

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



**Vliv stabilních agonistů a antagonistů ghrelinového receptoru
na regulaci příjmu potravy**

**Impact of stable ghrelin receptor agonists and antagonists
on food intake regulation**

Mgr. Martina Holubová

Praha 2014

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor:	Biochemie a patobiochemie
Předseda oborové rady:	Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.
Školící pracoviště:	Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v.v.i. Flemingovo náměstí 2, Praha 6, 166 10
Školitel:	RNDr. Lenka Maletínská, CSc.
Konzultant (byl-li):	Prof. MUDr. Martin Haluzík, DrSc.

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	4
ABSTRAKT.....	5
ABSTRACT.....	5
1. ÚVOD.....	6
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	9
3. MATERIÁL A METODIKA.....	10
4. VÝSLEDKY.....	13
5. DISKUZE.....	20
6. ZÁVĚRY.....	22
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	23
8. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ.....	26

SEZNAM ZKRATEK

ACACA	acetyl-CoA karboxyláza 1 (acetyl-CoA carboxylase 1)
ada	adamantanacetyl
AgRP	protein příbuzný signálnímu proteinu agouti (agouti-related protein)
ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
BAT	hnědá tuková tkáň (brown adipose tissue)
B2M	β_2 -mikroglobulin (β_2 -microglobulin)
bromooct	bromooktanoyl
Cha	cyklohexylalanin
dec	dekanoyl
decen	decenoyl
DIO	obezita indukovaná podáváním vysokotukové diety (diet-induced obesity)
Dpr	diaminopropionová kyselina (diaminopropionic acid)
FASN	syntáza mastných kyselin (fatty acid synthase)
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
GHS-R1a	ghrelinový receptor (growth hormone secretagogue receptor 1a)
HBSS	Hanksův vyvážený solný roztok (Hanks' Balanced Salt Solution)
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HF	vysokotuková dieta (high fat)
K_d	rovnovážná disociační konstanta radioligandu
K_i	rovnovážná disociační konstanta neznačeného ligandu
myr	myristoyl
Nal	naftylalanin
IPAT	intraperitoneální tuková tkáň (intraperitoneal adipose tissue)
NPY	neuropeptid Y (neuropeptide Y)
oct	oktanoyl
palm	palmitoyl
PEG	polyethylenglykol 300 (polyethylene glycol 300)
PF	párově krmené myši (pair-fed)
Phe	fenylalanin
PheCl ₂	dichlorfenylalanin
PheNO ₂	nitrofenylalanin
POMC	proopiomelanokortin (proopiomelanocortin)
Sar	sarkosin
SC	podkožní (<i>sub cutem</i>)
SCAT	podkožní tuková tkáň (subcutaneous adipose tissue)
SEM	střední chyba průměru (standard error of mean)
tBu	tercbutylalanin
UCP	rozpojovací protein (uncoupling protein)
undecyn	undecynoyl

ABSTRAKT

Dizertační práce se zabývá vlivem agonistů a antagonistů ghrelinového receptoru (GHS-R1a) na regulaci příjmu potravy. Ghrelin je doposud jediný známý periferní orexigenní hormon a jediný acylovaný hormon. Agonisté GHS-R1a by mohli být využiti k léčbě kachexie, antagonisté GHS-R1a by mohli sloužit k léčbě obezity.

V první části dizertační práce byli charakterizováni nově navržené peptidové agonisté GHS-R1a. Agonisté byli stabilizováni náhradou Ser³ s esterově vázaným oktanylem za kyselinu diaminopropionovou, k níž je mastná kyselina vázána stabilní amidovou vazbou, a dále začleněním dalších nekódových aminokyselin. Analogy ghrelinu byly modifikovány záměnou oktanoylu za jiné mastné kyseliny, začleněním druhé mastné kyseliny či zkrácením peptidového řetězce. Většina agonistů GHS-R1a se s vysokou afinitou ($K_i = 10^{-9}$ - 10^{-10} nM) vázala k receptoru GHS-R1a, aktivovala signalizační dráhy ghrelinu a po podkožním (SC) podání myším signifikantně a dlouhodobě zvyšovala příjem potravy.

Ve druhé části dizertační práce byly testovány akutní a dlouhodobé účinky pseudopeptidového agonisty GHS-R1a JMV1843. Jednorázové SC podání JMV1843 sytým myším C57BL/6 vedlo k dávkově závislému zvýšení příjmu potravy ($ED_{50} = 1.94$ mg/kg). Při inkubaci v krevním séru *in vitro* byl JMV1843 stabilní po dobu 24 hod. 10-denní SC podávání JMV1843 štíhlým myším vedlo ke zvýšení příjmu potravy, tělesné hmotnosti a exprese orexigenních neuropeptidů v mediobazálním hypothalamu a snížení exprese termogenního uncoupling proteinu 1 v hnědé tukové tkáni.

Ve třetí části práce byly testovány akutní a dlouhodobé účinky nepeptidových antagonistů GHS-R1a JMV3002 a JMV4208, sloučenin na bázi 1,2,4-triazolu. Jejich jednorázové SC podání hladovým štíhlým myším vedlo k dávkově závislému snížení příjmu potravy ($ED_{50} = 2.05$ a 5.25 mg/kg). Obě sloučeniny byly stabilní v myší krvi *in vivo*. 14-denní podávání myším s obezitou indukovanou vysokotukovou dietou (DIO) vedlo ke snížení příjmu potravy, tělesné hmotnosti (až o 15 %), hmotnosti tukové tkáně a exprese lipogenetických enzymů.

Klíčová slova:

Ghrelin, agonista GHS-R1a, antagonist GHS-R1a, příjem potravy, myši, kachexie, obezita

ABSTRACT

The thesis is focused on the effect of ghrelin receptor (GHS-R1a) agonists and antagonist on food intake regulation. Ghrelin is the only known peripherally produced orexigenic hormone and the only known acylated hormone. GHS-R1a agonists and antagonists could be useful in the treatment of cachexia and obesity, respectively.

In the first part of the thesis, newly designed peptidic GHS-R1a agonists were characterized. The agonists were stabilized by replacing octanoylated Ser³ with a fatty acid coupled to diaminopropionic acid by a stable amide bond. Other noncoded amino acids were also incorporated. Ghrelin analogs were modified by replacing the octanoyl group with another fatty acid, incorporation of the second fatty acid or shortening the peptide chain. Most of the tested GHS-R1a agonists were found to possess high affinities for GHS-R1a ($K_i = 10^{-9}$ - 10^{-10} nM) and to activate signaling pathways of ghrelin. After subcutaneous (SC) administration to mice, agonists showed significant and prolonged orexigenic effect.

In the second part of the thesis, acute and long-term effects of pseudopeptide GHS-R1a agonist JMV1843 were tested in lean C57BL/6 mice. Acute SC administration of JMV1843 to fed mice increased food intake in a dose-dependent manner ($ED_{50} = 1.94$ mg/kg). JMV1843 was stable in blood serum *in vitro* for 24 h. 10-day treatment with JMV1843 (SC administration) significantly increased food intake, body weight and mRNA expression of the orexigenic neuropeptides in the medial basal hypothalamus and decreased the expression of thermogenic uncoupling protein 1 in brown adipose tissue.

In the third part of the thesis, acute and long-term effects of nonpeptide GHS-R1a antagonists JMV3002 and JMV4208, compounds based on 1,2,4-triazole structure, were tested. Their acute SC administration decreased food intake in fasted lean mice in a dose-dependent manner ($ED_{50} = 5.25$ and 2.05 mg/kg). Both compounds were stable in mouse blood *in vivo*. 14-day treatment with the ghrelin antagonists decreased food intake, body weight, adipose tissue mass and expression of the lipogenesis-promoting enzymes in mice with diet-induced obesity (DIO).

Key words:

Ghrelin, GHS-R1a agonist, GHS-R1a antagonist, food intake, mice, cachexia, obesity

1. ÚVOD

Ghrelin je doposud jediný popsáný periferní orexigenní hormon. Je sekretován zejména buňkami sliznice žaludku, v menší míře také dalšími tkáněmi, mimo jiné hypothalamickými neurony. Ghrelin je peptid tvořený 28 aminokyselinami. Hydroxylová skupina Ser³ je posttranslačně esterifikována oktanovou kyselinou. Tato modifikace je mezi hormony unikátní a je zcela nezbytná pro biologickou aktivitu ghrelinu. Vzhledem k labilitě esterové vazby je ovšem poločas ghrelinu v krvi nízký (Kojima *et al.* 1999; Depoortere 2009).

Ghrelin ovlivňuje řadu významných fyziologických funkcí. K nejdříve známým účinkům ghrelinu patří stimulace sekrece růstového hormonu, dále pak účast na regulaci příjmu potravy, vliv na motilitu žaludku, žaludeční sekreci, funkci slinivky břišní a na metabolismus glukózy a lipidů. Byly také popsány kardioprotektivní a protizánětlivé účinky ghrelinu (Kojima & Kangawa 2005; Delporte 2013).

Receptor pro ghrelin (GHS-R1a) se v největší míře nachází v *nucleu arcuatu* v hypothalamu, klíčovém centru regulace energetické homeostáze, kde jeho interakce s ghrelinem vyvolává zvýšení příjmu potravy (Muccioli *et al.* 1998). GHS-R1a je receptor spřažený s G-proteiny, který k přenosu signálu do buňky využívá dráhu fosfolipázy C. Tato dráha vede přes druhé posly inositoltrifosfát a diacylglycerol k nárůstu hladiny intracelulárního kalcia. Následné signalizační kaskády zprostředkovávající aktivaci hypothalamických neuronů zahrnují např. fosforylaci proteinkinázy aktivované AMP (AMPK), jednoho z hlavních metabolických senzorů zajišťujícího udržení energetické homeostáze (Delporte 2013; Yin *et al.* 2014).

