

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie živočichů

**Vliv energetické hodnoty a složení potravy na hladiny
vybraných hormonů u osob s poruchami příjmu potravy**

Energetic value of diet and levels to selected hormonal
parameters in patients with eating disorders

Hana Doubková



Diplomová práce

Praha, 2010

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jara Nedvídková, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucí práce RNDr. Jary Nedvídkové, CSc. z Endokrinologického ústavu, a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Tato diplomová práce je součástí studie podpořené Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví s názvem Postprandiální odpověď ghrelinu a dalších hormonů s účastí v regulaci příjmu potravy u pacientek s anorexia nervosa a bulimia nervosa (číslo projektu: NR/9158-3).

Podpis

V Praze dne

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat za vstřícnost, pomoc a odborné rady RNDr. Jaře Nedvídkové, CSc. z Endokrinologického ústavu. Dále bych chtěla poděkovat za technickou výpomoc a podporu Nadě Procházkové a Dianě Riegerové.

ABSTRAKT

Peptidický hormon ghrelin je produkován zejména v žaludku a zvyšuje chuť k jídlu. Obestatin je peptid vznikající z preproghrelinu a původně byl považován za hormon, který potlačuje stimulační účinky ghrelinu na příjem potravy. V mé práci jsem se snažila zkoumat vliv postprandiálního stavu na hladiny hormonů ghrelinu a obestatinu u pacientek s mentální bulimií a u zdravých žen. Po nočním lačnění byly změřeny plasmatické hladiny ghrelinu a obestatinu před a po konzumaci rozpuštěné vlákniny a rozpuštěné vlákniny s glukosou. Pozorovala jsem větší pokles plasmatických hladin ghrelinu i obestatinu po konzumaci rozpuštěné vlákniny s glukosou. Na základě výsledků usuzuji, že postprandiální plasmatické hladiny ghrelinu a obestatinu jsou ovlivněny množstvím kalorií v potravě a stravovacími návyky.

Klíčová slova: total ghrelin, obestatin, mentální bulimie

ABSTRACT

Ghrelin is a gut peptide produced by mainly stomach that induces appetite stimulatory actions. Obestatin is peptide derived from preproghrelin and was initially described to antagonize stimulatory effect of ghrelin on food intake. This work was undertaken to investigate the influence of postprandial status on plasma ghrelin and obestatin concentrations in patients with bulimia nervosa and healthy women. After overnight fasting, plasma ghrelin and obestatin were measured before and after consumption of soluble fiber alone or with glucose. I observed greater decrease of plasma ghrelin and obestatin after consumption of soluble fiber with glucose. I conclude that postprandial plasma ghrelin and obestatin levels are influenced by caloric content of the meal and depend on eating behavior.

Key words: total ghrelin, obestatin, bulimia nervosa

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK.....	- 7 -
2. ÚVOD	- 9 -
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	- 10 -
3.1. REGULACE PŘÍJMU POTRAVY	- 10 -
3.2. HORMON GHRELIN	- 13 -
3.2.1. SYNTÉZA GHRELINU.....	- 13 -
3.2.2. IZOFORMY GHRELINU	- 14 -
3.2.3. RECEPTOR PRO GHRELIN	- 15 -
3.2.4. GHRELIN A RŮSTOVÝ HORMON	- 17 -
3.2.5. ÚČINKY GHRELINU	- 17 -
3.2.6. REGULACE SEKRECE	- 18 -
3.2.7. GHRELIN A ANOREXIA NERVOSA.....	- 20 -
3.2.8. GHRELIN A BULIMIA NERVOSA	- 20 -
3.3. HORMON OBESTATIN.....	- 21 -
3.3.1. RECEPTOR PRO OBESTATIN	- 22 -
3.4. PORUCHY PŘÍJMU POTRAVY	- 23 -
3.4.1. BULIMIA NERVOSA	- 23 -
4. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	- 26 -
5. MATERIÁL A METODY	- 27 -
5.1. KRITÉRIA PRO VÝBĚR KONTROLNÍCH OSOB A PACIENTEK S BN	- 27 -
5.2. STANOVENÍ HORMONŮ V KREVNÍ PLASMĚ	- 33 -
5.2.1. PŘÍPRAVA PLASMY.....	- 33 -
5.2.2. MĚŘENÍ HORMONŮ.....	- 33 -
5.2.3. ZMĚŘENÍ KONCENTRACE HORMONŮ VE VZORCÍCH.....	- 35 -
5.2.4. STANOVENÍ TOTAL GHRELINU.....	- 36 -
5.2.5. STANOVENÍ OBESTATINU.....	- 38 -
5.3. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ.....	- 41 -
6. VÝSLEDKY	- 42 -
6.1. GRAFICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ	- 43 -

7. DISKUSE.....	- 50 -
8. ZÁVĚR.....	- 53 -
9. LITERATURA.....	- 54 -

1. SEZNAM ZKRATEK

α-MSH	α - melanocyty stimulující hormon
^{125}I	izotop jódu s nukleonovým číslem 125
Ab	antibody (protilátka)
ADP	adenosindifosfát
Ag	antigen
Ag°	značený antigen
AgRP	agouti-related peptide
ARC	nucleus arcuatus
BN	bulimia nervosa (mentální bulimie)
Bq	becquerel – jednotka radioaktivity
cAMP	cyklický adenosin-monofosfát
CART	cocain amphetamine regulated transcript
Ci	curie – jednotka radioaktivity
CNS	centrální nervový systém
cpm	counts per minute (impulzy za minutu)
Da	dalton – atomová hmotnostní jednotka
EDTA	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
GH	růstový hormon
GHRH	GH-releasing hormone
GHS	growth hormone secretagogues
GHS-R	growth hormone secretagogue receptor
GI trakt	gastrointestinální trakt
GPCR	G-protein spřažené receptory
HCl	kyselina chlorovodíková
IgG	imunoglobulin G
IP3	inositoltrifosfát
LHA	laterální hypothalamická oblast
MKN-10	Mezinárodní klasifikace nemocí, desátá revize
NaI	jodid sodný
NPY	neuropeptid Y

