res* 2004, **999**(2):181-192.
84. Lakatos A, Prinster S, Vicentic A, Hall R, Kuhar M: **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* 2005, **384**(1-2):198-202.
85. Yoon H, Kim S, Park H, Kim J: **Microinjection of CART peptide 55-102 into the nucleus accumbens blocks both the expression of behavioral sensitization and ERK phosphorylation by cocaine.** *Neuropharmacology* 2007, **53**(2):344-351.
86. Vicentic A, Lakatos A, Jones D: **The CART receptors: background and recent advances.** *Peptides* 2006, **27**(8):1934-1937.
87. Vicentic A, Lakatos A, Kuhar M: **CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide receptors: specific binding in AtT20 cells.** *Eur J Pharmacol* 2005, **528**(1-3):188-189.
88. Keller P, Compan V, Bockaert J, Giacobino J, Charnay Y, Bouras C, Assimacopoulos-Jeannet F: **Characterization and localization of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) binding sites.** *Peptides* 2006, **27**(6):1328-1334.

89. Maletínská L, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Sloncová E, Elbert T, Slaninová J, Zelezná B: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12.** *Eur J Pharmacol* 2007, **559**(2-3):109-114.
90. Jones D, Kuhar M: **CART receptor binding in primary cell cultures of the rat nucleus accumbens.** *Synapse* 2008, **62**(2):122-127.
91. Thim L, Kristensen P, Nielsen P, Wulff B, Clausen J: **Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides in the rat.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(6):2722-2727.
92. Dylag T, Kotlinska J, Rafalski P, Pachuta A, Silberring J: **The activity of CART peptide fragments.** *Peptides* 2006, **27**(8):1926-1933.
93. Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H *et al*: **A prolactin-releasing peptide in the brain.** *Nature* 1998, **393**(6682):272-276.
94. Onaka T, Takayanagi Y, Leng G: **Metabolic and stress-related roles of prolactin-releasing peptide.** *Trends Endocrinol Metab* 2010, **21**(5):287-293.
95. Ibata Y, Iijima N, Kataoka Y, Kakihara K, Tanaka M, Hosoya M, Hinuma S: **Morphological survey of prolactin-releasing peptide and its receptor with special reference to their functional roles in the brain.** *Neurosci Res* 2000, **38**(3):223-230.
96. Nieminen M, Brandt A, Pietilä P, Panula P: **Expression of mammalian RF-amide peptides neuropeptide FF (NPFF), prolactin-releasing peptide (PrRP) and the PrRP receptor in the peripheral tissues of the rat.** *Peptides* 2000, **21**(11):1695-1701.
97. Lawrence C, Celsi F, Brennan J, Luckman S: **Alternative role for prolactin-releasing peptide in the regulation of food intake.** *Nat Neurosci* 2000, **3**(7):645-646.
98. Kotani M, Mollereau C, Detheux M, Le Poul E, Brézillon S, Vakili J, Mazarguil H, Vassart G, Zajac J, Parmentier M: **Functional characterization of a human receptor for neuropeptide FF and related peptides.** *Br J Pharmacol* 2001, **133**(1):138-144.
99. Langmead C, Szekeres P, Chambers J, Ratcliffe S, Jones D, Hirst W, Price G, Herdon H: **Characterization of the binding of [(125)I]-human prolactin releasing peptide (PrRP) to GPR10, a novel G protein coupled receptor.** *Br J Pharmacol* 2000, **131**(4):683-688.
100. Maruyama M, Matsumoto H, Fujiwara K, Kitada C, Hinuma S, Onda H, Fujino M, Inoue K: **Immunocytochemical localization of prolactin-releasing peptide in the rat brain.** *Endocrinology* 1999, **140**(5):2326-2333.
101. Fujiwara K, Matsumoto H, Yada T, Inoue K: **Identification of the prolactin-releasing peptide-producing cell in the rat adrenal gland.** *Regul Pept* 2005, **126**(1-2):97-102.
102. Sun B, Fujiwara K, Adachi S, Inoue K: **Physiological roles of prolactin-releasing peptide.** *Regul Pept* 2005, **126**(1-2):27-33.
103. Gu W, Geddes B, Zhang C, Foley K, Stricker-Krongrad A: **The prolactin-releasing peptide receptor (GPR10) regulates body weight homeostasis in mice.** *J Mol Neurosci* 2004, **22**(1-2):93-103.
104. Lawrence C, Liu Y, Stock M, Luckman S: **Anorectic actions of prolactin-releasing peptide are mediated by corticotropin-releasing hormone receptors.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004, **286**(1):R101-107.

