

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA KOMUČAR

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA KOMUČAR

PROUČEVANJE VPLIVA PEPTIDNEGA MIMETIKA N-KONČNEGA DELA GRELINA NA IZRAŽANJE OREKSIGENIH ŽIVČNIH PRENAŠALCEV IN NA AKTIVACIJO NEVRONOV V HIPOTALAMUSU MIŠJIH MOŽGANOV

STUDYING THE INFLUENCE OF PEPTIDE MIMETIC OF N-TERMINAL GHRELIN ON EXPRESSION OF OREXIGENIC NEUROPEPTIDES AND ACTIVATION OF NEURONS IN THE MOUSE HYPOTHALAMUS

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo. Eksperimentalno delo sem opravljala v Laboratoriju za genomiko živali, Inštitut za predklinične vede, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder in so-mentorstvom asist. dr. Neže Grgurevič.

Zahvala

Zahvaljujem se so-mentorici asist. dr. Neži Grgurevič, mentorici izr. prof. dr. Mojci Lunder in prof. dr. Gregorju Majdiču za strokovno usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge. Hvala tudi staršema Marjeti in Janezu ter bratu Gregorju, ki so mi tekom študija vseskozi stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko izdelala samostojno pod vodstvom mentorice izr. prof. dr. Mojce Lunder in so-mentorice asist. dr. Neže Grgurevič.

Tanja Komučar

Predsednik magistrske komisije: izr. prof. dr. Matjaž Jeras

Član Komisije: doc. dr. Ilija German Ilić

Mentorica: izr. prof. dr. Mojca Lunder

So-mentorica: asist. dr. Neža Grgurevič

Vsebina

POVZETEK	III
ABSTRACT	IV
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VI
1. UVOD	1
1.1 Endogeni modulatorji vnosa hrane	2
1.2 Centralni modulatorji vnosa hrane.....	2
1.3 Periferni modulatorji vnosa hrane.....	4
1.4 Grelin	6
1.4.1 Sinteza grelina	6
1.4.2 Grelinski receptor	7
1.4.3 Uravnavanje izločanja grelina	8
1.4.4 Vpliv grelina na sproščanje rastnega hormona.....	8
1.4.5 Vpliv grelina na uravnavanje apetita	8
1.5 C-fos.....	10
1.6 Ozadje naloge	11
1.7 Imunohistokemija	11
2 NAMEN DELA.....	13
3 MATERIALI IN METODE.....	14
3.1 Živali in fiksiranje možganov po aplikaciji preskušanih spojin in njihovih kombinacij	14
3.2 Imunohistokemija na plavajočih rezinah mišjih možganov.....	15
3.2.1 Rezanje tkiva in blokiranje nespecifičnih vezavnih mest.....	15
3.2.2 Vezava primarnih, sekundarnih protiteles ter encima hrenove peroksidaze .	16
3.2.3 Obarvanje kompleksa protiteles in tarčnih proteinov.....	17

3.3	Fotografiranje proučevanih možganskih jeder	18
3.4	Obdelava slik in analiza podatkov	20
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	21
4.1	Izražanje AgRP v PVN in ARC.....	21
4.2	Izražanje NPY v PVN.....	23
4.3	Izražanje c-fos.....	27
5	SKLEP.....	30
	LITERATURA.....	31

POVZETEK

Grelin je hitro-delujoči oreksigeni hormon, ki v hipotalamusu spodbuja sintezo oreksigenih nevropeptidov, kot sta nevropeptid Y (NPY) in agutiju sorodne beljakovine (AgRP) ter s svojim delovanjem spodbuja vnos hrane. V največji meri ga izločajo enteroendokrine celice želodca in stena črevesja. Grelin in njegov receptor, ki ga imenujemo receptor sekretogoga rastnega hormona 1a (GHSR-1a), sta dandanes zanimivi in priljubljen temi raziskovanja, saj lahko farmakološko delovanje na grelinski receptor močno pripomore k preprečevanju debelosti ali kaheksije. Na Fakulteti za farmacijo so v okviru doktorskega dela Mihe Vodnika žeeli najti novo peptidno učinkovino, ki bi uravnavala prenos grelinskega signala na GHSR-1a. Z rešetanjem peptidnih bakteriofagnih knjižnic so izbrali večje število peptidov, ki so imeli različno močne antagonistične učinke na GHSR-1a. Na podlagi poskusov *in vitro* so izbrali peptid z največjim antagonističnim učinkom in ga poimenovali peptid P1, ki so ga kasneje preizkusili tudi na miših *in vivo*. Živali so razdelili v 6 skupin in jim intraperitonealno aplicirali raztopino nosilca, antagonist D-Lys3-GHRP-6, peptida P1, grelina, kombinacijo grelina in D-Lys3-GHRP-6 ter kombinacijo grelina in peptida P1. V okviru naše magistrske naloge smo delo nadaljevali tako, da smo v možganih miši z imunohistokemijsko metodo na plavajočih tkivnih rezinah proučevali izražanje AgRP in NPY, ki delujeta oreksigeno, ter izražanje proteina c-fos, ki se uporablja kot označevalec aktivnih živčnih celic. Osredotočili smo se na področja v hipotalamusu, ki imajo pomembno vlogo pri urejanju energetskega ravnotežja v telesu, in sicer na arkvatno jedro (ARC) in paraventrikularno jedro (PVN). V ustrezno obdelanih rezinah možganov smo pod mikroskopom določili število celic, ki so izražale proučevane proteine in rezultate statistično obdelali v statističnem programu NCSS, grafe pa kreirali v programu Excel. Prišli smo do zaključka, da se izražanje NPY in AgRP med posameznimi skupinami miši ni razlikovalo. Pri proučevanju izražanja c-fos pa smo ugotovili, da se je v skupini poskusnih živali, ki so jim predhodno aplicirali kombinacijo grelina in peptida P1, izražanje c-fos statistično značilno povečalo, v primerjavi z ostalimi petimi skupinami. Grelin je v kombinaciji s peptidom P1 povečal število aktivnih živčnih celic v ARC, kar nakazuje, da bi peptid P1 lahko deloval kot alosterični modulator GHSR-1a.

Ključne besede: grelin, GHSR-1a, peptid P1, neuropeptid Y, agutiju soroden peptid, c-fos, imunohistokemija

ABSTRACT

Grelin is a fast-acting orexigenic hormone that promotes the synthesis of orexigenic neuropeptides in the hypothalamus, such as neuropeptide Y (NPY) and agouti related protein (AgRP), and promotes food intake. To the greatest extent it is secreted by enteroendocrine cells of the gastric and intestinal wall. Grelin and its receptor, called the growth hormone secretagogue receptor 1a (GHSR-1a), are nowadays interesting and popular research topics, since pharmacological action on the receptor can greatly contribute to the prevention of obesity or cachexia. At the Faculty of Pharmacy, within the doctoral thesis of Miha Vodnik, they tried to find a new peptide substance that modulates ghrelin signal transduction on GHSR-1a. By screening phage display peptide libraries, a large number of peptides with different antagonistic effects on GHSR-1a were selected. Based on *in vitro* studies, a peptide with the strongest antagonistic effect was selected and named P1. Later, the P1 peptide was also tested *in vivo* in mice. Animals were divided into 6 groups and intraperitoneally injected with vehicle, antagonist D-Lys3-GHRP-6, P1 peptide, ghrelin, combination of ghrelin and D-Lys3-GHRP-6 and combination of ghrelin and P1 peptide. Within our Master's thesis we studied the expression of orexigenic AgRP and NPY and the expression of the c-fos protein, which is a marker of neuronal activation, in mice brain with the method of immunohistochemistry on floating tissue slices. We focused on areas in the hypothalamus, which play an important role on regulation of energy balance in the body, arcuate nucleus (ARC) and paraventricular nucleus (PVN). Under the microscope we determined the number of cells in treated brain that expressed studied proteins. We analyzed the results with NCSS software and constructed the charts in Excel. We found out that NPY and AgRP expression did not differ among the individual groups of mice. In studying of c-fos expression, we noticed that combination of ghrelin and P1 peptide significantly increased c-fos expression in comparison to other five groups. Ghrelin, in combination with peptide P1, increased the number of active nerve cells in ARC, which indicates that P1 peptide might act as an allosteric modulator on GHSR-1a.

Komučar T. Proučevanje vpliva peptidnega mimetika N-končnega dela grelina na izražanje oreksigenih živčnih prenašalcev in na aktivacijo nevronov v hipotalamusu mišjih možganov.
Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2018.

Key words: ghrelin, GHSR-1a, P1 peptide, neuropeptide Y, agouti related peptide, c-fos, immunohistochemistry

SEZNAM OKRAJŠAV

AgRP	Agutiju soroden peptid
ARC	Arkvatno jedro
CART	S kokainom in amfetaminom uravnavan prepis
CRH	Kortikoliberin
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DMSO	Dimetil sulfoksid
GABA	γ -aminobenzojska kislina
GHRH	Rastni hormon sproščajoči hormon / somatoliberin
GHSR-1a	Receptor sekretagoga rastnega hormona 1a
GLP-1	Glukagonu soroden peptid 1
GOAT	Grelinska O-aciltransferaza
LHA	Lateralni hipotalamus
MCH	Melanin-koncentrirajoči hormon
MC3 in MC4	Melanokortinski receptor 3 in 4
NTS	<i>Nucleus tractus solitarius</i>
NPY	Nevropeptid Y
PBS	Fosfatni pufer z dodatkom NaCl
PFA	Perifornikalno področje
POMC	Proopiomelanokortin
PVN	Paraventrikularno jedro
TBS	Pufer Tris z dodatkom NaCl
TRH	Tiroliberin
α -MSH	α -melanocite stimulirajoči hormon

1. UVOD

Tekom zgodovine je bilo preživetje organizmov odvisno od sposobnosti oskrbe s hranili za njihove takojšnje presnovne potrebe in shranjevanja odvečne energije za obdobja, ko hrani v okolju ni bilo dovolj. V ta namen so se razvili številni mehanizmi, ki zagotavljajo zadostno količino hrani v krvi in zalogu v maščobnem tkivu (1, 2). Eden od mehanizmov uravnavanja energetskega ravnotežja poteka na nivoju uravnavanja prehranjevanja. Uravnavanje prehranjevanja delimo na kratkoročno in dolgoročno. Pri kratkoročnem uravnavanju vnosa hrane govorimo o začetku hranjenja, ki ga povzroča občutek lakote in prenehanju hranjenja z občutkom sitosti. Lakoto izzovejo znižane plazemske ravni hrani in znižanje ravni anoreksigenih hormonov, ki sicer zmanjšujejo lakoto. Vse to vodi v aktivacijo oreksigenih nevronov, ki ležijo v hipotalamusu in spodbujajo lakoto. Hipotalamus je področje, ki leži v diencefalonu ali vmesnem delu možganov in je odgovorno za uravnavanje številnih homeostatskih funkcij v organizmu, kot so: uravnavanje temperature, krvnega tlaka, osmotskega ravnovesja, nadziranje delovanja endokrinih žlez, itd. Med pomembnimi nalogami hioptalamusa je tudi uravnavanje energetskega ravnovesja in s tem tudi prehranjevanja. Hipotalamus se povezuje z avtonomnim živčnim sistemom, ki oživčuje vse notranje organe, vključno s prebavili. Prebavni trakt je eden prvih organskih sistemov, ki posreduje možganom informacije o prisotnosti hrane in hraničnih snovi v telesu. Raztezanje želodca zazna živec vagus in skupaj s porastom plazemskih koncentracij hrani ter sproščanjem anoreksigenih peptidov oblikuje občutek sitosti. Pomembno vlogo pri kratkoročnem uravnavanju hranjenja igra oreksigeni hormon grelin, ki se v največji meri sprošča iz stene želodca (3). V dolgoročno uravnavanje prehranjevanja pa sta vpletena hipotalamus in maščobno tkivo z izločanjem hormona leptina. Če je vnos energije večji od porabe, se njeni viški shranjujejo v maščobnem tkivu. Dlje kot traja pozitivna energijska bilanca, bolj se povečujeta količina maščevja in izločanje leptina iz maščevja. Leptin ob normalnem delovanju deluje na arkvatno jedro (ARC), zavira lakoto ter spodbuja občutek sitosti. Ima ključno vlogo pri uravnavanju dolgoročnega prehranjevanja, kar pomeni, da pomanjkanje leptina ali leptinskega receptorja vodi v enormno debelost že v zgodnjem otroštvu (2).

1.1 Endogeni modulatorji vnosa hrane

Možgani s sprejemanjem informacij preko krvnega obtoka in senzoričnih živcev iz gastrointestinalnega trakta zaznavajo procese prebave, zaloge energije v telesu in vplivajo na energetsko ravnotežje in vnos hrane (1, 4). Aferentni živčni signali iz mehanoreceptorjev, ki zaznavajo raztegnitev želodca in kemoreceptorjev, ki so občutljivi na spremembo vrednosti pH, osmolarnosti in sestavo hranil, se preko vagusa prenesejo do medialnega in dorzomedialnega dela jedra *nucleus tractus solitarius* (NTS) v podaljšani hrbtenjači. Živčne poti, ki potekajo iz NTS oživčujejo paraventrikularno jedro (PVN), dorzomedialno jedro, ARC, lateralni del hipotalamusa (LHA) in centralno jedro amigdale. Projekcije NTS do visceralnega senzoričnega dela talamusa, skupaj z visceralno senzorično skorjo, oblikujejo občutek sitosti (1).

Povezavo med gastrointestinalnim traktom in možgani so dokazali s pomočjo operativnih in kemijskih pristopov (4). Stimulacija vagusa ob želodcu, ali vstavitev in raztegnitev balona v gastrointestinalnem traktu povzroči občutek sitosti, infuzija bogata z maščobo, ogljikovimi hidrati in proteini v tanko črevo pa zmanjša potrebo po zaužitju hrane. Na drugi strani kirurška prekinitev senzoričnih vlaken vagusa iz prebavil poveča čas hranjenja in količino zaužite hrane. Te študije dokazujo močan negativen povraten učinek aferentnega vagusnega živčevja na kontrolo hranjenja (4).

