

# Ipamorelin - struktura i funkcija

---

**Papak, Matej**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:517683>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-19**



image not found or type unknown

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Matej Papak

Ipamorelin – struktura i funkcija

završni rad

Osijek, 2016.

**SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE**

**Završni rad**  
**Ipamorelin – struktura i funkcija**

Biokemija

Predmetni nastavnik: izv. prof. dr. sc. Ivica Strelec

---

Student/ica: Matej Papak (MB: 3639/12)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivica Strelec

Predano (datum):

Pregledano (datum):

---

**Ocjena:**

**Potpis mentora:**

---

## **Ipamorelin – struktura i funkcija**

### **SAŽETAK**

Ipamorelin je sintetski pentapeptid, 2-metilalanil-L-histidil-3-(2-naftil)-D-alanil-D-fenilalanil-L-lizinamid koji pripada skupini peptida-poticatelja izlučivanja hormona rasta, tzv. sekretagoga. Zbog toga bi se mogao koristiti u regeneraciji različitih tkiva nakon ozljeda, ili općenitih pojava neuravnoteženosti organizma. Međutim, bitno je za naglasiti da se ipamorelin za sada nalazi na listi zabranjenih supstanci Svjetske antidopinške organizacije. U ovom završnom radu prikazat će se dosadašnja saznanja o učincima ipamorelina, te najnovije spoznaje o detekciji ove nedozvoljene supstance u urinu sportaša.

**Ključne riječi:** ipamorelin, fiziološki učinak, sekretagog hormona rasta, detekcija u urinu

# Ipamorelin – Structure and Function

## SUMMARY

Ipamorelin is a synthetic penta-peptide, 2-methylalanyl-L-histidyl-3-(2-naphthyl)-D-alanyl-D-phenylalanyl-L-lysine which belongs to the group of growth hormone releasing peptides (secretagogues). Therefore it could be used for regeneration of couple of body tissues after any injury, or the general imbalance of the body. However, it should be mentioned, that ipamorelin is still included in the Prohibited List of doping substances of World Anti-Doping Agency. The aim of this undergraduate thesis is to give an overview of ipamorelin effects on various tissues of model animals. In addition, novel method of detection of this doping substances in the urine of athletes will be ascribed.

**Keywords:** ipamorelin, physiological effect, growth hormone secretagogue, detection in urine

# SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Ipamorelin	2
2.2. Molekularni mehanizam djelovanja GHRP	2
2.3. Fiziološki učinci ipamorelina	4
2.3.1. Ipamorelin potiče izlučivanje i biosintezu hormona rasta	4
2.3.2. Ipamorelin potiče longitudinalni rast kostiju	7
2.3.3. Ipamorelin suprimira negativne učinke dugotrajnog izlaganja glukokortikoidima	8
2.3.4. Ipamorelin potiče peristaltiku želuca i tankog crijeva	9
2.4. Detekcija ipamorelina u urinu sportaša	11
3. ZAKLJUČAK	14
4. LITERATURA	15

# 1. UVOD

Unazad dvadesetak godina, osim već poznatih hormona koji potiču izlučivanje hormona rasta (GHRH, eng. *Growth Hormone Releasing Hormones*), otkriveno je da i drugi spojevi mogu uzrokovati povišenje hormona rasta u krvi te djelovati kao tzv. sekretagogi. Radi se o porodici sinttskih peptida predestavljenih kao GHRP (eng. *Growth Hormone Releasing Peptides*). Uz ove dvije skupine spojeva, na razinu hormona rasta u krvi utječe i hormon somatostatin, inhibirajući njegovo lučenje (Anderson i sur., 2005.; Raun i sur., 1998.).

Budući da hormon rasta nema neki ciljni organ, već svoje djelovanje proteže na sva tkiva u tijelu regulirajući procese rasta, njegova je važnost neopisiva. Time ujedno jača i odgovornost uporabe sintetskih GHRP budući da reguliraju razinu hormona rasta. Naime, sintetski GHRP poput GHRP-1, GHRP-2 (pralmorelina), GHRP-4, GHRP-5, GHRP-6, hexarelina, alexamorelina te ipamorelina su skupina sekretagoga hormona rasta koji djeluju slično hormonu koji potiče izlučivanje hormona rasta (GHRH), podižući razinu hormona rasta u krvnoj plazmi na fiziološki prihvatljiviji način, točnije u vidu pulseva. Među njima se po svojim pozitivnim svojstvima ističe ipamorelin (Raun i sur., 1998.).

Dosadašnje spoznaje o fiziološkim učincima potkožne (supkutane) ili intravenozne administracije ipamorelina na pokusne životinje ili izloženosti kultura stanica tkiva ipamorelinu, upućuju da ipamorelin potiče somatotropne stanice adenohipofize na izlučivanje hormona rasta i njegovu biosintezu (Jiménez-Reina i sur., 2002.; Raun i sur., 1998.; Johansen i sur., 1999.), da ima blagotvorno djelovanje po koštano i mišićno tkivo sprječavajući negativne učinke dugotrajnog izlaganja organizma glukokortikoidima (Andersen i sur., 2001.), da potiče longitudinalni rast kostiju (Johansen i sur., 1999.), te pojačava peristaltiku želudca i tankog crijeva (Greenwood-Van Meerveld i sur., 2012.).

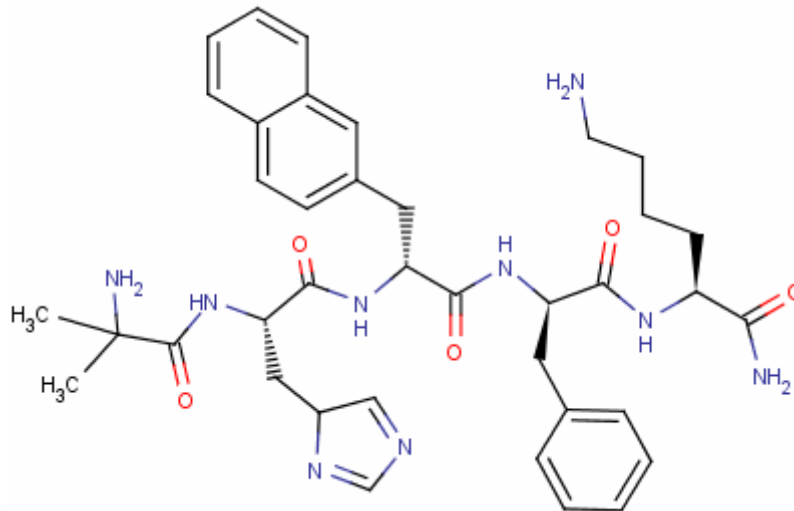
Međutim, ključno je za naglasiti da se ipamorelin nalazi na listi zabranjenih supstanci od strane Svjetske antidopinške organizacije (WADA; eng. *World Anti-Doping Agency*) te kao takav svoju primjenu trenutno ne pronalazi u svijetu sporta, osim u slučaju dopinga (Semenistaya i sur., 2015.).