V *nucleu arcuatu* se nacházejí dvě populace neuronů s opačným účinkem na příjem potravy. Orexigenní neurony (stimulující příjem potravy) exprimují neuropeptid Y (NPY) a agouti-related protein (AgRP), zatímco anorexigenní neurony (inhibující příjem potravy) produkují proopiomelanokortin (POMC) a transkript regulovaný kokainem a amfetaminem (CART). Na NPY/AgRP a POMC/CART neuronech se nacházejí receptory pro periferní hormony regulující příjem potravy; orexigenní hormony stimulují expresi NPY a AgRP, anorexigenní stimulují expresi POMC a CART (Harrold *et al.* 2012; Sam *et al.* 2012).

Centrální i periferní podání ghrelinu stimuluje příjem potravy a redukuje energetický výdej; výsledná pozitivní energetická bilance vede k akumulaci tukové tkáně a k nárůstu tělesné hmotnosti (Tschöp *et al.* 2000; Kamegai *et al.* 2001; Nakazato *et al.* 2001; Wren *et al.* 2001a; Wren *et al.* 2001b). Sekrece ghrelinu je pulzatilní; plazmatická hladina ghrelinu roste během hladovění, zatímco po jídle prudce klesá. Lze tedy předpokládat, že ghrelin slouží jako

signál pro zahájení příjmu potravy (Cummings *et al.* 2001; Tschöp *et al.* 2001). Hladiny ghrelinu jsou chronicky zvýšeny v souvislosti se snížením hmotnosti a chronicky sníženy u obézních osob, což naznačuje, že ghrelin působí také jako signál informující o dlouhodobé energetické bilanci (Cummings *et al.* 2002; Shiiya *et al.* 2002). Účinkem chronického podávání ghrelinu dochází ke zvýšení utilizace glukózy v bílé i hnědé tukové tkáni a ke zvýšení hladiny metabolických parametrů podněcujících ukládání tuku v bílých adipocytech; naopak se snižuje exprese mitochondriálních uncoupling proteinů (UCP) spjatých s termogenezí v hnědých adipocytech (Tsubone *et al.* 2005).

Popsané orexigenní a protizánětlivé účinky ghrelinu by mohly být využitelné v terapii kachexie, což je stav charakterizovaný fyzickým chřadnutím, ztrátou hmotnosti a svalové, případně i tukové hmoty, který je následkem nerovnováhy mezi katabolickými a anabolickými procesy a vyskytuje se u pacientů s pokročilým nádorovým, případně chronickým progresivním onemocněním. Za primární příčinu kachexie je považována nepřiměřená imunitní aktivace vedoucí k chronickému zánětu (Ashitani *et al.* 2009; DeBoer 2011). Ghrelin byl již testován v řadě krátkodobých studií na kachektických pacientech (Guillory *et al.* 2013). Jedním z mála syntetických agonistů, kteří postoupili do klinického testování, je pseudopeptid JMV1843 označovaný také macimorelin (Aeterna Zentaris). V budoucnu by se v léčbě kachexie mohly uplatnit také stabilní peptidové analogy ghrelinu s prodlouženým trváním účinku (Maletínská *et al.* 2012).

Blokování signalizace ghrelinu se jeví jako vhodný přístup v terapii obezity, současného nejzávažnějšího a nejrozšířenějšího metabolického onemocnění spojeného s řadou zdravotních rizik (diabetes II. typu, kardiovaskulární onemocnění, nádory) (Scerif *et al.* 2011). K zablokování účinku ghrelinu lze využít neutralizaci ghrelinu (vakcinace protilátkou, RNA-Spiegelmer), inhibici ghrelin-O-acyl transferázy (enzymu zprostředkovávajícího acylaci ghrelinu) nebo antagonisty či inverzní agonisty GHS-R1a (Depoortere 2009). Byla vyvinuta a testována celá řada syntetických antagonistů GHS-R1a (Chollet *et al.* 2009), mezi nimi např. deriváty 1,2,4-triazolu (Demange *et al.* 2007; Moulin *et al.* 2008), které po jednorázovém i opakovaném podání hlodavcům účinně snižují příjem potravy (Salomé *et al.* 2009a; Salomé *et al.* 2009b).

2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

- **Charakterizace nových stabilních dlouhodobě působících peptidových agonistů receptoru GHS-R1a**

Ghrelin je vzhledem ke své oktanoylaci na Ser³ poměrně nestabilní hormon, jako peptid je navíc snadno štěpen proteázami. Za účelem zvýšení stability molekuly ghrelinu byly v naší laboratoři navrženy jeho analogy s obměněnou aminokyselinovou sekvencí, do níž byly začleněny nekódové aminokyseliny (Sar¹ jako ochrana proti štěpení aminopeptidázami, Dpr³ vytvářející stabilní amidovou vazbu s mastnou kyselinou, záměny Phe⁴ na ochranu proti štěpení chymotrypsinovými proteázami). Tyto analogy byly dále modifikovány zkrácením peptidového řetězce, začleněním druhé mastné kyseliny, či záměnou oktanové kyseliny za delší či nenasycenou mastnou kyselinu. Prvním z cílů této práce bylo charakterizovat nové analogy ghrelinu po stránce jejich vazby k receptoru GHS-R1a, signalizace, stability a účinku na příjem potravy u myši.

- **Studium účinku pseudopeptidového agonisty receptoru GHS-R1a JMV1843 na příjem potravy a tělesnou hmotnost u štíhlých myších samců**

JMV1843 je pseudopeptidový analog ghrelinu, o němž se uvažuje jako o potenciálním léčivu pro terapii kachexie. Druhým cílem této práce bylo otestovat akutní účinek JMV1843 na příjem potravy po periferním podání myším, analyzovat jeho stabilitu v myší krvi jak *in vitro*, tak *in vivo*, a testovat účinky JMV1843 na příjem potravy, tělesnou hmotnost, metabolické parametry a expresi orexigenních neuropeptidů po dlouhodobém periferním podávání myším.

- **Studium účinku nepeptidových antagonistů receptoru GHS-R1a JMV3002 a JMV4208 na příjem potravy a tělesnou hmotnost u obézních myších samců**

Blokování účinku ghrelinu pomocí antagonistů GHS-R1a se jeví jako vhodný přístup v terapii obezity. Třetím cílem této práce bylo studovat účinky JMV3002 a JMV4208, nepeptidových antagonistů GHS-R1a založených na struktuře trisubstituovaného 1,2,4-triazolu. Předmětem zájmu byl akutní účinek obou antagonistů na příjem potravy po jednorázovém periferním podání štíhlým myším, farmakokinetika *in vivo* a dlouhodobý vliv na příjem potravy, tělesnou hmotnost, metabolické parametry a expresi neuropeptidů ovlivňujících příjem potravy po chronickém podávání myším s obezitou indukovanou vysokotukovou dietou.

3. MATERIÁL A METODIKA

Testování analogů ghrelinu *in vitro*

Vazebné studie byly prováděny s využitím membrán s transfekovaným receptorem GHS-R1a připravených z buněčné linie HEK293T (Multispan, USA), případně LLC-PK1 (IBMM, Montpellier, Francie). Pro kompetitivní vazebné experimenty byl použit vazebný pufr (50 mM Tris o pH 7.4; 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 0.1 mg/ml BPTI), neznačené analogy ghrelinu s finální koncentrací 10⁻¹² až 10⁻⁵ M a ¹²⁵I-ghrelin s finální koncentrací 0.05 nM (inkubace 45 min při laboratorní teplotě). Vazebná reakce byla ukončena přidáním vychlazeného vymývacího pufru (20 mM Tris o pH 7.4; 10 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 0.015 % Triton X-100) následovaným filtrací na Brandelově přístroji přes GF/C filtry (Whatman, USA). Radioaktivita navázaná na buněčných membránách zachycených na filtrech byla změřena na γ -čítači. Rovnovážná disociační konstanta neznačeného ligandu (K_i) byla vypočítána pomocí rovnice Chenga a Prussofa s použitím rovnovážné disociační konstanty radioligandu (K_d) 0.1938 nM získané v saturačních vazebných experimentech.

Akumulace inositolfosfátu byla stanovena pomocí IP-One HTRF kitu (Cisbio Bioassays, Francie) dle protokolu doporučeného výrobcem. Buňky HEK-293T (ATCC, USA) transientně transfekované receptorem GHS-R1a (50 tis. buněk na jamku na 96-jamkové destičce, 48 hod po transfekci) byly v prostředí stimulačního pufru (součást kitu) stimulovány testovaným ligandem v koncentracích 10⁻¹¹ – 10⁻⁵ M v duplikátech po dobu 45 min při 37 °C.

Mobilizace intracelulárního kalcia byla stanovena dle dříve popsaného postupu (Demange *et al.* 2007). Buňky HEK-293T transientně transfekované receptorem GHS-R1a byly pěstovány na 96-jamkových destičkách (80 tis. buněk na jamku). Po 24 hod (80-95% konfluence) byly promyty 150 μ l reakčního pufru (HBSS, 0.5 % BSA, 20 mM HEPES, 1 mM MgSO₄, 1.3 mM CaCl₂, pH 7.4), poté byl k buňkám přidán 1 μ M fluorescenční indikátor kalcia Fluo-4AM (Invitrogen, USA). Po hodinové inkubaci při 37 °C ve tmě byl přebytek Fluo-4AM odstraněn promytím reakčním pufrem. Test byl prováděn pomocí FlexStation II (Molecular Devices, USA), studované analogy byly k buňkám automaticky přidávány v koncentracích od 10⁻¹¹ do 10⁻⁵ M v triplikátech.