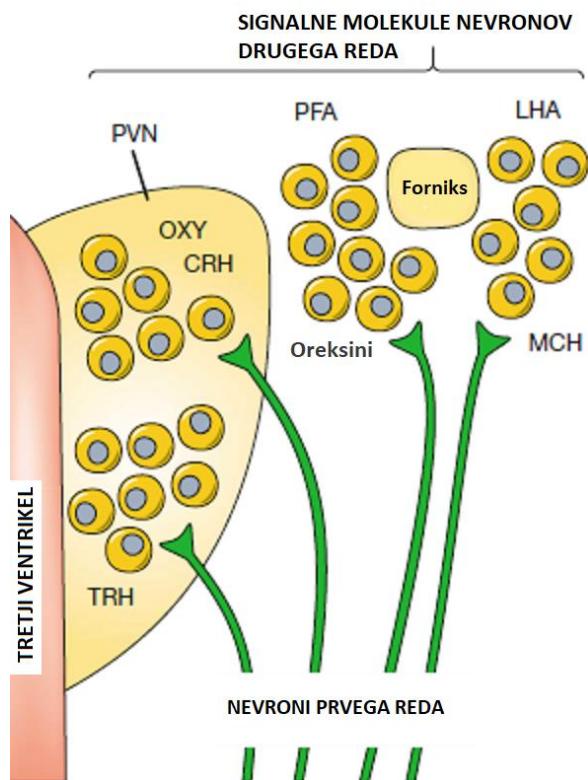
Snovi, ki uravnavajo ješčost ločimo glede na njihov učinek na oreksigene (pospešujejo ješčost) in anoreksigene (zavirajo ješčost), glede na mesto njihovega sproščanja pa na centralne, ki izvirajo iz centralnega živčevja in periferne, endogene modulatorje vnosa hrane, ki se tvorijo v prebavilih.

1.2 Centralni modulatorji vnosa hrane

Nevropeptidi iz hipotalamusa, ki delujejo tako lokalno, hkrati pa difundirajo tudi v druge predele možganov, igrajo osrednjo vlogo pri uravnavanju prehranjevanja. Nevropeptidi so peptidne molekule, ki jih sintetizirajo in nadzorovano sproščajo nevroni. Delujejo na receptorje, ki so prisotni na nevronih (5). Nevrone osrednjega živčevja, ki uravnavajo prehranjevanje, delimo na oreksigene, ki po aktivaciji izražajo oreksigene peptide in ješčost pospešujejo ter anoreksigene, ki proizvajajo anoreksigene peptide in ješčost zavirajo. Ti se nahajajo v ARC, na dnu tretjega ventrikla. Medialno od mediane eminence ležijo nevroni,

ki hkrati izražajo neuropeptid Y (NPY), agutiju soroden peptid (AgRP) in γ -aminobenzojsko kislino (GABA), lateralno pa tisti, ki hkrati izražajo propiomelanokortin (POMC) in transkript CART (angl. cocaine and amphetamine-regulated transcript) (4). Nevrone, ki sočasno izražajo POMC in CART, zmanjšujejo vnos hrane in telesno maso (1, 6). Aktivirajo se pod vplivom anoreksigenih signalov. Iz POMC, s tkivno-specifično post-translacijsko cepitvijo, nastane neuropeptid α -melanocite stimulirajoči hormon (α -MSH), ki preko melanokortinskih receptorjev 3 (MC3) in 4 (MC4) proži anoreksigene učinke, torej zavira vnos hrane (7, 8, 9). Nevrone NPY/AgRP/GABA pa aktivirajo oreksigeni signali. Ob njihovi aktivaciji se torej poveča občutek lakote in zmanjša poraba energije v organizmu. NPY je sestavljen iz 36 aminokislin in je eden najmočnejših oreksigenih peptidov. Pri glodavcih že ena sama intracerebrovaskularna aplikacija NPY v trenutku stimulira hranjenje (6, 7). Konična administracija NPY v PVN hipotalamusa vodi v trajno hiperfagijo in zvišanje telesne mase (4). Obratno pa aplikacija antagonist-a NPY zmanjša vnos hrane. Pred hranjenjem se v PVN močno zviša raven NPY, kar stimulira hranjenje preko aktivacije receptorjev Y1 in Y5 (1, 7). AgRP deluje zaviralno na receptorje MC3 in MC4 in s tem stimulira hranjenje. Receptorja MC3 in MC4 izkazujeta konstitutivno aktivnost, kar pomeni, da ob odsotnosti liganda prožita anoreksigene učinke in s tem zavirata hranjenje. AgRP, ki glede na izsledke Nijenhuisa sodelavci deluje kot inverzni agonist oreksigenu in zato zavira konstitutivno aktivnost receptorjev MC4 in MC3 ter uravnava aktivnost receptorjev MC neodvisno od α -MSH (8, 9, 10, 11). V nasprotju z močnim, a hkrati razmeroma kratkim učinkom NPY, centralno aplicirani AgRP pri glodavcih poveča trajanje vnosa hrane tudi do enega tedna (12). Prav tako kot pri NPY, tudi konična aplikacija AgRP povzroča hiperfagijo in vodi v debelost (13). GABA je inhibitorni nevrotrasmiter, ki še dodatno, z neposrednim delovanjem, inhibira sosednje nevrone POMC/CART. Raziskave, v okviru katerih so s šibkim električnim tokom stimulirali PVN in LHA, so nam omogočile vpogled v vlogo primarnih nevronov, ki ležijo v teh področjih. Stimulacija PVN inhibira vnos hrane, medtem ko ga stimulacija LHA spodbuja. Tovrstne študije dokazujejo, da oreksigene in anoreksigene molekule nastajajo prav v področjih PVN in LHA. Nevrone POMC/CART iz ARC segajo vse do PVN, kjer nato z izločanjem α -MSH, preko receptorjev MC3 in MC4, aktivirajo sekundarne nevrone, da sintetizirajo anoreksigene molekule, kot so kortikoliberin (CRH), tiroliberin (TRH) in oksitocin (14, 15, 16, 17). Nevrone NPY/AgRP/GABA pa segajo do

LHA, kjer preko aktivacije sekundarnih nevronov spodbujajo izražanje oreksina in melanin-koncentrirajočega hormona (MCH). Povezave med nevroni prvega in drugega reda prikazuje Slika 1.



Slika 1: Shematski prikaz lokacije sekundarnih nevronov v hipotalamusu, ki so udeleženi v proces uravnavanja prehranjevanja. Aksoni nevronov NPY/AgRP in POMC/CART iz ARC oživčujejo PVN, LHA in PFA. Skundarni nevrni v predelu PVN izražajo TRH, CRH in OXY ter posredujejo anoreksigene učinke. Sekundarni nevrni v LHA in PFA izražajo oreksine in MCH ter posredujejo oreksigene učinke. Legenda: PVN, paraventrikularno jedro; LHA, lateralni hipotalamus; PFA, perifornikalno področje; TRH, tiroliberin; CRH, kortikoliberin; OXY, oksitocin; MCH, melanin-koncentrirajoči hormon. Prirejeno po (18).

1.3 Periferni modulatorji vnosa hrane

Gastrointestinalni trakt, trebušna slinavka in maščobno tkivo izločajo hormone, ki poleg živca vagusa vplivajo na prehranjevanje. Na mestih kjer je krvno-možganska bariera bolj prepustna, ti hormoni, predvsem tisti peptidne narave, delno vstopajo v možgane, kjer vplivajo na nevrone prvega in posledično drugega reda, lahko pa delujejo tudi posredno, preko vagusa (19).

Inzulin, ki se sprošča iz β -celic Langerhansovih otočkov v trebušni slinavki, deluje anoreksigeno in se sprošča po obroku ter povečuje zaloge glikogena, maščobe in proteinov. Ključne tarče za učinke inzulina na vnos hrane so nevroni, ki izražajo POMC in AgRP (20). Anoreksigeni glukagonu soroden peptid 1 (GLP-1), se sprošča iz distalnega dela tankega črevesa. Receptorji za GLP-1 so prisotni v možganih, pljučih, skeletnih mišicah in maščobnem tkivu. GLP-1 sodeluje pri homeostazi glukoze, praznjenju želodca, razvoju in rasti črevesja in sproščanju inzulina. Živčna vlakna, ki vsebujejo GLP-1 in receptorji zanj se nahajajo v tistih centrih hipotalamusa, ki vplivajo na prehranjevanje (21, 22). Turton in sodelavci so preiskovali vpliv intracerebroventrikularne aplikacije GLP-1 na glodavcih in ugotovili, da je to povzročilo zaviranje vnosa hrane. Ta učinek pa je blokiral antagonist na receptorju za GLP-1 (22). Skupaj z GLP-1 se iz endokrinih celic L tankega in debelega črevesa izloča tudi peptid YY, ki se nespecifično veže na vse podtipe receptorja za NPY. Tako, npr. z vezavo na receptor Y2, proži anoreksigene učinke (23). Najbolj poznan gastrointestinalni peptid, ki posreduje informacije o sitosti možganom je holecistokinin. Če ga aplicirajo živalim pred hranjenjem, zmanjša potrebo po vnosu hrane. Peptid YY se sprošča med hranjenjem iz endokrinih celic I duodenuma in jejunuma. Holecistokininski receptorji A so izraženi na senzoričnih vlaknih vagusa. Zato periferna aplikacija holecistokinina zmanjša vnos hrane pri večini vrst sesalcev (24). Peptid leptin nastaja večinoma v maščobnem tkivu. Njegove ravni v krvnem obtoku so sorazmerne količini maščevja v telesu človeka ali živali (25). Centralna ali periferna aplikacija leptina pri glodavcih povzroči zmanjšanje potrebe po vnosu hrane in izgubo telesne mase (26). Intracerebroventrikularna aplikacija tega peptida ima največji vpliv, saj je glavno mesto njegovega delovanja v hipotalamu. Raven leptina v krvi se pri glodavcih poviša nekaj ur po hranjenju, pri človeku pa šele po nekaj dneh (27). Obratno pa raven leptina v krvi hitro pada pri stradanju. V primeru močno znižane ravni leptina v krvi zaradi stradanja pride do aktivacije hipotalamo-hipofizne osi in do zavrtja razmnoževanja ter zavrtja tiroidne osi in imunskega sistema. Leptin igra tudi zelo pomembno vlogo pri preživetju, in to kadar je hrane premalo ali pa je v izobilju (28). Leptin uravnava aktivnost nevronov v ARC hipotalamusa neposredno z vezavo na leptinski receptor (LRb), preko aktivacije signalizacijske poti JAK-STAT3. Upad ravni leptina med stradanjem zmanjša porabo energije preko aktivacije nevronov NPY/AgRP/GABA in zaviranja nevronov POMC/CART ter stimulacije MCH in

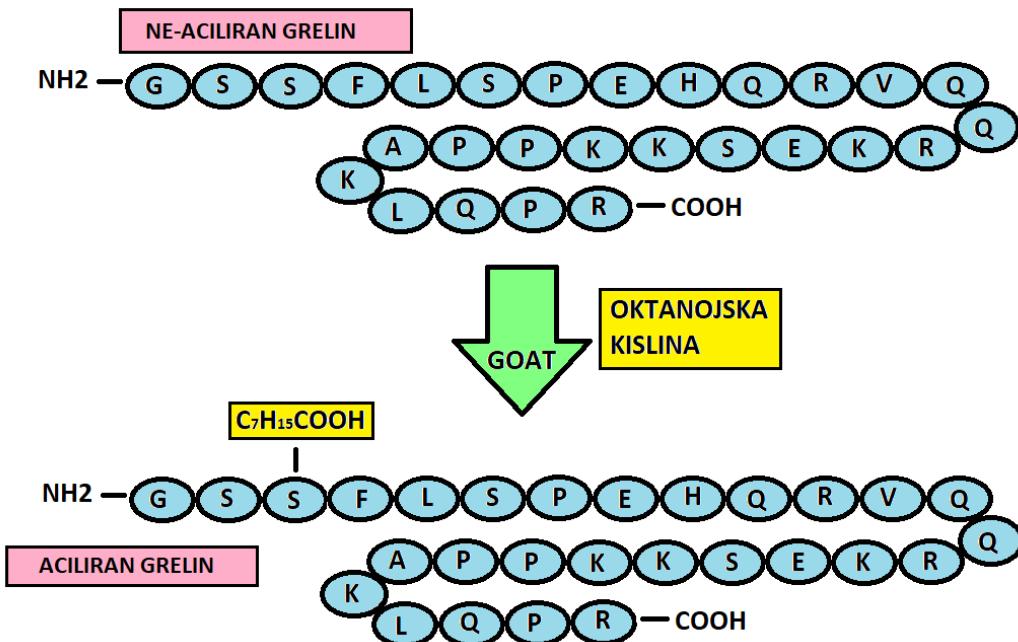
oreksinov v LHA. Obratno pa povečane ravni leptina v krvi v času sitosti zavirajo aktivnost nevronov NPY/AgRP/GABA in povečajo proizvodnjo anoreksigenih peptidov (npr. α -MSH, TRH, CRH) (28, 29).

1.4 Grelin

Tudi grelin spada med periferne modulatorje vnosa hrane, vendar nasprotno od prej omenjenih dejavnikov, ki so anoreksigeni, deluje oreksigeno. Grelin, je peptidni hormon, sestavljen iz 28 aminokislin, ki vpliva na številne fiziološke procese, med katerimi sta najpomembnejša vpliv na povečan vnos hrane in sproščanje rastnega hormona. Svoje učinke posreduje z vezavo na GHSR-1a. V največji meri ga sintetizirajo in izločajo enteroendokrine celice želodca in stene črevesja (30, 3).

1.4.1 Sinteza grelina

Proteinski proizvod gena za grelin zahteva še nadaljnje post-translacijske modifikacije, da lahko nastane aktivna oblika peptida grelina. Pre-pro-grelin se cepi v dva biološko aktivna peptida, obestatin in ne-aciliran grelin (31). Na slednjega pripne grelinska O-aciltransferaza (GOAT) n-oktanoilno skupino (32, 33). Encim pripne acilno skupino na tretji serin v strukturi grelina, kar je prikazano na Sliki 2. Ta modifikacija je pomembna za njegovo oreksigeno aktivnost (32). Dodana hidrofobna veriga konformacijsko spremeni grelin in poveča njegovo hidrofobnost, to pa izboljša interakcijo s celično membrano in spodbudi vezavo na GHSR-1a (32, 33, 34). Prav tako kot koncentracija grelina, je tudi izražanje GOAT v krvnem obtoku odvisno od stanja prehranjenosti (32, 35, 36). Znanstveniki ocenjujejo, da je približno 10 % grelina v krvnem obtoku v aktivni acilirani obliki, ki se je sposobna vezati na receptor in tako spodbujati vnos hrane (37).