Cilj ovoga rada je prikazati dosadašnja saznanja o fiziološkim učincima ipamorelina koje su u zadnjih dvadesetak godina ugledale svjetlo u svijetu životinjskih modela. Nadalje, u zadnjem dijelu rada prikazat će se trenutačne spoznaje o testiranju prisustva ove nedozvoljene supstance u urinu sportaša.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Ipamorelin

Molekulske formule  $C_{38}H_{49}N_9O_5$ , ipamorelin je sintetski pentapeptid 2-metilalanil-L-histidil-3-(2-naftil)-D-alanil-D-fenilalanil-L-lizinamid (**Slika 1**).



**Slika 1.** Strukturna formula ipamorelina (Raun i sur., 1998.)

Spada u skupinu sintetskih peptida koji potiču lučenje hormona rasta iz somatotropnih stanica prednjeg režnja hipofize (Jiménez-Reina i sur., 2002.).

Uz ipamorelin, najznačajniji sintetski peptidi-sekretagogi hormona rasta su: GHRP-1, GHRP-2 (palmorelin), GHRP-4, GHRP-5, GHRP-6, hexarelin i alexamorelin (Semenistaya i sur., 2015.; Ferro i sur., 2016.). Svi sekretagogi hormona rasta vežu se na specifični receptor u staničnoj membrani (GHSR, eng. *Growth Hormone Secretagogue Receptor*) stanica prednjeg režnja hipofize (adenohipofize) i potiču izlučivanje hormona rasta (Anderson i sur., 2005.).

### 2.2. Molekularni mehanizam djelovanja GHRP

Molekularni mehanizam koji vezanjem sintetskih GHRP za specifični receptor u staničnoj membrani stanica adenohipofize dovodi do otpuštanja hormona rasta, nešto se razlikuje od mehanizma uzrokovanog vezanjem GHRH. Glavni razlog tomu leži u činjenici da se GHRH veže na svoj specifični receptor, dok se sintetski GHRP vežu na posebnu podvrstu receptora zvanih grelinskim receptorima (GHS-R1a; eng. *Growth Hormone Secretagogue*



*Receptor 1a*). U oba slučaja radi se o receptorima koji unutarstaničnu signalizaciju započinju posredstvom G-veznih proteina (Anderson i sur., 2005.; Semenistaya i sur., 2015.; Yin i sur., 2014.).

Naime, vezanjem signalne molekule (GHRH ili GHRP) na receptor, receptor blago mijenja konformaciju, što slijedno dovodi i do promjene konformacije trimernog G-proteina vezanog uz receptor. To uzrokuje da  $G_{\alpha}$ -podjedinica G-proteina otpusti gvanozin-difosfat i veže gvanozin-trifosfat. Uslijed toga,  $G_{\alpha}$ -podjedinica disocira s trimernog G-proteina i veže se za specifični enzim kojeg aktivira (Strelec, 2016.; Yin i sur., 2014.).

U slučaju GHRH aktivira se enzim adenilat-ciklaza koja prevodi adenozin-trifosfat u ciklički adenozin-monofosfat (cAMP) koji djeluje kao drugi (sekundarni) glasnik u stanici, a u slučaju GHRP aktivira se enzim fosfolipaza C (PLC) koja cijepa membranske fosfolipide koji sadrže inozitol-4,5-difosfatnu skupinu u inozitol-1,4,5-trifosfat ( $IP_3$ ) i diacil-glicerol (DAG) pri čemu oba djeluju kao drugi glasnici (Yin i sur., 2014.; Strelac, 2016).

Nastali drugi glasnici, cAMP,  $IP_3$  i DAG, provode daljnju unutarstaničnu signalizaciju. Ciklički AMP se veže za inhibitorne podjedinice enzima protein-kinaze A (PKA), koje zbog vezanja cAMP disociraju sa inaktivnog enzima, te PKA prelazi u aktivan oblik fosforilirajući različite proteine u stanici. Inozitol-1,4,5-trifosfat ( $IP_3$ ) oslobođen djelovanjem PLC se veže za kalcijeve kanale u endoplazmatskom retikulumu što utječe na povišenje citoplazmatske koncentracije kalcijevih iona ( $Ca^{2+}$ ). Povišena koncentracija  $Ca^{2+}$  iona u citoplazmi potom djeluje i na protein-kinazu C (PKC), koja blago mijenja konformaciju, veže se za staničnu membranu, gdje se potom aktivira vezanjem DAG. Aktivirana PKC fosforilira kanale za kalij te ih na takav način inhibira. Inhibicija kanala za kalij dovodi do depolarizacije membrane i slijednog otvaranja kalcijevih kanala u staničnoj membrani, što dovodi do dodatno povećane koncentracije kalcijevih iona u citoplazmi stanica (Yin i sur., 2014.; Strelac, 2016).

U oba slučaja, kaskadni slijed unutarstanične signalizacije dovodi do stapanja vezikula koje sadrže hormon rasta sa staničnom membranom i otpuštanja hormona rasta u krvotok. Međutim, istovremeno s otpuštanjem hormona rasta unutarstanična signalizacija dovodi i do pojačane ekspresije gena za hormon rasta, slijedne biosinteze i pohranjivanja u sekretorne vezikule do sljedeće kaskade signala koja će potaknuti otpuštanje hormona rasta iz stanica adenohipofize u krvotok (Anderson i sur., 2005.).

