

Izraženost i učinci urogvanilina u mozgu miša

Habek, Nikola

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:361787>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-15**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine
Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Nikola Habek

**Izraženost i učinci urogvanilina u
mozgu miša**

DISERTACIJA



Zagreb, 2018.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Nikola Habek

**Izraženost i učinci urogvanilina u
mozgu miša**

DISERTACIJA

Zagreb, 2018.

Disertacija je izrađena na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga i Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada: prof. dr. sc. Aleksandra Dugandžić

Zahvaljujem se svojoj mentorici, učitelju i prijateljici prof. dr. sc. Aleksandri Dugandžić koja je svoje veliko znanje, nepresušne znanstvene ideje i male životne mudrosti prenosila na mene. Naučila me da je sve moguće ako se hoće. Hvala joj na svojoj pomoći, vodstvu i slobodi u znanstvenom razmišljanju i istraživačkom radu koji su mi omogućili da sada zrelo i samostalno mogu kročiti u daljnje sfere znanosti.

Posebno se zahvaljujem svojoj kolegici i dragoj prijateljici od prvog dana studija Medicine Katarini Ilić, dr. med. na brižnoj i moralnoj podršci i pomoći.

Zahvaljujem se i svojim kolegama i prijateljima Marti Balog, mag. biol., dr. sc. Ani Knezović, doc. dr. sc. Marini Radmilović i Dori Sedmak, dr. med. na nesebičnom dijeljenju svoga iskustva u istraživanju.

Srdačno se zahvaljujem našim suradnicima Milanu Kordiću, dipl. ing. el., Vladimiru Farkašu, dr. med. vet., Robertu Bagariću, dipl. ing., dr. sc. Siniši Škokiću i Josipu Dugandžiću na metodološkoj i grafičkoj pomoći u izradi ovoga rada.

Također se zahvaljujem Sandri Grgić, ing. med. lab. dg., Danici Budinščak, med. lab. ing., Božici Popović, lab. teh., Maji Horvat Božić, bacc. med. lab., Nataši Kuretić, vet. teh. i Valentini Ban Lugarić, vet. teh. na tehničkoj pomoći.

Na stručnoj pomoći i savjetima zahvaljujem se prof. dr. sc. Svjetlani Kalanj Bognar, doc. dr. sc. Dipeshu Chaudhuryu, dr. sc. Iri Milošević, prof. dr. sc. Zdravku Petanjeku, doc. dr. sc. Goranu Sedmak i prof. dr. sc. Nataši Kovačić.

Zahvalio bih se i stručnim savjetnicama Teni Popović i Željki Pavlović na iznimnoj pomoći kod Poslijediplomskog doktorskog studija iz neuroznanosti.

Najviše od svega zahvaljujem se svojoj obitelji na podršci tijekom cjelokupnog školovanja i ulaganja u moj uspjeh te njima i posvećujem ovaj rad.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Gvanilinski peptidi	3
1.1.1. Struktura	3
1.1.2. Izražaj	4
1.1.3. Sinteza	5
1.1.4. Oslobođanje	6
1.1.5. Metabolizam	7
1.2. Receptori i signalni mehanizmi gvanilinskih peptida	8
1.2.1. Membranske gvanilat ciklaze	8
1.2.2. cGMP	10
1.2.3. Gvanilat ciklaza C	11
1.2.4. Signalni mehanizam natriuretskih peptida neovisan o GC/cGMP	12
1.3. Gvanilinski peptidi u gastrointestinalnom sustavu	13
1.3.1. Fiziološka uloga	13
1.3.2. Uloga u patofiziologiji	15
1.4. Gvanilinski peptidi u ostalim tkivima	16
1.4.1. Bubrež	16
1.4.2. Gušterača	17
1.4.3. Jetra	17
1.4.4. Pluća	17
1.4.5. Ostali organi	18
1.5. Natriuretski peptidi u mozgu	18
1.5.1. Izražaj	18
1.5.2. Uloga u razvoju mozga	18
1.5.3. Učinak na otpuštanje neurotransmitera	19
1.5.4. Učinak na elektrofiziološke značajke neurona pojedinih regija	19
1.5.5. Neuroprotektivni učinak	20
1.5.6. Učinak na astrocite	20
1.6. Učinak urogvanilina na mozak	20
1.6.1. Učinak na hipotalamus i metabolizam	20
1.6.2. Učinak na metabolizam smeđeg masnog tkiva	21
1.6.3. Učinak na srednji mozak	22
2. HIPOTEZA	24
3. CILJEVI RADA	26

4. MATERIJALI I METODE	28
4.1. Životinje	29
4.2. Izolacija mozga i određivanje koncentracije glukoze u krvi i likvoru	32
4.3. Intracerebroventrikularna primjena inzulina	33
4.4. Izolacija primarne kulture astrocita magnetski aktiviranim odjeljivanjem stanica	34
4.5. Analiza genskog izražaja	35
4.5.1. Izolacija ukupne RNA	35
4.5.2. Prepisivanje RNA u cDNA postupkom reverzne transkripcije	36
4.5.3. Lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije	37
4.5.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	37
4.6. Analiza i kvantifikacija proteina	38
4.6.1. Izolacija proteina i određivanje koncentracije metodom po Bradfordu	38
4.6.2. Elektroforeza	39
4.6.3. <i>Western blot</i> metoda	39
4.7. Imunohistokemijska analiza	41
4.8. Priprema moždanih rezova za elektrofiziološka mjerenja i određivanje razine unutarstaničnog Ca ²⁺	43
4.9. Metoda priklještenih potencijala	44
4.10. Mjerenje promjena razine unutarstaničnog Ca ²⁺	46
4.11. Mjerenje unutarstaničnog pH	48
4.12. Magnetska rezonancija	49
4.13. Pozitronska emisijska tomografija	50
4.14. Infracrvena termografija na životinjama	51
4.15. Indirektna kalorimetrija	52
4.16. Testovi ponašanja životinja	53
4.16.1. Mjerenje horizontalne lokomotorne aktivnosti	53
4.16.2. Test hipofagije uzrokovana novim okruženjem	53
4.17. Određivanje termogeneze, aktivacije smeđeg masnog tkiva i glikemijskog statusa nakon obroka kod ljudi	54

4.18. Statistička obrada rezultata _____	57
5. REZULTATI _____	59
5.1. Izražaj gvanilina, urogvanilina i gvanilat-ciklaze C u pojedinim regijama mišjeg mozga _____	60
5.1.1. Izražaj urogvanilina i gvanilat-ciklaze C u pojedinim regijama mozga se mijenja s hranjenjem _____	65
5.1.2. Intracerebroventrikularna primjena inzulina mijenja izražaj urogvanilina u pojedinim regijama mozga _____	69
5.2. Urogvanilin mijenja membranski potencijal i frekvenciju izbijanja Purkinjeovih stanica malog mozga _____	69
5.3. Signalni put urogvanilina u mozgu neovisan o gvanilat-ciklazi C/cGMP-u ____	75
5.3.1. Primarna klutura astrocita _____	75
5.3.2. Astrociti kore velikog i malog mozga _____	77
5.4. Učinak gvanilat ciklaze C na volumen i aktivnost smeđeg masnog tkiva ____	80
5.4.1. Volumen i aktivnosti smeđeg masnog tkiva nakon hlađenja ____	80
5.4.2. Nedostatak aktivnosti smeđeg masnog tkiva i termogeneze uzrokovane hranom kod ženki divljeg tipa te životinja kojima nedostaje gvanilat ciklaza C _____	81
5.5. Hipofagija uzrokovana novom okolinom _____	85
5.6. Uloga smeđeg masnog tkiva u termogenezi uzrokovanoj hranom kod ljudi ____	86
5.6.1. Promjene aktivnosti smeđeg masnog tkiva ovisno o dobi i spolu ____	86
5.6.2. Smanjenje termogeneze uzrokovane hranom s dobi kod ženskih osoba _____	90
6. RASPRAVA _____	92
6.1. Promjena izražaja urogvanilina i gvanilat-ciklaze C u mozgu nakon hranjenja _____	93
6.2. Djelovanje urogvanilina na Purkinjeove stanice malog mozga _____	96
6.3. Signalni put za urogvanilin u mozgu neovisan o gvanilat-ciklazi C/cGMP-u ____	96
6.4. Aktivacija moždane gvanilat -ciklaze C urogvanilinom regulira aktivnost smeđeg masnog tkiva nakon obroka _____	99
6.4.1. Aktivacija smeđeg masnog tkiva nakon obroka ovisi o spolu, dobi i indeksu tjelesne mase _____	100
6.4.2. Hipotalamička regulacija smeđeg masnog tkiva nakon obroka ____	102

7. ZAKLJUČCI _____	105
8. SAŽETAK _____	108
9. SUMMARY _____	110
10. POPIS SLIKA I TABLICA _____	112
11. POPIS LITERATURE _____	116
12. ŽIVOTOPIS _____	140

POPIS KRATICA:

3V	treća komora
8 Br cGMP	analog cGMP-a koji prolazi kroz staničnu membranu
A	površina kože toplija od 36°C
aCSF	umjetni likvor (eng., <i>Artificial cerebrospinal fluid</i>)
Actb	β-Aktin
ANOVA	analiza varijance (eng., <i>Analysis of variance</i>)
ANP	atrijski natriuretski peptid (eng., <i>Atrial natriuretic peptide</i>)
APS	amonij-persulfat
Arc	arkuatna jezgra hipotalamusa
As	astrociti
ATP	adenozin-trifosfat
BAT	smeđe masno tkivo (eng., <i>Brown adipose tissue</i>)
BK	bradikinin
BMI	indeks tjelesne mase (eng., <i>Body mass index</i>)
BNP	moždani natriuretski peptid (eng., <i>Brain natriuretic peptide</i>)
BSA	albumin goveđeg seruma (eng., <i>Bovin serum albumin</i>)
cAMP	ciklički adenzin-monofosfat
Cb	mali mozak (eng., <i>Cerebellum</i>)
cDNA	komplementarna DNA (eng., <i>Complementary DNA</i>)
CD-NP	cenderitid - kimer natriuretskih peptida
CFTR	regulator transmembranske vodljivosti u cističnoj fibrozi (eng., <i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>)
cGMP	ciklički gvanozin-monofosfat
CNP	C-tip natriuretski peptid (eng., <i>C-type natriuretic peptide</i>)
CO	ugljikov monoksid
Cr	crijevo
Cx	kora velikog mozga (eng., <i>Cortex</i>)
DAB	diaminobenzidin
DIT	termogeneza uzrokovana hranom (eng., <i>Diet-induced thermogenesis</i>)
DM	dorzomedijalna jezgra hipotalamusa

DMEM	Dulbeccov modificirani Eagle medij (eng., <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>)
e	emisivnost kože
E	embrionalni dan
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EE	potrošnja energije (eng., <i>Energy expenditure</i>)
FA	masne kiseline (eng., <i>Fatty acids</i>)
FF	udio masti (eng., <i>Fat fraction</i>)
FOV	polje vidljivosti (eng., <i>Field of view</i>)
Fx	forniks
GABA	gama-aminomaslačna kiselina (eng., <i>Gamma-Aminobutyric acid</i>)
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (eng., <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GC	gvanilat-ciklaza
GC-A	gvanilat-ciklaza A
GCAP I	aktivator gvanilat-ciklaze I (eng., <i>Guanylate cyclase activator I</i>)
GCAP II	aktivator gvanilat-ciklaze II (eng., <i>Guanylate cyclase activator II</i>)
GC-B	gvanilat-ciklaza B
GC-C	gvanilat-ciklaza C
GC-C KO	životinje kojima nedostaje GC-C (eng., <i>GC-C Knock Out</i>)
GC-D	gvanilat-ciklaza D
GC-E	gvanilat-ciklaza E
GC-F	gvanilat-ciklaza F
GC-G	gvanilat-ciklaza G
gDNA	genomska DNA
GFAP	glijalni fibrilarni kiseli protein (eng., <i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
GI	gastrointestinalni
GLAST	glutamat-aspartatni transporter
GLUT 1/4	transporter glukoze 1 i 4
GN	gvanilin
GP	gvanilinski peptidi
GTP	gvanozin-tri-fosfat
GUCA1A	aktivator gvanilat-ciklaze 1A (eng., <i>Guanylate cyclase activator 1A</i>)

GUCA1B	aktivator gvanilat-ciklaze 1B (eng., <i>Guanylate cyclase activator 1B</i>)
GUCA2a	aktivator gvanilat-ciklaze 2a (eng., <i>Guanylate cyclase activator 2a</i>)
GUCA2b	aktivator gvanilat-ciklaze 2b (eng., <i>Guanylate cyclase activator 2b</i>)
GUK	glukoza u krvi
HBSS	Hanksova balansirana otopina soli (eng., <i>Hank's balanced salt solution</i>)
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (eng., <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
HPRT	hipoksantin-fosforibozil-transferaza (eng., <i>Hypoxanthine phosphoribosyl-transferase</i>)
HRP	peroksidaza iz hrena (eng., <i>Horseradish peroxidase</i>)
Ht	hipotalamus
iBAT	interskapularno smeđe masno tkivo (eng., <i>Interscapular brown adipose tissue</i>)
<i>i.c.v.</i>	intracerebro-ventrikularno
IK	interklavikularno
<i>i.p.</i>	intraperitonealno
IR	infracrvena termografija (eng., <i>Infrared thermography</i>)
<i>i.v.</i>	intravenski
LGN	limfogvanilin
LHA _{tub}	tubularni dio lateralnog hipotalamičkog područja
m	mužjak
M	biljeg
mACTH	muskarinski acetilkolinški receptor
mGluR	metabotropni glutamatni receptor
MnPO	medijalna preoptička jezgra
MR	magnetska rezonancija
NA	noradrenalin
NeuN	biljeg jezgre neurona (eng., <i>Neuronal nuclei marker</i>)
NHE	Na ⁺ /H ⁺ izmjenjivač (eng., <i>Na⁺/H⁺ exchanger</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartat
NMDG	N-metil-D-glukamin
NO	dušikov monoksid
NP	natriuretski peptidi

NPR-1	receptor natriuretskih peptida 1 (eng., <i>Natriuretic peptide receptor 1</i>)
NPR-2	receptor natriuretskih peptida 2 (eng., <i>Natriuretic peptide receptor 2</i>)
NPR-3	receptor natriuretskih peptida 3 (eng., <i>Natriuretic peptide receptor 3</i>)
NPR-C	receptor natriuretskih peptida C (eng., <i>Natriuretic peptide receptor C</i>)
OB	olfaktorni bulbus
pb	parovi baza
PBS	fosfatni pufer (eng., <i>Phosphyte buffer saline</i>)
PBSt	fosfatni pufer + 0,1% Tween-20 (eng., <i>Phosphyte buffer saline + 0,1% Tween-20</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (eng., <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDE	fosfodiesteraza
PET-CT	pozitronska emisijska tomografija
PeVtub	tubularni dio periventrikularne jezgre
PFA	paraformaldehid
PHN	posteriorna jezgra hipotalamusa
PKC	proteinska kinaza C
PKG	proteinska kinaza ovisna o cGMP-u
PLC	fosfolipaza C (eng., <i>Phospholipase C</i>)
PMH	posteromedijalna jezgra hipotalamusa
POMC	pro-opiomelanokortin
RGN	renogvanilin
ROI	regija od interesa (eng., <i>Region of interest</i>)
RT-PCR	lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije (eng., <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
SDS	natrijev dodecil-sulfat (eng., <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SE	standardna pogreška (eng., <i>Standard error</i>)
SES	<i>Spin Echo</i> sekvenca
SI	intenzitet signala (eng., <i>Signal intensity</i>)
SK	supraklavikularno
Sm	srednji mozak
SNP	polimorfizmi jednog nukleotida (eng., <i>Single-nucleotide polymorphisms</i>)
STa	termo-stabilni enterotoksin <i>E. coli</i> (eng., <i>Heat-stable enterotoxin</i>)
SUV	jedinica standardiziranog unosa (eng., <i>Standardized uptake value</i>)

SŽS	središnji živčani sustav
TE	vrijeme odjeka (eng., <i>Echo time</i>)
TEMED	tetrametiletildiamin
TR	vrijeme ponavljanja (eng., <i>Repetition time</i>)
TT	tjelesna temperatura
UCP1	protein za rasplitanje 1 (eng., <i>Uncoupling Protein 1</i>)
UCP3	protein za rasplitanje 3 (eng., <i>Uncoupling Protein 3</i>)
UGN	urogvanilin
UGN KO	životinje kojima nedostaje UGN (eng., <i>UGN Knock out</i>)
V_m	membranski potencijal
VMH	ventromedijalna jezgra hipotalamusa
VZ	ventrikularna zona
WAT	bijelo masno tkivo (eng., <i>White adipose tissue</i>)
WT	divlji tip (eng., <i>Wild type</i>)
ž	ženka
ϑ	Stephan-Boltzmannova konstanta

1. UVOD

Povijest istraživanja gvanilinskih peptida (GP), koji spadaju u porodicu natriuretskih peptida (NP), počinje 1992. godine otkrićem prvog endogenog agonista gvanilat-ciklaze C (GC-C), gvanilina (GN) (1) te drugog agonista, urogvanilina (UGN) 1993. godine (2). Nakon otkrića GN-a i UGN-a otkriveni su i drugi peptidi iz porodice GP-a, limfogvanilin (LGN) 1999. godine kod oposuma (3) te renogvanilin 2003. godine (RGN) kod jegulja (4).

Postojanje GC-C u crijevima pretpostavljeno je puno ranije, 1978. godine. GC-C je membranski receptor za termo-stabilni enterotoksin *Escherichiae coli* (*E. coli*) (eng., *Heat-stable enterotoxin*, STa) čija aktivacija toksinom dovodi do porasta koncentracije unutarstaničnog cikličkog gvanozin-monofosfata (cGMP) u enterocitima i sekrecije Cl⁻ i vode te posljedične dijareje (5–10). Do tada su već bile otkrivene dvije membranske gvanilat-ciklaze, A (GC-A), receptor za atrijski natriuretski peptid (eng., *Atrial natriuretic peptide*, ANP) i moždani natriuretski peptid (eng., *Brain natriuretic peptide*, BNP) (11,12) te B (GC-B), receptor za natriuretski peptid tip C (eng., *C-type natriuretic peptide*, CNP) (13). 1990. godine klonirana je i treća gvanilat-ciklaza, nazvana GC-C (14). Važnost ovoga otkrića je u tome što, prema podacima iz 2010. godine, dijareja uzrokuje smrt 600 000 do 700 000 djece godišnje od čega je 157 000 smrtnih slučajeva (9%) uzrokovano *E. coli* koja stvara STa (15). Novorođenčad i djeca posebno su osjetljiva jer je upravo tada izražaj GC-C u crijevima najveći (16).

Važnost sustava GP-a i GC-C pokazuje i njihovo rano pojavljivanje tijekom evolucije te postojanje u svim razredima životinja (sisavci, ptice, ribe) (17–20). Osim važnosti u održavanju homeostaze vode i elektrolita uz već postojeće sustave kao što su renin-angiotenzin, antidiuretski hormon i drugi natriuretski peptidi, odnedavno je poznato da GP-i imaju važnu ulogu i u regulaciji drugih tjelesnih funkcija što je i tema ove disertacije.

1.1. Gvanilinski peptidi

1.1.1. Struktura

Gvanilinski peptidi su mali peptidi koji sadrže 15 – 19 aminokiselina te su karakteristični po postojanju različitog broja disulfidnih veza. Broj disulfidnih veza utječe na jačinu aktivacije GC-C. LGN koji ima samo jednu disulfidnu vezu dovodi do najslabije aktivacije, GN, UGN i RGN imaju dvije disulfidne veze te dovode do fiziološke aktivacije, dok STa ima tri disulfidne veze i dovodi do najjače aktivacije GC-C i posljedično sekrecijske dijareje. Lomljenjem disulfidnih veza dolazi do inaktivacije peptida. Struktura GP-a u različitim životinjskim vrstama prikazane su u tablici 1.

GN se sastoji od 15 aminokiselina i posjeduje dvije disulfidne veze između 4. i 12. i 7. i 15. aminokiseline od N-terminalnog kraja (21) kako je prikazano na slici 1. Postoje male razlike u strukturi GN-a između različitih životinjskih vrsta tako da se ljudski GN razlikuje od svinjskog i štakorskog samo u jednoj dok se od oposumovog razlikuje u četiri aminokiseline (1,22) (Tablica 1.).

UGN se sastoji od 16 aminokiselina te sadrži dvije disulfidne veze između 4. i 12. i 7. i 15. aminokiseline od N-terminalnog kraja (Slika 1.) (23). Razlike u sastavu aminokiselina kod pojedinih životinjskih vrsta vidljive su u tablici 1. (2,22,24).

Tablica 1. Razlika u strukturi gvanilinskih peptida kod pojedinih životinjskih vrsta. Slijed aminokiselina koji je identičan u svim navedenim vrstama za pojedini peptid je podebljan i podcrtan. Modificirano prema (25).

Gvanilin:

Oposum	S H <u>TCEICA</u> F <u>AA</u> C A <u>GC</u>
Čovjek	P G <u>TCEICA</u> Y <u>AA</u> C T <u>GC</u>
Štakor/Miš	P N <u>TCEICA</u> Y <u>AA</u> C T <u>GC</u>
Svinja	P S <u>TCEICA</u> Y <u>AA</u> C A <u>GC</u>

Urogvanilin:

Oposum	Q E D <u>CELC</u> I <u>NVACTGC</u>
Čovjek	N D D <u>CELC</u> V <u>NVACTGCL</u>
Štakor/Miš	T D E <u>CELC</u> I <u>NVACTGC</u>
Svinja	G D D <u>CELC</u> V <u>NVACTGCS</u>

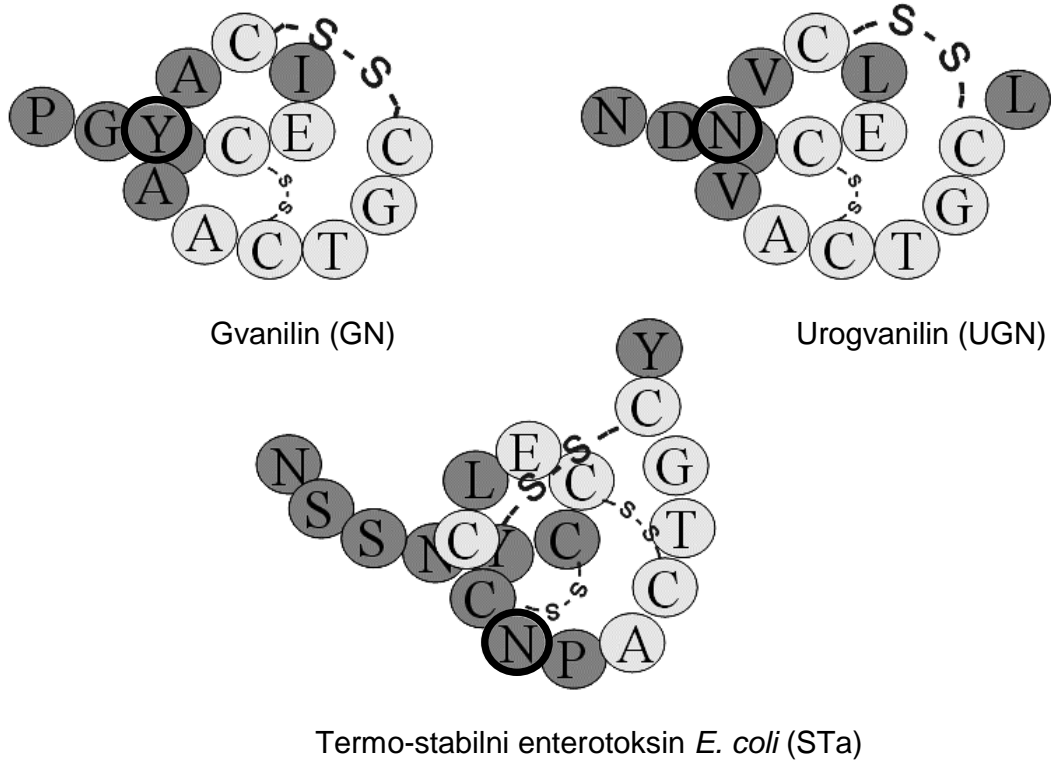
Limfogvanilin:

Oposum	Q E E C E L C I N M A C T G Y
--------	-------------------------------

Renogvanilin:

Jegulja	A D L C E I C A F A A C T G C L
---------	---------------------------------

LGN se sastoji od 15 aminokiselina i sadrži jednu disulfidnu vezu između 4. i 12. aminokiseline od N-terminalnog kraja (3) dok se RGN sastoji od 16 aminokiselina i sadrži dvije disulfidne veze između 4. i 12. i 7. i 15. aminokiseline od N-terminalnog kraja (4) (Tablica 1.).



Slika 1. Ljudski gvanilin, urogvanilin i termo-stabilni enterotoksin *E. coli*. Shematski prikaz strukture gvanilinskih peptida. Aminokiseline su označene slovima s oznakom disulfidnih veza. Jednake aminokiseline u sva tri peptida označene su svijetlim krugovima. Zaokružena aminokiselina odgovorna je za različitu osjetljivost GN-a i UGN-a na kimotripsin. Modificirano prema (25).

1.1.2. Izražaj

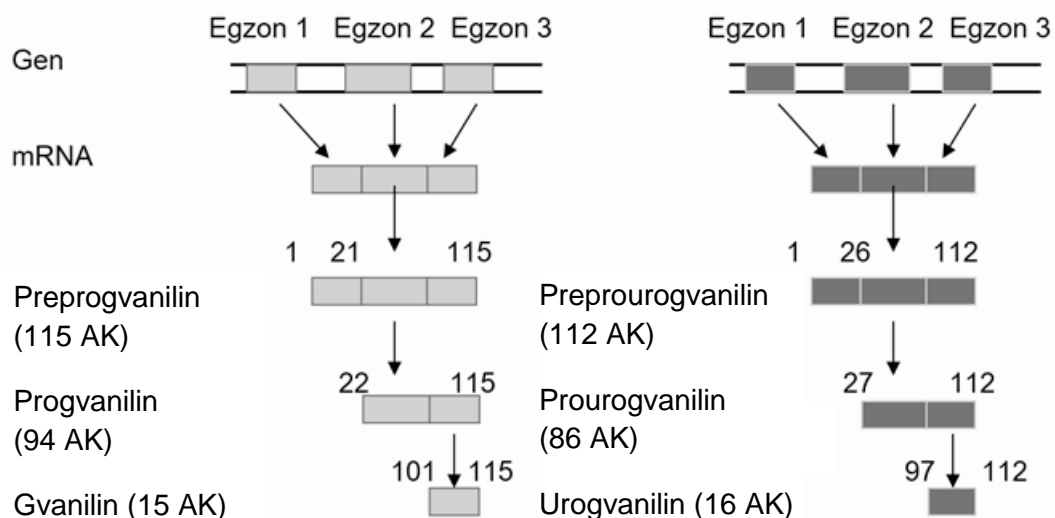
GP imaju najveći izražaj u crijevima, ali brojna istraživanja pokazuju i druga mjesta izražaja. GN je do sada pronađen i u plućima, mozgu, nadbubrežnoj žlijezdi, bubregu (kori i srži), muškom i ženskom reproduktivnom sustavu (jajovod, uterus, epididimis, sjemeni mjehurići, prostata te slabiji izražaj u jajniku i testisu) te žlijezdama slinovnicama (26–30).

UGN je do sada osim u crijevima pronađen i u bubrezima (kori i srži), srcu, gušterači, plućima, muškom i ženskom reproduktivnom sustavu (jajovod, epididimis, prostata te slabiji izražaj u jajniku, maternici i testisu), slezeni, limfnim čvorovima te žlijezdama slinovnicama (2,28,29,31–37). Iako je pronađen izražaj UGN-a u mozgu oposuma (37), izražaj UGN-a u mozgu je još uvijek kontroverzan jer kasniji radovi u potpunosti opovrgavaju izražaj UGN-a u mozgu drugih pokusnih životinja (38,39).

LGN je do sada pokazan samo kod oposuma u slezeni i limfnim čvorovima (po čemu je i dobio ime) te u bijelim krvnim stanicama, srcu, bubregu, mozgu, timusu i testisu (3) dok je RGN kao posljednji otkriveni GP do sada pronađen samo u crijevu i bubregu riba koštunjača (4,20).

1.1.3. Sinteza

Geni koji kodiraju GN i UGN (eng., *Guanylate cyclase activator 2a i 2b*, *GUCA2a* i *GUCA2b*) nalaze se kod ljudi na 1., a kod miševa (*Guca2a* i *Guca2b*) na 4. kromosomu (40). Geni za GN i UGN sastoje se od tri egzona i dva introna (41,42). Ljudski prepro-GN sastoji se od 115 aminokiselina koji nakon cijepanja ima 94 aminokiseline (pro-GN) dok GN ima 15 aminokiselina (21,43). Ljudski prepro-UGN sastoji se od 112 aminokiselina, pro-UGN ima 86 aminokiselina dok se UGN sastoji od 16 aminokiselina (35,42) (Slika 2.).



Slika 2. Sinteza ljudskog gvanilina i urogvanilina. Geni *GUCA2a* i *GUCA2b* imaju 3 egzona čijom transkripcijom nastaje mRNA te nakon translacije prepro-peptidi. Cijepanjem nastaju pro-peptidi te na kraju sami hormoni gvanilin i urogvanilin. Modificirano prema (44).

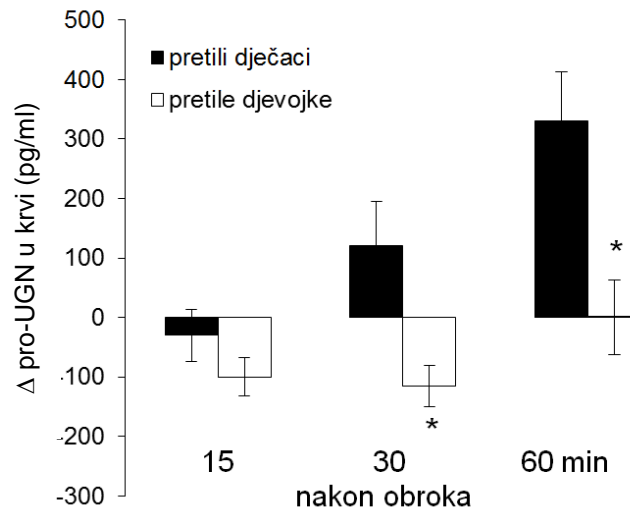
1.1.4. Oslobođanje

Glavni izvor GN-a i UGN-a u krvi je probavni sustav (34,45,46). GN se u plazmi nalazi u formi pro-GN u koncentraciji od $31,2 \pm 3,0$ fmol/ml te je povišen kod osoba s kroničnim zatajenjem bubrega (47–49). Kolinomimetik karbahol te druge tvari kao betanekol, bombesin te forskolin potiču lučenje pro-GN i GN-a u crijevima (50,51).

Stanice u crijevu koje stvaraju UGN pripadaju subpopulaciji enterokromafinih stanica koje izlučuju UGN preko apikalne membrane u lumen crijeva i preko bazolateralne membrane u krv (36,52). Manje UGN-a se u plazmi nalazi u formi bioaktivnog UGN-a u koncentraciji od $5,0 \pm 0,3$ fmol/ml koji se izlučuje urinom u količini od $103,1 \pm 15,9$ pmol/dan, a te su vrijednosti povišene kod osoba s kroničnim zatajenjem bubrega (45,53). Glavni oblik UGN-a u plazmi je pro-UGN i to u koncentraciji od $10,3 \pm 1,7$ pmol/ml (34,54). Vidljivo je da se zapravo većina plazmatskog UGN-a nalazi u formi pro-UGN-a (99,95%) dok u urinu prevladava UGN koji nastaje cijepanjem pro-UGN-a u bubrezima.

Koncentracija pro-UGN-a u plazmi je smanjena kod pretilih odraslih osoba te bolesnika s dijabetesom tip 2 (55) vjerojatno zbog njegovog smanjenog izražaja u crijevima što je pokazano kod pretilih adolescenata (56). Mogući razlog ovim promjenama je smanjena funkcija leptina kod ovih ispitanika jer je pokazano da miševi kojima nedostaje leptin imaju snižen izražaj UGN-a u crijevima i manju koncentraciju pro-UGN-a u plazmi. Primjenom leptina u ovih životinja dolazi do porasta plazmatske koncentracije pro-UGN-a (57).

Nakon obroka dolazi do porasta koncentracije plazmatskog pro-UGN-a (38,57). Regulacija otpuštanja UGN-a iz crijeva nakon obroka ovisi o spolu i tjelesnoj masi. Naime, kod pretilih adolescenata muškog spola dolazi do porasta koncentracije plazmatskog pro-UGN-a nakon obroka dok kod pretilih adolescenata ženskog spola to nije slučaj (Slika 3.) (58).



Slika 3. Razlika u koncentraciji pro-urogvanilina u plazmi nakon obroka kod pretelih dječaka i djevojčica. * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u promjeni koncentracije pro-urogvanilina (pro-UGN) prije i nakon obroka između pretelih dječaka i djevojčica. Modificirano prema (58).

U pokusnih životinja pokazano je i da količina soli u prehrani te količina Zn^{2+} u organizmu mijenja izražaj GP-a u crijevima (59–61). Na staničnoj kulturi HT29-18-N2 stanica (stanična linija ljudskog karcinoma kolona) pokazan je porast izražaja UGN-a nakon primjene hipertonične otopine NaCl (62). Novija istraživanja upućuju na moguću zablude u regulaciji izražaja GP-a u crijevima jer pokazuju da tijekom povećanog unosa soli dolazi do porasta izražaja UGN-a u bubrezima, ali ne i u crijevima, što upućuje na lokalnu regulaciju izražaja UGN-a u samim bubrezima (63,64).

1.1.5. Metabolizam

Plazmatski pro-GN, GN, pro-UGN i UGN filtriraju se u bubrezima pri čemu se GN razgrađuje pomoću kimotripsina u glomerulima (65) i proksimalnim kanalićima (66). Kako UGN kao 9. aminokiselinu od N-terminalnog kraja ima asparagin što ga čini otpornim na djelovanje kimotripsina u tubularnom lumenu (Slika 1.), on se može naći u urinu prema čemu je i dobio ime. Upravo se filtrirani pro-UGN, koji čini najveću frakciju plazmatskog UGN-a, cijepa u tubularnom lumenu istim proteazama na aktivnu formu (54,67) pa se u urinu nalazi UGN porijeklom iz plazme i samih bubrežnih stanica, ali ne i pro-UGN.

1.2. Receptori i signalni mehanizmi gvanilinskih peptida

Povijest istraživanja gvanilat-ciklaza (GC) započinje 1969. godine kada su otkriveni enzimi koji dovode do konverzije Mg^{2+} -GTP u cGMP (68–70) dok je sam cGMP kao drugi glasnik otkriven 6 godina ranije (71). Enzimi su prozvani gvanilat-ciklaze, a istraživanja su nadalje pokazala kako dolaze u dvije forme kao membranske GC-e i citoplazmatska GC (72,73). Dušikov monoksid (NO) i ugljikov monoksid (CO) su poznati ligandi citoplazmatske GC-e (74) čija aktivacija dovodi do porasta cGMP-a te relaksacije glatkih mišića krvnih žila i vazodilatacije. Za otkriće NO kao signalne molekule u kardiovaskularnom sustavu Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro i Ferid Murad dobili su 1998. godine Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu.

1.2.1. Membranske gvanilat-ciklaze

Porodica membranskih GC-a sastoji se od receptora koji nakon aktivacije NP-ma dovode do stvaranja unutarstaničnog cGMP-a. Do sada je otkriveno sedam membranskih GC-a (GC od A do G). GC-A je receptor za ANP i BNP (11,12,75), GC-B je receptor za CNP (13) dok je GC-C receptor za GP-e.

GC-D je pronađena u olfaktornim neuroepitelnim stanicama (76,77) te pripadajućim neuronima gdje GP-i dovode do porasta frekvencije izbijanja te sudjeluju u osjetu njuha (78). GC-E i F nazvane su i retinalne GC-e jer su pronađene u fotoreceptorima mrežnice (79–82), a aktiviraju ih citoplazmatski proteini aktivatori gvanilat-ciklaza I i II (eng., *Guanylate cyclase activating protein*, GCAP I, II ili *Guanylate cyclase activator*, GUCA 1A, 1B) (83). GC-G je pokazana u Grünenbergovom gangliju u olfaktornom sustavu te se aktivira hladnoćom (84,85). Izražaj i ligandi navedenih GC-a prikazani su u tablici 2 (86).

Sve GC su homodimeri gdje je svaka podjedinica sastavljena od proteinskog lanca građenog od oko 1050 aminokiselina. Izvanstanična domena je vezno mjesto peptidnih hormona čiji se signal prenosi kroz transmembransku domenu građenu od 15-20 aminokiselina. Unutarstanična domena sastoji se od jukstamembranske domene slične protein-kinazi i gvanilat-ciklazne domene na C-terminalnom kraju koje su razdvojene amfipatskom alfa-uzvojnicom. Ova alfa-uzvojnica sudjeluje u homodimerizaciji što igra veliku ulogu u aktivaciji gvanilat-ciklazne domene (87–89).

Funkcija domene slične protein-kinazi nije još u potpunosti razjašnjena, ali je fosforilacija ove domene nužna za potpunu aktivnost gvanilat-ciklazne domene. Naime, domena slična protein-kinazi inhibira gvanilat-ciklaznu domenu, a vezanjem liganda dolazi do konformacijske promjene te dezinhibicije i produkcije cGMP-a. Defosforilacijom dolazi do nemogućnosti inhibiranja te domene vezanjem liganda što je najizraženije kod GC-A i GC-B kod kojih su barem 8 aminokiselinskih ostataka ove domene fosforilirani (90–92). Vezivanjem liganda i konformacijskom promjenom, fosforilirana mjesta ove domene postaju dostupna specifičnim staničnim fosfatazama koje dovode i do homologne inhibicije receptora (vlastitim ligandom). Studije su također pokazale kako osim homologne inhibicije postoji i heterologna inhibicija gvanilat-ciklazne aktivnosti angiotenzinom II i endotelinom za GC-A te serumom i čimbenikom rasta trombocita i fibroblasta za GC-B (93–95).

Tablica 2. Membranske gvanilat-ciklaze. Prikazane su sve poznate membranske gvanilat-ciklaze s navedenim genom (kod čovjeka i miša), mjestom najvećeg izražaja, funkcijom, endogenim ligandom i poznatim agonistima. Modificirano prema (86).

	GC-A	GC-B	GC-C	GC-D	GC-E	GC-F	GC-G
Gen: čovjek miš	<i>NPR1</i> <i>Npr-1</i>	<i>NPR2</i> <i>Npr-2</i>	<i>GUCY2C</i> <i>Gucy2c</i>	<i>Gucy2d</i>	<i>GUCY2D</i> <i>Gucy2e</i>	<i>GUCY2F</i> <i>Gucy2f</i>	<i>Gucy2g</i>
Izražaj	KS	Kost, RS, KS	Crijevni epitel, neuroni	OS	Retinalni fotorec.	Retinalni fotorec.	Grünen- bergov ganglij
Učinak na	Krvni tlak, metabo- lizam	Rast kostiju, repro- dukcija krvne žile	Transport elektrolita i vode	Osjet mirisa, socijalno učenje	Vid, foto- transduk- cija	Vid, foto- transduk- cija	Osjet topline kod novoro- đenčadi
Endogeni ligand	ANP, BNP	CNP	UGN, GN	CO ₂ , UGN	GCAP1 (GCAP2)	GCAP2 (GCAP1)	Hladnoća, feromoni, CO ₂
Agonist	CD-NP	CD-NP	STa Plekanitid Linaklotid				

KS - kardiovaskularni sustav; RS - reproduktivni sustav; OS - olfaktorni sustav; CD-NP - kimera natriuretskih peptida

1.2.2. cGMP

Ciklički gvanozin-monofosfat (3',5'-ciklički GMP, cGMP) je ciklički nukleotid, derivat GTP-a te drugi glasnik NP-a. cGMP ima učinke na protein-kinaze ovisne o cGMP-u (PKG), fosfodiesteraze (PDE) i ionske kanale.

PKG su serin/treonin-kinaze koje nalazimo u dvije forme - citoplazmatskoj (tip I) i membranskoj (tip II). Obje forme imaju sličnu strukturu iako PKG-I dolazi u α i β izoformi kao produkt jednog gena dok je PKG-II produkt drugog gena. N-terminalni kraj je regulacijska domena dok je C-terminalni kraj kinazna domena. Bez prisutnosti cGMP-a regulacijska domena blokira kinaznu domenu dok vezanjem 4 molekule cGMP-a dolazi do konformacijskih promjena i dezinhibicije kinazne aktivnosti (96). PKG-I je prisutna u stanicama bubrega, srca, jetre, skeletnih mišića, perifernih neurona i pojedinih regija središnjeg živčanog sustava (SŽS) (86). PKG-II je najizraženija u tankom crijevu, mozgu, bubregu, plućima (97), a prisutna je i u debelom crijevu i prostati (98).

Najveći izražaj PKG u SŽS-u nalazi se u Purkinjeovim stanicama maloga mozga koje najviše izražavaju PKG-I α . Ovu izoformu također nalazimo i u hipotalamusu (Ht) (dorzomedijalna jezgra, suprahiazmatska jezgra), hipokampusu i dorzalnim ganglijima (99–103) dok PKG-I β nalazimo u olfaktornim bulbusima (OB) i hipokampusu (104). PKG-II, za razliku od PKG-I, nalazimo u velikom broju regija SŽS-a kao što su: kora velikog mozga (Cx), hipokampus, talamus, Ht, amigdala, moždano deblo i OB (105–107).

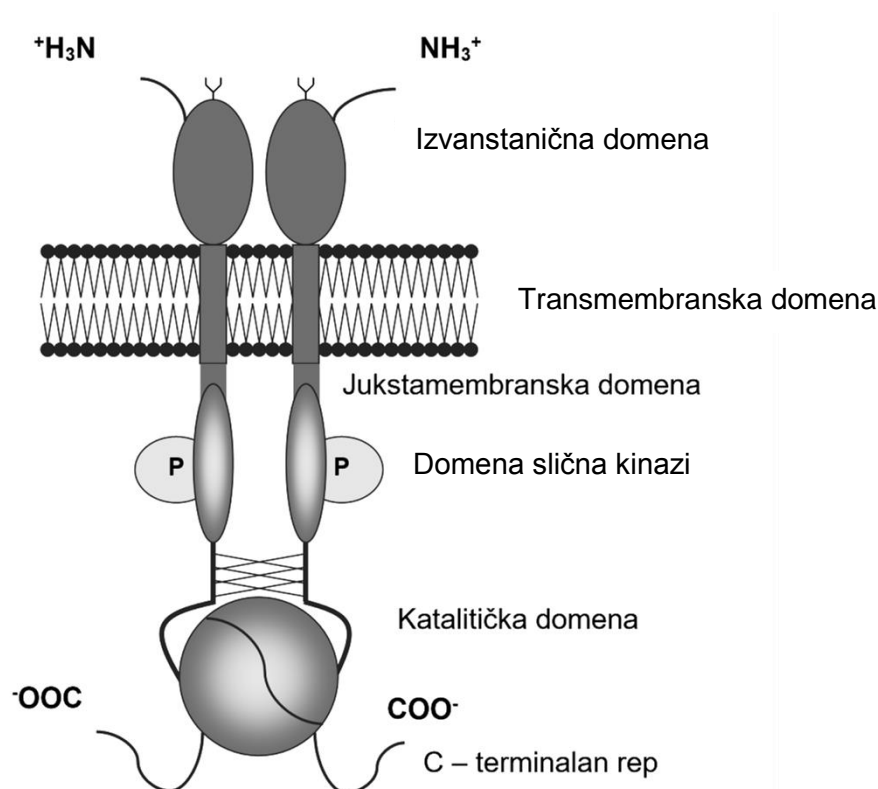
PDE su enzimi koji kidaju fosfodiestersku vezu odnosno razgrađuju cGMP i ciklički adenozin-monofosfat (cAMP) te tako kontroliraju djelovanje navedenih drugih glasnika. Obitelj PDE sastoji se od 11 enzima od kojih neki razgrađuju cAMP (PDE-4, 7, 8), drugi razgrađuju cGMP (PDE-5, 6, 9) dok ostali razgrađuju oba druga glasnika (PDE-1, 2, 3, 10, 11). Također neke PDE su aktivirane cGMP-om (PDE-2, 5, 6, 11) dok je PDE-3 inhibirana cGMP-om. cGMP upravo preko PDE-3 (koju inhibira) i PDE-2 (koju aktivira) može utjecati na koncentraciju cAMP-a u stanicama (108).

Kanali ovisni o cGMP-u su ionski kanali kod kojih izravno vezanje cGMP-a modulira njihovu funkciju. Ova uloga cGMP-a je posebno važna u funkciji vidnog i olfaktornog sustava te bubrega (109).

1.2.3. Gvanilat-ciklaza C

GC-C je jedini do sada poznati receptor za GP-e. Nalazi se u formi dimera i trimera (110,111). Izvanstanična domena sastoji se od više N-glikozilacijskih mjesta i višestrukih disulfidnih mostova (112). Upravo glikozilacija izvanstanične domene utječe na vezanje i aktivaciju receptora ligandom (113,114). Aktivnost GC-C može biti regulirana protein-kinazom C (PKC) i ATP-om. Iako GC-C, za razliku od GC-A i GC-B, nije fosforilirana (110), fosforilacija PKC-om dovodi do 70%-tnog povećanja njezine aktivnosti (110,115–117). ATP dovodi do povećanja gvanilat-ciklazne aktivnosti vjerojatno stabilizacijom aktivne forme receptora (110,118,119).

Izražaj GC-C je najuočljiviji na apikalnoj membrani enterocita, a do sada je pronađena i u mozgu, bubrezima, jetri, gušterači, nadbubrežnoj žlijezdi, muškom i ženskom reproduktivnom sustavu, dišnim putevima, žlijezdama znojnicama, slezeni, timusu i limfnim čvorovima (14,16,26,28,32,37,120–124).

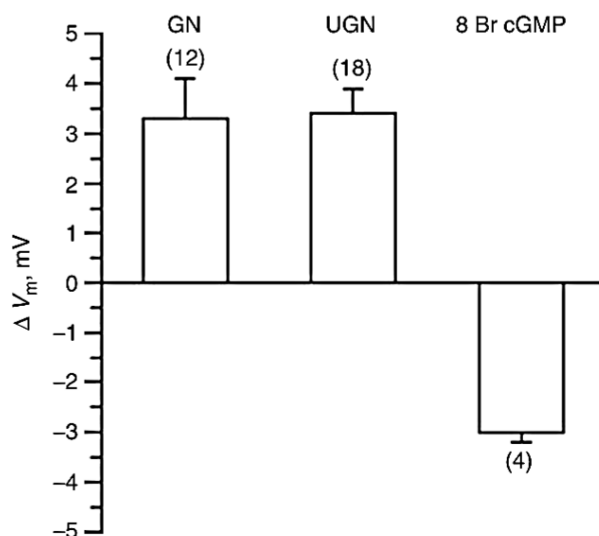


Slika 4. Gvanilat-ciklaza C. Prikazana je struktura gvanilat-ciklaze C koja se sastoji od izvanstanične, transmembranske, jukstamembranske, kinazi-slične i katalitičke domene. Modificirano prema (44).

1.2.4. Signalni mehanizam natriuretskih peptida neovisan o GC/cGMP

ANP, BNP i CNP vežu se s jakim afinitetom (ANP > CNP > BNP) za receptor NPR-C (eng., *Natriuretic peptide receptor C*) ili NPR-3 (125). Do sada još nije pokazano veže li NPR-C i GP-e ili samo ligande GC-A i GC-B. NPR-C je još nazvan i receptor čistač (eng., *clearance*) jer internalizira (endocitira) vezane NP-e i tako ih uklanja s mjesta djelovanja (126). NPR-C se sastoji od 540 aminokiselina, a kodiran je genom *NPR3* koji se kod čovjeka nalazi na 5. kromosomu. Ovaj receptor stvara homodimere koji su stabilizirani disulfidnim vezama (127) te ne sadrži gvanilat-ciklaznu domenu već je povezan s $G_{i/o}$ podjedinicom G-proteina. Nakon vezanja NP-a aktivira se fosfolipaza C (eng., *Phospholipase C*, PLC) i dolazi do porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+} te inhibicije adenilat-ciklaze što dovodi do smanjenja unutarstanične koncentracije cAMP-a (128,129). NPR-C je izražen u bubrezima, plućima, kostima, većini endokrinih žlijezda, endotelnim i glatkim mišićnim stanicama krvožilne stjenke (130). Zbog svog djelovanja miševi kojima nedostaje NPR-C imaju produženi poluvijek NP-a te posljedično sniženi arterijski tlak, izraženu diurezu i deformacije kostiju (126).

Sukladno NP-ima, dokazi o postojanju signalnog puta za GP-e neovisnog o GC-C postoje već neko vrijeme. Prvo takvo istraživanje pokazalo je da se vezna mjesta za STa i mRNA za GC-C u crijevima ne preklapaju u potpunosti (131). To je također pokazano i kod miševa kojima nedostaje GC-C (eng., *GC-C Knock out*, GC-C KO) gdje i dalje postoji 10% veznih mjesta za STa. Aktivacija ovog do sada još neidentificiranog receptora dovodi do porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+} te aktivacije PKC (132,133). Važnost ovog novog signalnog puta je prikazana i u bubrezima gdje se učinak GP-a ne razlikuje između divljeg tipa (WT) i GC-C KO miševa (134,135). Na staničnoj razini, GP dovode do promjene membranskog potencijala glavnih stanica kortikalnih sabirnih cijevi bubrega kod ljudi i miševa suprotno od učinka analoga cGMP-a koji prolazi kroz staničnu membranu (Slika 5.) (135,136). Također, miševi kojima nedostaje UGN (eng., *UGN Knock out*, UGN KO) imaju povišen krvni tlak što nije slučaj kod GC-C KO miševa, govoreći u prilog upravo djelovanju GP-a na signalni put neovisan o GC-C u bubrezima (137). Iako su istraživanja djelovanja UGN-a u mozgu još uvijek nedovoljno razjašnjena, Begg i sur. su pokazali da UGN KO miševi, ali ne i GC-C KO miševi, pokazuju povećanje tjelesne mase, porast apetita i poremećenu toleranciju na glukozu (138).