105. Ellacott K, Lawrence C, Rothwell N, Luckman S: **PRL-releasing peptide interacts with leptin to reduce food intake and body weight.** *Endocrinology* 2002, **143**(2):368-374.
106. Takayanagi Y, Matsumoto H, Nakata M, Mera T, Fukusumi S, Hinuma S, Ueta Y, Yada T, Leng G, Onaka T: **Endogenous prolactin-releasing peptide regulates food intake in rodents.** *J Clin Invest* 2008, **118**(12):4014-4024.
107. Tóth Z, Zelena D, Mergl Z, Kirilly E, Várnai P, Mezey E, Makara G, Palkovits M: **Chronic repeated restraint stress increases prolactin-releasing peptide/tyrosine-hydroxylase ratio with gender-related differences in the rat brain.** *J Neurochem* 2008, **104**(3):653-666.
108. Kimura A, Ohmichi M, Tasaka K, Kanda Y, Ikegami H, Hayakawa J, Hisamoto K, Morishige K, Hinuma S, Kurachi H *et al*: **Prolactin-releasing peptide activation of the prolactin promoter is differentially mediated by extracellular signal-regulated protein kinase and c-Jun N-terminal protein kinase.** *J Biol Chem* 2000, **275**(5):3667-3674.
109. Sakamoto T, Fujimoto M, Andot M: **Fishy tales of prolactin-releasing peptide.** *Int Rev Cytol* 2003, **225**:91-130.
110. Duval D, Gutierrez-Hartmann A: **PRL-releasing peptide stimulation of PRL gene transcription--enter AKT.** *Endocrinology* 2002, **143**(1):11-12.
111. Bjursell M, Lennerås M, Göransson M, Elmgren A, Bohlooly-Y M: **GPR10 deficiency in mice results in altered energy expenditure and obesity.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **363**(3):633-638.
112. Bechtold D, Luckman S: **Prolactin-releasing Peptide mediates cholecystokinin-induced satiety in mice.** *Endocrinology* 2006, **147**(10):4723-4729.
113. Roland B, Sutton S, Wilson S, Luo L, Pyati J, Huvar R, Erlander M, Lovenberg T: **Anatomical distribution of prolactin-releasing peptide and its receptor suggests additional functions in the central nervous system and periphery.** *Endocrinology* 1999, **140**(12):5736-5745.
114. Boyle R, Downham R, Ganguly T, Humphries J, Smith J, Travers S: **Structure-activity studies on prolactin-releasing peptide (PrRP). Analogues of PrRP-(19-31)-peptide.** *J Pept Sci* 2005, **11**(3):161-165.
115. Olney J: **Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate.** *Science* 1969, **164**(880):719-721.
116. Chu S, Chou Y, Liu J, Chen C, Shyu J, Chou F: **Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement.** *Life Sci* 1999, **64**(24):2299-2306.
117. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer L: **High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents.** *Obesity (Silver Spring)* 2007, **15**(4):798-808.
118. Butler A, Cone R: **Knockout models resulting in the development of obesity.** *Trends Genet* 2001, **17**(10):S50-54.
119. Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hökfelt 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**(25):15043-15048.