## 2.3. Fiziološki učinci ipamorelina

Dosadašnje spoznaje o fiziološkim učincima potkožne (supkutane) ili intravenozne administracije ipamorelina na pokusne životinje ili izloženosti kultura stanica tkiva ipamorelinu pokazuju da ipamorelin potiče somatotropne stanice adenohipofize na izlučivanje hormona rasta i njegovu biosintezu (Jiménez-Reina i sur., 2002.; Raun i sur., 1998.; Johansen i sur., 1999.), da ima blagotvorno djelovanje po koštano i mišićno tkivo sprječavajući negativne učinke dugotrajnog izlaganja organizma glukokortikoidima (Andersen i sur., 2001.), da potiče longitudinalni rast kostiju (Johansen i sur., 1999.), te pojačava peristaltiku želudca i tankog crijeva (Greenwood-Van Meerveld i sur., 2012.).

Gotovo se svi gore navedeni fiziološki učinci ipamorelina prije svega mogu pripisati učincima hormona rasta, budući ipamorelin potiče njegovo izlučivanje. Naime, opće je poznato da je hormon rasta izuzetno bitan za rast kostiju, oporavak i srašćivanje oštećenih mišića, energetska homeostazu, te metabolizam proteina, šećera, masti i minerala u sisavaca (Anderson i sur., 2005.). Stoga ne začuđuje činjenica da ipamorelin pokazuje blagotvorno djelovanje po koštano i mišićno tkivo (Andersen i sur., 2001.), te da potiče longitudinalni rast kostiju (Johansen i sur., 1999.). Međutim, u slučaju pojačavanja peristaltike želudca i tankog crijeva, fiziološki učinak ipamorelina se dijelom može pripisati njegovu djelovanju kao mimetiku hormona grelina. Naime, poznato je da se ipamorelin veže za grelinske receptore (GHS-R1a), te na neki način može imitirati djelovanje hormona grelina (Anderson i sur., 2005.; Greenwood-Van Meerveld i sur., 2012.; Ferro i sur., 2016.).

Upravo iz gore navedenog, ispitivanja fizioloških učinaka ipamorelina gotovo su uvijek provedena u usporedbi ili sa hormonom rasta, i/ili u usporedbi sa GHRH, a u slučaju ispitivanja peristaltike želudca i tankog crijeva u usporedbi sa hormonom grelinom. Štoviše, kako ipamorelin spada u skupinu sintetskih GHRP vrlo često je njegov učinak uspoređen i sa odabranim sintetskim GHRP.

### 2.3.1. Ipamorelin potiče izlučivanje i biosintezu hormona rasta

Potvrdu da ipamorelin djeluje kao sekretagog hormona rasta, odnosno da potiče izlučivanje hormona rasta iz somatotropnih stanica adenohipofize prvo su pokazala istraživanja Raun i sur. (1998). Naime, autori su ispitujući *in vitro* utjecaj ipamorelina i drugih GHRP na kulturu stanica hipofize štakora pronašli da ipamorelin potiče izlučivanje hormona rasta (Tablica 1). Učinak ipamorelina na 50%-tnu stimulaciju izlučivanja hormona rasta ( $EC_{50}$ ) iz stanica hipofize u *in vitro* uvjetima bio je lošiji od učinka GHRH (oko 5 puta niži), podjednak učinku GHRP-1 i GHRP-2, a bolji od učinka GHRP-6.

**Tablica 1.** Utjecaj GHRP na otpuštanje hormona rasta (Raun i sur., 1998.)

Sekretagog	Struktura	EC <sub>50</sub> (nmol/L)*	E <sub>max</sub> (%)**
GHRP-1	Ala-His-D2-Nal-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	1,1 ± 0,3	80 ± 5
NNC 26-0039***	Ala-His-D2-Nal-----D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	6,5 ± 1,7	105 ± 13
NNC 26-0133***	D-Ala-His-D2-Nal-----D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	15 ± 8	60 ± 8
Ipamorelin	Aib-His-D2-Nal-----D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	1,3 ± 0,4	85 ± 5
GHRP-2	Ala-----D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	1,8 ± 0,5	85 ± 5
GHRP-6	His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	2,2 ± 0,3	100
GHRH		0,26 ± 0,07	126 ± 7

\* EC<sub>50</sub> - koncentracija sekretagoga koja izaziva 50%-tnu stimulaciju otpuštanja hormona rasta

\*\* E<sub>max</sub> - maksimalna koncentracija otpuštenog hormona rasta izražena u %-tku u odnosu na koncentraciju izazvanu djelovanjem GHRP-6 (E<sub>max</sub> za GHRP-6 = 231 ± 51 ng/ml)

\*\*\* NNC 26-0039 i NNC 26-0133 su oznake zaštićenih nosintetiziranih peptida

Dodatnu potvrdu da ipamorelin djeluje kao sekretagog hormona rasta Raun i suradnici su u istom istraživanju pokazali *in vivo* ispitivanjima na svinjama i štakorima nakon intravenozne administracije odabranih GHRP (Tablica 2). Učinak ipamorelina na 50%-tnu stimulaciju izlučivanja hormona rasta (ED<sub>50</sub>) pronađenog u plazmi štakora i svinja bio je lošiji od učinka GHRP-2, a bolji od učinka GHRP-6. Međutim, autori nisu ispitali *in vivo* utjecaj GHRH, tako da se nije mogao usporediti *in vivo* učinak ipamorelina i GHRH.