Slika 5. Učinak gvanilinskih peptida i cGMP-a na membranski potencijal glavnih stanica sabirnih kanalića ljudskog bubrega. Gvanilin (GN) i urogvanilin (UGN) depolariziraju staničnu membranu dok analog cGMP-a koji prolazi kroz staničnu membranu (8 Br cGMP) dovodi do hiperpolarizacije. Modificirano prema (136).

Sve navedeno upućuje da je otkrivanje receptora neovisnog signalnog puta važno i prijeko potrebno zbog još neotkrivenih učinaka GP-a i mogućih nuspojava lijekova zasnovanih na djelovanju agonista GC-C koji će također dovesti i do aktivacije ovoga signalnog puta.

1.3. Gvanilinski peptidi u gastrointestinalnom sustavu

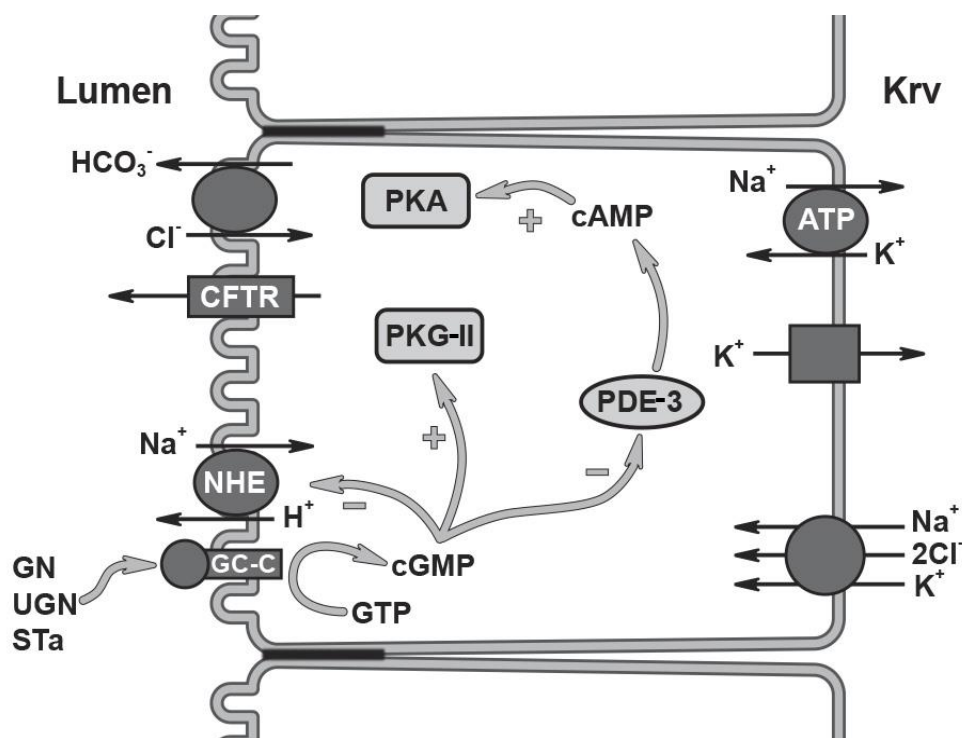
1.3.1. Fiziološka uloga

Gvanilinski peptidi, GN i UGN, otkriveni su upravo u gastrointestinalnom (GI) sustavu kao endogeni aktivatori GC-C. Analiza mRNA za GN i UGN pokazuje različitu raspodjelu izražaja ovih hormona uzduž probavnog sustava s time da je GN najviše izražen u kolonu i donjim dijelovima GI sustava, a najmanje u duodenumu. Izražaj UGN-a je upravo suprotan te je on najviše izražen u duodenumu i gornjim dijelovima GI sustava, a najmanje u slijepom crijevu (24,36,52,139–143). Upravo nejednaka raspodjela GN-a i UGN-a pokazuje njihovu različitu ulogu u fiziologiji probavnog sustava.

Enterokromafine, serotonin-pozitivne stanice tankog crijeva izlučuju UGN apikalno u lumen crijeva i preko bazolateralne membrane u intersticij i dalje u krv (36). UGN u želucu izlučuju stanice slične enterokromafinima (eng., *Enterocromafin like cells*) (144) čija je glavna uloga u regulaciji izlučivanja HCl iz parijetalnih stanica otpuštanjem histamina (145).

GC-C je u GI sustavu smješten na apikalnoj membrani enterocita pa tako GP djeluju s luminalne strane gdje dovode do pojačane sekrecije Cl^- , HCO_3^- i vode te smanjene resorpcije Na^+ (Slika 6.) (146–148). Aktivacijom GC-C dolazi do porasta unutarstaničnog cGMP-a koji dovodi do:

1. aktivacije PKG-II (149–151) koja je najviše izražena upravo u sluznici duodenuma i jejunuma gdje je usidrena u apikalnu membranu (97,150,152)
2. izravne inhibicije Na^+/H^+ izmjenjivača (eng., *Na⁺/H⁺ exchanger*, NHE) (153)
3. inhibicije PDE-3 što dovodi do porasta cAMP-a (150,154-156).



Slika 6. Signalni put gvanilinskih peptida u crijevima. GN - gvanilin; UGN - urogvanilin; STa - termo-stabilni enterotoksin *E. coli*; GC-C – gvanilat-ciklaza C; cGMP – ciklički gvanozin-monofosfat; PKG-II – protein-kinaze G tip II; PKA – protein-kinaza A; PDE-3 – fosfodiesteraza-3 specifično inhibirana cGMP-om; CFTR – regulator transmembranske vodljivosti u cističnoj fibrozi; NHE – izmjenjivač Na^+/H^+ . Modificirano prema (157).

Aktivirana PKG-II i PKA fosforiliraju regulator transmembranske vodljivosti u cističnoj fibrozi (eng., *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR). CFTR je kloridni kanal čija aktivacija dovodi do sekrecije Cl^- i HCO_3^- te posljedično i vode u lumen crijeva (155,158–164). Inhibicijom CFTR-a dolazi do gubitka učinka GN-a na sekreciju Cl^- (147,158,165) te kod bolesnika oboljelih od cistične fibroze STa ne može uzrokovati dijareju (166). Nadalje, u GC-C KO životinja na podražaj GP-ima ipak dolazi do sekrecije HCO_3^- što upućuje na važnu ulogu signalnog puta neovisnog o GC-C i u regulaciji membranskog transporta u crijevima (167).

Učinci GN-a i UGN-a na sekreciju Cl^- i HCO_3^- su ovisni o pH. Tako će UGN putem GC-C biti aktivniji pri pH 5 dok će GN biti aktivniji pri pH 8 (168). Dok pri niskom pH UGN aktivira GC-C, pri alkalnom pH UGN aktivira GC-C neovisni signalni put u stanicama proksimalnih kanalića bubrega čovjeka (169). Smatra se da su N-terminalni krajevi odgovorni za različitu osjetljivost na pH jer se upravo GP i STa u tom dijelu strukture najviše razlikuju (168). Ova pojava pridonosi važnosti UGN-a koji u duodenumu, na ulazak kiselog sadržaja iz želuca, dovodi do stvaranja cGMP-a te posljedično potiče sekreciju HCO_3^- i s time alkalinizaciju duodenalnog sadržaja.

1.3.2. Uloga u patofiziologiji

Uloga GP-a u mehanizmu nastanka crijevnih tumora je višestruka. Izražaj GN-a i UGN-a je smanjen u kolorektalnim tumorima dok je izražaj GC-C očuvan (170,171). Ovaj nalaz nije iznenađujuć ako znamo da UGN inhibira proliferaciju stanične linije tumora kolona T₈₄ te smanjuje broj polipa kod životinja koje se koriste kao mišji model polipoze, a kojima nedostaje tumorski supresorski gen APC (eng., *Adenomatous polyposis coli*) (172). Upravo zbog nemogućnosti djelovanja GP-a kod GC-C KO životinja nakon indukcije rasta tumora crijeva pojavljuje se povećani rast tumora (173). Nastanak crijevnih tumora nije vezan samo uz smanjen izražaj UGN-a već i fosforilaciju GC-C putem sarkomske (src) proto-onkogenske tirozinske protein-kinaze čiji je izražaj povećan u tumorima. Fosforilacija GC-C ovom protein-kinazom inhibira stvaranje cGMP-a što inhibira citostazu stanica uzrokovanu cGMP-om (174). Nadalje, GC-C/cGMP signalni sustav održava integritet crijevne sluznice održavanjem funkcionalnih čvrstih spojišta između stanica (175).

UGN/GC-C signalni put se u nedavnim istraživanjima predlaže kao novi put u prevenciji razvoja tumora kod pacijenata visokog rizika s adenomatoznom polipozom (176) zbog očuvanosti GC-C i regulacije staničnog ciklusa što je i potvrđeno na mišjim modelima (172). Danas dostupni analozi UGN-a, Linaklotid i Plekanitid su prvenstveno sintetizirani za simptomatsku terapiju sindroma iritabilnog crijeva i kronične konstipacije zbog fizioloških učinaka GC-C na sekreciju vode u crijevima (176–179). Primjena ovih lijekova za smanjenje rizika od pojave tumora crijeva još uvijek nije registrirana.

Kronični nedostatak Zn^{2+} dovodi do povećanog izražaja UGN-a u enterocitima što možemo povezati sa sekrecijskom dijareom koja se pojavljuje kod osoba koje unose premalo Zn^{2+} (61,180–182). Pri nedostatku Zn^{2+} dolazi i do nakupljanja bioaktivnog UGN-a na proteinskoj razini i u bubregu (183).

1.4. Gvanilinski peptidi u ostalim tkivima

1.4.1. Bubreg

GP u bubregu mogu djelovati endokrino nakon sekrecije iz crijeva ili lokalno nakon sekrecije u samom bubregu. Iako se bioaktivnim smatra UGN, usporednom analizom intravenske (*i.v.*) primjene UGN-a i pro-UGN-a, pokazano je da pro-UGN u bubrezima ima izraženiji natriuretski učinak (184,185). Kao i u crijevima, postoji anatomski razlika u izražaju GN-a i UGN-a u bubregu. Najviši izražaj mRNA za GN nađena je u sabirnim kanalićima, a za UGN u proksimalnim kanalićima (64). Izražaj UGN-a, ali ne i GN-a u bubrezima raste nakon unosa soli iako do sada još nije sa sigurnošću utvrđen mehanizam ove regulacije. Istraživanje je pokazalo kako ljudi koji hranom dnevno unose više soli (10 g) izlučuju više UGN-a u urinu nego ljudi koji unose manje soli (7 g) (45). Nadalje, UGN KO miševi pokazuju smanjenu natriurezu kod povećanog unosa soli te je upitno je li tome razlog nedostatak UGN-a u crijevima ili bubrezima (137). Pretpostavljeno je kako je upravo porast izražaja UGN-a u bubregu povezan s hipertonicitetom bubrega, a ne crijeva. To je vidljivo na staničnoj kulturi M-1 stanica koje imaju svojstva kortikalnih sabirnih cijevi bubrega gdje je potvrđen izražaj

UGN-a, ali ne i GN-a. Upravo u ovim stanicama dolazi do porasta izražaja UGN-a nakon dodavanja hiperosmolarnog staničnog medija (NaCl ili manitola) (64).

Izražaj samog receptora za GP-e, GC-C, u bubregu je i dalje kontroverzan. Iako je do sada pokazan izražaj mRNA u glomerulima, proksimalnim kanalićima, kortikalnim sabirnim kanalićima te uloga GC-C na funkciju stanica proksimalnih i sabirnih kanalića (64,135,136,169) neki laboratoriji nisu uspjeli dokazati GC-C u bubregu (185).

Koncentracija GP-a u plazmi je povišena kod bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrega, glomerulonefritisom, te osoba na dijalizi (45,47,53,186,187). Koncentracija UGN-a je u plazmi povećana dok je u urinu smanjena kod pacijenata s nefritičkim sindromom. Kako i dalje koncentracije UGN-a ovise o unosu Na⁺, UGN bi se mogao koristiti kao natriuretski peptid u ovoj bolesti (186,188,189).

1.4.2. Gušterača

mRNA za UGN i GC-C pronađena je u egzokrinim stanicama gušterače dok GN dovodi do porasta unutarstanične koncentracije cGMP-a preko GC-C u staničnoj liniji ljudske gušterače (32,190,191). Moguća uloga GP-a u gušterači je sekrecija HCO₃⁻ koji u duodenumu služi za neutralizaciju kiselog sadržaja želuca. GP i GC-C također su izraženi u tumorskim stanicama gušterače gdje UGN dovodi do inhibicije proliferacije (192).

1.4.3. Jetra

U epitelnim stanicama žučnih vodova i žučnom mjehuru potvrđen je izražaj GN-a, UGN-a, GC-C, PKG-II i CFTR-a na mRNA i proteinskoj razini (193,194). Nadalje, mRNA za GC-C je pronađena u jetri kod fetusa i novookoćenih štakora te nakon parcijalne hepatektomije i regeneracije jetre što pokazuje na regenerativnu ulogu GP-a (16,120–122).

1.4.4. Pluća

U plućima je pokazan izražaj GN-a i GC-C koji u dišnim putevima dovode do aktivacije CFTR-a što je važno za osobe oboljele od cistične fibroze jer su pluća organ

koji je u toj bolesti najviše oštećen (26,27,123,195,196). UGN također dovodi do relaksacije trahealnih glatkih mišića i smanjuje proizvodnju sluzi u velikim i malim dišnim putevima što bi mogao biti novi način liječenja astme (197,198).

1.4.5. Ostali organi

GP i GC-C su također pokazani u žlijezdama slinovnicama, žlijezdama znojnicama, srži nadbubrežne žlijezde te u muškom reproduktivnom sustavu (28–30,33,37,124). Također je otkriveno kako bi se UGN mogao koristiti u terapiji erektilne disfunkcije jer dovodi do relaksacije korpusa kavernoza (199).

1.5. Natriuretski peptidi u mozgu

1.5.1. Izražaj

Rasprostranjen izražaj NP-a i njihovih receptora u mozgu potvrđuju njihovu važnost od razvoja SŽS-a do kontrole otpuštanja neurotransmitera i modificiranja sinapsi. Izražaj NP-a i njihovih receptora u pojedinim regijama mozga prikazan je u tablici 3. (200).

1.5.2. Uloga u razvoju mozga

Mnoga istraživanja kod štakora pokazala su da vezna mjesta za ANP postoje u ventrikularnoj zoni (VZ) telencefalona 13. embrionalnog (E13) dana upravo kada se događa najveća neurogeneza (201), u dorzalnim spinalnim ganglijima i perifernim živcima E14 dana (202) te u kortikalnom neuroepitelu E17 dana (203). Izražaj GC-B, receptora za CNP, je pokazan u stanicama koje okružuju VZ gdje dolazi do diferencijacije post-mitotičkih neurona dok je NPR-C snažno izražen u notokordu te vjerojatno ima ulogu u dorzalno/ventralnoj orijentaciji leđne moždine. Nadalje, izražaj GC-A nije pokazan tijekom embrionalnog razvoja te se pretpostavlja kako NP imaju ulogu u razvoju SŽS-a vezanjem na GC-B i/ili NPR-C receptor, ali ne i na GC-A (204).

Tablica 3. Izražaj natriuretskih peptida i njihovih receptora u mozgu. Modificirano prema (200).

	ANP	BNP	CNP	GC-A	GC-B	GC-C	NPR-C
Kora velikog mozga	slab	jak	jak	srednji	srednji		jak
Amigdala	srednji	slab	jak	slab	srednji		jak
Hipotalamus	jak	jak	jak	jak	jak	jak	jak
Mali mozak	poneka stanica	slab	jak	slab	srednji		srednji
Hipokampus	poneka stanica	slab	slab	slab	slab		srednji

ANP - atrijski natriuretski peptid, BNP - moždani natriuretski peptid, CNP - natriuretski peptid tip C, GC-A do C – gvanilat-ciklaza A do C, NPR-C - receptor natriuretskih peptida C

1.5.3. Učinak na otpuštanje neurotransmitera

NP imaju utjecaj na otpuštanje noradrenalina i dopamina. Za ANP je pokazano kako na moždanim rezovima hipotalamusa, produljene moždine, *locus coeruleus*, *nucleus tractus solitarius* te pojedinih jezgara telencefalona i diencefalona dovodi do povećanja ponovnog unosa noradrenalina (205–207). U hipotalamusu, hormoni ANP, BNP i CNP aktivacijom GC-B i NPR-C negativno moduliraju noradrenergičnu neurotransmisiju inhibicijom spontanog otpuštanja, biosinteze i prometa (eng., *turnover*) noradrenalina, ali ne djeluju na njegov katabolizam (208,209).

Učinak NP-a na oslobađanje dopamina najviše je istražen na stanicama feokromocitoma (PC12 stanice). ANP i CNP inhibiraju Ca²⁺ ovisno oslobađanje dopamina potaknuto depolarizacijom tih stanica (210).

1.5.4. Učinak na elektrofiziološke značajke neurona pojedinih regija

ANP i BNP dovode do hiperpolarizacije fazički izbijajućih neurona supraoptičke jezgre Ht-a čime smanjuju njihovu frekvenciju izbivanja (211). ANP je uključen i u modulaciju sinaptičke transmisije jer kod hipertoničke stimulacije dovodi do smanjenja glutamatergičke transmisije *organum vasculosum laminae terminalis* na supraoptičku jezgru Ht-a (212). CNP također pokazuje inhibicijski učinak na aktivaciju neurona arkuatne (Arc, eng., *Arcuate nucleus*) jezgre Ht-a te inhibira učinak dopamina na iste neurone (213). U bipolarnim ON-tip neuronima retine pokazano je kako BNP preko

GC-A dovodi do supresije struje gama-aminomaslačne kiseline (eng., *gamma-Aminobutyric acid*, GABA) (214).

1.5.5. Neuroprotektivni učinak

Najnovija istraživanja pokazuju i neuroprotektivni učinak NP preko GC-A, ali ne i GC-B, nakon ishemijskog moždanog udara, inhibirajući učinke bradikina što posljedično smanjuje veličinu moždane lezije (215). ANP također pokazuje neuroprotektivni učinak preko GC-A i povećanja lučenja dopamina koji djeluje zaštitno na retinu u slučaju neurotoksičnosti inducirane s N-metil-D-aspartatom (NMDA) (216).

1.5.6. Učinak na astrocite

Osim na neurone, NP pokazuju i učinak na glijalne stanice. Neka istraživanja pokazuju da izražaj GC-A i GC-B ovisi o moždanoj regiji te se većinom nalaze na astrocitima (As) (217–222). Osim ovih receptora astrociti također pokazuju i izražaj NPR-C (223). ANP na staničnoj kulturi astrocita sprječava nastanak unutarstaničnog edema (224) dok CNP inhibira NHE i time snižava unutarstanični pH (225).

1.6. Učinak urogvanilina na mozak

Iako se za postojanje GC-C u mozgu zna već duže vrijeme, učinci UGN-a na mozak se istražuju tek zadnjih nekoliko godina. Za sada su jedino istraženi učinci na metabolizam preko Ht-a i učinci na dopaminergičke neurone srednjeg mozga. Učinci na Ht i dalje su kontroverzni zbog nesuglasica u istraživanjima koja su do sada provedena.

1.6.1. Učinak na hipotalamus i metabolizam

GC-C se u Ht-u nalazi na pro-opiomelanokortinskim (eng., *Proopiomelanocortin*, POMC) neuronima Arc jezgre. Smatra se da UGN koji se luči iz crijeva u plazmu dolazi do tih neurona te dovodi do povećanja unutarstanične koncentracije cGMP-a. GC-C KO miševi imaju veću tjelesnu masu u odnosu na WT miševe što je

posebno vidljivo kod starijih životinja i ženki (38,39). Taj višak tjelesne mase nastaje zbog viška masnih naslaga bijelog masnog tkiva (eng., *White adipose tissue*, WAT) dok su nemasna tjelesna masa i količina vode jednaki. Nadalje, GC-C KO životinje pokazuju znakove metaboličkog sindroma koji uključuje hiperinzulinemiju, hiperleptinemiju, hipertrofiju srca i poremećenu toleranciju na glukozu (38). Osim povećanog unosa kalorija nije pronađena promjena niti u jednom od mehanizama koji bi mogli dovesti do takvog stanja, kao što je apsorpcija masti, ugljikohidrata ili proteina. Upravo zbog toga, mogući razlog pretilosti kod GC-C KO životinja je taj da UGN dovodi do osjeta sitosti djelujući na GC-C smješten u Ht-u.

Intravenska primjena agonista GC-C dovodi do pojave sitosti što pokazuje da plazmatski UGN može utjecati na sitost upravo preko POMC neurona Arc jezgre Ht-a (38). Kontroverze nastaju jer drugo istraživanje nije potvrdilo navedene rezultate, već ih je, dapače, opovrgnulo. Ono pokazuje kako samo intracerebroventrikularna (izravno u moždane komore) (*i.c.v.*), a ne *i.v.* primjena UGN-a dovodi do osjećaja sitosti već 1 sat nakon primjene (226). Kod mlađih UGN KO miševa u odnosu na WT životinje iz istog legla uočena je povećana tjelesna masa, više WAT-a i pojačan apetit što nije primijećeno kod GC-C KO miševa. Također je uočeno da upravo UGN KO miševi imaju poremećenu kontrolu glikemije nakon obroka dok u gladovanju ta razlika nije vidljiva. Kako su u ovom istraživanju razlike vidljive kod miševa kojima nedostaje UGN, a ne GC-C zaključak je o mogućem postojanju signalnog puta neovisnog o GC-C za UGN i u mozgu (138).

1.6.2. Učinak na metabolizam smeđeg masnog tkiva

Osim učinka UGN-a na sitost, proučen je i učinak na smeđe masno tkivo (eng., *Brown adipose tissue*, BAT). BAT, za razliku od WAT-a, ne skladišti energiju već je troši. Nakon simpatičke stimulacije, BAT iskorištava masne kiseline i glukozu iz kojih stvara toplinu preko aktivacije proteina za rasplitanje 1 (eng., *Uncoupling Protein 1*, UCP 1) koji koncentracijski gradijent protona koristi za stvaranje topline, a ne sintezu ATP-a (Slika 7.). Funkcija BAT-a je zagrijavanje organizma uz povećanje potrošnje energije u hladnim uvjetima (unutarnja peć) (227). Nakon izlaganja hladnoći osjeti s kože projiciraju se u srednju preoptičku jezgru preoptičkog područja hipotalamusa (MnPO) gdje inhibiraju neurone osjetljive na toplinu. Time prestaje inhibicijski učinak

tih neurona na neurone rostralnog talamusa što dovodi do povećanja aktivnosti simpatikusa i aktivacije BAT-a (228,229). Upravo aktivacija BAT-a hladnoćom kod ljudi poboljšava inzulinsku osjetljivost, a ta aktivacija je smanjena kod ljudi s povišenim indeksom tjelesne mase (eng., *Body mass index*, BMI) (227,230–232).

Drugi mehanizam aktivacije BAT-a je nakon obroka u sklopu termogeneze uzrokovane hranom (eng., *Diet induced thermogenesis*, DIT) tijekom koje dolazi do povećanog ulaska glukoze u BAT i stvaranja topline (233). DIT je posebno izražen kod muške populacije normalne tjelesne mase koja ima i veću količinu BAT-a (234). Aktivacija BAT-a tijekom DIT-a i dalje nije u potpunosti razjašnjena.

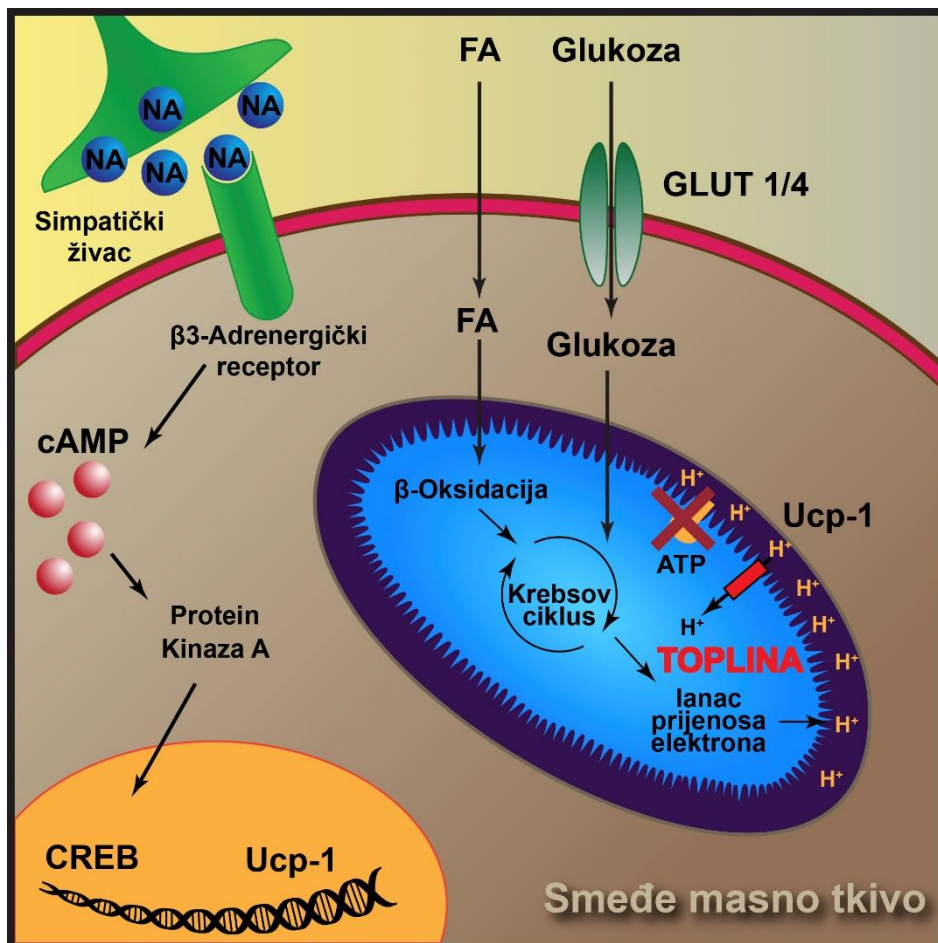
Inzulin i leptin su mogući sudionici u kontroli aktivnosti BAT-a preko POMC neurona Arc jezgre Ht te dovode do pretvorbe WAT-a u BAT (235). Leptin preko GABA-ergičnih neurona Arc jezgre dovodi do inhibicije paraventricularne jezgre Ht-a te putem simpatikusa aktivira BAT (236). Međutim, termogeneza kod ljudi je najizraženija dva sata nakon obroka dok se najveći porast leptina u plazmi može primjetiti tek osam sati nakon obroka (237,238). Također, presađivanje BAT-a miševima koji nisu u mogućnosti stvarati leptin (Ob/Ob miševi) dovodi do smanjenja tjelesne mase i povećava toleranciju na glukozu što pokazuje da leptin nije odgovoran za sve funkcije BAT-a (239,240).

Učinak UGN-a na BAT je pokazan na životinjskom modelu. Dugotrajna *i.c.v.* primjena UGN-a dovodi do smanjenja tjelesne mase, porasta termogeneze aktivacijom BAT-a (porast izražaja biljega termogeneze na razini mRNA kao što su: UCP1, UCP3, pozitivna regulatorna domena 16, (eng., *Positive regulatory domain 16*, PRMD16), receptor gama koaktivator 1 alfa aktiviran peroksisomnim proliferatorom (eng., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*, PGC-1 α)), pretvorbe WAT-a u BAT (porast izražaja UCP1) i mobilizacije lipida aktivacijom simpatikusa (226).

1.6.3. Učinak na srednji mozak

Osim u POMC neuronima Arc jezgre Ht-a, GC-C je pronađen i na somama i dendritima dopaminergičkih neurona *substantia nigra compacta* i ventralnog tegmentalnog područja srednjeg mozga (Sm). UGN neuromodulira te neurone

povećavajući frekvenciju izbijanja modulacijom učinka metabotropnih glutamatnih receptora (mGluR) grupe 1 i muskarinskih acetilkolinskih receptora (mAChR). Nije još jasno kako cGMP/PKG dovode do tog učinka, ali se sumnja na uključenost kanala/receptora prolaznog potencijala (eng., *Transient receptor potential*, TRP). Upravo zbog toga, GC-C KO miševi pokazuju simptome poremećaja pažnje s hiperaktivnošću (eng., *Attention deficiency and hyperactivity disorder*, ADHD) s povećanom lokomotornom aktivnošću i nedostatkom pažnje koji prestaju kod primjene amfetamina (lijek izbora u terapiji ove bolesti) (241). Zanimljivo je da Valentino i sur. nisu pokazali promjene lokomotorne aktivnosti kod GC-C KO miševa niti izražaj GC-C u Sm-u ukazujući na postojanje još mnogih nerazjašnjenih pitanja u ovom području istraživanja. (38).



Slika 7. Fiziologija smeđeg masnog tkiva. cAMP – ciklički adenzin-monofosfat, CREB – protein koji se veže na element koji odgovara na cAMP, GLUT 1/4 – transporter glukoze 1 i 4, UCP1 – protein za rasplitanje 1, ATP – adenzin-trifosfat, NA – noradrenalin, FA – masne kiseline. Modificirano prema (242).

2. HIPOTEZA

U mozgu postoji izražaj urogvanilina koji nakon hranjenja aktivira signalni put ovisan o cGMP/GC-C u neuronima pojedinih moždanih regija te signalni put neovisan o cGMP/GC-C u astrocitima.

3. CILJEVI RADA

OPĆI CILJ:

Cilj ovog istraživanja je utvrditi postojanje i ulogu UGN-a i njegovih signalnih puteva u mozgu.

Specifični ciljevi ovoga rada su odrediti:

1. izražaj UGN-a i GC-C u mozgu WT i GC-C KO životinja na razini mRNA i proteina za vrijeme gladovanja te nakon hranjenja;
2. mehanizam regulacije izražaja UGN-a u mozgu nakon hranjenja;
3. djelovanje UGN-a na neurone pojedinih moždanih regija na moždanim rezovima kod WT i GC-C KO životinja;
4. postojanje signalnog puta za UGN neovisnog o GC-C/cGMP-u u astrocitima izoliranim iz WT i GC-C KO životinja;
5. razlike u ponašanju oba tipa životinja za vrijeme gladovanja i nakon hranjenja;
6. učinak GC-C u hipotalamusu na volumen i aktivnost smeđeg masnog tkiva.

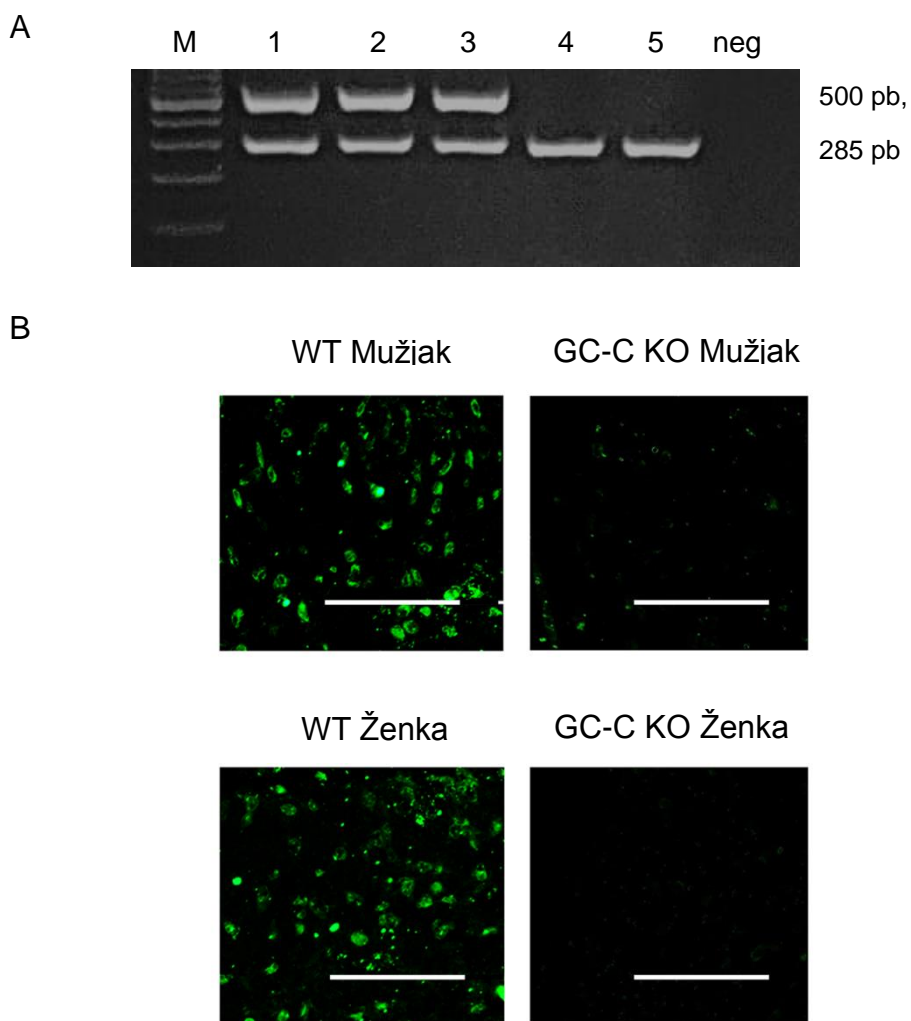
4. MATERIJALI I METODE

Ovo istraživanje provedeno je na laboratorijskim životinjama te zdravim ispitanicima. Korišteni su mušjaci i ženke WT i GC-C KO miševa starosti od 2 do 6 mjeseci. Ljudski ispitanici su bili zdravi dobrovoljci oba spola. Za potrebe imunohistokemije, hipotalamus muške osobe je uzet iz Zagrebačke neuroembriološke zbirke s vremenom nakon smrti do uzimanja uzorka od 6 sati.

4.1. Životinje

U ovome istraživanju korišteni su WT miševi oba spola soja C57Bl6 i GC-C KO miševi istog soja kojima je isključen gen za GC-C. GC-C KO životinje uzgojene su kako je opisano (243). Ukratko, ulomak *Gucy2c* gena koji je sadržavao promotor i egzone 1.-4. je kloniran te je prvi egzon zamijenjen za mini-gen hipoksantin-fosforibozil-transferazu (eng., *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase*, HPRT). U HPRT-embriionalne matične stanice (E14TGA2) elektroporacijom je ubačen konstruirani vektor i odabrani su klonovi s točno ugrađenim vektorom. Ti su klonovi ubačeni u mišju blastocistu te su uzgojeni kimerični miševi. Homozigotni GC-C KO miševi uzgojeni su sparivanjem heterozigotnih miševa. GC-C KO miševе dobili smo kao donaciju od dr. Kris Steinbrechthera (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, SAD).

Genotipizacija je učinjena iz genomske DNA (gDNA). Životinjama je kod razdvajanja i obilježavanja uzet vrh repa. Repić životinja je inkubiran preko noći na 56°C u puferu za lizu stanica (50 mM Tris pH = 8,0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 10 µl (10 mg/ml) proteinaza K (Promega, Fitchburg, WI, SAD)). Sljedećeg dana uzorci su centrifugirani 20 min na 12 000 g. Supernatant je prebačen u čiste epruvete te je dodano 500 µl izopropanola (omjer supernatanta i izopropanola 1:1) što precipitira gDNA. Uzorci su dalje centrifugirani 5 min na 12 000 g te je supernatant pažljivo uklonjen. gDNA je isprana s 1 ml 70% etilnog alkohola laganim okretanjem epruvete te centrifugirana 2 min na 12 000 g. Talog gDNA je potom sušen na 37°C i resuspendiran u 50 µl sterilne H₂O. Otopljena gDNA je dodatno inkubirana na 70°C te skladištena na +4°C do korištenja.



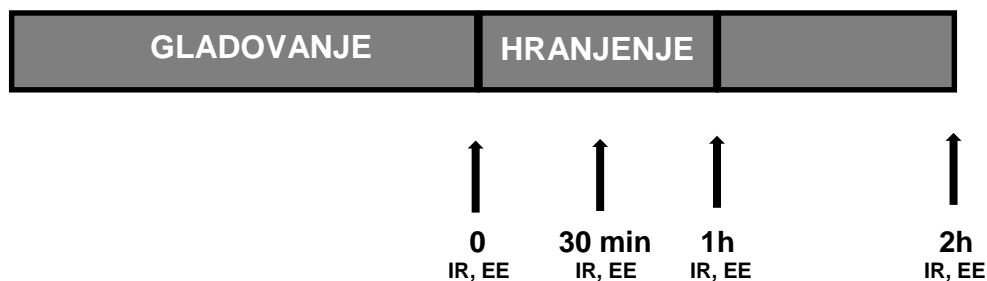
Slika 8. Karakterizacija miševa kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C. A - genotipizacija životinja. Ulomak od 285 pb označava gen s ubačenim dijelom. Ulomak od 500 pb označava divlji tip (WT). M – biljeg veličine DNA; linije 1, 2, 3 – heterozigotne životinje; linija 4 i 5 homozigotne životinje kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C (GC-C KO); linija 6 – negativna kontrola reakcije bez gDNA. B – imunohistokemijska analiza GC-C u hipotalamusu WT mužjaka i ženki te GC-C KO životinja 1 sat nakon obroka. Oznaka veličine 100 μ m.

Nakon izolacije gDNA učinjena je lančana reakcija polimerazom (eng., *Polymerase Chain Reaction*, PCR) s početnicama:

WT-S	5' CTTTCGCACTATGTCCAG 3';
WT-AS	5' GTGATGTGTCACAAACGG 3';
GC-C KO-S	5' TGGATGTGGAATGTGTGC 3';
GC-C KO-AS	5' TCAACCAAGCTGTATCCC 3'.

Reakcijska smjesa je po uzorku sadržavala: 1 μ l od svake početnice (10 pM), 0,5 μ l smjese nukleotida (10 mM), 5 μ l reakcijskog pufera (5x), 1 μ l $MgCl_2$ (25 mM), 0,125 μ l GoTaq polimeraze (5 U/ μ l) (Promega), 13,375 μ l dH_2O . Protokol reakcije je bio: 4 min na 94°C; 30 s na 94°C, 30 s na 61°C, 45 s na 72°C (30 ciklusa); 7 min na 72°C. Rezultati PCR reakcije analizirani su elektroforezom na agaroznom gelu. U reakciji je moguće dobiti dva ulomka od kojih ulomak od 500 parova baza (pb) označava homozigotnu WT životinju dok ulomak od 285 pb označava homozigotnu GC-C KO životinju. Ako se pojavljuju oba ulomka radi se o heterozigotnoj životinji (Slika 8.).

Životinje su hranjene standardnom hranom za glodavce te su imale pristup hrani i vodi *ad libitum* osim u slučajevima pokusa kontroliranog hranjenja. Kod pokusa kontroliranog hranjenja, životinje su gladovale preko noći sa slobodnim pristupom vodi. Nakon toga hranjene su standardnom hranom 1 sat (Slika 9.). Mjerenja aktivnosti smeđeg masnog tkiva te potrošnje energije (eng., *Energy expenditure*, EE) napravljena su prije hranjenja te 30 min, 1 i 2 sata od početka pokusa.



Slika 9. Protokol hranjenja i eksperimentalnih postupaka na životinjama. Životinje su gladovale preko noći te im je izmjerena temperatura i aktivnost smeđeg masnog tkiva infracrvenom termografijom (IR) i potrošnja energije (EE). Nakon toga su životinje dobile hranu na 1 sat, a mjerenja su ponovljena nakon 30 min, 1h i 2h.

4.2. Izolacija mozga i određivanje koncentracije glukoze u krvi i likvoru

Mozgovi WT i GC-C KO miševa izolirani su nakon kontroliranog hranjenja ili nakon *i.c.v.* primjene inzulina. Prije izolacije mozga svakoj životinji je određena koncentracija glukoze u krvi (GUK) dobivenoj iz repa. Nakon toga životinja je anestezirana intraperitonealnom (*i.p.*) primjenom 2,2,2-tribrometanol (250 mg/kg) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, SAD). Glukoza u likvoru je određivana iz uzorka likvora dobivenog punkcijom *cisterna magna*. Životinja je postavljena u aparat za stereotaksiju te se učinio rez kože na stražnjoj strani vrata. Razmicanjem mišićnog i vezivnog tkiva pristupilo se *cisterna magna* te se staklenom mikropipetom izvela punkcija. Koncentracije glukoze u krvi i likvoru određene su pomoću glukometra ContourXT (Ascensia Diabetes Care Holdings AG, Bazel, Švicarska). Kod uzorkovanja mozga za imunohistokemiju, životinja je perfundirana fiksativom, a za potrebe izolacije RNA i proteina, svježi mozak je izoliran i smrznut u tekućem dušiku.

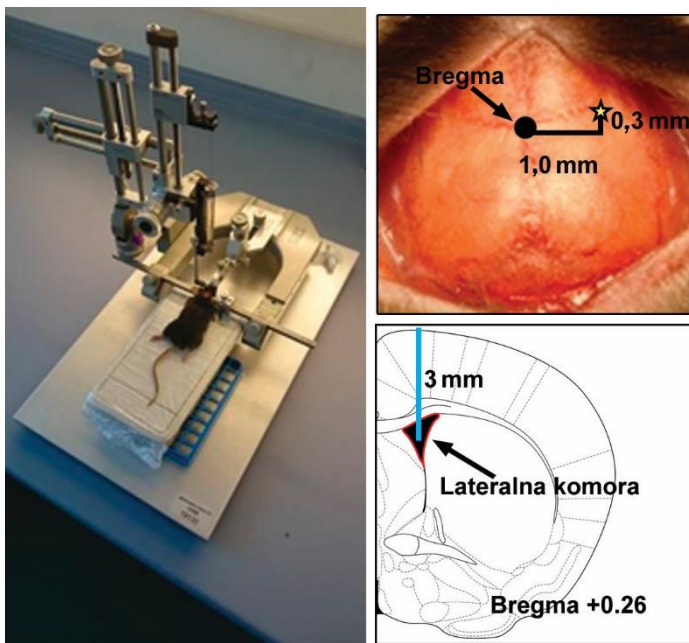
Kod perfuzije, otvaranjem abdominalne i torakalne šupljine prikazani su srce i jetra. Na srcu, rez je bio učinjen na desnoj aurikuli (vidljivi dio desnog atrija) za izlaz tekućine, a u lijevi ventrikul je ubodena igla spojena na štrcaljku (ulaz tekućine). Krvožilni sustav je prvo ispran s 20 ml fosfatnog pufera (eng., *phosphate buffer saline*, PBS) te su potom tkiva fiksirana s 20 ml 4% paraformaldehida u PBS-u (4% PFA). Kao kontrola uspješnosti perfuzije promatrano je ispiranje krvi iz jetre. Nakon dekapitacije, mozak je izvađen te prebačen u isti fiksativ preko noći na +4°C. Za krioprotekciju, mozak je prebacivan u uzlazni niz otopina saharoze (10%, 20% i 30% u PBS-u, svaki preko noći na +4°C).

Kod izolacije svježeg mozga, životinja je nakon određivanja koncentracije glukoze u krvi i likvoru bila dekapitirana te mozak izvađen. Pojedine regije mozga su bile odijeljene (Ht, mali mozak (Cb), Cx, Sm) te pojedinačno smrznute u tekućem dušiku i spremljene na -80°C do analize.

Ljudski hipotalamus je nakon sekcije fiksiran dva dana u 4% PFA te proveden radi krioprotekcije kroz uzlazni niz otopina saharoze (10%, 20% i 30% u PBS-u, svaki preko noći na +4°C).

4.3. Intracerebroventrikularna primjena inzulina

Mužjaci WT miševa su gladovali preko noći. Anestezirane životinje (postupak anestezije opisan ranije) su postavljene u uređaj za stereotaksiju. Nakon učinjenog reza na koži glave od vrata do između očiju, prikazana je *bregma*. Inzulin je bio primjenjivan u desnu lateralnu komoru s koordinatama od bregme: 1 mm lateralno desno, 0,3 mm anteriorno i 3 mm kaudalno. Na poziciji 1 mm lateralno desno i 0,3 mm anteriorno bušilicom je učinjena rupa u lubanji. Hamiltonova igla je spuštena 3 mm od ruba lubanje kroz tkivo mozga do lateralne komore brzinom od 1 mm/s (Slika 10.). Prije početka primjene pričekano je 2 min kako bi moždano tkivo okružilo iglu. Inzulin je primijenjen u dozi od 0,1, 1 ili 10 mU u volumenu od 1 μ l u vremenu od 2-4 min. Identičan postupak je primijenjen i kod kontrolnih životinja uz primjenu fiziološke otopine. Nakon primjene pričekano je 2 min te se igla u trajanju od 5 min polako vadila kako bi se izbjeglo curenje tekućine. Koža je potom zašivena kirurškim koncem, a životinja postavljena na zagrijanu podlogu. Mozgovi su bili prikupljeni 2, 4 i 6 sati nakon *i.c.v.* primjene.



Slika 10. Intracerebroventrikularna primjena inzulina. A – životinja postavljena u uređaj za stereotaksiju tijekom primjene inzulina u desnu lateralnu komoru. B – koordinate za mjesto uboda u desnu lateralnu komoru: 1 mm lateralno desno, 0,3 mm anteriorno i 3 mm ventralno od bregme. Modificirano prema (244).

4.4. Izolacija primarne kulture astrocita magnetski aktiviranim odjeljivanjem stanica

Novookoćeni WT miševi (postnatalni dan 0) anestetizirani su na ledu, dekapitirani te su glave odmah stavljene u 70% etanol. Nakon ispiranja glava u dH₂O, lubanja je otvorena, mozak pažljivo izoliran i prebačen u Hanksovu balansiranu otopinu soli (eng., *Hank's Balanced Salt Solution*, HBSS, Sigma), moždane ovojnice su odstranjene te je mozak usitnjen. Nakon uklanjanja HBSS-a, tkivu je dodan 1 ml (po mozgu) otopine enzima za odvajanje stanica StemPro[®] Accutase[®] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i uslijedila je inkubacija od 60 min na sobnoj temperaturi uz povremeno lagano miješanje. Aktivnost enzima zaustavljena je dodavanjem jednakog volumena staničnog medija DMEM/F12 sa dodatkom glutamina (eng., *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 + GlutaMAX[™]*, Thermo Fisher Scientific). Supernatant koji sadrži stanice je sakupljen te centrifugiran 6 min na 300 g. Supernatant je uklonjen i talog sa stanicama proveden kroz magnetski aktivirano odjeljivanje stanica (245).

Magnetski aktivirano odjeljivanje stanica sastoji se od obilježavanja stanica specifičnim protutijelima, magnetskog odjeljivanja i sakupljanja stanica od interesa. U talog s miješanim stanicama dodano je na 10⁷ stanica 80 µl PBS-a + 0,5% BSA (albumina goveđeg seruma, eng., *Bovine serum albumin*, BSA) (PBS/BSA) te se nakon resuspendiranja dodalo 20 µl Anti-GLAST (ACSA-1)-biotin konjugiranih protutijela (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka) na specifični antigen astrocita (glutamat-aspartatni transporter, GLAST). Nakon laganog miješanja suspenzija je inkubirana 10 min na +4°C. Ispiranje je provedeno u 2 ml PBS/BSA te je uzorak centrifugiran 10 min na 300 g nakon čega je supernatant u potpunosti uklonjen. Nakon resuspendiranja stanica u 80 µl PBS/BSA dodano je 20 µl anti-biotin protutijela konjugiranog s magnetskim česticama (eng., *MicroBeads*, Miltenyi Biotec GmbH). Suspenzija je dobro promiješana i inkubirana 15 min na +4°C, isprana s 2 ml PBS/BSA te centrifugirana 10 min na 300 g. Stanice su ponovno resuspendirane u 500 µl PBS/BSA. Tako je postignuto da se magnetski aktivirane čestice u suspenziji stanica nalaze specifično vezane na astrocite.

Kolumna za magnetsko odjeljivanje je postavljena u držač u snažno magnetsko polje (Miltenyi Biotec GmbH) te je najprije isprana s 500 μ l PBS/BSA. Tada je kroz kolumnu propuštena suspenzija stanica. Pod djelovanjem snažnog magnetskog polja stanice obilježene magnetskim česticama (u ovom slučaju astrociti) ostaju vezane dok ostale stanice slobodno prolaze kroz kolumnu. Moguće ostatne, neoznačene, stanice isprane su 3 puta s 500 μ l PBS/BSA. Nakon uklanjanja kolumne iz snažnog magnetskog polja, 99% čisti astrociti kao označene stanice, prikupljeni su za daljnji postupak izolacije mRNA ili za elektrofiziološka istraživanja te mjerenje unutarstanične koncentracije Ca^{2+} ili pH.

