

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA PEINKIHER

PREIZKUŠANJE UČINKOVITOSTI PEPTIDNEGA ANTAGONISTA GRELINSKEGA  
RECEPTORJA NA MIŠJEM MODELU

INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SARA PEINKIHER

**PREIZKUŠANJE UČINKOVITOSTI PEPTIDNEGA ANTAGONISTA  
GRELINSKEGA RECEPTORJA NA MIŠJEM MODELU**

**PEPTIDE ANTAGONIST OF GHRELIN RECEPTOR EFFICACY IN THE  
MOUSE MODEL**

INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo. Večino eksperimentalnega dela sem opravljala na Fakulteti za Veterino, na Inštitutu za predklinične vede v laboratoriju za Genomiko, prav tako na Univerzi v Ljubljani.

## **Zahvala**

V prvi vrsti se zahvaljujem mentorici, izr. prof. dr. Mojci Lunder, ker me je sprejela pod svoje mentorstvo in me usmerila v izvenštudijsko izobraževanje. Zahvaljujem se ji za vso prejeto znanje in strokovno svetovanje pri nastajanju magistrskega dela. Prav tako se zahvaljujem somentorici, asist. dr. Neži Grgurevič, dr. vet. med., za vso pomoč, potrpljenje in učenje pri eksperimentalnem delu in komentiranju rezultatov. Za sprejem in prijaznost se zahvaljujem tudi celotnemu oddelku za Genomiko Veterinarske fakultete.

Posebno zahvalo namenjam mami, bratu, sestri in fantu, ki so mi z veliko mero motivacije in spodbude pomagali med samim študijem in pisanjem magistrskega dela.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder in somentorstvom asist. dr. Neže Grgurevič, dr. vet. med.

Sara Peinkihher

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Aleš Obreza

Mentor: izr. prof. dr. Mojca Lunder

Somentor: asist. dr. Neža Grgurevič, dr. vet. med.

Član magistrske komisije: izr. prof. dr. Rok Dreu

## VSEBINA

	Str.
VSEBINA.....	III
KAZALO SLIK.....	V
POVZETEK .....	VI
ABSTRACT .....	VII
OKRAJŠAVE IN PREVODI .....	VIII
1. UVOD .....	1
1.1. Grelin .....	1
1.1.1. Nastanek in izločanje grelina.....	2
1.1.2. Receptor za grelin.....	3
1.1.3. Vpliv grelina na izločanje ravnega hormona .....	4
1.1.4. Vpliv grelina na vnos hrane in druge telesne funkcije .....	6
1.1.5. Dejavniki, ki vplivajo na izločanje grelina in delovanje grelina .....	7
1.2. Antagonisti grelina.....	9
2. NAMEN DELA.....	10
3. MATERIALI IN METODE .....	11
3.1. Živali.....	11
3.1.1. Genotip/vrsta .....	11
3.1.2. Nastanitev živali .....	11
3.2. Priprava poskusnih živali in aplikacija .....	11
3.2.1. Nastanitev poskusnih živali .....	11
3.2.2. Aplikacija snovi.....	12
3.2.3. Odvzem krvi in organov .....	13
3.3. Shranjevanje in nadaljnja obdelava odvzetih tkiv .....	15
3.4. Priprava testnih snovi.....	16

3.4.1.	Pozitivna kontrola.....	16
3.4.2.	Peptid P1.....	17
3.4.3.	Grelin.....	17
3.4.4.	Grelin in Peptid P1 .....	17
3.4.5.	Grelin in [D-Lys-3]-GHRP-6 .....	17
3.5.	Analiza podatkov .....	17
4.	EKSPERIMENTALNO DELO .....	19
4.1.	Poskus 1 .....	19
4.2.	Poskus 2 .....	19
4.3.	Poskus 3 .....	20
5.	REZULTATI.....	21
5.1.	Vpliv peptida P1 na vnos hrane .....	21
5.2.	Vpliv peptida P1 na izločanje ravnega hormona.....	24
6.	RAZPRAVA .....	26
6.1.	Vpliv peptida P1 na vnos hrane .....	26
6.2.	Vpliv aplikacije peptida P1 na izločanje ravnega hormona .....	27
7.	SKLEP.....	30
8.	LITERATURA.....	31

## KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Prikaz nastanka grelinskih oblik (Prirejeno po Gualillio, 2006 (11)).	3
Slika 2: Prikaz signalnih poti grelina iz želodca do hipofize (Prirejeno po Hosoda, 2006 (8)).	5
Slika 3: Prikaz intraperitonealne aplikacije (46).	12
Slika 4: Shema perfuzije oz. spiranja živali (prirejeno po Riffe, 2013(47)).	14
Slika 5: Umeritvena krivulja	16
Slika 6: Shema poskusa 1.	19
Slika 7: Shema poskusa 2.	20
Slika 8: Shema poskusa 3.	20
Slika 9: Prikaz rezultatov poskusa 1 – intraperitonealne aplikacije.	21
Slika 10: Prikaz rezultatov poskusa 2 – intranazalne aplikacije.	23
Slika 11: Prikaz rezultatov poskusa 3 – vpliv testnih snovi na RH.	24

## POVZETEK

Grelin je periferni peptidni hormon, ki je vpleten v uravnavanje energijske homeostaze, uravnavanje vnosa hrane in izločanje rastnega hormona. Iskanje antagonistov receptorja za grelin je eden od načinov iskanja novih spojin vodnic, katerih namen je zdravljenje bolezenskih stanj in tveganj, kot so na primer prekomerna telesna masa, debelost in z njo povezana druga bolezenska stanja. Na Katedri za farmacevtsko biologijo, Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani, so s pomočjo tehnologije bakteriofagnega prikaza razvili peptidne ligande receptorja za grelin, z *in vitro* antagonističnim delovanjem. Najučinkovitejšega med njimi smo v magistrski nalogi preizkusili še *in vivo* na mišjem modelu linije C57BL/6J. Delovanje peptida, ki smo ga poimenovali P1, smo primerjali z antagonistom grelina [D-Lys-3]-GHRP-6. V nalogi smo preizkusili dva načina vnosa snovi, preko trebušne (intraperitonealno, i.p.) in preko nosne votline. Opravili smo 3 poskuse; v poskusih 1 in 2 smo po vnašanju snovi intraperitonealno in preko nosne votline spremljali vnos hrane pri testnih živalih, v poskusu 3 smo po vnosu peptidne snovi intraperitonealno merili koncentracijo rastnega hormona v serumu testnih živali. V poskusih 1 in 2 smo imeli tri skupine živali: 1) kontrolno, 2) skupino z dodanim [D-Lys-3]-GHRP-6 in 3) skupino z dodanim peptidom P1. V poskusu 3 smo poleg v poskusih 1 in 2 navedenih treh dodali še tri skupine živali: 4) z dodanim grelinom, 5) z istočasno dodanim grelinom in peptidom P1 ter 6) z istočasno dodanim [D-Lys-3]-GHRP-6 in peptidom P1.

Prost vnos hrane 30 min po intraperitonealni aplikaciji snovi se je razlikoval med kontrolno skupino in skupino z dodanim antagonistom [D-Lys-3]-GHRP-6, medtem ko pri skupini z dodanim peptidom P1 ni prišlo do pričakovanih sprememb. Razlike smo zaznali tudi v koncentraciji rastnega hormona v serumu. Aplikacija grelina je, v primerjavi z nosilnim sistemom brez grelina, signifikantno povečala koncentracijo rastnega hormona v serumu. Istočasna aplikacija grelina in peptida P1 je povzročila nepričakovano višjo koncentracijo rastnega hormona kakor sama aplikacija grelina. Rezultati naše raziskave niso potrdili antagonističnega *in vivo* delovanja peptida P1 na vnos hrane, pokazali pa so vpliv peptida P1 na izločanje rastnega hormona.

**Ključne besede:** peptid P1, peptidi, antagonist, grelin, *in vivo* testiranje, mišji model

## ABSTRACT

Ghrelin is a peripheral peptide hormone, which is involved in the regulation of energy homeostasis, regulation of food intake and secretion of growth hormone. Searching for the ghrelin receptor antagonist is one way of finding a new lead compounds in order to treat conditions, such as overweight, obesity and its other related illness conditions. Department of Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy of University of Ljubljana has developed new peptide ligands of the ghrelin receptor with the help of bacteriophage imaging technology, which have expressed *in vitro* antagonistic activity. In the master's thesis we have tested the most effective peptide ligand among them (peptide P1) *in vivo* study on the C57BL/6J mouse model strain. The activity of peptide, which we have named P1, was compared with the known ghrelin antagonist [D-Lys-3]-GHRP-6. In our thesis we have tested two methods of applying substances, through abdominal and nasal cavity. We conducted 3 experiments; in experiments 1 and 2 we have monitored the food intake depending on the different application of substances. In the experiment 3, we have monitored the concentration of growth hormone in the serum of the tested animals after intraperitoneal application. In experiments 1 and 2 we had three testing groups of animals; 1) a control group, 2) group with the addition of [D-Lys-3]-GHRP-6 and 3) the group with added peptide P1. In experiment 3, additional three testing groups were added to the experiment: 4) group with the addition of ghrelin, 5) with simultaneously applied ghrelin and peptide P1 and 6) with simultaneously applied [D-Lys-3]-GHRP-6 and peptide P1.

*Ad libitum* food intake after 30 min from intraperitoneal application was distinguished between control group and group with [D-Lys-3]-GHRP-6, while no expected changes were noticed in the group with added peptide P1. Differences were also observed in the concentration of serum growth hormone. The application of ghrelin has, in comparison with the carrier (control group), significantly increased expression of growth hormone in the serum. Simultaneous application of ghrelin and peptide P1 resulted in an unexpectedly higher growth hormone concentration than the application of ghrelin itself. The results of our study did not confirm the antagonistic *in vivo* activity of peptide P1 on the food intake, but they showed effect of peptide P1 on the secretion of growth hormone release.

**Key words:** peptide P1, peptides, antagonist, ghrelin, *in vivo* testing, mouse model



## OKRAJŠAVE IN PREVODI

<i>ad libitum</i>	Neomejeno / po želji
cAMP	Ciklični adenozinmonofosfat
ELISA	Encimska imunoabsorpcijska preiskava
n	Število živali
RH	Growth hormone / rastni hormon
GHRH	Growth hormone - releasing hormone / hipotalamusni somatoliberin
GHS-R	Growth hormone secretagogue receptor / receptor za sekretagoge rastnega hormona
NPY	Neuropeptide Y / neuropeptid Y
s.c.	Subkutana aplikacija
SST	Somatostatin
TM	Telesna masa

## 1. UVOD

Hormoni v telesu predstavljajo pomembne spojine, ki jih naše telo tvori za signalizacijo med tkivi in organi preko krvi. V telesu se izločajo iz žlez z notranjim izločanjem (endokrinih žlez), kot so hipofiza, epifiza (češarika), timus (priželjc), ščitnica, nadledvična žleza, trebušna slinavka, moda ter jajčniki. Hormoni, ki nastajajo v endokrinih žlezah, se izločijo neposredno v krvni obtok in potujejo do celic. Te izražajo receptorje, ki se ujemajo s specifičnimi hormonskimi epitopi. Ko se ligand veže na receptor, se sproži prenos signala. Signal se lahko posreduje s fosforilacijo ali defosforilacijo citoplazemskih proteinov, kar vodi do spremembe v prepustnosti ionskega kanala ali pa se signal posreduje s pomočjo sekundarnih prenašalcev. Izjema so lipofilni hormoni, ki imajo možnost samostojnega prehajanja preko celične membrane in s tem možnost vezave na receptorje znotraj celice (1,2). Hormoni po vezavi delujejo kot agonisti ali antagonisti receptorja. Agonisti so ligandi, ki s svojo vezavo na receptor inducirajo mehanizme, ki vodijo k biološkemu učinku. Delovanje večine naravnih hormonov je agonistično. Druga skupina hormonov so antagonisti, ki s svojo vezavo na receptor onemogočajo vezavo agonista in tako ne pride do sprožitve mehanizmov, ki bi vodili k biološkemu učinku (3). Hormonske antagoniste pogosto uporabljamo kot zdravila. V skupino možnih antagonističnih spojin vodnic sodi tudi peptid P1, ki je *in vitro* antagonist grelina (oreksigenega hormona). P1 so identificirali na Katedri za farmacevtsko biologijo Univerze v Ljubljani. Njegovo *in vivo* učinkovitost smo preizkusili v naši nalogi.