Testování analogů ghrelinu *in vivo*

Myši samci kmene C57BL/6 (Charles River, Německo) byli chováni v akreditovaném zvěřinci ÚOCHB AV ČR, v.v.i., Praha v areálu ústavů Akademie věd v Krči při teplotě 22 \pm 2 °C a rytmu světlo/tma 12/12 hodin (světlo od 6:00), s volným přístupem k potravě i pitné vodě. Se zvířaty bylo zacházeno podle zákona o ochraně zvířat proti týrání (zákon

č. 246/1992 Sb.). Myši byly krmeny standardní dietou St-1 (Mlýn Kocanda, Jesenice, ČR) složenou z 66 % sacharidů, 25 % proteinů a 9 % tuků, s energetickou hodnotou 3.4 kcal/g. Během všech pokusů na příjem potravy měly myši volný přístup k pitné vodě.

Pro **testování akutního účinku analogů ghrelinu** byli použiti myši samci C57BL/6 ve stáří 12-15 týdnů, pro testování agonistů GHS-R1a sytí, pro testování antagonistů GHS-R1a hladoví (17 hod před pokusem). Bezprostředně před testem byla myším odebrána potrava. Agonisté GHS-R1a byli rozpouštěni ve fyziologickém roztoku, nerozpustní triazoloví antagonisté GHS-R1a v 50% polyethylenglykolu 300 (50% PEG). Injikování rozpouštědla, ghrelinu i analogů ghrelinu bylo prováděno SC, v dávkách 0.1 – 20 mg/kg (0.2 ml/myš). 15 min po injikování testované látky byla myším podána předem zvážená potrava, která pak byla vážena každých 30 min po dobu 5-10 hod. Každá skupina čítala alespoň 5 myší.

Pro **testování dlouhodobých účinků JMV1843** byli použiti myši samci C57BL/6 ve věku 16 týdnů. V průběhu pokusu byl jednotlivým skupinám myší (n=10) dvakrát denně (v 8:00 a 18:00 hod) po dobu 10 dnů SC injikován fyziologický roztok, nebo JMV1843 rozpuštěný ve fyziologickém roztoku v dávce 5 nebo 10 mg/kg (0.2 ml/myš). Během experimentu byl jednou denně monitorován příjem potravy a tělesná hmotnost myší.

Pro **testování dlouhodobých účinků JMV3002 a JMV4208** byl u myších samců C57BL/6 zaveden model obezity indukované dietou (DIO). Do 8. týdne věku konzumovaly myši standardní dietu (St-1), od 8. týdne věku dietu vysokotukovou (HF), složenou ze 40 % St-1, 34 % Sunaru, 25 % vepřového sádla a 1 % kukuřičného škrobu (Kopecký *et al.* 1996). HF dieta obsahovala 13 % proteinů, 27 % sacharidů a 60 % tuků (energetická hodnota 5.3 kcal/g). Do 20. týdne věku myši byl jednou týdně sledován přírůstek hmotnosti. Myši rezistentní ke vzniku DIO (přibližně 15 % myší) byly z pokusu vyřazeny. Průměrná hmotnost DIO myší použitých pro experiment byla 47 g (průměrná hmotnost štíhlých samců C57BL/6 stejného věku se pohybuje mezi 25-30 g). V průběhu pokusu byl jednotlivým skupinám myší (n=10) dvakrát denně (v 8:00 a 18:00 hod) po dobu 14 dnů SC injikován 50% PEG nebo jeden z antagonistů GHS-R1a rozpuštěný v 50% PEG v dávce 10 nebo 20 mg/kg (0.2 ml/myš). Během experimentu byl jednou denně monitorován příjem potravy a tělesná hmotnost myší. Dále byly zavedeny skupiny tzv. párově krměných myší (PF) ke skupinám injikovaným vyššími dávkami antagonistů. Tyto myši dostávaly stejné množství potravy, jaké konzumovala skupina myší po injekci antagonistů v příslušný den dlouhodobého pokusu.

Na konci dlouhodobých experimentů byly myši usmrceny a byla jim odebrána krev, z níž byla připravena plazma ke stanovení biochemických parametrů (inzulín, leptin, adiponektin, glukóza, triglyceridy) pomocí komerčně dostupných kitů. Myším byl odebrán

podkožní (SCAT), intraperitoneální (IPAT) a hnědý (BAT) tuk a játra. Tkáně byly zmrazeny v tekutém dusíku a uchovány při -70 °C. Mozky byly vloženy do isopentanu (-20°C), zmrazeny na suchém ledu a uchovány při -70 °C.

Vzorky tukové tkáně (BAT, SCAT, IPAT) byly homogenizovány v MagNA Lyser homogenizátoru a byla z nich extrahována celková RNA pomocí MagNA Pure Compact RNA Isolation (Tissue) Kitu na automatickém izolátoru MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics, Německo). RNA byla přepsána do cDNA pomocí High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu (Applied Biosystems, USA). Expze mRNA byla stanovena pomocí PCR systému ABI PRISM 7500 Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems, USA) s použitím TaqMan produktů pro stanovování genové expze (Applied Biosystems, USA). V BAT byla sledována expze UCP-1, v IPAT a SCAT expze ACACA (acetyl-CoA karboxyláza 1) a FASN (syntáza mastných kyselin). Jako vnitřní standard byl použit β_2 -mikroglobulin (B2M).

Mediobazální hypothalamus izolovaný z řezů mozkové tkáně byl homogenizován v RNA extrakčním lyzačním pufru. Celková RNA byla z homogenizované tkáně izolována s použitím RNAqueous Micro Kitu (Ambion, USA) a následně byla přepsána do cDNA pomocí High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kitu. Expze mRNA byla stanovena pomocí PCR systému ABI PRISM 7000 Sequence Detector s použitím TaqMan produktů pro stanovování genové expze. V mediobazálním hypothalamu byla sledována expze NPY a AgRP. Jako vnitřní standard byla použita glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH).

Farmakokinetika

Pro zjištění stability JMV1843 v myším séru *in vitro* byl do krevního séra myších samců C57BL/6 přidán JMV1843 do finální koncentrace 10^{-6} M, sérum bylo inkubováno při 37 °C. Vzorky séra byly odebírány v časech 30 min, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 a 144 hodin od počátku inkubace, bezprostředně po odebrání byly zmrazeny a uchovány při -20 °C.

Pro měření farmakokinetiky *in vivo* bylo myším samecům C57BL/6 SC injikován JMV3002 nebo JMV4208 v 50% PEGu v dávce 5 mg/kg (n=3). Myši byly usmrceny v časech 30 min, 1, 2, 4 a 8 hodin po injekci a byla jim odebrána krev, z níž byla připravena plazma.

Analyzované sloučeniny byly ze vzorků séra/plazmy extrahovány pomocí precipitace proteinů acetonitrem a podrobeny LC-MS analýze.

Statistické vyhodnocení dat

Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM. Pro statistické vyhodnocení a pro výpočet hodnot EC_{50} , ED_{50} , K_i , K_d byl použit program GraphPad Prism 5. Použitá statistická metoda je uvedena u výsledků. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, pokud $P < 0.05$.

4. VÝSLEDKY

Dlouhodobě působící peptidoví agonisté GHS-R1a

Výsledky uvedené v této kapitole jsou součástí podaného patentu č. PV 2014-429.

Byli syntetizováni dlouhodobě působící stabilní agonisté GHS-R1a (struktury jsou uvedeny v tab. 1), u nichž byl Gly¹ nahrazen sarkosinem a Ser³ diaminopropionovou kyselinou. Dále byla provedena jedna nebo více z následujících modifikací:

- oktanová kyselina na Dpr³ byla nahrazena mastnou kyselinou s delším řetězcem (dekanová, myristová, palmitová), nenasycenou mastnou kyselinou (undecynová, decenová) nebo dalšími kyselinami (adamantanoctová, bromoktanová)
- byla připojena druhá mastná kyselina na sekundární aminoskupinu lysinu v C-koncové části molekuly (u analogů s plnou délkou na Lys²⁴, u zkrácených analogů na Lys¹⁶)
- Phe⁴ byl zaměněn za naftylalanin, cyklohexylalanin, tercbutylalanin, nitrofenylalanin či dichlorofenylalanin
- byl zkrácen peptidový řetězec (18 aminokyselin od N-konce sekvence ghrelinu)

Z kompetitivní vazebné studie s agonisty GHS-R1a vyplynulo, že většina testovaných agonistů se váže s vysokou afinitou ($K_i=10^{-9}$ - 10^{-10} nM) na buněčné membrány s transfekovaných receptorem GHS-R1a. S afinitou srovnatelnou s ghrelinem se vážaly analogy 2, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 17, 18, 21, 23, 25, 26, s vyšší afinitou analogy 1, 3, 6, 14, 15, 16. Hodnoty K_i jsou shrnuty v tab. 1 spolu s přepočtem na % vazby ghrelinu.

Ve funkčních studiích sledujících aktivaci signalizačních drah ghrelinu působily vybrané analogy srovnatelně s ghrelinem (případně [Dpr³]ghrelinem) na mobilizaci intracelulárního kalcia (Ca²⁺) a aktivaci inositolfosfátové kaskády (IP1) (tab. 2).