**Tablica 2.** Utjecaj sekretagoga na razinu hormona rasta u plazmi štakora i svinja (Raun i sur., 1998.)

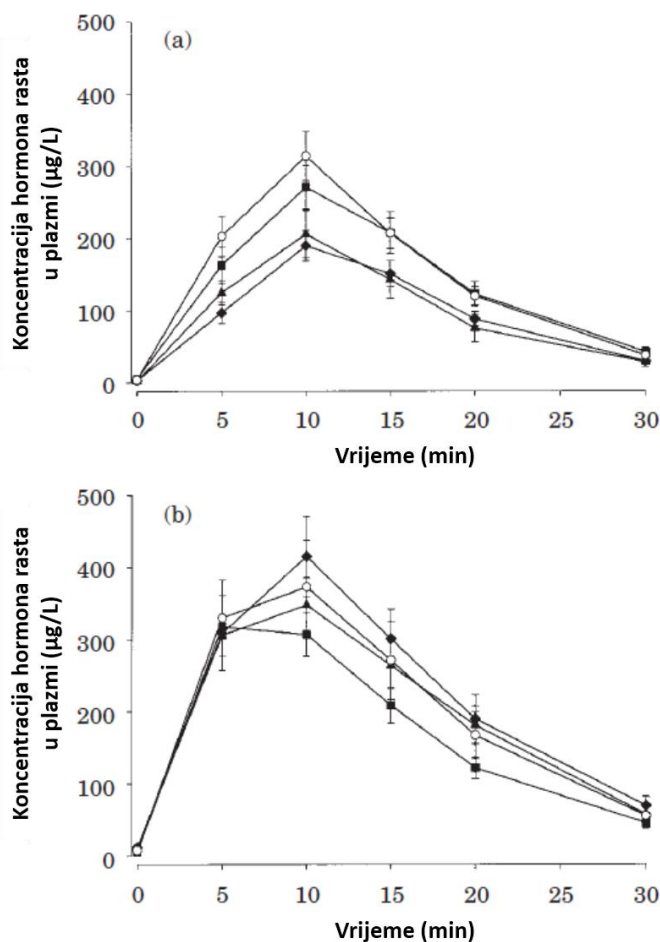
Sekretagog	Štakor		Svinja	
	ED <sub>50</sub> (nmol/kg)*	E <sub>max</sub> (ng/ml)**	ED <sub>50</sub> (nmol/kg)	E <sub>max</sub> (ng/ml)
Ipamorelin	80 ± 42	1545 ± 250	2,3 ± 0,03	65 ± 0,2
NNC 26-0039***	> 4300	0	-	-
NNC 26-0133***	186 ± 126	587 ± 93	-	-
GHRP-2	30 ± 4	1153 ± 31	0,6 ± 0,2	56 ± 6
GHRP-6	115 ± 36	1167 ± 120	3,9 ± 1,4	74 ± 7

\* ED<sub>50</sub> - koncentracija sekretagoga koja izaziva 50%-tnu stimulaciju otpuštanja hormona rasta

\*\* E<sub>max</sub> - maksimalna koncentracija otpuštenog hormona rasta

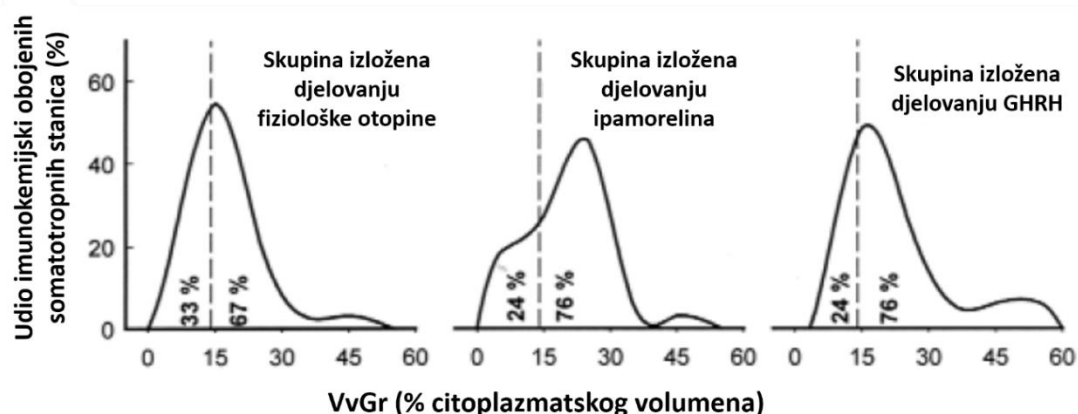
\*\*\* NNC 26-0039 i NNC 26-0133 su oznake zaštićenih nosintetiziranih peptida

*In vivo* učinak ipamorelina i GHRH pokazali su Johansen i suradnici (1999.) koji su pratili utjecaj ipamorelina i GHRH na razinu hormona rasta u plazmi štakora nakon intravenozne administracije različitih koncentracija oba sekretagoga (Slika 2). Uočeno je da ipamorelin pokazuje 35% niži udio hormona rasta u plazmi štakora u odnosu na GHRH. Međutim, kada se uzme u obzir da je GHRH u 15-tom danu dodan u desetorostruko nižoj koncentraciji od ipamorelina, tada se može reći da ipamorelin pokazuje znatno niži učinak na izlučivanje hormona rasta od GHRH pri istoj primijenjenoj masenoj koncentraciji.



**Slika 2.** Koncentracija hormona rasta u plazmi štakora nakon intravenozne administracije a) ipamorelina (100 µg/kg) ili b) GHRH (10 µg/kg). Štakori su prvo uzgajani uz dnevnu potkožnu administraciju ipamorelina ili GHRH od 0-tog do 14-tog dana kako slijedi: 450 µg/dan (◆), 90 µg/dan (■), 18 µg/dan (△), fiziološka otopina sa 0,1% serumskim albuminom štakora – 0 µg/dan (○), a potom su u 15-tom danu izloženi intravenoznoj administraciji (Johansen i sur., 1999.)

Osim što potiče izlučivanje hormona rasta, ipamorelin istovremeno potiče somatotropne stanice adenohipofize na biosintezu hormona rasta, što indirektno pokazuju istraživanja Jiménez-Reina i suradnika (2002.). Autori su ultrastrukturnom analizom imunokemijski obojanih stanica hipofize štakora nakon 21 dana izlaganja živih životinja fiziološkoj otopini, ipamorelinu ili GHRH, ustanovili da je volumna gustoća sekretornih vezikula (koje sadrže hormon rasta) u somatotrofnim stanicama adenohipofize (VvGr; izražena kao %-tak volumena citoplazme) veća u stanicama životinja tretiranih sa ipamorelinom ( $20,89 \pm 1,57$ ) i GHRH ( $23,03 \pm 2,16$ ), nego tretiranih fiziološkom otopinom (16,45) (Slika 3). Time su indirektno dokazali da ipamorelin pokazuje sličan učinak GHRH u poticanju biosinteze hormona rasta.



**Slika 3.** Volumna gustoća sekretornih vezikula (VvGr) u somatotropnim stanicama adenohipofize štakora nakon 21 dan izlaganja živih životinja fiziološkoj otopini, ipamorelinu i GHRH (Jiménez-Reina i sur., 2002.)

