

مطالعه اثر تزریق میکرونی آگونیست و آنتاگونیست گیرنده های متابوتروپیک گلوتامات بر میزان اشتها

دکتر علی باغبان زاده^۱، دکتر جواد چراغی^{۲*}، دکتر گیتا امام^۱، دکتر وهاب بابا پور^۱

۱- بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

۲- آموزشکده دامپزشکی، دانشگاه ایلام

تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۲/۵

تاریخ دریافت: ۸۵/۷/۱۷

چکیده

مقدمه: تاکنون در رابطه با نقش گیرنده های متابوتروپیک گلوتامات در تنظیم اشتها تحقیقات بسیار کمی انجام شده است. در این مطالعه به ارتباط گیرنده های متابوتروپیک گلوتامات و اهمیت آنها در تنظیم دریافت غذا در جوجه خروس های گوشتی پرداخته شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۱۲ قطعه جوجه با وزن ۷۵۰-۷۰۰ گرم پرورش داده شد. با استفاده از دستگاه استریو تاکس در بطن راست مغزی پرندگان کانول گذاری انجام شد. سپس با تزریق داخل بطن مغزی (ICV) آگونیست (DHPG) و آنتاگونیست (AIDA) گیرنده های متابوتروپیک گلوتامات بترتیب در دوز های ۱ میکرومول و ۲ میلی مول، دریافت تجمعی غذا در زمانهای مختلف پس از تزریق، با استفاده از کامپیوتر محاسبه گردید. در این تحقیق پرندگان به روش مربع لاتین تکراری در ۴ گروه و در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ داروهای مورد نظر را دریافت نمودند.

یافته های پژوهش: تجویز داخل بطن مغزی DHPG (آگونیست گیرنده گلوتاماتی گروه I)، دریافت غذا را بطور معنی داری افزایش (بطور متوسط ۲۸/۷ درصد) داد. در حالیکه AIDA (آنتاگونیست گیرنده گلوتاماتی گروه I)، دریافت غذا را بطور معنی داری کاهش (بطور متوسط ۳۰ درصد) داد ($P < 0/05$).

نتیجه گیری نهایی: بر اساس نتایج بدست آمده، گیرنده های متابوتروپیک گلوتامات اثرات مرکزی قابل ملاحظه ای بر دریافت غذا در جوجه خروس های گوشتی داشته و در این پروسه با اهمیت تلقی می شوند.

واژه های کلیدی: اشتها، گیرنده های متابوتروپیک گلوتامات، جوجه گوشتی

* نویسنده مسئول: آموزشکده دامپزشکی، دانشگاه ایلام

مقدمه

گلوتامات یک میانجی تحریکی عمده در مغز و طناب نخاعی است و مسئول بیش از ۷۵ درصد انتقالات سیناپسی تحریکی در مغز می باشد و در وزیکولهای پیش سیناپسی لوکالیزه شده، در پاسخ به محرکهای فیزیولوژیکی بر اساس روند آگروسیتوز از غشاء نورون پیش سیناپسی آزاد می گردد.

تاکنون از گلوتامات بصورت تزریق داخل ناحیه هیپوتالاموس جانبی در موش صحرایی ۱ (۱) و در جوجه خروس گوشتی (۲) بصورت داخل بطن مغزی استفاده شده است، که تزریق در ناحیه هیپوتالاموس جانبی موجب تحریک اخذ غذا و تزریق داخل بطن مغزی باعث کاهش اشتها شده است.

گیرنده های گلوتامات بطور کلی به دو دسته تقسیم می شوند:

۱- گیرنده های یونوتروپیک

۲- گیرنده های متابوتروپیک

گیرنده های یونوتروپیک کانال های دریچه دار لیگاندی هستند و در انتقال سیناپسی سریع در بخش وسیعی از سیناپس های CNS شرکت دارند. گیرنده های متابوتروپیک براساس شباهت سکانس آمینو اسیدی، خواص فارماکولوژیکی و مکانیسم های انتقال سیناپسی سه گروه هستند.