Slika 2: Aminokislinsko zaporedje grelina in nastanek njegove aktivne, acilirane oblike. Encim GOAT pripne oktanoilno skupino na tretji serin ne-aciliranega grelina. Modificirana oblika je aktivna in sposobna vezave na receptor GHSR-1a. Legenda: GOAT, gulin O-aciltransferaza; GHSR-1a, receptor sekretagogega rastnega hormona 1a.

Grelin so odkrili v številnih vrstah (38). Aminokislinsko zaporedje aktivnega grelina je med posameznimi vrstami sesalcev, vključujuč s človekom, podgano, mišjo, opico, prašičem, kravo, ovco in psom, zelo podobno, zaporedje prvih desetih aminokisel na N-končnem delu pa je identično (3, 39, 40, 41). Ta podatek nakazuje, da je N-končno področje pomembno za aktivnost tega oreksigenega peptida (34, 38).

1.4.2 Grelinski receptor

GHSR-1a so sprva identificirali kot tarčo eksogenih agonistov, sekretagogov rastnega hormona v hipofizi in hipotalamu. Gre za s proteinom G sklopljen receptor, ki vsebuje 366 aminokisel, urejenih v 7 transmembranskih domen. Receptor je razprtjen po različnih delih možganov, predvsem hipotalamu, natančneje v ARC in ventromedialnem jedru, pa tudi v perifernih tkivih in organih (maščobno tkivo, skorja nadledvične žleze in želodec) (42, 43, 44). Najpomembnejši fiziološki vlogi tega receptorja sta vpliv na vnos hrane in energijsko presnovo (43). Pomembna lastnost receptorja GHSR-1a je njegova visoka konstitutivna aktivnost, kar pomeni, da je aktiven tudi kadar ni aktivno stimuliran z agonistom (45). Za

zavrtje njegove aktivnosti imajo zato večji potencial kot polni antagonisti, inverzni agonisti, ki z vezavo na receptor zmanjša njegovo konstitutivno aktivnost. Zaviranje delovanja receptorja GHSR-1a lahko vodi v upočasnjeno rast in zmanjšanje telesne mase, kar je posledica znižanih ravni oreksigenega peptida NPY (46).

1.4.3 Uravnavanje izločanja grelina

Krvne koncentracije grelina nihajo glede na stanje prehranjenosti. Koncentracije so najvišje v obdobju stradanja in najnižje takoj po obroku (47). Tudi raven glukoze v krvi najverjetneje vpliva na izločanje grelina, saj njena peroralna ali intravenska administracija zmanjša njegovo plazemsko koncentracijo (48). Mehanski razteg želodca ne vpliva na izločanje grelina, saj vnos vode in s tem polnjenje želodca ne vplivata na njegove plazemske koncentracije (49).

1.4.4 Vpliv grelina na sproščanje rastnega hormona

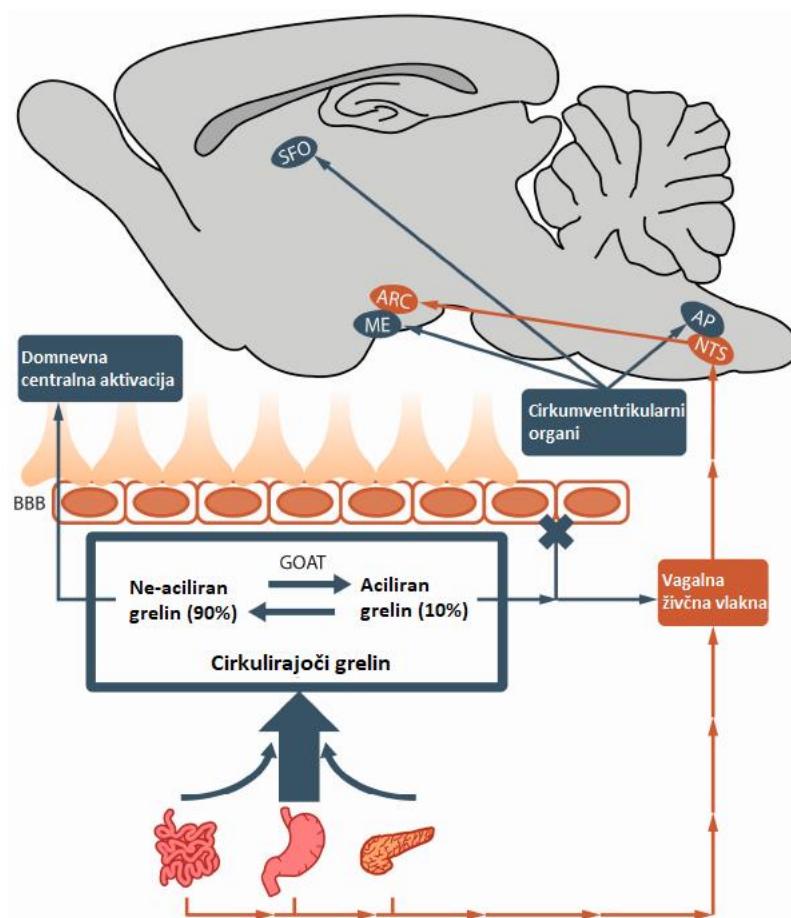
Vpliv na sproščanje rastnega hormona je ena od primarnih funkcij grelina. Grelinska stimulacija tega procesa je dva- do trikrat močnejša od stimulacije s somatoliberinom (GHRH), hormonom hipotalamusa, ki prav tako spodbuja izločanje rastnega hormona iz hipofize (38). Izločanje rastnega hormona je najmočnejše 5 do 15 minut po intravenski injekciji grelina (50). Grelin lahko deluje neposredno na celice hipofize in spodbuja izločanje rastnega hormona, čeprav je za izrazito sproščanje in maksimalni učinek potrebno tudi delovanje samega hipotalamusa in živca vagusa (3, 51, 52). Grelin in GHRH delujeta sinergistično, zato je za maksimalni učinek prvega na izločanje rastnega hormona potrebno tudi sočasno delovanje slednjega (53).

1.4.5 Vpliv grelina na uravnavanje apetita

1.4.5.1 Signalizacijske poti grelina

Dokazali so, da grelin, injiciran neposredno v možgane, vpliva na proces prehranjevanja in da nevroni, ki se nahajajo v predelih možganov povezanih z omenjenim procesom, izražajo grelinske receptorje in so zato občutljivi na aktivno obliko tega peptida (42, 43, 54). Prehajanje grelina, ki se v največji meri sintetizira in izloča na periferiji, preko krvno-možganske bariere iz krvnega obtoka v možgane, je zelo omejeno (Slika 3). Ugotovili pa so,

da periferni grelin verjetno aktivira GHSR-1a tako na periferiji, in sicer na aferentnih vlaknih vagusa, kot tudi centralno v možganih, s prehodom preko možganskih struktur, ki so močno ožljene in imajo zato bolj prehodno krvno-možgansko bariero (npr. *area postrema* in mediana eminencia) (3, 51, 53, 55, 56, 57, 58, 59). Mediana eminencia se nahaja pod tretjim ventrikлом v bazi hipotalamusa, poleg ARC. Prav zaradi bližine ARC je pri raziskovalcih vzbudila veliko zanimanja, saj je ARC najpomembnejše področje možganov, kjer grelin izzove oreksigene učinke (19). Schaeffer s sodelavci je s fluorescentno označenim grelinom dokazal, da lahko njegova aktivna, acilirana oblika prehaja krvno-možgansko bariero in preko mediane eminence doseže ARC, kjer se veže na nevrone NPY/AgRP/GABA in POMC/CART (56). Po drugi strani pa prekinitve afententnih vlaken vagusa močno zmanjša oreksigeni učinek periferne grelina, kar nakazuje, da lahko ta proži centralne učinke tudi preko gastričnih aferentnih vagusnih vlaken (58).



Slika 3: Shematski prikaz verjetnih dostopov periferne grelina do možganov. Grelin se v največji meri sintetizira in sprošča iz enteroendokrinih celic želodca. Encim grelinska O-aciltransferaza (GOAT) pretvori njegovo ne-acilirano obliko v aktivno, acilirano. Acilirana oblika grelina je sposobna aktivirati receptor

GHSR-1a. Po drugi strani pa esteraza odceplja O-oktanoilno skupino iz grelina in ga tako povrne v sicer prevladajočo neaktivno obliko. Ne-aciliran grelin lahko prehaja krvno-možgansko bariero, aciliran pa le v zelo omejenih količinah (na sliki označeno z modrim znakom X). Aciliran grelin bodisi stimulira receptorje na vagusnih aferentnih živcih, ali pa na področjih oslabljene krvno-možganske bariere okoli ventrikla, kjer nevroni neposredno komunicirajo s kapilarimi (cirkumventrikularni organi), prehaja v možgane in tako posreduje centralne oreksigene učinke. Legenda: AP, area postrema; ARC, arkavatno jedro; ME, mediana eminenca; NTS, nucleus tractus solitarius; SFO, subfornikalni organ; BBB, krvno-možganska bariera. Prirejeno po (46).

1.4.5.2 Centralno delovanje grelina

Vsa večja jedra hipotalamusa, kot na primer ARC, PVN, dorzomedialno jedro, ventromedialno jedro in LHA izražajo receptorje GHSR-1a. Lokalna infuzija grelina v ta področja (jedra) poveča potrebo po vnosu hrane in zmanjša porabo energije, kar vodi v povečanje telesne mase (60, 61, 62). Receptorji GHSR-1a so izraženi v dveh pomembnih tipih nevronov, ki uravnavajo homeostazo hranjenja, in sicer NPY/AgRP/GABA ter POMC/CART (46). Grelin poveča aktivnost nevronov NPY/AgRP/GABA tako, da se veže neposredno na GHSR-1a, poleg tega pa tudi z vezavo na ekscitatorna aferentna vlakna, ki so v stiku s to vrsto nevronov. Grelin inhibira nevrone POMC/CART posredno, in sicer tako, da se veže na tiste nevrone, ki zavirajo njihovo aktivnost. Po drugi strani pa grelin poveča tudi izražanje GABA iz nevronov NPY/AgRP/GABA. GABA še dodatno deluje inhibitorno na nevrone POMC/CART (54, 63). Aktivirani nevroni NPY/AgRP/GABA stimulirajo hranjenje preko sproščanja že predhodno opisanih oreksigenih peptidov NPY, AgRP in GABA, ki skupaj zavrejo vplive tistih živčnih poti, ki zavirajo hranjenje in povzročajo sitost (8, 9, 54, 64, 65).

1.5 C-fos

C-fos je proto-onkogen, ki se izraža v odzivu na neposredno stimulacijo z rastnimi dejavniki in živčnimi prenašalci (66). Protein c-fos, lahko identificiramo z imunohistokemijskimi tehnikami. Njegovo Izražanje lahko uporabimo za označevanje aktiviranih nevronov po njihovi stimulaciji (67). C-fos je normalno prisoten v možganih glodavcev, in sicer predvsem v cerebralnem korteksu in hipokampusu (66). Leta 2013 so Hassouna in sodelavci poročali o vplivih nativnega grelina, njegovega analoga z agonističnim delovanjem BIM-28131 in njegovega antagonistista BIM-28163, na aktivnost izražanja proteina c-fos v ARC miši. Ugotovili so, da so bili dobljeni rezultati v vseh primerjanih skupinah poskusnih živali, razen v tisti, ki so jo tretirali z antagonistom, statistično značilno različni, v primerjavi s kontrolno

skupino. Injekcija grelina je inducirala aktivacijo c-fos v ARC tudi ob sočasni aplikaciji antagonista. Najmočneje je povečala aktivacijo omenjenega proteina aplikacija agonista BIM-28131. Spremljali so tudi obseg aktivacije c-fos v nevronih, v katerih so NPY označili s fluorescentno zeleno beljakovino (miši NPY-GFP) ter ugotovili, da se njegovo povečanje v vseh testnih skupinah, v primerjavi s kontrolno. Najbolj se je aktivacija c-fos povečala v skupinah, v katerih so miši tretirali bodisi s samim grelinom, samim agonistom, ali s kombinacijo aktivnega grelina z antagonistom. V teh skupinah se je aktivacija c-fos v nevronih NPY povečala za kar 20 %, medtem, ko je samostojna aplikacija grelina in antagonista povečala aktivacijo za manj kot 15 %, vse v primerjavi s kontrolno skupino (68).

1.6 Ozadje naloge

Ena od potencialnih učinkovin z antagonističnim delovanjem na grelinski receptor je peptid P1, ki so ga s pomočjo tehnologije bakteriofagnega prikaza seleкционirali na Katedri za farmacevtsko biologijo, Fakultete za farmacijo v Ljubljani. Cilj te raziskave je bil namreč najti novo peptidno učinkovino, ki bi uravnavala prenos grelinskega signala na GHSR-1a. Agonistično in antagonistično aktivnost P1 so testirali z merjenjem sproščanja znotrajcelične koncentracije kalcija v človeških celičnih linijah, ki izražajo grelinske receptorje in ugotovili, da je izkazoval antagonistično aktivnost v nanomolarnih koncentracijah (69, 70). Ker se je peptid P1 izkazal kot zelo učinkovit antagonist v pogojih *in vitro*, so ga v sodelovanju z Veterinarsko fakulteto Univerze v Ljubljani preskusili še v pogojih *in vivo*. Na miših C57BL/6J so ugotavljali njegov vpliv na vnos hrane in izločanje rastnega hormona ter njegove učinke primerjali z delovanjem antagonistika D-Lys-3-GHRP-6 (71). Sočasna aplikacija grelina in peptida P1 je izzvala nepričakovano višjo koncentracijo rastnega hormona, v primerjavi z aplikacijo samega grelina. Rezultati sicer niso potrdili antagonističnega delovanja peptida P1 *in vivo* na vnos hrane, pokazali pa so njegov vpliv na izločanje rastnega hormona (71).