### 2.3.2. Ipamorelin potiče longitudinalni rast kostiju

Jedan od ključnih učinaka hormona rasta jest formiranje, rast kostiju i povišenje koštane mase (Andersen i sur., 2001.; Anderson i sur., 2005.). Stoga je kako je već prije navedeno, logično za očekivati da bi ipamorelin mogao imati sličan učinak na rast kostiju kao i hormon rasta, budući da potiče izlučivanje hormona rasta. Da ipamorelin potiče longitudinalni rast kostiju dokazano je u istraživanju Johansen-a i suradnika (1999.).

Navedeni autori su ispitivali longitudinalni rast kostiju štakora tijekom 15 dana rasta uz dnevnu primjenu potkožnih injekcija ipamorelina različitih koncentracija (450, 90, 18 i 0 µg/dan) u rasponu od nultog do petnaestog dana rasta te ustanovili da je longitudinalni rast kostiju ovisan o primijenjenoj koncentraciji ipamorelina (Tablica 3). Primjena ipamorelina pri maksimalnoj koncentraciji od 450 µg/danu dovela je do 24% većeg longitudinalnog rasta kostiju u odnosu na kontrolu, što upućuje na moguću primjenu ipamorelina u liječenju bolesti poremećaja rasta.

**Tablica 3.** Longitudinalni rast kostiju (LRK, µm/dan) u štakora dnevno tretiranih potkožnim injekcijama ipamorelina različitih koncentracija tijekom 15 dana rasta (Johansen i sur., 1999.)

Dani	Ipamorelin µg/dan			
	450	90	18	0
0-6	50	48	41	38
6-13	54	52	46	45
0-13	52	50	44	42
	(24%)*	(19%)*	(5%)*	

\* Postotni porast longitudinalnog rasta kostiju tijekom trinaest dana rasta (0-13 dana) izračunat na odnosu promjenu rasta zabilježenu kod kontrolne skupine (0 µg/danu ipamorelina)

### 2.3.3. Ipamorelin suprimira negativne učinke dugotrajnog izlaganja glukokortikoidima

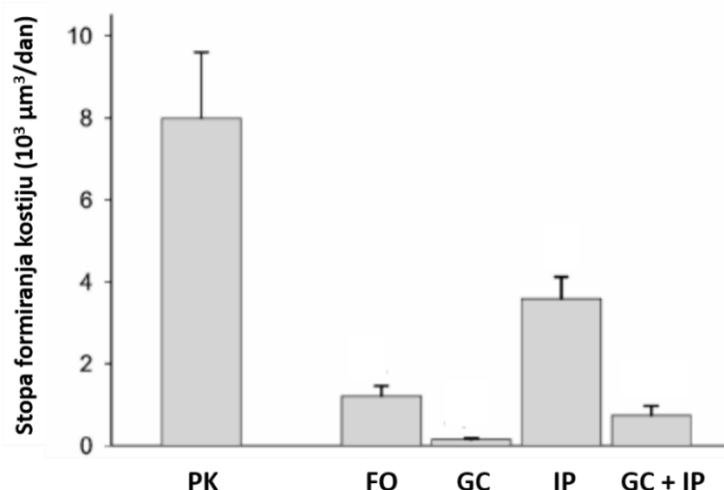
Dugotrajno korištenje glukokortikoida u slučaju određenih bolesti i neravnoteža imunološkog sustava može dovesti do slabljenja mišićne muskulature i skeletnih tkiva, prvenstveno zbog kataboličkog efekta glukokortikoida i njihove supresije izlučivanja hormona rasta. Stoga su Andersen i suradnici (2001.) ispitali potencijal ipamorelina kao poticatelja izlučivanja hormona rasta na supresiju negativnih učinaka dugotrajne izloženosti glukokortikoidima.

Navedeni autori ispitali su utjecaj dnevne izloženosti 8 mjeseci starih štakora tijekom tri mjeseca pokusa fiziološkoj otopini, glukokortikoidnom hormonu (9 mg/kg), ipamorelinu (100 µg/kg), te kombinaciji glukokortikoidnog hormona i ipamorelina u gore navedenim koncentracijama. Administracija gore navedenih supstanci provedena je svaki dan tijekom 3 mjeseca davanjem potkožnih injekcija.

Negativni učinak tromjesečnog djelovanja glukokortikoida uočen je po sniženju tjelesne mase štakora, sniženju suhe bezmasne tvari mišića (Tablica 4), te gotovo potpunom prestanku formiranja kostiju (Slika 4) u odnosu na skupinu tretiranu fiziološkom otopinom, dok je primjena ipamorelina u kombinaciji sa glukokortikoidnim hormonom pokazala djelomičnu supresiju negativnih učinaka glukokortikoidnog hormona.

**Tablica 4.** Utjecaj glukokortikoidnog hormona, ipamorelina i njihove kombinacije na promjenu tjelesne mase te suhe bezmasne tvari mišića štakora (Andresen i sur., 2001.)

Skupina	Tjelesna masa (g)	Suha bezmasna tvar mišića (mg)
Početna kontrola ( <i>0-tli dan ispitivanja</i> )	264 ± 4	364 ± 10
Fiziološka otopina	294 ± 4	363 ± 8
Glukokortikoidni hormon	254 ± 8	295 ± 8
Ipamorelin	313 ± 6	373 ± 8
Glukokortikoidni hormon + ipamorelin	270 ± 6	318 ± 9

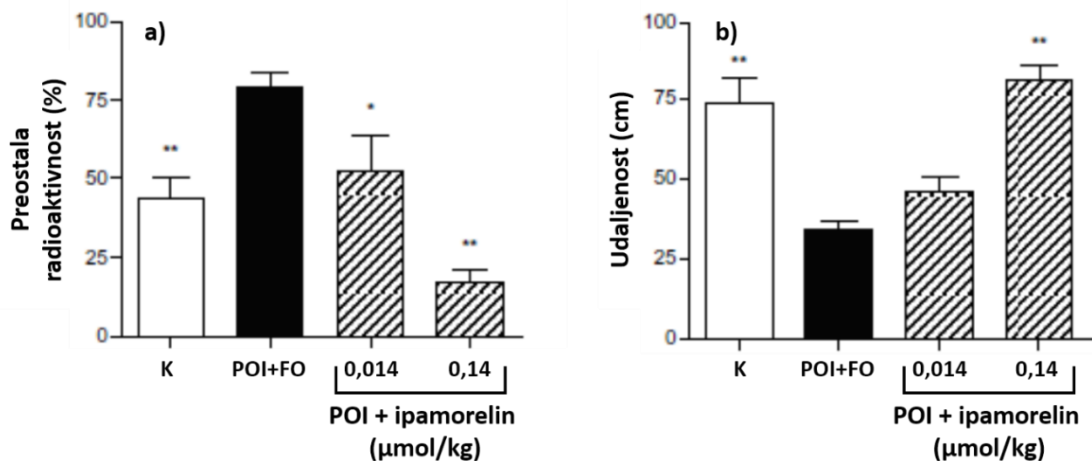


**Slika 4.** Utjecaj glukokortikoidnog hormona, ipamorelina i njihove kombinacije na promjenu stope formiranja kostiju u štakora. Legenda: PK – početna kontrolna točka (0-iti dan ispitivanja); FO – fiziološka otopina; GC – glukokortikoidni hormon; IP – ipamorelin; GC+IP – kombinacija glukokortikoidnog hormona i ipamorelina, (Andersen i sur., 2001.)