120. Elefteriou F, Takeda S, Liu X, Armstrong D, Karsenty G: **Monosodium glutamate-sensitive hypothalamic neurons contribute to the control of bone mass.** *Endocrinology* 2003, **144**(9):3842-3847.
121. Maletínská L, Toma R, Pirnik Z, Kiss A, Slaninová J, Haluzík M, Zelezná B: **Effect of cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice.** *Regul Pept* 2006, **136**(1-3):58-63.
122. Greene L, Tischler A: **Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976, **73**(7):2424-2428.
123. Vaudry D, Stork P, Lazarovici P, Eiden L: **Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections.** *Science* 2002, **296**(5573):1648-1649.
124. Adler E, Gough N, Blundon J: **Differentiation of PC12 cells.** *Sci STKE* 2006, **2006**(351):tr9.
125. Bérault A, Noël N, Hurbain-Kosmath I, Polkowska J, Bohin A, Leiter E, Jutisz M: **[Characterization of gonadotropic cells in a new pituitary tumor cell line].** *Ann Endocrinol (Paris)* 1990, **51**(2):82-88.
126. Hurbain-Kosmath I, Bérault A, Noël N, Polkowska J, Bohin A, Jutisz M, Leiter E, Beamer W, Bedigian H, Davisson M: **Gonadotropes in a novel rat pituitary tumor cell line, RC-4B/C. Establishment and partial characterization of the cell line.** *In Vitro Cell Dev Biol* 1990, **26**(5):431-440.
127. Tashjian AJ, Yasumura Y, Levine L, Sato G, Parker M: **Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone.** *Endocrinology* 1968, **82**(2):342-352.
128. Vlotides G, Siegel E, Donangelo I, Gutman S, Ren S, Melmed S: **Rat prolactinoma cell growth regulation by epidermal growth factor receptor ligands.** *Cancer Res* 2008, **68**(15):6377-6386.
129. Jin L, Zhang S, Burguera B, Couce M, Osamura R, Kulig E, Lloyd R: **Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells.** *Endocrinology* 2000, **141**(1):333-339.
130. Czarnecki A, Vaur S, Dufy-Barbe L, Dufy B, Bresson-Bepoldin L: **Cell cycle-related changes in transient K(+) current density in the GH3 pituitary cell line.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, **279**(6):C1819-1828.
131. Buonassisi V, SATO G, COHEN A: **Hormone-producing cultures of adrenal and pituitary tumor origin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962, **48**:1184-1190.
132. Motulsky H, Neubig R: **Analyzing radioligand binding data.** *Curr Protoc Neurosci* 2002, **Chapter 7**:Unit 7.5.
133. Chang C, Cheng Y: **Ribonucleotide reductase isolated from human cells. Heterogeneity among the sources.** *Biochem Pharmacol* 1978, **27**(19):2297-2300.
134. Maixnerová J, Hlaváček J, Blokesová D, Kowalczyk W, Elbert T, Sanda M, Blechová M, Zelezná B, Slaninová J, Maletínská L: **Structure-activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments.** *Peptides* 2007, **28**(10):1945-1953.
135. Fraker P, Speck JJ: **Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril.** *Biochem Biophys Res Commun* 1978, **80**(4):849-857.