4.5. Analiza genskog izražaja

4.5.1. Izolacija ukupne RNA

Tkivo mišjeg mozga (OB, Cx, Cb, Sm i Ht), proksimalni dio mišjeg tankog crijeva (Cr) te interskapularno smeđe masno tkivo (iBAT) je izvagano i dodano 1 ml TRIzol reagensa (Thermo Fisher Scientific) na 100 mg tkiva ili 10^5 - 10^7 izoliranih astrocita. Nakon homogenizacije na ultrasonikatoru Microson: Ultrasonic Cell Disruptor (Misonix, Farmingdale, NY, SAD) homogenati su inkubirani 5 min na sobnoj temperaturi kako bi se omogućila disocijacija nukleoproteinskih kompleksa. Potom je dodano 0,2 ml kloroforma po 1 ml TRIzol reagensa, inkubirano 2 min te centrifugirano 15 min na 12 000 g na $+4^\circ\text{C}$. Centrifugiranjem dolazi do razdvajanja smjese na tri faze: gornja, vodena faza koja sadržava RNA, srednja faza s DNA i donja, organska faza koja sadržava proteine. Gornja, vodena faza s RNA pažljivo je premještena u nove mikro-epruvete te je dodano 0,5 ml izopropanola po 1 ml korištenog TRIzol reagensa što dovodi do precipitacije RNA koja je inkubirana 10 min na sobnoj temperaturi. Smjesa je potom centrifugirana 10 min na 12 000 g na $+4^\circ\text{C}$. Supernatant je pažljivo odliven uz uočljiv talog RNA na dnu mikro-epruvete. Talog RNA ispran je s 1 ml 75% etanola te su uzorci ponovno centrifugirani 5 min na 7 500 g na $+4^\circ\text{C}$. Etanol je pažljivo odliven dok je talog RNA kratko sušen na zraku nakon čega je stavljen u vakuumski koncentrator Concentrator plus (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) u trajanju od 5 min kako bi se uklonio višak etanola. Ukupna izolirana RNA je otopljena u dH_2O te je ili

odmah iskorištena za prepisivanje u cDNA ili je bila spremljena na -80°C do daljnjeg korištenja.

4.5.2. Prepisivanje RNA u cDNA postupkom reverzne transkripcije

Uzorcima izolirane RNA je izmjerena koncentracija RNA na spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Omjer apsorbancije 260/280 nm oko 2,0 označava kvalitetnu i čistu RNA. 1 μg ukupne RNA prepisan je u komplementarnu DNA (eng., *Complementary DNA*, cDNA) korištenjem GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) prema sljedećem protokolu: 1 μg RNA, 1 μl Oligo(dt) početnice (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) i dH_2O u ukupnom volumenu od 5 μl . Reakcijska smjesa je zagrijana na 70°C u trajanju od 5 min što dovodi do vezanja početnica na RNA te naglo ohlađeno na ledu 5 min kako bi se spriječilo odvajanje početnica. Potom je u reakciju dodano 4 μl GoScript (5x) pufera za reakciju, 2 μl MgCl_2 (25 mM), 1 μl smjese nukleotida (10 mM), 0,5 μl inhibitora ribonukleaza (40 U/ μl), 1 μl GoScript reverzne transkriptaze te 6,5 μl H_2O . cDNA je sintetizirana prema protokolu: 5 min na 25°C , 60 min na 42°C i 15 min na 70°C te spremljena na -20°C do korištenja.

Tablica 4. Korištene početnice za RT - PCR reakciju

Ime početnice	Sekvenca	Spec. temperatura
<i>Guca2b - S</i>	5' GGTGGCAGGCAGGTGGACA 3'	59,8°C
<i>Guca2b - AS</i>	5' CTGGGAGGATGGCGATTACTTCA 3'	
<i>Guca2a - S</i>	5' TTGGCT GTCCTGGTAGAAG 3'	55,8°C
<i>Guca2a - AS</i>	5' TGTGGCAGGGCAATAGATG 3'	
<i>Gucy2c - S</i>	5' TGCGCTGCTGGTGTGTTGTGG 3'	58,8°C
<i>Gucy2c - AS</i>	5' CCCGAGGCCTGTCTTTTCTGTAA 3'	
<i>Gapdh - S</i>	5' ACGGCCGCATCTTCTTGTG 3'	57,3°C
<i>Gapdh - AS</i>	5' CCCATTCTCGGCCTTGACTG 3'	

RT-PCR - lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije

4.5.3. Lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije

Izražaj UGN-a, GN-a i GC-C na uzorcima cDNA analiziran je PCR-om. Početnice korištene u ovoj analizi odabrane su pomoću DNASTAR računalnog programa (DNASTAR, Madison, WI, SAD) iz mRNA sekvenci gena *Guca2b* (UGN), *Guca2a* (GN), *Gucy2c* (GC-C) i *Gapdh* (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, eng., *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) (Tablica 4.) te nabavljene od Microsynth AG (Balgach, Švicarska).

Ostali potrebni reagensi nabavljeni su od Promega. Reakcijska smjesa sastojala se od: 1 µl svake željene početnice (10 pM), 0,5 µl smjese nukleotida (10 mM), 5 µl reakcijskog pufera (5x), 1 µl MgCl₂ (25 mM), 0,125 µl GoTaq polimeraze (5 U/µl), 13,375 µl dH₂O. Reakcijska smjesa svakog pojedinog uzorka potom je stavljena u PCR uređaj s navedenim protokolom: 2 min na 94°C, 30 s na specifičnoj temperaturi, 1 min na 72°C (jedan ciklus); 30 s na 94°C, 30 s na specifičnoj temperaturi, 1 min na 72°C (30 ciklusa). Produkti PCR reakcije su analizirani elektroforezom na 1,8 % agaroznom gelu u koji je dodana boja za nukleinske kiseline GelRed® (Biotinum, Fremont, CA, SAD). Ulomci su potom izrezani iz gela i poslani na sekvenciranje radi potvrde specifičnosti.

4.5.4. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Svi potrebni reagensi nabavljeni su od Taqman Real-Time PCR Assay (Thermo Fisher Scientific). Korišteni su kompleti za određivanje *Guca2b* (Mm01192051_m1, UGN), *Gucy2c* (Mm01267705_m1, GC-C) te *Actb* (β-Aktin) (Mm00607939_s1, ACTb) kao gena čuvara prema čijem je izražaju u analizi napravljena normalizacija. U pločicu s 96 jažica stavljeno je po uzorku:

- 10 µl mješavine reagensa (eng., *Master MIX*) koja se sastoji od reakcijskog pufera, nukleotida i DNA polimeraze
- 1 µl početnica obilježenih specifičnim probama
- 1 µl cDNA (iz pojedinih uzoraka mozga)
- 8 µl H₂O

Pločica je centrifugirana 5 min na 250 g te stavljena u uređaj za PCR u stvarnom vremenu 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Vezivanjem početnica za uzorak cDNA dolazi do oslobađanja fluorescentne probe i odašiljanja fotona koje uređaj bilježi te mjeri njihovu količinu u pojedinom ciklusu. Nakon završene reakcije dobije se dijagram s krivuljama izražaja za svaki pojedinačni uzorak. Program analizom daje točan broj ciklusa kada je za pojedini uzorak na njegovoj vlastitoj krivulji prijeđen definirani prag. Izražaj normaliziran prema *Actb* se potom izračuna tako što se broj dva potencira na razliku između ciklusa kada je prijeđen prag gena od interesa i *Actb*.

4.6. Analiza i kvantifikacija proteina

4.6.1. Izolacija proteina i određivanje koncentracije metodom po Bradfordu

Tkivo određenih regija mišjeg mozga je otopljeno na +4°C. Tkivo je izvagano i homogenizirano na ledu ultrasonikatorom Microson: Ultrasonic Cell Disruptor (Misonix, Farmingdale) u puferu za lizu stanica koji se sastojao od: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 1 mM Na₂MoO₄ x 2H₂O, 5 mM Na₄P₂O₇ x 10 H₂O, 1% Triton X-100, 0,5% Na-deoksikolat, 0,1% natrijev dodecil sulfat (SDS), 10% glicerol. Homogenat je centrifugiran 10 min na 12 000 g te je supernatant prebačen u novu mikro-epruvetu. Koncentracija proteina u pojedinom uzorku izmjerena je spektrofotometrijskom metodom po Bradfordu. U epruvetu s 1 ml Bradfordovog reagensa dodan je 1 µl uzorka proteina, dobro promiješan na vrtložnoj miješalici te inkubiran 15 min na sobnoj temperaturi. Na isti način su pripremljeni uzorci 5 različitih koncentracija BSA koji su služili za izradu baždarnog pravca. Absorbancije uzoraka izmjerene su na spektrofotometru Visible Spectrophotometer M201 (Spectronic CamSpec Ltd, Leeds, UK) na 595 nm valne duljine pri kojoj dolazi do najveće apsorbancije svjetlosti u Bradfordovom reagensu s porastom koncentracije proteina. Od apsorbancija uzoraka poznatih koncentracija BSA napravljen je baždarni pravac iz koje su očitane koncentracije proteina u uzorcima mozga.

4.6.2. Elektroforeza

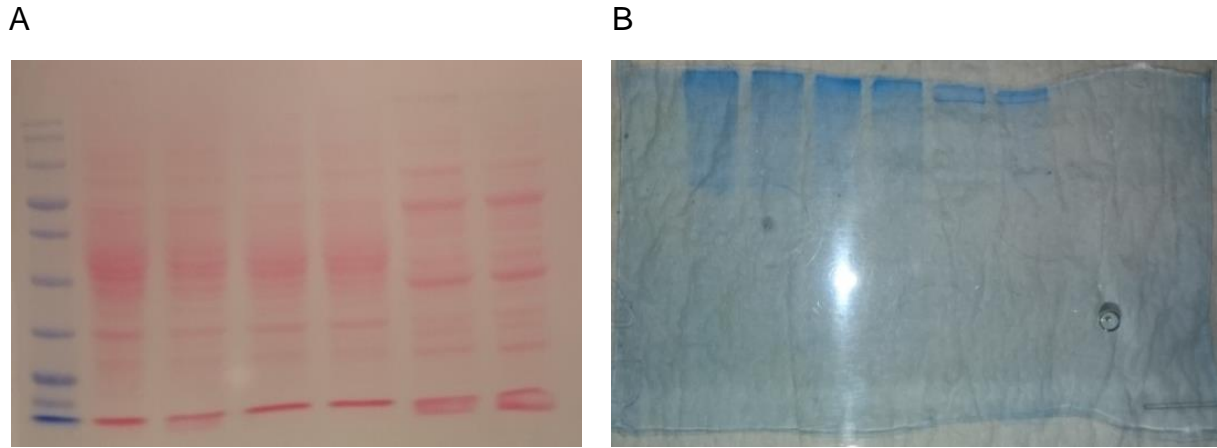
Uzorci proteina za elektroforezu pripremljeni su na sljedeći način: uzorak je sadržavao 100 µg proteina ili 30 µg proteina za procjenu izražaja GC-C, 5 µl pufera za uzorke s 2 µl reducirajućeg agensa (ditiotretiol) (Thermo Fisher Scientific) te dH₂O do volumena od 20 µl. Uzorci su potom kuhani 5 min na 95°C.

16% gel za analizu izražaja UGN-a i 12% gel za analizu izražaja GC-C pripremljeni su od: 30% akrilamida/1% bisakrilamida (prema završnoj koncentraciji gela), 1,5 M Tris-HCl pufera pH=8,8 (25% završnog volumena), dH₂O do konačnog volumena te 80 µl 10% amonij persulfata (APS) i 8 µl tetrametiletilendiamina (TEMED). Smjesa je potom izlivena u aparaturu za pripremu gelova (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, SAD) koja se sastojala od dva stakla razmaknuta 1 mm postavljena u držače kako ne bi došlo do izlivanja nepolimerizirane otopine. Nakon 20 min polimerizacije na donji gel (eng., *Running gel*) stavljen je 4% gel za sabijanje proteina (eng., *Stacking gel*) u sastavu: 30% akrilamid/ 1 % bisakrilamid (volumen prilagođen tako da krajnja koncentracija bude 4%), Tris-HCl pufer pH=6,8 (25% završnog volumena), dH₂O do konačnog volumena te 40 µl 10% APS i 4 µl TEMED. Na gornji gel je stavljen češljic za formiranje jažica. Nakon polimerizacije gel je u staklima prebačen u komoru za elektroforezu u koju je do vrha gela naliven pufer za elektroforezu (eng., *Running buffer*) u sastavu: 0,025 M Tris baza, 0,15 M glicin, 0,1% SDS. 20 µl pripremljenih uzoraka nanoseno je u pojedinu jažicu kao i 4 µl proteinskog biljega. Elektroforeza je provedena na 120 V tijekom 2 h, odnosno dok se proteinski biljeg nije potpuno razvukao na gelu. Stakla s gelom potom su izvađena iz pufera i pažljivo rastvorena te je gornji gel odstranjen.

4.6.3. Western blot metoda

Pripremljen je sendvič za prijenos proteina na membranu: držač > spužvica > filter papir > gel – membrana < filter papir < spužvica < držač. Korištena je PVDF membrana s porama od 0,2 µm radi boljeg vezanja proteina male molekularne mase. Membrana je prije stavljanja u sendvič aktivirana u metanolu 1 min i isprana u dH₂O 1 min. Sendvič je stavljen u komoru za prijenos ispunjenu puferom za prijenos (eng.,

Transfer pufer) u sastavu: 0,02 M Tris, 0,14 M glicin, 20% metanol. Prijenos proteina na membranu odvijao se na 10 V preko noći na +4°C.



Slika 11. Membrana obojena *Ponceau S* i gel obojen *Commassie* bojom. Postojanje proteina na membrani (A) i prazan gel (B) pokazatelji su uspješnosti prijenosa proteina.

Nakon prijenosa, membrana je isprana 5 min u 0,1% Tween-20 u PBS-u (PBSt) te je uspješnost prijenosa proteina provjerena bojenjem membrane *Ponceau S* i gela *Commassie* bojom. Obje boje označavaju proteine (Slika 11.) s tim da se membrana bojena s *Ponceau S* može isprati i sama boja ne dovodi do interferencije s kasnijim postupcima. Nakon bojenja i provjere uspješnosti prijenosa proteina, s membrane je isprana boja s PBSt-om te stavljena u blokirajući pufer (5% obrano mlijeko u prahu u PBSt-u) 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja antigena membrana je inkubirana s primarnim protutijelom. Inkubacija se odvijala uz miješanje preko noći na +4°C. Membrana je isprana 3 puta po 10 min u PBSt-u te je stavljena u otopinu sekundarnog protutijela, prema životinji u kojoj je bilo napravljeno primarno protutijelo, obilježenog peroksidazom iz hrena (eng., *Horseradish peroxidase*, HRP) u blokirajućem puferu. Inkubacija se odvijala miješanjem na sobnoj temperaturi 1 h. Membrana je ponovno ispirana 3 puta po 10 min u PBSt-u te prelivena kemiluminiscentnim supstratom SuperSignal WestFemto (Thermo Fisher Scientific) koji je pripremljen miješanjem otopine A i otopine B u omjeru 1:1, a signal je vizualiziran na uređaju ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories). Protokol za snimanje u programu ImageLab (Bio-Rad Laboratories) namješten je da svakih 10 s tijekom 15 min snimi po jednu sliku s

akumulacijom signala tijekom vremena tako da je s dužinom ekspozicije dolazilo do pojačavanja signala. Kao sliku za kasniju analizu uzeta je slika prije pojave prvog zasićenja signala (pojava saturiranih piksela koje je program označio crvenom bojom). Takvim načinom osigurava se dosljednost pokusa. Analiza i kvantifikacija je učinjena u programu ImageLab, a normalizacija je učinjena prema količini β -aktina (ACTB) u uzorku. Korištena protutijela prikazana su u tablici 5.

Tablica 5. Protutijela korištena za analizu proteina metodom *Western blot*

	Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač
Primarna	Zečji Anti-pro-UGN	1:500	Proteintech Group, Manchester, UK
	Kozji Anti-GC-C	1:250	Santa-Cruz Biotechnology, Dallas, TX, SAD
	Monoklonalni mišji Anti-GAPDH	1:2500	Santa-Cruz
	Monoklonalni mišji Anti-βActin	1:2500	Santa-Cruz
Sekundarna	Anti-zečji HRP	1:10000	Abcam, Cambridge, UK
	Anti-kozji HRP	1:8000	Abcam
	Anti-mišji HRP	1:7500	Abcam

UGN – urogvanilin, GC-C – gvanilat-ciklaza C, GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, HRP – peroksidaza iz hrena

4.7. Imunohistokemijska analiza

Mozgovi su izolirani kako je već opisano. Uzorak tkiva je učvršćen na uređaj za rezanje na -25°C Cryostat 2300 (Leica Biosystems, Wetzlar, Njemačka) uz pomoć ljepila Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, SAD). Rezovi mozga pojedinih regija od interesa rezani su frontalno ili sagitalno na debljinu od 4 μm te odmah prilijepljeni za predmetna stakla s pozitivnim nabojem Superfrost plus (Thermo Fisher Scientific) koji smanjuju mogućnost odvajanje tkiva od stakla tijekom postupka imunohistokemijskog bojanja. Stakla s rezovima spremljena su na $+4^{\circ}\text{C}$ do upotrebe.

Imunohistokemijska analiza započela je najprije rehidracijom rezova 10 min u PBS-u. Tada je učinjen postupak otkrivanja antigena (eng., *antigen retrieval*) kuhanjem stakala s rezovima u 0,01 M citratnom puferu pH=6, 20 min u mikrovalnoj pećnici na 800 W. Uzorci su potom pušteni da se ohlade na sobnu temperaturu te provedeni kroz postupak permeabilizacije 15 min u 0,2% Tween 20 u PBS-u. Nakon permeabilizacije uzorci su isprani 2 puta po 5 min u PBS-u te stavljeni u blokirajući pufer koji se sastojao od 1% BSA u PBS-u. Blokiranje antigena trajalo je 1 h na sobnoj temperaturi. Uzorci su potom inkubirani s određenim primarnim protutijelima na +4°C preko noći. Korištena protutijela, koncentracije i proizvođači prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Protutijela korištena za imunohistokemijsku analizu

	PROTUTIJELA	RAZRJEĐENJE	PROIZVOĐAČ
Primarna	Zečji Anti-GFAP	1:1000	DAKO, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, Z 0334
	Zečji Anti-NeuN	1:1000	Abcam
	Zečji Anti-pro-UGN	1:50	Proteintech
	Kozji Anti-GC-C	1:25	Santa Cruz Biotechnology
Sekundarna	Alexa fluor 488	1:500	Thermo Fisher Scientific
	Cy5	1:200	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, SAD
	HRP	1:500	Abcam

UGN – urogvanilin, GC-C – gvanilat-ciklaza C, NeuN biljeg jezgre neurona, GFAP - glijalni fibrilarni kiseli protein, HRP - peroksidaza iz hrena

Nakon inkubacije s primarnim protutijelom uzorci su isprani 3 puta po 10 min u PBS-u te je na njih stavljeno sekundarno protutijelo prema životinji u kojoj je proizvedeno primarno protutijelo u blokirajućem puferu. Inkubacija sa sekundarnim protutijelom (obilježenim fluorescentnom bojom ili HRP-om) trajala je 1 h na sobnoj temperaturi u mraku. Uzorci bojeni fluorescentnim bojenjem potom su poklopljeni pokrovnim staklom s medijem za očuvanje fluorescencije (DAKO). Kod obilježavanja sekundarnim protutijelom konjugiranim s HRP-om, signal je dobiven bojenjem DAB-om (3,3'-diaminobenzidin), stakla su poklopljena tekućinom za pokrivanje uzoraka Histomount (National Diagnostics, Atlanta, GA, SAD), a rezovi su snimljeni na Hammamatsu skeneru visoke rezolucije (Hammamatsu Photonics, Hammamatsu City, Japan).

Fluorescentni signal potaknut je i snimljen na laserskom konfokalnom mikroskopu Zeiss LSM 510-META (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Njemačka) ovisno o fluorofori sekundarnog protutijela. Za Alexa fluor 488 korišten je argonski laser valne duljine 488 nm te je emisijski fluorescentni signal prikupljen između 505 i 530 nm. Za Cy5 korišten je helij-neonski laser valne duljine 633 nm te je emisijski fluorescentni signal prikupljen iznad 650 nm.

Uzastopni rez svakog pojedinog preparata zbog anatomske orijentacije obojen je metodom po Nisslu (0.1% *cresyl violet* 1 min, ispiranje u dH₂O, diferenciranje u 95% etanolu 5 min, dehidriranje u 100% etanolu). Preparati su potom uklopljeni u Histomount te slikani na stereomikroskopu Olympus SZX10 koristeći digitalnu kameru AmScope MT1000 (United Scope LLC, Irvinr, CA, SAD).

4.8. Priprema moždanih rezova za elektrofiziološka mjerenja i određivanje razine unutarstaničnog Ca²⁺

Mušjaci WT i GC-C KO miševa anestetizirani su kako je opisano ranije te nakon otvaranja abdominalne i torakalne šupljine brzo transkardijalno perfundirani s 20 ml ledeno hladnog, oksigeniranog (95% O₂, 5% CO₂) protektivnog N-metil-d-glukamin (NMDG) umjetnog likvora (eng., *Artificial cerebrospinal fluid*, aCSF) u sastavu: 93 mM NMDG, 93 mM HCl, 2,5 mM KCl, 1,2 mM NaH₂PO₄, 30 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina), 25 mM D-glukoza, 10 mM MgSO₄, 0,5 mM CaCl₂ kako je ranije opisano (246). Zamjenom cjelokupnog Na⁺ izvanstanične otopine s NMDG-om i snižavanjem temperature na 0-2°C postiže se bolje preživljavanje neurona na moždanim rezovima. Mozak je potom brzo izvađen (<1 min) te prebačen u istu otopinu NMDG aCSF u kojoj je na vibratomu (Vibratome 1000 plus, The Vibratome Company, St. Louis, MO, SAD) rezan na rezove debljine 200-300 μm. Moždani rezovi stavljeni su na početni oporavak u trajanju od 10 min u NMDG aCSF na 34°C te prebačeni kod standardni aCSF u sastavu od: 127 mM NaCl, 10 mM D-glukoza, 1,25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 3 mM KCl, 2 mM CaCl₂ na dodatni oporavak u trajanju od najmanje 60 min na sobnoj temperaturi prije početka pokusa.

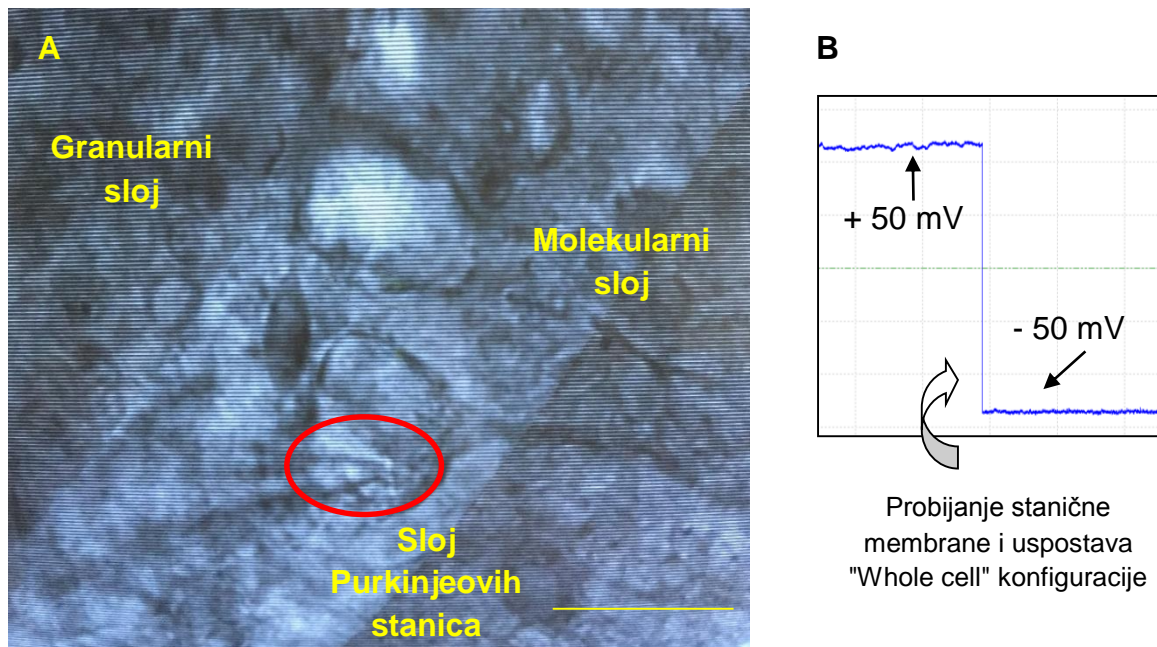
4.9. Metoda priklještenih potencijala

Pojedini moždani rezovi malog mozga WT ili GC-C KO životinja stavljeni su u komoru za snimanje i stabilizirani držačem u obliku harfe. Komora je potom montirana na mikroskop Zeiss FS2+ (Carl Zeiss AG) te je provedena stalna perfuzija oksigeniranog standardnog aCSF-a brzinom od 2-3 ml/min grijanog na $33 \pm 1^\circ\text{C}$. Cijeli postupak je izveden pod infracrvenom kontrastnom diferencijalnom interferentnom mikroskopijom (eng., *Differential interference contrast*) kojom se najbolje mogu uočiti obrisi neurona na rezovima.

Pod objektivom povećanja 4x pronađena je regija Purkinjeovih stanica koja se nalazi između molekularnog i granularnog sloja maloga mozga. Mikro-pipete za elektrofiziologiju veličine $6\ \text{M}\Omega$ izvučene su od borosilikatnog stakla GB150T-8P (Science products, Hofheim, Njemačka) na izvlačivaču Narishige PP-830 (Narishige international limited, London, UK). Mikro-pipeta je ispunjena unutarnjom otopinom u sastavu: 115 mM K^+ -glukonat, 20 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM kreatin-fosfat, 10 mM HEPES, 2 mM Mg-ATP, 0,5 mM GTP te stavljena na elektrodu spojenu s pojačalom SEC-05LPX npi (npi electronic, Tamm, Njemačka). Referentna elektroda uronjena je u otopinu koja se nalazi oko moždanog reza na komorici. Pojačalo je preko jedinice za pretvorbu analognog u digitalni signal (eng., *A/D converter unit*) spojeno s računalom i računalnim programom WinEDR (University of Strathclyde, Glasgow, UK) u kojem je provedena stimulacija i snimanje. Nakon što je mikro-pipeta uronjena u otopinu u kojoj je perfundiran moždani rez očitana je širina pipete (u $\text{M}\Omega$) te je dodan niski pozitivni tlak koji pomaže pri očuvanju čistoće pipete i razmicanju tkiva iznad stanica.

Za postupak spajanja mikro-pipete sa stanicom primjenjivani su pulsevi pozitivne i negativne struje od 1 nA u trajanja 10 ms. Pod objektivom 40x uronjenim u otopinu vizualizirane su stanice i prema morfološkim karakteristikama odabrana je zdrava stanica te je mikro-pipeta polagano spuštana do same stanice. Nakon što je na stanici vizualno primijećena udubina od pipete pozitivni tlak je otpušten i odmah je primijenjen negativni tlak do stvaranja čvrstog spoja (eng., *seal*) između mikro-pipete i stanične membrane (Slika 12.). Stvaranje čvrstog spoja je vidljivo po drastičnom povišenju otpora u prolasku pulseva primjenjivane struje (prema Ohmovom zakonu). Stanična membrana je potom mehanički probijena (Slika 12B) i uspostavljena je

elektrofiziološka konfiguracija cijele stanice (eng., *Whole cell*). Snimanja su izvedena u načinu stalne struje (eng., *Current-clamp*) koji omogućava mjerenje potencijala na membrani. Cijeli pokus sniman je u WinEDR računalnom programu.



Slika 12. Mikropipeta na Purkinjeovoj stanici čvrsto spojena sa stanicom. A: Na snimci kore malog mozga (kontrastna diferencijalna interferentna mikroskopija) vidljiv je granularni sloj, molekularni sloj te sloj Purkinjeovih stanica između koje su određene morfološki. Crveni krug prikazuje pipetu priljubljenu na stanicu tijekom elektrofiziološkog pokusa. (Oznaka veličine $40\ \mu\text{m}$). B: nakon stvaranja čvrstog spoja između pipete i stanice, stanična membrana je mehanički probijena što se vidi promjenom izmjenog potencijala sa $+50\ \text{mV}$ (na površini stanice) na $-50\ \text{mV}$ (unutrašnjost stanice).

Na Purkinjeovim stanicama proučavali smo učinak UGN-a ($100\ \text{nM}$) na membranski potencijal mirovanja te frekvenciju i amplitudu izbijanja akcijskih potencijala. Stanice su stimulirane na izbijanje otopinom standardnog aCSF-a s $30\ \text{mM}\ \text{K}^+$ sastava: $30\ \text{mM}\ \text{KCl}$, $100\ \text{mM}\ \text{NaCl}$, $10\ \text{mM}\ \text{D-glukoza}$, $1,25\ \text{mM}\ \text{NaH}_2\text{PO}_4$, $26\ \text{mM}\ \text{NaHCO}_3$, $1\ \text{mM}\ \text{MgCl}_2$, $2\ \text{mM}\ \text{CaCl}_2$.

Astrociti su nakon izolacije resuspendirani u mediju za stanice DMEM/F12 sa dodatkom glutamina te nasađeni na pokrovna stakalca prethodno obložena poli-D lizinom (Sigma). Stanice su održavane u atmosferi s 5% CO₂/95% zraka na 37°C i upotrebljavane u pokusima 3 do 6 dana nakon nasađivanja. Postupak snimanja promjene membranskog potencijala na primarnoj kulturi astrocita izvođen je na istom sustavu i istom metodom kao za moždane rezove samo što je korištena otopina standardnog aCSF-a bez NaHCO₃, koji je zamijenjen s NaCl. Osim UGN-a (10 i 100 nM) na astrocitima su provedena mjerenja i s GN-om (10 nM) i membranski propusnim cGMP-om (8-Br-cGMP, 1 μM). Mikro-pipete za ova elektrofiziološka istraživanja bile su veličine 5 MΩ.

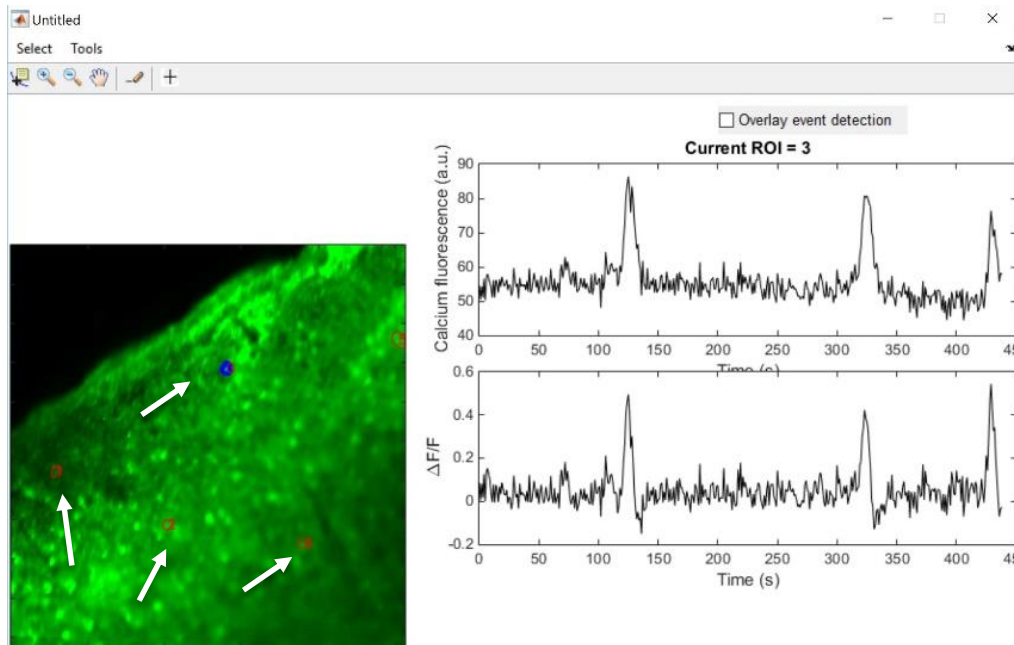
4.10. Mjerenje promjena razine unutarstaničnog Ca²⁺

Astrociti su nakon izolacije resuspendirani u mediju za stanice DMEM/F12 sa dodatkom glutamina te nasađeni na petrijevke sa staklenim dnom. Stanice su održavane u atmosferi s 5% CO₂/95% zraka na 37°C i upotrebljavane u pokusima 3 do 10 dana nakon nasađivanja. Stakalca s astrocitima izvađena su iz staničnog medija i stavljena u HBSS otopinu s bojom osjetljivom na Ca²⁺, Fluo-4 AM, 10 μM (Thermo Fisher Scientific), 15 min na 37°C u atmosferi s 5% CO₂/95% zraka. Nakon inkubacije stanice su kratko isprane od viška boje u HBSS i učvršćene na komoru za snimanje u koju je dodan HBSS.

Moždani rezovi WT i GC-C KO miševa pripremljeni su kako je opisano. Pojedini rez maloga mozga ili kore velikog mozga stavljen je u otopinu s bojom osjetljivom na Ca²⁺, Fluo-4 AM, 10 μM za mjerenje na astrocitima (Thermo Fisher Scientific) ili Oregon Green™ 488 BAPTA AM, 10 μM za mjerenje na neuronima (Thermo Fisher Scientific) u oksigeniranom aCSF-u s dodatkom 100 mM manitola. Rezovi su inkubirani na sobnoj temperaturi u određenoj boji 20 min, isprani 10 min u aCSF-u te učvršćeni na komoru za snimanje s aCSF-om.

Stanice ili moždani rezovi u komori za snimanje učvršćeni su na laserski konfokalni mikroskop Zeiss LSM 510-META (Carl Zeiss AG). Fluorescentni signal pobuđen je argonskim laserom valne duljine 488 nm dok je emisijski signal sakupljen na 505-530 nm valne duljine. Nakon vizualizacije pojedinih stanica, započeto je

snimanje brzinom od 1 Hz. U otopinu je potom dodan UGN (100 nM) te bradikinin (BK, 1 μ M – pozitivna kontrola). Porast intenziteta fluorescentnog signala odgovara porastu unutarstanične razine Ca^{2+} .



Slika 13. Analiza mjerenja unutarstaničnog Ca^{2+} na moždanim rezovima u MATLAB programu. Prikaz dijela programa gdje se prikazuje rez kore velikog mozga inkubiran u Fluo-4 AM boji za Ca^{2+} na kojemu su zaokruženi astrociti kao regije od interesa (ROI) na koje ukazuju do crtane strelice. Program automatski prolazi kroz sve slike i izračunava promjene intenziteta signala u vremenu za svaki pojedini ROI.

Nakon završetka snimanja analiza rezultata učinjena je u programu MATLAB (MathWorks, Natick, MA, SAD). Na seriji snimljenih slika svakog pojedinog pokusa ručno su izabrane regije od interesa (eng., *Region of interest*, ROI). Računalni program potom analizira intenzitet signala svakog ROI na svakoj od pojedinih slika radeći omjer razlike između intenziteta signala dvije uzastopne slike i pozadinskog signala ($\Delta F/F$) pri čemu dobivamo prikaz promjene intenziteta signala, odnosno unutarstanične razine Ca^{2+} u vremenu (Slika 13.).

4.11. Mjerenje unutarstaničnog pH

Primarna kultura astrocita pripremljena je kao i kod pokusa mjerenja unutarstanične razine Ca^{2+} . Stanice na stakalcima inkubirane su u boji osjetljivoj na koncentraciju H^+ iona, BCECF AM, 10 μM (Thermo Fisher Scientific), u HBSS 15 min na 37°C u atmosferi s 5% $\text{CO}_2/95\%$ zraka. Nakon inkubacije, stanice su kratko isprane od viška boje u HBSS-u i učvršćene na komoru za snimanje postavljenu na sustav za mikro-fluorescentna mjerenja te perfundirane standardnim aCSF-om sa ili bez NaHCO_3 ovisno o pokusu. Fluorescentni signal potaknut je dvjema valnim duljinama od 440 nm i 490 nm dok je emisijski signal sakupljen fotonskom cijevi (Hamamatsu Photonics) na 530 nm valne duljine pomoću Biofluor računalnog programa. Brzina snimanja bila je 10 Hz. Potrebne su dvije valne duljine ekscitacije jer BCECF spada u omjerne boje (eng., *Ratiometric dye*) pri čemu valna duljina od 440 nm pobuđuje boju na koju nije vezan H^+ , a valna duljina od 490 nm boju s vezanim H^+ ionima. Računanjem omjera između emisijskih signala određena je promjena unutarstanične koncentracije H^+ iona. Program računa i pozadinsku fluorescenciju kao treću mjernu varijablu.

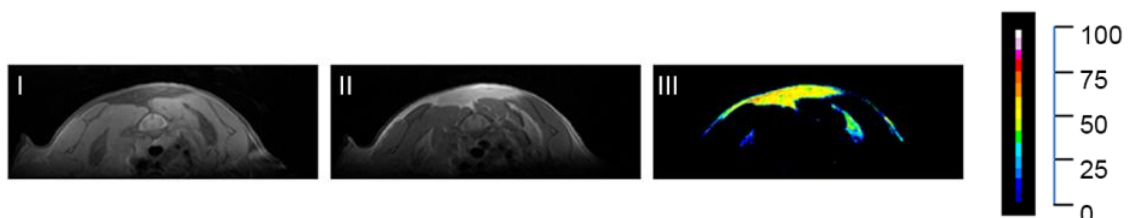
Aktivnost transporta H^+ iona izmjerena je pokusom amonijskog pulsa. Nakon početnog snimanja perfuzijom s aCSF-om bez NaHCO_3 stanice su perfundirane aCSF-om s 20 mM NH_3 . Tijekom amonijskog pulsa NH_3 ulazi u stanicu i veže H^+ ione čime dovodi do alkalizacije unutarstanične tekućine. Nakon uklanjanja NH_3 iz perfuzije dolazi do pretjeranog zakiseljavanja stanice nakon disocijacije NH_4^+ na NH_3 i H^+ . Tada dolazi do aktivacije NHE koji izbacuje H^+ iz stanice i time vraća pH na fiziološku vrijednost. Upravo promjena pH u vremenu označava aktivnost NHE. Amonijski puls je napravljen sa ili bez prisutnosti UGN-a (100 nM) u otopini za perfuziju.

Također je mjerena aktivnost transporta HCO_3^- . Nakon početnog snimanja s otopinom aCSF bez NaHCO_3 dodan je aCSF s 26 mM NaHCO_3 (zamijenjen za 26 mM NaCl). Zbog transporta HCO_3^- dolazi do alkalizacije stanice, a aktivnost transporta je vidljiva iz nagiba krivulje alkalizacije. Promjena pH u vremenu bez i sa UGN-a (100 nM) pokazuje učinak UGN na transport HCO_3^- .

4.12. Magnetska rezonancija

Za određivanje volumena iBAT-a kod WT i GC-C KO miševa oba spola, korišten je uređaj za magnetsku rezonanciju (MR) koji se nalazi u multimodalnom centru za oslikavanje GlowLab, Laboratorij za regenerativnu neuroznanost, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Hrvatska (FP7: GlowBrain). Istraživač nije bio upoznat s grupom kojoj je pripadala pojedina životinja koja je bila snimana. Životinje su bile anestezirane smjesom 70%N₂/30%O₂ koja je sadržavala 4% izoflurana (Forane, Abbott laboratories, Berkshire, UK) te održavane u anesteziji tijekom snimanja. Temperatura tijela životinja pratila se i održavala na 36,8 - 37,2°C. Sva MR snimanja izvodila su se na MR sustavu za male životinje snage 7T (BioSpec 70/20 USR, Bruker Biospin, Rheinstetten, Njemačka) i provodila pomoću ParaVisiona (PV6.01, Bruker Biospin).

Anatomske slike, reference za daljnje snimanje, snimljene su Spin Echo sekvencom (SES), s vremenom ponavljanja (TR)/odjekom (TE) od 900 ms/7,5 ms (razmak odjeka od 5 ms, prosjek 2 odjeka), 15 presjeka, debljina/razmak od 1 mm/0,5 mm, izotropni pikseli od 140 μm (veličina matrice 250 px x 100 px, polje vidljivosti (FOV) 35 mm x 14 mm), 2 prosjeka, širina frekvencijskog pojasa od 150 000 Hz. Snimanje je trajalo 2 min i 15 s. Mjerenja udjela masti (FF) vršila su se korištenjem identičnih SES s istovrsnim parametrima kako slijedi: TR/TE od 3000 ms/7,5 ms (razmak odjeka od 5 ms, prosjek 2 odjeka), 17 presjeka, debljina/razmak presjeka 0,7 mm/0,3 mm, izotropni pikseli u ravnini od 100 μm (veličina matrice 300 px x 110 px, FOV 30 mm x 11 mm), 4 prosjeka i širina frekvencijskog pojasa od 150 000 Hz, trajanje svakog snimanja 16 min i 36 s. U drugom snimanju uključila se supresija signala masti za mjerenje signala koji dolazi samo od molekula vode.

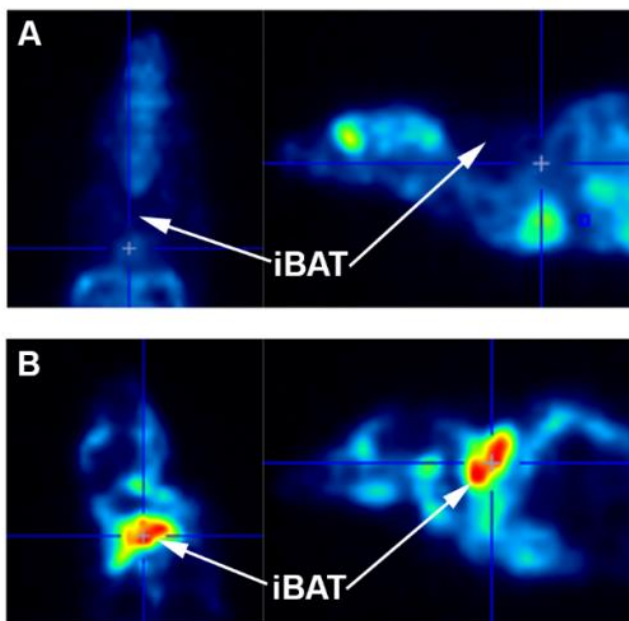


Slika 14. Mjerenje volumena interskapularnog smeđeg masnog tkiva magnetskom rezonancom. I – snimka signala masti (SI_{mast}), II – snimka signala vode, III – zbirna slika ($SI_{mast}/SI_{mast+voda}$) s filterom praga postavljenim u ImageJ programu između 20% i 70%.

Optimalna homogenost polja postigla se dodatnim lokaliziranim ujednačavanjem polja pomoću MAPSHIM algoritma. Mape FF dobile su se korištenjem Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD) softvera putem formule ($FF = S_{I_{mast}}/S_{I_{mast+voda}}$), gdje $S_{I_{mast}}$ predstavlja izračunati intenzitet signala masti ($S_{I_{mast}} = S_{I_{mast+voda}} - S_{I_{voda}}$). $S_{I_{mast+voda}}$ odgovara signalu izmjerenom prvom skeniranom sekvencom, dok $S_{I_{voda}}$ predstavlja samo intenzitet slike signala koji se mjerio drugom sekvencom sa suprimiranim signalom masti. Volumen iBAT-a izračunao se interpolacijom kroz relevantne presjeke primjenom filtra praga koji ograničava vrijednosti FF između 20% i 70% (Slika 14.) te se prikazao kao mm^3 po g tjelesne mase (247,248).

4.13. Pozitronska emisijska tomografija

Kako bi se odredila razlika u aktivaciji BAT-a nakon izlaganja hladnoći kod WT i GC-C KO miševa oba spola provedena je metoda pozitronske emisijske tomografije (PET-CT) (249) u Laboratoriju za eksperimentalnu fiziku na Institutu Ruđer Bošković.



Slika 15. Određivanje aktivnosti interskapularnog smeđeg masnog tkiva PET-CT metodom. Životinja je prikazana u frontalnom i sagitalnom presjeku. A – snimka prije hlađenja i bez vidljive akumulacije 2-(18F) fluor-2-deoksi-D-glukoza (FDG). B – snimka nakon hlađenja sa snažnom akumulacijom FDG-a u interskapularnom smeđem masnom tkivu.

Miševi su držani na +4°C kroz 3,5 sata prije snimanja. Istraživač nije bio upoznat s grupom životinja koju je snimao. Životinje su anestetizirane smjesom 4% izoflurana (Forane) u kisiku s protokom od 0,6 l/min. Potom je *i.p.* aplicirano 50-180 µl 2-(18F)fluor-2-deoksi-D-glukoza (FDG ili 18F-FDG) radioaktivnosti 10,1-13,8 MBq ovisno o masi životinje te je omogućena apsorpcija radioaktivne glukoze 30 min na +4°C. Životinje su ponovno anestetizirane i postavljene u ClearPET™ (Elysia-raytest GmbH, Straubenhardt, Germany) PET skener (250) za male životinje visoke performance. Tijekom snimanja životinje su održavane u anesteziji i temperatura je održavana na 37°C.

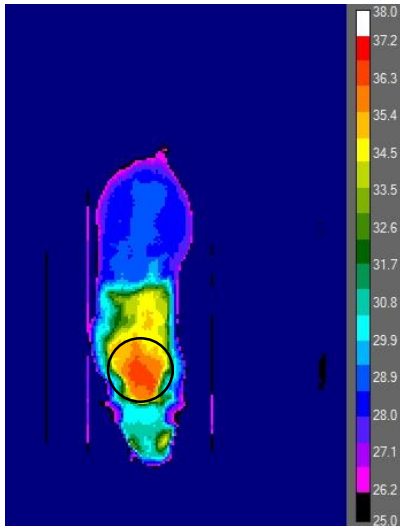
Rekonstrukcija slika izvedena je računalnim programom STIR (251,252) dok je analiza podataka izvedena u PMOD 3.2 programu za analizu slika (PMOD Technologies LLC, Zürich, Švicarska). Kako bi se odredila aktivnost iBAT-a, jednaki ROI su ručno označeni. Krajnji rezultat aktivnost iBAT-a je dan u jedinici standardiziranog unosa (eng., *Standardized uptake value*, SUV) koja je definirana kao:

$$SUV = \frac{MA[MBq/ml]}{IA[MBq]/BW[g]}$$

MA: totalna izmjerena aktivnost
 IA: injicirana aktivnost
 BW: tjelesna masa životinje

4.14. Infracrvena termografija na životinjama

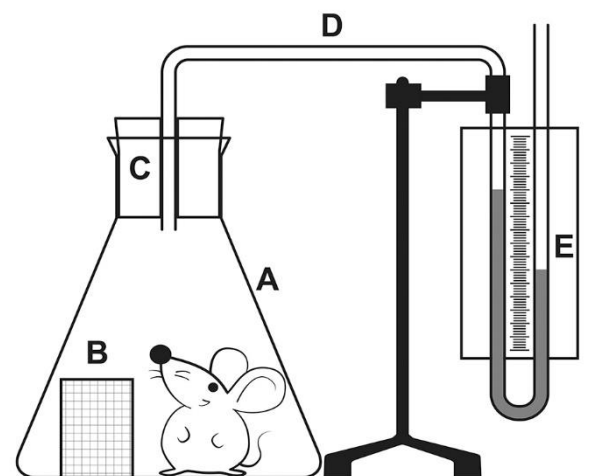
Metoda infracrvene termografije (IR, eng., *Infrared thermography*) korištena je za određivanje aktivnosti iBAT-a nakon obroka kod WT i GC-C KO miševa oba spola te zdravih ispitanika. Za mjerenje je korištena infracrvena kamera (FLIR T-650sc, FLIR Systems, Wilsonville, OR, SAD). Program kamere izračunava temperaturu snimanog objekta iz: emisivnosti kože ($e = 0,97$), reflektirane temperature prostorije (26,3°C), temperature zraka (25,8°C), relativne vlažnosti zraka (42%) i udaljenosti od objekta (1 m) kao varijabli koje mogu utjecati na zračenje objekta snimanja (Slika 16.). Životinjama su dan prije snimanja bila obrijana leđa kako bi se pristupilo koži između skapula te su gladovale preko noći. Nakon početnog snimanja natašte životinje su hranjene 1 sat, a snimanja su ponovljena na 30 min, 1 i 2 sata od početka pokusa kao što je shematski prikazano na slici 9.



Slika 16. Određivanje temperature kože životinje iznad interskapularnog smeđeg masnog tkiva metodom infracrvene termografije. Crnim krugom je označeno područje interskapularnog smeđeg masnog tkiva koje je značajno toplije od ostalog dijela kože.

4.15. Indirektna kalorimetrija

Mušjaci i ženke WT i GC-C KO miševa stavljeni su na gladovanje preko noći sa slobodnim pristupom vodi. Potrošnja energije (EE) (kJ/h/cm^2) određena je prije obroka te nakon 30 min, 1 i 2 sata od početka pokusa kako je prikazano na slici 9. Aparatura za pokus postavljena je kao na slici 17 i sastojala se od: hermetički zatvorene komore (A), sredstva koje adsorbira CO_2 (smjesa natrijevog i kalcijevog hidroksida, B) i vodenog manometara (C).



Slika 17. Shematski prikaz aparature za indirektnu kalorimetriju kod životinja. A – hermetički zatvorena komora, B – sredstvo za adsorpciju CO_2 , C – gumeni čep za hermetičko zatvaranje, D – gumena cijev, E – vodeni manometar s prikazanom razlikom tlaka.