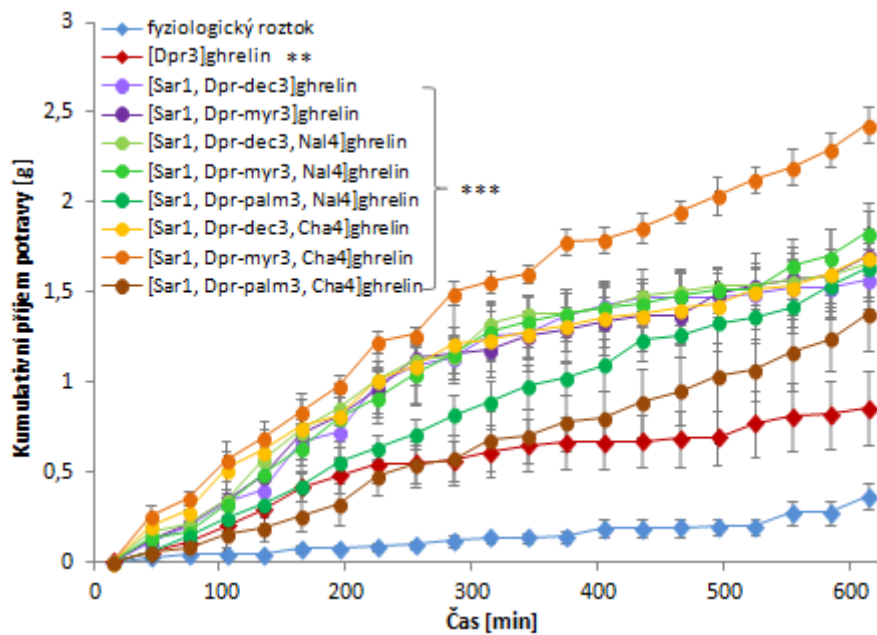
Akutní orexigenní účinek byl sledován po periferním (SC) podání agonistů štíhlým sytým myším samcům (dávky 0.1 – 10 mg/kg, příjem potravy byl monitorován po dobu 8-10 hod). Všechny testované peptidy zvyšovaly příjem potravy v závislosti na dávce, a to ve většině případů srovnatelně nebo účinněji než ghrelin, případně [Dpr³]ghrelin. Orexigenní působení všech testovaných analogů bylo dlouhodobé, účinek trval po celou dobu experimentu, tedy minimálně 8 hodin. Tab. 1 uvádí hodnoty ED₅₀ (dávky příslušných analogů potřebné k vyvolání poloviny maximálního efektu), které byly stanoveny v čase 250 min od injekce daného analogu (v čase největšího účinku). Dále je v tab. 1 uveden maximální efekt jednotlivých analogů v čase 480 min od podání vztažený na maximální účinek [Dpr³]ghrelinu ve stejném čase od podání. Na obr. 1 je porovnán orexigenní účinek vybraných analogů. Obr. 2 uvádí příklad závislosti příjmu potravy na dávce pro vybraný analog.

Tab. 1 *Struktura a biologické vlastnosti peptidových agonistů GHS-R1a – kompetitivní vazebné experimenty a orexigenní efekt po SC podání myším. NT-netestováno.*

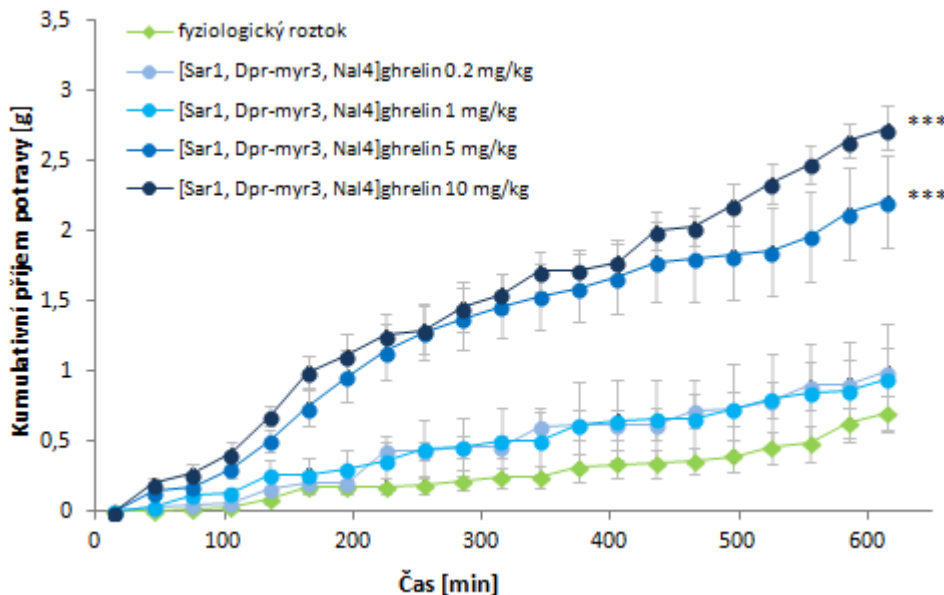
Analog	Ki [nM]	% vazby ghrelinu	ED ₅₀ [mg/kg]	max. efekt [% Dpr ³ ghr]
Ghrelin	1.15 ± 0.20	100	2.39	106.5
[Dpr ³]ghrelin	0.68 ± 0.02	169	0.82	100
1 [Sar ¹ , Dpr-dec ³]ghrelin	0.63 ± 0.03	183	3.90	218.8
2 [Sar ¹ , Dpr-myr ³]ghrelin	2.10 ± 0.16	54	3.80	202.7
3 [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Nal ⁴]ghrelin	0.65 ± 0.07	176	0.64	220.3
4 [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Nal ⁴]ghrelin	2.01 ± 0.11	57	6.02	212.8
5 [Sar ¹ , Dpr-palm ³ , Nal ⁴]ghrelin	4.25 ± 0.64	27	5.16	183.3
6 [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Cha ⁴]ghrelin	1.04 ± 0.06	110	1.02	204.5
7 [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Cha ⁴]ghrelin	6.41 ± 0.51	18	3.05	276.2
8 [Sar ¹ , Dpr-palm ³ , Cha ⁴]ghrelin	5.89 ± 0.38	20	3.09	131.8
9 [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , tBu ⁴]ghrelin	4.71 ± 0.45	24	0.85	122.7
10 [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , PheNO ₂ ⁴]ghrelin	230 ± 25.6	0.5	NT	71.9
11 [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , PheNO ₂ ⁴]ghrelin	126 ± 7.18	0.9	NT	60.3
12 [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , PheCl ₂ ⁴]ghrelin	2.45 ± 0.37	47	NT	92.9
13 [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , PheCl ₂ ⁴]ghrelin	16.8 ± 1.81	7	0.65	235.5
14 [Sar ¹ , Dpr-undecyn ³]ghrelin	0.83 ± 0.02	139	6.62	124.8
15 [Sar ¹ , Dpr-ada ³]ghrelin	0.27 ± 0.01	425	0.20	169.9
16 [Sar ¹ , Dpr-bromoact ³]ghrelin	0.79 ± 0.08	145	4.24	129.2
17 [Sar ¹ , Dpr-decen ³]ghrelin	1.51 ± 0.43	76	NT	141.5
18 [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , Lys-palm ²⁴]ghrelin	6.09 ± 0.74	19	9.98	193.9
19 [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , Cha ⁴ , Lys-palm ²⁴]ghrelin	20.8	6	NT	200.2
20 [Sar ¹ , Dpr-oct ³ , Nal ⁴ , Lys-palm ²⁴]ghrelin	23.3 ± 5.34	5	NT	171.1
21 [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Lys-palm ²⁴]ghrelin	4.27 ± 0.45	27	NT	59.7
22 [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Lys-palm ²⁴]ghrelin	14.9 ± 2.94	7	NT	62.9
23 [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Lys-palm ¹⁶]ghrelin 1-18	5.99 ± 0.79	19	NT	158.8
24 [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Lys-palm ¹⁶]ghrelin 1-18	51 ± 8.65	2	NT	177.6
25 [Sar ¹ , Dpr-dec ³]ghrelin 1-18	3.71 ± 0.78	30	NT	147.85
26 [Sar ¹ , Dpr-myr ³]ghrelin 1-18	3.38 ± 0.90	34	NT	128.54

Tab. 2 *Struktura a biologické vlastnosti peptidových agonistů GHS-R1a – funkční studie.*

Analog	IP1 - EC ₅₀ [nM]	Ca ²⁺ - EC ₅₀ [nM]
Ghrelin	NT	3.32
[Dpr ³]ghrelin	16.3	NT
1 [Sar ¹ , Dpr-dec ³]ghrelin	12.6	9.66
2 [Sar ¹ , Dpr-myr ³]ghrelin	7.10	36.6
3 [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Nal ⁴]ghrelin	2.08	18.6
4 [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Nal ⁴]ghrelin	9.75	10.9
5 [Sar ¹ , Dpr-palm ³ , Nal ⁴]ghrelin	4.01	6.64
6 [Sar ¹ , Dpr-dec ³ , Cha ⁴]ghrelin	3.28	10.6
7 [Sar ¹ , Dpr-myr ³ , Cha ⁴]ghrelin	3.08	11.4
8 [Sar ¹ , Dpr-palm ³ , Cha ⁴]ghrelin	4.25	NT



Obr. 1 Akutní orexigenní efekt vybraných agonistů GHS-R1a po SC podání sytým myším. Dávka 5 mg/kg, $n=5-6$. Data jsou uvedena jako průměr \pm SEM a byla analyzována metodou one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ oproti kontrolní skupině.