### 1.1. Grelin

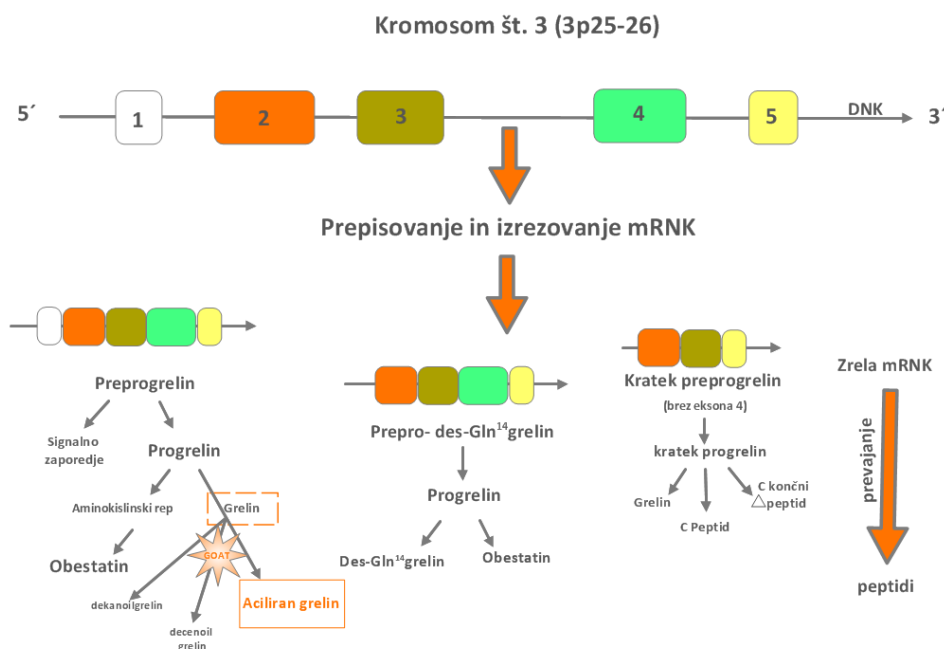
Grelin je prvi izoliral in poimenoval japonski znanstvenik Kojima s sodelavci. Kot endogeni ligand receptorja za sproščanje ravnega hormona (GHS-R) je bil leta 1991 izoliran iz podganjih želodcev. V tistem času ligand za GHS-R še ni bil poznan (4). Izoliran grelin so znanstveniki takrat opisali kot peptid dolg 28 aminokislin, z oktanojsko kislino na Ser3, ki je ključna za aktivnost peptida. S primerjavo cDNA knjižnic podganjega in humanega želodca so znanstveniki ugotovili podobnost med prekuzorji grelinskih peptidov pri obeh vrstah. Medvrstno razliko so ugotovili le v dveh aminokislinskih ostankih (Arg11–Val12),

kar priča o zelo dobri medvrstni ohranjenosti gena in posledično pomembni vlogi grelina (5).

### *1.1.1. Nastanek in izločanje grelina*

Grelina se pretežno izloča iz sluznice želodca. Tam so enteroendokrine X/A celice, ki so ločene od lumna želodca in nastanjene v sluznici želodca blizu kapilar. X/A celice vsebujejo okrogle, kompaktne granule, napolnjene z grelinom, ki se preko sten kapilar izloča v kri. Prav tako se majhen del grelina izloča v hipotalamusu ter v sledovih v različnih drugih tkivih (6,7,8).

Genetski zapis za grelina je lociran na kromosomu številka 3 (oziroma lokusu 3p25–26) in je sestavljen iz 5 aksonov in 4 intronov, ki kodirajo 117. aminokislinski peptid, imenovan preprogrelin. Preprogrelin je sestavljen iz signalnega peptida, dolgega 23 aminokislin in pro-grelina, dolgega 94 aminokislin. Pro-grelin vsebuje 28 aminokislin zrelega grelina in aminokislinski rep iz 66 aminokislin, ki predstavlja anoreksigeni peptidni hormon obestatin. Aktivna oblika grelina je posledica edinstvene post-translacijske modifikacije. V procesu nastanka aktivne oblike grelina se hidroksilna skupina tretjega serinskega ostanka (Ser3) zaestri z oktanojsko kislino, kar je poglobitnega pomena za biološko aktivnost grelina. Postranslacijsko modifikacijo katalizira encim na notranji membrani endoplazemskega retikuluma – encim grelina-O-aciltransferaza (GOAT/MBOAT4) (8,9). Poleg aktivne oblike grelina (oktanoil grelina) je v krvi še neacilirani grelina (ang. des-acyl ghrelin) (5,10,11,12). V sledovih so prisotne še druge oblike: des-Gln<sup>14</sup>grelina, neacilirani des-Gln<sup>14</sup> grelina, dekanoil grelina in decenoil grelina. To je posledica naključnega biološkega izrezovanja mRNK ter posttranslacijskih modifikacij, kot je prikazano na Sliki 1 (13).



Slika 1: Prikaz nastanka grelinskih oblik (Prirejeno po Gualillio, 2006 (11)).

Do današnjega dne je grelin tarča raziskovanja več raziskovalnih skupin, predvsem zaradi razkritja, da je vpleten v uravnavanje energijske homeostaze, uravnavanje vnosa hrane in izločanje rastnega hormona (RH). Zato ni presenetljivo dejstvo, da je vloga grelina v organizmu že precej raziskana (14,15,16).

### 1.1.2. Receptor za grelin

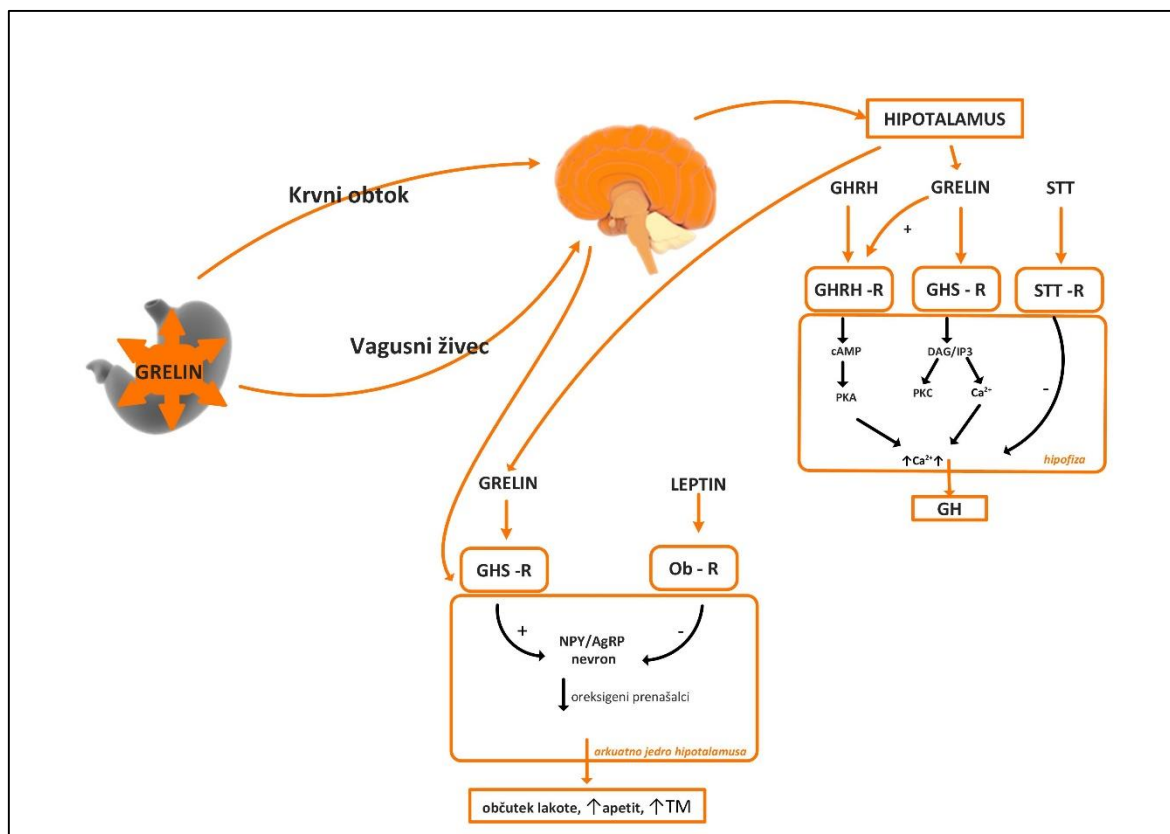
Receptor za grelin spada v skupino receptorjev, ki so sklopljeni s proteinom G. Do sedaj sta znana dva transkripta GHS-R, ki sta izražena v različnih tkivih. Prvo obliko poimenujemo 1a in predstavlja funkcionalen protein, ki je najpogosteje izražen v hipofizi (skladno s svojo vlogo sproščanja rastnega hormona (RH)), hipotalamusu in hipokampusu. mRNA, ki nosi zapis za receptor, so znanstveniki identificirali tudi v naslednjih perifernih tkivih: srcu in obtočilih, nadledvični žlezi, modih, jajčnikih, tankem in debelem črevesu, trebušni slinavki in pljučih. Pomembna značilnost receptorja GHS-R-1a je njegova bazalna (konstitutivna) aktivnost v odsotnosti agonistov, kar nam daje spoznanje o visoki internalizaciji in

signalizacijski vrednosti receptorja. Ko se signalna molekula, kot je grelin, veže na receptor, pride do spremembe konformacije, ki omogoča aktivacijo G proteina, lociranega na notranji strani plazemske membrane celic hipofize. Poročajo o dveh mehanizmih povečanja znotrajcelične koncentracije  $Ca^{2+}$  ionov v hipofizi. Dominantna signalna pot poteka preko fosfolipaze C (PLC)/inozitol trifosfata (IP3). Druga signalna pot poteka preko protein kinaze A (PKA)/cAMP. Obe stimulirata izločanje RH. Medsebojna povezava teh dveh poti pa je za enkrat še neznana. Drugo obliko receptorja poimenujemo 1b in je prisotna v veliko večjem številu različnih tkiv kakor 1a. Vloga 1b receptorja je še neraziskana, dokazano je le, da zagotovo ne deluje enako kot receptor 1a (7,8,16).

### ***1.1.3. Vpliv grelina na izločanje ravnega hormona***

Rastni hormon (RH) je odgovoren za rast celic, presnovo ogljikovih hidratov, proteinov in lipidov ter vodno-elektrolitsko ravnovesje. Do odkritja grelina je veljalo, da se sproščanje RH uravnava le z dvema mehanizmoma. Sproščanje stimulira hipotalamusni somatoliberin (GHRH), ki z vezavo na GHRH-receptor hipofize zviša koncentracijo cAMP, kar vodi do sproščanja RH v krvni obtok. Zaviranje sproščanja RH pa se posreduje z vezanjem somatostatina (SST) na SST-receptor, ki je sklopljen s proteinom G (17). Tretja pot uravnavanja izločanja RH je povezana z grelinom. Grelin po vezavi na GHS-R-1a receptor hipofize povzroči povišanje znotrajcelične koncentracije  $Ca^{2+}$  ionov in s tem stimulira izločanje RH v krvni obtok, kot je prikazano na Sliki 2 (7).