Životinja je stavljena u komoru zajedno sa sredstvom koje adsorbira CO₂, komora je hermetički zatvorena te s cijevi povezana s vodenim manometrom. Kako životinja metaboličkom aktivnošću troši O₂, a izdiše CO₂ dolazi do adsorpcije CO₂ na adsorbirajuće sredstvo i do pada tlaka u komori što se vidi na manometru. Pokus je trajao 5 min nakon čega je očitana razlika tlaka u odnosu na atmosferski tlak u cm vode (Slika 17E) iz koje se izračunava potrošnja kisika prema formuli:

$$V = (V_p - V_z) p/P_a$$

gdje je: V – potrošeni kisik, V_p – volumen posude umanjen za volumen cilindra s adsorpcijskim sredstvom, V_z – volumen životinje (približno kao tjelesna masa u kg), p – razlika u tlaku u komori u odnosu na atmosferski zrak, P_a – atmosferski tlak. Iz volumena potrošenog kisika po satu izračunala se potrošnja energije preko energijskog ekvivalenta litre kisika (20,2 kJ/l). EE (kJ/h/cm²) prikazana je prema površini tijela životinje koja se računa prema:

$$\text{Površina} = 10 \times \text{tjelesna masa}^{2/3}$$

4.16. Testovi ponašanja životinja

4.16.1. Mjerenje horizontalne lokomotorne aktivnosti

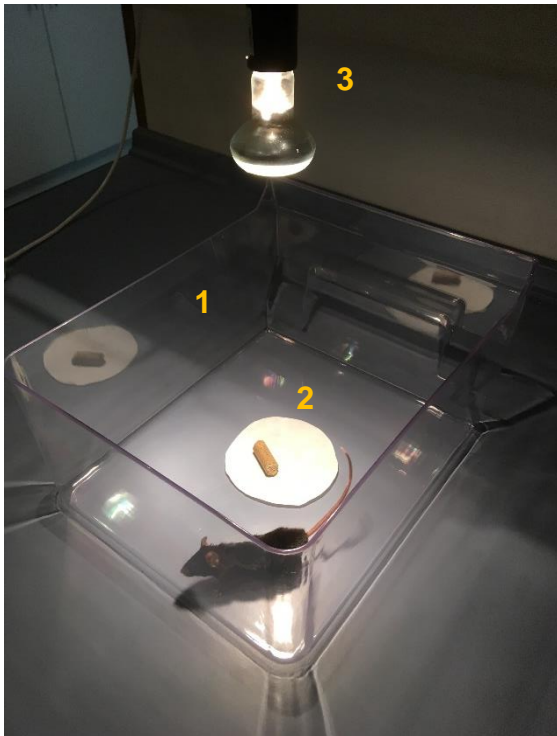
Ugo-Basile kavez (Biological research apparatus, Milano, Italija) na dnu je sastavljen od prečaka koje su spojene s brojačem. Kada životinja šapom stane na prečku zatvara strujni krug što se registrira na brojaču. U ovom testu ponašanja korišteni su mužjaci i ženke WT i GC-C KO miševa. Mjerenje je trajalo 5 min, a rezultati su prikazani kao broj dotaknutih prečki u 5 min očitani sa brojača (253).

4.16.2. Test hipofagije uzrokovane novim okruženjem

WT i GC-C KO miševi stavljeni su na gladovanje preko noći sa slobodnim pristupom vodi. Aparatura za utvrđivanje testa hipofagije uzrokovane novim okruženjem (eng., *Novelty induced hypophagia*) postavljena je kao na slici 18. te se sastojala od: prozirne plastične komore dužine 30 cm, širine 25 cm i visine 15 cm,

izvora svjetla od 25 W na visini od 30 cm, bijelog kruga od filter papira na sredini komore. Na filter papir stavljena je životinjama poznata hrana (pelet kojim se hrane) te je životinja stavljena u kut komore čime počinje mjerenje vremena. Vrijeme je zaustavljeno u trenutku kada je životinja počela jesti i jela hranu najmanje 3 s mjereći tako vrijeme latencije od trenutka ulaska gladne životinje u novo okruženje do konzumacije hrane.

A



B



Slika 18. Test hipofagije uzrokovane novim okruženjem. A – životinja stavljena u test ponašanja: 1 – prozirna plastična komora, 2 – životinji poznata hrana na bijeloj podlozi u centru, 3 – izvor jakog svjetla. B – životinja nakon određenog vremena dolazi do centra i počinje jesti.

4.17. Određivanje termogeneze, aktivacije smeđeg masnog tkiva i glikemijskog statusa nakon obroka kod ljudi

Ispitivanja na ljudima provedena su uz suglasnost Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta za provođenje istraživanja. U ovom istraživanju sudjelovalo je 15 muškaraca i 16 žena s područja grada Zagreba koji ne boluju od metaboličkog

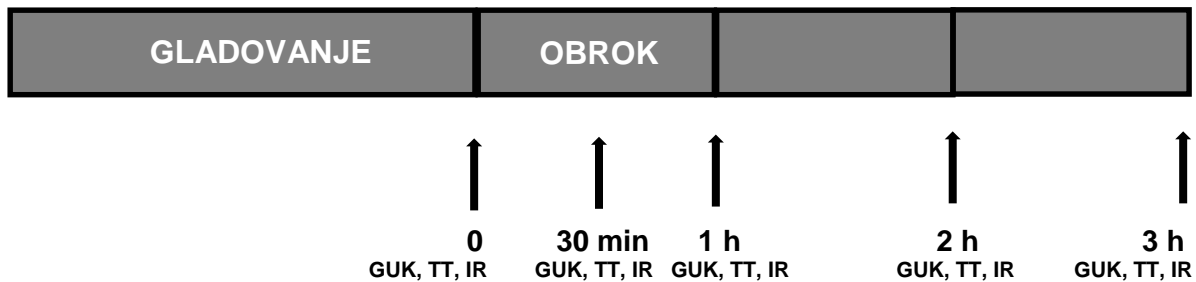
sindroma, šećerne bolesti, hipo- ili hipertireoze te neke druge kronične bolesti. Karakteristike ispitanika prikazane su u tablici (Tablica 7.).

Termogeneza uzrokovana hranom istražena je mjerenjem aksilarne temperature živinim toplomjerom prije i nakon obroka. Ispitanici su sami mjerili tjelesnu temperaturu (TT) kod kuće u opuštenoj atmosferi kako bi se izbjegao stres koji dovodi do povišenja temperature (254). Ispitanici su izbjegavali tjelesnu aktivnost i hranu 3 sata prije obroka, a smjeli su konzumirati vodu. TT su mjerili aksilarno u trajanju od 5 min prije obroka te 30 min, 1, 2 i 3 sata nakon obroka (Slika 19.).

Tablica 7. Karakteristike ispitanika u istraživanju

	Žene		Muškarci	
	BMI < 25 (n = 7)	BMI > 25 (n = 9)	BMI < 25 (n = 4)	BMI > 25 (n = 11)
Dob (godine)	27,4 ± 4,7	44,3 ± 5,9*	29,3 ± 4,0	29,1 ± 1,6
Visina (cm)	172 ± 3	166 ± 1*	184 ± 3	184 ± 3
Tjelesna masa (kg)	62,0 ± 2,8	87,4 ± 4,0*	78,0 ± 4,4	98,9 ± 7,7
Tjelesna masa bez udjela masti (%)	79,5 ± 1,3	62,9 ± 2,2*	80,6 ± 0,9	64,7 ± 6,0*
BMI (kg/m²)	20,9 ± 0,9	31,9 ± 1,5*	23,0 ± 0,7	29,1 ± 1,6*
Početna TT (°C)	36,4 ± 0,1	36,3 ± 0,2	36,2 ± 0,4	36,2 ± 0,1

* p<0,05 , statistički značajna razlika u odnosu na osobe normalne tjelesne mase, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška BMI - indeks tjelesne mase, TT - tjelesna temperatura



Slika 19. Protokol postupaka provedenih kod ljudskih ispitanika. Nakon gladovanja od 3 sata izmjerena je glukoza u krvi (GUK), tjelesna temperatura aksilarno (TT) i snimka infracrvenom termografijom supraklavikularnog smeđeg masnog tkiva (IR). 30 min, 1 h, 2 h i 3 h nakon obroka ponovljena su mjerenja.

Aktivnost BAT-a nakon obroka mjerena je termokamerom FLIR T-650sc (FLIR) (Slika 20.) kako smo i objavili u radu (255). Ispitanici su potpisali pristanak za izvođenje ovih ispitivanja nakon jasnog upućivanja u postupke koji će se provoditi. Ispitanici su izbjegavali tjelesnu aktivnost, hranu i stres 3 sata prije mjerenja, a smjeli su konzumirati samo vodu. Nakon početnog snimanja (0 h) svaki je ispitanik dobio miješani obrok od 1200 kcal u sastavu 40% ugljikohidrata, 40% masti i 20% proteina. Mjerenje aktivnosti BAT-a ponovljeno je 30 min, 1, 2 i 3 h nakon obroka (Slika 19.). Program kamere izračunava temperaturu snimanog objekta iz: emisivnosti kože ($e = 0,97$), reflektirane temperature prostorije ($26,3^{\circ}\text{C}$), temperature zraka ($25,8^{\circ}\text{C}$), relativne vlažnosti zraka (42%) i udaljenosti od objekta (1 m) kao varijabli koje mogu utjecati na zračenje objekta snimanja. Dvije regije od interesa (ROI) su ručno odabrane: 1. iznad BAT-a u supraklavikularnom (SK) području i 2. interklavikularno (IK) područje bez BAT-a kao referentno područje prema snimkama PET-CT (Slika 20.) (256). Snimke su analizirane FLIR Tools programom (Verzija 5.13.17110.2003. Flir Systems). Aktivnost BAT-a određena je na tri načina:

1. određena je maksimalna temperatura (T_{\max}) svakog ROI te je izračunata aktivnost BAT-a = $T_{\max}(\text{SK}) - T_{\max}(\text{IK})$. Vrijednosti u određenim vremenskim točkama nakon obroka su oduzete od vrijednosti prije obroka (257).

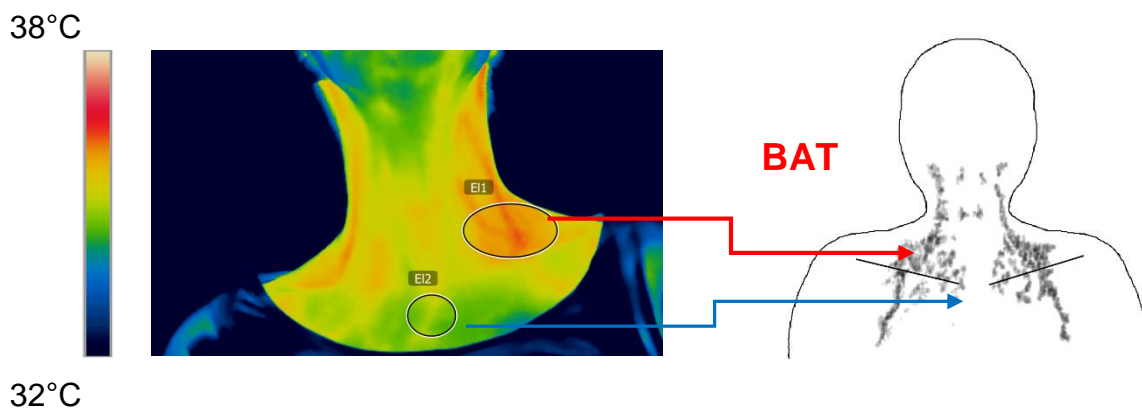
2. određena je površina BAT-a kao područje kože toplije od $36,0^{\circ}\text{C}$ te je izračunata razlika između snimaka prije i nakon obroka.

3. određena je razlika između otpuštene energije (W) iz BAT-a prije i nakon obroka prema Stephan-Boltzmanovu zakonu (258):

$$\text{BAT}_{\text{aktivnost}} (W) = e \times \sigma \times A \times T^4$$

gdje je e – emisivnost kože (0,97) , σ - Stephan-Boltzmannova konstanta ($5,676 \times 10^{-8} \text{ W/m}^2\text{K}^4$), A – površina kože toplija od 36°C (m^2), T – srednja temperatura regije od interesa (K).

Ispitanicima je također mjerena TT aksilarno pomoću živinog toplomjera i GUK pomoću glukometra ContourXT (Ascensia Diabetes Care Holdings AG) prije obroka te 30 min, 1 sat, 2 sata i 3 sata nakon obroka.



Slika 20. Određivanje zona interesa na originalnim snimkama termalne kamere. Određene su dvije zone od interesa (slika lijevo), iznad BAT-a u supraklavikularnom području te bez BAT-a u interklavikularnom području (referentno područje). Zone interesa su određene prema smještaju BAT-a određenim PET-CT metodom (desno - modificirano prema (256)).

4.18. Statistička obrada rezultata

Normalnost distribucije podataka provjerena je Kolmogorov-Smirnov testom. Studentov t -test korišten je kada su se uspoređivale dvije varijable. Kod usporedbe više od dviju varijabli korištena je parna ili neparna analiza varijanci (ANOVA) s Tukey *post-hoc* analizom. Kod provjere povezanosti varijabli korištena je Pearsonova korelacija. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška (SE, eng., *Standard Error*). $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom. Cijela statistička

obrada rađena je u statističkom programu GraphPad InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, SAD).

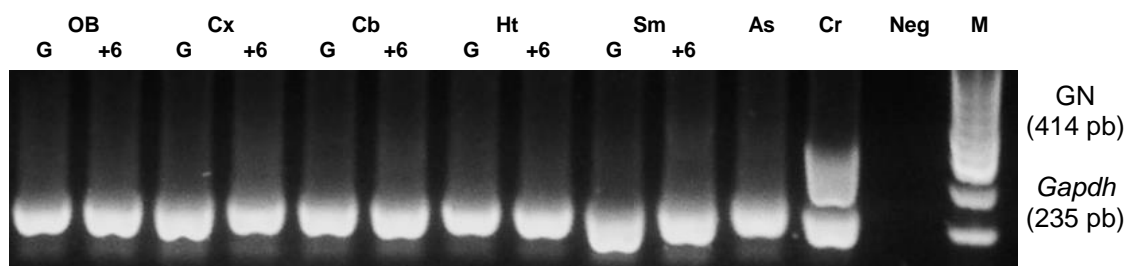
Za određivanje broja životinja u pokusu učinjen je izračun veličine uzorka (eng., *Sample size calculation*) prema pilot studiji s alfa vrijednosti od $p < 0,05$ i snagom od 90%. Za pokuse indirektna kalorimetrije (pilot studija: WT mužjaci = $0,028 \pm 0,023$ kJ/h/cm², WT ženke = $-0,026 \pm 0,027$ kJ/h/cm², n = 6) bilo je potrebno 6 životinja po grupi. U drugim pokusima broj životinja po grupi bio je jednak ili manji.

5. REZULTATI

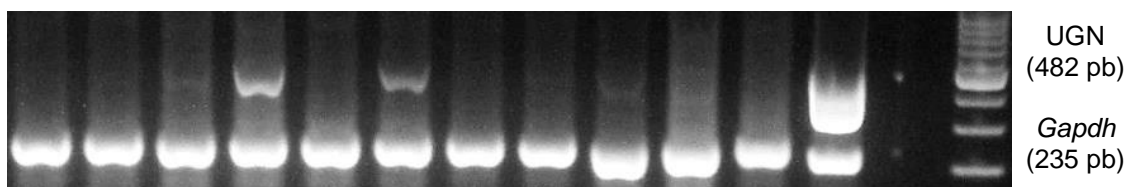
5.1. Izražaj gvanilina, urogvanilina i gvanilat-ciklaze C u pojedinim regijama mišjeg mozga

Izražaj GC-C u mozgu poznat je više desetljeća te smo mRNA za ovaj receptor pronašli u svim ispitivanim regijama mišjeg mozga, ali ne u izoliranim astrocitima. Izražaj agonista GC-C u mozgu opovrgavan je zadnjih 20 godina. Od najpoznatijih agonista GC-C, GN nije nazočan niti u jednoj ispitanoj regiji mozga, dok se mRNA za UGN nalazi u Cx-u, Cb-u, Ht-u i Sm-u. Vjerojatno je da se u mozgu UGN stvara u neuronima jer mRNA za ovaj protein nije pronađena u primarnoj kulturi astrocита. Kako se može vidjeti na slici 21. Izražaj UGN-a se mijenjao ovisno o hranjenju.

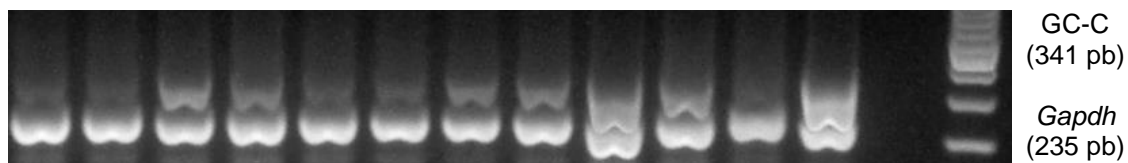
A: GN



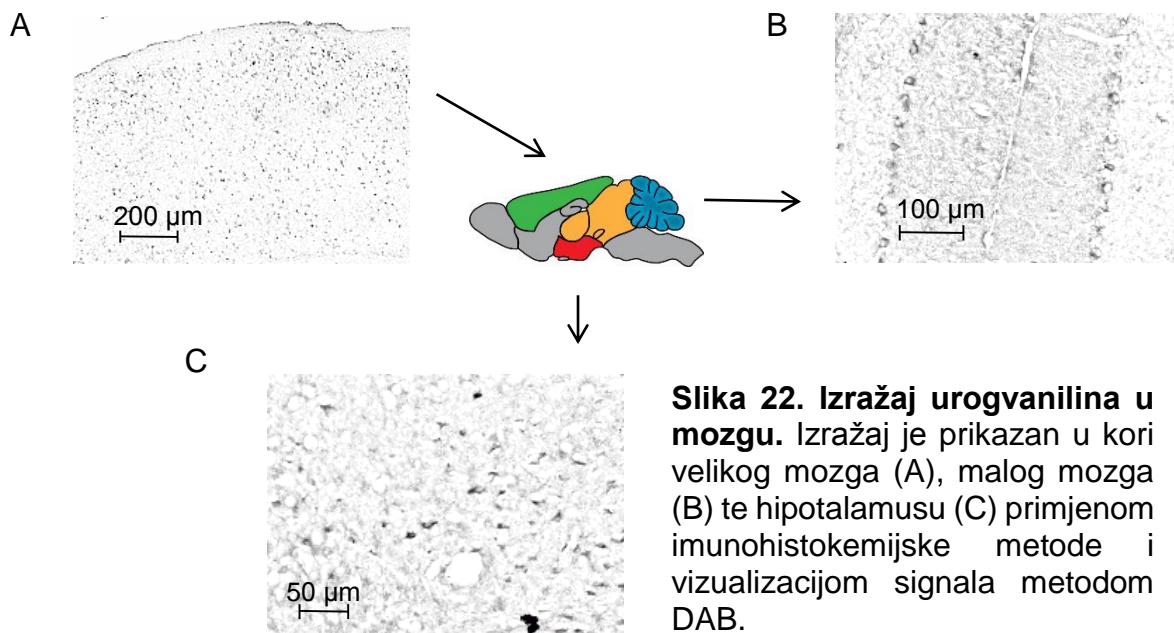
B: UGN



C: GC-C



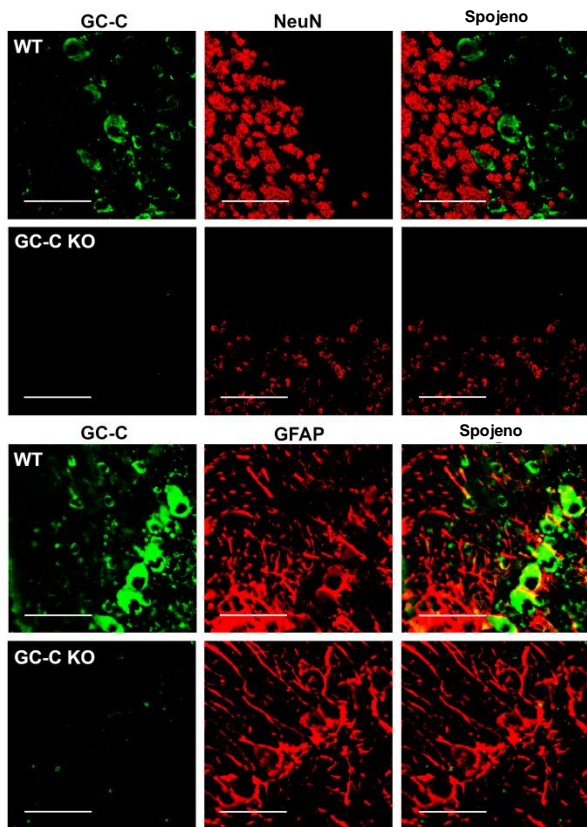
Slika 21. Izražaj mRNA za gvanilin, urogvanilin te gvanilat-ciklazu C u pojedinim regijama mozga. Olfaktorni bulbus (OB), kora velikog mozga (Cx), mali mozak (Cb), hipotalamus (Ht) i srednji mozak (Sm) izolirani su iz cijelog mozga nakon gladovanja (G) te 6 sati nakon ponovnog hranjenja (+6); astrociti (As) izolirani iz novoookočenih miševa. Pozitivna kontrola je cDNA iz crijeva (Cr) nakon hranjenja, a negativna kontrola je PCR reakcija bez cDNA (Neg). Kontrola kvalitete cDNA je određena upotrebom *Gapdh* (glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza). M – biljeg veličine ulomaka, GN – gvanilin, UGN – urogvanilin, GC-C – gvanilat-ciklaza C.



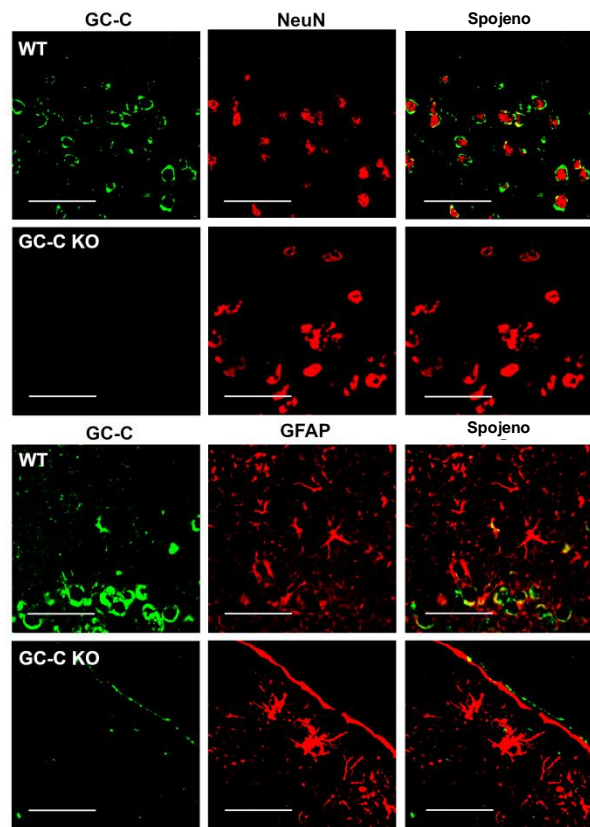
Da bismo detaljnije odredili smještaj UGN-a u pojedinim regijama mozga, koristili smo specifično protutijelo te bojanje DAB-om. UGN se u Cx-u nalazi u motoričkoj regiji u slojevima 2/3, dok se u somatosenzoričkoj kori uz slojeve 2/3 UGN nalazi i u sloju 5 (Slika 22A). U Cb-u izražaj UGN-a se najjasnije primjećuje u Purkinjeovim stanicama kore (Slika 22B). O izražaju UGN-a u Ht-u (Slika 22C) bit će više rečeno kasnije. Osim u prikazanim regijama izražaj UGN-a je zamijećen i u amigdali, entorinalnom Cx-u te laterodorzalnoj tegmentalnoj jezgri.

Smještaj receptora za UGN, GC-C, je do sada bio poznat u Ht-u te Sm-u. Kako smo i pokazali na razini mRNA, GC-C je smješten i u drugim dijelovima mišjeg mozga (Slika 21.). Na proteinskoj razini, smještaj GC-C smo pokazali u kori i dubokim jezgrama Cb-a, Cx-a i Ht-a (Slika 23.) te u amigdali. Kako izražaj GC-C nije prikazan na razini mRNA u primarnoj kulturi astrocita (Slika 21.), isto je potvrđeno i na proteinskoj razini jer se izražaj GC-C preklapa s izražajem specifičnog biljega za jezgre neurona NeuN (eng., *Neuronal nuclei marker*), ali ne sa specifičnim biljekom astrocita, glijalnim fibrilarnim kiselim proteinom, GFAP (eng., *Glial Fibrillary Acidic Protein*). Da bismo utvrdili specifičnost GC-C protutijela isto bojanje smo ponovili i na GC-C KO životinjama (Slika 23.).

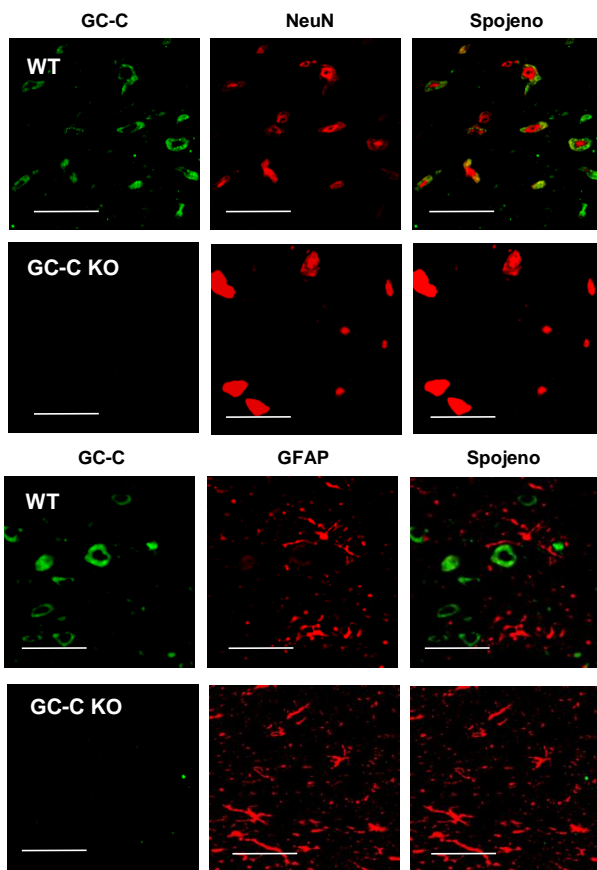
A – kora malog mozga



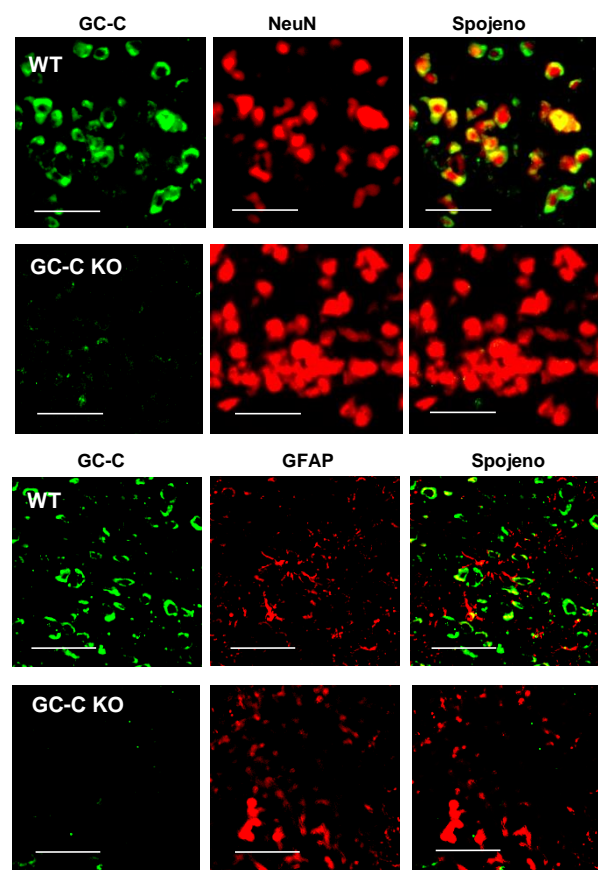
C - kora velikog mozga



B – duboke jezgre malog mozga



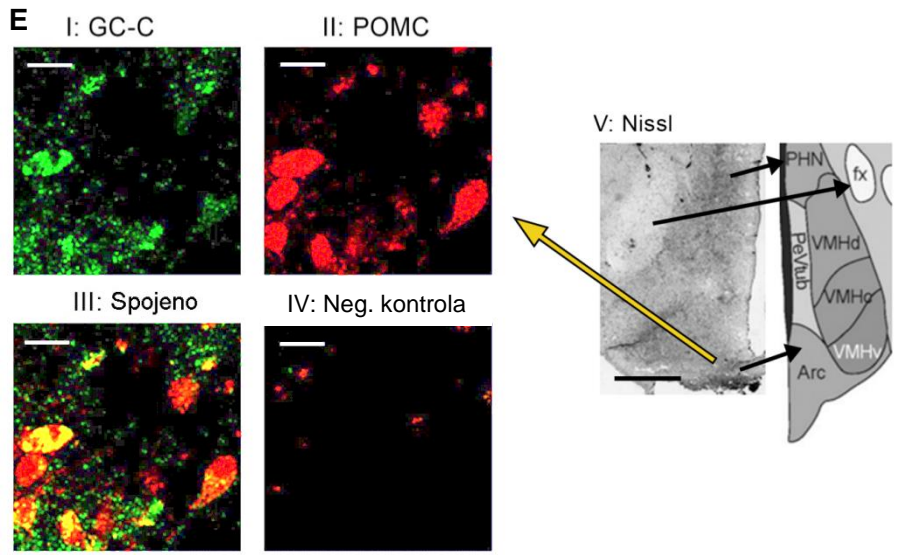
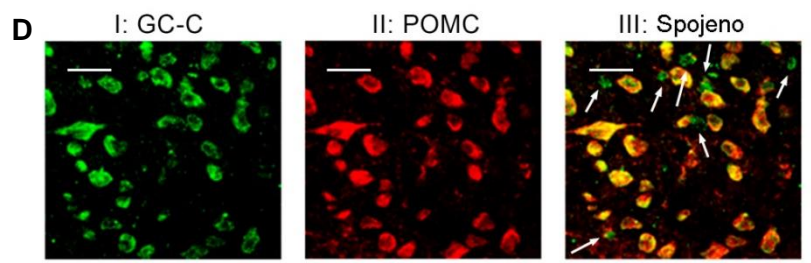
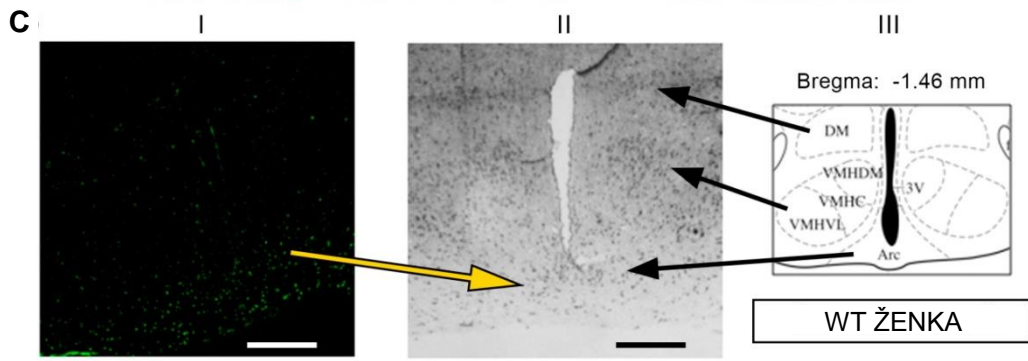
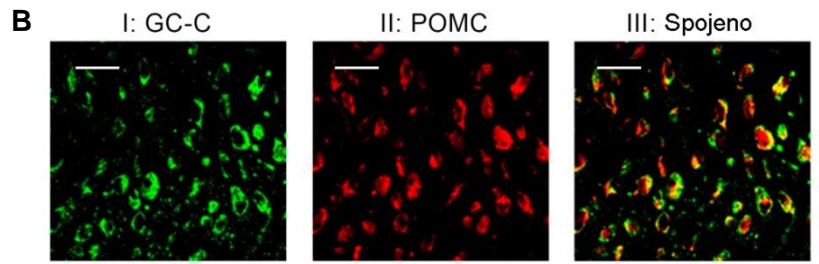
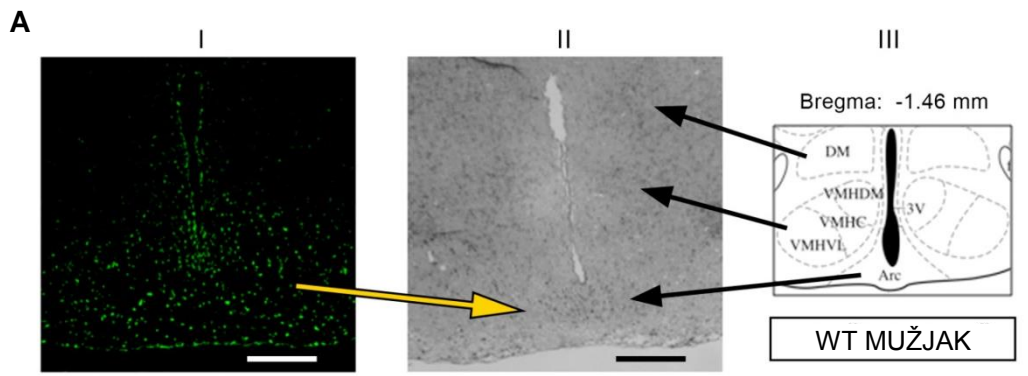
D - hipotalamus



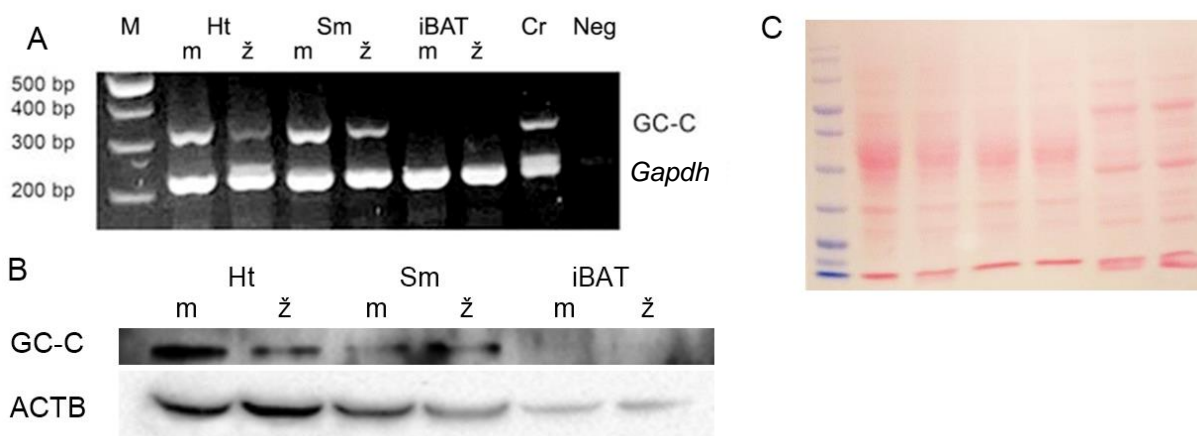
Slika 23. Izražaj gvanilat-ciklaze C u mišjem mozgu. Gvanilat-ciklaza C (GC-C - zeleno) kolokalizira s biljegom jezgre neurona NeuN, ali ne sa specifičnim biljegom astrocita, glijalnim fibrilarnim kiselim proteinom, GFAP u korteksu (A) i dubokim jezgrama (B) malog mozga, kori velikog mozga (C) te hipotalamusu (D) divljeg tipa (WT) životinja. Životinje kojima nedostaje GC-C (GC-C KO) su korištene kao negativna kontrola. Oznaka predstavlja 50 μm .

U hipotalamusu aktivacija GC-C dovodi do porasta izražaja POMC-a (38) te smo pretpostavili da postoji izražaj GC-C upravo u POMC neuronima Arc jezgre ove moždane regije. Ovaj izražaj potvrđen je i na uzorku ljudskog hipotalamusa izoliranog iz muškog mozga. Kao što je prikazano na slici 24., izražaj GC-C u ovim neuronima nije identičan u oba spola. Već iz samog imunohistokemijskog prikaza vidljivo je da je izražaj GC-C u ženki miševa slabije izražen te da postoji i još jedan tip stanica koji izražavaju GC-C, a nisu POMC neuroni.

Detaljnije smo istražili ovu spolnu razliku u izražaju GC-C u hipotalamusu na razini mRNA i proteina što upućuje na različitu ulogu GC-C u regulaciji metabolizma. Nedavno je pokazana uloga UGN-a putem aktivacije GC-C smještenoj u hipotalamusu na aktivaciju smeđeg masnog tkiva (226). Aktivaciju moždanog GC-C, (a ne lokalno djelovanje UGN-a na smeđe masno tkivo) pretpostavljamo na slici 25. gdje se može vidjeti da se GC-C nalazi u Ht-u i Sm-u (pozitivna kontrola), ali ne i u BAT-u (Slika 25 A: mRNA razina, B: proteinska razina). Zbog smanjenog izražaja kontrolnog proteina, ACTB u smeđem masnom tkivu, ali ne i ukupne količine proteina, slika 25C prikazuje originalnu *Western blot* membranu nakon *Ponceau S* bojanja. Kao što je već prikazano imunohistokemijskim metodama, određivanje količine proteina *Western blot* metodom također pokazuje da je izražaj GC-C u Ht-u ženki WT životinja smanjen.



Slika 24. Izražaj gvanilat-ciklaze C u arkuatnoj jezgri hipotalamusa. A - gvanilat-ciklaza C (GC-C) u arkuatnoj (Arc) jezgri hipotalamusa divljeg tipa (WT) mužjaka (I: imunobojanje, II: Nissl bojanje i III: odgovarajuća shema, oznaka = 200 μ m), B – GC-C (I), pro-opiomelanokortin (POMC, II) i spojeno (III) u Arc jezgri WT mužjaka (oznaka = 20 μ m), C – GC-C u Arc jezgri hipotalamusa WT ženki (I: imunobojanje, II: Nissl bojanje i III: odgovarajuća shema, oznaka = 200 μ m), D – GC-C (I), POMC (II) i spojeno (III) u Arc jezgri WT ženki (oznaka = 20 μ m, bijele strelice pokazuju na stanice koje izražavaju GC-C, ali ne i POMC). E – GC-C (I), POMC (II), spojeno (III). Negativna kontrola (IV) je bojanje bez primarnog protutijela. GC-C se kao i kod miševa nalazi u Arc jezgri hipotalamusa muškarca (oznaka = 20 μ m). Nissl bojanje i odgovarajuća shema su prikazani na V (oznaka = 1500 μ m). 3V – treća komora, Arc – arkuatna, DM – dorzomedijalna i VMH – ventromedijalna jezgra, LHAtub – lateralno hipotalamičko područje, tubularni dio, PeVtub – periventrikularna jezgra, tubularni dio, PMH – posteromedijalna hipotalamička jezgra, PHN – posteriorna hipotalamička jezgra, fx – forniks



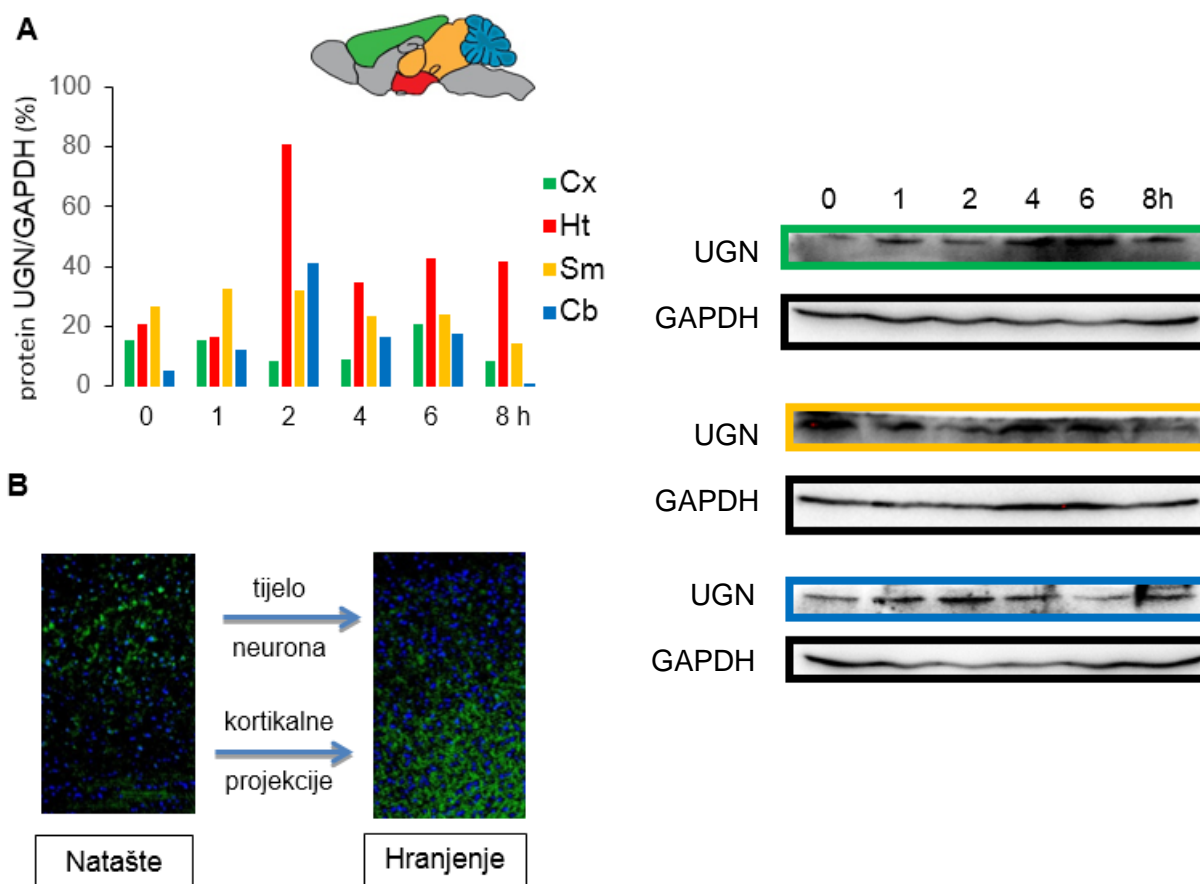
Slika 25. Smanjen izražaj gvanilat-ciklaze C u hipotalamusu ženki u odnosu na izražaj u hipotalamusu mužjaka. Prikazan je izražaj gvanilat-ciklaze C (GC-C) na razini mRNA (A - M – biljeg, Cr - crijevo (+ kontrola), Neg. – negativna kontrola (PCR reakcija bez cDNA). *Gapdh* – glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza, kontrola PCR reakcije) te proteinskoj razini (B – izražaj u odnosu na β -aktin (ACTB)) 1h nakon obroka u hipotalamusu (Ht), srednjem mozgu (Sm) te interskapularnom smeđem masnom tkivu (iBAT). C - prikazuje odgovarajuću *Western blot* membranu. ž – ženke, m - mužjaci

5.1.1. Izražaj urogvanilina i gvanilat-ciklaze C u pojedinim regijama mozga se mijenja s hranjenjem

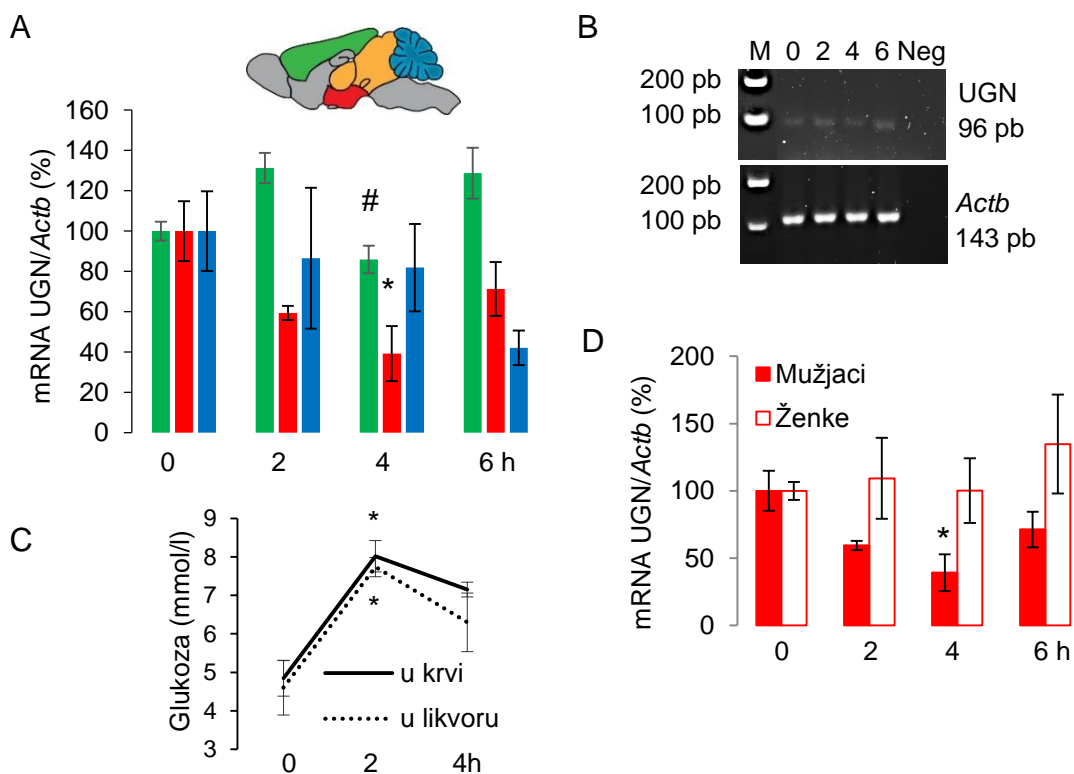
Do sada je pokazano da je UGN hormon sitosti (38) te nas je zanimalo mijenja li se izražaj UGN-a u pojedinim dijelovima mozga s hranjenjem. Promatrali smo izražaj u Cx-u, Sm-u, Cb-u i Ht-u. Na proteinskoj razini izražaj UGN-a u odnosu na izražaj

GAPDH u srednjem mozgu nije se mijenjao, dok je došlo do porasta izražaja UGN-a u Ht-u i Cb-u s najizraženijom promjenom 2 sata nakon obroka te povratkom na početne vrijednosti već 4 sata nakon obroka (Slika 26A).

Nasuprot tome u Cx-u je došlo do smanjenja izražaja UGN-a 2 i 4 sata nakon obroka te povratka na početne vrijednosti 6 sati nakon obroka. Moguće objašnjenje ovih promjena je u premještanju UGN-a iz tijela neurona u kortikalne puteve (Slika 26B).



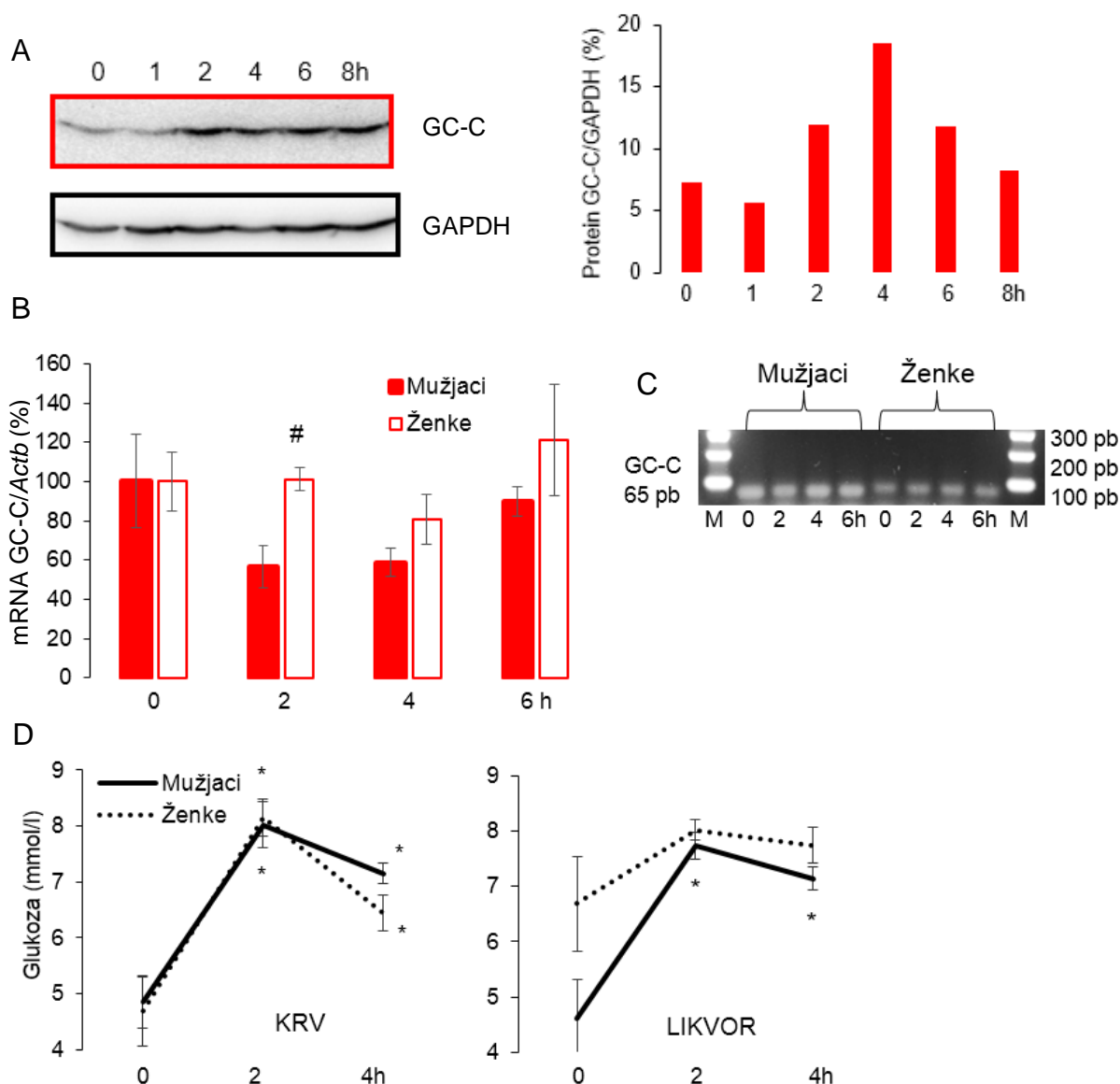
Slika 26. Promjene izražaja urogvanilina nakon hranjenja u različitim regijama mozga kod mužjaka divljeg tipa. Nakon hranjenja dolazi do smanjenja izražaja urogvanilina (UGN) u kori velikog mozga (A – izvorni *Western blot* – glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) je korištena za normalizaciju) što odgovara premještanju UGN-a iz tijela neurona u kortikalne projekcije (B). U isto vrijeme dolazi do porasta izražaja UGN-a u hipotalamusu (Ht). Cx - kora velikog mozga, Sm - srednji mozak, Cb - mali mozak



Slika 27. Izražaj mRNA za urogvanilin se mijenja s hranjenjem kod mušjaka divljeg tipa miševa. A: u kori velikog mozga (zeleno) dolazi do smanjenja izražaja urogvanilina (UGN) 4 sata nakon obroka (# $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na 2 i 6 sati nakon hranjenja). U hipotalamusu (crveno) dolazi do smanjenja izražaja UGN-a 4 sata nakon hranjenja (* $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na vrijednosti natašte, $n = 6$). B: kontrola specifičnosti PCR reakcije u stvarnom vremenu za hipotalamus (M: biljeg, Neg: PCR reakcija bez cDNA). C: kontrola hranjenja je provedena mjerenjem glukoze u krvi i likvoru (* $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na vrijednosti natašte). D: Izražaj UGN-a 4 sata nakon hranjenja je statistički značajno različit u hipotalamusu mušjaka i ženki (* $p < 0,05$, $n = 6$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE. *Actb* - β -Aktin

Izražaj UGN-a u pojedinim regijama mozga utvrdili smo i na mRNA razini. Kontrola hranjenja izvedena je određivanjem glukoze u krvi i likvoru prije obroka, te 2 i 4 sata nakon unosa hrane. Natašte izražaj UGN-a normaliziran izražajem *Actb* se kreće u rasponu kao što je navedeno: Cx ($0,00302 \pm 0,00079$ proizvoljne jedinice, $n = 6$) > Ht ($0,00281 \pm 0,00042$ proizvoljne jedinice, $n = 6$) > Cb ($0,00135 \pm 0,00033$ proizvoljne jedinice, $n = 6$, $p < 0,05$ rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE). I u Cx-u i u Ht-u dolazi do smanjenja izražaja mRNA za UGN 4 h nakon obroka dok u Cb-u ne dolazi do promjene što upućuje na zaključak da UGN u Cb dolazi iz neke druge regije mozga na poticaj hranjenjem (Slika 27A). Smanjenje izražaja mRNA za

UGN u hipotalamusu ženki nije primijećen te se najveća razlika u izražaju UGN-a između mužjaka i ženki može primijetiti 4 sata nakon obroka (Slika 27D).