1.7 Imunohistokemija

Imunohistokemija združuje anatomsко-histološke, imunološke in biokemijske tehnike, s ciljem označevanja iskanih tkivnih komponent, na osnovi reakcije med tarčnimi antigeni in zanje specifičnimi protitelesi (poliklonskimi ali monoklonskimi). Tovrstne metode

omogočajo vizualizacijo porazdelitve in lokalizacijo specifičnih celičnih komponent v tkivih in celicah. Uporabljajo se v diagnostiki bolezni, razvoju zdravil in v bioloških raziskavah (72, 73, 74). Čeprav so imunohistokemijske metode manj občutljive od prenosa western in testov ELISA, pa je njihova velika prednost v tem, da omogočajo natančno lokalizacijo iskane molekule v tkivih in tudi znotraj celic (75). Za imunohistokemijsko analizo lahko uporabljamo biopsijske vzorce ali celoten organ, odvzet po smrti, odvisno od ciljev preiskave. Proces imunohistokemijske preiskave poteka po naslednjih stopnjah: odvze tkivnega materiala, fiksacija tkiva, rezanje vzorca, blokiranje nespecifičnih vezavnih mest, vezava antigensko specifičnih primarnih protiteles, vezava označenih sekundarnih protiteles, dodatek encima hrenove peroksidaze,obarvanje nastalih imunskeih kompleksov, priprava trajnega preparata ter njegova analiza (opazovanje in štetje označenih celic ali intracelularnih struktur pod mikroskopom). Pri tovrstnih metodah uporabljamo visoko specifična protiteesa, s čimer zagotovimo njihovo vezavo izključno na tarčno molekulo v tkivni rezini. Zelo pozorni moramo biti pri spiranju vzorcev po aplikacijah primarnih in sekundarnih protiteles, saj na ta način odstranjujemo nevezana protiteesa in tista, ki so se morda šibko vezala na nespecifična vezavna mesta (72). Kot rezultat dobimo sliko rezine tkiva, kjer je vidna lokacija izraženih proučevanih proteinov. Sliko lahko še dodatno obdelamo in ocenimo količino izraženega proteina.

2 NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge bomo proučevali vpliv peptidnega mimetika N-končnega dela grelina, peptida P1, z aminokislinskim zaporedjem FSFLPPE, na izražanje proteinov v možganih poskusnih miših linije C57BL/6J. Vpliv peptida P1 bomo primerjali z delovanjem grelina in znanega antagonista D-Lys3-GHRP-6 ter s kombinacijama grelina in peptida P1 ali grelina in D-Lys3-GHRP-6. Za namen naše raziskave bomo spremljali izražanje treh proteinov, in sicer zgodnjega proteina c-fos, ki se uporablja kot označevalec aktivnih živčnih celic ter AgRP in NPY, ki sta udeležena v uravnavanju apetita. Možgane različno tretiranih miši bomo imunohistokemijsko obdelali in v tkivnih preparatih pod mikroskopom določili število celic, ki izražajo omenjene proteine, rezultate statistično obdelali v statističnem programu NCSS ter kreirali grafe v računalniškem programu Excel.

Predpostavljam, da bo grelin, kot oreksigeni peptid, povečal izražanje proteina AgRP v področjih ARC in nevronih PVN, proteina NPY v nevronih PVN in proteina c-fos v področju ARC, glede na kontrolno skupino, ki je prejela le raztopino nosilca. Pričakujemo tudi, da bosta peptid P1, za katerega so v predhodnih študijah *in vitro* dokazali antagonistično delovanje na GHSR-1a ter znani antagonist D-Lys3-GHRP-6, ki dokazano zmanjša potrebo po vnosu hrane, zavrla izražanje proteina AgRP v področju ARC in nevronih PVN, proteina NPY v nevronih PVN, ter povečala izražanje c-fos v področju ARC, v primerjavi s kontrolno skupino (70, 71, 76). Po aplikaciji obeh kombinacij grelina, tako s peptidom P1, kot tudi z D-Lys3-GHRP-6, pričakujemo manjši obseg izražanja proteinov NPY in AgRP v nevronih PVN ter proteina AgRP v področju ARC, kot pa po aplikaciji samega grelina ter večji obseg njihovega izražanja kot po samostojno apliciranem antagonistu receptorja GHSR-1a.

3 MATERIALI IN METODE

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

3.1 Živali in fiksiranje možganov po aplikaciji preskušanih spojin in njihovih kombinacij

V poskusih smo uporabili možgane divjega tipa mišjih samcev, linije C57BL/6J. Živali so vzredili na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani, v Laboratoriju za genomiko. Za imunohistokemijsko analizo smo uporabili predhodno izolirane in obdelane mišje možgane (71). Možgansko tkivo so namreč v okviru predhodne raziskave obdelali tako, da so preprečili razpadanje celičnih proteinov in tkivne arhitekture. Živali so, v izogib intenzivnemu obarvanju ozadja zaradi prisotnosti krvi in morebitnih motenj pri ugotavljanju lokacije tarčnih antigenov zaradi hematoloških antigenov, s pomočjo peristaltične črpalke (Ecoline ISM1079, Ismatec SA, Švedska), s pretokom 5 mL/min, perfundirali s hladnim 0,05 M PBS (fosfatni pufer z NaCl), nato pa tkiva fiksirali s 4 m/v % paraformaldehidom v 0,05 M PBS, ki denaturira beljakovine in konzervira tkivo, pri čemer ostanejo celične strukture ohranjene (72). Fiksiranje je potrebno zaradi ohranjanje intaktnih celičnih komponent (vključno s topnimi in strukturnimi proteini), preprečevanja avtolize in premikov celičnih sestavin (vključno z antigeni in encimi), stabilizacije celičnega materiala in optimalnega barvanje celic (74). Fiksirane možgane so čez noč pustili v 4 m/v % raztopini paraformaldehida na 4 °C in jih naslednji dan prestavili v 0,01 M fosfatni pufer ter jih shranili na 4 °C do nadaljnje uporabe.

Skupno smo v poskusih uporabili 31 možganov. Glede na način predhodnega tretiranja poskusnih živali, so bili možgani razdeljeni v 6 skupin (n predstavlja število možganov iz posamezne skupine):

1. skupina: raztopina nosilca (10% DMSO v fiziološki raztopini); n=6
2. skupina: raztopina antagonista D-Lys3-GHRP-6 (0,2 µmol/miš); n=5
3. skupina: raztopina peptida P1 (2 µmol/miš); n=6
4. skupina: raztopina grelina (0,03 µmol/miš); n=5

5. skupina: kombinacija grelina ($0,03 \mu\text{mol}/\text{miš}$) z D-Lys3-GHRP-6 ($0,2 \mu\text{mol}/\text{miš}$);

n=4

6. skupina: kombinacija grelina ($0,03 \mu\text{mol}/\text{miš}$) s peptidom P1 ($2 \mu\text{mol}/\text{miš}$); n=5.

Pri proučevanju izražanja proteinov v statistično analizo nismo vključili vseh obdelanih možganov. Izključili smo namreč vse tiste, na katerih imunohistokemija ni popolnoma uspela. Izključitveni kriterij so bile raztrgane rezine v področju ARC. Število mišjih možganov, ki smo jih vključili v statistično analizo, proučevani predeli možganov in vrsta primarnih oz. detekcijskih protiteles, ki smo jih uporabili, so prikazani v Preglednici I.

Preglednica I: Število vzorcev možganov miši v posameznih, različno tretiranih eksperimentalnih skupinah, ki smo jih statistično primerjali med seboj. V vrsticah so prikazana protitelesa, ki smo jih uporabili za detekcijo proučevanih peptidov ter hipotalamusna jedra, v katerih smo preverjali njihovo vezavo. V stolpcih je prikazan način tretiranja posameznih skupin živali ter število uporabljenih možganov.

Protitelo/jedro hipotalamusa	Grelin	Peptid P1	Grelin + peptid P1	Grelin + D-Lys3-GHRP-6	D-Lys3-GHRP-6	Kontrola (nosilec)
NPY (DiaSorin, kat. št. 22940) v PVN	5	5	4	4	5	4
AgRP (Phoenix Pharmaceuticals, kat. št. H-003-53) v PVN	3	5	4	4	4	3
AgRP (Phoenix Pharmaceuticals, kat. št. H-003-53) v ARC	4	5	4	4	4	3
C-fos (Calbiochem, kat. št. PC38) v ARC	5	6	5	4	5	5

3.2 Imunohistokemija na plavajočih rezinah mišjih možganov

3.2.1 Rezanje tkiva in blokiranje nespecifičnih vezavnih mest

Možgane, predpripravljene po zgoraj opisanem postopku, smo potopili v 5 m/v % agarozo (Sigma-Aldrich, ZDA) in jih narezali na $50 \mu\text{m}$ debele rezine v hladnem 0,05 M PBS, s pomočjo vibrirajočega rezalnika (Vibratome Leica, VT1000 S, Leica Biosystems, Nussloch, Nemčija). Nato smo rezine najprej 30 minut inkubirali v 0,1 M raztopini glicina (Sigma-Aldrich, ZDA), potem pa jih 15 minut spirali v 0,05 M PBS, pri temperaturi 4°C in jih v naslednjem koraku inkubirali v 0,5 m/v % raztopini natrijevega borohidrida (Sigma-Aldrich, ZDA) v 0,05 M PBS. Sledilo je 20 minutno spiranje v 0,05 M PBS pri temperaturi 4°C . Čeprav so primarna protitelesa visoko specifična za točno določene epitope, se lahko deloma

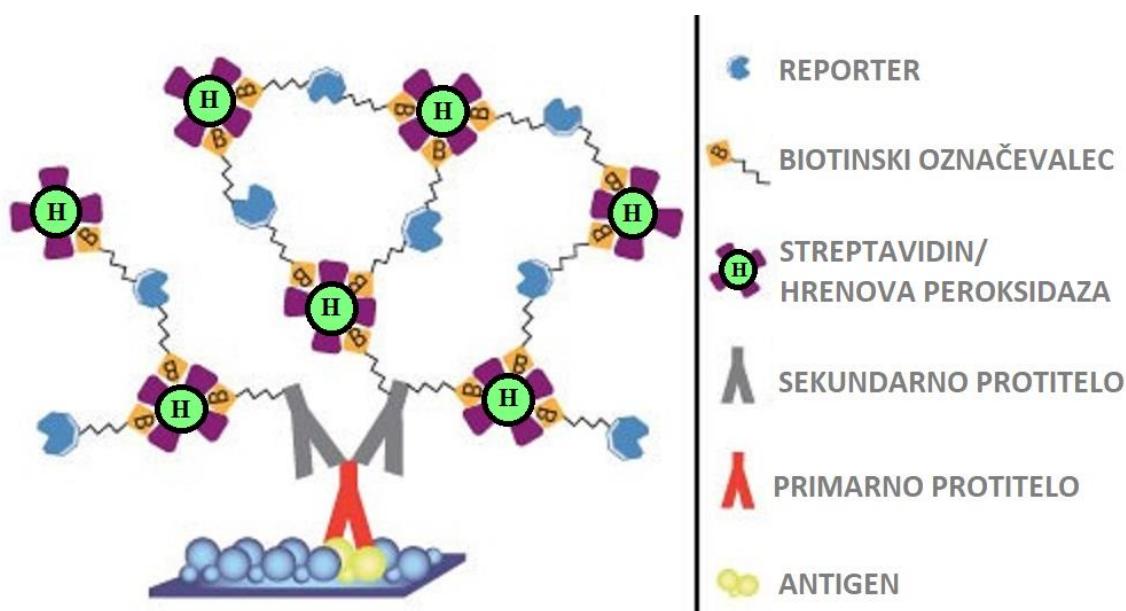
nespecifično vežejo tudi na dele proteinov, ki so podobni epitopom tarčnega antiga. Nespecifična vezava povzroči močno obarvanje ozadja in s tem zakrije detekcijo iskanega antiga. Za zmanjšanje obarvanosti ozadja, smo možganske rezine inkubirali 30 minut v 5 v/v % normalnem kozjem serumu (Chemicon, Temecula, CA, ZDA) z dodatkom 0,5 v/v % raztopine Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in 1 v/v % H₂O₂, pri temperaturi 4 °C, ter tako blokirali nespecifična reaktivna mesta, na katera se lahko vežejo primarna in sekundarna protitelesa.

3.2.2 Vezava primarnih, sekundarnih protiteles ter encima hrenove peroksidaze

Posredna (indirektna) imunohistokemijska metoda vključuje uporabo neoznačenih primarnih protiteles, ki se vežejo na antigen in nato ustrezno označenih sekundarnih protiteles, ki reagirajo s primarnimi. Sekundarno protitelo je usmerjeno proti protitelesom živalske vrste, v kateri je bilo pridobljeno primarno protitelo. V našem primeru je bilo sekundarno protitelo proti kuncu in narejeno v oslu.

Rezine smo med mešanjem 3 dni pri temperaturi 4 °C v kunčjih primarnih protitelesih proti c-fos (Calbiochem, kataloška številka PC38, razredčitev 1:20000), proti NPY (DiaSorin, kataloška številka 22940, razredčitev 1:10000) in proti AgRP (Phoenix Pharmaceuticals, kataloška številka H-003-53, razredčitev 1:8000) v 0,05 M PBS z dodatkom 1 m/v % govejega serumskega albumina (Sigma) in 0,5 v/v % Triton X-100. Primarna protitelesa se vežejo na antigen in so pri indirektni metodi imunohistokemije neoznačena. Rezine smo nato spirali v 0,05 M PBS z dodatkom 1 v/v % normalnega kozjega serumu in 0,02 % Triton X-100 štirikrat po 15 minut pri sobni temperaturi. Sekundarna protitelesa označena z biotinom (DAR; Donkey Anti- Rabbit, Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 011-060-003, RRID_AB_2337125) smo redčili v razmerju 1:500 s 0,05 M PBS z dodatkom 1 v/v % normalnega kozjega serumu in 0,5 % Triton X-100. Rezine smo inkubirali s sekundarnimi protitelesi med mešanjem 2 uri pri sobni temperaturi. Sledilo je štirikrat po 15 minutno spiranje rezin v 0,05 M PBS z dodatkom 0,02 v/v % Triton X-100. Nato smo dodali raztopino encima hrenove peroksidaze, konjugirane s streptavidinom (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA), redčene 1:2500 v 0,05 M PBS z dodatkom 0,5 v/v % Triton X-100. Rezine smo z encimom inkubirali eno uro pri sobni temperaturi in jih nato spirali v 0,05 M

TBS pufru (Tris-HCl/0,9 % NaCl; pH 7,5; Sigma) eno uro pri sobni temperaturi. Encim hrenova peroksidaza se je vezal na sekundarno protitelo preko povezave biotina na sekundarnem protitelesu in streptavidina. Ker ima molekula streptavidina 4 vezavna mesta za biotin, lahko naredimo na tak način velik kompleks številnih molekul biotina ter streptavidina, povezanega s hrenovo peroksidazo in na ta način močno ojačamo signal prvotno vezanega enega samega protitelesa (Slika 4).