Navedeno upućuje na mogućnost primjene ipamorelina u sprječavanju negativnih učinaka izazvanim dugotrajnim korištenjem glukokortikoida tijekom liječenja određenih bolesti. Štoviše, obzirom da razine hormona rasta opadaju kod starijih osoba (osobe starije od 60 godina), što dovodi do sniženja mase mišićnih tkiva, slabljenja kostiju i dugoročno osteoporeze (Andersen i sur., 2001.), čini se da bi primjena ipamorelina mogla dovesti do poboljšanja njihova zdravstvenog stanja.

#### 2.3.4. Ipamorelin potiče peristaltiku želudca i tankog crijeva

Pozitivno djelovanje ipamorelina kao mimetika hormona grelina na poboljšanje peristaltike probavnog sustava pokazuju istraživanja Greenwood-Van Meerveld i suradnika (2012.). Navedeni autori su ispitali utjecaj ipamorelina na poboljšanje peristaltike želudca i crijeva štakora podvrgnutih manipulaciji tankog crijeva čime im je izazvan postoperativni ileus (POI). Naime, postoperativni ileus je privremeni prekid crijevne peristaltike najčešće uzrokovan nakon abdominalnog zahvata, osobito kod manipulacije crijevom (Merck Sharp & Dohme, 2016.). Uz *in vivo* ispitivanja kojima je praćeno pražnjenje želudca (Slika 5a), te duljina puta koju je probavljeni obrok prešao u tankom crijevu ispitanih životinja (Slika 5b), provedena su i *in vitro* istraživanja utjecaja ipamorelina i grelina na kontrakciju glatkog mišićja izoliranih iz fundusa želudca štakora (Slika 6).

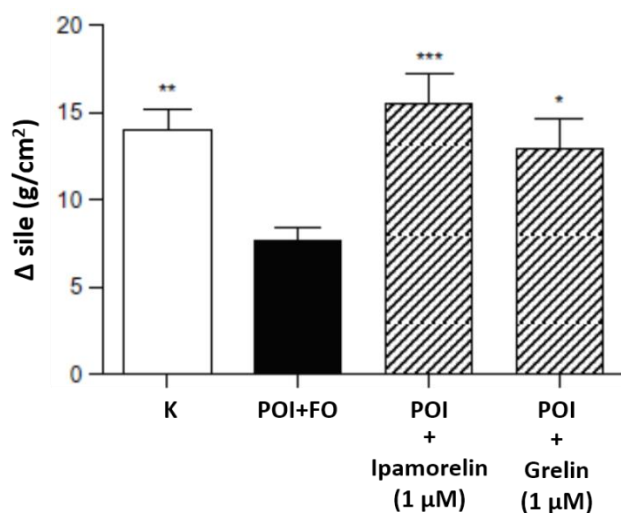


**Slika 5a i 5b.** Utjecaj ipamorelina na a) pražnjenje želudca i b) duljinu puta koji je probavljeni obrok prošao u tankom crijevu ispitivanih štakora. Legenda: K- kontrolna skupina bez izazvanog postoperativnog ileusa; POI + FO – skupina sa izazvanim postoperativnim ileusom izložena administraciji fiziološke otopine; POI + ipamorelin - skupina sa izazvanim postoperativnim ileusom izložena administraciji dvije različite koncentracije ipamorelina, (Slika preuzeta i prilagođena iz rada Greenwood-Van Meerveld i sur., 2012.)

*In vivo* istraživanja na štakorima su pokazala da ipamorelin potiče pražnjenje želudca u skupini sa izazvanim postoperativnim ileusom (POI) u odnosu na POI skupinu tretiranu fiziološkom otopinom. Povišenjem koncentracije intravenozno administriranog ipamorelina poboljšano je i pražnjenje želudca (Slika 5a). Štoviše, u usporedbi sa kontrolnom skupinom u kojoj nije izazvan POI, može se uočiti da već niža primijenjena koncentracija ipamorelina (0,014  $\mu\text{M}$ ) potpuno suzbija učinak postoperativnog ileusa. Shodno tome, ustanovljeno je i da ipamorelin ovisno o koncentraciji poboljšava i peristaltiku tankog crijeva, pri čemu je pri višoj primijenjenoj koncentraciji ipamorelina (0,14  $\mu\text{M}$ ) postignut dulji put probavljene hrane koje je gotovo identičan putu kontrolne skupine bez izazvanog postoperativnog ileusa (Slika 5b).

Potvrdu da je pražnjenje želudca zapravo izazvano poboljšanim radom glatkog mišićja pokazalo je *in vitro* istraživanje utjecaja ipamorelina i grelina na kontrakciju glatkog mišićja fundusa želuca štakora izloženog kratkotrajnom djelovanju neurotransmitera acetilkolina (Greenwood-Van Meerveld i sur., 2012.). Ustanovljeno je da acetilkolin nema sposobnost podražaja glatkog mišićja fundusa želudca u štakora sa izazvanim postoperativnim ileusom (POI + FO), ali se primjenom 1  $\mu\text{M}$  grelina ili ipamorelina u POI skupini, podražaj acetilkolinom vraća u prvobitno stanje (Slika 6).