Slika 28. Promjene izražaja gvanilat-ciklaze C nakon hranjenja u hipotalamusu mužjaka divljeg tipa. Na proteinskoj (A) te mRNA (B) razini kod mužjaka postoji postprandijalna regulacija izražaja gvanilat-ciklaze C (GC-C) u hipotalamusu dok ta regulacija izostaje kod ženki. (A – originalni *Western blot* – GAPDH (glicerilaldehid-3-fosfat dehidrogenaza) korištena je za normalizaciju). # $p < 0,05$ statistički značajna razlika u izražaju mRNA za GC-C u hipotalamusu ženki u odnosu na izražaj u hipotalamusu mužjaka ($n = 6$). Kontrola specifičnosti PCR reakcije u stvarnom vremenu (C – M: biljeg). Kontrola hranjenja je provedena mjerenjem koncentracije glukoze u krvi i likvoru (D). * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u koncentraciji glukoze u odnosu na vrijednosti natašte. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE.

Nadalje, nakon obroka ne mora se mijenjati samo UGN, već može doći i do promjene izražaja samog receptora. Nakon obroka dolazi do porasta izražaja GC-C u hipotalamusu mužjaka na proteinskoj razini 2 i 4 sata nakon obroka dok se u isto vrijeme smanjuje izražaj mRNA pretpostavljajući post-translacijsku regulaciju mRNA za GC-C (Slika 28.). Upravo je izražaj GC-C u pozitivnoj korelaciji sa izražajem UGN-a kod mužjaka ($r = 0,59$, $p = 0,0075$), ali ne i kod ženki ($r = -0,38$, $p = 0,08$). Kontrola hranjenja je provedena mjerenjem glukoze u krvi i likvoru. Iako i kod mužjaka i ženki dolazi do porasta koncentracije glukoze nakon obroka, kod ženki koncentracija glukoze u likvoru prije te 2 sata nakon obroka statistički se ne razlikuje (Slika 28C).

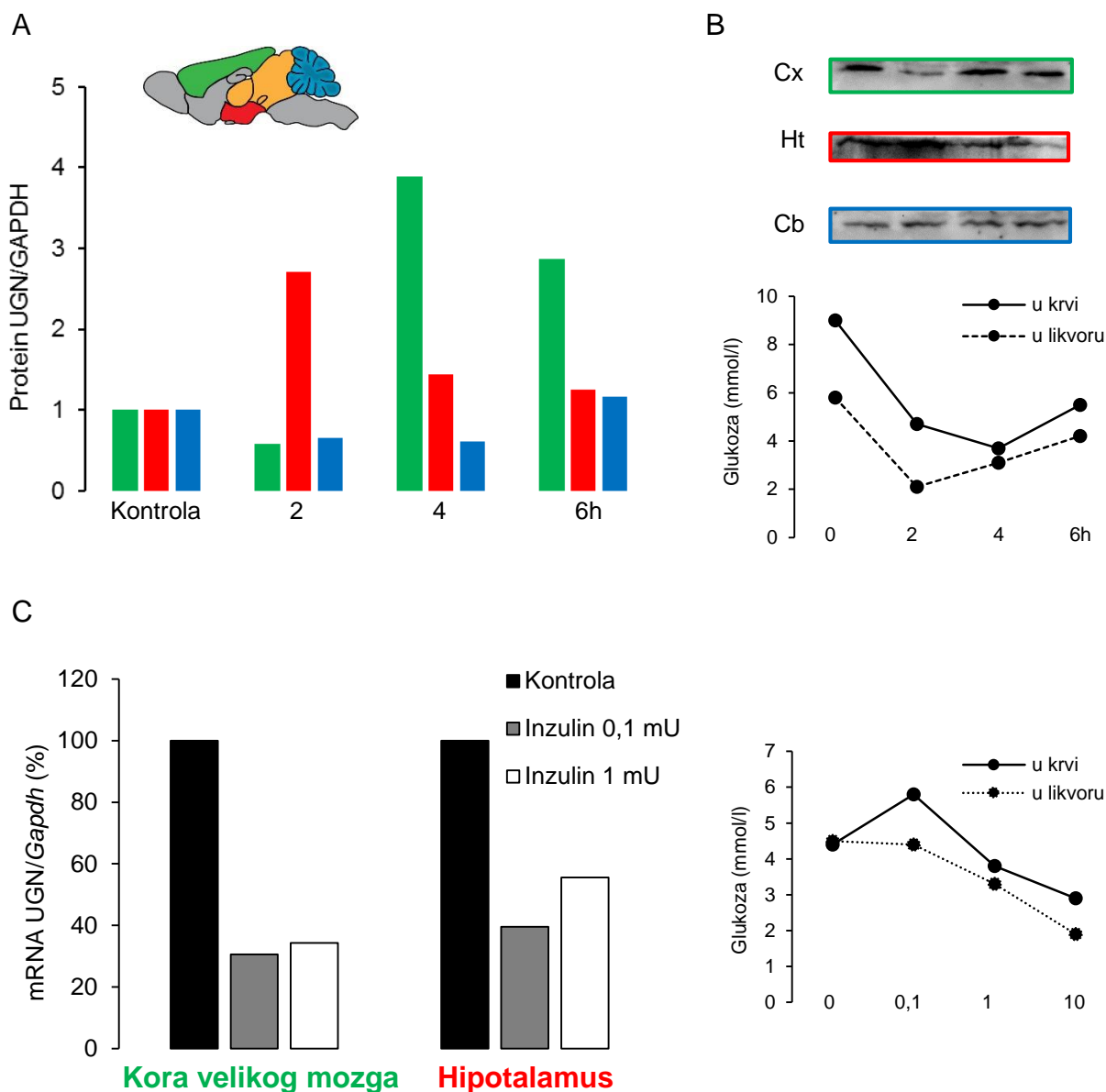
5.1.2. Intracerebroventrikularna primjena inzulina mijenja izražaj urogvanilina u pojedinim regijama mozga

Da bismo odredili mogući mehanizam regulacije izražaja UGN-a nakon hranjenja *i.c.v.* smo primijenili 10 mU inzulina te izolirali pojedine regije mozga 2, 4 i 6 sati nakon primjene. Izražaj UGN-a na proteinskoj razini prati promjene prikazane nakon hranjenja. Naime, 2h nakon obroka u Cx-u dolazi do pada izražaja UGN-a dok u Ht-u dolazi do porasta (Slika 29.).

Na mRNA razini *i.c.v.* primjena inzulina već pri dozama od 0,1 mU 2 h nakon primjene dovodi do smanjenja izražaja UGN-a u Cx-u. Pad izražaja UGN-a se može primijetiti i u Ht-u (Slika 29.). Kontrola *i.c.v.* primjene inzulina provedena je određivanjem koncentracije glukoze u krvi i likvoru (259).

5.2. Urogvanilin mijenja membranski potencijal i frekvenciju izbivanja Purkinjeovih stanica malog mozga

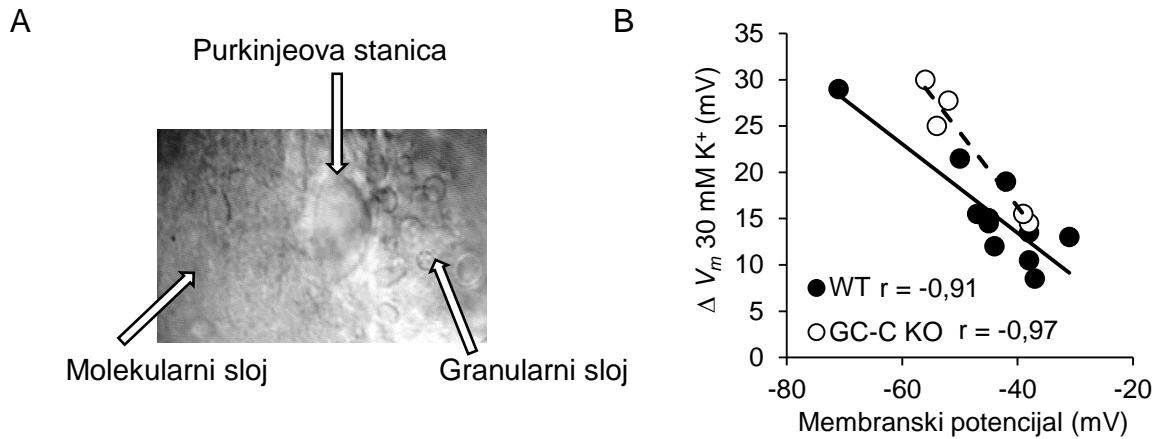
Kako većina Purkinjeovih stanica Cb-a izražavaju GC-C, učinak UGN-a putem ovog receptora procijenjen je upravo na ovim neuronima. Purkinjeove stanice se nalaze između molekularnog i granularnog sloja kore Cb-a te su lako prepoznatljive po svojoj veličini (Slika 12. i 30.).



Slika 29. Promjene izražaja urogvanilina nakon primjene inzulina intracerebroventrikularno. Na proteinskoj razini 2 h nakon primjene 10 mU inzulina dolazi do pada izražaja urogvanilina (UGN) u kori velikog mozga (zeleno) te porasta u hipotalamusu (crveno), dok u malom mozgu ne dolazi do promjene (plavo) (A). Izvorne *Western blot* membrane te kontrola primjene inzulina mjerenjem promjene koncentracije glukoze u krvi i likvoru prikazane su na B. Na razini mRNA, u kori velikog mozga i hipotalamusu dolazi do pada izražaja mRNA za UGN 2h nakon primjene inzulina od 0,1 i 1 mU. Kontrola primjene inzulina procijenjena je određivanjem glukoze u krvi i likvoru (C).

Učinak UGN-a na funkciju Purkinjeovih stanica istražen je na malom mozgu WT te GC-C KO životinja. Početni membranski potencijal ovih neurona nije se razlikovao kod WT i GC-C KO životinja (WT: $-42,5 \pm 4,3$ mV; GC-C KO: $-41,2 \pm 4,6$ mV, rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm SE). Vijabilnost stanica te sposobnost izbivanja

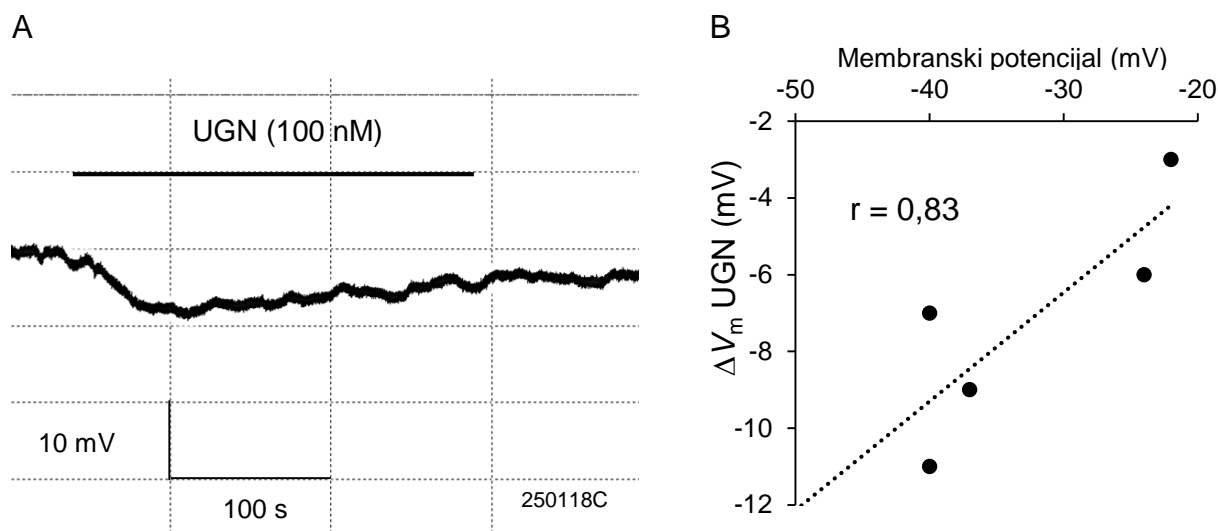
akcijskih potencijala procijenjena je depolarizacijskim učinkom 30 mM K⁺ (Slika 30.) koji je u negativnoj korelaciji sa vrijednostima početnog membranskog potencijala (WT: $r = -0,91$; GC-C KO: $r = -0,97$).



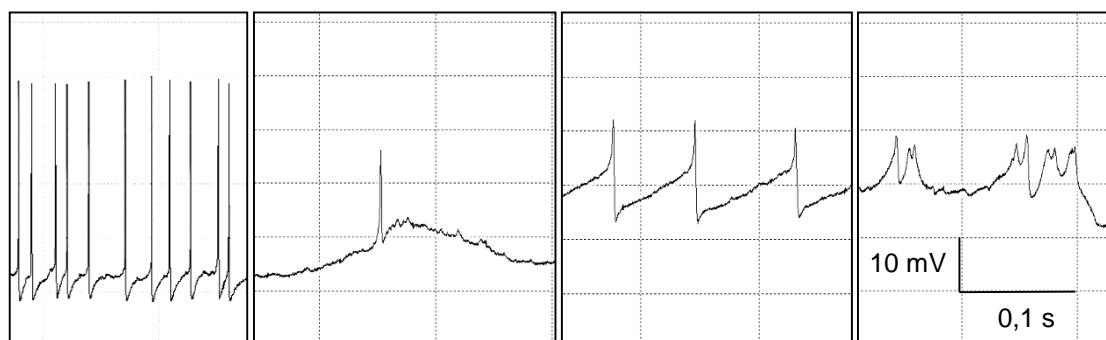
Slika 30. Smještaj i procjena vijabilnosti Purkinjeovih stanica. Purkinjeove stanice se nalaze u kori malog mozga između granularnog i molekularnog sloja te su lako prepoznatljive zbog svoje veličine (A). Vijabilnost stanica procijenjena je depolarizacijskim učinkom 30 mM K⁺ koji je u negativnoj korelaciji s veličinom membranskog potencijala (B).

Djelovanje UGN-a (100 nM) na Purkinjeove stanice odredili smo učinkom na početni membranski potencijal stanica te amplitudu i frekvenciju izbijanja akcijskih potencijala. UGN dovodi do hiperpolarizacije stanica kod WT životinja, ali ne i kod GC-C KO životinja (WT: $-7,2 \pm 1,4$ mV, $n = 5$; GC-C KO: $1,6 \pm 1,7$ mV, $n = 4$, $p < 0,05$ statistički značajna razlika učinka, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE). Upravo ovaj učinak UGN-a kod WT životinja je u pozitivnoj korelaciji s početnim membranskim potencijalom (Slika 31.).

Postoji više vrsta spontanog izbijanja (ili izbijanja potaknutog kalijem) Purkinjeovih stanica (Slika 32.). U odnosu na izbijanja kod WT životinja, izbijanja akcijskih potencijala Purkinjeovih stanica GC-C KO životinja su jednakih amplituda, ali nižih frekvencija (amplituda: WT: $5,0 \pm 0,6$ mV, $n = 16$; GC-C KO: $4,9 \pm 1,9$ mV, $n = 4$; frekvencija: WT: $13,7 \pm 1,1$ Hz, $n = 16$; GC-C KO: $6,5 \pm 1,0$ Hz, $n = 4$, $p < 0,05$ statistički značajna razlika u frekvenciji izbijanja Purkinjeovih stanica WT i GC-C KO životinja, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE). Kako UGN hiperpolarizira stanicu pretpostavili smo djelovanje UGN-a i na frekvenciju izbijanja Purkinjeovih stanica.

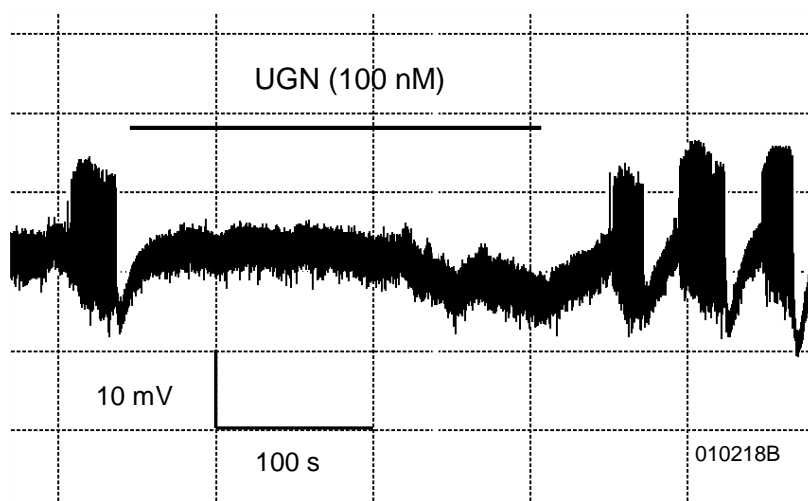


Slika 31. Urogvanilin hiperpolarizira Purkinjeove stanice malog mozga. A: izvorni zapis, B: učinak UGN-a (100 nM) je u pozitivnoj korelaciji s osnovnim membranskim potencijalom.



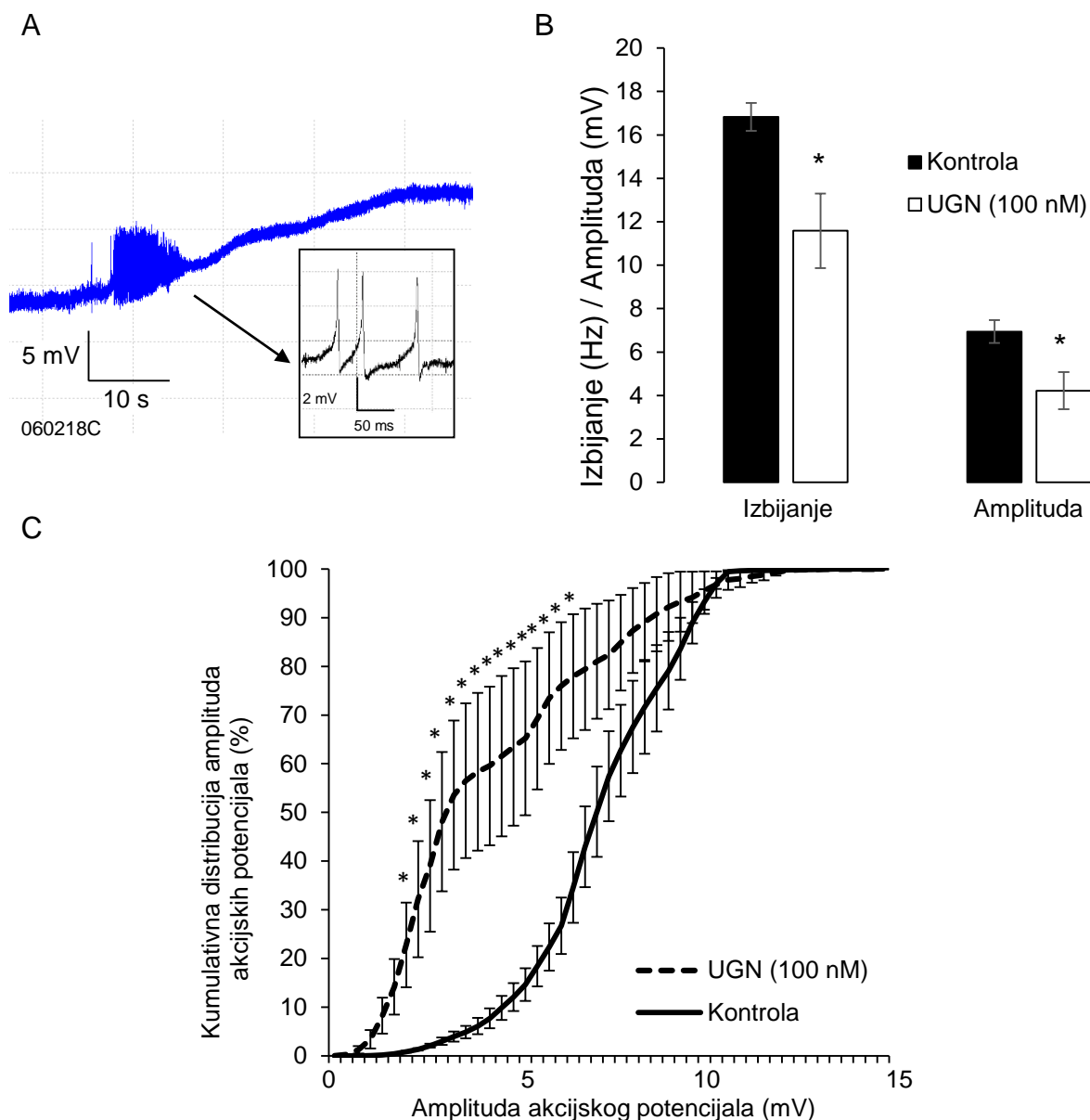
Slika 32. Različiti oblici izbijanja Purkinjeovih stanica malog mozga. Svi prikazi su izvorni zapisi s jednakim skalama potencijala i vremena.

Djelovanje UGN-a je procijenjeno na sve spomenute vrste izbijanja. Kako se može primijetiti na izvornom zapisu, pod djelovanjem UGN-a te posljedične hiperpolarizacije, dolazi do prestanka spontanog izbijanja (Slika 33. izvorni zapis). Nakon prestanka djelovanja UGN-a prvo spontano izbijanje ima smanjenu amplitudu u odnosu na ona koje slijede.



Slika 33. Djelovanje urogvanilina na spontana izbijanja Purkinjeovih stanica malog mozga. Urogvanilin (UGN, 100 nM) dovodi do hiperpolarizacije Purkinjeovih stanica te prestanka spontanog izbijanja.

Učinak UGN-a na izbijanje Purkinjeovih stanica proučavano je i na izbijanjima potaknutim s 30 mM K^+ u aCSF-u (Slika 34A). UGN je pritom smanjio frekvenciju izbijanja akcijskih potencijala. Razlika u frekvenciji izbijanja može nastati zbog različitih početnih potencijala, ali se oni nisu razlikovali (kontrola: $-39,0 \pm 0,4$ mV, $n = 6$, UGN (100 nM): $-38,8 \pm 0,9$ mV, $n = 8$, rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm SE) (Slika 34B). UGN također smanjuje i amplitude akcijskih potencijala te se na zbirnom prikazu može primijetiti da je učinak UGN-a pojava akcijskih potencijala s nižom amplitudom (statistička značajnost pri amplitudama od 1,95 do 6,15 mV - Slika 34C). Ovi učinci UGN-a nisu vidljivi kod GC-C KO životinja.



Slika 34. Učinak urogvanilina na izbijanje akcijskih potencijala Purkinjeovih stanica. Pod 30 mM K^+ membrana Purkinjeovih stanica depolarizira te izbija akcijske potencijale (A). Umetak prikazuje akcijske potencijale na uvećanoj skali. Urogvanilin (UGN, 100 nM) smanjuje frekvenciju izbijanja te amplitudu akcijskih potencijala (B). Prikaz kumulativne distribucije amplitude akcijskih potencijala prikazuje veću pojavnost amplituda od 2 do 6 mV tijekom djelovanja UGN-a u odnosu na kontrolne vrijednosti (UGN, $n = 8$, kontrola, $n = 6$). * $p < 0,05$ statistički značajna razlika učinka UGN-a u odnosu na kontrolne vrijednosti. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE.

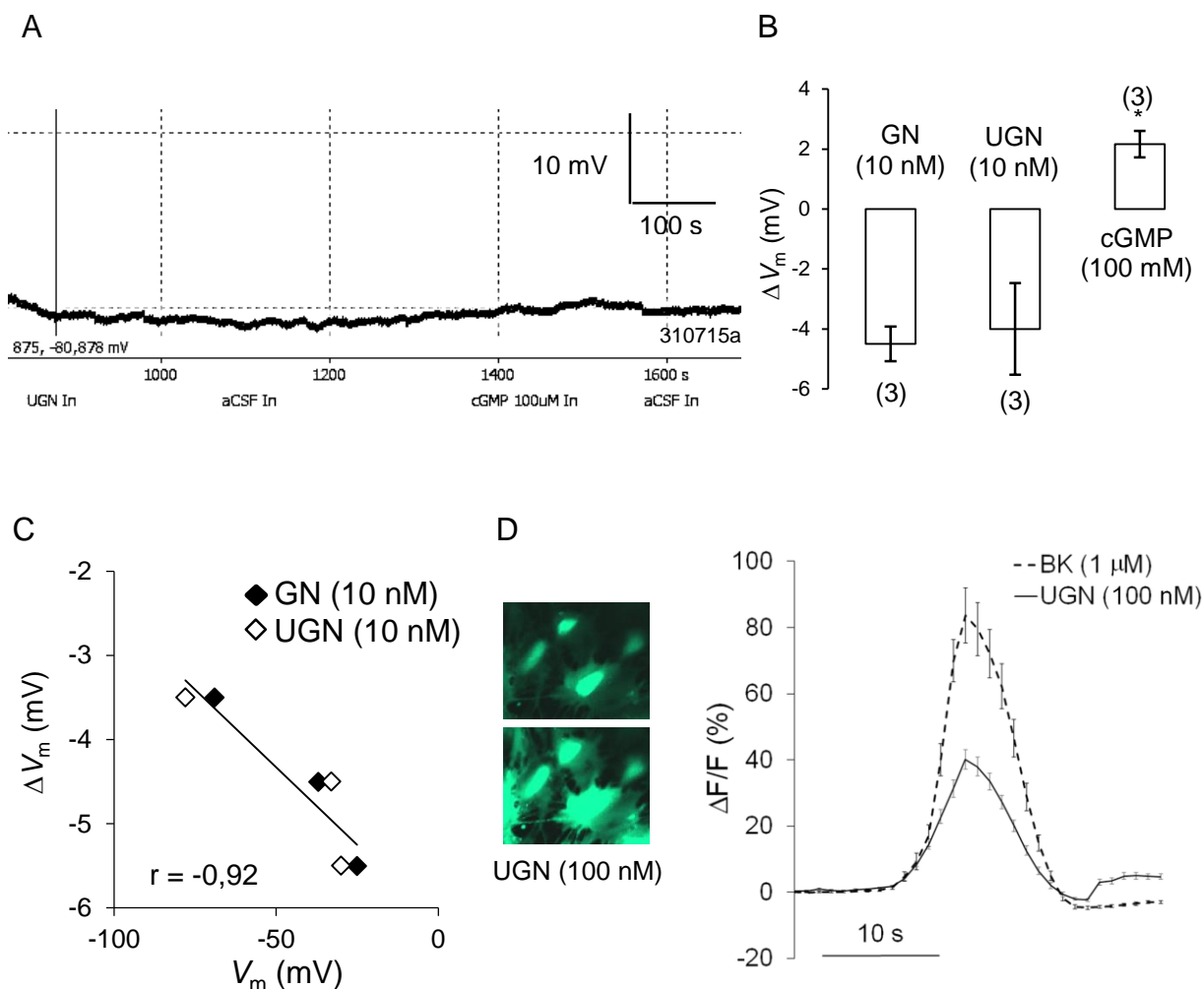
5.3. Signalni put urogvanilina u mozgu neovisan o gvanilat-ciklazi C/cGMP-u

5.3.1. Primarna kultura astrocита

U crijevima su identificirane dvije skupine veznih mjesta za GP-e: receptori koji posjeduju visoki afinitet i nisu vezani uz gvanilat-ciklaznu aktivnost (5% veznih mjesta) te vezna mjesta niskog afiniteta vezana uz gvanilat-ciklaznu aktivnost (95% veznih mjesta) (260). Djelovanje upravo GN-a i UGN-a na membranski potencijal astrocита u primarnoj kulturi upućuje na postojanje signalnog puta neovisnog o GC-C/cGMP-u i u ovim stanicama. Naime, dok GN i UGN (10 nM) hiperpolariziraju, analog cGMP-a koji prolazi kroz staničnu membranu, 8-Br cGMP (100 μ M), depolarizira staničnu membranu astrocита (Slika 35A izvorni zapis, B zbirni rezultati). Za razliku od učinka u Purkinjeovim stanicama, ovaj učinak GP-a na membranski potencijal astrocита je u negativnoj korelaciji s početnim membranskim potencijalom (Slika 35C).

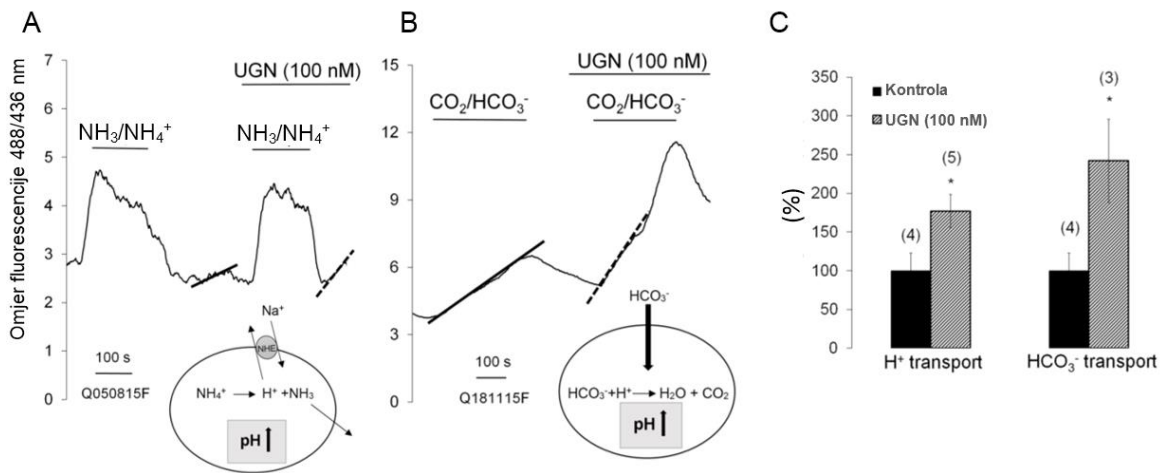
Do sada je pokazano da signalni put natriuretskih peptida neovisan o gvanilat-ciklaznoj aktivnosti pripada porodici receptora vezanih za G-proteine čijom aktivacijom dolazi do porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+} te aktivacije PKC (132,133,169). U skladu s time u astrocítima 100 nM UGN-a dovodi do porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+} . Bradikinin (1 μ M) je korišten kao pozitivna kontrola (Slika 35D).

Da bismo procijenili mogući stanični učinak GC-C/cGMP neovisnog, ali Ca^{2+} ovisnog signalnog puta, mjerili smo unutarstanični pH koristeći BCECF AM fluorescentnu boju. Učinak UGN-a na aktivnost NHE procijnilo smo koristeći amonijski puls (Slika 36A – izvorni zapis). Amonijak (NH_3) ulazi u stanicu gdje se veže za H^+ što dovodi do alkalinizacije stanice. Nakon uklanjanja amonijaka iz otopine unutarstanični NH_4^+ disocira na H^+ i NH_3 što zakiseljuje staničnu citoplazmu, ali je sad pH niži od početne vrijednosti. Da bi se stanica riješila viška H^+ aktivira NHE kao što je prikazano na shemi slike 36A. Upravo promjena pH u vremenu je mjera aktivnosti ovog izmjenjivača. Aktivnost NHE raste pod djelovanjem UGN-a (Slika 36C).



Slika 35. Signalni put urogvaniina neovisan o gvanilat-ciklazi C u primarnoj kulturi astrocita. A: izvorni zapis prikazuje hiperpolarizaciju astrocita u primarnoj kulturi na poticaj UGN-om (10 nM) dok istu stanicu 8 Br cGMP (cGMP, 100 μM) depolarizira. B: GN i UGN imaju jednaki učinak. U zagradi je prikazan broj pokusa. * p<0,05 označava statistički značajnu razliku učinka cGMP-a u odnosu na učinak GN-a i UGN-a. C: učinak GN-a (označen crno) i UGN-a (označen bijelo) su u negativnoj korelaciji s početnim membranskim potencijalom. D: UGN (100 nM) i bradikinin (BK 1 μM – pozitivna kontrola) dovode do porasta unutarstanične koncentracije Ca²⁺ astrocita mjerene fluorescentnom bojom Fluo-4 AM. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE. aCSF – likvor

Dodavanjem CO₂/HCO₃⁻ u otopinu kojom su perfundirane stanice dolazi do ulaska HCO₃⁻ u stanicu te se stanica pritom alkalinizira (Slika 36B). Pod djelovanjem 100 nM UGN-a ovaj transport HCO₃⁻ je gotovo 2,5 puta veći (Slika 36C).

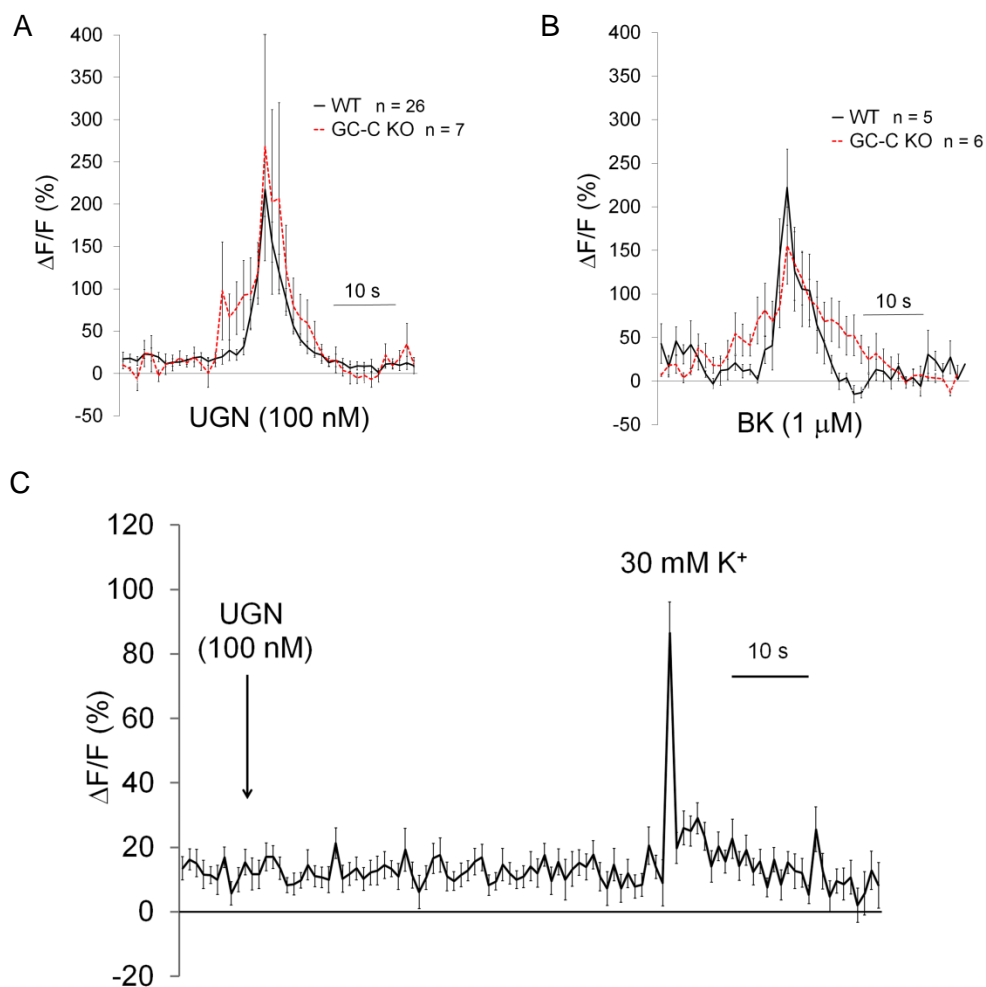


Slika 36. Urogvanilin aktivira transport H⁺ i HCO₃⁻. A: amonijski puls (shema prikazuje učinak uklanjanja NH₃), B: transport HCO₃⁻ (shema predstavlja učinak izlaganja stanica CO₂/HCO₃⁻) mjereno upotrebom BCECF AM fluorescentne boje C: ukupni rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE. Broj pokusa je prikazan u zagradi. * p<0,05 označava statistički značajnu razliku učinka UGN-a u odnosu na kontrolne vrijednosti. NHE - Na⁺/H⁺ izmjenjivač

5.3.2. Astrociti kore velikog i malog mozga

Da bismo uočili moguću razliku u aktivaciji signalnog puta neovisnog o GC-C/cGMP-u u astrocitima različitih moždanih regija, mjerili smo promjenu unutarstanične koncentracije Ca²⁺ u kori velikog i malog mozga. U ovu svrhu koristili smo dvije fluorescentne boje, Fluo-4 AM koja je specifičnija za astrocite, te Oregon Green™ 488 BAPTA AM za neurone.

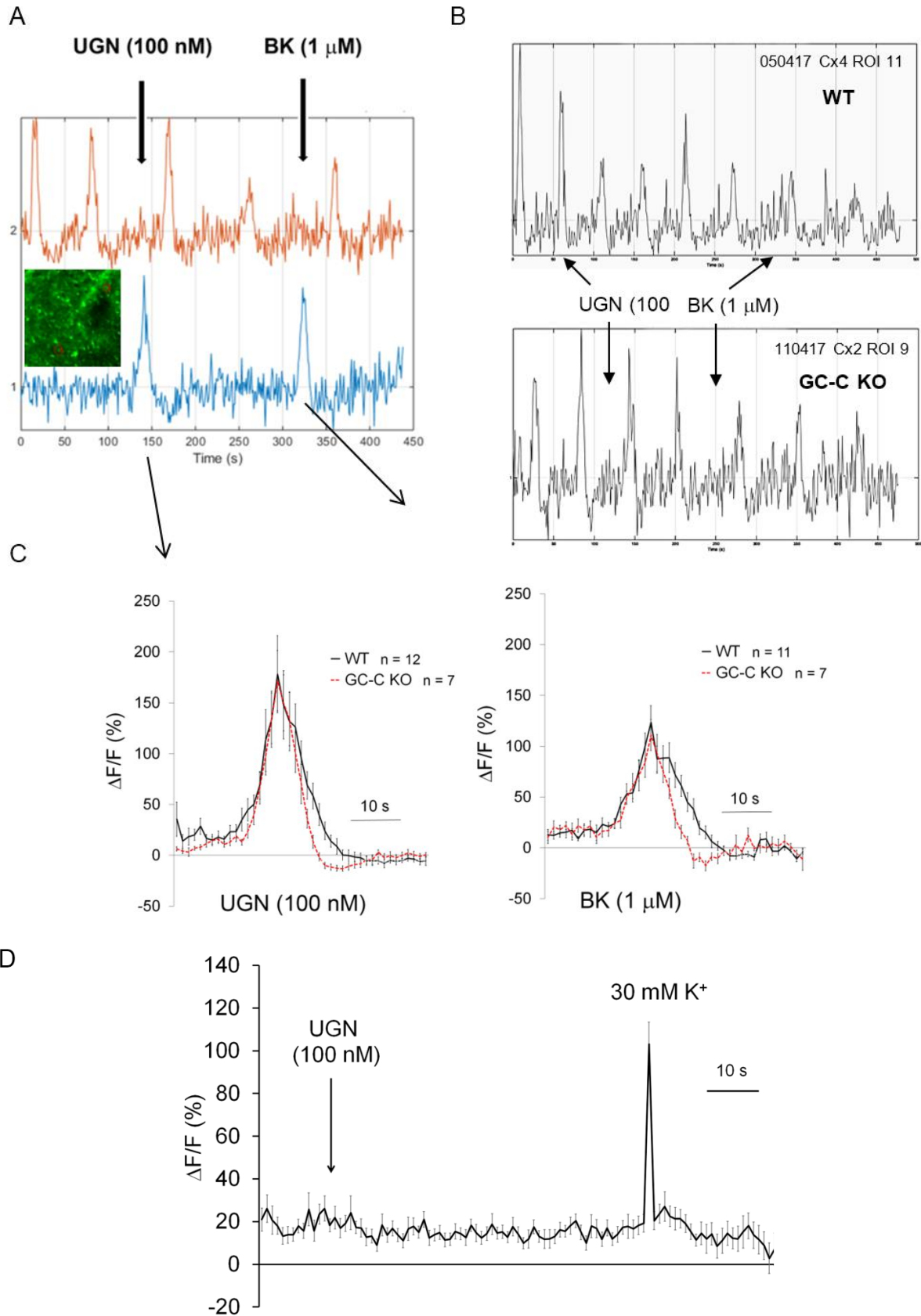
U astrocitima kore malog mozga UGN (100 nM) dovodi do porasta unutarstanične koncentracije Ca²⁺. Ovaj signalni put je neovisan o aktivaciji GC-C jer su slični rezultati dobiveni i na moždanim rezovima GC-C KO miševa (Slika 37A). U ovim pokusima BK (1 μM) je korišten kao pozitivna kontrola (Slika 37B). Kada smo moždane rezove inkubirali u Oregon Green™ 488 BAPTA AM koja je specifičnija za neurone, tada je i učinak UGN-a na promjenu unutarstanične koncentracije Ca²⁺ izostao. Ovdje je kao pozitivna kontrola korištena hiperkalijemija od 30 mM K⁺ koja dovodi do izbijanja akcijskih potencijala (kao je već opisano ranije) te posljedičnog porasta unutarstanične koncentracije Ca²⁺ (Slika 37C).



Slika 37. Signalni put urogvanilina ovisan o Ca^{2+} u astrocitima kore malog mozga. Učinak urogvanilina (UGN) (A) i bradikinina (BK, B) na astroците kore malog mozga divljeg tipa (WT) životinja (crna linija, $N = 8$) i životinja kojima nedostaje GC-C (GC-C KO, crvena linija, $N = 5$), ali ne i na neurone (C, $n = 23$, $N = 7$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE.

U Cx-u primijetili smo postojanje 2 tipa astrocita ovisno o obliku promjene unutarstanične koncentracije Ca^{2+} (Slika 38A). Jedan tip posjeduje spontane oscilacije unutarstanične koncentracije Ca^{2+} (Slika 38B) te ne postoji razlika u učestalosti izbijanja u 1. sloju Cx u odnosu na sloj 2/3 (WT: sloj 1: $0,82 \pm 0,06/\text{min}$, $n = 7$, sloj 2/3: $0,70 \pm 0,05/\text{min}$, $n = 15$). U GC-C KO životinja također su zabilježene spontane oscilacije koje se nisu razlikovale u odnosu na WT životinje (GC-C KO: sloj 1: $0,80 \pm 0,06/\text{min}$, $n = 17$, sloj 2/3: $0,84 \pm 0,06/\text{min}$, $n = 11$, rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm SE). U drugom tipu stanica dolazi do porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+} na poticaj UGN-om i BK-om (Slika 38C), slično kao u kori Cb-a. Nema značajne razlike u odgovoru između WT i GC-C KO životinja. Odgovor na hormone, a ni

oscilacije nisu primijećene kad smo koristili boju specifičnu za neurone upravo potvrđujući postojanje spontanijh oscilacija u samim astrocitima (Slika 38D).



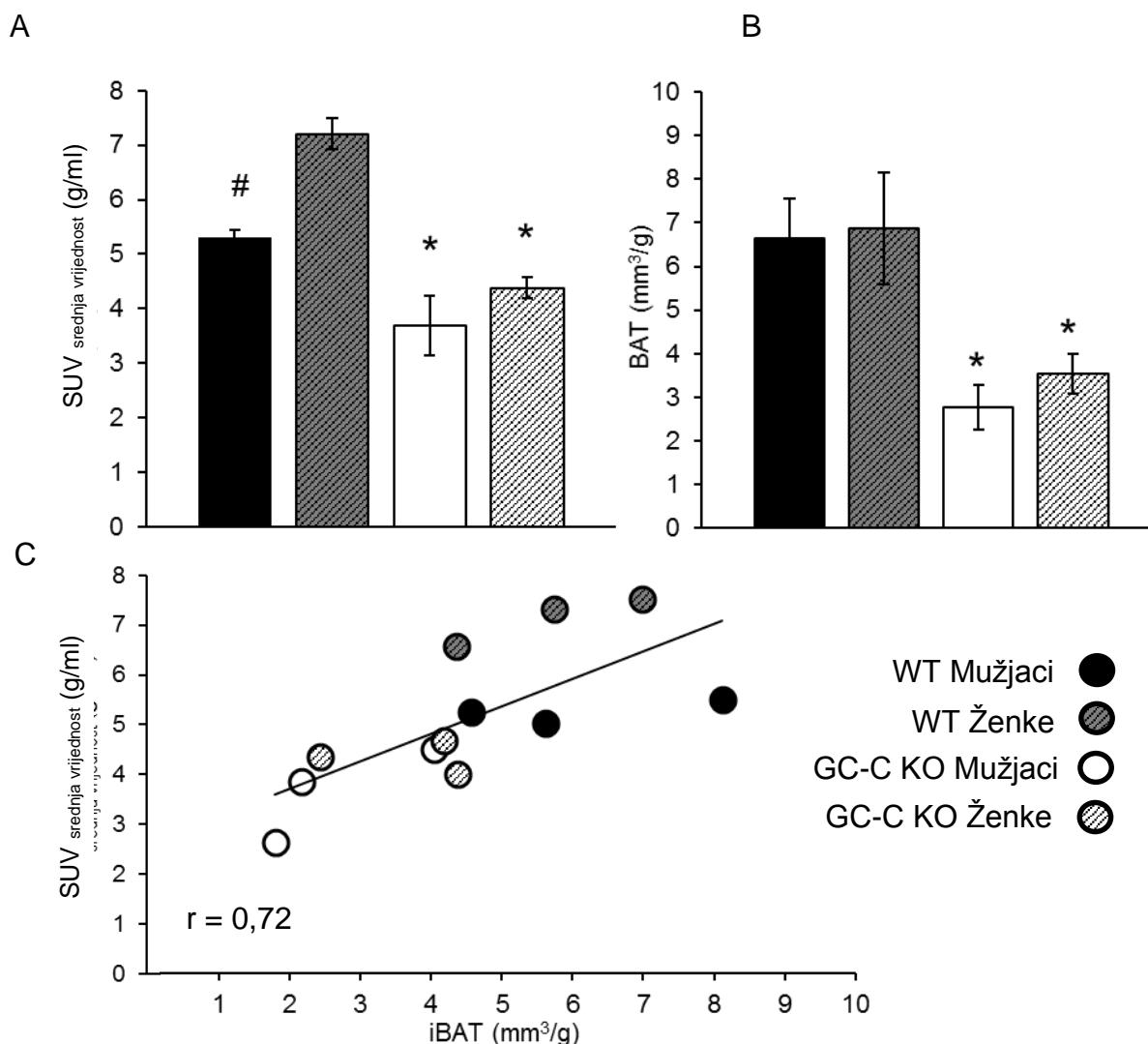
Slika 38. Signalni put urogvanilina ovisan o Ca^{2+} u astrocitima kore velikog mozga. U kori velikog mozga postoje 2 tipa astrocita, oni koji odgovaraju na poticaj urogvanilinom (UGN) i bradikininom (BK) te astrociti koji pokazuju spontane oscilacije unutarstanične koncentracije Ca^{2+} (A – izvorni zapis, umetnuta slika prikazuje analizirane stanice). Astrociti koji prikazuju spontane oscilacije ne pokazuju odgovor na poticaj UGN-om (100 nM) niti BK-om (1 μM) kako u divljem tipu (WT) tako ni kod životinja kojima nedostaje GC-C (GC-C KO) (B). UGN i BK (C) dovode do porasta koncentracije unutarstaničnog Ca^{2+} u astrocitima kore velikog mozga WT životinja (crna linija, N = 9) i GC-C KO životinja (crvena linija, N = 10). U neuronima nisu opaženi učinci UGN-a niti spontane oscilacije (D, n = 23, N = 7). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE.