Slika 4: Shematski prikaz nastajanja kompleksov streptavidin-biotin. Primarno protitelo se veže na tkivni antigen. Sekundarno protitelo, usmerjeno proti primarnemu, ima vezano nase biotin. Po dodatu streptavidina, na katerega je vezan encim hrenova peroksidaze pride do nastanka ojačanega signala, saj ima molekula streptavidina 4 vezavna mesta za biotin. Na tak način nastane velik kompleks molekul streptavidina in biotina.

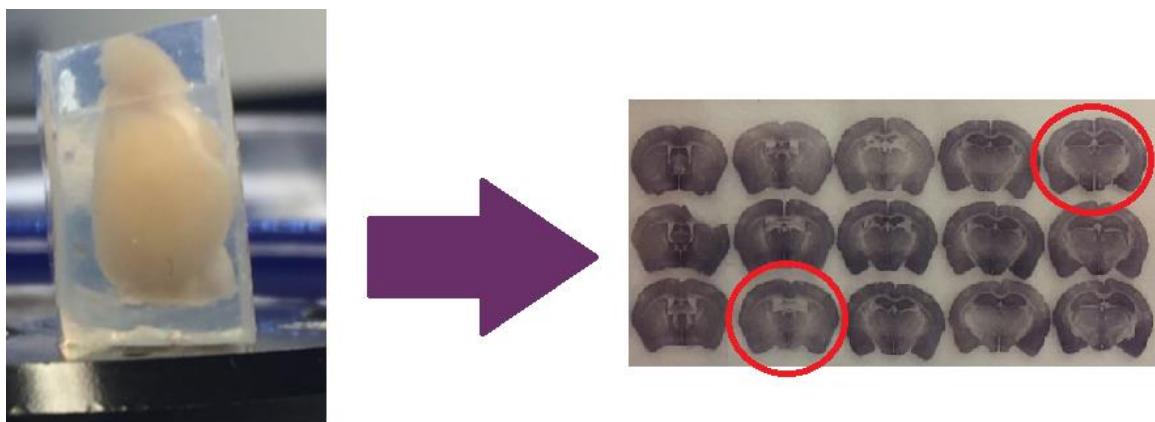
Prirejeno po 77.

3.2.3 Obarvanje kompleksa protiteles in tarčnih proteinov

V zadnji stopnji smo komplekse antigen-protitelo zaznali kot temen reakcijski produkt po 5 minutni inkubaciji rezin v 0,025 m/v % DAB (3,3'-diaminobenzidin) v prisotnosti nikelj (II) sulfata (Sigma) v TBS z dodatkom 0,02 v/v % H₂O₂ na sobni temperaturi. Detekcija kromogena namreč temelji na aktivnosti encima hrenove peroksidaze, ki tvori obarvane, netopne precipitate ob dodatu substrata, kot npr. DAB. Ko na tkivo z vezanimi protitelesi dodamo DAB, ta v prisotnosti peroksidaze in vodikovega peroksida oksidira. Rezultat je obarvan alkoholni, netopni precipitat na območju encimske aktivnosti. Običajno je precipitat

rjave barve, ker pa smo v raztopino DAB-a dodali nikelj, to povzroči nastanek temnosivega, skoraj črnega precipitata.

Rezine smo spirali trikrat po 5 minut v TBS in jih zložili na predmetnice, počakali 4 ure, da se popolnoma posušijo, ter jih sprali z destilirano vodo, da smo odstranili morebitne delce, ki bi motili analizo pod mikroskopom. Ponovno smo jih sušili 20 minut, nato pa jih prelili s sintetičnim krovnim sredstvom, ki temelji na ksilolu (Pertex, Burgdorf, Nemčija) in prekrili s krovnim stekлом. S tem smo preprečili encimatske spremembe in vzorec shranili za dolgorajno uporabo. Slika 5 prikazuje začetno stopnjo pri imunohistokemiji (možgane potopljene v agarozo) in končni produkt (rezine na predmetnici v obliki trajnega preparata).

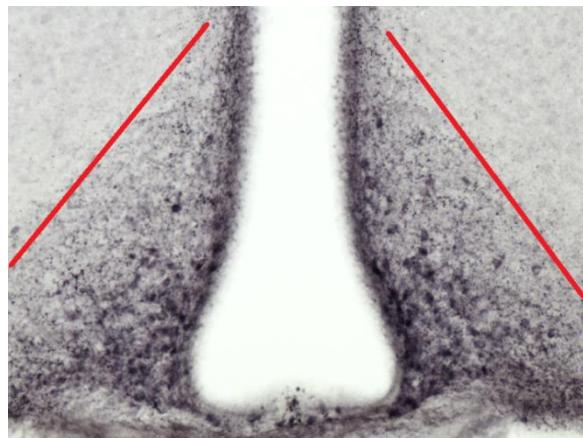


Slika 5: Shematski prikaz začetka imunohistokemije z možgani potopljenimi v agarozo in končne obarvane rezine v obliki trajnega preparata. Na sliki sta obkroženi rezini, kjer smo proučevali izraženost proteinov. Na levih obkroženih rezinah smo opazovali PVN, na desni ARC. PVN, paraventrikularno jedro; ARC, arkvatno jedro.

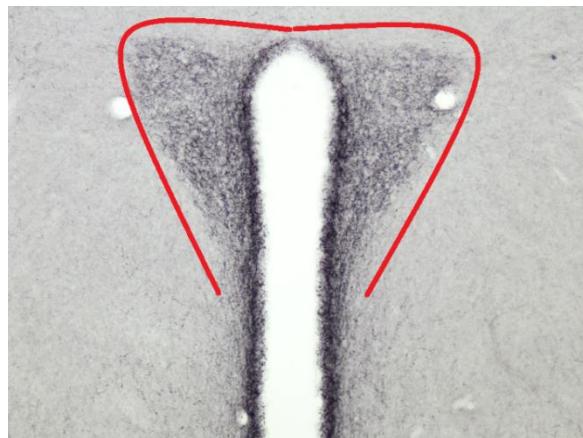
3.3 Fotografiranje proučevanih možganskih jeder

Po končanem postopku imunohistokemije, smo posamezna jedra možganov fotografirali pod mikroskopom. Področje, ki je od bregme, katera predstavlja kraj povezovanja sagitalnih in koronarnih šivov, oddaljeno med -1,58 in -1,94 mm (ARC) ter med -0,82 in 0,94 mm (PVN) smo fotografirali pod 100-kratno povečavo, z uporabo Nikon Eclipse 80i fotomikroskopa. Anatomske korelacije smo naredili glede na slike iz anatomskega atlasa The mouse brain in stereotaxis coordinates (druga izdaja) (78). Sliki 6 in 7 prikazujeta ARC in PVN v možganih, ki smo jih obdelali s protitelesi proti AgRP, slika 8 prikazuje PVN v možganih, ki smo jih obdelali s protitelesi proti NPY. V obeh primerih vidimo obarvana vlakna nevronov. Slika 9

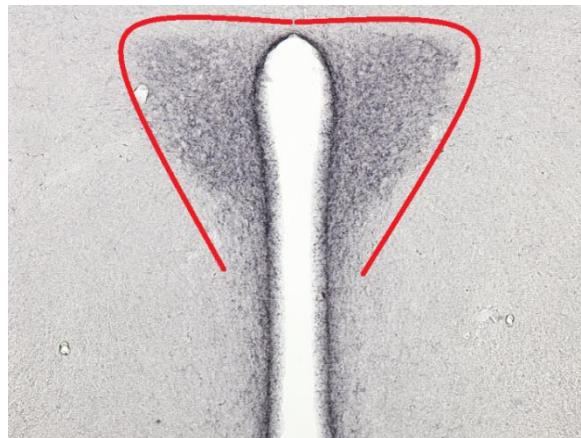
prikazuje levo polovico ARC v možganih, obdelanih s protitelesi proti c-fos. Vidimo obarvane nevrone v obliki temnih pik.



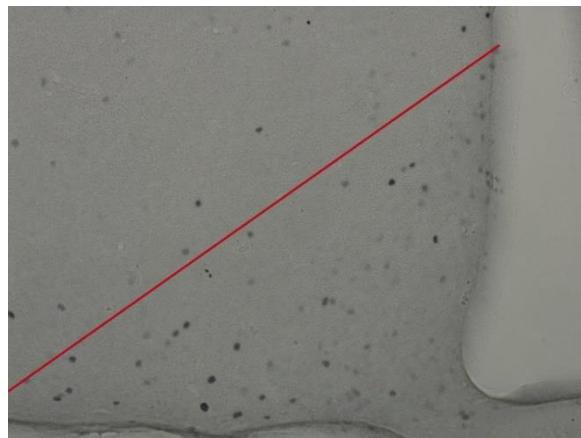
Slika 6: Slika prikazuje ARC na rezini možganov, ki smo jih obdelali s protitelesi proti AgRP. Vidna so vlakna AgRP nevronov. ARC je področje pod rdečo črto.



Slika 7: Slika prikazuje PVN na rezini možganov, ki smo jih obdelali s protitelesi proti AgRP. Vidna so vlakna AgRP nevronov. PVN je področje pod rdečo krivuljo.



Slika 8: Slika prikazuje PVN na rezini možganov, ki smo jih obdelali s protitelesi proti NPY. Vidna so vlakna NPY nevronov. PVN je področje pod rdečo krivuljo.



Slika 9: Slika prikazuje levo polovico ARC na rezini možganov, ki smo jih obdelali s protitelesi proti c-fos. Vidni so obarvani nevroni v obliki temnih pik. ARC je področje pod rdečo črto.

3.4 Obdelava slik in analiza podatkov

Slike smo obdelali v programu GIMP 2 (Spencer Kimball in Peter Mattis, Univerza v Kaliforniji). Slike smo pretvorili v sivinski način, program pa je samodejno nastavil prag in raven obarvanosti. Nato smo prešteli obarvane celice, ki izražajo protein c-fos s programom ImageJ (Nacionalni inštitut za zdravje, ZDA) in pomerili površino obarvanih vlaken v programu Surfkvad (Dr. Marko Kreft, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani) v primeru NPY in AgRP. Rezultate smo analizirali s statističnim programom NCSS (NCSS statistical software, Kaysville, UT), kjer smo z uporabo ANOVA z dvostranskim tveganjem ($p<0,01$) preverili razlike med skupinami. Grafikone smo oblikovali v programu Excel.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Na Fakulteti za farmacijo so z namenom odkritja nove peptidne učinkovine, ki bi uravnavala prenos grelinskega signala na grelinski receptor, z rešetanjem peptidnih bakteriofagnih knjižnic izbrali večje število peptidov, ki so imeli različno močne antagonistične učinke na GHSR-1a receptor. Kasneje so v okviru raziskovalne naloge Eve Knuplež na Veterinarski fakulteti v poskusu *in vitro* izbrali peptid z najmočnejšim antagonističnim učinkom, peptid P1 (70) in ga v okviru magistrske naloge Sare Peinkiher preizkusili *in vivo* (71).

V okviru magistrske naloge smo dokončali del poskusov *in vivo* proučevanja antagonističnih učinkov peptida P1. Z metodo imunohistokemije smo primerjali možgane šestih skupin miši, katerim smo intraperitonealno aplicirali: raztopino nosilca, raztopino antagonist-a D-Lys3-GHRP-6, raztopino peptida P1, raztopino grelina, kombinacijo grelina z D-Lys3-GHRP-6 in kombinacijo grelina s peptidom P1. V možganih smo analizirali dve jedri hipotalamusa PVN in ARC, v katerih smo gledali izražanje dveh nevropeptidov, ki uravnavata vnos hrane NPY in AgRP ter izražanje proteina c-fos, ki je pokazatelj aktivnih živčnih celic.

4.1 Izražanje AgRP v PVN in ARC

Ko smo primerjali skupno površino živčnih vlaken pozitivnih za protein AgRP, smo ugotovili, da se vseh 6 skupin miši med seboj ne razlikuje (Slika 12, Slika 13). Vse miši so imele podobno število vlaken z izraženim AgRP v obeh jedrih ARC in PVN. Slike 10 in 11 prikazujeta končni obdelani fotografiji, ki smo ju uporabili za merjenje površine obarvanih nevronov.

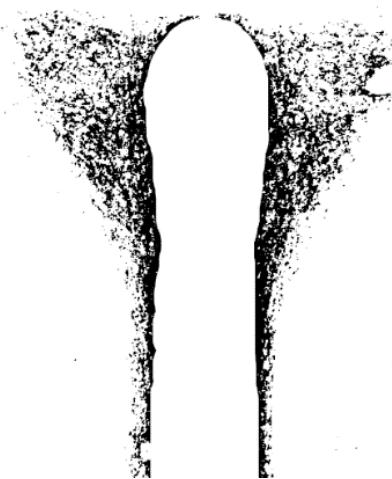


Slika 10: Slika prikazuje končno obdelano fotografijo poteka živčnih vlaken v ARC v možganih obdelanih z AgRP, ki smo jo uporabili za merjenje površine obarvanih nevronov.