گروه I (*mGluR5, mGluR2*)، گروه II (*mGluR3*) و گروه III (*mGluR4, mGluR7*) و *mGluR8* تحریک گیرنده های متابوتروپیک گروه I که معمولا در غشاء پس سیناپسی نورونها متمرکز شده اند، موجب فعال شدن فسفولیپاز C گردیده، با تشکیل *IP3*، کلسیم را از مخازن داخل سلولی آزاد می کنند. این گیرنده ها با پروتئین G از نوع *Gq/11*، *Gi/o* و *Gs* اتصال برقرار کرده، مکانیسم های متفاوتی را در نورون ها راه اندازی می کنند و پس از فعال شدن این نوع گیرنده ها *CAMP* تولید

می شود. در بعضی شرایط ویژه، فعال شدن این گیرنده ها باعث آزادسازی گلوتامات می شود (۳، ۴). تنظیم دریافت غذا در پستانداران و پرندگان از سه الی چهار دهه گذشته مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است. بسیاری از جنبه های دریافت غذا در پرندگان مشابه پستانداران است و تاکنون قسمت اعظم تحقیقات انجام گرفته در این راستا بر روی موش صحرایی صورت گرفته است. عوامل عصبی مرکزی و محیطی بر روی پروسه اشتها تاثیر میگذارند. بسیاری از مراکز مغزی تاثیرگذار شامل هسته هیپوتالاموسی شکمی - میانی، استریاتوم، هسته قوسی، آمیگدال و غیره می باشند.

از عوامل محیطی می توان به کبد و دستگاه گوارش پرندگان اشاره نمود که بعنوان مراکز مهم کنترل دریافت غذا بشمار می روند. با تحقیقات انجام شده مشخص شده است که هرگاه نوروترانسمیترها و عوامل تغذیه ای بصورت داخل مغزی و یا بصورت سیستمیک تزریق شوند بر روی اشتهای حیوان مؤثر خواهند بود. از جمله این عوامل می توان به موارد زیر اشاره نمود: لپتین (۵)، گرلین (۶، ۷) و *NPY* (۸). زیرگروه گیرنده های گروه I (*mGluR5*) (۹)، پلی پپتید پانکراسی طیور، *GABA* (۱۰)، اپیوئیدها (۱۱)، پرولاکتین (۱۲)، هورمون رشد و کلونیدین (۱۱) می توان نام برد که موجب افزایش دریافت غذا در پرندگان می گردند. از عوامل کاهش دهنده غذا نیز می توان به کوله سیستوکینین، بومبیزین و نوراپی نفرین اشاره کرد (۱۳).

تزریق مستقیم نور اپی نفرین، آمینو اسید، گلوکز و اسیدهای چرب به سیستم پورتال کبدی پرندگان موجب کاهش دریافت غذا گردیده است (۱۱).

بسیاری از نورون های حسی (آوران) واگ، از نوع گلوتامینرژیک هستند. گیرنده های *NMDA* گلوتامات، در فرآیند سیری یپوتالاموسی

۴- روش جراحی: بمنظور مهیا شدن برای جراحی، ابتدا با تزریق داروی پنتوباریتال سدیم ۱ با دوز ۲۵ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن (۵) و از طریق ورید بال، پرندگان کاملاً بی‌هوش شده، سپس از طرف سر در دستگاه استریوتاکس (*Stoelting, USA*) قرار داده شدند.

کانول گذاری به صورت یکطرفه در مختصات $AP:6.7\text{ mm}$ ، 0.7 mm L و $Depth:3.75\text{ mm}$ (۱۵) انجام شد. قبل از شروع تزریقات، پرندگان جهت استراحت به قفس های انفرادی به مدت ۵ تا ۷ روز انتقال داده شدند.

۵- روش آزمایش: در مجموع از ۳۶ قطعه جوجه در سه تجربه برای بدست آوردن دوز موثر دارو ها استفاده گردید. در هر تجربه ۱۲ قطعه پرنده را به ۴ گروه سه تایی تقسیم کرده، در ۱۲ قفس انفرادی نگهداری شدند. با استفاده از روش مربع لاتین تکراری ۲ (که در آن پرندگان و روزها فاکتور های بلوک کننده هستند)، محلول های مورد نظر (تمامی محلول های مورد استفاده از شرکت توکریس *Tocris Co.* [خریداری شدند] را دریافت کردند. آب و غذا بطور مداوم و ۲۴ ساعته در اختیار پرندگان قرار داده شد، در تجربه اول از *DHPG* در سه دوز مختلف $2\mu\text{M}$ و $13M\cdot0.5\mu\text{M}$ (محلول در سرم فیزیولوژی) و در گروه کنترل (گروه چهارم) مایع مغزی - نخاعی مصنوعی استفاده شد. در تجربه دوم از *AIDA* در سه دوز مختلف $2mM$ ، $4mM$ و $8mM$ (ابتدا در *NaOH* ۱۱ اکی والان حل کرده سپس با سرم فیزیولوژی رقیق شد) بصورت تزریق داخل بطن مغز راست و در گروه کنترل از مایع مغزی-نخاعی مصنوعی استفاده گردید. در تجربه سوم، از دوزهای موثر $1\mu\text{M}$ آگونیست، $2mM$ آنتاگونیست و تزریق توأم آگونیست و آنتاگونیست در سه گروه و همچنین از مایع مغزی - نخاعی مصنوعی بعنوان کنترل (گروه چهارم) استفاده