5.4. Učinak gvanilat-ciklaze C na volumen i aktivnost smeđeg masnog tkiva

5.4.1. Volumen i aktivnost smeđeg masnog tkiva nakon hlađenja

Budući da je nedavno pokazano da *i.c.v.* promjena UGN-a dovodi do pretvorbe WAT-a u BAT (226), željeli smo utvrditi može li se kod GC-C KO životinja volumen BAT-a i aktivnost BAT-a potaknuti hladnoćom. Aktivnost BAT-a procijenjena je PET CT-om, a volumen mjerenjima MR-om.

Iako kod GC-C KO životinja dolazi do porasta aktivnosti iBAT-a potaknutog hladnoćom, ona je u odnosu na aktivnost kod WT životinja snižena. Također se može primijetiti da je razlika u porastu aktivnosti iBAT-a ovisna o spolu. Dok je aktivnost iBAT-a kod WT ženki viša u odnosu na WT mužjake, ova razlika ne postoji kod ženki GC-C KO miševa u odnosu na GC-C KO mužjake (Slika 39A). Smanjena aktivnost iBAT-a kod GC-C KO miševa nastala je zbog toga što ove životinje imaju smanjen volumen iBAT-a u odnosu na WT miševe (Slika 39B) te su aktivnost i volumen iBAT-a u pozitivnoj korelaciji (Slika 39C).

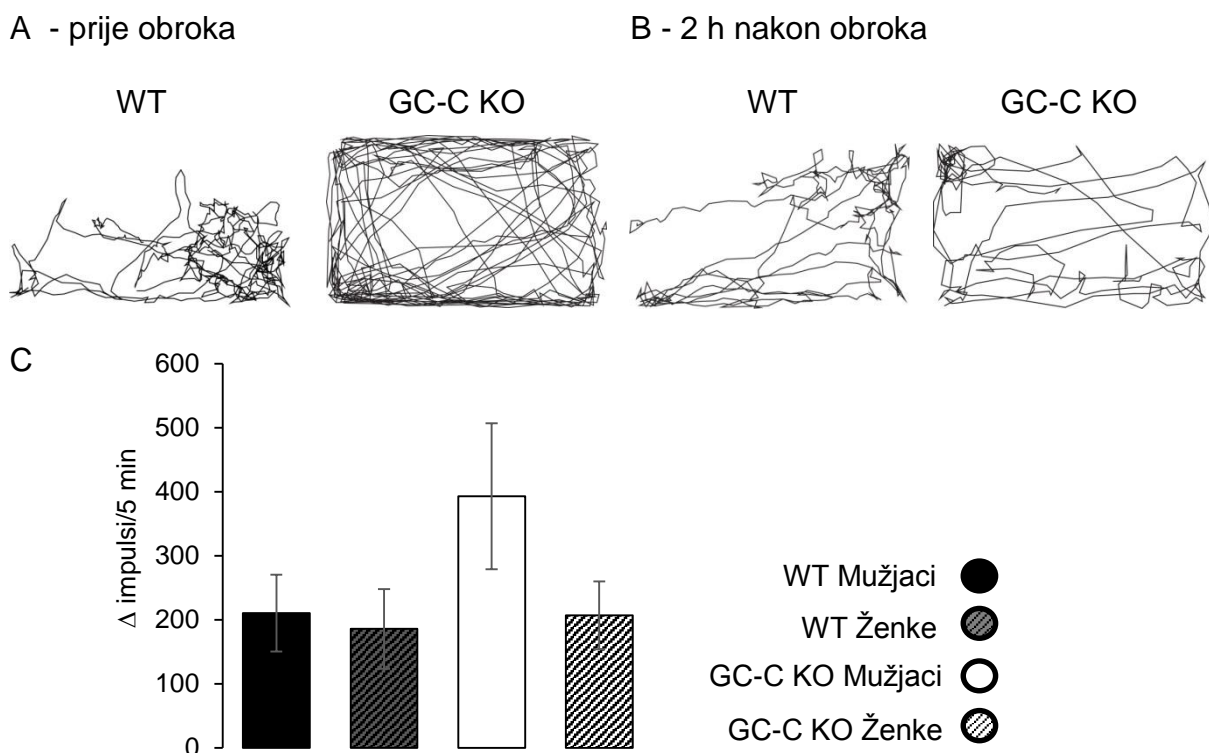


Slika 39. Aktivnost i volumen interskapularnog smeđeg masnog tkiva smanjeni su kod životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C. Razlike u aktivnosti interskapularnog smeđeg masnog tkiva (iBAT) potaknute hladnoćom (A, n = 3) i volumen iBAT-a (B, n = 4) kod divljeg tipa (WT) i životinja kojima nedostaje GC-C (GC-C KO) su u pozitivnoj korelaciji (C). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE. * p<0,05 - označava statistički značajnu razliku između WT i GC-C KO životinja. # p<0,05 označava statistički značajnu razliku između mušjaka i ženki. SUV - standardizirani unos

5.4.2. Nedostatak aktivnosti smeđeg masnog tkiva i termogeneze uzrokovane hranom kod ženki divljeg tipa te životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C

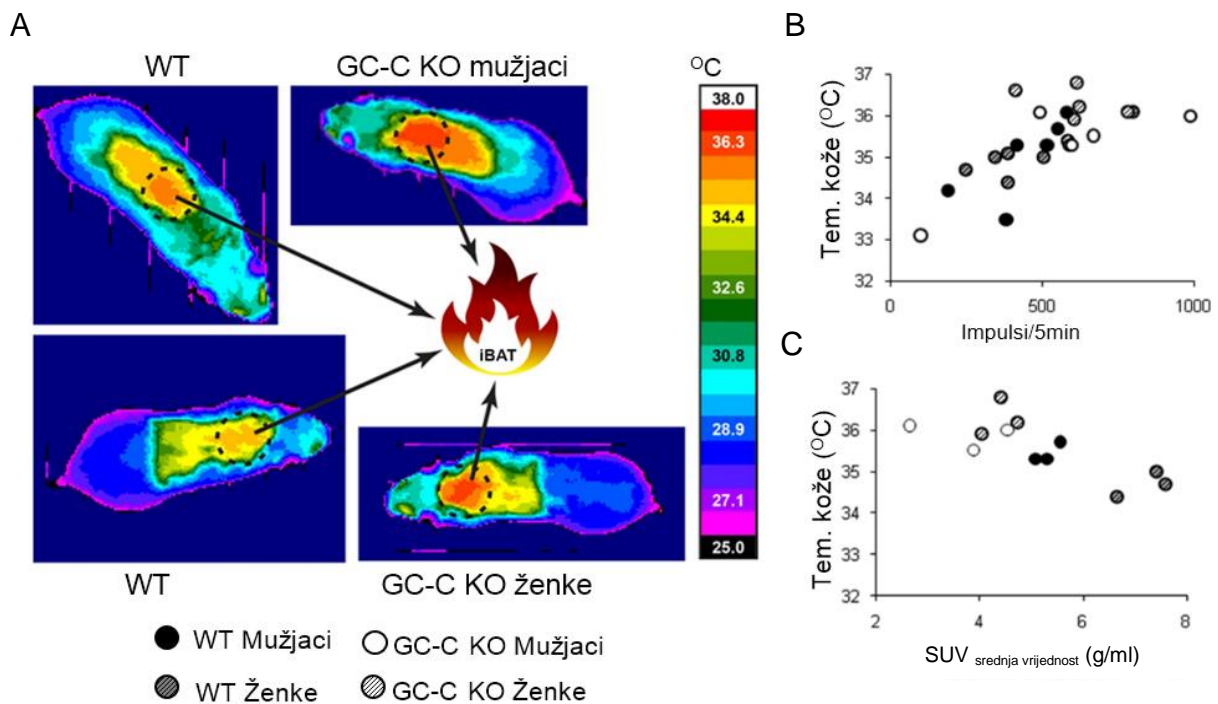
Tjelesna toplina nastaje zbog potrošnje energije bazalnim metabolizmom, mišićnom aktivnošću te nakon obroka. Poznato je da su GC-C KO životinje aktivnije od WT životinja te upravo zbog toga procjena DIT-a mjerenjem tjelesne temperature nije moguća. Prije obroka, GC-C KO životinje su u odnosu na WT životinje aktivnije

(WT: 440 ± 47 ; GC-C KO: 630 ± 45 impulsa/5 min, $n = 12$, statistički značajna razlika na razini $p < 0,05$, rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm SE) te se aktivnost nakon obroka smanjuje (WT: 242 ± 15 ; GC-C KO: 354 ± 48 impulsa/5 min, $n = 12$, statistički značajna razlika na razini $p < 0,05$, rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm SE). Dok su sve životinje imale podjednako smanjenje aktivnosti nakon obroka to smanjenje je gotovo dvostruko bilo više kod GC-C KO mužjaka u odnosu na ostale životinje (Slika 40.). Zbog toga ne iznenađuje da je upravo temperatura kože mjerena termalnom kamerom bila viša kod gladnih GC-C KO u odnosu na WT životinje (WT: $35,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$, GC-C KO: $35,9 \pm 0,2^\circ\text{C}$, $n = 12$, statistički značajna razlika na razini $p < 0,05$, rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm SE). TT GC-C KO životinja prije obroka više ovisi o njihovoj mišićnoj aktivnosti, dok kod WT životinja TT više ovisi o aktivnosti iBAT-a (Slika 41.).



Slika 40. Mišićna aktivnost divljih tipova i životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C prije te 2 h nakon obroka. Prikazani su izvorni zapisi kretanja muških životinja u trajanju od 5 min prije obroka (A), nakon obroka (B) te njihova razlika (C). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE, $n = 6$. WT - divlji tip životinja, GC-C KO - životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C (GC-C)

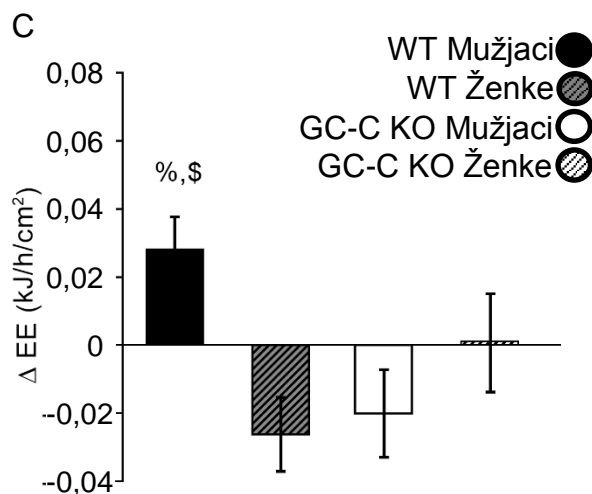
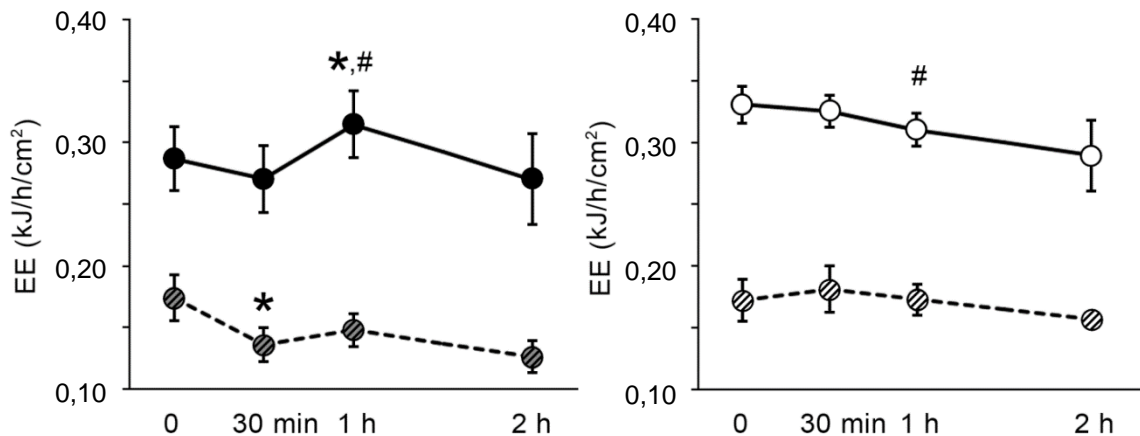
Zbog svega navedenog, DIT je određen potrošnjom energije prije te 30 min, 1 i 2 sata nakon obroka. Količina unesene hrane nije se razlikovala između ispitivanih skupina životinja. Prije obroka EE je bila statistički značajno niža kod ženki (WT: $0,174 \pm 0,019$ kJ/h/cm²; GC-C KO: $0,172 \pm 0,017$ kJ/h/cm², n = 6) nego kod mužjaka (WT: $0,286 \pm 0,026$ kJ/h/cm²; GC-C KO: $0,331 \pm 0,015$ kJ/h/cm², n = 6, rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm SE) dok potrošnja nije bila statistički značajno različita između genotipova. 30 min nakon obroka kod WT ženki dolazi do smanjenja potrošnje koja nije zamijećena kod WT mužjaka. Sat vremena nakon obroka dolazi do termogeneze uzrokovane hranom, ali samo kod mužjaka WT životinja (Slika 42A i B). Ovaj porast potrošnje nije bio zamijećen niti kod WT ženki niti kod GC-C KO životinja oba spola. Dapače, kod GC-C KO mužjaka došlo je do pada potrošnje sat vremena nakon obroka u odnosu na potrošnju nakon 30 min vjerojatno zbog izraženijeg smanjenja mišićne aktivnosti. Kada usporedimo promjenu EE prije i 1 sat nakon obroka, statistički značajan porast se pojavljuje samo kod mužjaka WT životinja (Slika 42C).



Slika 41. Životinje kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C imaju povišenu tjelesnu temperaturu zbog povećane tjelesne aktivnosti. A: izvorna snimka prije obroka. Životinje kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C (GC-C KO) toplije su od divljeg tipa (WT) životinja. Označena područja pokazuju kožu iznad interskapularnog smeđeg masnog tkiva (iBAT). B: korelacija prosječne temperature kože (ne uključujući kožu iznad iBAT-a) te aktivnost životinja. C: korelacija između temperature kože i aktivnosti BAT-a nakon izlaganja hladnoći.

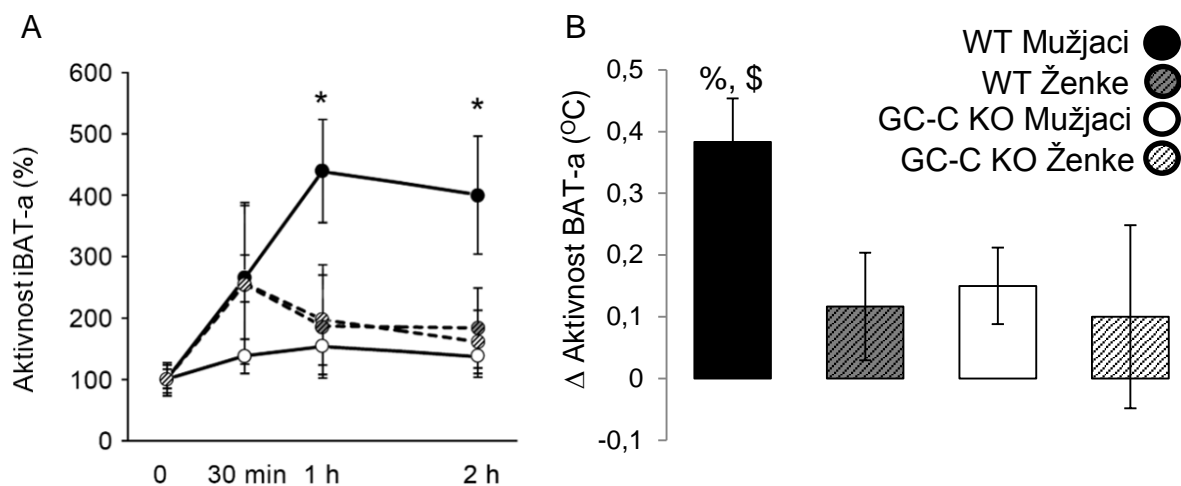
A

B



Slika 42. Promjene potrošnje energije nakon obroka. A: divlji tip (WT) životinja, B: životinje kojima nedostaje gvanilatciklaza C (GC-C KO), * $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na vrijednosti prije obroka, # $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na vrijednosti 30 min nakon obroka. C: razlike u potrošnji energije (EE) prije i 1 h nakon obroka pokazuju promjenu jedino u WT mužjaka. % $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na GC-C KO mužjake, \$ $p < 0,05$ statistički značajna razlika u odnosu na WT ženke. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE, $n = 6$.

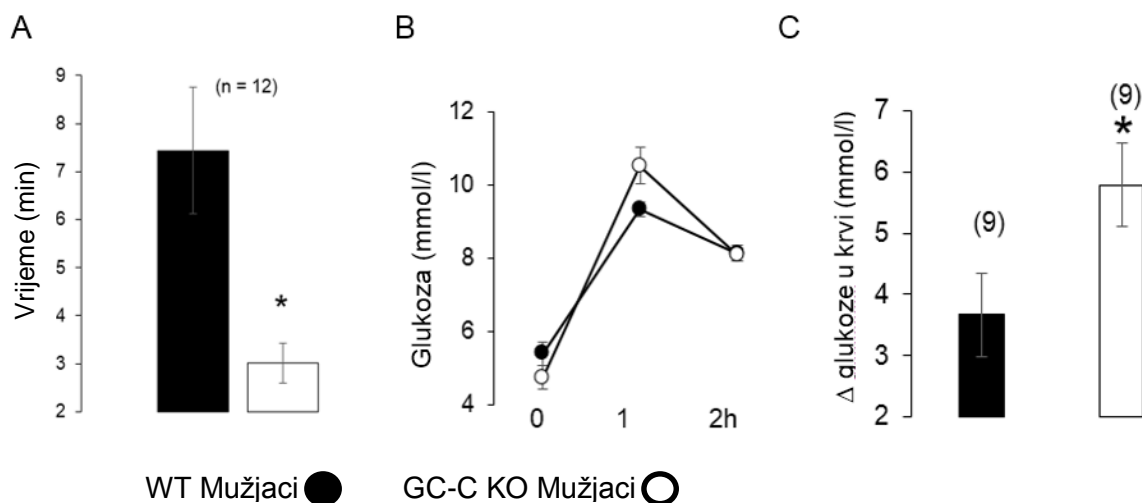
Da bismo odredili ulogu BAT-a u DIT-u, mjerili smo aktivnost BAT-a termalnom kamerom (IR). Tijekom ovog postupka ne dolazi se u kontakt sa životinjom te se izbjegava stres, jedan od ključnih aktivatora BAT-a. Količina unesene hrane nije se razlikovala između ispitivanih skupina životinja. Nakon neznatnog porasta aktivnosti BAT-a 30 min nakon obroka, aktivnost BAT-a nastavlja rasti jedino kod mužjaka WT životinja (Slika 43A) te se statistički značajno razlikuje 1 i 2 sata nakon obroka u odnosu na vrijednosti prije obroka. Ako stavimo u korelaciju aktivnost iBAT-a nakon obroka i aktivnost iBAT-a izazvanu hladnoćom, jedinu pozitivnu korelaciju ćemo zamijetiti kod WT mužjaka (WT mužjaci: $r = 0,99$, WT ženke: $r = 0,20$, GC-C KO mužjaci: $r = -0,17$, GC-C KO ženke: $r = -0,21$) što upućuje na značajnost aktivacije BAT-a nakon obroka jedino kod mužjaka WT životinja.



Slika 43. Porast aktivnosti interskapularnog smeđeg masnog tkiva nakon obroka. A: Aktivnost interskapularnog smeđeg masnog tkiva (iBAT) prije i nakon obroka * $p < 0,05$ - statistički značajna razlika u odnosu na vrijednosti prije obroka. B: razlike u iBAT aktivnosti prije i 1 h nakon obroka. % $p < 0,05$ - statistički značajna razlika u odnosu na mužjake kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C (GC-C KO). & $p < 0,05$ - statistički značajna razlika u odnosu na ženke divljeg tipa (WT). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE, $n = 6$.

5.5. Hipofagija uzrokovana novom okolinom

Osim u Ht-u, UGN i GC-C smo pronašli i u amigdali te nas je zanimalo imaju li GC-C KO životinje, osim razlike u mišićnoj aktivnosti, i promjene u reakciji na stresni podražaj. Testom hipofagije uzrokovane novom okolinom može se odrediti razina anksioznosti uzrokovane stresom mjereći vrijeme koje je potrebno da životinja počne jesti u novom okruženju. Upravo je GC-C KO životinjama potrebno upola manje vremena da počnu jesti hranu u odnosu na WT životinje pokazujući smanjenu anksioznost (Slika 44A). Tijekom ovog pokusa određivali smo i koncentraciju GUK-a nakon obroka. Iako se unos hrane u obje skupine životinja nije statistički značajno razlikovao (WT mužjaci: $0,59 \pm 0,11$ g, GC-C KO mužjaci: $0,68 \pm 0,08$ g, rezultati prikazani kao srednja vrijednost \pm SE, $n = 9$) porast koncentracije GUK-a kod GC-C KO životinja je bio viši u odnosu na WT životinja (Slika 44B).



Slika 44. Hipofagija uzrokovana novom okolinom. Životinjama kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C (GC-C KO) vrijeme potrebno za početak hranjenja u novoj okolini je 2,5 puta skraćeno (A). Koncentracije glukoze u krvi (GUK) prije te 1 i 2 sata nakon obroka se ne razlikuju između divljeg tipa (WT) i GC-C KO životinja (B), dok je porast GUK-a sat vremena nakon obroka viši kod GC-C KO životinja (C). * $p < 0,05$ - označava statistički značajnu razliku u odnosu na WT životinje. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE, broj pokusa je prikazan u zagradi.

5.6. Uloga smeđeg masnog tkiva u termogenezi uzrokovanoj hranom kod ljudi

Aktivacija BAT-a kod ljudi nakon obroka je još uvijek kontroverzna. Upotrebom nove metode za mjerenje aktivnosti BAT-a kod ljudi, IR, bili smo u mogućnosti odrediti aktivnost BAT-a kod svih ispitanika što do sada nije bilo moguće.

Na originalnim snimkama termalnom kamerom odabrali smo dvije zone interesa, područje kože vrata iznad BAT-a u supraklavikularnoj regiji te interklavikularnoj regiji koja ne sadrži BAT (Slika 20.).

5.6.1. Promjene aktivnosti smeđeg masnog tkiva ovisno o dobi i spolu

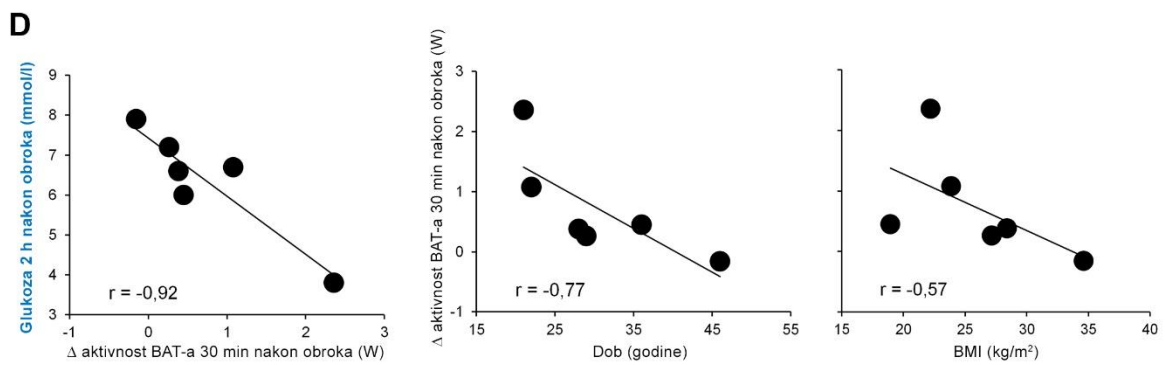
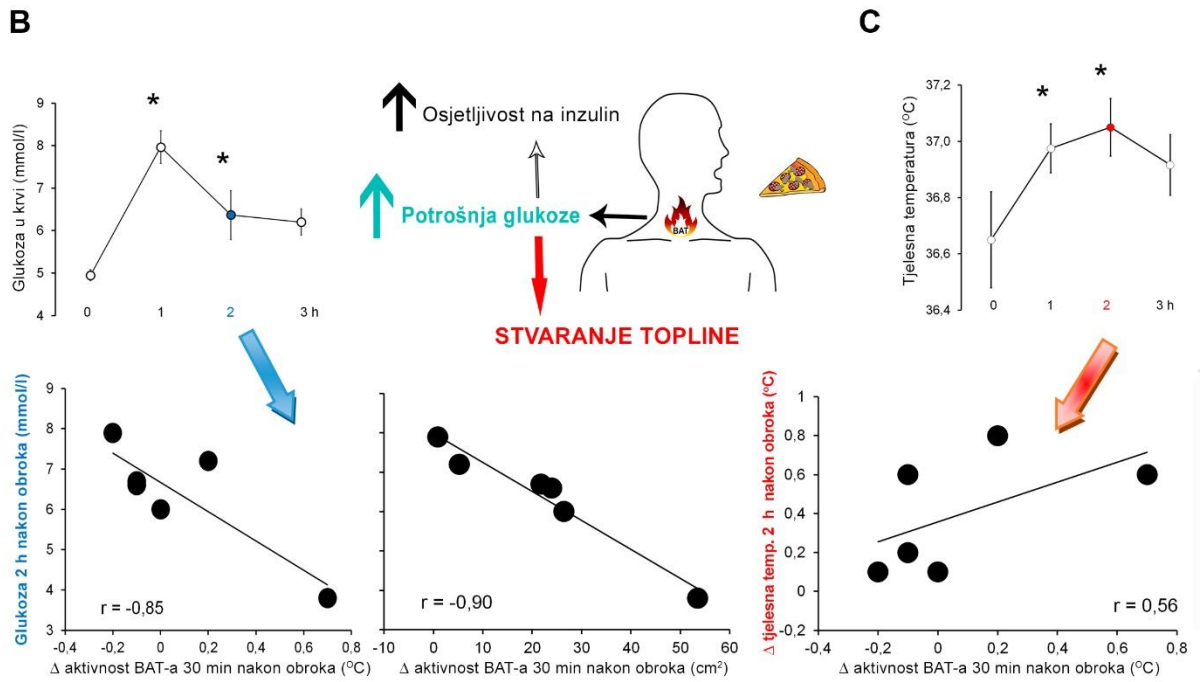
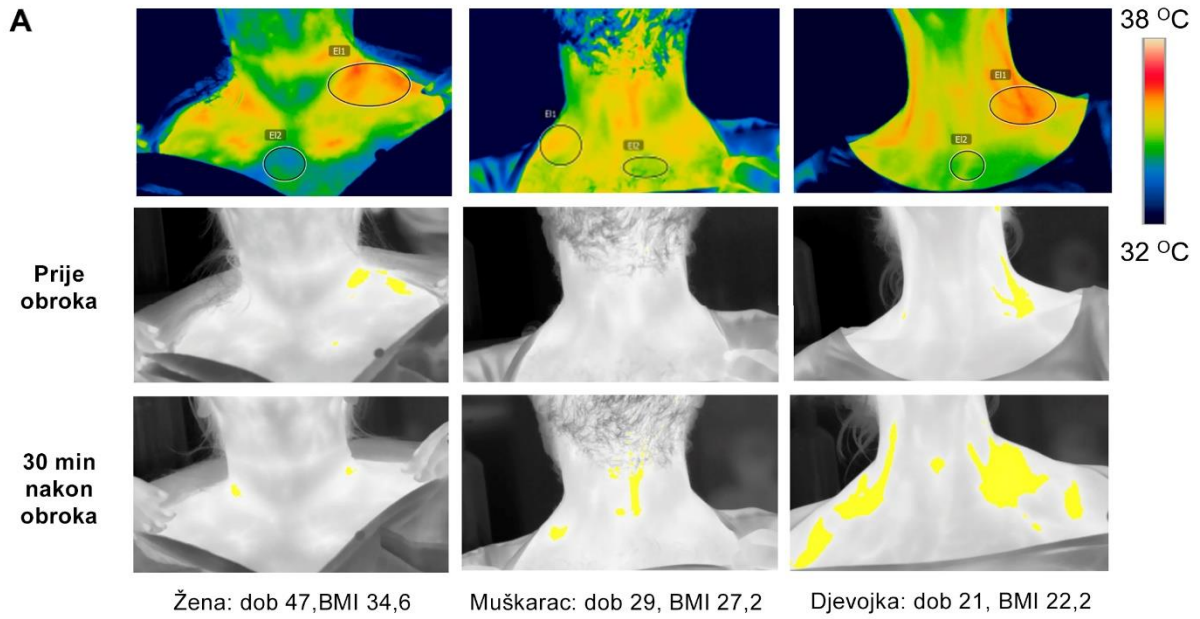
Odredili smo aktivnost BAT-a IR metodom (izvorne slike prikazane na slici 45A). Prije obroka BAT je zamijećen kod svih ispitanika. Aktivnost BAT-a određivali smo prije te 30 min, 1, 2 i 3 sata nakon obroka. Aktivnost BAT-a odredili smo razlikom u maksimalnoj temperaturi područja kože iznad BAT-a i referentnog područja. U tablici 8. prikazane su korelacije aktivnosti BAT-a nakon obroka s koncentracijom glukoze

nakon obroka. Upravo rana aktivacija BAT-a (30 min nakon obroka) je u izrazitoj negativnoj korelaciji sa koncentracijom GUK-a 2 h nakon obroka (Slika 45B, lijevo, $r = -0,85$, $p = 0,015$). I aktivnost i porast aktivnosti BAT-a 30 min nakon obroka u izrazitoj su negativnoj korelaciji i s povratkom glukoze na početne vrijednosti 2 h nakon obroka. Porast aktivnosti BAT-a 2 h nakon obroka u odnosu na vrijednosti natašte su u slaboj negativnoj korelaciji s povratkom glukoze nakon obroka na početne vrijednosti (Tablica 8.).

Tablica 8. Korelacije aktivnosti smeđeg masnog tkiva i koncentracije glukoze u krvi nakon obroka. Prikazane su r vrijednosti (Pearsonova korelacija).

Aktivnost BAT-a nakon obroka	Koncentracija glukoze nakon obroka		Razlika u koncentraciji glukoze 2 h nakon obroka u odnosu na:	
	2 sata	3 sata	natašte	1 sat nakon obroka
30 min	-0,80949	-0,12734	-0,81136	-0,97874
1 sat	0,226521	0,163198	0,152936	-0,33448
2 sata	0,078081	0,064449	0,02525	-0,38672
3 sata		-0,12513		
Razlika u aktivnosti BAT-a prije i nakon obroka				
30 min	-0,8541	-0,13528	-0,86085	-0,57084
1 sat	-0,16112	0,157485	-0,27821	-0,16139
2 sata	-0,48146	0,067625	-0,64443	-0,62006
3 sata		-0,20333		

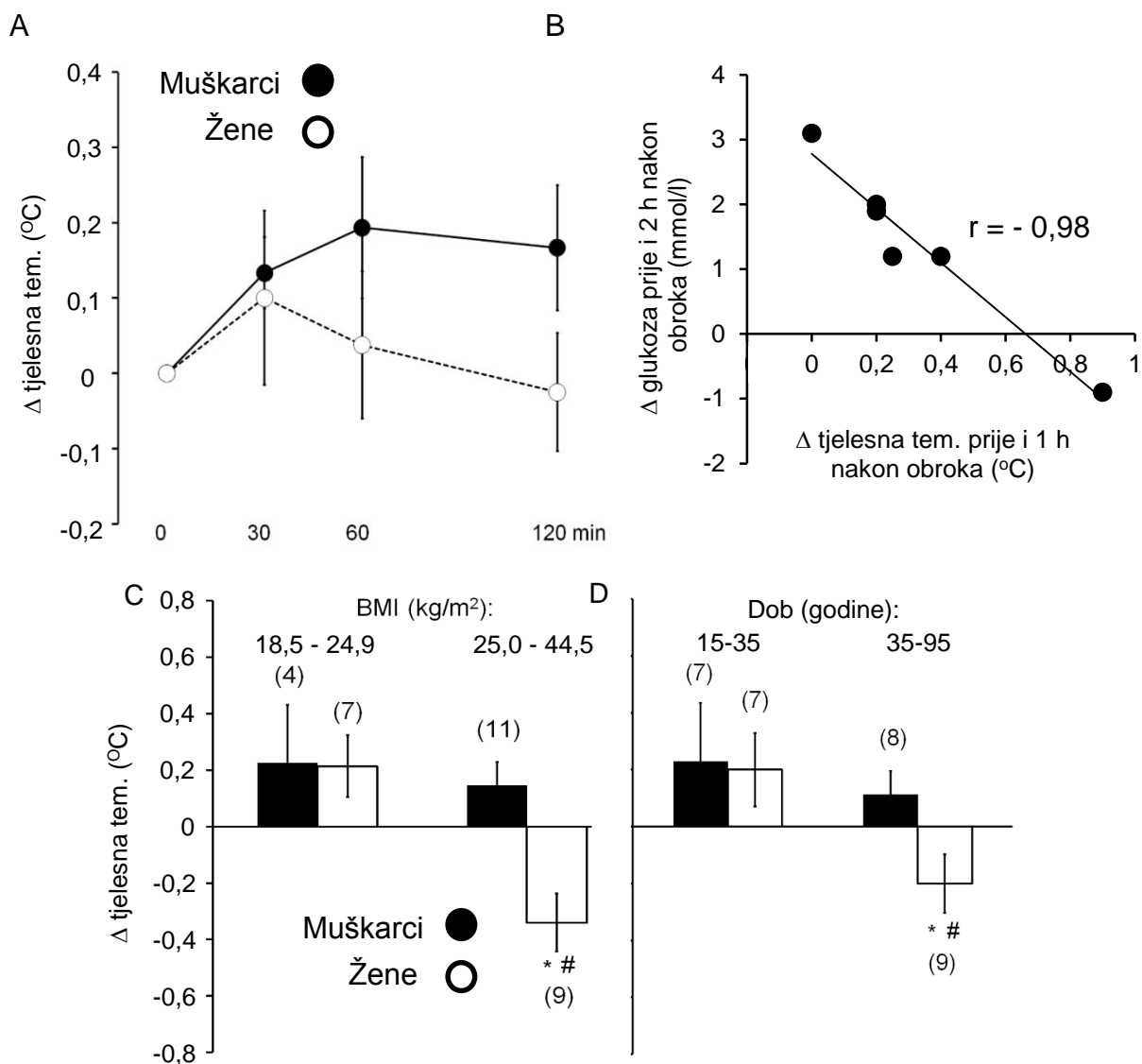
Označene su one r vrijednosti čiji je apsolutni iznos veći od 0,5.
BAT - smeđe masno tkivo



Slika 45. Promjena aktivnosti smeđeg masnog tkiva 30 min nakon obroka. Na izvornim slikama (A) prikazane su temperature kože vrata prije obroka (prvi niz slika). U drugom nizu slika prikazane su iste slike samo je područje kože toplije od 36°C označeno žutom bojom. Isto kodiranje bojom je primijenjeno i u donjem nizu slika koje su dobivene 30 min nakon obroka prikazujući porast aktivnosti BAT-a kod mlade žene i muškarca, ali smanjenje aktivnosti kod žene srednjih godina s povišenim indeksom tjelesne mase (BMI >25 kg/m²). Koncentracija glukoze u krvi (GUK) 2 h nakon obroka je u negativnoj korelaciji i s promjenama aktivnosti BAT-a (B) mjenim promjenom temperature (lijevo) i promjenom površine kože toplijom od 36°C (desno). Porast aktivnosti BAT-a povećava stvaranje topline (C - donja slika) što dovodi do porasta tjelesne temperature (C - gornja slika). Stvaranje topline (W) je ponovno u negativnoj korelaciji s koncentracijama GUK-a 2 h nakon obroka te dobi i BMI-u ispitanika. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SE. * p<0,05 - označava statistički značajnu razliku koncentracije GUK-a i tjelesne temperature u odnosu na vrijednosti prije obroka (modificirano prema (255)).

Kako najizraženiji učinak na koncentraciju glukoze nakon obroka ima porast aktivnosti 30 min nakon obroka, aktivnost BAT-a upravo u to vrijeme određivali smo na još dva načina. Kada oduzmemo veličinu površine kože iznad BAT-a toplije od 36°C (površina označena žuto na slici 45A) prije i 30 min nakon obroka ponovno zamjećujemo izrazito negativnu korelaciju s koncentracijom glukoze 2 sata nakon obroka (Slika 45B, sredina, $r = -0,90$, $p = 0,007$).

Aktivacija BAT-a nakon obroka znači utrošak glukoze te stvaranje topline što se primjećuje porastom TT. Porast aktivnosti BAT-a 30 min nakon obroka je u pozitivnoj korelaciji s porastom TT 1 sat ($r = 0,89$) te 2 sata nakon obroka (Slika 45C). Upravo ovu proizvodnju topline možemo izračunati ako uzmemo u obzir i površinu i promjenu temperature kože iznad BAT-a putem Stefan–Boltzmannovog zakona (258). Proizvodnja topline BAT-om je također u izrazito negativnoj korelaciji s koncentracijom GUK-a 2 sata nakon obroka (Slika 45D). Promjena aktivnosti BAT-a nakon obroka je ovisna o spolu, dobi i BMI-u. Pad aktivnosti BAT-a 30 min nakon obroka primijećen je kod žene srednje dobi s izrazito povišenim BMI-em, umjeren porast aktivnosti kod muškarca s umjerenom povišenim BMI-em, te najizraženiji kod žena mlađe dobi s normalnim vrijednostima BMI-a (Slika 45A). Upravo proizvodnja topline 30 min nakon obroka je u negativnoj korelaciji i sa starošću ispitanika i s njihovim vrijednostima BMI-a (Slika 45D).



Slika 46. Termogeneza uzrokovana hranom kod muškaraca i žena. Tjelesna temperatura nakon obroka raste kod muškaraca, a pada kod žena (A). Povratak koncentracije glukoze u krvi 2 sata nakon obroka na vrijednosti natašte su u izrazito negativnoj korelaciji s promjenama tjelesne temperature 1 sat nakon obroka (B). Razlike u porastu tjelesne temperature 2 sata nakon obroka kod muških i ženskih ispitanika nalaze se kod osoba s povišenim vrijednostima BMI-a (>25 kg/m² - C) i/ili kod osoba starijih od 35 godina (D). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm SE. * $p < 0,05$ - označava statistički značajnu razliku između muških i ženskih ispitanika, # $p < 0,05$ - označava statistički značajnu razliku između ispitanika normalne i veće tjelesne mase te osoba mlađih i starijih od 35 godina.

5.6.2. Smanjenje termogeneze uzrokovane hranom s dobi kod ženskih osoba

Promjena TT nakon obroka (DIT) se razlikuje kod muškaraca i žena. 30 min nakon obroka dolazi do malog porasta tjelesne temperature kod oba spola. Kod muškaraca TT nastavlja rasti dok se kod ženskih ispitanika 1 i 2 sata nakon obroka

smanjuje (Slika 46A). Upravo promjena TT 1 sat nakon obroka te razlika između koncentracija GUK-a 2 sata i natašte u izrazitoj su negativnoj korelaciji (Slika 46B). Kako je aktivacija BAT-a ovisna o spolu, dobi i BMI-u, zdravi ispitanici su raspoređeni u grupe s normalnim ($<25 \text{ kg/m}^2$) ili povišenim vrijednostima BMI-a ($> 25 \text{ kg/m}^2$) te u grupe ovisno o dobi (mlađi ili stariji od 35 godina). Statistički značajna razlika u DIT-u između muških i ženskih ispitanika je zamijećena u grupi osoba s povišenom tjelesnom masom (Slika 46C) ili kod osoba starijih od 35 godina (Slika 46D).

6. RASPRAVA

Gvanilinski peptidi pripadaju obitelji natriuretskih peptida koji obuhvaćaju GN, UGN, LGN i nedavno otkriven RGN. GP aktiviraju GC-C što dovodi do porasta unutarstanične koncentracije cGMP-a, koji aktivira PKG. Uloga drugih pripadnika obitelji natriuretskih peptida u mozgu (kao npr. ANP) poznata je već neko vrijeme (pregledni članak (261)). U ovom radu po prvi puta je prikazano postojanje UGN-a u mozgu, regulacija njegovog izražaja, signalni put neovisan o GC-C/cGMP-u u astrocitima te djelovanje moždanog UGN-a na metabolizam s posebnim osvrtom na razliku kod muškaraca i žena.

6.1. Promjena izražaja urogvanilina i gvanilat-ciklaze C u mozgu nakon hranjenja

Iako je postojanje GC-C u mozgu poznato više od 25 godina, izražaj GP-a te njihova uloga u pojedinim regijama mozga još je uvijek nedovoljno istražena i dosadašnja istraživanja su puna kontroverzi. Još davne 1997. godine Fan i sur. pokazali su postojanje GN-a u velikom, malom i srednjem mozgu, hipotalamusu, olfaktornim bulbusima te produljenoj i leđnoj moždini dok je UGN pronađen u malom i srednjem mozgu, hipotalamusu i olfaktornim bulbusima kod oposuma (37). Izražaj GN-a nije pronađen u mozgu štakora (26) što smo i mi pokazali kod miševa. Iako izražaj UGN-a u mozgu, osim kod oposuma, nije potvrđen u istraživanjima na drugim životinjskim vrstama (138,39), ovdje po prvi put pokazujemo izražaj UGN-a kod miševa u kori velikog mozga, malom mozgu (Purkinjeove stanice), hipotalamusu, srednjem mozgu, amigdali, te laterodorzalnoj tegmentalnoj jezgri (Slika 22.). Opisana razlika u reakciji na stresni podražaj između WT i GC-C KO životinja ispitivan testom hipofagije uzrokovane novom okolinom (Slika 44.) pretpostavlja ulogu UGN-a i GC-C u amigdali.

Izražaj GC-C u pojedinim dijelovima mozga je nedovoljno istražen. 2011. godine Gong i sur. su kod miša pokazali izražaj GC-C jedino u dopaminergičkim neuronima srednjeg mozga (ventralno tegmentalno područje i supstancija nigra) gdje aktivacija ovog receptora dovodi do porasta frekvencije izbijanja neurona nakon aktivacije mGluR te mAChR. Pretpostavlja se postojanje hiperaktivnosti kod GC-C KO životinja upravo zbog nemogućnosti djelovanja UGN-a na ovo područje mozga (241).

Iste godine Valentino i sur. tvrde da izražaj GC-C u mozgu postoji samo u hipotalamusu s najjačim izražajem u njegovoj Arc jezgri gdje učinak UGN-a regulira hranjenje te nije neobično da upravo GC-C KO miševi imaju veću tjelesnu masu u odnosu na WT životinje (38,39). Opisano je da aktivacija GC-C potiče sintezu POMC-a (39), a mi smo pokazali da je GC-C upravo smješten na staničnoj membrani neurona koji sintetiziraju POMC (POMC neuroni) kod muških životinja, a rezultat je potvrđen i na ljudskom hipotalamusu izoliranom iz muškog mozga (Slika 24.). Kod ženki, izražaj GC-C u hipotalamusu je smanjen i na razini mRNA i na razini proteina te je promijenjena i njegova lokalizacija (Slika 24., 25.). Naime, osim u POMC neuronima Arc jezgre, GC-C je izražena i u POMC negativnim neuronima (pokusi izvedeni na životinjama starijima od 6 mjeseci). Ovi rezultati su u skladu s tvrdnjom da se izražaj GC-C u prefrontalnoj kori velikog mozga kod žena smanjuje sa starošću (262,263). Osim u navedenim regijama mozga, pokazali smo izražaj GC-C i u kori velikog i malog mozga, te dubokim jezgrama malog mozga (Slika 23.). Izražaj GC-C u neuronima je prikazan i na mRNA i na proteinskoj razini upućujući na važnost djelovanja UGN-a upravo putem porasta unutarstanične koncentracije cGMP-a. Izražaj GP-a i receptora u pojedinim regijama mozga prikazani su u tablici 9.

Tablica 9. Izražaj gvanilinskih peptida i gvanilat-ciklaze C u pojedinim regijama mozga. Modificirano prema (200).

	ANP	BNP	CNP	GN	UGN*	GC-A	GC-B	GC-C*	NPR-C
Kora velikog mozga	slab	jak	jak	neg.	jak	srednji	srednji	jak	jak
Amigdala	srednji	slab	jak	neg.	srednji	slab	srednji	srednji	jak
Hipotalamus	jak	jak	jak	neg.	slab	jak	jak	srednji (Arc jezgra)	jak
Mali mozak	slab	slab	jak	neg.	slab	slab	srednji	slab	srednji
Hipokampus	slab	slab	slab	neg.	neg.	slab	slab	-	srednji

* - prikazan izražaj kod mužjaka natašte

Budući da su nedavna istraživanja pokazala porast UGN-a u plazmi nakon obroka, koji sudjeluje u nastanku osjećaja sitosti kod ljudi i laboratorijskih životinja (38,39), željeli smo istražiti mijenja li unos hrane izražaj UGN-a i GC-C u pojedinim regijama mozga kao što je to slučaj kod bubrezima (63,64). Kod mužjaka, na proteinskoj razini dolazi do porasta izražaja UGN-a 2 sata nakon obroka u hipotalamusu i malom mozgu. Nasuprot tome, u kori velikog mozga dolazi do smanjenja izražaja 2 i 4 sata nakon obroka (uz početni porast te pad izražaja mRNA)

što odgovara premještanju UGN-a iz some neurona u kortikalne putove (Slika 26.). Na razini mRNA u malome mozgu ne dolazi do promjene izražaja pa predlažemo da je upravo porast količine UGN-a u ovoj regiji nakon obroka rezultat premještanja iz druge regije mozga te vezanje za GC-C na površini Purkinjeovih stanica. U hipotalamusu dolazi do smanjenja izražaja mRNA za UGN 2 i 4 sata nakon obroka što se događa u isto vrijeme kada i porast razine samog UGN proteina (Slika 27.). Postoje dva objašnjenja ove pojave. Sinteza UGN-a u hipotalamusu bi mogla uključivati posttranskripcijsku regulaciju sinteze proteina što bi značilo smanjenje mRNA te istovremeni porast količine proteina (264). Drugo moguće objašnjenje je da sam UGN do hipotalamusa dolazi iz sistemske krvi ili druge regije mozga te tako djeluje na GC-C (38) dok istovremeno dolazi do smanjivanja izražaja same mRNA. Upravo ova regulacija izražaja UGN-a na mRNA razini nedostaje kod ženki pa se može pretpostaviti da je fiziološka uloga UGN-a u hipotalamusu ovisna o spolu.

Izražaj samog receptora GC-C je ovisan o režimu prehrane kako je pokazano nedavno (39). Spolna razlika je vidljiva i kod regulacije izražaja GC-C u hipotalamusu nakon obroka (Slika 28.). Kod mužjaka dolazi do porasta izražaja GC-C na razini proteina i smanjenja izražaja specifične mRNA. Ova regulacija izražaja kod ženki nije primijećena s najvećom razlikom u izražaju u odnosu na mužjake upravo 2 sata nakon obroka.

Da bismo odgovorili na pitanje koji je mehanizam regulacije UGN-a u mozgu nakon hranjenja razmotrili smo moguće učinke inzulina i leptina čije koncentracije rastu u plazmi i likvoru nakon obroka (265,266). Inzulin djeluje na izražaj signalnog puta UGN-a u jetri (267) dok leptin regulira porast izražaja UGN-a u crijevima i plazmi nakon obroka (57). Naše istraživanje započeli smo *i.c.v.* primjenom inzulina te već kod primjene ovog hormona primijetili jednake promjene u izražaju UGN-a u kori velikog mozga i hipotalamusu, ali ne i u malom mozgu, kakve su zamijećene nakon hranjenja (Slika 29.). Upravo promjene u Cx-u i Ht-u upućuju na regulaciju sinteze UGN-a inzulinom u ovim regijama mozga, dok u Cb-u ne dolazi do sinteze UGN-a nakon obroka, već on dolazi iz drugih regija mozga, pa zbog toga niti inzulin nije mogao regulirati ovu sintezu. Iako su promjene izražaja prikazane 2 sata nakon primjene, već pri koncentraciji od 0,1 mU, da bi se primijetile promjene u izražaju UGN-a u Cb-u radi premještanja UGN-a bila bi potrebna kronična primjena inzulina infuzijskim pumpama.

6.2. Djelovanje urogvanilina na Purkinjeove stanice malog mozga

Kako bismo istražili djelovanje UGN-a putem GC-C odabrali smo Purkinjeove stanice Cb-a. Sudeći po imunohistološkim bojenjima većina Purkinjeovih stanica na svojoj membrani izražava GC-C. UGN dovodi do hiperpolarizacije Purkinjeovih stanica (Slika 31.) te je taj odgovor u pozitivnoj korelaciji s početnim membranskim potencijalom (što je potencijal manje negativan to je i hiperpolarizacijski učinak UGN-a manji). Sličan rezultat je dobiven proučavanjem djelovanja ANP-a na neurone supraoptičke jezgre hipotalamusa (211). Upravo zbog hiperpolarizacijskog učinka UGN-a tijekom njegovog djelovanja na Purkinjeove stanice rijetko dolazi do izbijanja akcijskih potencijala. Kada do izbijanja dođe i frekvencija izbijanja i amplituda samih akcijskih potencijala je smanjena (Slika 34.). Važnost GC-C u djelovanju UGN-a pokazuje činjenica da u Purkinjeovim stanicama kojima nedostaje GC-C UGN ne dovodi do promjene membranskog potencijala. U kontrolnim uvjetima, kod GC-C KO životinja primijećena je promjena u frekvenciji izbijanja, ali ne i amplitudi akcijskih potencijala Purkinjeovih stanica u odnosu na WT životinje što upućuje na moguću ulogu GC-C u razvoju neurona.