136. Bradford M: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
137. G: FKaP: **The mouse brain in stereotaxic coordinates.** 1997.
138. Lambert P, Couceyro P, McGirr K, Dall Vechia S, Smith Y, Kuhar M: **CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y.** *Synapse* 1998, **29**(4):293-298.
139. Kask A, Schiöth H, Mutulis F, Wikberg J, Rågo L: **Anorexigenic cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide intensifies fear reactions in rats.** *Brain Res* 2000, **857**(1-2):283-285.
140. Kobelt P, Paulitsch S, Goebel M, Stengel A, Schmidtman M, van der Voort I, Tebbe J, Veh R, Klapp B, Wiedenmann B *et al*: **Peripheral injection of CCK-8S induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats.** *Brain Res* 2006, **1117**(1):109-117.
141. Kiss A, Palkovits M, Skirboll L: **Light microscopic triple-colored immunohistochemical staining on the same vibratome section using the avidin-biotin-peroxidase complex technique.** *Histochemistry* 1988, **88**(3-6):353-356.
142. Maixnerová J, Špolcová A, Pýchová M, Blechová M, Elbert T, Řezáčová M, Železná B, Maletínská L: **Characterization of prolactin-releasing peptide: binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor.** submitted to *Eur. J. Pharmacol.* 2010.
143. Sainsbury A, Zhang L: **Role of the arcuate nucleus of the hypothalamus in regulation of body weight during energy deficit.** *Mol Cell Endocrinol* 2010, **316**(2):109-119.
144. Shioda S, Takenoya F, Yagi M, Wang L, Hori Y, Kageyama H: **Neural networks of several novel neuropeptides involved in feeding regulation.** *Nutrition* 2008, **24**(9):848-853.
145. Hunter R, Philpot K, Vicentic A, Dominguez G, Hubert G, Kuhar M: **CART in feeding and obesity.** *Trends Endocrinol Metab* 2004, **15**(9):454-459.
146. Couceyro P, Fritz T: **Production of recombinant CART peptides in Escherichia coli with agonist and antagonist effects on food intake in rats.** *Protein Expr Purif* 2003, **32**(2):185-193.
147. Dylag T, Rafalski P, Kotlinska J, Silberring J: **CART (85-102)-inhibition of psychostimulant-induced hyperlocomotion: importance of cyclization.** *Peptides* 2006, **27**(12):3183-3192.
148. Jaworski J, Kozel M, Philpot K, Kuhar M: **Intra-accumbal injection of CART (cocaine-amphetamine regulated transcript) peptide reduces cocaine-induced locomotor activity.** *J Pharmacol Exp Ther* 2003, **307**(3):1038-1044.
149. Kim J, Creekmore E, Vezina P: **Microinjection of CART peptide 55-102 into the nucleus accumbens blocks amphetamine-induced locomotion.** *Neuropeptides* 2003, **37**(6):369-373.
150. Maletínská L, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Pirník Z, Kiss A, Zelezná B: **Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice.** *BMC Neurosci* 2008, **9**:101.

151. Kuhar M, Adams L, Hunter R, Vechia S, Smith Y: **CART peptides.** *Regul Pept* 2000, **89**(1-3):1-6.
152. Hirose Y, Inui A, Teranishi A, Miura M, Nakajima M, Okita M, Nakajima Y, Himori N, Baba S, Kasuga M: **Cholecystokinin octapeptide analogues suppress food intake via central CCK-A receptors in mice.** *Am J Physiol* 1993, **265**(3 Pt 2):R481-486.
153. Moran T, Ameglio P, Schwartz G, McHugh P: **Blockade of type A, not type B, CCK receptors attenuates satiety actions of exogenous and endogenous CCK.** *Am J Physiol* 1992, **262**(1 Pt 2):R46-50.
154. Aja S, Ewing C, Lin J, Hyun J, Moran T: **Blockade of central GLP-1 receptors prevents CART-induced hypophagia and brain c-Fos expression.** *Peptides* 2006, **27**(1):157-164.
155. Zheng H, Patterson L, Berthoud H: **CART in the dorsal vagal complex: sources of immunoreactivity and effects on Fos expression and food intake.** *Brain Res* 2002, **957**(2):298-310.
156. Kobelt P, Tebbe J, Tjandra I, Stengel A, Bae H, Andresen V, van der Voort I, Veh R, Werner C, Klapp B *et al*: **CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, **288**(3):R751-758.
157. Mönnikes H, Lauer G, Arnold R: **Peripheral administration of cholecystokinin activates c-fos expression in the locus coeruleus/subcoeruleus nucleus, dorsal vagal complex and paraventricular nucleus via capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK-A receptors in the rat.** *Brain Res* 1997, **770**(1-2):277-288.
158. Sawchenko P, Swanson L: **The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat.** *Brain Res* 1982, **257**(3):275-325.
159. Pirnik Z, Maixnerová J, Matysková R, Koutová D, Zelezná B, Maletínská L, Kiss A: **Effect of anorexigenic peptides, cholecystokinin (CCK) and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) peptide, on the activity of neurons in hypothalamic structures of C57Bl/6 mice involved in the food intake regulation.** *Peptides* 2010, **31**(1):139-144.
160. De Lartigue G, Dimaline R, Varro A, Raybould H, de la Serre CB, Dockray GJ: **Cocaine- and amphetamine-regulated transcript mediates the actions of cholecystokinin on rat vagal afferent neurons.** *Gastroenterology* 2010, **138** (4): 1479-90.
161. Dawson R, Pellemounter M, Millard W, Liu S, Eppler B: **Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage.** *Am J Physiol* 1997, **273**(1 Pt 1):E202-206.
162. Kerkérian L, Pelletier G: **Effects of monosodium L-glutamate administration on neuropeptide Y-containing neurons in the rat hypothalamus.** *Brain Res* 1986, **369**(1-2):388-390.
163. Mistlberger R, Antle M: **Neonatal monosodium glutamate alters circadian organization of feeding, food anticipatory activity and photic masking in the rat.** *Brain Res* 1999, **842**(1):73-83.
164. Djazayeri A, Miller D, Stock M: **Energy balances in obese mice.** *Nutr Metab* 1979, **23**(5):357-367.