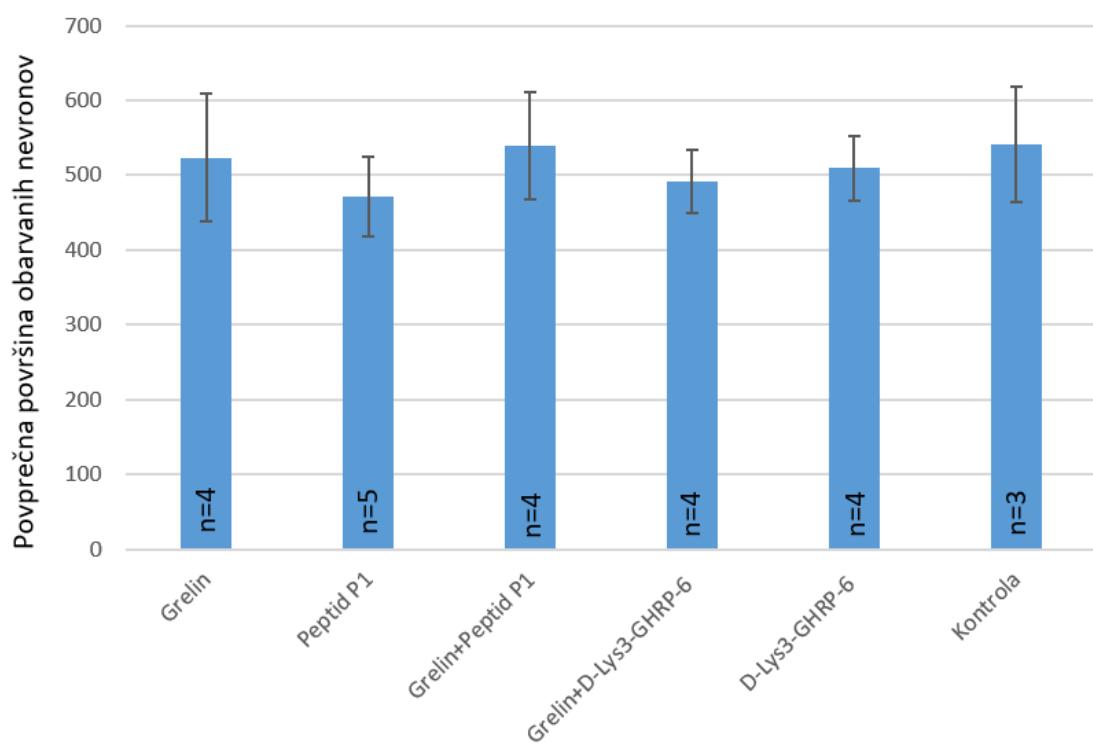
Komučar T. Proučevanje vpliva peptidnega mimetika N-končnega dela grelina na izražanje oreksigenih

živčnih prenašalcev in na aktivacijo nevronov v hipotalamusu mišjih možganov.

Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2018.



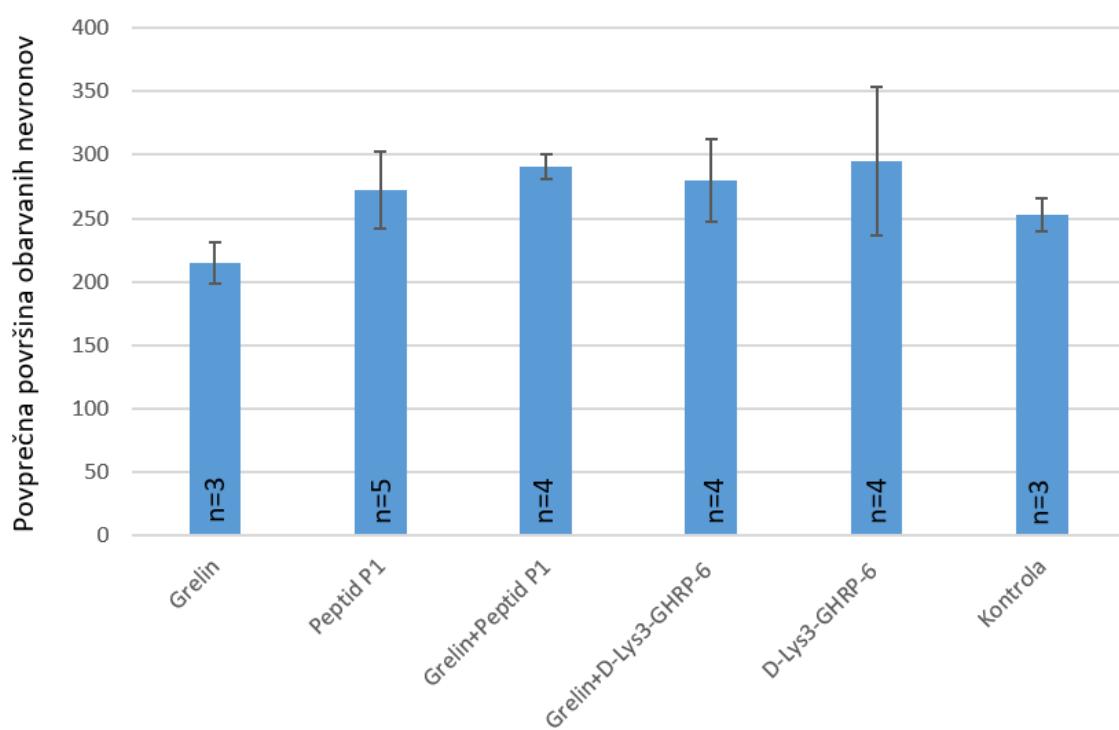
Slika 11: Slika prikazuje končno obdelano fotografijo poteka živčnih vlaken v PVN v možganih obdelanih z AgRP, ki smo jo uporabili za merjenje površine obarvanih nevronov.



Slika 12: Izražanje AgRP v ARC. Na sliki je prikazana povprečna površina obarvanih nevronov in standardna napaka v ARC po vezavi protiteles proti AgRP pri skupinah miši, ki so bile različno tretirane.

Komučar T. Proučevanje vpliva peptidnega mimetika N-končnega dela grelina na izražanje oreksigenih živčnih prenašalcev in na aktivacijo nevronov v hipotalamusu mišjih možganov.

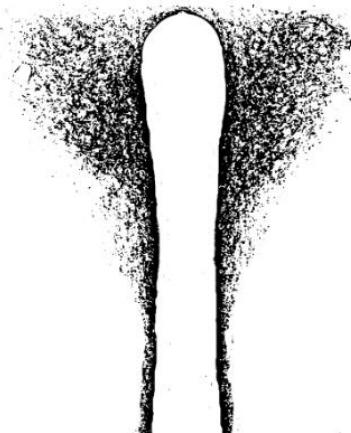
Mag. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani. Fakulteta za farmacijo, 2018.



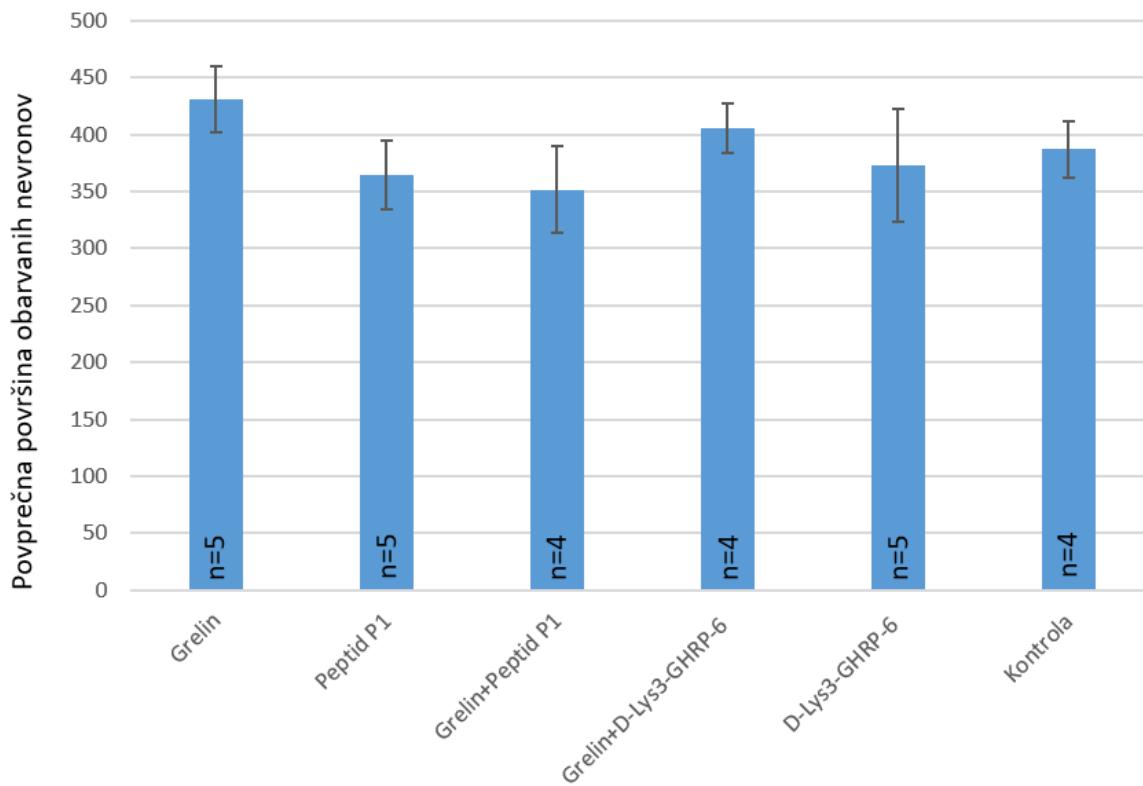
Slika 13: Izražanje AgRP v PNV. Na sliki je prikazana povprečna površina obarvanih nevronov in standardna napaka v PNV po vezavi protiteles proti AGRP pri skupinah miši, ki so bile različno tretirane.

4.2 Izražanje NPY v PVN

Ko smo primerjali skupno površino živčnih vlaken pozitivnih za protein NPY smo ugotovili, da se vseh 6 skupin miši med seboj ne razlikujejo (Slika 15). Vse miši so imele podobno število vlaken z izraženim NPY v PVN. Slika 14 prikazuje končno obdelano fotografijo, ki smo jo uporabili za merjenje površine obarvanih nevronov.



Slika 14: Slika prikazuje končno obdelano fotografijo poteka živčnih vlaken v PVN v možganih obdelanih z NPY, ki smo jo uporabili za merjenje površine obarvanih nevronov.



Slika 15: Izražanje NPY v PVN. Na sliki je prikazana povprečna površina obarvanih nevronov in standardna napaka v PVN po vezavi protiteles proti NPY pri skupinah miši, ki so bile različno tretirane.

Grelin je eden redkih poznanih perifernih hormonov z oreksigenimi učinki preko centralnega mehanizma. Ima veliko različnih bioloških vlog, med katerimi sta najbolj znani stimulacija izločanja rastnega hormona iz hipofize in stimulacija apetita. Zato sta grelin in njegov receptor tarča številnih raziskav, za razvoj terapevtikov. Prve sekretagoge rastnega hormona so proučevali še pred odkritjem grelina, kot endogenega liganda GHSR-1a receptorja. Kljub zgodnjem odkritju grelina, na trgu še vedno ni registrirane učinkovine, ki bi učinkovito vplivala na zmanjšanje vnosa hrane ali preprečevala razvoj kaheksije z delovanjem na grelinski sistem. Pleiotropni učinki grelina, ki so posledica periferne in centralne razporeditve receptorja GHSR-1a in heterogene narave signaliziranja preko GHSR-1a, spodbujajo k razvoju zdravilne učinkovine, ki bi selektivno delovala na grelinski receptor (43, 79). Agonisti receptorja spodbujajo apetit in izločanje rastnega hormona, zato bi lahko bili uporabni pri zdravljenju kaheksije, mišične izčrpanosti in bolezni, ki so povezane s starostno-degenerativnimi procesi. Na drugi strani imajo antagonisti in inverzni agonisti receptorja anoreksigene učinke in bi jih lahko uporabili za preprečevanje debelosti.

Peptid P1 je mimetik N-končnega dela grelina, ki vsebuje dobro ohranjeni zaporedje aminokislin, ki sestavlja strukturo humanega grelina. Vsebuje tudi ohranjen serin na mestu 3, na katerega pa ni pripeta oktanoilna skupina. N-končni del strukture in oktanoilna skupina pripeta na tretji serin sta sicer ključna za vezavo na receptor in sprožitev učinka. Takšne male molekule z ohranjenimi deli strukturnega zaporedja človeškega grelina predstavljajo možnost za razvoj peptidnih mimetikov za farmakološko delovanje na grelinski receptor (80).

Pri proučevanju izražanja NPY nevronov smo se za razliko od večine ostalih raziskovalcev, ki so izražanje proučevali v ARC, osredotočili na PVN, pri proučevanju izražanja AgRP pa smo se osredotočili na obe jedri, ARC in PVN. Dosedanji izsledki dokazujejo povezavo med grelinom in oreksigenim sistemom hipotalamusa. GHSR-1a mRNA je izražena v NPY/AgRP nevronih v ARC hipotalamusa podganjih možganov (81). Vnos grelina neposredno v možgane poveča vsebnost mRNA NPY in AgRP v ARC (82, 83). Kamagai in sodelavci so v predhodnih študijah namreč dokazali 22,5 % povišanje ravni AgRP in 10,1 % povišanje ravni NPY mRNA v ARC v skupini podgan, ki so jim centralno aplikirali grelin v primerjavi s kontrolno skupino (82). Glede na dosedanje izsledke študij izražanja NPY nevronom smo pričakovali, da bo samostojno injiciran grelin povečal ravni izražanja NPY nevronov, peptid P1, ki je v poskusih *in vitro* pokazal antagonistično delovanje na GHSR-1a, pa bo aktivnost zavrl. Prav tako smo pričakovali, da bo aktivnost izražanja zavrta pri antagonistu D-Lys3-GHRP-6. Khazali s sodelavci je dokazal, da injekcija grelinskega antagonista D-Lys3-GHRP-6 v možgane pri stradanih podganah statistično zmanjša vnos hrane (76), iz česar smo sklepali, da bo prišlo do sprememb izražanja oreksigenih proteinov tudi v možganih. Do sedaj še ni bilo opravljene študije, ki bi proučevala vpliv grelinskega antagonista D-Lys3-GHRP-6 na aktivacijo nevronov in izražanje proteinov v možganih. Hassouna s sodelavci, ki je proučeval vpliv grelina, grelinskega agonista (BIM-28131) in grelinskega antagonista (BIM-28163) na aktivacijo NPY nevronov preko izražanja c-fos iz teh nevronov, je ugotovil, da v ARC antagonist izzove aktivacijo c-fos v manjšem deležu NPY nevronov kot agonist (68).