که توسط اعصاب واگ منتقل می‌شوند سهم مهمی دارند (۱۴). احتمالاً گیرنده های متابوتروپیک گروه I نیز با سیگنال های فیدبک منفی دستگاه گوارش که در خاتمه غذا خوردن (سیری) ایجاد می شوند، مداخله می نمایند ولی محل اثر آگونیست و آنتاگونیست هایی که در دریافت غذا موثرند، مشخص نشده است (۱۴).

مواد و روش ها

۱- حیوانات مورد مطالعه: جهت انجام این تحقیق از جوجه خروس گوشتی یک روزه نژاد *Ross 308* استفاده شد. این جوجه ها تا ۳ ساعت پس از هچ شدن در جوجه کشی باقی مانده، سپس به سرعت به آزمایشگاه فیزیولوژی دریافت آب و غذا در موسسه تحقیقاتی امین آباد (وابسته به دانشگاه تهران) انتقال داده شدند.

۲- شرایط نگهداری: جوجه ها در ۳ روز اول در دمای ۳۰ تا ۳۱ درجه سانتی گراد، نگهداری، سپس درجه حرارت به ازای هر یک روز، ۱ درجه کاهش و از روز ۱۲ به بعد در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد ثابت باقی ماند. تنظیم دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه های گرم کننده و خنک کننده صورت گرفت. مقدار رطوبت نسبی، حدود ۴۰ درصد و روشنایی ۲۴ ساعته بود. در ابتدا تعداد ۲۵-۲۰ قطعه جوجه برای هر تجربه در نظر گرفته می شد. از این تعداد، ۱۲ قطعه که دارای وزن یکسانی (۷۰۰ تا ۷۵۰ گرم) بودند (۲ و ۱۵)، در روز آزمایش انتخاب و شماره گذاری شده، به قفس های انفرادی منتقل شدند.

۳- جیره غذایی: جیره غذایی جوجه های تحت آزمایش، جیره استارتر کرامبل شماره ۲۰۱ بود، که در کل دوره آزمایش در اختیار جوجه ها قرار گرفت. میزان پروتئین این جیره ۲۱/۵ درصد، انرژی ۲۹۵۰ کیلوکالری محاسبه شده بود.

آنتاگونیست گیرنده های گروه I در طی ۷ روز (بصورت یک روز در میان) انجام شد.

نتایج حاصل از تزریق داخل بطن مغزی آگونیست و آنتاگونیست گیرنده های متابوتروپیک گلوتامات در جوجه خروس گوشتی در نمودار (۱) و جدول (۱) نشان داده می شود.

DHPG، بطور معنی داری ($p < 0.05$)، اخذ غذا را در جوجه خروس های گوشتی (در مقایسه با گروه کنترل) افزایش داد. در دقایق ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ به ترتیب ۳۷٪، ۲۸/۱٪، ۲۹٪ و ۲۱٪ افزایش میزان دریافت غذا ایجاد کرده بود. اما در دقایق آغازین و انتهایی آزمایش میزان دریافت غذا تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت. برعکس، **AIDA** اخذ غذا را بطور معنی داری کاهش داده بود ($p < 0.05$). آنتاگونیست گیرنده های متابوتروپیک گروه I در دقایق ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ پس از تزریق، دریافت غذا را به ترتیب به میزان ۱۷/۸٪، ۲۰/۹٪، ۳۷٪، ۲۸/۳٪، ۴۷٪ و ۲۶٪ نسبت به گروه کنترل کاهش داده بود. تزریق توام **DHPG** و **AIDA** نیز از نظر آماری کاهش معنی داری در دریافت غذا (در مقایسه با گروه کنترل) ایجاد کرده بود ($p < 0.05$)، بدین ترتیب که در دقایق ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ پس از تزریق میزان دریافت غذا را به ترتیب ۲۸/۸٪، ۲۹٪ و ۳۳٪ کاهش داده بود.