Periferni hormon grelin sproži izločanje RH preko delovanja v centralnem živčevju. Signalizacija lahko poteka s prečkanjem grelina preko krvno-možganske pregrade in vezavo na specifične receptorje v centralnem živčevju ali pa s periferno vezavo grelina na nevrone vagusnega živca, na katerih so prav tako prisotni specifični receptorji GHS-R (18,19).



Slika 2: Prikaz signalnih poti grelina iz želodca do hipofize (Prirejeno po Hosoda, 2006 (8)).

V raziskavi Malagon in sod. (20) so raziskovalci z različnimi tretiranjmi na izoliranih prašičjih somatotropnih celicah hipofize dokazali, da grelin stimulira izločanje RH preko več signalizacijskih kaskad, ki obsegajo inozitol fosfat, cAMP in znotrajcelične  $Ca^{2+}$  ione. Sočasna aplikacija SST in grelina je zavrla stimulirajoč učinek grelina. Znanstveniki so z raziskavami na ljudeh (21,22) dokazali, da ima aplikacija 0,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  grelina enak učinek kot aplikacija 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  GHRH. Grelin je torej močnejši spodbujevalec izločanja RH kakor GHRH in njegova vloga pri uravnavanju izločanja RH je zelo pomembna. Sočasna intravenska aplikacija GHRH (1,0 mg/kg) in majhni odmerki grelina (0,08 in 0,02 mg/kg) so pri odraslih moških močno spodbudili sproščanje RH, v primerjavi s sproščanjem RH pri prostovoljcih, ki so prejeli le grelin ali GHRH. Slednja raziskava na *in vivo* modelu potrjuje domnevanja o sinergističnem delovanju dveh različnih poti na izločanje RH.

Grelin brez oktanoilne skupine ne aktivira vezavnih mest na receptorju v centralnem živčevju, ter tako ne vpliva na izločanje RH (5,10,11,12). Vnos neaktivne oblike grelina, v

nasprotju z aktivno obliko, povzroči zmanjšan vnos hrane pri miših in upočasnji praznjenje želodca pri predhodno stradanih miših (23).

#### ***1.1.4. Vpliv grelina na vnos hrane in druge telesne funkcije***

Grelina ima še številne druge učinke. Z vezavo na GHS-R receptorje hipotalamusnih nevronov arkvatnega jedra, ki izražajo neuropeptid Y in agutiju podoben peptid (NPY/AgRP), aktivira izločanje oreksigenih prenašalcev, ki sprožijo občutek lakote ter spodbujajo vnos hrane v organizem. Grelin prav tako vpliva na gibanje prebavil, saj pospeši praznjenje želodca preko vezave na vagusni živec. Vpliva tudi na delovanje srca, imunski sistem, reproduktivne procese in anksioznost (7,18, 24, 25,26,27).

Izražanje grelina je v največji meri pogojeno s prehranjevalnim statusom organizma. Študije so pokazale, da ob negativni energijski bilanci ali pri postenju pride do povečanega sproščanja grelina iz endokrinih celic želodca. Njegova koncentracija v plazmi naraste. Koncentracija grelina je nižja pri debelosti in upade po pravem ali samo navideznem hranjenju (vohanje, gledanje in žvečenje hrane). Prav tako na nivo grelina vpliva vrsta hrane. Po obroku, bogatem z ogljikovimi hidrati, se koncentracija grelina pri ljudeh zelo zmanjša, za razliko od obrokov bogatih z maščobami, beljakovinami, sadjem ali zelenjavo, ki ne dosežejo tako velikega padca koncentracije grelina v krvi. Pri obroku, bogatem s proteini, je bila koncentracija grelina pri udeležencih raziskave nižja dlje časa kakor pri obroku, bogatem z ogljikovimi hidrati (28,29,30).

Znano je, da je nivo grelina obratno sorazmeren z indeksom telesne mase, z izjemo bolnikov s Prader-Will sindromom (31). Ti imajo konstantno povišane koncentracije grelina, ki potencialno prispevajo k njihovem neustavljivemu apetitu (hiperfagiji) in debelosti. Zanimivo je dejstvo, da je pri stradanju živalih (podganah), ki so hrano 15 min samo gledale in vonjale, prav tako prišlo do padca plazemskega grelina, kot tudi pri živalih, ki so hrano po stradanju dejansko zaužile. Tega pojava niso opazili pri živalih po vagotomiji (32). Iz teh rezultatov lahko sklepamo o velikem vplivu grelina pri pripravi organizma na hranjenje ter o vlogi vagusnega živca pri prenosu signala iz periferije v centralno živčevje.

Wren in sod. (27) so v svoji raziskavi na podganah primerjali intracerebroventrikularno (i.c.v.) in intraperitonealno aplikacijo grelina na povišan vnos krme in nivo ravnega

hormona v krvi. Večji vnos hrane so opazili pri i.c.v. aplikaciji grelina. Učinek so zaznali še 24 ur po aplikaciji. Prav tako so bili rezultati vnosa hrane po i.c.v. aplikaciji grelina primerljivi s testno skupino živali, katerim so znanstveniki aplicirali hipotalamusni NPY, ki dokazano neposredno vpliva na vnos hrane. Vnos hrane je bil pri NPY sicer višji kakor pri aplikaciji samega grelina. Povišano koncentracijo RH so znanstveniki opazili pri obeh načinih aplikacije grelina, vendar je bil učinek pri intraperitonealni aplikaciji znatno manjši. Na končen vnos hrane večkratno zaporedno apliciranje grelina enake koncentracije ni imelo bistvenega vpliva. Le sprememba oz. povišana koncentracija oz. odmerek grelina je rezultiral v višji koncentraciji izločenega RH. Učinek grelina pri intraperitonealni aplikaciji je bil hiter. Največjega so zaznali petnajst minut po aplikaciji, ki pa se je v 30 minutah po aplikaciji povrnil na bazalno raven (27).

#### **1.1.5. Dejavniki, ki vplivajo na izločanje grelina in delovanje grelina**

Raziskovalci so dokazali, da je koncentracija izražene mRNK grelina močno povišana pri stradanih miših, kar potrjuje dejstvo, da je eden najpomembnejših dejavnikov izražanja grelina prav prehranjenost organizma. Na izločanje grelina pa ne vplivata samo prehraben status organizma in energijska bilanca, katere smo že opisali, temveč tudi drugi dejavniki, kot so na primer endokrini dejavniki. Vpliv estrogenih hormonov na grelin je glede na dognanja znanstvenikov različen. V raziskavi na ljudeh so znanstveniki primerjali nivo grelina med kontrolno žensko in moško populacijo. Ugotovili so, da je nivo plazemskega grelina pri ženskah višji za kar 60 % (moški  $130,0 \pm 10,3$ ; ženske  $194,3 \pm 19,4$  fmol / ml), kar naj bi bila po njihovem posledica vpliva estrogenih hormonov na izražanje mRNK grelina (33).

V raziskavi Clegg in sod. (34) so bile podgane z odstranjenimi jajčniki in podgane moškega spola bistveno bolj občutljive na centralno ali periferno aplikacijo grelina različnih koncentracij kakor skupina podgan s prisotnimi jajčniki. V raziskavo so vključili tudi transgene miši z izbitim genom za grelinski receptor (miši *Ghsr<sup>-/-</sup>*). Ko so primerjali skupine transgenih miši z odstranjenimi jajčniki in miši divjega tipa z odstranjenimi jajčniki, so raziskovalci prišli do ugotovitve, da se pri divjem tipu miši poveča vnos hrane in telesna masa, za razliko od transgenih. To po njihovem dognanju pomeni, da postopek odstranitve



jajčnikov poveča vnos hrane s sprostivjo dodatnega grelina, ki bi ga drugače zaviralo delovanje endogenih estrogenov. Predhodna aplikacija estradiola testnim skupinam, ki so jim nato centralno ali periferno aplicirali še grelin, je izničila s predhodnim poskusom dokazan učinek grelina na povečan vnos hrane. Na podlagi rezultatov raziskave Clegg in sod. lahko domnevamo, da estrogeni hormoni vplivajo na signalno pot grelina in s tem zmanjšajo njegove oreksigene učinke. V nasprotju s prejšnjo raziskavo Sakata in sod. (35) v svoji *in vitro* raziskavi na izoliranih podganjih želodčnih celicah trdijo, da estrogeni, sintetizirani v želodcu, stimulirajo izražanje gena in produkcijo grelina v odvisnosti od odmerka. Celice, ki so jim dodali antagonist receptorja za estrogene (ICI-182 780) in nato estrogene, niso kazale zvečanega izražanja grelina. V isti *in vivo* raziskavi so znanstveniki primerjali plazemsko koncentracijo grelina podgan z odstranjenimi jajčniki in podgan z lažno odstranjenimi jajčniki po treh tednih od operacije. Njihov namen je bil določanje vpliva estrogenov iz jajčnikov na izražanje grelina. Izražanje mRNK in plazemska koncentracija grelina se med testnima skupinama proti pričakovanjem ni razlikovala. Nasprotujoča, glede vpliva estrogenih snovi na izražanje grelina, je tudi raziskava Dafapoulos in sod. (36) na ljudeh. Znanstveniki so v raziskavi testirali vpliv estrogenov na koncentracijo plazemskega grelina. Ugotovili so, da med kratkotrajno in dolgotrajno dermalno aplikacijo estrogenov med ženskami z odstranjenimi jajčniki ter ženskami pred in po menopavzi ni prišlo do nikakršnih razlik v koncentracijah plazemskega grelina. Možen odgovor za pojasnitev rezultatov predhodne raziskave (36) je v napačnem načinu aplikacije estrogenov, saj so v sledeči raziskavi Kellokoski in sod. (37), kjer so znanstveniki preučevali vpliv nadomestne estrogenske terapije na nivo grelina v plazmi, prišli do drugačnih zaključkov. Dolgoročna peroralna aplikacija estrogena je povzročila bistven dvig grelina pri ženskah v menopavzi z opravljeno histerektomijo, za razliko od dermalne aplikacije, katera je komaj zaznavno povečala koncentracijo grelina. Znanstveniki so ugotovili, da so bile spremembe v koncentraciji grelina pogojene s spremembami serumskih koncentracij estradiola, kar potrjuje dejstvo, da endokrini dejavniki vplivajo na plazemsko koncentracijo grelina.

## 1.2. Antagonisti grelina

Poleg grelina vplivajo na vnos hrane številni drugi hormoni. Vnos hrane se zmanjša s sproščanjem leptina iz celic maščobnega tkiva ter zviša s sproščanjem grelina. Leptin in grelin sta med seboj negativno uravnana. Vnosa hrane pa ne uravnata le leptin in grelin, ampak v manjši meri tudi mnogo drugih dražljajev in peptidov. Eden izmed teh peptidov je motlin. Raziskovalci so na podlagi strukture motlina razvili nepeptidni agonist, za katerega so že potrdili klinično indikacijo, stimulacijo peristaltičnega gibanja prebavil. Motlin je zelo soroden grelinu, saj se oba vežeta na s proteinom G sklopljen receptor. Poleg tega se njuno aminokislinsko zaporedje prekriva v 53 odstotnem deležu (38). Tako se je s poznavanjem strukture in funkcije grelinskega receptorja (GHS-R 1a) ter grelina pričelo tudi iskanje selektivnih ligandov, ki bi vplivali na vnos hrane.

Raziskovalci so prišli do spoznanja, da agonisti GHS-R spodbujajo apetit in povzročajo izločanje RH, kar potencialno pripomore pri kahesiji ter izgubi telesne mase povezane s starostnimi, rakavimi in degenerativnimi boleznimi (39,40,41). Antagonisti pa imajo, v nasprotju z agonisti, anoreksične učinke. Enkratna aplikacija antagonista [D-Lys-3]-GHRP-6 zmanjša vnos hrane in praznjenje želodca v odvisnosti od odmerka. Večkratna aplikacija pa dodatno vodi do zmanjšanja telesne mase in koncentracije glukoze v krvi, kar nam da vedeti, da so antagonisti grelinskega receptorja dobre potencialne spojine vodnice za zdravljenje debelosti (42,43). Na svetovnem trgu je prisotnih ali pa v višjih fazah razvoja že veliko agonistov ter hkrati izredno malo antagonistov. Eden izmed potencialnih učinkovin z antagonističnim delovanjem na grelinski receptor je peptid P1, ki so ga selekcionirali s pomočjo tehnologije bakteriofagnega prikaza na Katedri za farmacevtsko biologijo, Fakultete za farmacijo v Ljubljani. Peptid P1 se je na *in vitro* modelu izkazal kot učinkovit agonist, saj je zavrl delovanje grelina za kar 60 % (44).