165. Morris M, Tortelli C, 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**:441-447.
166. Tang-Christensen M, Kristensen P, Stidsen C, Brand C, Larsen P: **Central administration of Y5 receptor antisense decreases spontaneous food intake and attenuates feeding in response to exogenous neuropeptide Y.** *J Endocrinol* 1998, **159**(2):307-312.
167. Zelezná B, Maixnerová J, Matysková R, Haugvicová R, Blokesová D, Maletínská L: **Anorexigenic effect of cholecystokinin is lost but that of CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice.** *Physiol Res* 2009, **58**(5):717-723.
168. Tang-Christensen M, Havel P, Jacobs R, Larsen P, Cameron J: **Central administration of leptin inhibits food intake and activates the sympathetic nervous system in rhesus macaques.** *J Clin Endocrinol Metab* 1999, **84**(2):711-717.
169. Takaya K, Ogawa Y, Hiraoka J, Hosoda K, Yamori Y, Nakao K, Koletsky R: **Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat.** *Nat Genet* 1996, **14**(2):130-131.
170. Morton G, Niswender K, Rhodes C, Myers MJ, Blevins J, Baskin D, Schwartz M: **Arcuate nucleus-specific leptin receptor gene therapy attenuates the obesity phenotype of Koletsky (fa(k)/fa(k)) rats.** *Endocrinology* 2003, **144**(5):2016-2024.
171. Morton G, Blevins J, Williams D, Niswender K, Gelling R, Rhodes C, Baskin D, Schwartz M: **Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals.** *J Clin Invest* 2005, **115**(3):703-710.
172. Satoh F, Smith D, Gardiner J, Mahmoodi M, Murphy K, Ghatei M, Bloom S: **Characterization and distribution of prolactin releasing peptide (PrRP) binding sites in the rat—evidence for a novel binding site subtype in cardiac and skeletal muscle.** *Br J Pharmacol* 2000, **129**(8):1787-1793.
173. Rubinek T, Hadani M, Barkai G, Melmed S, Shimon I: **Prolactin (PRL)-releasing peptide stimulates PRL secretion from human fetal pituitary cultures and growth hormone release from cultured pituitary adenomas.** *J Clin Endocrinol Metab* 2001, **86**(6):2826-2830.
174. Watanobe H, Schiöth H, Wikberg J, Suda T: **Evaluation of the role for prolactin-releasing peptide in prolactin secretion induced by ether stress and suckling in the rat: comparison with vasoactive intestinal peptide.** *Brain Res* 2000, **865**(1):91-96.
175. Spuch C, Diz-Chaves Y, Pérez-Tilve D, Alvarez-Crespo M, Mallo F: **Prolactin-releasing Peptide (PrRP) increases prolactin responses to TRH in vitro and in vivo.** *Endocrine* 2007, **31**(2):119-124.
176. Samson W, Resch Z, Murphy T, Chang J: **Gender-biased activity of the novel prolactin releasing peptides: comparison with thyrotropin releasing hormone reveals only pharmacologic effects.** *Endocrine* 1998, **9**(3):289-291.
177. Jarry H, Heuer H, Schomburg L, Bauer K: **Prolactin-releasing peptides do not stimulate prolactin release in vivo.** *Neuroendocrinology* 2000, **71**(4):262-267.
178. Taylor M, Samson W: **The prolactin releasing peptides: RF-amide peptides.** *Cell Mol Life Sci* 2001, **58**(9):1206-1215.
179. Iijima N, Matsumoto Y, Yano T, Tanaka M, Yamamoto T, Kakihara K, Kataoka Y, Tamada Y, Matsumoto H, Suzuki N *et al*: **A novel function of prolactin-releasing**