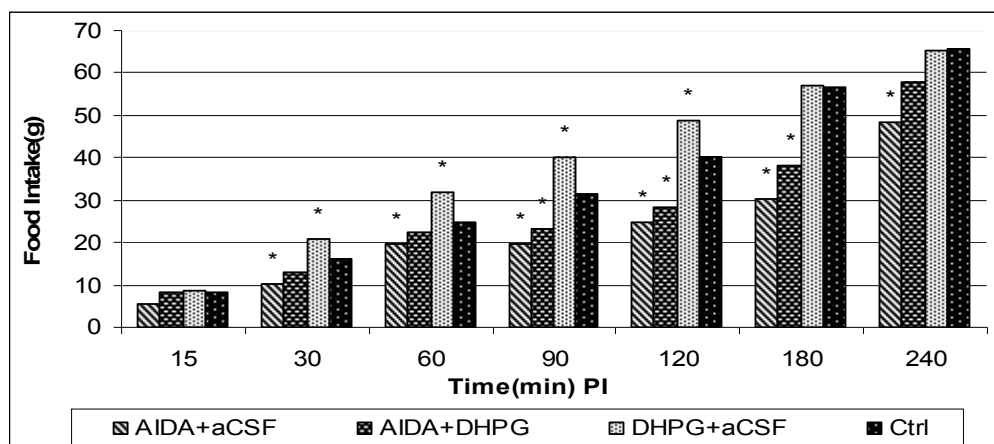
گردید. بر اساس مربع لاتین تکراری در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ تمامی مواد مذکور بصورت چرخشی تجویز شد. حجم کلی هر تزریق $10 \mu L$ بود، که با استفاده از سرنگ هامیلتون انجام گرفت. ۲۴ ساعت قبل از تزریق محلولها، پرندگان را از آب و غذا محروم کرده (گرسنگی و تشنگی ۲۴ ساعته) و در فواصل بین هر مرحله تزریق یک روز استراحت داده شد. در دقایق ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ پس از تزریق محلول های مورد نظر در بطن راست مغز، میزان غذای برداشت شده توسط هر پرنده بر حسب گرم توسط کامپیوتر محاسبه و اندازه گیری شد.

۶- تست آماری: جهت تعیین وجود اختلاف معنی دار در بین گروه های تحت آزمایش از نرم افزار **SPSS** ابتدا از آنالیز واریانس دوطرفه استفاده گردید و سپس از تست **Bonferroni** جهت پی بردن به فهرست این گروهها استفاده شد.

یافته های پژوهش

به منظور بررسی اثر گیرنده های متابوتروپیک گلوتامات، در دریافت غذا توسط جوجه خروس گوشتی، تزریق داخل بطن مغزی با آگونیست و

نمودار شماره ۱: دریافت تجمعی غذا در جوجه خروس های گوشتی پس از تزریق داخل بطن مغزی (**ICV**) آگونیست و آنتاگونیست گیرنده های متابوتروپیک گروه I گلوتامات (علامت * معنی دار بودن داده ها را در $P < 0.05$ نشان می دهد).



بحث و نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از تزریق داخل بطن راست مغزی آگونیست انتخابی گیرنده های متابوتروپیک گروه I (DHPG) در جوجه خروس های گوشتی که ۲۴ ساعت از آب و غذا محروم بوده اند نشان می دهد که دریافت غذا نسبت به گروه کنترل بطور معنی داری افزایش یافته است ($P < 0/05$). این افزایش اشتها در مدت زمان معینی اعمال شده است. بر اساس این یافته ها شروع افزایش دریافت غذا از دقیقه ۳۰ بوده که تا دقیقه ۱۲۰ پس از تزریق ادامه داشته و سپس به حد طبیعی خود (گروه کنترل) برگشته بود. تزریق DHPG تفاوت معنی داری بر دریافت غذا در دقایق ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ ایجاد کرده است. در زمان های مذکور بطور متوسط ۲۸/۷٪ افزایش دریافت غذا نسبت به گروه کنترل در اثر تزریق DHPG محاسبه گردید. برادبرگ و همکاران، گزارش کردند که تزریق داخل بطن مغزی آگونیست *mGluR5* از گیرنده های تابوتروپیک گروه I دریافت غذا را در موش صحرائی افزایش داده است (۸) که با نتایج حاصل از این مطالعه در طیور مطابقت دارد (۹). یافته های اخیر، نقش یکسان گیرنده های گروه I در افزایش اشتها در جوندگان و پرندگان را تقویت می نماید.