**Slika 6.** Utjecaj ipamorelina (1 μM) i grelina (1 μM) na kontrakciju glatkog mišićja želuca izazvanom djelovanjem acetilkolina (100 μM). Legenda: K - kontrolna skupina bez izazvanog postoperativnog ileusa; POI + FO – skupina sa izazvanim postoperativnim ileusom izložena administraciji fiziološke otopine; POI - skupina sa izazvanim postoperativnim ileusom. (Slika preuzeta i prilagođena iz rada Greenwood-Van Meerveld i sur., 2012.)

Navedeno upućuje na potencijal korištenja ipamorelina u rješavanju postoperativnog ileusa, kao i drugih bolesti koje dovode do usporenog ili odgođenog pražnjenja crijeva. Ovo posebice dolazi do izražaja kada se zna da je usporeno ili odgođeno pražnjenje crijeva poznat poremećaj rada probavnog sustava koji s današnjim prehrambenim navikama izaziva sve češće te iznimno ozbiljne probleme. Slab unos prehrambenih vlakana, izloženost procesiranoj hrani, manjak aktivnosti, nekvalitetna prehrana i slično, najčešći su uzroci takvih neravnoteža koje se najprije manifestiraju kao blagi simptomi, a zatim vode i do kroničnih bolesti.

## 2.4. Detekcija ipamorelina u urinu sportaša

Zbog svojih sposobnosti da pojačavaju snagu i izdržljivost organizma, sintetski peptidi koji potiču lučenje hormona rasta (GHRP) vrlo su brzo pronašli mogućnost zlorabe u domeni profesionalnog sporta. Naime, osim što GHRP potiču izlučivanje hormona rasta i time poboljšavaju snagu i izdržljivost organizma za sportske napore, istovremeno maskiraju znakove korištenja rekombinantnog hormona rasta (Ferro i sur., 2016.).

Upravo zbog gore navedenog, GHRP poput GHRP-1, GHRP-2 (pralmorelina), GHRP-4, GHRP-5, GHRP-6, hexarelina, alexamorelina te ipamorelina svrstani su na listu

zabranjenih supstanci od strane Svjetske antidopinške organizacije (WADA; eng. *World Anti-Doping Agency*).

Iako GHRP pokazuju potencijal za korištenje u liječenju, za sada je samo sintetski peptid pralmorelin (GHRP-2) u Japanu klinički testiran na ljudima te dozvoljen za uporabu u medicinske svrhe u toj zemlji, ali se i dalje nalazi na listi svjetske antidopinške organizacije, te je zabranjen za uporabu kod profesionalnih sportaša (Ferro i sur., 2016., Semenistaya i sur., 2015.).

Jedan od ključnih problema u detekciji nedozvoljene uporabe GHRP zbog poboljšanja sportskih performansi je kratak poluživot u krvi te se za njihovu nedozvoljenu uporabu i antidopinška testiranja prije svega koristi analiza urina. Antidopinška testiranja ovih supstanci započela su tek na zimskim olimpijskim igrama u Sočiju 2014. godine, prilikom čega je otkrivena nedozvoljena uporaba GHRP-2, GHRP-6 i hexamorelina (Ferro i sur., 2016.; Semenistaya i sur., 2015.) .

Iako u testiranjima sportaša prema dostupnim literaturnim izvorima do sada nije otkrivena nedozvoljena uporaba ipamorelina kao sekretagoga hormona rasta, velika je mogućnost da će se ova supstanca zbog svoje visoke djelotvornosti slične djelotvornosti GHRP-2 (Raun i sur., 1998.) uskoro pronaći u urinu sportaša. Razlog tomu leži u činjenici da se ipamorelin vrlo lako može pribaviti putem crnog tržišta na internetu, za što se autor ovog djela vrlo brzo uvjerio pretraživanjem interneta.

Način na koji se nedozvoljena primjena ipamorelina može otkriti u urinu pojedinaca pokazalo je istraživanje Semenistaya-e i suradnika (2015.). Autori su nakon nazalne aplikacije ipamorelina (injekcija u epitel nosne sluznice; 5 µg/kg) tijekom 48 sati pratili koncentraciju ipamorelina i njegovih metabolita u urinu dobrovoljaca primjenom nano-tekućinske kromatografije u sprezi s masenom spektrometrijom (Tablica 5).

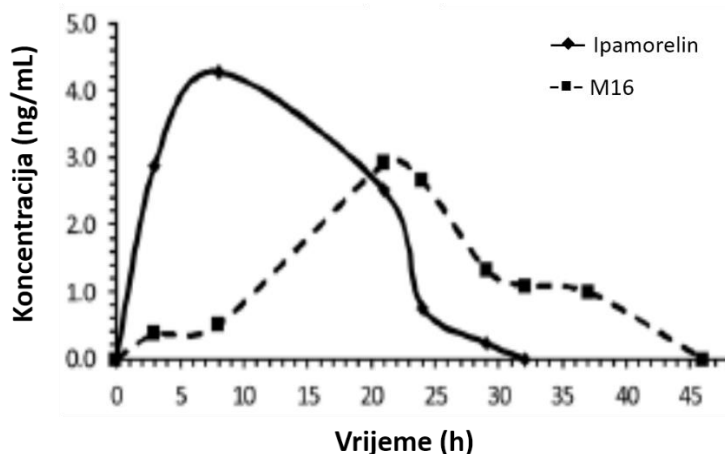
**Tablica 5.** Maksimalno vrijeme detekcije ipamorelina i njegovih metabolita u urinu dobrovoljaca nakon nazalne administracije. Ipamorelin i njegovi metaboliti određeni su primjenom nano-tekućinske kromatografije u sprezi sa masenom spektrometrijom (Semenistaya i sur., 2015.)

Spoj	Aminokiselinski slijed	t <sub>max</sub> (h)*
Ipamorelin	Aib-His-(D-β-Nal)-(D-Phe)-Lys-NH <sub>2</sub>	29
Ipamorelin bez lizina (M16)	Aib-His-(D-β-Nal)-(D-Phe)-OH	37
Ipamorelin sa uklonjenom amidnom skupinom sa C-terminalne skupine lizina (M17)	Aib-His-(D-β-Nal)-(D-Phe)-Lys-OH	24

\* t<sub>max</sub> – maksimalno vrijeme detekcije u urinu nakon nazalne administracije ipamorelina

Pronađeno je da se ipamorelin relativno brzo razgrađuje na dva osnovna metabolita: spoj M17 kod kojeg je uklonjena amidna skupina sa  $\alpha$ -karboksilne skupine C-terminalnog lizina u ipamorelinu, te spoj M16 kod kojeg je uklonjen amidirani lizin iz ipamorelina (Tablica 5). Pri tome se ipamorelin u urinu mogao detektirati do 29-tog sata počevši od nazalne administracije, spoj M17 do 24-tog sata, a spoj M16 do 37-og sata od nazalne administracije.