6.3. Signalni put za urogvanilin u mozgu neovisan o gvanilat-ciklazi C/cGMP-u

Djelovanje UGN-a na astrocite koji ne izražavaju GC-C nas je iznenadilo. Za razliku od cGMP-a koji ove stanice depolarizira vjerojatno inhibirajući K^+ kanale (135,136,169,268,269), GP ih hiperpolariziraju. Ovaj učinak GP-a je u negativnoj korelaciji s početnim membranskim potencijalom upućujući na mogućnost njihovog djelovanja na vodljivost membrane za Cl^- (Slika 35.).

Za razliku od GP-a za koje je do sad identificiran samo jedan tip receptora, GC-C, ostali natriuretski peptidi imaju receptor gvanilat-ciklazu te receptor "čistač" čija aktivacija dovodi do porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+} (129). Upravo zbog sumnje da bi signalni put neovisan o GC-C mogao ovisiti upravo o ovom ili sličnom receptoru čistaču, ali za GP-e, mjerili smo promjenu unutarstanične koncentracije Ca^{2+} na poticaj UGN-om. UGN dovodi do porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+} koji bi

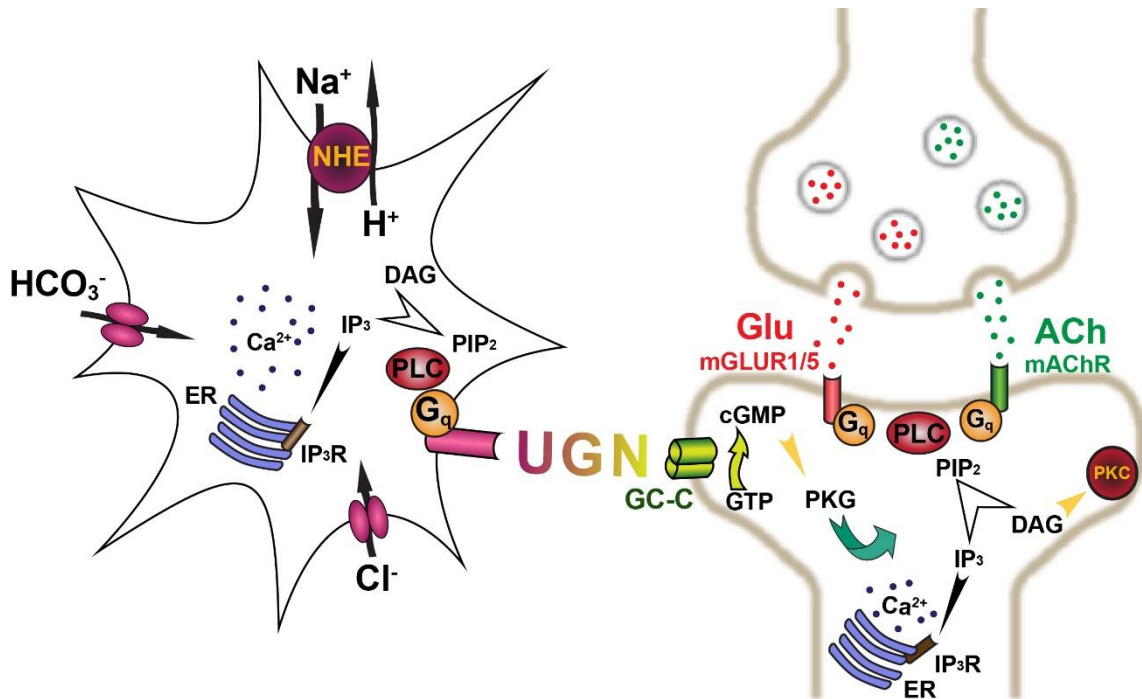
mogao aktivirati Ca^{2+} ovisne Cl^- kanale što bi dovelo do već opisane hiperpolarizacije (215).

Poznato je da putem cGMP-a UGN može mijenjati unutarstanični pH inhibicijom transporta H^+ djelovanjem na NHE te H^+/ATP -azu ili HCO_3^- promjenom izražaja $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ izmjenjivača (270–272). U astrocitima cGMP snižava unutarstanični pH inhibirajući NHE (225). Kako snižavanje pH intersticija dovodi do inhibicije NMDA glutamatnih receptora te Ca^{2+} kanala ovisnih o naponu, promjena izvanstaničnog pH može promijeniti funkciju neurona (273,274). Kako smo već pokazali da cGMP nije drugi glasnik GP-a u astrocitima, željeli smo provjeriti može li UGN mijenjati transport H^+ i/ili HCO_3^- putem Ca^{2+} signalnog puta (275). Kako smo i predvidjeli, UGN putem signalnog puta neovisnog o cGMP-u ubrzava oporavak unutarstaničnog pH nakon amonijskog pulsa povećavajući, a ne inhibirajući, aktivnost NHE. UGN također aktivira i transport HCO_3^- nakon izlaganja $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ (Slika 36.). Daljnja istraživanja su potrebna da bismo utvrdili izoformu NHE te HCO_3^- transportera uključenih u djelovanje UGN-a.

S obzirom da je primarna kultura astrocita izolirana iz novookoćenih životinja, odredili smo postojanje signalnog puta neovisnog o GC-C i na moždanim rezovima odraslih WT i GC-C KO životinja te utvrdili moguću specifičnost u djelovanju na astrocite različitih moždanih regija. U astrocitima kore malog mozga UGN dovodi do porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+} kod oba tipa životinja. Kada smo promatrali djelovanje UGN-a na promjenu razine unutarstaničnog Ca^{2+} u neuronima izazvane povećanom koncentracijom K^+ u izvanstaničnoj otopini i upotrebom specifične fluorescentne boje, tada UGN nije imao učinka (Slika 37.).

U astrocitima kore velikog mozga WT i GC-C KO životinja, primijetili smo postojanje dva funkcionalno različita tipa astrocita. U jednom tipu dolazi do porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+} na poticaj UGN-om, dok drugi tip ne pokazuje odgovor na UGN, ali posjeduje spontane Ca^{2+} oscilacije (276). U neuronima kod kojih dolazi do porasta unutarstaničnog Ca^{2+} na poticaj izvanstanične hiperkalemije, ne dolazi niti do odgovora na UGN niti do pojave spontanih Ca^{2+} oscilacija (Slika 38.). Za razliku od kore velikog mozga, u kori malog mozga nismo zamijetili spontane Ca^{2+}

oscilacije u astrocitima zbog toga što oscilacije Ca^{2+} nastaju djelovanjem glutamata putem mGluR tipa 5 koji se nalaze u kori velikog, ali ne i malog mozga (277–279).



Slika 47. Učinci novog signalnog puta u astrocitima neovisnog o gvanilat-ciklazi C. U neuronima srednjeg mozga urogvanilin (UGN) putem gvanilat-ciklaze C (GC-C) pospješuje ekscitacijski učinak glutamata putem metabotropnih glutamatnih receptora (mGluR1/5) i acetilkolina (ACh) putem muskarinskih acetilkolinških receptora (mAChR). Na astrocitima, UGN se veže za receptor čija aktivacija dovodi do porasta unutarstaničnog Ca^{2+} aktivacijom fosfolipaze C (PLC) te posljedičnim stvaranjem inozitol-1,4,5,-trifosfata (IP_3) i diacil-glicerola (DAG) razgradnjom membranskih fosfoinozitol-4,5-bisfosfata (PIP_2). IP_3 se veže za svoj receptor (IP_3R) na endoplazmatskoj mrežici što dovodi do otpuštanja Ca^{2+} u citoplazmu. Ovaj signalni put posljedično dovodi do aktivacije Na^+/H^+ izmjenjivača (NHE), transporta HCO_3^- i hiperpolarizacije stanične membrane. cGMP - ciklički gvanozin-monofosfat, GTP - gvanozin-trifosfat, PKC – protein-kinaza C, PKG – protein-kinaza G

Moguću ulogu signalnog puta u astrocitima neovisnog o GC-C/cGMP-u predložili smo na slici 47. koja prikazuje model tripartitne sinapse u srednjem mozgu. Djelovanje UGN-a na neurone putem GC-C razlikovati će se u različitim dijelovima mozga, od neuromodulacije u srednjem mozgu (241) do promjena membranskih potencijala te frekvencije izbijanja u Purkinjeovim stanicama dok se glavna uloga UGN-a u astrocitima ovisno o regiji mozga i ne razlikuje značajno. Vežanje za receptor koji ne pokazuje gvanilat-ciklaznu aktivnost dovodi do porasta unutarstaničnog Ca^{2+} što je vjerojatno posljedica aktivacije PLC. Aktivacija ovog signalnog puta će dovesti

do promjene vodljivosti membrane vjerojatno za Cl^- te do aktivacije NHE i transporta HCO_3^- . Upravo NPR-C ili receptor "čistač" je moguća karika koja nedostaje u signalnom putu UGN-a neovisnom o GC-C/cGMP-u jer je vezan uz G protein te njegova aktivacija dovodi do porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+} , a GP kao ligandi ovog receptora nisu nikad opovrgnuti (129).

6.4. Aktivacija moždane gvanilat-ciklaze C urogvanilinom regulira aktivnost smeđeg masnog tkiva nakon obroka

U završnom dijelu ovog istraživanja željeli smo detaljnije istražiti moguću ulogu UGN-a u Ht-u te važnost njegove regulacije hranjenjem. Nedavno su Folgueira i sur. pokazali ne samo djelovanje UGN-a na Ht u poticanju osjećaja sitosti već i važnu ulogu u aktivaciji BAT-a (226).

BAT se aktivira nakon izlaganja hladnoći da bi održao tjelesnu temperaturu te nakon obroka što dovodi do porasta potrošnje energije i glukoze te stvaranja topline. Da bismo utvrdili moguću ulogu GC-C u fiziologiji BAT-a prvo smo odredili promjenu volumena BAT-a (MR) te promjenu aktivnosti iBAT-a (PET CT) kod GC-C KO životinja u odnosu na WT životinje oba spola (Slika 39.). Očekivano, GC-C KO životinje pokazale su i smanjenu aktivnost i smanjeni volumen iBAT-a. Upravo ova smanjena aktivnost mogla bi biti i jedan od razloga povećane tjelesne mase GC-C KO životinja koja nastaje usprkos njihovoj hiperaktivnosti (Slika 40., 41.) (38). Ako pogledamo spolne razlike u aktivaciji iBAT-a nakon izlaganja hladnoći primijetit ćemo da je aktivacija bila viša kod WT ženki u odnosu na WT mužjake što odgovara rezultatima dobivenima u ljudskoj populaciji (231). Budući da se BAT aktivira i nakon obroka (233) bilo bi za očekivati da će termogeneza uzrokovana hranom biti viša kod žena, što nije slučaj (280).

Određivanje termogeneze uzrokovane hranom kod GC-C KO životinja predstavlja izazov. Svaki stres dovodi do porasta aktivnosti BAT-a putem simpatikusa na gotovo identičan način kao i tijekom termogeneze uzrokovane hranom (281). Nadalje, GC-C KO životinje imaju povišenu tjelesnu temperaturu zbog njihove hiperaktivnosti (241). Kada smo usporedili prosječnu tjelesnu temperaturu s aktivacijom iBAT-a nakon izlaganja hladnoći te motoričkom aktivnošću životinja, bilo je

očigledno da temperatura kože, a posljedično i tijela u GC-C KO životinja ovisi više o povećanoj tjelesnoj aktivnosti, dok kod WT životinja o aktivaciji iBAT-a (Slika 41.).

Metoda izbora u mjerenju aktivnosti BAT-a danas je PET CT koji koristi radioaktivno obilježenu glukozu (biljeg je ciklotronski proizvod, izotop fluora (^{18}F) (227,230–232). Ako zanemarimo činjenicu da je ova metoda skupa i invazivna, PET CT ima ograničenja u procjeni aktivnosti BAT-a nakon obroka. Nakupljanje FDG-a u BAT-u nakon obroka je izraženije kod mršavih muškaraca. Upravo osobe kojima je pronađen BAT upotrebom PET CT-a imaju i izraženiji DIT (233,234). Kako se FDG natječe za isti transporter na staničnoj membrani kao i glukoza čija koncentracija u krvi nakon obroka raste (postprandijalna hiperglikemija), nakupljanje FDG-a u stanicama BAT-a nakon obroka kod većine osoba je jedva primjetno (234). Dapače, nedavno je i predloženo da je aktivnost BAT-a kod ljudi puno izraženija nego što se to dosadašnjim metodama moglo pokazati (232). U ovom istraživanju predlažemo IR metodu kao metodu izbora za mjerenje aktivnosti BAT-a nakon obroka (255). Do sada se IR koristila za procjenu aktivnosti BAT-a nakon izlaganja hladnoći (258,282,283). U novijoj ljudskoj povijesti, do aktivacije BAT-a hladnoćom dolazi rijetko, dok se aktivacija BAT-a nakon obroka događa svaki dan. Kako se regulacija ove dvije funkcije BAT-a putem Ht-a u potpunosti razlikuje (228,229,235) određivanje aktivacije BAT-a hladnoćom kao mjera svakodnevne aktivnosti BAT-a je u potpunosti neprikladna. Korištenje neinvazivne IR metode za određivanje aktivnosti BAT-a nakon obroka mogla bi biti veoma značajna kod pacijenata s povećanom tjelesnom masom i/ili pacijenata oboljelih od šećerne bolesti te se može koristiti u procjeni djelotvornosti novih supstanci koje bi poticale aktivnost BAT-a s ciljem poboljšanja homeostaze glukoze (284).

6.4.1. Aktivacija smeđeg masnog tkiva nakon obroka ovisi o spolu, dobi i indeksu tjelesne mase

Termogenezu uzrokovanu hranom mjerili smo kod životinja određujući potrošnju energije, kod ljudi mjerenjem tjelesne temperature prije i nakon obroka, a aktivnost iBAT-a termalnom kamerom. Porast potrošnje energije nakon obroka dobivena je jedino kod WT mužjaka, ali ne i kod WT ženki i GC-C KO životinja oba spola (Slika 42.). Kod WT ženki je već 30 min nakon obroka došlo do smanjenja

potrošnje energije. Upravo ovaj nedostatak DIT tj. smanjenje tjelesne temperature nakon obroka pokazano je i kod žena starijih od 35 godina i žena s povišenim BMI-em (Slika 46.).

Ove razlike u DIT-u prati i razlika u aktivaciji BAT-a i kod životinja i kod ljudi. Kod svih testiranih skupina životinja do porasta aktivnosti nakon hranjenja došlo je jedino kod WT mužjaka (Slika 43.). Dapače, kod GC-C KO mužjaka došlo je do pada potrošnje nakon obroka zbog značajnog smanjenja mišićne aktivnosti i nedostatka porasta aktivnosti iBAT-a nakon obroka. Folgueira i sur. su pokazali da primjena UGN-a izravno u moždane komore dovodi do povećanja aktivnosti BAT-a, ali ovi pokusi izvedeni su jedino na mužjacima (226). Upravo aktivacija BAT-a nakon obroka je u korelaciji s izražajem GC-C u Ht-u. Potpuni nedostatak GC-C kod GC-C KO životinja dovodi do potpunog nestanka aktivacije BAT-a nakon obroka. Kod WT životinja izražaj GC-C u Ht-u smanjen je kod ženki i na mRNA i na proteinskoj razini te ne dolazi do promjena u izražaju GC-C nakon obroka koja je pokazana kod mužjaka. Nadalje, kod žena aktivacija BAT-a nakon obroka opada s godinama te je u skladu sa smanjivanjem izražaja GC-C u mozgu (262,263).

U ženki WT životinja, stvaranje topline BAT-om nakon izlaganja hladnoći je izraženije iako ne postoji porast aktivnosti nakon hranjenja, što bi moglo imati važnu fiziološku ulogu u grijanju novookoćenih miševa u hladnim uvjetima. Zbog svega navedenog predlažemo da je regulacija DIT-a UGN-om putem aktivacije GC-C puno važnija u muškoj populaciji, a kod žena srednje dobi, sa smanjenjem izražaja GC-C u mozgu, u potpunosti se gubi.

Aktivacija BAT-a nakon obroka dovodi do porasta stvaranja topline što podiže tjelesnu temperaturu. Ono što je važnije je da ta aktivacija dovodi do potrošnje glukoze te je porast aktivnosti BAT-a u negativnoj korelaciji s koncentracijom glukoze 2 sata nakon obroka (Tablica 8., Slika 45.). Smanjena potrošnja glukoze kod žena nakon obroka mogla bi dovesti do skladištenja suviška energije u bijelo masno tkivo. Ovi rezultati su u skladu s osnovnim razlikama između spolova u nakupljanju masti. Naime, nakupljanje masti u muškoj populaciji je posljedica povećanog unosa hrane, dok se u ženskoj populaciji zbiva zbog smanjenja EE (285). Upravo nedostatak aktivacije BAT-a nakon obroka kod žena srednje životne dobi mogao bi dovesti do inzulinske rezistencije (286–289) i povećane pojavnosti pretilosti (290–292).

Nadalje, u ženskoj populaciji termogeneza uzrokovana hranom te aktivacija BAT-a gubi se s porastom BMI-a (Slika 45., 46.). Ovi rezultati su u suglasnosti s nedavno objavljenim istraživanjem koje pokazuje da kod pretilih dječaka dolazi do porasta u koncentraciji UGN-a nakon obroka kao i kod osoba normalne tjelesne mase, dok kod pretilih djevojčica ovaj porast koncentracije UGN-a izostaje (58).

Iako termogeneza uzrokovana hranom ovisi o početnoj tjelesnoj temperaturi u muškaraca ($r = -0,64$), što nije slučaj kod žena ($r = 0,02$), moguću ulogu estrogena i progesterona u promjeni aktivnosti BAT-a nakon obroka sa starenjem treba detaljnije razmotriti. Danas se smatra da estrogeni dovode do porasta aktivnosti BAT-a dok taj učinak progesterona nije u potpunosti potvrđen (293). Pad količine estrogena nakon menopauze bi doveo i do smanjenja aktivnosti BAT-a. Kako je kod žena prije menopauze s normalnom tjelesnom masom razina estrogena niža u odnosu na pretilu ženu, estrogen vjerojatno nije razlog smanjenoj aktivnosti BAT-a nakon obroka (294). Danas se pretpostavlja da su promjene u razinama hormona štitnjače razlog smanjenja aktivnosti BAT-a sa starošću (295). Potrebna su daljnja istraživanja da bi se utvrdilo djelovanje hormona štitnjače na promjenu izražaja GC-C u mozgu te posljedično aktivnost i/ili volumena BAT-a nakon obroka što bi posljedično mijenjalo mogućnost njegove aktivacije.

6.4.2. Hipotalamička regulacija smeđeg masnog tkiva nakon obroka

Regulacija aktivnosti BAT-a nakon obroka moguća je putem djelovanja plazmatskog UGN-a na BAT, djelovanjem plazmatskog UGN-a na GC-C smještenog u Arc jezgri Ht-a ili djelovanjem moždanog UGN-a na moždanu GC-C. Kako smo GC-C pronašli u Ht-u, ali ne i u iBAT-u, sve upućuje na postojanje središnje regulacije aktivnosti BAT-a putem UGN-a. Do danas je poznata 31 mutacija (eng., *Single-nucleotide polymorphisms* - SNP) u egzonima gena za UGN koje dovode do promjene slijeda aminokiselina u strukturi UGN-a. Najčešća je zamjena prolina (11. aminokiselina) koja je nepolarna za polarnu aminokiselinu treonin zamjenom C u A. Ova mutacija postoji u 18% populacije na jednom alelu dok na oba u 4% populacije Europe (296). Ako se prisjetimo da GC-C KO miševi imaju inzulinsku rezistenciju, povećanu razinu inzulina i leptina u plazmi kao i povećanu tjelesnu masu može se pretpostaviti da bi nedostatak funkcionalnog UGN-a mogao biti uključen u mehanizam

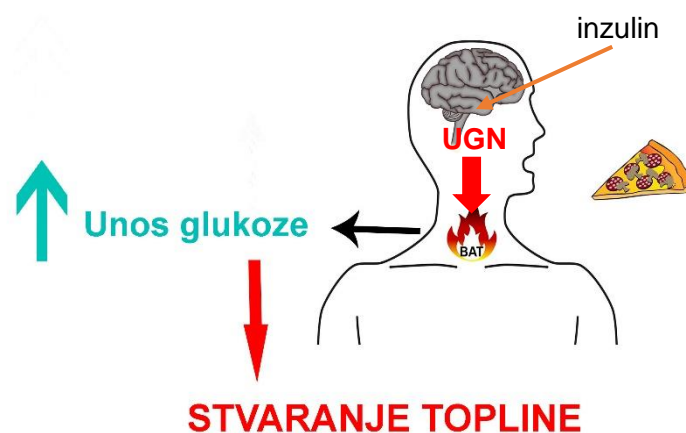
nastanka metaboličkog sindroma i pretilosti ne samo regulacijom sitosti već i regulacijom aktivnosti BAT-a.

Aktivacija BAT-a nakon izlaganja hladnoći i nakon obroka je u potpunosti različita što se može vidjeti i na primjeru WT ženki i GC-C KO životinja oba spola. Naime, kod GC-C KO životinja koje ne pokazuju aktivaciju BAT-a nakon obroka, aktivacija BAT-a hladnoćom još uvijek postoji iako je smanjena. Pretpostavljamo da upravo nedostatak aktivacije nakon obroka kod ovih životinja dovodi do smanjenja volumena BAT-a i posljedično smanjene aktivnosti u hladnim uvjetima. Nakon izlaganja hladnoći, osjetni podražaji iz kože završavaju u MnPO preoptičke regije Ht-a što dovodi do inhibicije neurona osjetljivih na toplinu. To dovodi do smanjenja inhibicijskog učinka na *rostralni raphe pallidus* te porasta aktivnosti simpatikusa (228,229).

Kako je i ranije pokazano, GC-C se prvenstveno nalazi u Arc jezgri Ht-a (38) i to u POMC neuronima kod mužjaka, dok kod ženki GC-C postoji i na neidentificiranim neuronima. Postoji nekoliko vrsta neurona u Arc jezgri koji mogu regulirati aktivnost BAT-a nakon obroka. Stvaranje neuropeptida Y iz AgRP neurona (eng., *Agouti-related peptide*) putem paraventricularne jezgre, dovodi do inhibicije aktivnosti BAT-a (297,298). Ne iznenađuje da upravo aktivacija POMC neurona (ciljne stanice djelovanja UGN-a) dovodi do aktivacije BAT-a (235). Od hormona koji se oslobađaju nakon obroka, inzulin i leptin su dobri kandidati koji bi mogli imati ulogu u aktivaciji BAT-a izravno ili putem UGN-a (235). Leptin putem GABA neurona dovodi do inhibicije paraventricularne jezgre Ht-a te posljedične aktivacije BAT-a (236). Do porasta leptina u plazmi dolazi tek 8 sati nakon obroka (238), dok je termogeneza kod ljudi najizraženija 1-2 sata nakon obroka (Slika 46.) što odgovara do sada objavljenim rezultatima (299). Nadalje, transplantacija BAT-a kod Ob/Ob miševa (životinje kojima nedostaje leptin) dovodi do smanjenja tjelesne mase i popravljiva homeostazu glukoze (239) što pokazuje da nedostatak leptina ne utječe pretjerano na aktivnost BAT-a (300).

Do sada smo pokazali da se izražaj UGN-a u različitim dijelovima mozga mijenja s hranjenjem, u Ht-u dolazi do porasta količine UGN proteina, ali i do pada izražaja mRNA za UGN, ali samo kod mužjaka ponovno pokazujući spolne razlike u funkciji UGN-a. Porast UGN-a u Ht-u upravo u vrijeme aktivacije BAT-a može se dogoditi iz

više razloga, primjerice zbog dolaska UGN-a iz periferne krvi koji je proizveden u crijevima nakon obroka (38), (istraživanje samo na mužjacima), iz nekog drugog područja mozga, ili iz samog Ht-a posttranslacijskom regulacijom mRNA. Koncentracija pro-UGN-a u plazmi je smanjena kod pretilih osoba (55) što odgovara rezultatima dobivenim na pretilim miševima kod kojih je sekrecija UGN-a nakon obroka smanjena (301). Na koji način pretilost mijenja izražaj UGN-a nakon obroka u Ht-u, predmet je budućeg istraživanja. Kako smo i pokazali u ovom radu, mogući aktivator sinteze UGN-a u mozgu je inzulin. Osim što smo pokazali da *i.c.v.* primjena inzulina mijenja izražaj UGN-a u pojedinim regijama mozga koje su slične promjenama izražaja UGN-a nakon obroka, smanjena koncentracija inzulina u likvoru pretilih osoba bila bi u skladu s našom hipotezom (302). Možemo primijetiti da će aktivacija BAT-a nakon obroka biti smanjena ako ne dolazi do dovoljnog porasta inzulina u likvoru nakon obroka, ili ako postoji mutacija u samom UGN-u koji ga čini nefunkcionalnim. Uloga UGN-a u regulaciji BAT-a nakon obroka, prevenciji pretilosti i posprandijalne hiperglikemije pogotovo kod pacijenata oboljelih od šećerne bolesti tipa 2 prikazana je na slici 48.



Slika 48. Uloga urogvanilina u aktivaciji smeđeg masnog tkiva nakon obroka. Nakon obroka na poticaj inzulinom dolazi do porasta izražaja UGN-a u hipotalamusu koji djeluje na POMC neurone Arc jezgre što posljedično dovodi do porasta simpatičkog izbijanja i aktivacije BAT-a. Aktivacija BAT-a nakon obroka troši glukozu iz koje stvara toplinu te sudjeluje u nastanku termogeneze uzrokovane hranom.

7. ZAKLJUČCI

1. Receptor za UGN, GC-C je izražen u različitim regijama mozga:

- a) osim u hipotalamusu i srednjem mozgu, GC-C je nazočana i u kori malog mozga i njegovim dubokim jezgrama te kori velikog mozga;
- b) u hipotalamusu u njegovoj arkuatnoj jezgri GC-C je smještena u POMC neuronima kako kod miševa tako i kod ljudi, dok je taj izražaj smanjen kod ženskih miševa te ne dolazi do postprandijalne regulacije izražaja GC-C;
- c) GC-C je izražena samo u neuronima, a u astrocitima nije detektiran ni na mRNA ni na proteinskoj razini ;

2. Izražaj UGN-a u mozgu se mijenja ovisno o hranjenju:

- a) UGN je izražen u mozgu i to u motoričkoj i somatosenzoričkoj kori velikog mozga, u kori malog mozga, u hipotalamusu te srednjem mozgu;
- b) izražaj UGN-a ovisi o hranjenju u kori velikog mozga, hipotalamusu te u malom mozgu, ali ne i srednjem mozgu;
- c) u kori velikog mozga dolazi do porasta izražaja mRNA za UGN, ali smanjenja izražaja na proteinskoj razini 2 h nakon hranjenja što odgovara premještanju UGN-a nakon hranjenja iz tijela neurona u kortikalne puteve te izlaska iz kore velikog mozga;
- d) u malom mozgu i hipotalamusu dolazi do porasta UGN-a na razini proteina iako nema porasta specifične mRNA (u hipotalamusu čak dolazi do pada izražaja mRNA) što upućuje na premještanje UGN-a iz drugih regija, a ne na lokalnu sintezu;

3. Centralna primjena inzulina regulira izražaj UGN-a u nekim regijama mozga:

- a) u kori velikog mozga i hipotalamusu nakon davanja 10 mU *i.c.v.* dolazi do promjene u izražaju UGN-a na proteinskoj razini slične promjeni izražaja UGN-a nakon hranjenja;

4. Na moždanim rezovima UGN mijenja funkciju Purkinjeovih stanica malog mozga:

- a) UGN hiperpolarizira membranu Purkinjeovih stanica;
- b) tijekom učinka UGN-a stanice rijetko pokazuju spontana izbijanja, a kad i nastanu tada su amplituda i frekvencija smanjene;

c) ovi učinci UGN-a na Purkinjeove stanice, koje u WT životinja izražavaju GC-C, nisu primijećeni kod GC-C KO životinja;

5. Osim GC-C, UGN aktivira i signalni put neovisan o GC-C u mozgu:

a) za agoniste GC-C na primarnoj kulturi astrocита, cGMP nije drugi glasnik;

b) na astrocite u primarnoj kulturi te na moždanim rezovima, UGN djeluje tako da dovodi do porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+} koja postoji i kod GC-C KO životinja;

c) aktivacijom signalnog puta neovisnog o GC-C dolazi do promjena u transportu H^+ i HCO_3^- ;

6. Aktivacija moždanog GC-C UGN-om regulira smeđe masno tkivo:

a) iako su volumen i aktivnost smeđeg masnog tkiva nakon izlaganja hladnoći kod GC-C KO životinja smanjeni, tjelesna temperatura GC-C KO životinja je povišena zbog hiperaktivnosti;

b) aktivacija smeđeg masnog tkiva nakon obroka prisutna je samo kod mužjaka divljeg tipa dok kod ženki divljeg tipa te GC-C KO životinja oba spola to nije slučaj što se očituje odgovarajućim porastom potrošnje energije nakon obroka (termogeneza uzrokovana hranom);

c) smanjenjena aktivacija smeđeg masnog tkiva nakon obroka korelira s izražajem GC-C u hipotalamusu;

d) smanjena aktivacija smeđeg masnog tkiva nakon obroka kod GC-C KO životinja smanjuje postprandijalnu potrošnju glukoze;

e) aktivacija smeđeg masnog tkiva u sklopu termogeneze uzrokovane hranom (porast tjelesne temperature nakon obroka) važna je za metabolizam glukoze i kod ljudi;

f) nedostatak termogeneze uzrokovane hranom kod ženskih ispitanika pojavljuje se s porastom BMI-a te s dobi što je u skladu s rezultatima dobivenim na životinjama;

8. SAŽETAK

Urogvanilin (UGN) pripada porodici gvanilinskih peptida (GP) koji u probavnom sustavu reguliraju transport elektrolita i vode aktivacijom gvanilat-ciklaze C, do danas jedinog poznatog receptora za GP-e. Ovim radom pokazujemo izražaj UGN-a na mRNA i proteinskoj razini u pojedinim regijama mozga koji je ovisan o hranjenju iako se do sada smatralo da se UGN ne stvara u mozgu. Uz do sada poznati izražaj gvanilat-ciklaze C (GC-C) u srednjem mozgu i hipotalamusu, otkrili smo nova mjesta izražaja GC-C u neuronima (korteks velikog mozga, Purkinjeove stanice i duboke jezgre malog mozga), ali ne i u astrocitima. UGN hiperpolarizira staničnu membranu Purkinjeovih stanica i smanjuje frekvenciju izbijanja dok u astrocitima dovodi do povećanja unutarstanične koncentracije Ca^{2+} putem signalnog puta neovisnog o GC-C/cGMP-u. Učinak UGN-a u hipotalamusu na termogenezu uzrokovanu hranom te aktivaciju smeđeg masnog tkiva (BAT) nakon obroka postoji kod mužjaka, ali ne i ženki divljeg tipa životinja ni kod oba spola životinja kojima nedostaje GC-C. Istraživanje je provedeno i na zdravim dobrovoljcima i pokazuje kako je aktivacija BAT-a nakon obroka ovisna o spolu, dobi i indeksu tjelesne mase. Rad ukazuje na ulogu UGN-a u regulaciji BAT-a koja je od neizmjerne važnosti za razvoj novih terapijskih pristupa u terapiji pretilosti, metaboličkog sindroma i šećerne bolesti.

9. SUMMARY

Title: "Expression and effects of uroguanylin in the mouse brain"

PhD student: Nikola Habek, MD

Year: 2018

Uroguanylin (UGN) belongs to the family of guanylin peptides. They regulate electrolyte and water transport in intestine via guanylate cyclase C, the only known receptor for guanylin peptides. In this thesis we are showing expression of UGN in different brain regions which is regulated by feeding, although it was believed that brain is not expressing UGN. Guanylate cyclase C (GC-C) is expressed in midbrain and hypothalamus, while we discovered additional brain regions expressing GC-C in neurons (cerebral cortex, Purkinje cells and deep nuclei of the cerebellum) but not in astrocytes. UGN hyperpolarized Purkinje cells and decreased firing rate while in astrocytes lead to increase in intracellular Ca^{2+} concentration via GC-C/cGMP independent signalling pathway. Effects of UGN in hypothalamus on diet-induced thermogenesis and brown adipose tissue (BAT) activation after a meal exist in male but not female WT animals and GC-C KO animals of both genders. Similar research was performed on healthy volunteers which showed that activation of BAT after a meal is gender, age, and body mass index dependent. Role of UGN in BAT regulations is of immeasurable importance for development of the new therapeutic approaches in treatment of obesity, metabolic syndrome, and diabetes mellitus.

10. POPIS SLIKA I TABLICA

POPIS SLIKA:

Slika 1. Ljudski gvanilin, urogvanilin i termo-stabilni enterotoksin <i>E. coli</i> _____	4
Slika 2. Sinteza ljudskog gvanilina i urogvanilina _____	5
Slika 3. Razlika u koncentraciji pro-urogvanilina u plazmi nakon obroka kod pretilih dječaka i djevojčica _____	7
Slika 4. Gvanilat-ciklaza C _____	11
Slika 5. Učinak gvanilinskih peptida i cGMP-a na membranski potencijal glavnih stanica sabirnih kanalića ljudskog bubrega _____	13
Slika 6. Signalni put gvanilinskih peptida u crijevima _____	14
Slika 7. Fiziologija smeđeg masnog tkiva _____	23
Slika 8. Karakterizacija miševa kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C _____	30
Slika 9. Protokol hranjenja i eksperimentalnih postupaka na životinjama _____	31
Slika 10. Intracerebroventrikularna primjena inzulina _____	33
Slika 11. Membrana obojena <i>Ponceau S</i> i gel obojen <i>Commassie</i> bojom _____	40
Slika 12. Mikro-pipeta na Purkinjeovoj stanici čvrsto spojena sa stanicom _____	45
Slika 13. Analiza mjerenja unutarstaničnog Ca^{2+} na moždanim rezovima u MATLAB programu _____	47
Slika 14. Mjerenje volumena interskapularnog smeđeg masnog tkiva magnetskom rezonancom _____	49
Slika 15. Određivanje aktivnosti interskapularnog smeđeg masnog tkiva PET-CT metodom _____	50
Slika 16. Određivanje temperature kože životinje iznad interskapularnog smeđeg masnog tkiva metodom infracrvene termografije _____	52
Slika 17. Shematski prikaz aparature za indirektnu kalorimetriju kod životinja _____	52
Slika 18. Test hipofagije uzrokovane novim okruženjem _____	54
Slika 19. Protokol postupaka provedenih kod ljudskih ispitanika _____	56
Slika 20. Određivanje zona interesa na originalnim snimkama termalne kamere _____	57
Slika 21. Izražaj mRNA za gvanilin, urogvanilin te gvanilat-ciklazu C u pojedinim regijama mozga _____	60
Slika 22. Izražaj urogvanilina u mozgu _____	61

Slika 23. Izražaj gvanilat-ciklaze C u mišjem mozgu _____	63
Slika 24. Izražaj gvanilat-ciklaze C u arkuatnoj jezgri hipotalamusa _____	65
Slika 25. Smanjen izražaj gvanilat-ciklaze C u hipotalamusu ženki u odnosu na izražaj u hipotalamusu mužjaka _____	65
Slika 26. Promjene izražaja urogvanilina nakon hranjenja u različitim regijama mozga u mužjaka divljeg tipa _____	66
Slika 27. Izražaj mRNA za urogvanilin se mijenja s hranjenjem kod mužjaka divljeg tipa miševa _____	67
Slika 28. Promjene izražaja gvanilat-ciklaze C nakon hranjenja u hipotalamusu mužjaka divljeg tipa _____	68
Slika 29. Promjene izražaja urogvanilina nakon primjene inzulina intracerebroventrikularno _____	70
Slika 30. Smještaj i procjena vijabilnosti Purkinjeovih stanica _____	71
Slika 31. Urogvanilin hiperpolarizira Purkinjeove stanice malog mozga _____	72
Slika 32. Različiti oblici izbijanja Purkinjeovih stanica malog mozga _____	72
Slika 33. Djelovanje urogvanilina na spontana izbijanja Purkinjeovih stanica malog mozga _____	73
Slika 34. Učinak urogvanilina na izbijanje akcijskih potencijala Purkinjeovih stanica _____	74
Slika 35. Signalni put urogvanilina neovisan o gvanilat-ciklazi C u primarnoj kulturi astrocita _____	76
Slika 36. Urogvanilin aktivira transport H^+ i HCO_3^- _____	77
Slika 37. Signalni put urogvanilina ovisan o Ca^{2+} u astrocitima kore malog mozga _	78
Slika 38. Signalni put urogvanilina ovisan o Ca^{2+} u astrocitima kore velikog mozga _	80
Slika 39. Aktivnost i volumen interskapularnog smeđeg masnog tkiva smanjeni su kod životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C _____	81
Slika 40. Mišićna aktivnost divljih tipova i životinja kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C prije te 2h nakon obroka _____	82
Slika 41. Životinje kojima nedostaje gvanilat-ciklaza C imaju povišenu tjelesnu temperaturu zbog povećane tjelesne aktivnosti _____	83
Slika 42. Promjene potrošnje energije nakon obroka _____	84
Slika 43. Porast aktivnosti intraskapularnog smeđeg masnog tkiva nakon obroka _	85
Slika 44. Hipofagija uzrokovana novom okolinom _____	86
Slika 45. Promjena aktivnosti smeđeg masnog tkiva 30 min nakon obroka _____	89

Slika 46. Termogeneza uzrokovana hranom kod muškaraca i žena _____	90
Slika 47. Učinci novog signalnog puta u astrocitima neovisnog o gvanilat-ciklazi C _____	98
Slika 48. Uloga urogvanilina u aktivaciji smeđeg masnog tkiva nakon obroka _____	104

POPIS TABLICA:

Tablica 1. Razlika u strukturi gvanilinskih peptida kod pojedinih životinjskih vrsta _____	3
Tablica 2. Membranske gvanilat-ciklaze _____	9
Tablica 3. Izražaj natriuretskih peptida i njihovih receptora u mozgu _____	19
Tablica 4. Korištene početnice za RT-PCR reakciju _____	36
Tablica 5. Protutijela korištena za analizu proteina metodom <i>Western blot</i> _____	41
Tablica 6. Protutijela korištena za imunohistokemijsku analizu _____	42
Tablica 7. Karakteristike ispitanika u istraživanju _____	55
Tablica 8. Korelacije aktivnosti smeđeg masnog tkiva i koncentracije glukoze u krvi nakon obroka _____	87
Tablica 9. Izražaj gvanilinskih peptida i gvanilat-ciklaze C u pojedinim regijama mozga _____	94

11. POPIS LITERATURE

1. Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL, et al. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(3):947–51.
2. Hamra FK, Forte LR, Eber SL, Pidhorodeckyj NV, Krause WJ, Freeman RH, et al. Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(22):10464–8.
3. Forte LR, Eber SL, Fan X, London RM, Wang Y, Rowland LM, et al. Lymphoguanylin: cloning and characterization of a unique member of the guanylin peptide family. *Endocrinology*. 1999;140(4):1800–6.
4. Yuge S, Inoue K, Hyodo S, Takei Y. A novel guanylin family (guanylin, uroguanylin, and renoguanylin) in eels: possible osmoregulatory hormones in intestine and kidney. *J Biol Chem*. 2003;278(25):22726–33.
5. Burgess MN, Bywater RJ, Cowley CM, Mullan NA, Newsome PM. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect Immun*. 1978;21(2):526–31.
6. Field M, Graf LH, Laird WJ, Smith PL. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(6):2800–4.
7. Guerrant RL, Hughes JM, Chang B, Robertson DC, Murad F. Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: studies of tissue specificity, potential receptors, and intermediates. *J Infect Dis*. 1980;142(2):220–8.
8. Giannella RA. Pathogenesis of acute bacterial diarrheal disorders. *Annu Rev Med*. 1981;32:341–57.
9. Huott PA, Liu W, McRoberts JA, Giannella RA, Dharmasathaphorn K. Mechanism of action of *Escherichia coli* heat stable enterotoxin in a human colonic cell line. *J Clin Invest*. 1988;82(2):514–23.
10. Hughes JM, Murad F, Bing C, Guerrant RL. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Nature*. 1978;271(5647):755–6.
11. Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin HM, Goeddel DV, et al. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature*. 1989;338:78–83.
12. Chang MS, Lowe DG, Lewis M, Hellmiss R, Chen E, Goeddel DV. Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature*. 1989;341(6237):68–72.
13. Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, et al. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science*. 1991;252:120–3.
14. Schulz S, Green CK, Yuen PS, Garbers DL. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell*. 1990;63(5):941–8.

15. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One*. 2013;8(9):e72788.
16. Laney DJ, Mann EA, Dellon SC, Perkins DR, Giannella RA, Cohen MB. Novel sites for expression of an *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin receptor in the developing rat. *Am J Physiol*. 1992;263(5):G816–21.
17. Krause WJ, Freeman RH, Eber SL, Hamra FK, Fok KF, Currie MG, et al. Distribution of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin/guanylin/uroguanylin receptors in the avian intestinal tract. *Acta Anat (Basel)*. 1995;153(3):210–9.
18. Krause WJ, Freeman RH, Eber SL, Hamra FK, Currie MG, Forte LR. Guanylyl cyclase receptors and guanylin-like peptides in reptilian intestine. *Gen Comp Endocrinol*. 1997;107(2):229–39.
19. Comrie MM, Cutler CP, Cramb G. Cloning and expression of guanylin from the European eel (*Anguilla anguilla*). *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281(5):1078–85.
20. Cramb G, Martinez AS, McWilliam IS, Wilson GD. Cloning and expression of guanylin-like peptides in teleost fish. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1040(0):277–80.
21. de Sauvage FJ, Keshav S, Kuang WJ, Gillett N, Henzel W, Goeddel DV. Precursor structure, expression, and tissue distribution of human guanylin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(19):9089–93.
22. Mägert HJ, Hill O, Zucht HD, Martin S, Meyer M, Forssmann WG, et al. Porcine guanylin and uroguanylin: cDNA sequences, deduced amino acid sequences, and biological activity of the chemically synthesized peptides. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;259(1):141–8.
23. Kita T, Smith CE, Fok KF, Duffin KL, Moore WM, Karabatsos PJ, et al. Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family. *Am J Physiol*. 1994;266(2):F342–8.
24. Fan X, Hamra FK, London RM, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, et al. Structure and activity of uroguanylin and guanylin from the intestine and urine of rats. *Am J Physiol*. 1997;273(5):E957–64.
25. Sindić A, Schlatter E. Mechanisms of actions of guanylin peptides in the kidney. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2005;450(5):283–91.
26. Schulz S, Chrisman TD, Garbers DL. Cloning and expression of guanylin. Its existence in various mammalian tissues. *J Biol Chem*. 1992;267(23):16019–21.
27. Cetin Y, Kulaksiz H, Redecker P, Bargsten G, Adermann K, Grube D, et al. Bronchiolar nonciliated secretory (Clara) cells: source of guanylin in the mammalian lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(13):5925–9.
28. Jaleel M, London RM, Eber SL, Forte LR, Visweswariah SS. Expression of the receptor guanylyl cyclase C and its ligands in reproductive tissues of the rat: a potential role for a novel signaling pathway in the epididymis. *Biol Reprod*. 2002;67(6):1975–80.

29. Kulaksiz H, Rausch U, Vaccaro R, Renda TG, Cetin Y. Guanylin and uroguanylin in the parotid and submandibular glands: potential intrinsic regulators of electrolyte secretion in salivary glands. *Histochem Cell Biol.* 2001;115(6):527–33.
30. Reinecke M, David I, Loffing-Cueni D, Ablinger P, Cetin Y, Kuhn M, et al. Localization, expression, and characterization of guanylin in the rat adrenal medulla. *Histochem Cell Biol.* 1996;106(4):367–74.
31. Miyazato M, Nakazato M, Matsukura S, Kangawa K, Matsuo H. Uroguanylin gene expression in the alimentary tract and extra-gastrointestinal tissues. *FEBS Lett.* 1996;398(2–3):170–4.
32. Kulaksiz H, Cetin Y. Uroguanylin and guanylate cyclase C in the human pancreas: expression and mutuality of ligand / receptor localization as indicators of intercellular paracrine signaling pathways. *J Endocrinol.* 2001;170(1):267–75.
33. Maake C, Auf der Maur F, Jovanovic K, Reinecke M, Hauri D, John H. Occurrence and localization of uroguanylin in the aging human prostate. *Histochem Cell Biol.* 2003;119(1):69–76.
34. Fan X, Hamra FK, Freeman RH, Eber SL, Krause WJ, Lim RW, et al. Uroguanylin: cloning of preprouroguanylin cDNA, mRNA expression in the intestine and heart and isolation of uroguanylin and preprouroguanylin from plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;219(2):457–62.
35. Miyazato M, Nakazato M, Yamaguchi H, Date Y, Kojima M, Kangawa K, et al. Cloning and characterization of a cDNA encoding a precursor for human uroguanylin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;219(2):644–8.
36. Perkins A, Goy MF, Li Z. Uroguanylin is expressed by enterochromaffin cells in the rat gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 1997;113(3):1007–14.
37. Fan X, Wang Y, London RM, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, et al. Signaling pathways for guanylin and uroguanylin in the digestive, renal, central nervous, reproductive, and lymphoid systems. *Endocrinology.* 1997;138(11):4636–48.
38. Valentino MA, Lin JE, Snook AE, Li P, Kim GW, Marszalowicz G, et al. A uroguanylin-GUCY2C endocrine axis regulates feeding in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(9):3578–88.
39. Kim GW, Lin JE, Snook AE, Aing AS, Merlino DJ, Li P, et al. Calorie-induced ER stress suppresses uroguanylin satiety signaling in diet-induced obesity. *Nutr Diabetes.* 2016;23(6):e211.
40. Schulz S. Targeted gene disruption in the development of mouse models to elucidate the role of receptor guanylyl cyclase signaling pathways in physiological function. *Methods.* 1999;19(4):551–8.
41. Hill O, Kuhn M, Zucht HD, Cetin Y, Kulaksiz H, Adermann K, et al. Analysis of the human guanylin gene and the processing and cellular localization of the peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(6):2046–50.

42. Mägert HJ, Reinecke M, David I, Raab HR, Adermann K, Zucht HD, et al. Uroguanylin: gene structure, expression, processing as a peptide hormone, and co-storage with somatostatin in gastrointestinal D-cells. *Regul Pept.* 1998;73(3):165–76.
43. Wiegand RC, Kato J, Huang MD, Fok KF, Kachur JF, Currie MG. Human guanylin: cDNA isolation, structure, and activity. *FEBS Lett.* 1992;311(2):150–4.
44. Sindic A. Current understanding of guanylin peptides actions. *ISRN Nephrol.* 2013;2013:813648.
45. Kinoshita H, Fujimoto S, Nakazato M, Yokota N, Date Y, Yamaguchi H, et al. Urine and plasma levels of uroguanylin and its molecular forms in renal diseases. *Kidney Int.* 1997;52(4):1028–34.
46. Hess R, Kuhn M, Schulz-Knappe P, Raida M, Fuchs M, Klodt J, et al. GCAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. *FEBS Lett.* 1995;374(1):34–8.
47. Nakazato M, Yamaguchi H, Shiomi K, Date Y, Fujimoto S, Kangawa K, et al. Identification of 10-kDa proguanylin as a major guanylin molecule in human intestine and plasma and its increase in renal insufficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205:1966–75.
48. Date Y, Nakazato M, Yamaguchi H, Miyazato M, Matsukura S. Tissue distribution and plasma concentration of human guanylin. *Intern Med.* 1996;35(3):171–5.
49. Kuhn M, Raida M, Adermann K, Schulz-Knappe P, Gerzer R, Heim JM, et al. The circulating bioactive form of human guanylin is a high molecular weight peptide (10.3 kDa). *FEBS Lett.* 1993;318(2):205–9.
50. Martin S, Adermann K, Forssmann WG, Kuhn M. Regulated, side-directed secretion of proguanylin from isolated rat colonic mucosa. *Endocrinology.* 1999;140(11):5022–9.
51. Moro F, Levenez F, Nemoz-Gaillard E, Pellissier S, Plaisancie P, Cuber JC. Release of guanylin immunoreactivity from the isolated vascularly perfused rat colon. *Endocrinology.* 2000;141(7):2594–9.
52. Li Z, Perkins AG, Peters MF, Campa MJ, Goy MF. Purification, cDNA sequence, and tissue distribution of rat uroguanylin. *Regul Pept.* 1997;68(1):45–56.
53. Nakazato M, Yamaguchi H, Kinoshita H, Kangawa K, Matsuo H, Chino N, et al. Identification of biologically active and inactive human uroguanylin in plasma and urine and their increases in renal insufficiency. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;220(3):586–93.
54. Moss NG, Fellner RC, Qian X, Yu SJ, Li Z, Nakazato M, et al. Uroguanylin, an intestinal natriuretic peptide, is delivered to the kidney as an unprocessed propeptide. *Endocrinology.* 2008;149(9):4486–98.

55. Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, et al. Guanylin and uroguanylin stimulate lipolysis in human visceral adipocytes. *Int J Obes*. 2016;40(9):1405–15.
56. Di Guglielmo MD, Perdue L, Adeyemi A, van Golen KL, Corao DU. Immunohistochemical staining for uroguanylin, a satiety hormone, is decreased in intestinal tissue specimens from female adolescents with obesity. *Pediatr Dev Pathol*. 2017;1:109352661772291.
57. Folgueira C, Sanchez-Rebordelo E, Barja-Fernandez S, Leis R, Tovar S, Casanueva FF, et al. Uroguanylin levels in intestine and plasma are regulated by nutritional status in a leptin-dependent manner. *Eur J Nutr*. 2016;55(2):529–36.
58. Di Guglielmo MD, Tonb D, He Z, Adeyemi A, van Golen KL. A pilot study measuring the novel satiety hormone, pro-uroguanylin, in adolescents with and without obesity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;66(3):1.
59. Carrithers SL, Jackson BA, Cai WY, Greenberg RN, Ott CE. Site-specific effects of dietary salt intake on guanylin and uroguanylin mRNA expression in rat intestine. *Regul Pept*. 2002;107(1–3):87–95.
60. Li Z, Knowles JW, Goyeau D, Prabhakar S, Short DB, Perkins AG, et al. Low salt intake down-regulates the guanylin signaling pathway in rat distal colon. *Gastroenterology*. 2015;111(6):1714–21.
61. Blanchard RK, Cousins RJ. Differential display of intestinal mRNAs regulated by dietary zinc. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(14):6863–8.
62. Steinbrecher KA, Rudolph JA, Luo G, Cohen MB. Coordinate upregulation of guanylin and uroguanylin expression by hypertonicity in HT29-18-N2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(6):C1729-37.
63. Fellner RC, Moss NG, Goy MF. Dietary salt regulates uroguanylin expression and signaling activity in the kidney, but not in the intestine. *Physiol Rep*. 2016;4(9):1–16.
64. Potthast R, Ehler E, Scheving LA, Sindic A, Schlatter E, Kuhn M. High salt intake increases uroguanylin expression in mouse kidney. *Endocrinology*. 2001;142(7):3087–97.
65. Greenberg RN, Hill M, Crytzer J, Krause WJ, Eber SL, Hamra FK, et al. Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and Escherichia coli heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *J Investig Med*. 1997;45:276–82.
66. Hamra FK, Fan X, Krause WJ, Freeman RH, Chin DT, Smith CE, et al. Prouroguanylin and proguanylin: purification from colon, structure, and modulation of bioactivity by proteases. *Endocrinology*. 1996;137(1):257–65.
67. Qian X, Moss NG, Fellner RC, Goy MF. Circulating prouroguanylin is processed to its active natriuretic form exclusively within the renal tubules. *Endocrinology*. 2008;149(9):4499–509.

68. Hardman JG, Sutherland EW. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem.* 1969;244(23):6363–70.
69. White AA, Aurbach GD. Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta.* 1969;191(3):686–97.
70. Schultz G, Böhme E, Munske K. Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci.* 1969;8(24):1323–32.
71. Ashman DF, Lipton R, Melicow MM, Price TD. Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun.* 1963;11(4):330–4.
72. Kimura H, Murad F. Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. *J Biol Chem.* 1974;249(21):6910–6.
73. Chrisman TD, Garbers DL, Parks MA, Hardman JG. Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung. *J Biol Chem.* 1975;250(2):374–81.
74. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(8):3203–7.
75. Lowe DG, Chang MS, Hellmiss R, Chen E, Singh S, Garbers DL, et al. Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. *EMBO J.* 1989;8(5):1377–84.
76. Fülle HJ, Vassar R, Foster DC, Yang RB, Axel R, Garbers DL. A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(8):3571–5.
77. Juilfs DM, Fülle HJ, Zhao AZ, Houslay MD, Garbers DL, Beavo JA. A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(7):3388–95.
78. Leinders-Zufall T, Cockerham RE, Michalakis S, Biel M, Garbers DL, Reed RR, et al. Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(36):14507–12.
79. Yang RB, Foster DC, Garbers DL, Fülle HJ. Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(2):602–6.
80. Shyjan AW, de Sauvage FJ, Gillett NA, Goeddel DV., Lowe DG. Molecular cloning of a retina-specific membrane guanylyl cyclase. *Neuron.* 1992;9(4):727–37.
81. Lowe DG, Dizhoor AM, Liu K, Gu Q, Spencer M, Laura R, et al. Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(12):5535–9.

82. Yang RB, Garbers DL. Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers. *J Biol Chem.* 1997;272(21):13738–42.
83. Dizhoor AM, Olshevskaya EV, Peshenko IV. Mg²⁺/Ca²⁺ cation binding cycle of guanylyl cyclase activating proteins (GCAPs): role in regulation of photoreceptor guanylyl cyclase. *Mol Cell Biochem.* 2010;334(1–2):117–24.
84. Liu CY, Fraser SE, Koos DS. The Grueneberg Ganglion olfactory subsystem employs a cGMP signaling pathway. *J Comp Neurol.* 2009;516(1):36–48.
85. Chao YC, Chen CC, Lin YC, Breer H, Fleischer J, Yang RB. Receptor guanylyl cyclase-G is a novel thermosensory protein activated by cool temperatures. *EMBO J.* 2015;34(3):294–306.
86. Kuhn M. Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors. *Physiol Rev.* 2016;96(2):751–804.
87. Chinkers M, Garbers DL. The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. *Science.* 1989;245(4924):1392–4.
88. Wilson EM, Chinkers M. Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. *Biochemistry.* 1995;34(14):4696–701.
89. Qiu Y, Ogawa H, Miyagi M, Misono KS. Constitutive activation and uncoupling of the atrial natriuretic peptide receptor by mutations at the dimer interface: role of the dimer structure in signaling. *J Biol Chem.* 2004;279(7):6115–23.
90. Potter LR, Garbers DL. Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-a receptor causes desensitization. *J Biol Chem.* 1992;267(21):14531–4.
91. Potter LR, Hunter T. Identification and characterization of the major phosphorylation sites of the B-type natriuretic peptide receptor. *J Biol Chem.* 1998;273(25):15533–9.
92. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev.* 2000;52(3):375–413.
93. Chrisman TD, Garbers DL. Reciprocal antagonism coordinates C-type natriuretic peptide and mitogen-signaling pathways in fibroblasts. *J Biol Chem.* 1999;274(7):4293–9.
94. Haneda M, Kikkawa R, Maeda S, Togawa M, Koya D, Horide N, et al. Dual mechanism of angiotensin II inhibits ANP-induced mesangial cGMP accumulation. *Kidney Int.* 1991;40(2):188–94.
95. Potter LR. Guanylyl cyclase structure, function and regulation. *Cell Signal.* 2011;12:1921–6.
96. Wall ME, Francis SH, Corbin JD, Grimes K, Richie-Jannetta R, Kotera J, et al. Mechanisms associated with cGMP binding and activation of cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(5):2380–5.

97. Jarchau T, Häusler C, Markert T, Pöhler D, Vanderkerckhove J, De Jonge HR, et al. Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(20):9426–30.
98. Orstavik S, Solberg R, Taskén K, Nordahl M, Altherr MR, Hansson V, et al. Molecular cloning, cDNA structure, and chromosomal localization of the human type II cGMP-dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;220(3):759–65.
99. Qian Y, Chao DS, Santillano DR, Cornwell TL, Nairn AC, Greengard P, et al. cGMP-dependent protein kinase in dorsal root ganglion: relationship with nitric oxide synthase and nociceptive neurons. *J Neurosci*. 1996;16(10):3130–8.
100. Lohmann SM, Walter U, Miller PE, Greengard P, De Camilli P. Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(1):653–7.
101. El-Husseini AE, Williams J, Reiner PB, Pelech S, Vincent SR. Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain. *J Chem Neuroanat*. 1999;17(1):45–55.
102. Revermann M, Maronde E, Ruth P, Korf HW. Protein kinase G I immunoreaction is colocalized with arginine-vasopressin immunoreaction in the rat suprachiasmatic nucleus. *Neurosci Lett*. 2002;334(2):119–22.
103. Kleppisch T, Pfeifer A, Klatt P, Ruth P, Montkowski A, Fässler R, et al. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J Neurosci*. 1999;19(1):48–55.
104. Geiselhöringer A, Gaisa M, Hofmann F, Schlossmann J. Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues. *FEBS Lett*. 2004;575(1–3):19–22.
105. el-Husseini AE, Bladen C, Vincent SR. Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *J Neurochem*. 1995;64(6):2814–7.
106. De Vente J, Asan E, Gambaryan S, Markerink-van Ittersum M, Axer H, Gallatz K, et al. Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain. *Neuroscience*. 2001;108(1):27–49.
107. Oster H, Werner C, Magnone MC, Mayser H, Feil R, Seeliger MW, et al. cGMP-dependent protein kinase II modulates mPer1 and mPer2 gene induction and influences phase shifts of the circadian clock. *Curr Biol*. 2003;13(9):725–33.
108. Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(4):290–314.
109. Kaupp UB, Seifert R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev*. 2002;82(3):769–824.

110. Vaandrager AB, Van der Wiel E, De Jonge HR. Heat-stable enterotoxin activation of immunopurified guanylyl cyclase C. Modulation by adenine nucleotides. *J Biol Chem.* 1993;268(26):19598–603.
111. Vaandrager AB, Van Der Wiel E, Hom ML, Luthjens LH, De Jonge HR. Heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C is an oligomer consisting of functionally distinct subunits, which are non-covalently linked in the intestine. *J Biol Chem.* 1994;269(23):16409–15.
112. Hasegawa M, Matsumoto-Ishikawa Y, Hijikata A, Hidaka Y, Go M, Shimonishi Y. Disulfide linkages and a three-dimensional structure model of the extracellular ligand-binding domain of guanylyl cyclase C. *Protein J.* 2005;24(5):315–25.
113. Ghanekar Y, Chandrashaker A, Tatu U, Visweswariah SS. Glycosylation of the receptor guanylate cyclase C: role in ligand binding and catalytic activity. *Biochem J.* 2004;379(Pt 3):653–63.
114. Vaandrager AB, Schulz S, De Jonge HR, Garbers DL. Guanylyl cyclase C is an N-linked glycoprotein receptor that accounts for multiple heat-stable enterotoxin-binding proteins in the intestine. *J Biol Chem.* 1993;268(3):2174-9.
115. Crane JK, Shanks KL. Phosphorylation and activation of the intestinal guanylyl cyclase receptor for *Escherichia coli* heat-stable toxin by protein kinase C. *Mol Cell Biochem.* 1996;165(2):111–20.
116. Crane JK, Wehner MS, Bolen EJ, Sando JJ, Linden J, Guerrant RL, et al. Regulation of intestinal guanylate cyclase by the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (STa) and protein kinase C. *Infect Immun.* 1992;60(12):5004–12.
117. Roy N, Guruprasad MR, Kondaiah P, Mann EA, Giannella RA, Visweswariah SS. Protein kinase C regulates transcription of the human guanylate cyclase C gene. *Eur J Biochem.* 2001;268(7):2160–71
118. Bhandari R, Suguna K, Visweswariah SS. Guanylyl cyclase C receptor: regulation of catalytic activity by ATP. *Biosci Rep.* 1999;19(3):179–88.
119. Gazzano H, Wu HI, Waldman SA. Activation of particulate guanylate cyclase by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is regulated by adenine nucleotides. *Infect Immun.* 1991;59(4):1552-7.
120. Scheving LA, Russell WE. Guanylyl cyclase C is up-regulated by nonparenchymal cells and hepatocytes in regenerating rat liver. *Cancer Res.* 1996;56(22):5186–91.
121. Mann EA, Shanmukhappa K, Cohen MB. Lack of guanylate cyclase C results in increased mortality in mice following liver injury. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:86.
122. Laney DW, Bezerra JA, Kosiba JL, Degen SJ, Cohen MB. Upregulation of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin receptor in regenerating rat liver. *Am J Physiol.* 1994;266(5):G899–906.
123. Krause WJ, Freeman RH, Fort LR. Autoradiographic demonstration of specific binding sites for *E. coli* enterotoxin in various epithelia of the North American

- opossum. *Cell Tissue Res.* 1990;260:387–94.
124. Spreca A, Simonetti S, Rambotti MG. Atrial natriuretic peptide and guanylin-activated guanylate cyclase isoforms in human sweat glands. *Histochem J.* 2000;32(12):725–31.
 125. Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, et al. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology.* 1992;130(1):229–39.
 126. Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M, et al. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(13):7403–8.
 127. Porter JG, Arfsten A, Fuller F, Miller JA, Gregory LC, Lewicki JA. Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;171(2):796–803.
 128. Murthy KS, Teng BQ, Zhou H, Jin JG, Grider JR, Makhoul GM, et al. G(i-1)/G(i-2)-dependent signaling by single-transmembrane natriuretic peptide clearance receptor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2018;(30):G974–80.
 129. Rose RA, Giles WR. Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature. *J Physiol.* 2008;586(2):353–66.
 130. Maack T. Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu Rev Physiol.* 1992;54:11–27.
 131. Qian X, Prabhakar S, Nandi A, Visweswariah SS, Goy MF. Expression of GC-C, a receptor-guanylate cyclase, and its endogenous ligands uroguanylin and guanylin along the rostrocaudal axis of the intestine. *Endocrinology.* 2000;141(9):3210–24.
 132. Ganguly U, Chaudhury AG, Basu A, Sen PC. STa-induced translocation of protein kinase C from cytosol to membrane in rat enterocytes. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;204(1):65–9.
 133. Gupta DD, Saha S, Chakrabarti MK. Involvement of protein kinase C in the mechanism of action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) in a human colonic carcinoma cell line, COLO-205. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;206(1):9-16.
 134. Carrithers SL, Ott CE, Hill MJ, Johnson BR, Cai W, Chang JJ, et al. Guanylin and uroguanylin induce natriuresis in mice lacking guanylyl cyclase-C receptor. *Kidney Int.* 2004;65(1):40–53.
 135. Sindić A, Velic A, Başoğlu C, Hirsch JR, Edemir B, Kuhn M, et al. Uroguanylin and guanylin regulate transport of mouse cortical collecting duct independent of guanylate cyclase C. *Kidney Int.* 2005;68(3):1008–17.

136. Sindić A, Hirsch JR, Velic A, Piechota H, Schlatter E. Guanylin and uroguanylin regulate electrolyte transport in isolated human cortical collecting ducts. *Kidney Int.* 2005;67(4):1420–7.
137. Lorenz JN, Nieman M, Sabo J, Sanford LP, Hawkins JA, Elitsur N, et al. Uroguanylin knockout mice have increased blood pressure and impaired natriuretic response to enteral NaCl load. *J Clin Invest.* 2003;112(8):1244–54.
138. Begg DP, Steinbrecher KA, Mul JD, Chambers AP, Kohli R, Haller A, et al. Effect of guanylate cyclase-C activity on energy and glucose homeostasis. *Diabetes.* 2014;63(11):3798–804.
139. London RM, Krause WJ, Fan X, Eber SL, Forte LR. Signal transduction pathways via guanylin and uroguanylin in stomach and intestine. *Am J Physiol.* 1997;273(1):G93-105.
140. Wiegand RC, Kato J, Currie MG. Rat guanylin cDNA: Characterization of the precursor of an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;185(3):812–7.
141. Nakazato M, Yamaguchi H, Date Y, Miyazato M, Kangawa K, Goy MF, et al. Tissue distribution, cellular source, and structural analysis of rat immunoreactive uroguanylin. *Endocrinology.* 1998;139(12):5247–54.
142. Ikpa PT, Sleddens HF, Steinbrecher KA, Peppelenbosch MP, de Jonge HR, Smits R, et al. Guanylin and uroguanylin are produced by mouse intestinal epithelial cells of columnar and secretory lineage. *Histochem Cell Biol.* 2016;146(4):445-55.
143. Whitaker TL, Witte DP, Scott MC, Cohen MB. Uroguanylin and guanylin: distinct but overlapping patterns of messenger RNA expression in mouse intestine. *Gastroenterology.* 1997;113(3):1000–6.
144. Date Y, Nakazato M, Yamaguchi H, Kangawa K, Kinoshita Y, Chiba T, et al. Enterochromaffin-like cells, a cellular source of uroguanylin in rat stomach. *Endocrinology.* 1999;140(5):2398–404.
145. Prinz C, Kajimura M, Scott DR, Mercier F, Helander HF, Sachs G. Histamine secretion from rat enterochromaffinlike cells. *Gastroenterology.* 1993;105(2):449–61.
146. Charney AN, Egnor RW, Alexander-Chacko JT, Zaharia V, Mann EA, Giannella RA. Effect of *E. coli* heat-stable enterotoxin on colonic transport in guanylyl cyclase C receptor-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280(2):G216–21.
147. Guba M, Kuhn M, Forssmann WG, Classen M, Gregor M, Seidler U. Guanylin strongly stimulates rat duodenal HCO₃-secretion: proposed mechanism and comparison with other secretagogues. *Gastroenterology.* 1996;111(6):1558–68.
148. Joo NS, London RM, Kim HD, Forte LR, Clarke LL. Regulation of intestinal Cl⁻ and HCO₃⁻ secretion by uroguanylin. *Am J Physiol.* 1998;274(4 Pt 1):G633–44.

149. Vaandrager AB, Bot AG, De Jonge HR. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate dependent-protein kinase II mediates heat-stable enterotoxin-provoked chloride secretion in rat intestine. *Gastroenterology*. 2015;112(2):3–5.
150. Vaandrager AB, Bot AG, Ruth P, Pfeifer A, Hofmann F, De Jonge HR. Differential role of cyclic GMP–dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon. *Gastroenterology*. 2000;118(1):108–14.
151. Pfeifer A, Aszodi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fassler R. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP- dependent protein kinase II. *Science*. 1996;274(5295):2082–6.
152. Markert T, Vaandrager AB, Gambaryan S, Pöhler D, Häusler C, Walter U, et al. Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest*. 1995;96(2):822–30.
153. Fawcus K, Gorton VJ, Lucas ML, McEwan GT. Stimulation of three distinct guanylate cyclases induces mucosal surface alkalinisation in rat small intestine in vitro. *Comp Biochem Physiol - A Physiol*. 1997;118(2):291–5.
154. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci*. 1997;22(8):307–312.
155. Forte LR, Thorne PK, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, Francis SH, et al. Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol*. 1992;263(3):C607–15.
156. Dousa TP. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int*. 1999;55(1):29–62.
157. Sindic A. Cellular effects of guanylin and uroguanylin. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(3):607–16.
158. Cuthbert AW, Hickman ME, MacVinish LJ, Evans MJ, Colledge WH, Ratcliff R, et al. Chloride secretion in response to guanylin in colonic epithelial from normal and transgenic cystic fibrosis mice. *Br J Pharmacol*. 1994;112(1):31–6.
159. Seidler U, Blumenstein I, Kretz A, Viellard-Baron D, Rossmann H, Colledge WH, et al. A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca²⁺-dependent HCO₃⁻ secretion. *J Physiol*. 1997;505(2):411–23.
160. Chao AC, de Sauvage FJ, Dong YJ, Wagner JA, Goeddel DV, Gardner P. Activation of intestinal CFTR Cl⁻ channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J*. 1994;13(5):1065–72.
161. Selvaraj NG, Prasad R, Goldstein JL, Rao MC. Evidence for the presence of cGMP-dependent protein kinase-II in human distal colon and in T84, the colonic cell line. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2000;1498(1):32–43.

162. French PJ, Bijman J, Edixhoven M, Vaandrager AB, Scholte BJ, Lohmann SM, et al. Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 1995;270(44):26626–31.
163. Vaandrager AB, Smolenski A, Tilly BC, Houtsmuller AB, Ehlert EM, Bot AG, et al. Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(February):1466–71.
164. Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, et al. Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(20):9262–6.
165. Tien XY, Brasitus TA, Kaetzel MA, Dedman JR, Nelson DJ. Activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by cGMP in the human colonic cancer cell line, Caco-2. *J Biol Chem.* 1994;269(1):51–4.
166. Goldstein JL, Sahi J, Bhuvra M, Layden TJ, Rao MC. Escherichia coli heat-stable enterotoxin-mediated colonic Cl⁻ secretion is absent in cystic fibrosis. *Gastroenterology.* 1994;107(4):950–6.
167. Rao SP, Sellers Z, Crombie DL, Hogan DL, Mann EA, Childs D, et al. A role for guanylate cyclase C in acid-stimulated duodenal mucosal bicarbonate secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286(1):G95–101.
168. Hamra FK, Eber SL, Chin DT, Currie MG, Forte LR. Regulation of intestinal uroguanylin/guanylin receptor-mediated responses by mucosal acidity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(6):2705–10.
169. Sindiće A, Başoğlu C, Cerçi A, Hirsch JR, Potthast R, Kuhn M, et al. Guanylin, uroguanylin, and heat-stable enterotoxin activate guanylate cyclase C and/or a pertussis toxin-sensitive G protein in human proximal tubule cells. *J Biol Chem.* 2002;277(20):17758–64.
170. Steinbrecher KA, Tuohy TM, Heppner Goss K, Scott MC, Witte DP, Groden J, et al. Expression of guanylin is downregulated in mouse and human intestinal adenomas. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273(1):225–30.
171. Cohen MB, Hawkins JA, Witte DP. Guanylin mRNA expression in human intestine and colorectal adenocarcinoma. *Lab invest.* 1998;78(1):101–8.
172. Shailubhai K, Yu HH, Karunanandaa K, Wang JY, Eber SL, Wang Y, et al. Uroguanylin treatment suppresses polyp formation in the Apc(Min/+) mouse and induces apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via cyclic GMP. *apoptosis.* 2000;5:151–7.
173. Li P, Schulz S, Bombonati A, Palazzo JP, Hyslop TM, Xu Y, et al. Guanylyl cyclase C suppresses intestinal tumorigenesis by restricting proliferation and maintaining genomic integrity. *Gastroenterology.* 2007;133(2):599–607.
174. Basu N, Bhandari R, Natarajan VT, Visweswariah SS. Cross talk between receptor guanylyl cyclase C and c-src tyrosine kinase regulates colon cancer cell cytostasis. *Mol Cell Biol.* 2009;29(19):5277–89.

175. Han X, Mann E, Gilbert S, Guan Y, Steinbrecher KA, Montrose MH, et al. Loss of guanylyl cyclase C (GCC) signaling leads to dysfunctional intestinal barrier. *PLoS One*. 2011;6(1):1–13.
176. Blomain ES, Lin JE, Kraft CL, Trela UT, Rock JM, Aing AS, et al. Translating colorectal cancer prevention through the guanylyl cyclase C signaling axis. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2014;6(5):557–64.
177. Vazquez-Roque MI, Bouras EP. Linaclotide, novel therapy for the treatment of chronic idiopathic constipation and constipation-predominant irritable bowel syndrome. *Adv Ther*. 2013;30(3):203–11.
178. Bryant AP, Busby RW, Bartolini WP, Cordero EA, Hannig G, Kessler MM, et al. Linaclotide is a potent and selective guanylate cyclase C agonist that elicits pharmacological effects locally in the gastrointestinal tract. *Life Sci*. 2010;86(19–20):760–5.
179. Chang W-CL, Masih S, Thadi A, Patwa V, Joshi A, Cooper HS, et al. Plecanatide-mediated activation of guanylate cyclase-C suppresses inflammation-induced colorectal carcinogenesis in *Apc +/Min-FCCC* mice. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017;8(1):47.
180. Blanchard RK, Cousin RJ. Upregulation of rat intestinal uroguanylin mRNA by dietary zinc restriction. *Am J Physiol*. 1997;272:972–8.
181. Cui L, Blanchard RK, Coy LM, Cousins RJ. Prouroguanylin overproduction and localization in the intestine of zinc-deficient rats. *J Nutr*. 2000;130(11):2726–32.
182. Blanchard RK, Cousins RJ. Regulation of intestinal gene expression by dietary zinc: induction of uroguanylin mRNA by zinc deficiency. *J Nutr*. 2000;130(5S Suppl):1393S-8S.
183. Cui L, Blanchard RK, Cousins RJ. Dietary zinc deficiency increases uroguanylin accumulation in rat kidney. *Kidney Int*. 2001;59(4):1424–31.
184. Moss NG, Riguera DA, Fellner RC, Cazzolla C, Goy MF. Natriuretic and antihypertensive effects of uroguanylin and prouroguanylin in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;299(6):F1433-42.
185. Qian X, Moss NG, Fellner RC, Taylor-Blake B, Goy MF. The rat kidney contains high levels of prouroguanylin (the uroguanylin precursor) but does not express GC-C (the enteric uroguanylin receptor). *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;300(2):F561-73.
186. Kinoshita H, Fujimoto S, Fukae H, Yokota N, Hisanaga S, Nakazato M, et al. Plasma and urine levels of uroguanylin, a new natriuretic peptide, in nephrotic syndrome. *Nephron*. 1999;81(2):160–4.
187. Fukae H, Kinoshita H, Fujimoto S, Nakazato M, Eto T. Plasma concentration of uroguanylin in patients on maintenance dialysis therapy. *Nephron*. 2000;84(3):206–10.

188. Kikuchi M, Fujimoto S, Fukae H, Kinoshita H, Kita T, Nakazato M, et al. Role of uroguanylin, a peptide with natriuretic activity, in rats with experimental nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(2):392–7.
189. Baba A, Fujimoto S, Kikuchi M, Kita T, Kitamura K. Effects of uroguanylin on natriuresis in experimental nephrotic rats. *Nephrology.* 2009;14(1):80–5.
190. John M, Wiedenmann B, Kruhoffer M, Adermann K, Ankorina-Stark I, Schlatter E, et al. Guanylin stimulates regulated secretion from human neuroendocrine pancreatic cells. *Gastroenterology.* 1998;114(4):791–7.
191. Kulaksiz H, Schmid A, Hönscheid M, Eissele R, Klempnauer J, Cetin Y. Guanylin in the human pancreas: A novel luminocrine regulatory pathway of electrolyte secretion via cGMP and CFTR in the ductal system. *Histochem Cell Biol.* 2001;115(2):131–45.
192. Kloeters O, Friess H, Giese N, Buechler MW, Cetin Y, Kulaksiz H. Uroguanylin inhibits proliferation of pancreatic cancer cells. *Scand J Gastroenterol.* 2008;43(4):447–55.
193. Schwabe K, Cetin Y. Guanylin and functional coupling proteins in the hepatobiliary system of rat and guinea pig. *Histochem Cell Biol.* 2012;137(5):589–97.
194. Tran-Paterson R, Davin D, Krauss RD, Rado TA, Miller DM. Expression and regulation of the cystic fibrosis gene during rat liver regeneration. *Am J Physiol.* 1992;263(1 Pt 1):C55-60.
195. Range SP, Holland ED, Basten GP, Knox AJ. Regulation of guanosine 3':5'-cyclic monophosphate in ovine tracheal epithelial cells. *Br J Pharmacol.* 1997;120(7):1249–54.
196. Zhang ZH, Jow F, Numann R, Hinson J. The airway-epithelium: A novel site of action by guanylin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;244(1):50–6.
197. Ohbayashi H, Yamaki K, Suzuki R, Takagi K. Effects of uroguanylin and guanylin against antigen-induced bronchoconstriction and airway microvascular leakage in sensitized guinea-pigs. *Life Sci.* 1998;62(20):1833–44.
198. Ohbayashi H, Yamaki KI. Both inhalant and intravenous uroguanylin inhibit leukotriene C4-induced airway changes. *Peptides.* 2000;21(10):1467–72.
199. Sousa CM, Havt A, Santos CF, Arnaud-Batista FJ, Cunha KM, Cerqueira JB, et al. The relaxation induced by uroguanylin and the expression of natriuretic peptide receptors in human corpora cavernosa. *J Sex Med.* 2010;7(11):3610–9.
200. Cao LH, Yang XL. Natriuretic peptides and their receptors in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 2008;84(3):234–48.
201. Tong Y, Pelletier G. Ontogeny of atrial natriuretic factor (ANF) binding in various areas of the rat brain. *Neuropeptides.* 1990;16(2):63–8.
202. Scott JN, Jennes L. Localization of 125I-atrial natriuretic peptide (ANP) in the rat fetus. *Anat Embryol (Berl).* 1991;183(3):245–9.

203. Zorad S, Tsutsumi K, Bhatia AJ, Saavedra JM. Localization and characteristics of atrial natriuretic peptide receptors in prenatal and postnatal brain. 1993;241:195–200.
204. Diccico-Bloom E, Lelièvre V, Zhou X, Rodriguez W, Tam J, Waschek JA. Embryonic expression and multifunctional actions of the natriuretic peptides and receptors in the developing nervous system. *Dev Biol.* 2004;271(1):161–75.
205. Fernández BE, Domínguez AE, Vatta MS, Mendez MA, Bianciotti LG, Martínez Seeber A. Atrial natriuretic peptide and angiotensin II interaction on noradrenaline uptake in the central nervous system. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1990;307:11–7.
206. Vatta M, Travaglianti M, Bianciotti L, Coll C, Perazzo J, Fernández B. Atrial natriuretic factor effects on norepinephrine uptake in discrete telencephalic and diencephalic nuclei of the rat. *Brain Res.* 1994;646(2):324–6.
207. Vatta M, Rodríguez-Fermepín M, Bianciotti L, Perazzo J, Monserrat A, Fernández B. Atrial natriuretic factor enhances norepinephrine uptake in circumventricular organs, locus coeruleus and nucleus tractus solitarii of the rat. *Neurosci Lett.* 1995;197(1):29–32.
208. Vatta MS, Presas M, Bianciotti LG, Zarrabeitia V, Fernández BE. B and C types natriuretic peptides modulate norepinephrine uptake and release in the rat hypothalamus. *Regul Pept.* 1996;65(3):175–84.
209. Vatta MS, Rodríguez-Fermepín M, Durante G, Bianciotti LG, Fernández BE. Atrial natriuretic factor inhibits norepinephrine biosynthesis and turnover in the rat hypothalamus. *RegulPept.* 1999;85:101–7.
210. Kanwal S, Elmquist BJ, Trachte GJ. Atrial natriuretic peptide inhibits evoked catecholamine release by altering sensitivity to calcium. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;283(2):426–33.
211. Okuya S, Yamashita H. Effects of atrial natriuretic polypeptide on rat hypothalamic neurones in vitro. *J Physiol.* 1987;389:717–28.
212. Richard D, Bourque CW. Atrial natriuretic peptide modulates synaptic transmission from osmoreceptor afferents to the supraoptic nucleus. *J Neurosci.* 1996;16(23):7526–32.
213. Pan JT, Lai CJ, Yen SH. Effects of natriuretic peptides and dopamine on single-unit activity of dorsomedial arcuate neurons in rat brain slices. *Brain Res.* 1996;737(1–2):78–82.
214. Yu YC, Cao LH, Yang XL. Modulation by brain natriuretic peptide of GABA receptors on rat retinal ON-type bipolar cells. *J Neurosci.* 2006;26(2):696–707.
215. Dobrivojević M, Špiranec K, Gorup D, Erjavec I, Habek N, Radmilović M, et al. Urodilatin reverses the detrimental influence of bradykinin in acute ischemic stroke. *Exp Neurol.* 2016;284(Pt A):1–10.

216. Kuribayashi K, Kitaoka Y, Kumai T, Munemasa Y, Kitaoka Y, Iseoumi K, et al. Neuroprotective effect of atrial natriuretic peptide against NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *Brain Res.* 2006;1071(1):34–41.
217. Gonçalves J, Grove KL, Deschepper CF. Generation of cyclic guanosine monophosphate in brain slices incubated with atrial or C-type natriuretic peptides: comparison of the amplitudes and cellular distribution of the responses. *Regul Pept.* 1995;57(1):55–63.
218. Hosli E, Hosli L. Autoradiographic localization of binding sites for arginine vasopressin and atrial natriuretic peptide on astrocytes and neurons of cultured rat central nervous system. *Neuroscience.* 1992;51(1):159–66.
219. Levin ER, Frank HJ, Gelfand R, Loughlin SE, Kaplan G. Natriuretic peptide receptors in cultured rat diencephalon. *J Biol Chem.* 1990;265(17):10019–24.
220. Simonnet G, Allard M, Legendre P, Gabrion J, Vincent JD. Characteristics and specific localization of receptors for atrial natriuretic peptides at non-neuronal cells in cultured mouse spinal cord cells. *Neuroscience.* 1989;29(1):189–99.
221. Teoh R, Kum W, Cockram CS, Young JD, Nicholls MG. Mouse astrocytes possess specific ANP receptors which are linked to cGMP production. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1989;16(4):323–7.
222. Friedl A, Harmening C, Schmalz F, Schuricht B, Schiller M, Hamprecht B. Elevation by atrial natriuretic factors of cyclic GMP levels in astroglia-rich cultures from murine brain. *J Neurochem.* 1989;52(2):589–97.
223. Summers C, Tang W. Atrial natriuretic peptide receptor subtypes in rat neuronal and astrocyte glial cultures. *Am J Physiol.* 1992;262(5):C1134–43.
224. Latzkovits L, Cserr HF, Park JT, Patlak CS, Pettigrew KD, Rimanoczy A. Effects of arginine vasopressin and atriopeptin on glial cell volume measured as 3-MG space. *Am J Physiol.* 1993;264(3):C603–8.
225. Touyz RM, Picard S, Schiffrin EL, Deschepper CF. Cyclic GMP inhibits a pharmacologically distinct Na⁺/H⁺ exchanger variant in cultured rat astrocytes via an extracellular site of action. *J Neurochem.* 1997;68(0022–3042):1451–61.
226. Folgueira C, Beiroa D, Callon A, Al-Massadi O, Barja-Fernandez S, Senra A, et al. Uroguanylin action in the brain reduces weight gain in obese mice via different efferent autonomic pathways. *Diabetes.* 2016;65(2):421–32.
227. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1500–8.
228. Morrison SF, Nakamura K. Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci.* 2011;16:74–104.
229. Contreras C, Gonzalez F, Fernø J, Diéguez C, Rahmouni K, Nogueiras R, et al. The brain and brown fat. *Ann Med.* 2015;47(2):150–68.

230. Ouellet V, Routhier-Labadie A, Bellemare W, Lakhal-Chaieb L, Turcotte E, Carpentier AC, et al. Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of ¹⁸F-FDG-detected BAT in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(1):192–9.
231. Pfannenberg C, Werner MK, Ripkens S, Stef I, Deckert A, Schmadl M, et al. Impact of age on the relationships of brown adipose tissue with sex and adiposity in humans. *Diabetes.* 2010;59(7):1789–93.
232. Leitner BP, Huang S, Brychta RJ, Duckworth CJ, Baskin AS, McGehee S, et al. Mapping of human brown adipose tissue in lean and obese young men. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 2017;114(32):8649–54.
233. Hibi M, Oishi S, Matsushita M, Yoneshiro T, Yamaguchi T, Usui C, et al. Brown adipose tissue is involved in diet-induced thermogenesis and whole-body fat utilization in healthy humans. *Int J Obes.* 2016;40(11):1655–61.
234. Vosselman MJ, Brans B, van der Lans AA, Wierts R, van Baak MA, Mottaghy FM, et al. Brown adipose tissue activity after a high-calorie meal in humans. *Am J Clin Nutr.* 2013;98(1):57–64.
235. Dodd GT, Decherf S, Loh K, Simonds SE, Wiede F, Balland E, et al. Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell.* 2016;160(1–2):88–104.
236. Kong D, Tong Q, Ye C, Koda S, Fuller PM, Krashes MJ, et al. GABAergic RIP-Cre neurons in the arcuate nucleus selectively regulate energy expenditure. *Cell.* 2012;151(3):645–57.
237. Verboeket-van de Venne WP, Westerterp KR, Hermans-Limpens TJ, de Graaf C, van het Hof KH, Weststrate JA. Long-term effects of consumption of full-fat or reduced-fat products in healthy non-obese volunteers: assessment of energy expenditure and substrate oxidation. *Metabolism.* 1996;45(8):1004–10.
238. Dallongeville J, Hecquet B, Lebel P, Edme JL, Le Fur C, Fruchart JC, et al. Short term response of circulating leptin to feeding and fasting in man: influence of circadian cycle. *Int J Obes.* 1998;22:728–33.
239. Liu X, Wang S, You Y, Meng M, Zheng Z, Dong M, et al. Brown adipose tissue transplantation reverses obesity in Ob/Ob mice. *Endocrinology.* 2015;156(7):2461–9.
240. Fischer AW, Hoefig CS, Abreu-Vieira G, de Jong JMA, Petrovic N, Mittag J, et al. Leptin raises defended body temperature without activating thermogenesis. *Cell Rep.* 2016;14(7):1621–31.
241. Gong R, Ding C, Hu J, Lu Y, Liu F, Mann E, et al. Role for the Membrane receptor guanylyl cyclase-C in attention deficiency and hyperactive behavior. *Science.* 2011;333(6049):1642–6.

242. Hoeke G, Kooijman S, Boon MR, Rensen PC, Berbeé JF. Role of brown fat in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(1):173–82.
243. Mann EA, Jump ML, Wu J, Yee E, Giannella RA. Mice lacking the guanylyl cyclase C receptor are resistant to STA- induced intestinal secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;239(2):463–6.
244. DeVos SL, Miller TM. Direct intraventricular delivery of drugs to the rodent central nervous system. *J Vis Exp*. 2013;(75):1–10.
245. Jungblut M, Tiveron MC, Barral S, Abrahamsen B, Knöbel S, Pennartz S, et al. Isolation and characterization of living primary astroglial cells using the new GLAST-specific monoclonal antibody ACSA-1. *Glia*. 2012;60(6):894–907.
246. Ting JT, Daigle TL, Chen Q, Feng G. Acute brain slice methods for adult and aging animals: application of targeted patch clamp analysis and optogenetics. *Methods Mol Biol*. 2014;1183:221–42.
247. Branca RT, Zhang L, Warren WS, Auerbach E, Khanna A, Degan S, et al. In vivo noninvasive detection of Brown Adipose Tissue through intermolecular zero-quantum MRI. *PLoS One*. 2013;8(9) :e74206.
248. Rasmussen JM, Entringer S, Nguyen A, van Erp TG, Burns J, Guijarro A, et al. Brown adipose tissue quantification in human neonates using water-fat separated MRI. *PLoS One*. 2013;8(10) e77907.
249. Wang X, Minze LJ, Shi ZZ. Functional imaging of brown fat in mice with 18F-FDG micro-PET/CT. *J Vis Exp*. 2012;(69):1–4.
250. Sempere Roldan P, Chereul E, Dietzel O, Magnier L, Pautrot C, Rbah L, et al. Raytest ClearPET™, a new generation small animal PET scanner. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect A Accel Spectrometers, Detect Assoc Equip*. 2007;571(1–2):498–501.
251. Weber S, Morel C, Simon L, Krieguer M, Rey M, Gundlich B, et al. Image reconstruction for the ClearPET™ Neuro. *Nucl Instruments Methods Phys Res Sect A Accel Spectrometers, Detect Assoc Equip*. 2006;569(2):381–5.
252. Thielemans K, Tsoumpas C, Mustafovic S, Beisel T, Aguiar P, Dikaios N, et al. STIR: Software for tomographic image reconstruction release 2. *Phys Med Biol*. 2012;57(4):867–83.
253. Dolezal T, Krsiak M. Guaifenesin enhances the analgesic potency of paracetamol in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2002;366(6):551-4.
254. Kataoka N, Hioki H, Kaneko T, Nakamura K. Psychological stress activates a dorsomedial hypothalamus-medullary raphe circuit driving brown adipose tissue thermogenesis and hyperthermia. *Cell Metab*. 2014;20(2):346–58.
255. Habek N, Kordić M, Jurenec F, Dugandžić A. Infrared thermography, a new method for detection of brown adipose tissue activity after a meal in humans. *Infrared Phys Technol*. 2018;89:271–6.

256. Fenzl A, Kiefer FW. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2014;19(1):25–37.
257. Formenti D, Ludwig N, Rossi A, Trecroci A, Alberti G, Gargano M, et al. Skin temperature evaluation by infrared thermography: Comparison of two image analysis methods during the nonsteady state induced by physical exercise. *Infrared Phys Technol.* 2017;81:32–40.
258. Ang QY, Goh HJ, Cao Y, Li Y, Chan SP, Swain JL, et al. A new method of infrared thermography for quantification of brown adipose tissue activation in healthy adults (TACTICAL): a randomized trial. *J Physiol Sci.* 2017;67(3):395–406.
259. Gelling RW, Morton GJ, Morrison CD, Niswender KD, Myers MG, Rhodes CJ, et al. Insulin action in the brain contributes to glucose lowering during insulin treatment of diabetes. *Cell Metab.* 2006;3(1):67–73.
260. Crane MR, Hugues M, O'Hanley PD, Waldman SA. Identification of two affinity states of low affinity receptors for Escherichia coli heat-stable enterotoxin: correlation of occupation of lower affinity state with guanylate cyclase activation. *Mol Pharmacol.* 1992;41:1073–80.
261. Sindić A, Dobrivojević M, Hirsch JR. Natriuretic peptides in brain physiology. *Transl Neurosci.* 2011;2(3):246–51.
262. Colantuoni C, Lipska BK, Ye T, Hyde TM, Tao R, Leek JT, et al. Temporal dynamics and genetic control of transcription in the human prefrontal cortex. *Nature.* 2012;478(7370):519–23.
263. <http://human.brain-map.org>
264. Vogel C, Marcotte EM. Insights into regulation of protein abundance from proteomics and transcriptomics analyses. *Nat Rev Genet.* 2013;13(4):227–32.
265. Ratzmann KP, Hampel R. Glucose and insulin concentration patterns in cerebrospinal fluid following intravenous glucose injection in humans. *Endokrinologie.* 1980;76(2):185–8.
266. Nishii N, Nodake H, Takasu M, Soe O, Ohba Y, Maeda S, et al. Postprandial changes in leptin concentrations of cerebrospinal fluid in dogs during development of obesity. *Am J Vet Res.* 2006;67(12):2006–11.
267. Scheving LA, Russell WE. Insulin and heregulin- b 1 upregulate guanylyl cyclase C expression in rat hepatocytes Reversal by phosphodiesterase-3 inhibition. *Send to Cell Signal.* 2001;13(9):665–72.
268. Lehner U, Velić A, Schroter R, Schlatter E, Sindić A. Ligands and signaling of the G-protein-coupled receptor GPR14, expressed in human kidney cells. *Cell Physiol Biochem.* 2007;20(1–4):181–92.
269. Wahler GM, Sperelakis N. Use of the cell-attached patch clamp technique to examine regulation of single cardiac K channels by cyclic GMP. *Mol Cell Biochem.* 1988;80(1–2):27–35.

270. Lessa LM, Carraro-Lacroix LR, Crajoinas RO, Bezerra CN, Dariolli R, Girardi AC, et al. Mechanisms underlying the inhibitory effects of uroguanylin on NHE3 transport activity in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(10):F1399–408.
271. da Silva Lima V, Crajoinas RO, Carraro-Lacroix LR, Godinho AN, Dias JLG, Dariolli R, et al. Uroguanylin inhibits H-ATPase activity and surface expression in renal distal tubules by a PKG-dependent pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014;307(6):C532–41.
272. Rozenfeld J, Tal O, Kladnitsky O, Adler L, Efrati E, Carrithers SL, et al. Pendrin, a novel transcriptional target of the uroguanylin system. *Cell Physiol Biochem*. 2013;32(7):221–37.
273. Traynelis SF, Chesler M. Proton release as a modulator of presynaptic function. *Neuron*. 2001;32(6):960–2.
274. Traynelis SF, Cull-Candy SG. Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature*. 1990;345(6273):347–50.
275. Costa-Pessoa JM, Figueiredo CF, Thieme K, Oliveira-Souza M. The regulation of NHE1 and NHE3 activity by angiotensin II is mediated by the activation of the angiotensin II type I receptor/phospholipase C/calcium/calmodulin pathway in distal nephron cells. *Eur J Pharmacol*. 2013;721(1–3):322–31.
276. Hirase H, Qian L, Barthó P, Buzsáki G. Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biol*. 2004;2(4):494–9.
277. Wallach G, Lallouette J, Herzog N, De Pittà M, Jacob EB, Berry H, et al. Glutamate Mediated Astrocytic Filtering of Neuronal Activity. *PLoS Comput Biol*. 2014;10(12):e1003964.
278. Nakahara K, Okada M, Nakanishi S. The metabotropic glutamate receptor mGluR5 induces calcium oscillations in cultured astrocytes via protein kinase C phosphorylation. *J Neurochem*. 1997;69(4):1467–75.
279. Shigemoto R, Nomura S, Ohishi H, Sugihara H, Nakanishi S, Mizuno N. Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. *Neurosci Lett*. 1993;163:53–7.
280. Schwarz JM, Schutz Y, Froidevaux F, Acheson KJ, Jeanprêtre N, Schneider H, et al. Thermogenesis in men and women induced by fructose vs glucose added to a meal. *Am J Clin Nutr*. 1989;49(4):667–74.
281. Carter EA, Bonab AA, Paul K, Yerxa J, Tompkins RG, Fischman AJ. Association of heat production with FDG accumulation by murine brown adipose tissue (BAT) after stress. *J Nucl Med*. 2011;52(9):1616–20.
282. Lee P, Ho KK, Lee P, Greenfield JR, Ho KK, Greenfield JR. Hot fat in a cool man: infrared thermography and brown adipose tissue. *Diabetes, Obes Metab*. 2011;13(1):92–3.

283. Jang C, Jalapu S, Thuzar M, Law PW, Jeavons S, Barclay JL, et al. Infrared thermography in the detection of brown adipose tissue in humans. *Physiol Rep*. 2014;2(11):1–7.
284. Sacks H, Symonds ME. Anatomical locations of human brown adipose tissue: functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2013;62(6):1783–90.
285. Shi H, Strader AD, Woods SC, Seeley RJ. Sexually dimorphic responses to fat loss after caloric restriction or surgical lipectomy. *Am J Physiol Metab*. 2007;293(1):E316–26.
286. Glümer C, Jørgensen T, Borch-Johnsen K. Prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in a Danish population: the Inter99 study. *Diabetes Care*. 2003;26(8):2335–40.
287. Sicree RA, Zimmet PZ, Dunstan DW, Cameron AJ, Welborn TA, Shaw JE. Differences in height explain gender differences in the response to the oral glucose tolerance test - The AusDiab study. *Diabet Med*. 2008;25(3):296–302.
288. van Genugten RE, Utzschneider KM, Tong J, Gerchman F, Zraika S, Udayasankar J, et al. Effects of sex and hormone replacement therapy use on the prevalence of isolated impaired fasting glucose and isolated impaired glucose tolerance in subjects with a family history of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2006;55(12):3529–35.
289. Williams JW, Zimmet PZ, Shaw JE, de Courten MP, Cameron AJ, Chitson P, et al. Gender differences in the prevalence of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance in Mauritius. Does sex matter? *Diabet Med*. 2003;20:915–20.
290. Al-Lawati JA, Mohammed AJ, Al-Hinai HQ, Jousilahti P. Prevalence of the metabolic syndrome among Omani adults. *Diabetes Care*. 2003;26(6):1781–5.
291. Gu D, Reynolds K, Wu X, Chen J, Duan X, Reynolds RF, et al. Prevalence of the metabolic syndrome and overweight among adults in China. *Lancet*. 2005;365(9468):1398–405.
292. Gupta R, Deedwania PC, Gupta A, Rastogi S, Panwar RB, Kothari K. Prevalence of metabolic syndrome in an Indian urban population. *Int J Cardiol*. 2004;97(2):257–61.
293. Quarta C, Mazza R, Pasquali R, Pagotto U. Role of sex hormones in modulation of brown adipose tissue activity. *J Mol Endocrinol*. 2012;49(1):1–7.
294. Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Gracia CR. Obesity and reproductive hormone levels in the transition to menopause. *Menopause*. 2010;17(4):718–26.
295. Valle A, Santandreu FM, García-Palmer FJ, Roca P, Oliver J. The serum levels of 17beta-estradiol, progesterone and triiodothyronine correlate with brown adipose tissue thermogenic parameters during aging. *Cell Physiol Biochem*. 2008;22(1-4):337-46.
296. www.1000genomes.org

297. Egawa M, Yoshimatsu H, Bray GA. Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. *Am J Physiol.* 1991;260:R328–34.
298. Steculorum SM, Ruud J, Karakasilioti I, Backes H, Engström Ruud L, Timper K, et al. AgRP neurons control systemic insulin sensitivity via myostatin expression in brown adipose tissue. *Cell.* 2016;165(1):125–38.
299. Westerterp KR, Verboeket-van de Venne WP, Bouten CV, de Graaf C, van het Hof KH, Weststrate JA. Energy expenditure and physical activity in subjects consuming full- or reduced-fat products aspart of their normal diet. *Br J Nutr.* 1996;76(6):785.
300. Kaiyala KJ, Ogimoto K, Nelson JT, Muta K, Morton GJ. Response to Leptin-deficient mice are not hypothermic, they are anapyrexia. *Mol Metab.* 2017;6(4):313–4.
301. Simões-Silva L, Moreira-Rodrigues M, Quelhas-Santos J, Fernandes-Cerqueira C, Pestana M, Soares-Silva I, et al. Intestinal and renal guanylin peptides system in hypertensive obese mice. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013;238(1):90–7.
302. Kern W, Benedict C, Schultes B, Plohr F, Moser A, Born J, et al. Low cerebrospinal fluid insulin levels in obese humans. *Diabetologia.* 2006;49(11):2790–2.

12. ŽIVOTOPIS

Nikola Habek, dr. med. rođen je 14.11.1988. godine u Zagrebu. Pohađao je 1. Gimnaziju u Zagrebu gdje je tijekom školovanja osvojio više nagrada na državnim natjecanjima iz biologije u znanstvenom radu i znanju. Završio je Osnovnu glazbenu školu Zlatka Balokovića, klasa violina. 2007. godine upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje se rano uključuje u znanstveni rad na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga te je redovito sudjelovao na Festivalu znanosti. Tijekom studija dobitnik je Rektorove nagrade za znanstveni rad koji je i objavljen u međunarodnom časopisu te Stipendije grada Zagreba. Medicinski fakultet završio je 2013. godine s odličnim uspjehom te je odradio pripravnički staž doktora medicine i položio stručni ispit. 2014. godine upisuje poslijediplomski doktorski studij neuroznanosti. Koautor je na 3 rada objavljenih u međunarodnim časopisima indeksiranim u Current Contents te je sudjelovao na više od deset domaćih i međunarodnih kongresa. Stručno se usavršavao u području elektrofiziologije i signalizacije Ca^{2+} u mozgu na Europskom Institutu za Neuroznanost u Göttingenu te je prenio i uspješno uspostavio na Hrvatski institut za istraživanje mozga nekoliko novih metoda iz područja neurofiziologije. Osvojio je više nagrada za najbolji poster na znanstvenim skupovima i na Danu doktorata. Područje interesa mu je neurofiziologija prvenstveno elektrofiziologija i modulacija sinapsi.