## 2. NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge bomo preizkusili *in vivo* antagonistično aktivnost peptida P1, ki so ga razvili na Katedri za farmacevtsko biologijo. Iz obetavnih predhodnih *in vitro* raziskav (44) pričakujemo, da bomo dokazali antagonistične učinke peptida P1 tudi na *in vivo* modelu.

Kot živalski model bomo uporabili miši linije C57/BL6J. Učinkovitost in delovanje peptida P1 bomo primerjali z antagonistom [D-Lys-3]-GHRP-6 in kontrolno skupino, ki ji bomo aplicirali le placebo dostavni sistem.

V prvem delu bomo proučevali spremembe vnosa hrane med testnima skupinama in kontrolno skupino pri enkratni intraperitonealni (Poskus 1) ali intranazalni (i.n) (Poskus 2) aplikaciji peptida P1, antagonista [D-Lys-3]-GHRP-6 ali nosilnega sistema.

V drugem delu (Poskus 3) bomo proučevali razlike med šestimi skupinami živali: po intraperitonealni aplikaciji peptida P1, antagonista [D-Lys-3]-GHRP-6, grelina, sočasni aplikaciji grelina in peptida P1, sočasni aplikaciji [D-Lys-3]-GHRP-6 in grelina ter nosilnega sistema, določali vpliv na izločanje rastnega hormona (RH). RH bomo merili v serumu pred in po vnosu snovi.

### **3. MATERIALI IN METODE**

Eksperimentalno delo smo izvedli v skladu z etičnimi načeli in standardi. Poskus je odobrila Veterinarska uprava Republike Slovenije. Številka dovoljenja: U34401-23/2013/6.

#### **3.1. Živali**

##### **3.1.1. Genotip/vrsta**

V poskusu smo uporabili divji tip miši, linije C57BL/6J. Živali so vzredili na Veterinarski fakulteti v Ljubljani, v Laboratoriju za genomiko.

##### **3.1.2. Nastanitev živali**

Živali so bile nastanjene v standardnih laboratorijskih pogojih s temperaturo 20–24° C in vlago 55±10 % ter v umetnem ciklu svetlobe: 12 ur teme/12 ur svetlobe. Hranili smo jih s krmo brez fitoestrogenov (Harlan Tekland, Velika Britanija) in vodo z dodano klorovodikovo kislino (1 mL HCl/500 mL vode; umerjeno s končnim pH vode na 3,0). Živalim je bila voda in hrana na voljo *ad libitum*. Poskusne živali so bile pred poskusom nastanjene skupinsko. Vse živali so imele mikrobiološko neoporečno (avtoklavirano) steljo iz žagovine (Lignocel, Nemčija). Kletke so bile ne-ventilirane z rešetkastimi pokrovi, ki smo jih čistili, oziroma jih zamenjali najmanj enkrat tedensko. Kontrola vode in hrane je bila opravljena vsak dan.

#### **3.2. Priprava poskusnih živali in aplikacija**

##### **3.2.1. Nastanitev poskusnih živali**

Za poskus smo uporabili miši moškega spola starosti 2 do 6 mesecev. Živali smo izolirali in jih individualno nastanili v kletke približno dva tedna pred začetkom poskusa. Živalim je bila hrana in voda na voljo *ad libitum*. Z živalmi smo dnevno rokovali z namenom spremljanja zdravstvenega stanja. Vsakodnevno rokovanje (fiksacija za intraperitonealno aplikacijo) smo izvajali tudi z namenom, da kasnejša aplikacija snovi živalim ne bi predstavljala prevelikega stresa in vplivala na rezultate raziskave.

### 3.2.2. Aplikacija snovi

Pri poskusu smo uporabili tri različne načine aplikacije, in sicer (45,46):

- **Subkutana aplikacija (s.c.):** Je aplikacija v področje kože med lopaticami. Žival smo fiksirali s prijemom, ki nam je zagotovil, da je žival med aplikacijo mirovala in smo tako nemoteno vnesli snov v privzdignjeno kožno gubo. Pazljivi smo morali biti na največji dovoljen volumen snovi  $10\mu\text{l/g}$  telesne mase (TM).
- **Intraperitonealna aplikacija (i.p.):** Žival smo fiksirali s kožno gubo, grbo na hrbtu ter repom. Žival smo držali z glavo obrnjeno navzdol, da smo se izognili aplikaciji v organe. Snov smo skozi trebušno steno aplicirali v trebušno votlino pod kotom  $30^\circ$ , nekoliko levo ali desno od popka med pubično simfizo in ksifoidnim delom, kot je prikazano na Sliki 3. Največji apliciran volumen ni smel presegati  $10\mu\text{l/g}$  TM.



Slika 3: Prikaz intraperitonealne aplikacije (46).

- **Intranazalna aplikacija (i.n.):** Žival smo fiksirali (trdno, da je mirovala), nato pa smo ji s pomočjo pipete na nosnice kanili majhne kapljice naše snovi in počakali, da jo je žival »vdihnila«. Enkratni injiciran volumen ni smel presegati  $5\mu\text{l}$ .

### 3.2.3. *Odvzem krvi in organov*

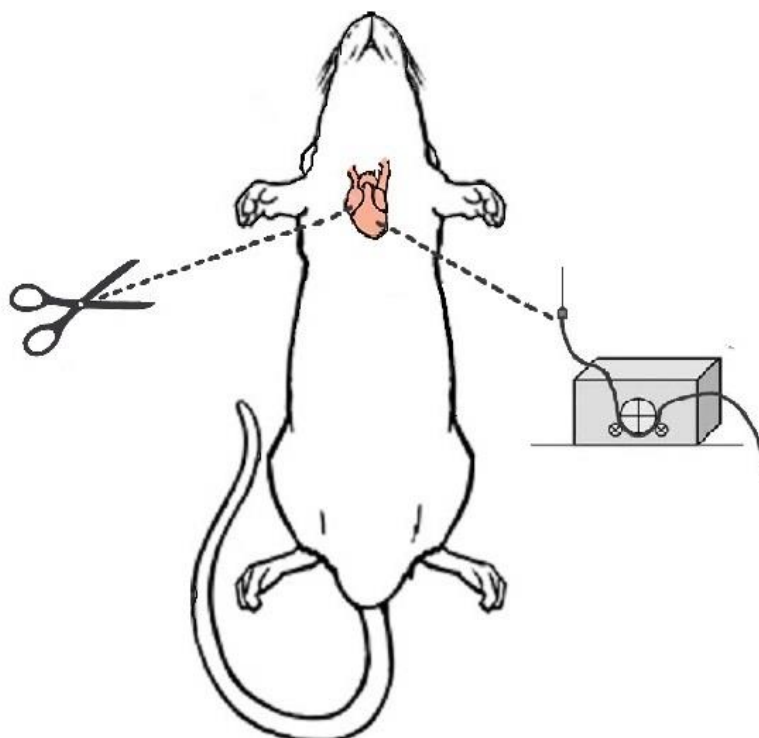
Materiali:

- kirurški instrumenti (škarje, pincete, pean ...),
- igla,
- črpalka,
- pipeta,
- mikrocentrifugirke,
- alkoholni robčki,
- centrifugirke,
- fosfatni pufer (0,05 M, PBS – *ang.* Phosphate-buffered saline),
- 4 % paraformaldehid,
- kirurške rokavice, primerna zaščitna oblačila,
- brisačke,
- flomaster,
- zbiralnik biološko nevarnih odpadkov (trdih in tekočih),
- lanceta,
- ELISA kit: Rat/Mouse Hormone ELISA Kits, 96-Well Plate, Cat#EZRMGH-45K, EMD Millipore Corporation, USA.

Odvzem organov in krvi je potekal, ko so bile živali pod splošno anestezijo, z mešanico anestetikov (ketamina 100 µg/g TM, acepromazina 2 µg/g TM in xilazina 10 µg/g TM), ki smo jo injicirali s.c.. Pred začetkom dela smo s pritiskom na spodnje okončine preverili refleks na bolečino in s tem ugotovili, ali je žival prejela zadostno količino anestetika. Testnim živalim smo odvzeli možgane in kri:

- KRI: Odvzeli smo jo iz submandibularnega pleteža. Žival smo fiksirali, predel odvzema smo očistili z alkoholnim robčkom ter z lanceto vbodli v submandilarni venozni pletež. Vsaki živali smo odvzeli 5 kapljic krvi, kar ustreza volumnu približno 100 do 200 µL (13 % celotnega volumna krvi) in smo jo zbrali v mikrocentrifugirke.

- **MOŽGANI:** Živalim smo odprli prsni koš. Nato smo s pomočjo peristaltične črpalke (Ecoline ISM1079, Ismatec SA) s pretokom 5 mL/min preko levega prekata sprali kri s hladnim 0,05 M fosfatnim pufrom, kot je prikazano na Sliki 4. Po 4 minutah oziroma po pretečenih 20 mL skozi ožilje, smo cevko prestavili v 4 % paraformaldehid, ki je tkiva fiksiral. Po fiksaciji (po pretečenih 20–25 mL), smo s pomočjo pincete ter škarij odvzeli možgane. Možganov v naši raziskavi nismo uporabili. Shranili smo jih za nadaljnje raziskave.



Slika 4: Shema perfuzije oz. spiranja živali (prirejeno po Riffe, 2013(47)).

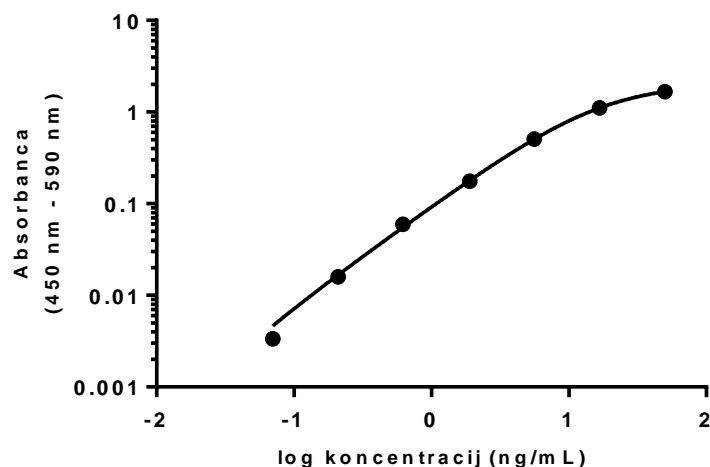
### 3.3. Shranjevanje in nadaljnja obdelava odvzetih tkiv

Kri smo pustili stati eno uro na sobni temperaturi, nato smo jo 15 min centrifugirali pri 2000 g. Serum smo odpipetirali v čiste mikrocentrifugirke in zamrznili na  $-80^{\circ}\text{C}$  vse do izvedbe testa ELISA.