Slijedom navedenog Semenistaya i suradnici (2015.) su kao potencijalne markere nedozvoljene uporabe ipamorelina odabrali ipamorelin i spoj M-16 (ipamorelin sa uklonjenim amidiranim lizinom), te su izlučivanje ipamorelina i spoja M16 u urinu tijekom 48 sati od nazalne administracije pratili primjenom validirane metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti u sprezi sa masenom spektrometrijom (UHPLC-MS/MS). Pronađeno je da ipamorelin postiže maksimum izlučivanja 8 sati nakon nazalne administracije, potom njegova koncentracija u urinu blago opada do 20-tog sata, nakon čega dolazi do naglog pada koncentracije, a 32 sata nakon nazalne administracije više ga nije moguće detektirati u urinu (Slika 7). Međutim, njegov metabolit (spoj M16, ipamorelin bez amidiranog lizina) pokazao je porast koncentracije nakon 8-og sata od nazalne administracije, pri čemu je postigao maksimalnu koncentraciju u 21-om satu, nakon čega je njegova koncentracija u urinu blago opala, ali ga je bilo moguće detektirati u urinu u značajnim količinama do 40-og sata.



**Slika 7.** Koncentracija ipamorelina i njegova metabolita spoja M16 (ipamorelin bez lizina) u urinu nakon nazalne administracije ipamorelina (5  $\mu$ g/kg) (Semenistaya i sur., 2015.)

Iz navedenog može se zaključiti da se nedozvoljena uporaba ipamorelina, sa sigurnošću u urinu sportaša može odrediti do 40 sati od nazalne administracije primjenom UHPLC-MS/MS metode.

### 3. ZAKLJUČAK

Ipamorelin je sintetski pentapeptid koji pripada skupini peptida-poticatelja izlučivanja hormona rasta, tzv. sekretagoga. Na osnovi istraživanja provedenim na pokusnim životinjama može se zaključiti da bi ipamorelin mogao pronaći značajnu ulogu u liječenju određenih bolesti u čovjeka, poput bolesti poremećaja rasta, u sprječavanju negativnih učinaka izazvanih dugotrajnim korištenjem glukokortikoida, poboljšanju zdravstvenog stanja starijih osoba kod kojih je sniženo izlučivanje hormona rasta, te suprimiranju negativnih učinaka postoperativnog ileusa, kao i drugih bolesti koje dovode do usporenog ili odgođenog pražnjenja crijeva. Naravno, sve gore navedeno je prije svega potrebno potvrditi u kliničkim ispitivanjima, prije potencijalne uporabe ipamorelina u medicinskoj terapiji.

Međutim, primjena ovog sekretagoga hormona rasta u sportskoj medicini i rehabilitaciji ostaje upitna, prvenstveno zbog činjenice da ipamorelin kao i ostali sintetski peptidi koji potiču izlučivanje hormona rasta poboljšava snagu i izdržljivost organizma za sportske napore te istovremeno maskira znakove korištenja rekombinantnog hormona rasta, zbog čega se i s razlogom nalazi na listi zabranjenih supstanci od strane Svjetske antidopinške organizacije.

## 4. LITERATURA

- Andersen NB, Malmjöf K, Johansen PB, Andreassen TT, Ørtoft G, Oxlund H: The growth hormone secretagogue ipamorelin counteracts glucocorticoid-induced decrease in bone formation of adult rats. *Growth Hormone & IGF Research* 11:266-272, 2001.
- Anderson LL, Jeftinija S, Scanes CG, Stromer MH, Lee J-S, Jeftinija K, Glavaski-Joksimovic A: Physiology of ghrelin and related peptides. *Domestic Animal Endocrinology* 29:111-144, 2005.
- Ferro P, Krotov G, Zvereva I, Rodchenkov R, Segura J: Structure-activity relationship for peptidic growth hormone secretagogues. *Drug and Testing Analysis*, 2016, doi: 10.1002/dta.1947.
- Greenwood-Van Meerveld B, Tyler K, Mohammadi E, Pietra C: Efficacy of ipamorelin, a ghrelin mimetic, on gastric dysmotility in a rodent model of postoperative ileus. *Journal of Experimental Pharmacology* 4:149-155, 2012.
- Jiménez-Reina L, Cañete R, de la Torre MJ, Bernal G: Influence of chronic treatment with the growth hormone secretagogue Ipamorelin, in young female rats: somatotroph response in vitro. *Histology and Histopathology* 17:707-714, 2002.
- Johansen PB, Nowak J, Skjærbæk C, Flyvbjerg A, Andreassen TT, Wilken M, Ørskov H: Ipamorelin, a new growth hormone-releasing peptide, induces longitudinal bone growth in rats. *Growth Hormone & IGF Research* 9:106-113, 1999.
- Merck Sharp & Dohme: MSD priručnik dijagnostike i terapije. MSD, 2008. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/bolesti-probave/akutni-abdomen-i-kirurska-gastroenterologija/ileus> [04.08.2016.].
- Raun K, Hansen BS, Johansen NL, Thøgersen H, Madsen K, Ankersen M, Andersen PH: Ipamorelin, the first selective growth hormone secretagogue. *European Journal of Endocrinology* 139:552-561, 1998.
- Semenistaya E, Zvereva I, Thomas A, Thevis M, Krotova G, Rodchenkova G: Determination of growth hormone releasing peptides metabolites in human urine after nasal administration of GHRP-1, GHRP-2, GHRP-6, Hexarelin, and Ipamorelin. *Drug and Testing Analysis* 7:919-925, 2015.
- Strelec I: Membranski receptori i stanična signalizacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2016. [http://studenti.ptfos.hr/Diplomski\\_studij/Interakcije\\_hrane\\_i\\_gena](http://studenti.ptfos.hr/Diplomski_studij/Interakcije_hrane_i_gena) [03.08.2016.].
- Yin Y, Li Y, Zhang W: The Growth Hormone Secretagogue Receptor: Its Intracellular Signaling and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences* 15:4837-4855, 2014.