اثرات آنتاگونیست گیرنده های گروه I در مقایسه با آگونیست این گروه پایدارتر بود، تزریق AIDA به تنهایی اخذ غذا را نسبت به گروه کنترل بطور معنی داری کاهش داده بود ($P < 0/05$). بطوریکه تا پایان آزمایش اثر کاهش دهنده آن ادامه داشت. پرندگان تحت آزمایش از دقیقه ۳۰ تا ۲۴۰ پس از تزریق AIDA بطور متوسط ۳۰٪ کاهش دریافت غذا در مقایسه با گروه کنترل داشتند. در این مطالعه اثرات کاملاً متضاد محلول های فوق بر دریافت غذا مشخص شده است و نشان دهنده اهمیت گیرنده های متابوتروپیک گلوتامات در تنظیم اخذ غذا می باشد. تزریق توام و همزمان آگونیست و آنتاگونیست نیز موجب کاهش معنی داری در اخذ غذا گردید ($P < 0/05$)، ولی اثر آنها در زمانهای محدودتری پایدار مانده بود. نتایج بدست آمده، نشان دهنده اثر مهارکننده AIDA بر گیرنده های متابوتروپیک گروه I در ارتباط با اشتها می باشد. نکته قابل توجه در ارتباط با اثر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده های فوق آن است که ۳۰ دقیقه پس از تزریق، اختلاف میزان دریافت غذا معنی دار شده بود، شاید بدلیل اثرات آهسته در انتقال سیناپسی توسط گیرنده های مذکور باشد، که نسبت به گیرنده های یونوتروپیک از روند آهسته تری برخوردارند. بر اساس گزارش باغبان زاده و باباپور، تزریق

جدول شماره ۱: میانگین اخذ غذای تجمعی در زمان های مختلف (دقیقه) با تزریق داخل بطن مغزی آگونیست و آنتاگونیست گیرنده های متابوتروپیک (گروه I) گلوتامات.

زمان	۱۵	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۸۰	۲۴۰
AIDA+aCSF	۵/۵	۱۰/۴	۱۹/۷	۱۹/۷	۲۴/۸	۳۰/۴	۴۸/۵
AIDA+DHPG	۸/۲۵	۱۳	۲۲/۳	۲۳/۲	۲۸/۵	۳۸/۱	۵۷/۷
DHPG+aCSF	۸/۵	۲۲/۲	۳۱/۸	۴۰/۳	۴۸/۶	۵۶/۹	۶۵/۲
گروه کنترل	۸/۲۵	۱۶/۲	۲۴/۹	۳۱/۳	۴۰/۲	۵۶/۸	۶۵/۵

متابوتروپیک) که در سیستم عصبی مرکزی بوفور یافت می شوند، در این رابطه وجود داشته و منشاء اثر هستند.

با این وجود هنوز مکانیسم اثر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده های متابوتروپیک گروه I، در تنظیم اخذ غذا مشخص نشده است. ولی بنظر می رسد با توجه به پراکندگی زیاد گیرنده های گلوتامات که تقریباً در همه جای مغز گسترش دارند. با سیستم های نورونی دیگر از قبیل گابا آرژیک، دوپامینی و غیره، سیناپس برقرار کرده و برابند مکانیسم های تحریکی و مهاري ایجاد شده است که تعیین کننده کاهش یا افزایش اشتها می گردد. همچنین یافته های حاصل از تحقیقات گذشته بیان گر نقش کاملاً پیچیده و متناقض گیرنده های متابوتروپیک می باشد که نیاز مند مطالعه بیشتر و مشخص شدن اعمال فیزیولوژیکی هر کدام از گیرنده های فوق می باشد.

آنتاگونیست وسیع الطیف گیرنده های متابوتروپیک (MSPG) موجب افزایش معنی داری در دریافت غذای پرندگان مورد مطالعه شده است (۲). با توجه به آثار و اعمال متفاوت گیرنده های متابوتروپیک گلوتامات و مکانیسم های مختلفی که به کار می برند، احتمالاً آنتاگونیست استفاده شده (MSPG) بر روی گیرنده های خاصی (بجز گروه I) موثر واقع شده و افزایش دریافت غذا بدنبال تزریق آن در نتیجه اعمال اثر بر سایر گیرنده های متابوتروپیک بوده است که نقش کاهش دهنده در دریافت غذا دارند.