Za določanje RH v serumu smo uporabili ELISA kit test – Rat/Mouse Hormone ELISA Kits, 96-Well Plate, Cat#EZRMGH-45K podjetja EMD Millipore Coporation. Uporabljen kit je sestavljen na principu neposredne oziroma »sendvič« ELISE. Na trdnem nosilcu - 96 mikrotiterski plošči so vezana predhodno titrirana poliklonska protitelesca proti RH. Na ta protitelesca smo nanесли naše vzorce seruma, ki smo jih predhodno redčili z pufrom ELISA kit testa, da smo bili z našimi meritvami v območju merilne/referenčne krivulje. Hkrati smo zraven vzorcev z enakim protokolom tretirali standarde, ki so nam služili za določitev umeritvene krivulje ter slepa vzorca. Po inkubaciji smo mikrotitersko ploščo »sprali« z reagenti ter tako odstranili antigene, ki niso bili specifični za vezavo na protitelesca proti RH. Na mikrotitersko ploščo oziroma kompleks protitelo – RH smo nato vezali sekundarno protitelo konjugirano z biotinom. Sledilo je spiranje, s katerim smo odstranili presežna konjugirana protitelesa. Na imobilizirana biotinska protitelesa smo konjugirali hrenovo peroksidazo (ang. horseradish peroxidase/encime solution). Po inkubaciji je sledilo spiranje presežnega konjugata. Po spiranju smo dodali tetrametilbenzidin – substrat za peroksidazo. Po inkubaciji smo dodali še ustavitven reagent ter nato spektrofotometrično izmerili aktivnost encima pri povišani absorbanci pri 450 nm ter popravljeni absorbanci pri 590 nm po zakisevanju oblikovanih produktov. Vrednosti absorbanc smo med seboj odšteli. Prav tako smo od razlike absorbanc odšteli tudi vrednosti povprečja slebih vzorcev.

Vrednosti absorbanc smo nato s pomočjo programa GraphPad Prism s funkcijo 5-parameter logistic equation obdelali, iz vzorcev standardov smo tako naredili umeritveno krivuljo prikazano na Sliki 5, na podlagi katere smo lahko določili vrednost RH v naših vzorcih.





Slika 5: Umeritvena krivulja

### 3.4. Priprava testnih snovi

Preiskovane snovi smo shranjevali pri  $-20^{\circ}\text{C}$ , bodisi v praškastem ali tekočem stanju in jih alikvotirali, da bi preprečili večkratno zamrzovanje in odtajanje.

Za raztapljanje preiskovanih snovi smo uporabili dve različni raztopini, in sicer nosilni sistem 1 in nosilni sistem 2. Nosilni sistem 1 je fiziološka raztopina, ki je v končni formulaciji vsebovala dimetil sulfoksid (DMSO / Dimethyl sulfoxide) v razmerju 9:1 in smo jo uporabili pri poskusih 1 in 2. Nosilni sistem 2, ki smo ga uporabili v poskusu 3, je bil enak sestavi nosilnega sistema 1, le da smo mu dodali še goveji serumski albumin (Bovine serum albumin / BSA) v končni koncentraciji 0,25 %.

#### 3.4.1. Pozitivna kontrola

Kot pozitivno kontrolo smo uporabili antagonist [D-Lys-3]-GHRP-6 (Bachem, Bubendorf, Switzerland), ki smo ga v poskusih aplicirali v koncentraciji  $6,7\ \mu\text{mol/kg TM}$ . Odmerek raztopine preiskovane snovi smo v poskusu 1 pripravili za vse živali enako – glede na povprečno maso izračunano iz telesne mase vseh živali v skupini, v poskusu 2 pa glede na

telesno maso posamične živali. Za poskus 3 smo pripravili končno raztopino z vsebnostjo 200 nmol antagonista na posamično žival.

#### **3.4.2. Peptid P1**

Peptid P1, ki so ga po naročilu sintetizirali v podjetju EZ biolabs (EZBiolabs, Carmel, Indiana, US), smo za poskus 1 pripravili v končni koncentraciji 6,7  $\mu\text{mol/kg}$  TM z nosilnim sistemom 1. Odmerek za posamično miš smo pripravili glede na povprečno telesno maso izračunano iz telesne mase vseh živali v skupini. V poskusu 2 smo prav tako z nosilnim sistemom 1 pripravili raztopino s povečano koncentracijo, in sicer 67  $\mu\text{L/kg}$  TM glede na telesno maso posamične živali. V poskusu 3 smo peptid P1 pripravili v koncentraciji 2000 nmol na miš z nosilnim sistemom 2.

#### **3.4.3. Grelin**

Grelin (Bachem, Bubenheim, Schwitterland) smo pripravili v koncentraciji 30 nmol na miš, raztopljen v nosilnem sistemu 2.

#### **3.4.4. Grelin in Peptid P1**

Raztopino grelina in peptida P1 smo pripravili v koncentraciji 30 nmol grelina ter 2000 nmol peptida P1 na miš v nosilnem sistemu 2.

#### **3.4.5. Grelin in [D-Lys-3]-GHRP-6**

Raztopino grelina in [D-Lys-3]-GHRP-6 smo pripravili v koncentraciji 30 nmol grelina ter 200 nmol antagonista [D-Lys-3]-GHRP-6 na miš v nosilnem sistemu 2.

### **3.5. Analiza podatkov**

Dobljene podatke smo obdelali, predstavili in analizirali s programom GraphPad Prism, verzije 6. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili Kolmogorov-Smirnof test, da smo ugotovili normalnost porazdelitve dobljenih podatkov. Ob normalni porazdelitvi podatkov

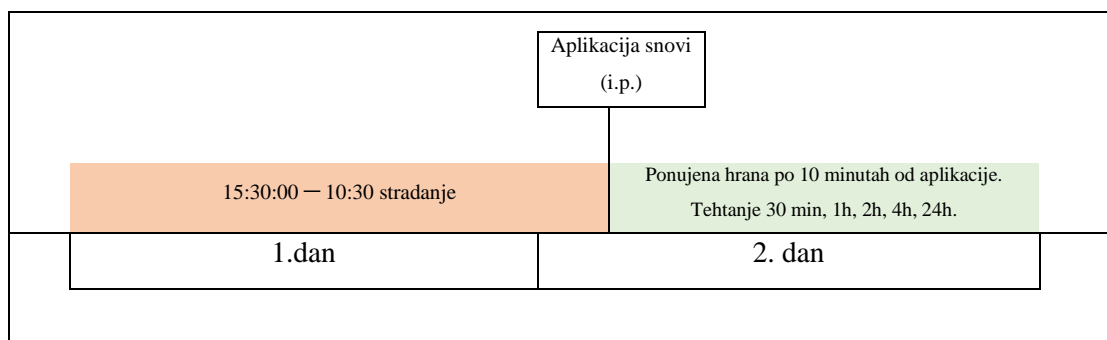
smo opravili ANOVA Test (Bonferoni test), ob nenormalni porazdelitvi pa ne-parametrični ANOVA Test (Kruskal-Wallis test). Razlike smo sprejeli za statistično značilne, če je bila vrednost  $p < 0,05$ , kar na grafih označimo z \*.

## 4. EKSPERIMENTALNO DELO

Eksperimentalno delo smo izvedli v skladu z etičnimi načeli in standardi. Poskus je odobrila Veterinarska uprava Republike Slovenije dne 23.8.2013 z številko dovoljenja: U34401-23/2013/6.

### 4.1. Poskus 1

Poskus 1 smo začeli z odstavitvijo hrane ob 15:30 uri, tik pred začetkom nočnega cikla v koloniji. Pred samim pričetkom aplikacije smo stehali živali in pripravili raztopine preiskovanih snovi. Ob 10:30 smo začeli z intraperitonealno aplikacijo snovi (kontrola (število živali (n) = 5), peptid P (n = 5), [D-Lys-3]-GHRP-6 (n = 6)). Hrano smo živalim ponudili 10 minut po aplikaciji snovi, oziroma po približno 20 urah stradanja. Ponudili smo tri 3 sveže brikete, ki smo jih predhodno stehali. Vnos hrane smo spremljali/merili v naslednjih časovnih intervalih: 30 min, 1 h, 2 h, 4 h in 24 h po aplikaciji snovi, kot je prikazano na Sliki 6.

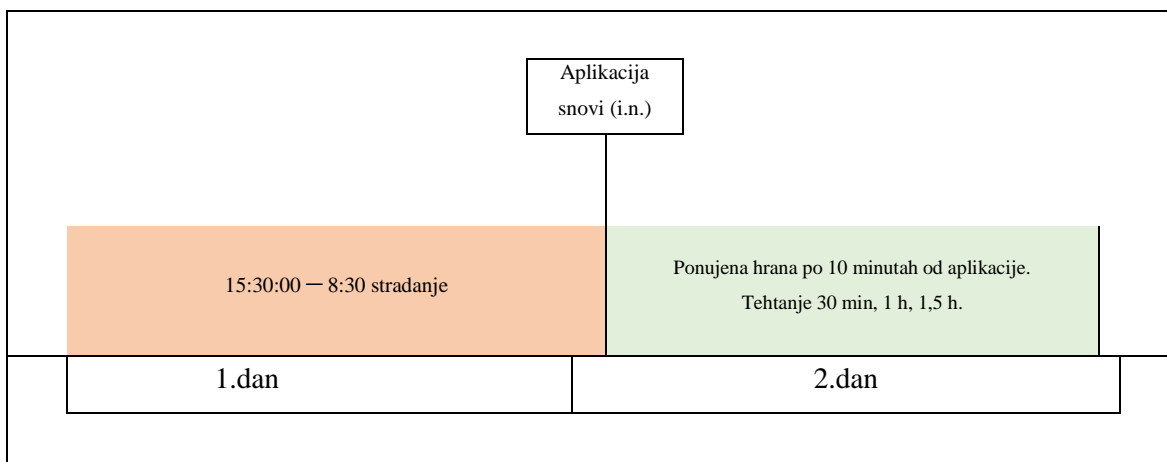


Slika 6: Shema poskusa 1.

### 4.2. Poskus 2

Poskus 2 smo začeli z odstavitvijo hrane ob 15:30 uri. Živali smo naslednje jutro stehali in ob 8:30 intranazalno tretirali s snovmi (kontrola (n = 2), peptid P1 (n = 2), [D-Lys-3]-GHRP-6 (n = 2)) z volumnom  $2 \times$  po 4  $\mu$ L, s časovnim presledkom 5 minut. Hrano smo živalim

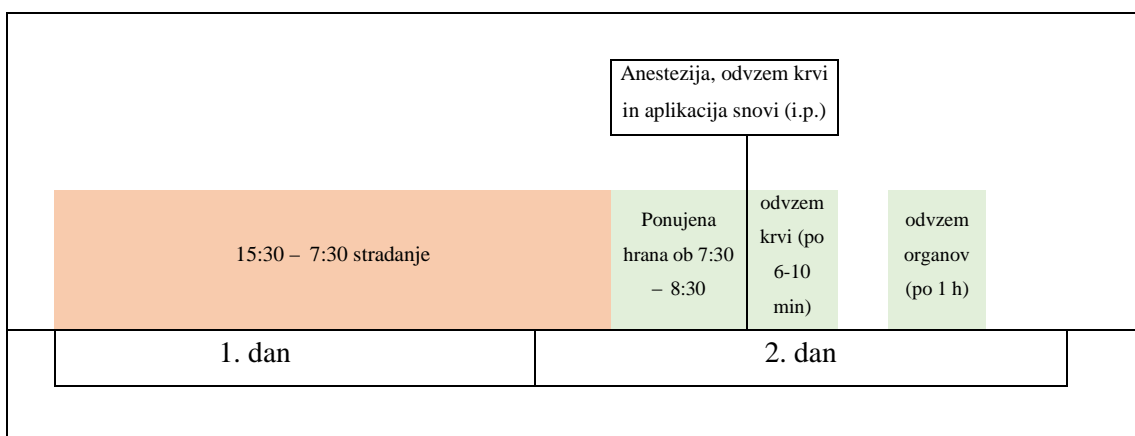
ponudili 10 minut po zadnji aplikaciji. Ponudili smo tri sveže brikete, ki smo jih predhodno stehtali. Vnos hrane smo spremljali, oziroma merili 30 min, 1 h in 1,5 h po aplikaciji snovi, kot je prikazano na Sliki 7.



Slika 7: Shema poskusa 2.