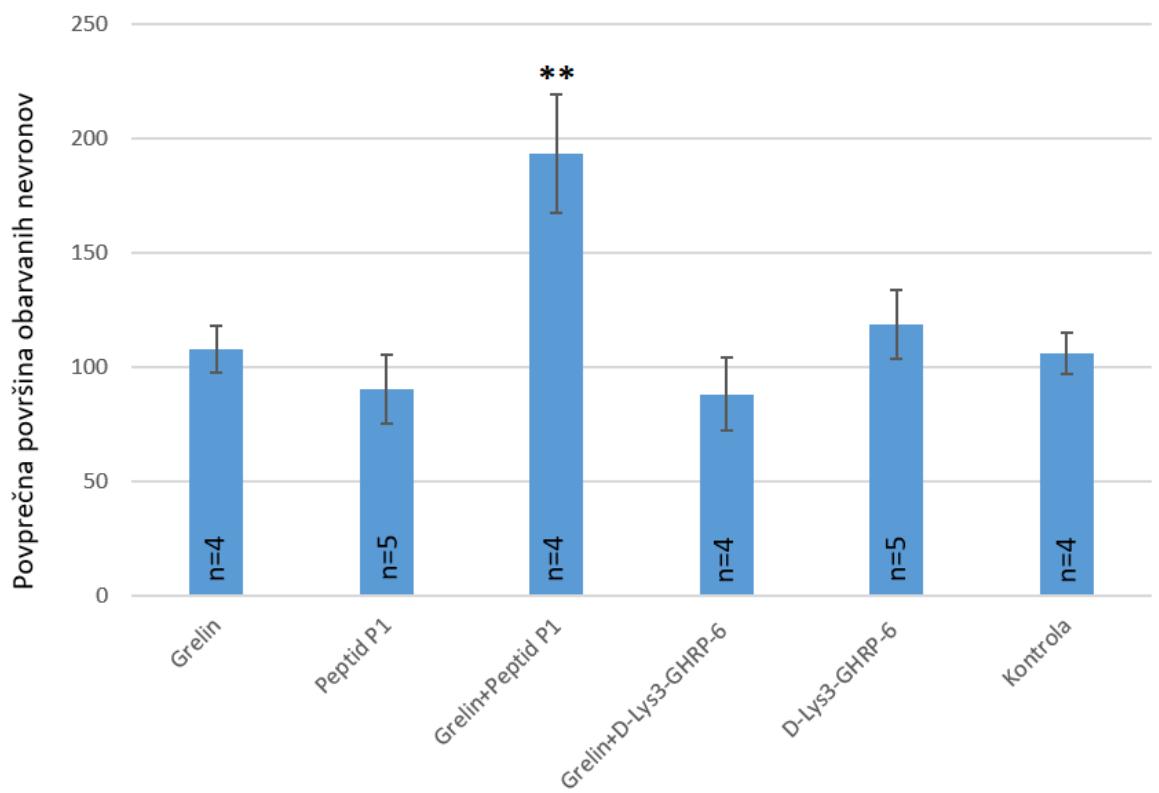
Statistična analiza PVN in ARC hipotalamusa v možganih, katere smo obdelali s primarnimi protitelesi proti NPY in AgRP, ni pokazala statističnih razlik med posameznimi skupinami miši. Razlogov za takšne rezultate je lahko več. Vsekakor je bilo v raziskavo vključeno

premajhno število vzorcev. Mogoče bi se razlike pokazale s povečanjem števila osebkov na skupino, saj bi s tem zmanjšali standardno napako. Za razliko od raziskovanja vpliva grelina na regulacijo hranjenja v centralnem živčevju Nakazata s sodelavci, je bila v našem primeru aplikacija intraperitonealna, torej periferna in ne centralna (83). Zaradi oviranega prehoda krvno-možganske bariere bi lahko grelin po periferni aplikaciji aktiviral AgRP in NPY nevrone v manjši meri, kot se to zgodi po centralni aplikaciji. Povsem verjetno bi bilo tudi, da je sprememba NPY in AgRP na nivoju proteina premajhna, da bi jo lahko zaznali z uporabljeno metodo imunohistokemije, zgoraj omenjene raziskave so namreč ugotavljale in dokazale spremembo izražanja mRNA in ne proteinov (81, 82, 83, 84, 85). Uporabiti bi bilo potrebno bolj občutljivo metodo kot na primer prenos western ali ELISA, ki pa nam ne omogočata lokalizacije proteinov. Sprememba na nivoju proteinov NPY ali AgRP je lahko časovno pogojena in povisana samo v določenem časovnem obdobju, katerega nismo uspeli uloviti. Campos je skupaj s kolegi proučeval časovne okvirje izražanja NPY po obroku v brazilski vrsti rib. Meril je ravni mRNA NPY dve uri pred obrokom, dve uri po obroku in v času 0. Najvišje ravni mRNA je opazil v času 0, najnižje pa 2 uri po obroku (84). Hong-Zai je s sodelavci proučeval časovno odvisnost izražanja NPY/AgRP mRNA po injekciji grelina v dorzalni vagalni kompleks. Najvišje ravni NPY/AgRP mRNA so zaznali 2 uri po injekciji (85). V nasprotju s predhodnimi študijami, grelin ni signifikantno povečal izražanja NPY in AgRP, kar bi lahko delno pojasnili tudi z različnimi pogoji hranjenja živali. V raziskavi, kjer je Kamegai s sodelavci proučeval vpliv kronične centralne infuzije grelina na raven AgRP in NPY mRNA v ARC, so imele živali prost dostop do hrane (61). Tudi v raziskavi Hong-Zaia so imele živali neomejen dostop do hrane in zaznane ravni NPY in AgRP mRNA so bile v testni skupini, ki je prejela injekcijo grelina signifikantno višje kot v kontrolni skupini (85). V naši raziskavi so imele miši po 18 urnem stradanju eno uro prost dostop do hrane in so se pred intraperitonealno aplikacijo snovi do sitega najedle. Pred obrokom so tako imele povišan endogeni grelin v krvi, eno uro po hranjenju pa se jim je nivo istega grelina že znižal in site živali smo anestezirali ter jim ponovno intraperitonealno dodali grelin in ostale snovi. Ker so bile žrtvovane dve uri po začetku hranjenja je lahko nivo NPY, ki bi bil lahko zvišan od endogenega grelina, že upadel ali pa snovi, ki so bile intraperitonealno dodane v eni uri še niso dosegle največjega učinka na izražanje NPY in AgRP. Ker so bile živali v trenutku

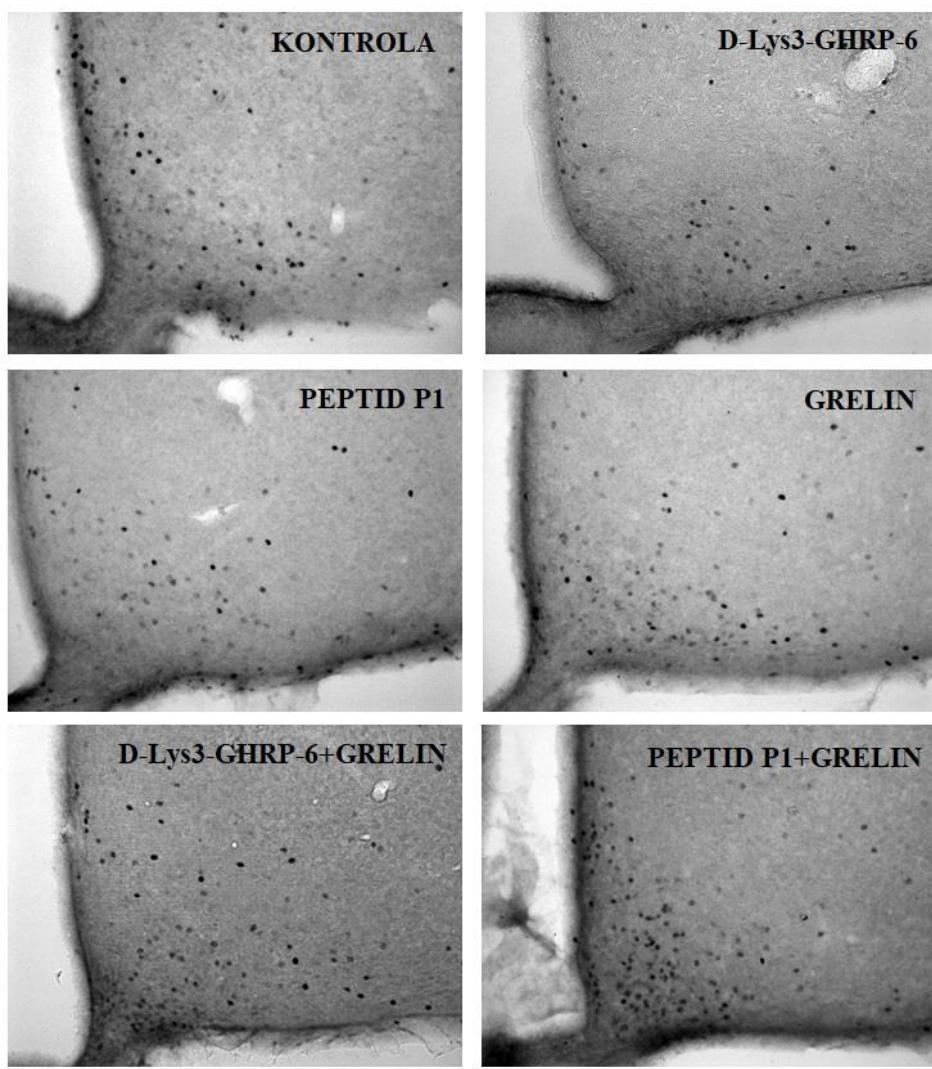
intraperitonealne aplikacije anestezirane, bi lahko pri vseh živalih anestetik zavrl NPY in AgRP nevrone v taki meri, da ne bi bilo več vidnih razlik med skupinami.

4.3 Izražanje c-fos

Statistična analiza c-fos imunoreaktivnih celic v ARC, je pokazala statistično značilno razliko med skupino, tretirano s kombinacijo grelina s peptidom P1 in ostalimi skupinami, kar nakazuje, da peptid P1 potencira učinke grelina (86). Število c-fos pozitivnih celic v ARC se ni razlikovalo med kontrolno skupino in vsemi ostalimi skupinami, z izjemo zgoraj omenjene skupine, ki je prejela kombinacijo grelina s peptidom P1.



Slika 16: Izražanje c-fos v ARC. Na sliki je prikazana povprečno število obarvanih nevronov in standardna napaka v ARC po vezavi protiteles proti c-fos pri skupinah miši, ki so bile različno tretirane. Skupina, ki je prejela kombinacijo grelina in peptida P1 (na sliki označeno z ***) se statistično razlikuje od ostalih skupin ($p<0,01$).



Slika 17: Slika prikazuje ARC različno tretiranih skupin mišjih možganov, ki smo jih obdelali s protitelesi proti c-fos. Črne točke prikazujejo obarvane aktivirane nevrone. Iz slike je razvidno, da je v skupini grelin+peptid P1 obarvanih več nevronov kot v ostalih skupinah.

Stevanovic s sodelavci z metodo imunohistokemije primerjal vpliv intracerebrovaskularno apliciranega aciliranega, ne-aciliranega in kombinacije obeh oblik grelina na aktivacijo c-fos v ARC in ugotovil, da je aciliran v primerjavi z ne-aciliranim grelinom značilno povečal c-fos imunoreaktivnost (87). Tudi Kobelt s sodelavci je z imunohistokemijo dokazal, da grelin, ki so ga podganam aplicirali intraperitonealno, v ARC signifikantno poveča izražanje c-fos v primerjavi s kontrolno skupino (88). V nobeni od raziskav živali niso bile stradane. V magistrski nalogi pa nismo mogli dokazati, da samostojno intraperitonealno injiciran grelin statistično vpliva na c-fos izražanje. Živalim so v predhodni raziskavi kri in organe odvzeli,

ko so bile miši pod splošno anestezijo (71). Splošna anestezija bi lahko imela vpliv na aktivacijo nevronov in posledično na izražanje proteina c-fos v možganih, saj v raziskavi Keilhoffa s sodelavci ugotavlajo, da anestezija s ketaminom, ki je bil uporabljen tudi v naši raziskavi, poveča izražanje c-fos (89). Kljub vsemu predvidevamo, da na končne rezultate anestezija ne bi smela vplivati, saj so bile anestezirane vse živali in je verjetno pri vseh skupinah prišlo do enakega učinka. Na izražanje pa bi lahko vplivali različni pogoji hrانjenja testnih živali. V predhodnih študijah, so vplive grelina na aktivacijo nevronov proučevali na živalih, ki niso bile stradane (68, 90). Po drugi strani so bile živali v naši študiji stradane 18 ur pred začetkom eksperimenta, nato pa so imele 1 uro prost dostop do hrane, kar bi lahko aktiviralo c-fos v ARC hipotalamusa. To pojasni tudi podobne ravni c-fos aktivacije med posameznimi ostalimi skupinami, z izjemo zgoraj omenjene skupine, ki je prejela kombinacijo grelina s peptidom P1, ki je po vsej verjetnosti aktivirala neko drugo populacijo celic (npr. celice, ki so specifično vpletene v sproščanje rastnega hormona) v ARC (86). V poskusu *in vitro* na celicah je peptid P1 deloval kot antagonist, v poskusu *in vivo* antagonističnega učinka na vnos hrane niso zaznali, saj intraperitonealna aplikacija peptida P1 ni zavrla hrانjenja pri stradanih živalih. Izmerili pa so agonistični učinek na izločanje rastnega hormona, ki bi lahko bilo povezano tudi s povečanim izražanjem c-fos v ARC, vendar pa sta oba učinka vidna le pri živalih, kjer je bil peptid P1 dodan v kombinaciji z grelinom (86). Ta podatek nakazuje, da bi lahko peptid P1 deloval kot alosterični modulator.

5 SKLEP

Na Fakulteti za Farmacijo so identificirali nov peptidni ligand za grelinski receptor, peptid P1. Ta je v pogojih *in vitro* na celicah deloval antagonistično, zato smo pričakovali antagonistični učinek na izražanje AgRP in c-fos v ARC ter NPY in AgRP v PVN.