سؤالی که در اینجا مطرح می شود آنست که آیا آگونیست و آنتاگونیست گیرنده های متابوتروپیک مستقیماً و از طریق گیرنده های اختصاصی خود عمل می نمایند یا اینکه از طریق اثر بر گیرنده های غیر گلوتاماتی موجبات اثر بر اشتها میشوند؟ شواهد محکمی وجود دارد مبنی بر این که گیرنده های متابوتروپیک گلوتامات انتقال عصبی تحریکی و مهاري را در سیناپس های موجود در سیستم عصبی مرکزی تنظیم می کنند. برخی گزارش ها نقش تنظیم کنندگی گیرنده های گروه I بر سایر گیرنده ها از قبیل گیرنده های گابا به اثبات (GABA)، دوپامینی و گیرنده های یونوتروپیک گلوتامات را به اثبات می رسانند (۳)، ولی بررسی های دیگر بر عدم دخالت این گیرنده ها در تنظیم آزادسازی نوروترانسمیترهای غیر گلوتامینرژیک فوق تاکید دارند. از طرف دیگر شواهد گویای آن است که سیگنال های فیدبک منفی توسط دستگاه گوارش به سیستم عصبی مرکزی ارسال می شوند که منجر به سیری و خاتمه تغذیه می شود (۱۴) و این سیگنال های فیدبک منفی از طریق عصب واگ و با دخالت گیرنده های گلوتاماتی NMDA به CNS ارسال می شوند (۱۴). احتمالاً سایر گیرنده های گلوتامات (از قبیل گیرنده های

References :

- 1- Stanley BG, Ha LH, Spears LC, et al. Lateral hypothalamic injections of glutamate, kainic acid, D,L-amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole propionic acid or N-methyl-D-aspartic acid rapidly elicit intense transient eating in rats. *Brain Res* 1993, 630: 41-49.
- 2-Baghbanzadeh A and Babapour V. CNS glutamatergic control of food intake in domestic fowl. *Appetite* 2001, 37:267-abstract.
- 3-Bordi F, Ugolini A. Group I metabotropic glutamate receptors: Implications for brain diseases. *Prog in neurobiol* 1999, 59: 55-79.
- 4-Katayama J, Akaike N, Nabekura J. Characterization of pre- and post-synaptic metabotropic glutamate receptor-mediated inhibitory responses in substantia nigra dopamine neurons. *Neuroscience Research* 2003, 45: 101-115.
- 5- Denbow DM, Meade S, Robertson A, et al. Leptin-induced decrease in food intake in chickens. *Physiology & Behavior*, 69:359-362.
- 6-Cummings DE. Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiology & Behavior* 2006, 89: 71-84.
- 7-Silveira PP, Benetti CS, Ayres C, et al. Satiety assessment in neonatally handled rats. *Behav Brain Res* 2006, 173: 205-210.
- 8-Adrian TE, Allen JM, Bloom SR, et al. Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature*, (1983), 306 : 584-586.
- 9-Bradburg MJ, Campbell U, Giraclo D, et al. Metabotropic glutamate receptor mGlu5 is a mediator of appetite and energy balance in rats and mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2004, 313:395-402.
- 10- Denbow D M. Induction of food intake by a GABAergic mechanism in the turkey. *Physiol Behav* 1991, 49: 485-488.
- 11- Kuenzel WJ. Central neuroanatomical systems involved in the regulation of food intake in birds and mammals. *J Nutr* 1994, 124 :1355-1370.
- 12-Buntin JD, Figge GR. Prolactin and growth hormone stimulate food intake in ring doves. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1988, 31 :533-540.
- 13-Denbow DM, Myers RD. Eating, drinking, and temperature responses to intracerebroventricular cholecystokinin in the chick. *Peptides* 1982, 3 :739-743.
- 14-Denbow DM, Sheppard BJ. Food and water intake responses of the domestic fowl to norepinephrine infusion at circumscribed neural sites. *Brain Res Bull* 1993, 31:121-128.
- 15-Kuenzel WJ, Masson MA. Stereotaxic atlas of the brain of the chick. 1988 Johns Hopkins University press, Baltimore, MD.