### 4.3. Poskus 3

Poskus 3, katerega časovni potek je prikazan na Sliki 8, smo pričeli z odstavitvijo hrane ob 15:30 uri. Naslednji dan, ob 7:30, smo živalim za eno uro ponudili tri sveže brikete, ki smo jih predhodno stehtali. Po pretečeni 1 uri, smo hrano stehtali, da bi ocenili vnos hrane, ter živali anestezirali s s.c. aplikacijo anestetika. Sledil je odvzem krvi iz submandibularnega pleteža ter intraperitonealna aplikacija snovi (kontrola (n = 6), peptid P1 (n = 6), [D-Lys-3]-GHRP-6 (n = 6), grelin (n = 7), grelin + peptid P1 (n = 8), grelin + [D-Lys-3]-GHRP-6 (n = 6)). V časovnem okviru 6–10 minut po aplikaciji snovi smo na enak način še enkrat odvzeli vzorec krvi. Po 1 uri od aplikacije smo živali žrtvovali in jim odvzeli organe.

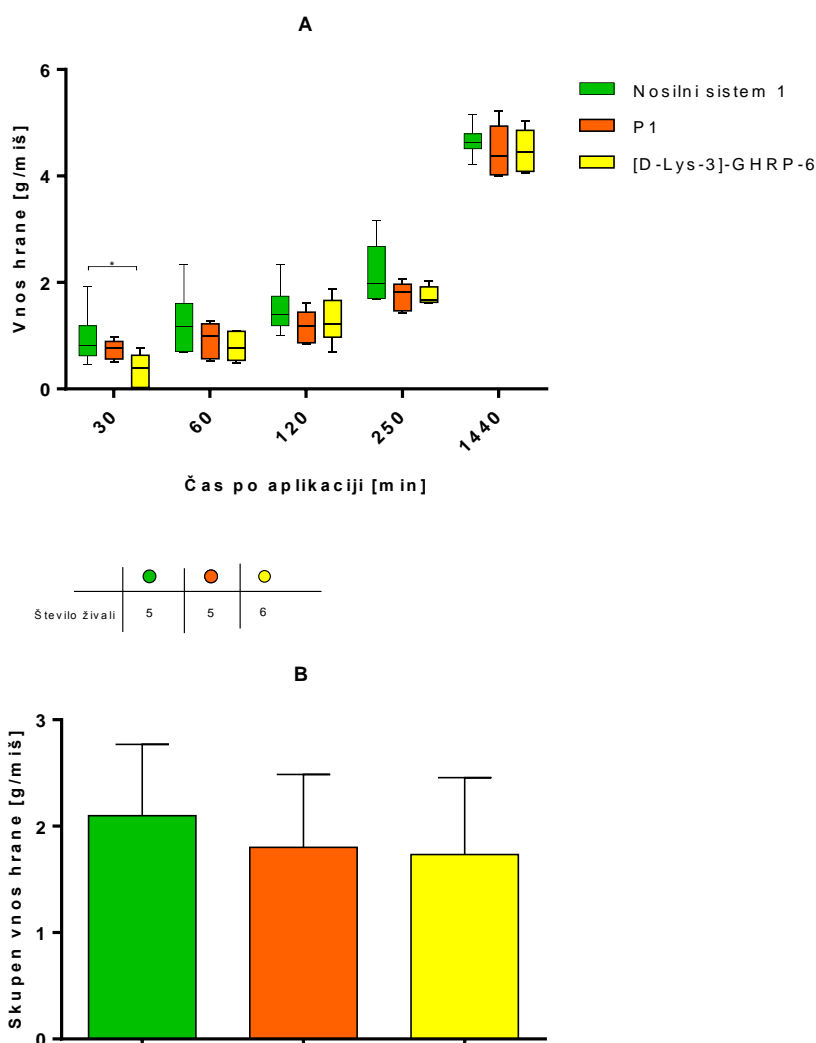


Slika 8: Shema poskusa 3.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Vpliv peptida P1 na vnos hrane

V prvem poskusu smo miške razdelili v tri skupine: pozitivno kontrolo ([D-Lys-3]-GHRP-6), negativno kontrolo (nosilni sistem 1) ter tretjo skupino, ki je prejela peptid P1. Predpostavili smo, da se bo peptid P1 po intraperitonealni aplikaciji vezal na receptorje za grelin v centralnem živčnem sistemu (CŽS) in nevronih vagusa ter s tem preprečil izločanje RH in hkrati zavrnil apetit, kar bi posledično vodilo do zmanjšane vnosa hrane v primerjavi s kontrolno skupino. Rezultati poskusa so prikazani na Sliki 9.

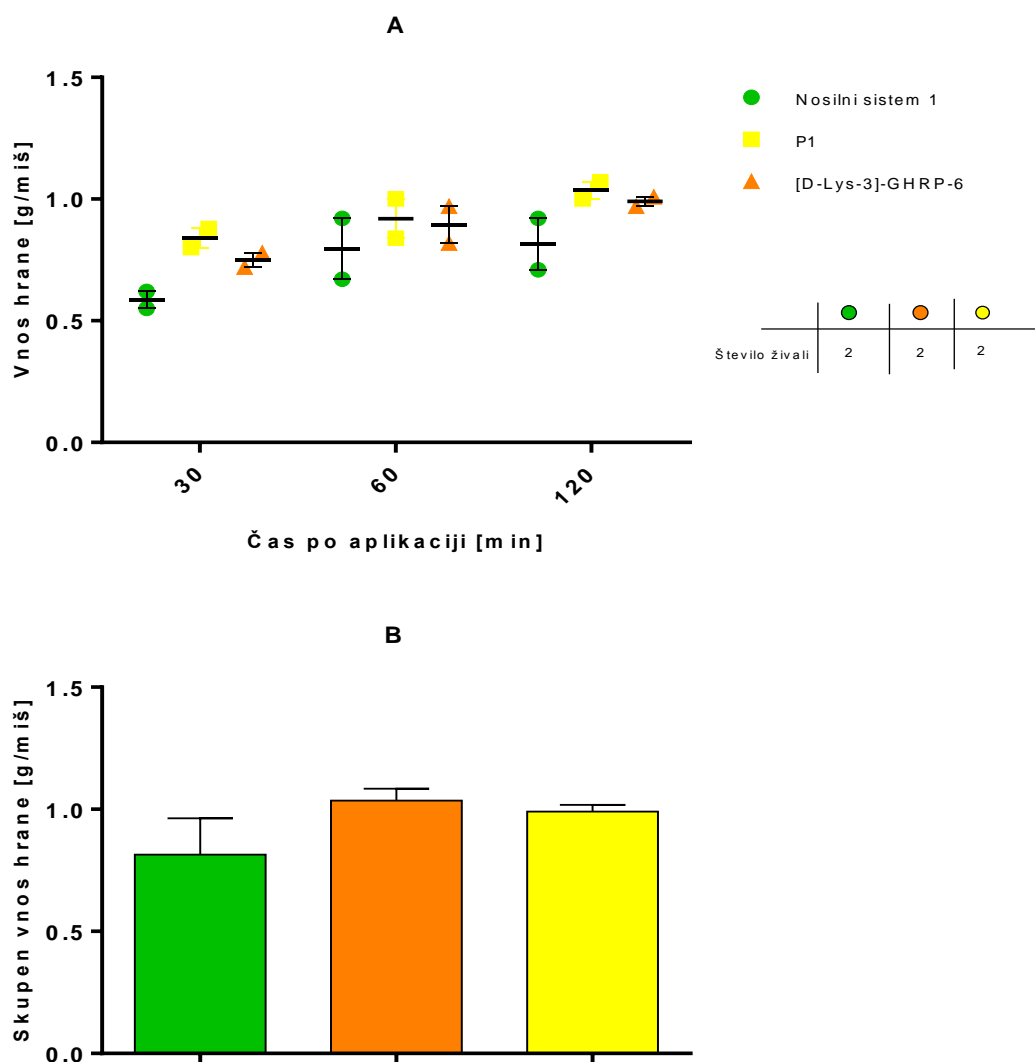


Slika 9: Prikaz rezultatov poskusa 1 – intraperitonealne aplikacije.

Vnos hrane na miš v odvisnosti od časa intraperitonealne aplikacije snovi (A). Skupen vnos hrane na miš po preteku 2h od aplikacije snovi s prikazom standardne napake povprečja (SEM) (B). Statistično značilna razlika je označena z \* ( $p < 0,05$ ) (2wayANOVA: Bonferoni test).

Iz podatkov je razvidno, da ni prišlo do statistično značilnih razlik med posamičnimi testnimi skupinami pri različnih časovnih točkah. Izjema je točka 30 minut po aplikaciji. Pri prvi meritvi vnosa hrane 30 minut po aplikaciji snovi je bil vnos hrane pri [D-Lys-3]-GHRP-6 signifikantno nižji v primerjavi z negativno kontrolo, v skladu z njegovim kratkotrajnim antagonističnim delovanjem. Pričakovanega učinka, da bodo živali, ki bodo tretirane z [D-Lys-3]-GHRP-6 in peptidom P1, kazale zmanjšan apetit in ne bodo zainteresirane za hranjenje, nismo zaznali, saj je bilo njihovo obnašanje podobno skupini, ki je prejela le nosilni sistem (negativna kontrola).

V drugem poskusu smo miškam snovi (nosilni sistem 1, peptid P1 ter [D-Lys-3]-GHRP-6) aplicirali še intranazalno. S tem načinom aplikacije smo želeli omogočiti učinkovitejše prehajanje v CŽS. Pričakovali smo bolj izrazit vpliv na vnos hrane kakor pri poskusu 1. Zaradi majhnega vpliva na vnos hrane pri poskusu 1 smo za 10 krat povečali odmerek peptida P1. Rezultati poskusa so prikazani na Sliki 10.



Slika 10: Prikaz rezultatov poskusa 2 – intranazalne aplikacije.

Odvisnost vnosa hrane od časa aplikacije (A). Skupen vnos hrane (B) po preteku 2 ur od aplikacije snovi s prikazom standardne napake povprečja (SEM) (ANOVA:Kruskal-Wallis test).

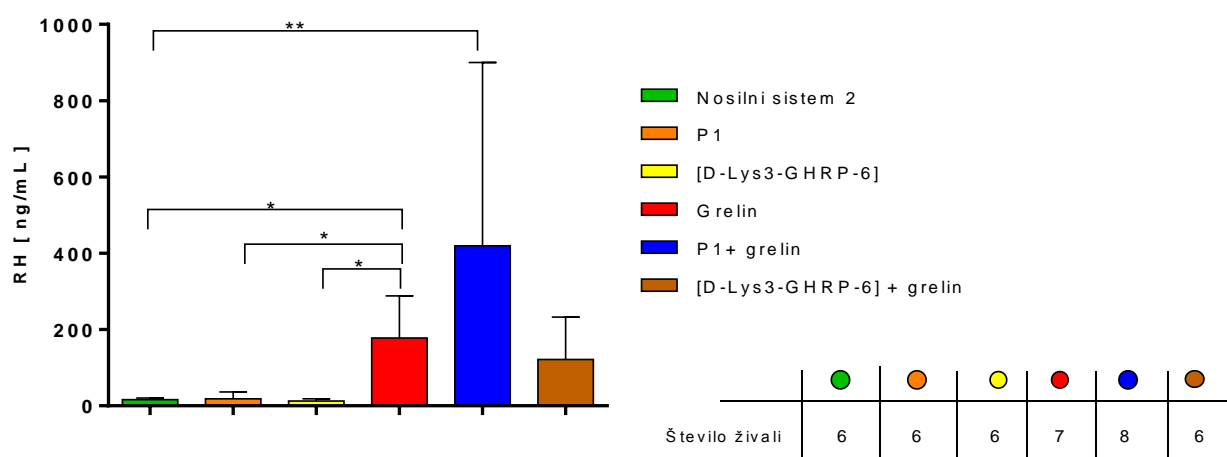
Pri poskusu 2 intranazalno apliciran peptid P1 ni imel vpliva na vnos hrane. Pri [D-Lys-3]-GHRP-6 nismo opazili zmanjšane vnosa hrane, kot smo ga zaznali v poskusu 1 pri intraperitonealni aplikaciji snovi.