Po izvedbi imunohistokemije, smo ugotovili, da je peptid P1 hkratno apliciran z agonistom grelinom signifikantno povečal izražanje c-fos proteina v ARC, kar nakazuje, da bi peptid P1 lahko deloval kot alosterični modulator GHSR-1a. Med ostalimi skupinami nismo zaznali nobenih značilnih razlik v izražanju c-fos. V možganih, ki smo jih obdelali s protitelesi proti NPY in AgRP, nismo zaznali nobenih značilnih razlik med skupinami. Razlog temu bi bila lahko premajhna občutljivost metode za zaznavanje majhnih sprememb na nivoju proteina ali časovna odvisnost sprememb izražanja proteinov. S povečanjem števila vzorcev možganov v posameznih skupinah bi zmanjšali standardno napako, kar bi lahko za posledico imelo značilne razlike med skupinami.

Kljub temu, da rezultati v raziskavi niso pokazali statističnih razlik med skupinami, menimo, da je nadaljevanje raziskav s peptidom P1 smiselno, saj lahko na podlagi predhodnih *in vitro* in sedanjih raziskavah *in vivo* sklepamo, da deluje kot alosterični modulator na receptorju GHSR-1a in kot tak zavira aktivnost GHSR-1a receptorja. Raziskavo bi bilo vredno ponoviti brez uporabe splošne anestezije in s povečanim številom živali na skupino. Namesto proučevanja vplivov na raven izraženih peptidov, bi bilo bolje meriti količino sintetizirane mRNA, saj bi na tak način zaznali že manjše spremembe v izražanju. Žrtvovanje živali bi bilo smiselno namesto po eni uri, kot so to storili v našem primeru, opraviti po dveh urah, ko so ravni NPY/AgRP mRNA dokazano najvišje (85). S kemijskimi spremembami molekule bi morali sintetizirati peptidomimetik z zaščiteno peptidno strukturo za vplive hidrolize v pogojih *in vivo*, saj bi is tem povečali obstojnost aktivne oblike v telesu. Z ohranjeno peptidno molekulsko strukturo bi podaljšali razpolovno dobo peptida P1, kar bi v večji meri zavrllo oreksigene poti v hipotalamusu.

LITERATURA

1. Ahima RS, Antwi DA. Brain regulation of appetite and satiety. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2008; 37 (4): 811-823.
2. Sergej Pirkmajer, Dušan Šuput in sod.: Patološka fiziologija, Učbenik za študente farmacije, 1. izdaja, Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2015, 277-287.
3. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656–660.
4. Schwartz GJ. The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutrition* 2000; 6: 866-873.
5. Parker JA, Bloom SR. Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology* 2012; 63 (1): 18-30.
6. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews* 1999; 20: 68–100.
7. Neary NM, Goldstone AP, Bloom SR. Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clinical endocrinology* 2003; 60 (2): 153–160.
8. Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular Endocrinology* 1994; 8: 1298–1308.
9. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 1997; 278: 135–138.
10. Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbæk C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 1999; 23: 775–786.
11. Nijenhuis WA, Oosterom J, Adan RA. AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Molecular Endocrinology* 2001; 15: 164 – 171.
12. Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russell SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Ghatei MA,

- Bloom SR. A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of α -melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 1998; 139: 4428–4431.
13. Small CJ, Kim MS, Stanley SA, Mitchell JR, Murphy K, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR. Effects of chronic central nervous system administration of Agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes* 2001; 50: 248–254.
14. Bray GA, Fisler J, York DA. Neuroendocrine control of the development of obesity: understanding gained from studies of experimental animal models. *Frontiers in Neuroendocrinology* 1990; 11: 128–181.
15. Dallman MF, et al. Feast and famine: Critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Frontiers in Neuroendocrinology* 1993; 14: 303–347.
16. Kow L, Pfaff D. The effects of the TRH-metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1991; 38: 359–364.
17. Verbalis J, Blackburn R, Hoffman G, Stricker E. Establishing behavioral and physiological functions of central oxytocin: insights from studies of oxytocin and ingestive behaviors. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1995; 395: 209–225.
18. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661–671.
19. Rodriguez EM, Blazquez JL, Guerra M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 2010; 31: 757–776.
20. Niswender KD, Schwartz MW. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Frontier in Neuroendocrinology* 2003; 24: 1–10.
21. Tang-Christensen M, Vrang N, Larsen PJ. Glucagon-like peptide containing pathways in the regulation of feeding behaviour. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 2001; 25 (5): 42–47.
22. Turton MD, O’Shea D, Gunn I, et al. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 1996; 379: 69–72.

23. Grandt D, Schimiczek M, Struk K, et al. Characterization of two forms of peptide YY, PYY (1–36) and PYY (3–36), in the rabbit. *Peptides* 1994; 15: 815–820.
24. Corp ES, McQuade J, Moran TH, Smith GP. Characterization of type A and type B CCK receptor binding sites in rat vagus nerve. *Brain Research* 1993; 623: 161–166.
25. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *New England Journal of Medicine* 1996; 334: 292–295.
26. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395, 763–770.
27. Kolaczynski JW, Ohannesian JP, Considine RV, Marco CC, Caro JF. Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81, 4162–4165.
28. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; 382, 250–252.
29. Myers MG, Cowley MA, Muñzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annual Review of Physiology* 2008; 70: 537–556.
30. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, Kasuga M. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 2003; 52: 947–952.
31. 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.
32. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105: 6320–6325.
33. 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.

34. Bednarek MA, Feighner SD, Pong S, McKee KK, Hreniuk DL, Silva MV, Warren VA, Howard AD, Ploeg LHY, van der Heck JV. Ghrelin: Minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth. *Journal of Medicinal Chemistry* 2000; 43: 4370–4376.
35. Drazen DL, Vahl TP, D'Alessio DA, Seeley RJ, Woods SC. Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: Evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology* 2006; 147: 23–30.
36. Gahete MD, Córdoba-Chacón J, Salvatori R, Castaño JP, Kineman RD, Luque RM. Metabolic regulation of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) expression in the mouse hypothalamus, pituitary, and stomach. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010; 317: 154–160.
37. Patterson M, Murphy KG, Le Roux CW, Ghatei MA, Bloom SR. Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005; 90: 2205–2211.
38. Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, Ohgusu H, Kangawa K, Kojima M. Structure, regulation and function od ghrelin. *The Journal of Biochemistry* 2012; 151 (2): 119-128.
39. Tanaka M, Hayashida Y, Iguchi T, Nakao N, Nakai N, Nakashima K. Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. *Endocrinology* 2008; 142: 3697-3700.
40. Angeloni SV, Glynn N, Ambrosini G, Garant MJ, Higley JD, Suomi S, Hansen BC. Characterization of the Rhesus monkey ghrelin gene and factors influencing ghrelin gene expression and fasting plasma levels. *Endocrinology* 2004; 145: 2197-2205.
41. Tomasetto C, Wendling C, Rio MC, Poitras P. Identification of Cdna encoding motilin related peptide/ghrelin precursor from dog fundus. *Peptides* 2001; 22: 2055-2059.
42. Ferrini F, Salio C, Lossi L, Merighi A. Ghrelin in central neurons. *Current Neuropharmacology* 2009; 7: 37–49.
43. Guan X, Yu H, Palyha O, McKee K, Feighner S, Sirinathsinghji D, Smith R, van der Ploeg L, Howard A. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Molecular Brain Research* 1997; 48: 23–29.

44. Shuto Y, Shibasaki T, Wada K, Parhar I, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I. Generation of polyclonal antiserum against the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R): Evidence that the GHS-R exists in the hypothalamus, pituitary and stomach of rats. *Life Sciences* 2001; 68: 991–996.
45. Holst B, Cygankiewicz A, Jensen TH, Ankersen M, Schwartz TW. High constitutive signaling of the ghrelin receptor - identification of a potent inverse agonist. *Molecular Endocrinology* 2003;17(11):2201-2210.
46. Edwards A, Abizaid A. Clarifying the ghrelin system's ability to regulate feeding behaviours despite enigmatic spatial separation of the GHSR and its endogenous ligand. *International Journal of Molecular Science* 2017; 18 (4): 895.
47. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50: 1714–1719.
48. Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe S, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 240-244.
49. Yildiz BO, Suchard MA, Wong ML, McCann SM, Licinio J. Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 10434-10439.
50. Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M. Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 275: 477-480.
51. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Niijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123: 1120-1128.
52. Williams DL, Grill HJ, Cummings DE, Kaplan JM. Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin. *Endocrinology* 2003; 144: 5184-5187.
53. 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: 4552.
54. Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL, Strasburger CJ, Bidlingmaier M, Esterman M, Heiman ML, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003; 37: 649–661.
55. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86: 4753–4758.
56. Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, Lamarque L, Verdié P, Bourrier E, Dehouck B, et al. Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; 110: 1512–1517.
57. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Niijima A, Fujino MA, et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001; 120: 337–345.
58. Page AJ, Slattery JA, Milte C, Laker R, O'Donnell T, Dorian C, Brierley SM, Blackshaw, L.A. Ghrelin selectively reduces mechanosensitivity of upper gastrointestinal vagal afferents. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2007; 292: 1376–1384.
59. Sawchenko PE. Central connections of the sensory and motor nuclei of the vagus nerve. *Journal of the Autonomic Nervous System* 1983; 9: 13–26.
60. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194–198.
61. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 2001; 50: 2438–2443.
62. Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 2001; 50: 227-232.

63. Riediger T, Traebert M, Schmid HA, Scheel C, Lutz TA, Scharrer E. Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience Letters* 2003; 341: 151–155.
64. Stanley BG, Leibowitz SF. Neuropeptide Y: Stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sciences* 1984; 35: 2635–2642.
65. Tong Q, Ye CP, Jones JE, Elmquist JK, Lowell BB. Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nature Neuroscience* 2008; 11: 998–1000.
66. Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos Protein in Brain: Metabolic Mapping at the Cellular Level. *Science* 1988; 240 (4857): 1328.
67. Bullitt E. Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 1990; 296 (4):517-530.
68. Hassouna R, Laberthe A, Zizzari P, Videau C, Culler M, Epelbaum J, Tolle V. Actions of agonists and antagonists od the ghrelin/GHS-R pathway on GH secretion, appetite, and cFos activity. *Frontiers in endocrinology* 2013; 4: 25.
69. Vodnik M. Razvoj peptidnih učinkovin za poseganje v delovanje grelina in vpliv estrogenih snovi na njegovo izražanje: doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: Ljubljana 2013.
70. Knuplež E. Preizkušanje novih peptidnih spojin vodnic za poseganje v delovanje oreksigenega hormona grelina. Veterinarska fakulteta: Raziskovalno delo, Ljubljana 2015.
71. Peinkicher S. Preizkušanje učinkovitosti peptidnega antagonist grelinskega receptorja na mišjem modelu. Fakulteta za farmacijo: Ljubljana 2018.
72. Thermo Fisher Scientific. Overview of immunohistochemistry. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-immunohistochemistry.html>. Dostopno Januar 3, 2017.
73. Duraiyan J, Govindarajan R, Kaliyappan K, Palanisamy M. Applications of immunohistochemistry. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* 2012; 4 (2): 307–309.

74. Ramos-Vara JA, Miller MA. When tissue antigens and antibodies get along. Revisiting the technical aspects of immunohistochemistry—the red, brown, and blue technique. *Veterinary pathology* 2014; 51 (1): 42-87.
75. Immunohistochemistry.us. Immunohistochemical Analysis. <http://www.immunohistochemistry.us/what-is-immunohistochemistry/Immunohistochemical-Analysis.html>. Dostopno Januar 3, 2017.
76. Khazali H, Mahmoudi F. The anti-obesity effect of d-lys3- ghrp-6 peptide, GHSR receptor antagonist in rats. *Iranian journal of endocrinology and metabolism* 2012; 14(5): 484-491.
77. Thermo fisher scientific. Avidin-biotin complex method for ihc detection. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/avidin-biotin-complex-method-ihc-detection.html>. Dostopno Januar 3, 2017.
78. Paxinos G, Franklin K: The mouse brain in stereotaxis coordinates, Second edition, Academic Press, New York, 2001.
79. Neary NM, Small CJ, Wren AM, et al. Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004; 89 (6): 2832-2836.
80. Ueno S, Yoshida S, Mondal A, et al. In vitro selection of a peptide antagonist of growth hormone secretagogue receptor using cDNA display. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; 109(28): 11121–6.
81. Willesen MG, Kristensen P, Romer J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 1999; 70: 306–316.
82. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 2001; 50 (11): 2438-2443.
83. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194–198.

84. Campos VF, Robaldo RB, Deschamps JC, Seixas FK, McBride AJ, Marins LF, Okamoto M, Sampaio LA, Collares T. Neuropeptide Y gene expression around meal time in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*. *Journal of Biosciences* 2012; 37 (2): 227-32.
85. Hong-Zai G, Qing-Chun L, Zheng-Yao J. Ghrelin acts on rat dorsal vagal complex to stimulate feeding via arcuate neuropeptide Y/agouti-related peptide neurons activation. *Acta Physiologica Sinica* 2010; 62 (4): 357-364.
86. Lunder M, Vodnik M, Kubale K, Grgurevič N, Majdič G, Štrukelj B. Peptide mimetic of N-terminal ghrelin enhances ghrelin induced growth hormone secretion and c-fos expression in mice. *Molecular and cellular endocrinology* (v recenziji).
87. Stevanovic DM, Grefhorst A, Themmen AP, Popovic V, Holstege J, Haasdijk E, Trajkovic V, van der Lely AJ, Delhanty PJ. Unacylated ghrelin suppresses ghrelin-induced neuronal activity in the hypothalamus and brainstem of male rats. *Public Library of Science* 2014; 9 (5): e98180.
88. Kobelt P, Wisser A-S, Stengel A, Goebel M, Inhoff T, Noetzel S, Veh WR, Bannert N, van der Voort I, Wiedenmann B, Klapp FB, Tache Y, Mönnikes H. Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats. *Brain research* 2008; 1204: 77-86.
89. Keilhoffa G, Beckerb A, Greckschb GGWolfa, Bernsteinc H-G. Repeated application of ketamine to rats induces changes in the hippocampal expression of parvalbumin, neuronal nitric oxide synthase and cFOS similar to those found in human schizophrenia. *Neuroscience* 2004; 126 (3): 591-598.
90. Wang L, Saint-Pierre DH, Tache Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience Letters* 2002; 325: 47-51.