Obr. 2 Závislost orexigenního účinku analogu č. 4 na dávce. SC podání sytým myším v dávkách 0.2-10 mg/kg, $n = 5-6$. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM a byla analyzována metodou one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem. *** $P<0.001$ oproti kontrolní skupině.

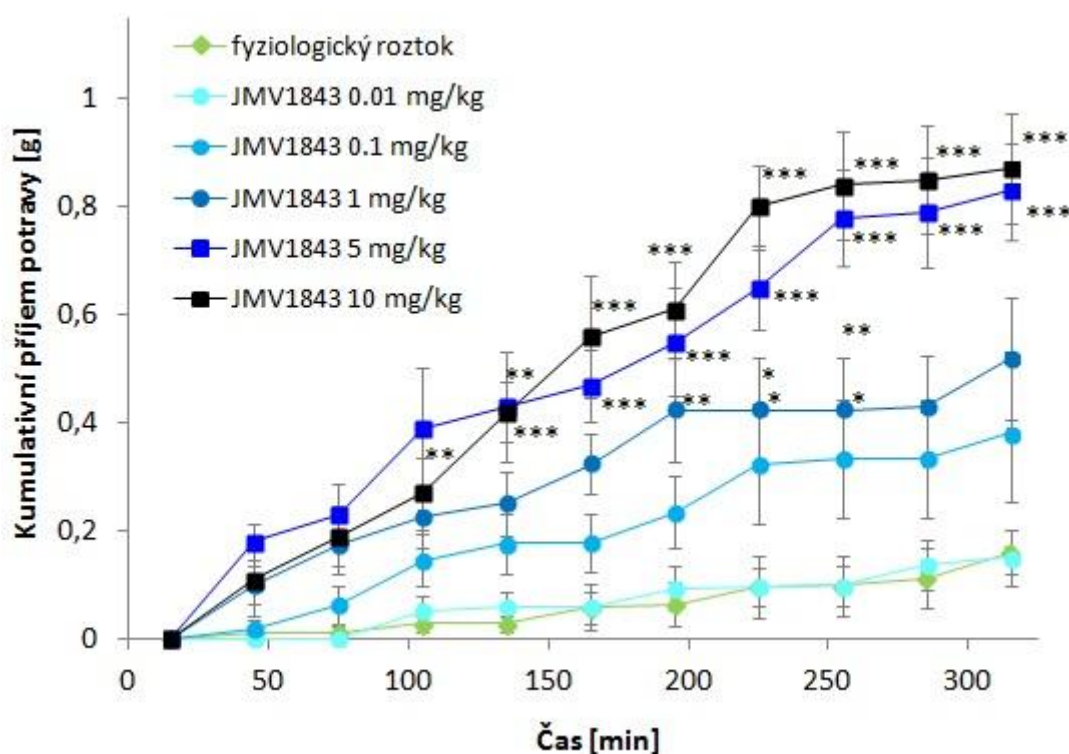
Pseudopeptidový agonista GHS-R1a JMV1843

Výsledky uvedené v této kapitole již byly publikovány (Holubová *et al.* 2013).

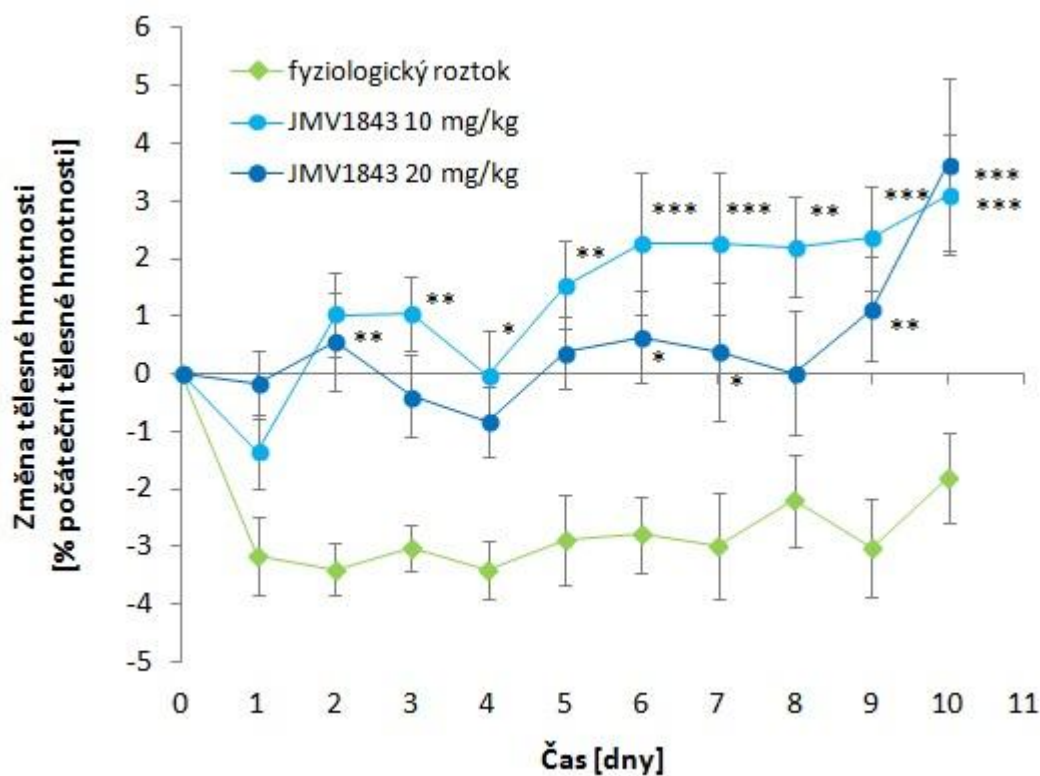
JMV1843 zvyšoval příjem potravy v závislosti na dávce, hodnota ED₅₀ v čase 250 min po podání JMV1843 byla 1.94 mg/kg. Dávky 5 a 10 mg/kg způsobily více než pětinasobný nárůst příjmu potravy oproti kontrolní skupině, jíž byl podáván fyziologický roztok (obr. 3).

JMV1843 vykazoval dobrou stabilitu *in vitro*; při inkubaci v myším krevním séru při teplotě 37 °C zůstávala jeho koncentrace po dobu 24 hodin prakticky nezměněna a na polovinu původní hodnoty poklesla přibližně po 60 hodinách.

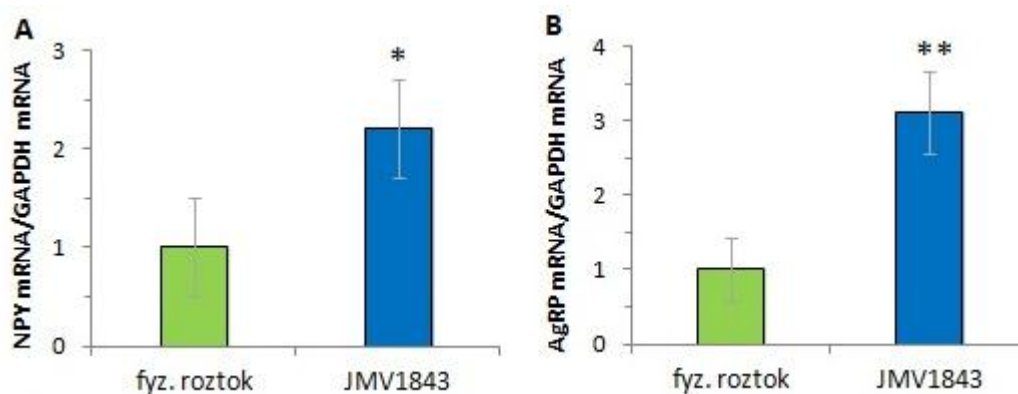
Desetidenní podávání JMV1843 způsobilo v obou testovaných dávkách (10 a 20 mg/kg/den) zvýšení příjmu potravy a tělesné hmotnosti (obr. 4). 10-denní podávání JMV1843 v dávce 20 mg/kg/den vedlo ke zvýšení hladiny krevní glukózy. Hladiny cirkulujícího leptinu a obsah tukové tkáně byly po podávání dávky 20 mg/kg/den nevýznamně zvýšeny. Působením opakovaného podávání JMV1843 v dávce 20 mg/kg/den došlo k signifikantnímu zvýšení exprese mRNA pro orexigenní peptidy NPY a AgRP v mediobazálním hypothalamu (obr. 5) a snížení exprese mRNA pro UCP-1 v hnědé tukové tkáni.



Obr. 3 Závislost akutního orexigenního účinku JMV1843 na dávce. SC podání sytým myším v dávkách 0.01-10 mg/kg, $n = 5-6$. Data jsou uvedena jako průměr \pm SEM a byla analyzována metodou one-way ANOVA s následným Dunnettovým post-hoc testem. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ oproti kontrolní skupině.



Obr. 4 Účinek JMV1843 na tělesnou hmotnost po 10-denním SC podávání štíhlým myším C57BL/6. Dávky 10 a 20 mg/kg/den, $n = 10$. Přírůstek tělesné hmotnosti je vyjádřen v % počáteční hmotnosti. Data jsou uvedena jako průměr \pm SEM a byla analyzována metodou two-way ANOVA následovanou Bonferroniho post-hoc testem. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.001$ oproti kontrolní skupině.**



Obr. 5 Expres mRNA v mediobazálním hypothalamu po 10-denním periferním podávání JMV1843 myším. Dávka 20 mg/kg/den, $n = 10$. A) Expres NPY. B) Expres AgRP. Data byla normalizována vzhledem k expresi GAPDH a analyzována pomocí nepárového t-testu. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ oproti kontrolní skupině.