## 5.2. Vpliv peptida P1 na izločanje ravnega hormona

V tretjem poskusu smo preizkušali vpliv peptida P1 in vpliv sočasne aplikacije peptida P1 in grelina na izločanje RH. Vpliv na izločanje RH smo primerjali z vplivom, ki ga ima sam antagonist [D-Lys-3]-GHRP-6, sočasna aplikacija [D-Lys-3]-GHRP-6 in grelina, sam grelin ter nosilni sistem 2 po i.p aplikaciji. Vpliv apliciranih snovi na izločanje RH smo določali z določanjem koncentracije RH v serumu.

Rezultati poskusa vpliva različnih snovi na nivo RH v serumu krvi so prikazani na Sliki 11.



Slika 11: Prikaz rezultatov poskusa 3 – vpliv testnih snovi na RH.

Nivo ravnega hormona v serumu pri različnih testnih skupinah s standardno napako povprečja (SEM).

Statistično značilne razlike so označene z \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ) (ANOVA: Kruskal-Wallis test).

Na Sliki 11 lahko opazimo bistvene razlike v koncentracijah RH med testno skupino, ki je prejela grelin in med negativno kontrolno skupino, ki je prejela le nosilni sistem, kar je v skladu s samim delovanjem signalizacijske poti grelina. Posledica injiciranja grelina je večje izločanje RH, kar smo dokazali v poskusu 3. Peptid P1 in [D-Lys-3]-GHRP-6 nista vplivala na povečano izločanje ravnega hormona, ko sta bila aplicirana samostojno. Ob sočasni aplikaciji [D-Lys-3]-GHRP-6 in grelina se je povprečna koncentracija RH malenkost zmanjšala v primerjavi z aplikacijo samega grelina. Razlika je statistično neznačilna. Po

sočasni aplikaciji peptida P1 in grelina pa je prišlo do velikega povečanja koncentracije rastnega hormona v primerjavi s skupino, kjer je bil dodan samo grelin.

## 6. RAZPRAVA

### 6.1. Vpliv peptida P1 na vnos hrane

Predhodne raziskave so pokazale vpliv [D-Lys-3]-GHRP-6 in grelina na vnos hrane. [D-Lys-3]-GHRP-6 apliciran intraperitonealno ali intracerebroventrikularno zmanjša vnos hrane (42,43), za razliko od grelina, ki stimulira vnos hrane (27,48).

Vpliv aplikacije peptida P1 na vnos hrane smo preverili z intraperitonealno in intranazalno aplikacijo. Za negativno kontrolo smo uporabili testno skupino miši, ki smo jim injicirali le nosilni sistem. Kot pozitivna kontrola nam je služila testna skupina miši, ki smo jim injicirali antagonist receptorja za grelin GHS-R-1a [D-Lys-3]-GHRP-6. V poskusu 2 smo živalim vnesli snovi intranazalno in nismo ugotovili razlik med testnimi skupinami. Pri intraperitonealni aplikaciji smo po 30 minutah od aplikacije ugotovili signifikantno znižan vnos hrane v skupini, ki smo ji injicirali [D-Lys-3]-GHRP-6, v primerjavi z nosilnim sistemom. Znižan vnos hrane pri 30 minutah dokazuje antagonistično delovanje agonista [D-Lys-3]-GHRP-6, kar se ujema s podatki iz literature (42,43), saj je njegovo delovanje kratkoročno z največjo jakostjo delovanja na začetku, ki izzveni po preteku 2 ur od intraperitonealne aplikacije [D-Lys-3]-GHRP-6. Kljub desetkratnem povečanju odmerka peptida P1 pri intranazalnem poskusu nismo zaznali bistvenih razlik med testnimi skupinami, prav tako nismo zaznali nobenega učinka pri pozitivni kontroli [D-Lys-3]-GHRP-6. Predvidevamo lahko, da so molekule prevelike, da bi prečkale krvno-možgansko bariero in se v CŽS – hipotalamusu vezale na receptorje ali pa uporabljajo kakšno drugo vrsto transporta, oziroma delujejo na vnos hrane samo periferno z vezavo na vagusni živec. Treba je poudariti, da je bil poskus 2, kjer smo vnašali snovi intranazalno, preliminarne narave, saj je bil izveden na zelo majhnem številu živali. Za dokončno potrditev rezultatov bi bilo treba ta poskus ponoviti na večji skupini živali. Rezultati našega poskusa so le delno primerljivi s prejšnjimi študijami. V našem poskusu smo hrano ročno stehali in vstavili na mrežo kletke. Druga možnost bi bila uporaba metabolnih kletk, kjer je merjenje hrane avtomatizirano. Take kletke omogočajo poleg merjenja vnosa hrane tudi natančno merjenje izločkov živali (urina in iztrebkov), ki se ločeno zbirajo pod kletko. Te kletke omogočajo natančnejše meritve, vendar so za živali včasih celo bolj stresne, saj so nastanjene na rešetkah brez nastila in potrebujejo dalj časa za navajanje. Z meritvami v metabolnih kletkah bi lahko dobili natančnejše rezultate in bi morda opazili razlike še med drugimi posamičnimi

skupinami, oziroma med negativno kontrolo in peptidom P1. Kljub vsemu pa predvidevamo, da antagonističen učinek peptida P1 tudi z drugimi meritvami ne bi bil večji kot pri antagonistu [D-Lys-3]-GHRP-6. Razlog temu bi lahko bila slabša *in vivo* stabilnost peptida P1. Peptid P1 je čist peptid, čigar peptidne vezi so tarča peptidaz, zaradi katerih lahko začne hitro razpadati in ima slabšo obstojnost. Za razliko od peptida P1 je [D-Lys-3]-GHRP-6 delno kemijsko spremenjen peptid, ki ima v primerjavi s peptidom P1 daljšo obstojnost v metabolizmu.

## 6.2. Vpliv aplikacije peptida P1 na izločanje rastnega hormona

V somatotropnih celicah hipofize je izraženih veliko ionskih kanalov. Grelin in sintezni analogi vplivajo na delovanje  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  kanalov. Grelin z vezavo na GHS-R-1a tako preko nastanka inozitol trifosfata poviša znotrajcelične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  ionov in posledično poveča sproščanje RH (7,49) iz celic hipofize. Prav tako je peptid P1 v *in vitro* raziskavi izvedeni na Fakulteti za Farmacijo, v primerjavi z [D-Lys-3]-GHRP-6, imel močnejši vpliv na  $\text{Ca}^{2+}$  ione, kar pomeni, da ima potrjen vpliv na receptor GHS-R-1a preko zaznavanja sekundarnih prenašalcev. V Poskusu 3 smo preizkušali vpliv peptida P1, antagonista [D-Lys-3]-GHRP-6, grelina, nosilnega sistema, kombinacije peptida P1 in grelina ter kombinacije [D-Lys-3]-GHRP-6 in grelina na izločanje RH. V tem poskusu smo živalim po stradanju ponudili hrano za eno uro. Glede na to, da so se vse prenehale hraniti po eni uri in glede na izsledke drugih raziskav predvidevamo, da so se v tem času najedle do sitega in da se jim je koncentracija njihovega lastnega (endogenega) grelina v krvi znižala. Zaradi nizke koncentracije endogenega grelina smo v tem poskusu vključili tudi skupino živali, ki smo ji še dodatno injicirali eksogeni grelin. S tem smo dobili skupino, ki je predstavljala pozitivno kontrolo, saj je znano, da grelin povzroči dvig RH v krvi. Pri peptidu P1 in [D-Lys-3]-GHRP-6 smo pričakovali nižjo raven RH v krvi kakor pri apliciranju nosilnega sistema ter veliko nižjo od apliciranja samega grelina. Koncentracije RH po aplikaciji samega peptida P1 ali [D-Lys-3]-GHRP-6 se niso razlikovale od kontrolne skupine. V testni skupini pri aplikaciji eksogenega grelina smo zaznali povišano izločanje RH v krvi v primerjavi z negativno kontrolo, kar je v skladu s predhodnimi raziskavami in našo hipotezo. V skupini s sočasno aplikacijo peptida P1 in grelina smo zaznali nepričakovano povišanje koncentracije RH v krvi v primerjavi z negativno kontrolo, ki je prejela nosilni sistem.

Razlogov za nepričakovano povečano raven sproščanja RH pri sočasni aplikaciji grelina in peptida P1 je lahko mnogo. Vsekakor bi bilo v nadaljevanju smiselno raziskovati dejansko vezavno mesto peptida P1 na receptor za grelin GHS-R1a ter njegov vpliv na koncentracijo  $\text{Ca}^{2+}$  ionov sočasno z grelinom ter primerjati njuna vezavna mesta z vezavnim mestom antagonista [D-Lys-3]-GHRP-6. Znanstveniki so z usmerjeno mutagenezo in modeliranjem receptorja GHS-R-1a ugotovili, da se ključna mesta vezave agonista razlikujejo od mesta vezave, ki določajo konstitutivno aktivnost (so od liganda neodvisna), čeprav se na receptorju nahajajo zelo blizu drug drugega (50). Ena od možnih razlag sinergističnega delovanja grelina in peptida P1, ob sočasnem apliciranju, bi lahko bila v sočasni vezavi na receptor za grelin in s tem močnejšim učinkom izločanja RH. Možna razlaga močnejšega izločanja RH je tudi aktivacija nepoznatih sekundarnih prenašalcev. Možno je, da se naš peptid zaradi nestabilne peptidne narave razgradi na gradnike, ki v kombinaciji z grelinom pripomorejo k večjemu izločanju RH.

Znano je, da ima grelinski receptor veliko bazalno (konstitutivno) aktivnost, kar nam da vedeti o velikem fiziološkem pomenu receptorja za sam organizem. Znani zaviralci bazalne aktivnosti so tudi inverzni agonisti grelina. Možno je, da na fiziološko aktivnost receptorja ne deluje samo agonist grelin, temveč tudi še neznan endogeni inverzni agonist (51). Prav tako ne poznamo vseh signalnih poti grelinskega receptorja. Signalizacija grelinskega receptorja poteka preko treh različnih G proteinov ( $G_{\alpha q}$ ,  $G_{\alpha i/o}$ ,  $G_{\alpha 12/13}$ ) ter ostalih poteh. Za razliko od endogenega liganda – grelina, ki ima zmožnost aktivacije največ G proteinov, aktivirajo sintetične spojine le nekatere izmed njih ali druge signalne poti (52). V raziskavi Constatini in sod. (53) so znanstveniki raziskovali delovanje novega antagonista grelinskega receptorja, derivata karbohidrazida - GSK1614343. Njegov vpliv na RH je bil v skladu s pričakovanji, vendar pa je povzročal druge nepričakovane učinke podobne grelinu (povišan vnos hrane in telesne mase). Iz slednjih in podobnih študij lahko trdimo, da je delovanje s proteinom G sklopljenega receptorja za grelin in vloga grelina v *in vivo* sistemu še zelo nerazjasnjena. Prav tako je aktivacija receptorja odvisna od njegove konformacije, na katero vplivajo različni ligandi, ki nam v večini ostajajo še nejasni (53,54). Moč signalizacije je bila pri nekaterih peptidnih in nepeptidnih ligandih pogojena z zmožnostjo alosteričnega povezovanja in ne direktno preko njihove ortosterične vezave (51). V raziskavi Holst in sod. (55) so raziskovalci med seboj primerjali različne nepeptidne in peptidne agoniste receptorja za grelin v mestu vezave in v signalizacijski poti. Najvišjo signalizacijsko aktivnost so opazili pri sočasni aplikaciji hormona grelina z eksogenim agonistom. Grelin je po nadaljnji

raziskavi aktiviral le določeno podenoto receptorja in tako se je lahko agonist vezal na drugo podenoto in deloval sočasno z grelinom. Tako je grelinski receptor s svojo raznovrstnostjo in različnimi možnostmi aktivacije, glede na vezavno mesto, zelo dobra tarča za razvoj spojin vodnic, ki bi imele selektivnejše delovanje. Z boljšim razumevanjem in aktivacijo le določenih podenot receptorja bi bilo tveganje za neželene učinke veliko manjše.