- peptide in the control of growth hormone via secretion of somatostatin from the hypothalamus.** *Endocrinology* 2001, **142**(7):3239-3243.
180. Seal L, Small C, Kim M, Stanley S, Taheri S, Ghatei M, Bloom S: **Prolactin releasing peptide (PrRP) stimulates luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) via a hypothalamic mechanism in male rats.** *Endocrinology* 2000, **141**(5):1909-1912.
181. Berthoud H, Sutton G, Townsend R, Patterson L, Zheng H: **Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size.** *Physiol Behav* 2006, **89**(4):517-524.
182. Hayakawa J, Ohmichi M, Tasaka K, Kanda Y, Adachi K, Nishio Y, Hisamoto K, Mabuchi S, Hinuma S, Murata Y: **Regulation of the PRL promoter by Akt through cAMP response element binding protein.** *Endocrinology* 2002, **143**(1):13-22.

PŘÍLOHA

SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace týkající se tématu disertační práce (s IF):

1. Maletínská, L., **Maixnerová, J.**, Matyšková, R., Haugvicová, R., Šloncová, E., Elbert, T., Slaninová, J., Železná, B.: Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide specific binding in pheochromocytoma cells PC12. *Eur. J. Pharmacol.* 559, 109 – 114, (2007). **IF = 2,585 (2009)**
2. **Maixnerová J**, Hlaváček J, Blokešová D, Kowalczyk W, Elbert T, Šanda M, Blechová M, Železná B, Slaninová J, Maletínská L. Structure – activity relationship of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide fragments. *Peptides* 28, 1945-1953, (2007). **IF = 2,705 (2009)**
3. Maletínská L., **Maixnerová J.**, Matyšková R., Haugvicová R., Pirnik Z., Kiss A., Železná B.: Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice. *BMC Neurosci.* 9(1), 101-110, (2008). **IF = 2,744 (2009)**
4. Železná B., **Maixnerová J.**, Matyšková R., Haugvicová R., Blokešová D., Maletínská L.: Anorexigenic effect of cholecystokinin is lost but that of CART (cocaine and amphetamine regulated transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice. *Phys. Res.* 58(5), 717-23, (2009). **IF = 1,430 (2009)**
5. Pirnik Z, **Maixnerová J**, Matyšková R, Koutová D, Železná B, Maletínská L, Kiss A. Effect of anorexigenic peptides, cholecystokinin (CCK) and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) peptide, on the activity of neurons in hypothalamic structures of C57Bl/6 mice involved in the food intake regulation. *Peptides* 31(1), 139-44, 2010. **IF = 2,705 (2009)**
6. **Maixnerová J**, Špolcová A, Pýchová M, Blechová M, Elbert T, Řezáčová M, Železná B, Maletínská L. Characterization of prolactin-releasing peptide: binding, signaling and hormone secretion in rodent pituitary cell lines endogenously expressing its receptor. Submitted to *Eur. J. Pharmacol.* (červenec 2010).

Publikace týkající se tématu disertační práce (bez IF):

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

Publikace týkající se jiných témat (s IF):

1. Matyšková, R., Maletínská, L., **Maixnerová, J.**, Pirník, Z., Kiss, A., Železná, L.: Comparison of the obesity phenotypes related to monosodium glutamate effect on arcuate nucleus and/or the high fat diet feeding in C57Bl/6 and NMRI mice. *Phys. Res.* 57, 727-734, (2008). **IF = 1,430 (2009)**
2. Matyšková R, Železná B, **Maixnerová J**, Koutová D, Haluzík M, Maletínská L. Estradiol supplementation helps overcome central leptin resistance of ovariectomized mice on a high fat diet. *Horm Metab Res.* 42(3), 182-6, 2010. **IF = 2,686 (2009)**