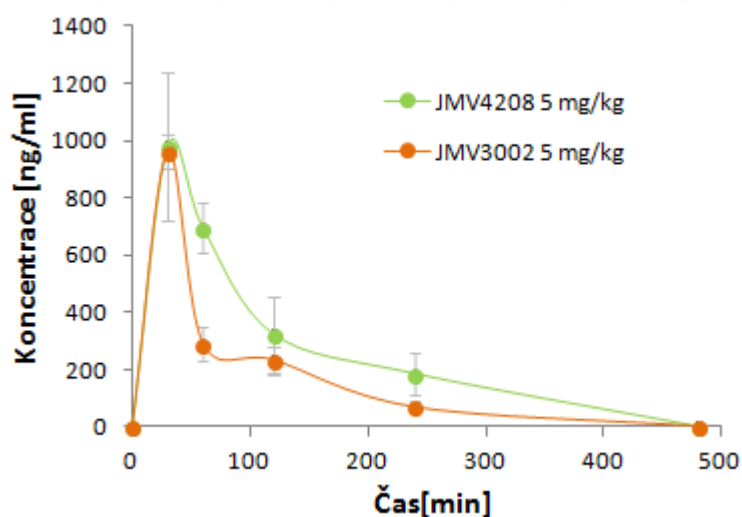
Neptidoví antagonisté GHS-R1a JMV3002 a JMV4208

Výsledky uvedené v této kapitole již byly publikovány (Holubová *et al.* 2014).

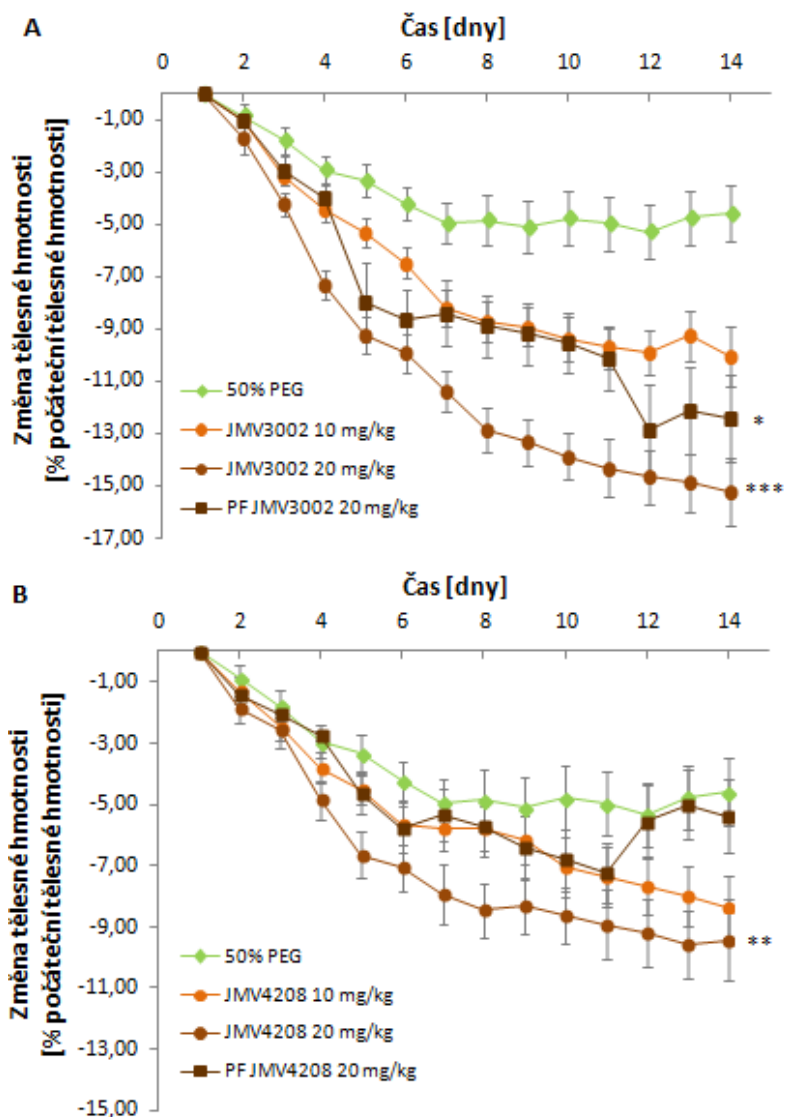
Antagonisté GHS-R1a JMV3002 a JMV4208 po SC podání štíhlým hladovým myším dávkově závisle snižovali příjem potravy oproti kontrolní skupině, již byl podáván 50% PEG; statisticky významný účinek byl pozorován od dávky 5 mg/kg. Hodnota ED₅₀ byla stanovena na 2.05 mg/kg pro JMV3002 a 5.25 mg/kg pro JMV4208.

Obě testované sloučeniny dosáhly maximální koncentrace v krvi 30 minut po SC podání myším a byly zcela eliminovány z krevního oběhu v průběhu 8 hodin po podání. Biologický poločas JMV3002 byl 60 min a poločas JMV4208 byl 90 min, přičemž v intervalu od 2 do 8 hodin po podání koncentrace obou sloučenin v krvi pomalu klesala (obr. 6)

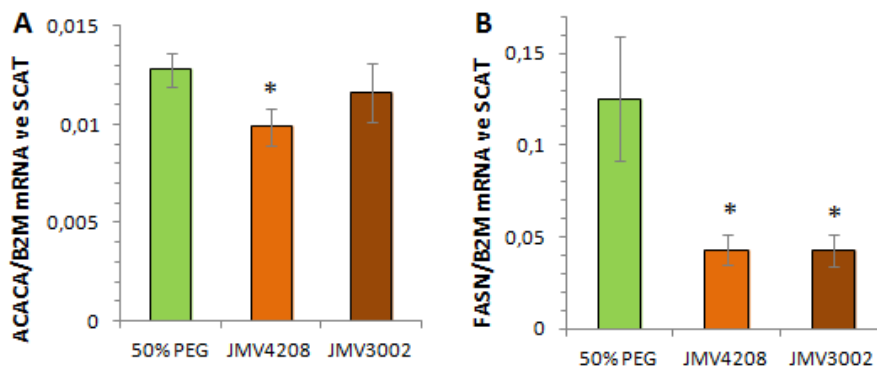
Průměrná tělesná hmotnost obézních DIO myší byla po 14-denním podávání antagonistů snížena o 15 % původní hmotnosti po podávání 20 mg/kg JMV3002 a o 10 % původní hmotnosti po podávání 20 mg/kg JMV4208. Hmotnostní úbytek párově krměných myší byl mírnější než úbytek po podávání testovaných látek (obr. 7). Dlouhodobé podávání JMV3002 a JMV4208 vedlo k redukci obsahu tukové tkáně, k souvisejícímu snížení hladin cirkulujícího leptinu a také snížení hmotnosti jater. Hladiny plazmatického inzulínu, glukózy, adiponektinu a triglyceridů byly nevýznamně sníženy. Obě testované sloučeniny v dávce 20 mg/kg způsobily po dlouhodobém podávání snížení exprese POMC v mediobazálním hypothalamu. Dlouhodobé podávání JMV3002 a JMV4208 v dávce 20 mg/kg vedlo ke statisticky významnému snížení exprese lipogenetických enzymů v tukové tkáni (obr. 8).



Obr. 6 Degradační profil JMV3002 a JMV4208 v myší krevní plazmě po jednorázovém SC podání štíhlým myším kmene C57BL/6. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, n = 3 myši na skupinu.



Obr. 7 Účinek JMV3002 (A) a JMV4208 (B) na tělesnou hmotnost po 14-denním SC podávání DIO myším v dávkách 10 a 20 mg/kg. Úbytek hmotnosti je vyjádřen v % počáteční tělesné hmotnosti. Data jsou uvedena jako průměr \pm SEM a byla analyzována metodou one-way ANOVA následovanou Dunnettovým post-hoc testem. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ oproti kontrolní skupině.



Obr. 8 Expresse lipolytických enzymů ACACA a FASN ve SCAT po 14-denním SC podávání JMV3002 a JMV4208 DIO myším. Data byla analyzována pomocí nepárového t-testu. * $P < 0.05$

5. DISKUZE

V první části práce bylo ukázáno, že většina testovaných peptidových analogů ghrelinu s obměněným aminokyselinovým složením a záměnou mastné kyseliny významně zvyšuje příjem potravy, přičemž jejich účinek je výraznější a déletrvající ve srovnání s ghrelinem či [Dpr³]ghrelinem. To pravděpodobně souvisí zejména se zvýšenou stabilitou - endogenní ghrelin je v krvi degradován během několika desítek minut (De Vriese *et al.* 2004; Akamizu & Kangawa 2006). Začlenění nekódových aminokyselin do peptidového řetězce zvyšuje odolnost vůči proteázám. Lipidizace peptidů, jedna ze současných strategií používaných při návrhu peptidových léčiv, umožňuje zvýšit stabilitu a biologický poločas peptidu a také zlepšit jeho průchod přes hematoencefalickou bariéru (Bellmann-Sickert & Beck-Sickinger 2010; Malavolta & Cabral 2011). Lze předpokládat, že podobně může fungovat i prodloužení mastné kyseliny v molekule ghrelinu. Nejvýraznější orexigenní účinek byl pozorován po podání analogů ghrelinu s fenylalaninem, cyklohexylalaninem, dichlorofenylalaninem nebo naftylalaninem v pozici 4 a prodlouženou mastnou kyselinou (zejména dekanovou či myristovou). Další prodlužování řetězce již pravděpodobně k nárůstu účinku nepřispívá. Mírnější nárůst účinku způsobila také náhrada oktanoylu nenasycenými mastnými kyselinami či kyselinou bromoktanovou nebo adamantanoctovou. Výrazný orexigenní účinek byl pozorován i po podání analogů se dvěma mastnými kyselinami, ať už se jednalo o analogy vycházející z plného či zkráceného řetězce ghrelinu. Z uvedených výsledků vyplývá, že testované syntetické peptidové analogy ghrelinu jsou účinnými a stabilními agonisty GHS R1a s prodlouženým trváním účinku. Nejúčinnější z analogů budou v blízké budoucnosti použity pro dlouhodobé testování *in vivo* na zvířecích modelech kachexie (např. na modelu kachexie vyvolané opakovaným podáváním bakteriálního toxinu lipopolysacharidu myším, nebo na potkaních modelech kachexie vyvolané 5/6 nefrektomií).