## 7. SKLEP

Grelin in njegovi antagonisti so bili in še bodo v znanstvenem svetu izziv mnogih raziskovalnih skupin, z namenom poiskati spojne vodnice, ki bi zavrle apetit in s tem pripomogle k zdravljenju debelosti, ki je v današnjem času vse večji problem.

V magistrski nalogi smo želeli preveriti delovanje peptida P1, ki je v *in vitro* testih pokazal antagonistično delovanje, tudi *in vivo* na mišjem modelu linije C57BL/6J.

Pri prvem poskusu smo med testnimi skupinami ugotovili razliko pri vnosu hrane le med antagonistom [D-Lys-3]-GHRP-6 in kontrolno skupino živali. Vnos hrane je bil v skladu s predhodnimi študijami, vendar smo v naši raziskavi zaznali razliko pri prvi meritvi 30 minut po aplikaciji.

Pri poskusu 2 z intranazalno aplikacijo snovi nismo zaznali razlik pri vnosu hrane med testnimi skupinami. Kot smo že omenili, je bil ta poskus preliminaren in bi ga bilo potrebno za dokončno potrditev rezultatov ponoviti. Če bi se rezultati na večjem številu živali potrdili, bi lahko domnevali, da snovi ne prehajajo čez krvno možgansko bariero in/ali delujejo le periferno na vagusni živec.

V poskusu 3 smo merili koncentracije RH v serumu krvi. Ob sočasni aplikaciji peptida P1 in grelina, kjer smo pričakovali nižjo vrednost RH, kot pa pri aplikaciji samega grelina, smo dobili nepričakovan rezultat, nasproten našemu predvidevanju. Koncentracija izmerjenega RH je bila najvišja v primerjavi z vsemi ostalimi testnimi skupinami. Možno je, da peptid P1 deluje na različno podenoto receptorja za grelin v primerjavi z grelinom in prav tako v primerjavi z [D-Lys-3]-GHRP-6 ter tako pride do drugačnega fiziološkega učinka. Za podrobnejše razlage bi bilo potrebno opraviti raziskave vezavnega mesta peptida P1, grelina ter [D-Lys-3]-GHRP-6.

Bolj natančno spremljanje porabo krme, presnove in izločkov živali bi lahko dosegli z uporabo metabolnih kletk. Kemijsko stabilnost peptida P1 pa bi bilo smiselno stabilizirati s kemijsko modifikacijo peptida.

## 8. LITERATURA

1. Coterill, S. ((1996-)2013). Medical Terminology for Cancer. 12: The Endocrine System (Hormones). Dostopno na: <http://www.cancerindex.org/medterm/medtm12.htm>
2. Flis, I. (2017). Hormoni. Zdravstveni zavod Flis Maribor. Dostopno na: <https://www.dr-flis.si/hormoni>
3. Bowen, R. Hormones, Receptors and Control Systems. V: Pathophysiology of the Endocrine System. Colorado State University: Dostopno na: <http://www.cancerindex.org/medterm/medtm12.htm>
4. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Van der Ploeg LH: A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273: 974–977.
5. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato N, Matsuo H, Kangawa K: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.
6. Date Y, et al: Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000; 141: 4255-4261.
7. Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K: Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2001; 12 (3): 118-122.
8. Hosoda H, Kojima M, Kangawa K: Biological, Physiological, and Pharmacological Aspects of Ghrelin. *Journal of Pharmacological Sciences* 2006; 100: 398-410.



9. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL: Identification of the Acyltransferase that Octanoylates Ghrelin, an Appetite-Stimulating Peptide Hormone. *Cell* 2008; 132: 387–396
10. Wajnrajch MP, Ten IS, Gertner JM, Leibel RL. Genomic organization of the human ghrelin gene. *Journal of Endocrine Genetics* 2000; 1 (4): 231–233.
11. Gualillo O, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C. One ancestor, several peptides post-translational modifications of preproghrelin generate several peptides with antithetical effects. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2006; 256: 1-8
12. Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB. Ghrelin—a hormone with multiple functions. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2005; 25 (1): 27-68
13. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, and Kangawa K. Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 21995-22000.
14. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407: 908-913.
15. Bernardis LL, Bellinger, LL. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci. Biobehav* 1996; 20: 187-287
16. Gualillo O, Lago F, Gómez-Reino J, Casanueva FF, Dieguez C. Ghrelin, a widespread hormone: insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action. *FEBS Letters* 2003; 552 (2-3): 105-109.

17. Muller EE. et al. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol. Rev.* 1991; 79: 511-607.
18. Asakawa A, Inui A, Kaga O, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Nijjima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001;120 (2): 337-345
19. Date Y, Murakami N, Toshinai K et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123 (4): 1120-8.
20. Malagón MM, Luque RM, Ruiz-Guerrero E, Rodríguez-Pacheco F, García-Navarro S, Casanueva FF, Gracia-Navarro F, Castaño JP. Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. *Endocrinology* 2003; 144 (12):5372-80.
21. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(12): 4908-11.
22. Hataya Y, Akamizu T, Takaya K, Kanamoto N, Ariyasu H, Saijo M, Moriyama K, Shimatsu A, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86 (9): 4552.
23. Asakawa A, Inui M, Fujimiya et al. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 2005; 54 (1): 18-24.
24. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 665-8.

25. Gnanapava S, Kola B, Bustin SA, et al. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87 (6): 2988-2991, 2002.
26. Davenport PA, Bonner TI, Foord SM, Harmar AJ, Neubig R, Pin JP, Spedding M, Kojima M, Kangava K. International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin Receptor Nomenclature, Distribution, and Function. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 541-546.
27. Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000; 141(11): 4325-8
28. Arosio M, Ronchi CL, Beck-Peccoz P, Gebbia C, Giavoli C, Cappiello V, Conte D, Peracchi M. Effects of modified sham feeding on ghrelin levels in healthy human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(10): 5101-4.
29. Blom WA, Lluch A, Stafleu A, Vinoy S, Holst JJ, Schaafsma G, Hendriks HF. Effect of a high-protein breakfast on the postprandial ghrelin response. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(2): 211-20.
30. Erdmann J, Töpsch R, Lippl F, Gussmann P, Schusdziarra V. Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake, plasma insulin, and glucose. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6): 3048-54.
31. Haqq AM, Farooqi IS, O'Rahilly S, Stadler DD, Rosenfeld RG, Pratt KL, LaFranchi SH, Purnell JQ. Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mass index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(1): 174-8.
32. Seoane LM, Al-Massadi O, Caminos JE, Tovar SA, Dieguez C, Casanueva F. Sensory Stimuli Directly Acting at the Central Nervous System Regulate Gastric Ghrelin Secretion. An ex Vivo Organ Culture Study. *Endocrinology* 2007; 148(8): 3998-4006.

33. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(10): 4753-8.
34. Clegg DJ, Brown LM, Zigman JM, Kemp CJ, Strader AD, Benoit SC, Woods SC, Mangiaracina M, Geary N. Estradiol-Dependent Decrease in the Orexigenic Potency of Ghrelin in Female Rats. *Diabetes* 2007; 56 (4): 1051-1058.
35. Sakata I, Tanaka T, Yamazaki M, Tanizaki t, Zheng Zan, Sakai T. Gastric estrogen directly induces ghrelin expression and production in the rat stomach. *Journal of Endocrinology* 2006; 190: 749–757.
36. Dafopoulos K, Chalvatzas N, Kosmas G, Kallitsaris A, Pournaras S, Messinis IE. The effect of estrogens on plasma ghrelin concentrations in women. *J. Endocrinol. Invest.* 2010; 33: 109-112.
37. Kellokoski E, Pöykkö SM, Karjalainen AH, Ukkola O, Heikkinen J, Kesäniemi YA, Hörkkö S. Estrogen replacement therapy increases plasma ghrelin levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(5):2954-63.
38. Poitras P, Peeters TL. Motilin. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity.* 2008; 15(1): 54–57.
39. Currow DC, Abernethy AP. Anamorelin hydrochloride in the treatment of cancer anorexia-cachexia syndrome. *Future Oncology* 2014; 10 (5): 789-802.
40. Gobburu JVS, Agersø H, Jusko WJ, Ynddal L. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling of Ipamorelin, a Growth Hormone Releasing Peptide, in Human Volunteers. *Pharmaceutical Research.* 1999; 16 (9): 1412-1416.

41. Haddley K. Relamorelin. Ghrelin receptor agonist, treatment of constipation, treatment of anorexia nervosa, treatment of diabetic gastroparesis. *Drugs Fut* 2014, 39(11): 775.
42. Ueno S, Yoshida S, Mondal A, Nishina K, Koyama M, Sakata I, Miura K, Hayashi Y, Nemoto N, Nishigaki K, Sakai T. In vitro selection of a peptide antagonist of growth hormone secretagogue receptor using cDNA display. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(28): 11121-6.
43. Asakawa A, Inui A, Kaga T, et al. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut*. 2003; 52(7): 947-952.
44. Vodnik, M. Razvoj peptidnih učinkovin za poseganje v delovanje grelina in vpliv estrogenih snovi na njegovo izražanje : [doktorska disertacija] / Miha Vodnik. - [Ljubljana : M. Vodnik, 2013]. - VI, 115 str. : ilustr. ; 30 cm
45. Živin, A. M., Aplikacija in odvzem telesnih tekočin. Poskusne živali: skrb za živali in kvalitetne raziskave/ urednik Martina Perše- 1.izd. Ljubljana: Medicinska fakulteta 2010.
46. Procedures With Car. Newcastle University. 2016. Dostopno na: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/66/4/984/F2.expansion.html>
47. Riffe. At the heart of the matter: an introduction to transcordial perfusion. 2013. Dostopno na: <http://voltagegate.blogspot.si/2013/07/at-heart-of-matter-introduction-to.html>
48. Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, et al. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* 2002; 143: 155–62.
49. Adasue Magdaleno-Méndez et. Al. Ghrelin increases growth hormone production and functional expression of NaV1.1 and Na V1.2 channels in pituitary somatotropes. *Endocrine*, 2014: 48(48).

50. Brid Callaghan B, Furness JB. Novel and Conventional Receptors for Ghrelin, Desacyl-Ghrelin, and Pharmacologically Related Compounds. *Pharmacol. Rev.* 2014; 66; 984-1001.
51. Holst B, Brandt E, Bach A, Heding A, Schwartz TW. Nonpeptide and peptide growth hormone secretagogues act both as ghrelin receptor agonist and as positive or negative allosteric modulators of ghrelin signaling. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 2400-2411.
52. Sivertsen B, Holliday N, Madsen AN, Holst B. Functionally biased signalling properties of 7TM receptors - opportunities for drug development for the ghrelin receptor. *Br J Pharmacol* 2013; 170:1349-1362.
53. Costantini VJA, Vicentini FE, Sabbatini Enzo Valerio M, et al . GSK1614343, a Novel Ghrelin Receptor Antagonist, Produces an Unexpected Increase of Food Intake and Body Weight in Rodents and Dogs . *Neuroendocrinology* 2011; 94 (2): 158-68.
54. Mary S, Damian M, Louet M, Floquet N, Fehrentz JA, Marie J, Martinez J, Baneres JL. Ligands and signaling proteins govern the conformational landscape explored by a G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 8304-8309.
55. Holst B, Cygankiewicz A, Halkjær Jensen T, Ankersen M, Schwartz TW. High Constitutive Signaling of the Ghrelin Receptor—Identification of a Potent Inverse Agonist. *Molecular Endocrinology* 2003; 17 (11): 2201–2210.