Ve druhé části práce bylo ukázáno, že 10-denní opakované subkutánní podávání JMV1843 štíhlým myším samcům vede ke zvýšení příjmu potravy a tělesné hmotnosti. Účinek na nárůst hmotnosti trval po celou dobu experimentu, přestože příjem potravy byl významně zvýšen pouze po dobu 7 dnů a poté jeho nárůst mírně poklesl. Toto zjištění je v souladu s předpokladem, že na vzrůstu tělesné hmotnosti vyvolaném účinky ghrelinu se pravděpodobně kromě hyperfagie podílejí také další mechanismy (Kim *et al.* 2004). Chronické podávání ghrelinu štíhlým myším vede ke snížení exprese termogenního UCP-1 v hnědé tukové tkáni (Tsubone *et al.* 2005). Jak bylo zmíněno, desetidenní podávání JMV1843 způsobuje statisticky významné snížení exprese UCP-1 v hnědé tukové tkáni

obdobně jako ghrelin. To napovídá, že k popsanému nárůstu tělesné hmotnosti mohla přispět také redukce energetického výdeje. K analýze mechanismu orexigenního účinku dlouhodobě podávaného JMV1843 jsme studovali změny exprese mRNA pro orexigenní neuropeptidy NPY a AgRP v mediobazálním hypothalamu. Jak centrální, tak periferní chronické podávání ghrelinu vede ke zvýšení exprese NPY a AgRP v hypothalamu, což naznačuje, že neurony exprimující NPY a AgRP jsou primárním cílem ghrelinu v hypothalamu a zprostředkovávají jeho orexigenní účinek (Kamegai *et al.* 2001; Chen *et al.* 2004). Zjistili jsme, že chronické podávání JMV1843 rovněž zvyšuje hladiny mRNA pro NPY a AgRP v hypothalamu, z čehož lze usoudit, že mechanismus účinku JMV1843 na příjem potravy je podobný popsanému mechanismu účinku ghrelinu. NPY a AgRP také snižují termogenezi prostřednictvím redukce produkce UCP-1 v hnědé tukové tkáni (Billington *et al.* 1994; Small *et al.* 2001). Je tedy pravděpodobné, že účinek JMV1843 na expresi UCP-1 v hnědé tukové tkáni může být zprostředkován stimulací NPY/AgRP neuronů v hypothalamu.

Ve třetí části práce bylo zjištěno, že 14-denní SC podávání JMV3002 a JMV4208 DIO myším vede ke statisticky významnému snížení příjmu potravy a tělesné hmotnosti myší, a to o až o 15 % původní hmotnosti. Redukce hmotnosti po dlouhodobém podávání JMV3002 a JMV4208 byla dána zejména úbytkem tukové tkáně, který byl provázen poklesem hladin cirkulujícího leptinu. V podkožní ani viscerální tukové tkáni nebyla snížena exprese mRNA pro leptin, což nasvědčuje tomu, že snížená sekrece leptinu je výsledkem sníženého množství tukové tkáně. Zmíněný úbytek tukové tkáně byl nejvýraznějším periferním účinkem testovaných sloučenin; zejména bylo redukováno množství podkožního a perirenálního tuku. Bylo popsáno, že GHS-R1a-deficientní myši mají nižší tělesnou hmotnost z důvodu nižší adipozity (Zigman *et al.* 2005) a podávání ghrelinu naopak u hlodavců vede k nárůstu adipozity (Tschöp *et al.* 2000). Pozorované snížení množství tuku bylo pravděpodobně zprostředkováno sníženou expresí lipogenetických enzymů ACACA a FASN, což je v souladu s pozorováním, že nárůst adipozity způsobený centrálním podáváním ghrelinu je zprostředkován zvýšením exprese ACACA a FASN v adipocytech bílé tukové tkáně (Theander-Carrillo *et al.* 2006).

6. ZÁVĚRY

- Nové peptidové analogy ghrelinu stabilizované nekódovými aminokyselinami a navázáním mastné kyseliny stabilní amidovou vazbou se s vysokou afinitou vázaly k receptoru GHS-R1a a srovnatelně s ghrelinem působily na aktivaci signalizačních drah ghrelinu. Po jednorázovém SC podání myším signifikantně zvyšovaly příjem potravy, a to srovnatelně či více než ghrelin nebo [Dpr³]ghrelin. Jejich účinek byl dlouhotrvající, což lze přičíst zvýšené stabilitě. Testované peptidové analogy ghrelinu jsou tedy účinnými a stabilními agonisty GHS-R1a s prodlouženým trváním účinku. Nejúčinnější z analogů by po otestování v dlouhodobých experimentech na kachektických zvířecích modelech mohly v budoucnu potenciálně najít využití v terapii kachexie či anorexie.
- Pseudopeptidový agonista GHS-R1a JMV1843 zvyšoval příjem potravy po jednorázovém SC podání štíhlým myším; jeho orexigenní účinek byl větší než efekt ghrelinu podaného ve stejné dávce, což je pravděpodobně dáno jeho vyšší stabilitou, prokázanou ve farmakokinetických experimentech *in vitro*. Dlouhodobé podávání JMV1843 štíhlým myším vedlo ke zvýšení příjmu potravy a nárůstu tělesné hmotnosti. Expresie orexigenních neuropeptidů NPY a AgRP v hypothalamu byla po dlouhodobém podávání signifikantně zvýšena, což naznačuje, že mechanismus orexigenního účinku JMV1843 je shodný s mechanismem účinku ghrelinu. Mimoto byla snížena exprese UCP-1 v hnědé tukové tkáni, k pozorovanému nárůstu tělesné hmotnosti tedy pravděpodobně přispěla i redukce energetického výdeje. Tyto výsledky podporují předpoklad, že by JMV1843 mohl být účinným prostředkem pro léčbu kachexie.
- Antagonisté GHS-R1a na bázi trisubstituovaného 1,2,4-triazolu JMV3002 a JMV4208 snižovali po jednorázovém periferním podání štíhlým myším příjem potravy v závislosti na dávce. Obě látky vykazovaly poměrně dobrou stabilitu v krvi *in vivo*. Při dlouhodobém podávání obézním myším s DIO bylo pozorováno snížení příjmu potravy a úbytek tělesné hmotnosti o 15 % po podávání JMV3002, o 10 % po podávání JMV4208. Redukce hmotnosti byla dána zejména úbytkem tukové tkáně, který byl zprostředkován sníženou expresí lipogenetických enzymů ACACA a FASN. Podávání JMV3002 také způsobilo snížení hmotnosti jater. Pokud by se podařilo vyřešit problém s nerozpustností těchto látek, mohly by potenciálně být v budoucnu využity v terapii obezity nebo jiných poruch asociovaných s hyperfagií.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Akamizu T. & Kangawa K. (2006) Translational research on the clinical applications of ghrelin. *Endocr J* 53, 585-91.
- Ashitani J., Matsumoto N. & Nakazato M. (2009) Ghrelin and its therapeutic potential for cachectic patients. *Peptides* 30, 1951-6.
- Bellmann-Sickert K. & Beck-Sickinger A.G. (2010) Peptide drugs to target G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 31, 434-41.
- Billington C.J., Briggs J.E., Harker S., Grace M. & Levine A.S. (1994) Neuropeptide Y in hypothalamic paraventricular nucleus: a center coordinating energy metabolism. *Am J Physiol* 266, R1765-70.
- Chen H.Y., Trumbauer M.E., Chen A.S., Weingarh D.T., Adams J.R., Frazier E.G., Shen Z., Marsh D.J., Feighner S.D., Guan X.M., Ye Z., Nargund R.P., Smith R.G., Van der Ploeg L.H., Howard A.D., MacNeil D.J. & Qian S. (2004) Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 145, 2607-12.
- Chollet C., Meyer K. & Beck-Sickinger A.G. (2009) Ghrelin--a novel generation of anti-obesity drug: design, pharmacomodulation and biological activity of ghrelin analogues. *J Pept Sci* 15, 711-30.
- Cummings D.E., Purnell J.Q., Frayo R.S., Schmidova K., Wisse B.E. & Weigle D.S. (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714-9.
- Cummings D.E., Weigle D.S., Frayo R.S., Breen P.A., Ma M.K., Dellinger E.P. & Purnell J.Q. (2002) Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 346, 1623-30.
- De Vriese C., Gregoire F., Lema-Kisoka R., Waelbroeck M., Robberecht P. & Delporte C. (2004) Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 145, 4997-5005.
- DeBoer M.D. (2011) Ghrelin and cachexia: will treatment with GHSR-1a agonists make a difference for patients suffering from chronic wasting syndromes? *Mol Cell Endocrinol* 340, 97-105.
- Delporte C. (2013) Structure and Physiological Actions of Ghrelin. *Scientifica (Cairo)* 2013, 518909.
- Demange L., Boeglin D., Moulin A., Mousseaux D., Ryan J., Bergé G., Gagne D., Heitz A., Perrissoud D., Locatelli V., Torsello A., Galleyrand J.C., Fehrentz J.A. & Martinez J. (2007) Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations of novel triazole derivatives as ligands of the ghrelin receptor. 1. *J Med Chem* 50, 1939-57.
- Depoortere I. (2009) Targeting the ghrelin receptor to regulate food intake. *Regul Pept* 156, 13-23.
- Guillory B., Splenser A. & Garcia J. (2013) The role of ghrelin in anorexia-cachexia syndromes. *Vitam Horm* 92, 61-106.
- Harrold J.A., Dovey T.M., Blundell J.E. & Halford J.C. (2012) CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology* 63, 3-17.
- Holubová M., Spolcová A., Demianová Z., Sýkora D., Fehrentz J.A., Martinez J., Stofková A., Jurčovičová J., Drápalová J., Lacinová Z., Haluzík M., Zelezná B. & Maletínská L.

- (2013) Ghrelin agonist JMV 1843 increases food intake, body weight and expression of orexigenic neuropeptides in mice. *Physiol Res* 62, 435-44.
- Holubová M., Nagelová V., Lacinová Z., Haluzík M., Sýkora D., Moulin A., Blayo A.L., Fehrentz J.A., Martinez J., Štofková A., Jurčovičová J., Železná B., Maletínská L. (2014) Triazole GHS-R1a antagonists JMV4208 and JMV3002 attenuate food intake, body weight, and adipose tissue mass in mice. *Mol Cell Endocrinol*, DOI: 10.1016/j.mce.2014.06.003 (In Press).
- Kamegai J., Tamura H., Shimizu T., Ishii S., Sugihara H. & Wakabayashi I. (2001) Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50, 2438-43.
- Kim M.S., Namkoong C., Kim H.S., Jang P.G., Kim Pak Y.M., Katakami H., Park J.Y. & Lee K.U. (2004) Chronic central administration of ghrelin reverses the effects of leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28, 1264-71.
- Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H. & Kangawa K. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-60.
- Kojima M. & Kangawa K. (2005) Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 85, 495-522.
- Kopecký J., Hodný Z., Rossmeisl M., Srovný I. & Kozak L.P. (1996) Reduction of dietary obesity in aP2-Ucp transgenic mice: physiology and adipose tissue distribution. *Am J Physiol* 270, E768-75.
- Malavolta L. & Cabral F.R. (2011) Peptides: important tools for the treatment of central nervous system disorders. *Neuropeptides* 45, 309-16.
- Maletínská L., Pýchová M., Holubová M., Blechová M., Demianová Z., Elbert T. & Železná B. (2012) Characterization of new stable ghrelin analogs with prolonged orexigenic potency. *J Pharmacol Exp Ther* 340, 781-6.
- Moulin A., Demange L., Ryan J., Mousseaux D., Sanchez P., Bergé G., Gagne D., Perrissoud D., Locatelli V., Torsello A., Galleyrand J.C., Fehrentz J.A. & Martinez J. (2008) New trisubstituted 1,2,4-triazole derivatives as potent ghrelin receptor antagonists. 3. Synthesis and pharmacological in vitro and in vivo evaluations. *J Med Chem* 51, 689-93.
- Muccioli G., Ghè C., Ghigo M.C., Papotti M., Arvat E., Boghen M.F., Nilsson M.H., Deghenghi R., Ong H. & Ghigo E. (1998) Specific receptors for synthetic GH secretagogues in the human brain and pituitary gland. *J Endocrinol* 157, 99-106.
- Nakazato M., Murakami N., Date Y., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K. & Matsukura S. (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 194-8.
- Salomé N., Haage D., Perrissoud D., Moulin A., Demange L., Egecioglu E., Fehrentz J.A., Martinez J. & Dickson S.L. (2009a) Anorexigenic and electrophysiological actions of novel ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonists in rats. *Eur J Pharmacol* 612, 167-73.
- Salomé N., Hansson C., Taube M., Gustafsson-Ericson L., Egecioglu E., Karlsson-Lindahl L., Fehrentz J.A., Martinez J., Perrissoud D. & Dickson S.L. (2009b) On the central mechanism underlying ghrelin's chronic pro-obesity effects in rats: new insights from studies exploiting a potent ghrelin receptor (GHS-R1A) antagonist. *J Neuroendocrinol*.
- Sam A.H., Troke R.C., Tan T.M. & Bewick G.A. (2012) The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology* 63, 46-56.

- Scerif M., Goldstone A.P. & Korbonits M. (2011) Ghrelin in obesity and endocrine diseases. *Mol Cell Endocrinol* 340, 15-25.
- Shiia T., Nakazato M., Mizuta M., Date Y., Mondal M.S., Tanaka M., Nozoe S., Hosoda H., Kangawa K. & Matsukura S. (2002) Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 240-4.
- Small C.J., Kim M.S., Stanley S.A., Mitchell J.R., Murphy K., Morgan D.G., Ghatel M.A. & Bloom S.R. (2001) Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes* 50, 248-54.
- Theander-Carrillo C., Wiedmer P., Cettour-Rose P., Nogueiras R., Perez-Tilve D., Pfluger P., Castaneda T.R., Muzzin P., Schürmann A., Szanto I., Tschöp M.H. & Rohner-Jeanrenaud F. (2006) Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest* 116, 1983-93.
- Tschöp M., Smiley D.L. & Heiman M.L. (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908-13.
- Tschöp M., Wawarta R., Riepl R.L., Friedrich S., Bidlingmaier M., Landgraf R. & Folwaczny C. (2001) Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 24, RC19-21.
- Tsubone T., Masaki T., Katsuragi I., Tanaka K., Kakuma T. & Yoshimatsu H. (2005) Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice. *Regul Pept* 130, 97-103.
- Wren A.M., Seal L.J., Cohen M.A., Brynes A.E., Frost G.S., Murphy K.G., Dhillon W.S., Ghatel M.A. & Bloom S.R. (2001a) Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5992.
- Wren A.M., Small C.J., Abbott C.R., Dhillon W.S., Seal L.J., Cohen M.A., Batterham R.L., Taheri S., Stanley S.A., Ghatel M.A. & Bloom S.R. (2001b) Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50, 2540-7.
- Yin Y., Li Y. & Zhang W. (2014) The growth hormone secretagogue receptor: its intracellular signaling and regulation. *Int J Mol Sci* 15, 4837-55.
- Zigman J.M., Nakano Y., Coppari R., Balthasar N., Marcus J.N., Lee C.E., Jones J.E., Deysher A.E., Waxman A.R., White R.D., Williams T.D., Lachey J.L., Seeley R.J., Lowell B.B. & Elmquist J.K. (2005) Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest* 115, 3564-72.

8. SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Publikace týkající se tématu dizertační práce (s IF):

1. Pirník Z., Bundzíková J., **Holubová M.**, Pýchová M., Fehrentz J.A., Martinez J., Železná B., Maletínská L., Kiss A. (2011) Ghrelin agonists impact on Fos protein expression in brain areas related to food intake regulation in male C57BL/6 mice. *Neurochem Int* 59(6), 889-95. **IF = 2.659.**
2. Maletínská L., Pýchová M., **Holubová M.**, Blechová M., Demianová Z., Elbert T., Železná B. (2012) Characterization of new stable ghrelin analogs with prolonged orexigenic potency. *J Pharmacol Exp Ther* 340(3), 781-6. **IF = 3.891.**
3. **Holubová M.**, Špolcová A., Demianová Z., Sýkora D., Fehrentz J.A., Martinez J., Štofková A., Jurčovičová J., Drápalová J., Lacinová Z., Haluzík M., Železná B., Maletínská L. (2013) Ghrelin agonist JMV 1843 increases food intake, body weight and expression of orexigenic neuropeptides in mice. *Physiol Res* 62(4), 435-44. **IF = 1.531.**
4. **Holubová M.**, Nagelová V., Lacinová Z., Haluzík M., Sýkora D., Moulin A., Blayo A.L., Fehrentz J.A., Martinez J., Štofková A., Jurčovičová J., Železná B., Maletínská L. (2014) Triazole GHS-R1a antagonists JMV4208 and JMV3002 attenuate food intake, body weight, and adipose tissue mass in mice. *Mol Cell Endocrinol*, DOI: 10.1016/j.mce.2014.06.003 (In Press). **IF = 4.039.**
5. Pirník Z., Majerčíková Z., **Holubová M.**, Pirník R., Železná B., Maletínská L., Kiss A. (2014) Effect of ghrelin receptor agonist and antagonist on the activity of arcuate nucleus tyrosine hydroxylase containing neurons in C57BL/6 male mice exposed to normal or high fat diet. *J Physiol Pharmacol* 65(4) (In Press). **IF = 2.476.**

Publikace týkající se jiných témat (s IF):

1. Špolcová A., **Holubová M.**, Mikulášková B., Nagelová V., Štofková A., Lacinová Z., Jurčovičová J., Haluzík M., Maletínská L., Železná B. (2014) Changes in FGF21 serum concentrations and liver mRNA expression in an experimental model of complete lipodystrophy and insulin-resistant diabetes. *Physiol Res* 2014 (In Press). **IF = 1.531.**

Patenty:

PV 2014-429 (Dlouhodobě působící stabilní analogy ghrelinu k léčbě kachexie)

Maletínská L., Železná B., Kuneš J., **Holubová M.**, Zemenová J.

Patentová přihláška podána v červnu 2014.