NTS	nucleus tractus solitarius
POMC	pro-opiomelanocortin
RIA	radioimunochemické stanovení
TI	thalium

2. ÚVOD

Pro udržení životních funkcí je pro živočichy nezbytně nutný přísun živin a energie. Příjem potravy je řízen homeostatickým mechanismem. Pro správné fungování celého organismu musí být rovněž zachována rovnováha mezi příjmem a výdejem energie. Hlavním centrem, které u člověka řídí příjem potravy, je část mozku označovaná jako hypothalamus. Nejen hypothalamus, ale i tkáňové hormony gastrointestinálního traktu a dalších orgánů, se významně podílí na celém procesu potravního chování. Při narušení těchto komplexních mechanismů řídících příjem potravy může dojít k závažným poruchám označovaným jako poruchy příjmu potravy. Mezi taková onemocnění se řadí mentální anorexie, mentální bulimie, obezita, psychogenní přejídání a další.

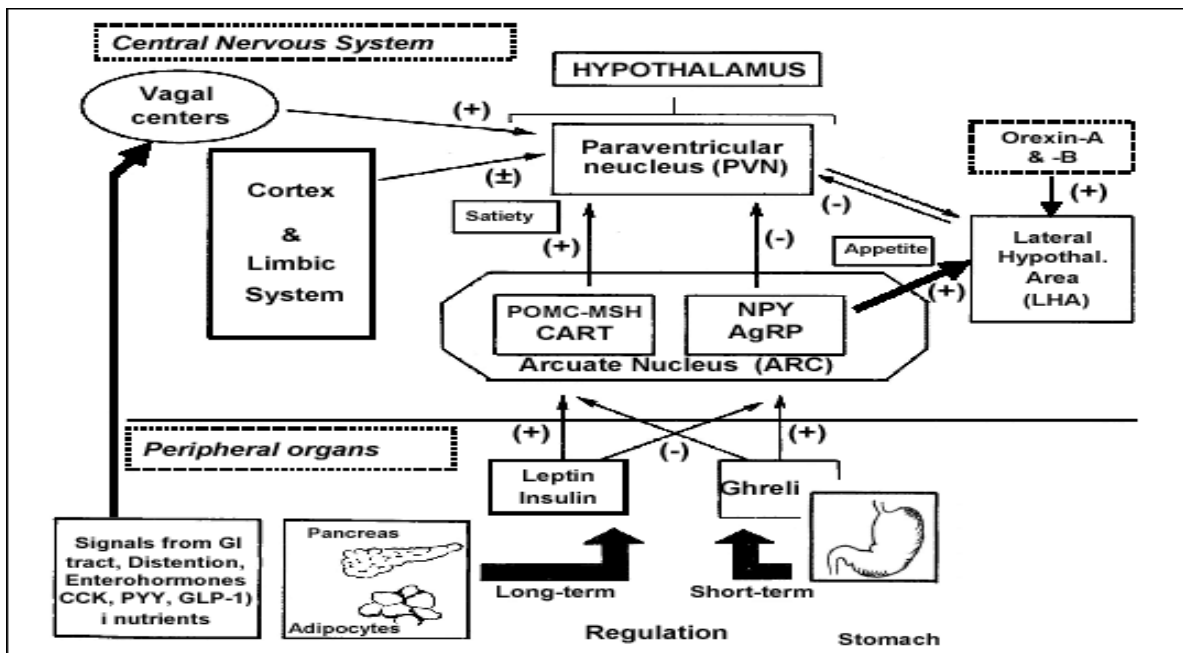
V mé práci jsem se zaměřila na pacientky s onemocněním mentální bulimií (bulimia nervosa, BN). Tato nemoc je charakteristická záchvaty přejídání, při nichž pacienti ztrácí přehled o množství zkonsumované potravy a následně jídlo vyzvrátí. Snažila jsem se porovnat plasmatické hladiny vybraných hormonů gastrointestinálního (GI) traktu mezi pacientkami s mentální bulimií a zdravými ženami po příjmu rozpuštěné vlákniny. Pokusila jsem se srovnat změny plasmatických hladin vybraných hormonů po příjmu samotné rozpuštěné vlákniny a po příjmu rozpuštěné vlákniny s glukosou, tedy vliv objemu potravy a vliv kalorické stravy. Pro pochopení patofyziologie poruch příjmu potravy je nutné objasnit, jakým mechanismem fungují jednotlivé části tohoto komplexního regulačního systému a k tomuto účelu jsou nutné studie zaměřující se také na gastrointestinální hormony. V mé diplomové práci jsem se zaměřila na regulační hormony příjmu potravy, orexigenní ghrelin a putativní anorexigenní obestatin. Výsledky z těchto studií by mohly být následně použity pro vývoj účinných léčiv pro pacienty s poruchami příjmu potravy.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. REGULACE PŘÍJMU POTRAVY

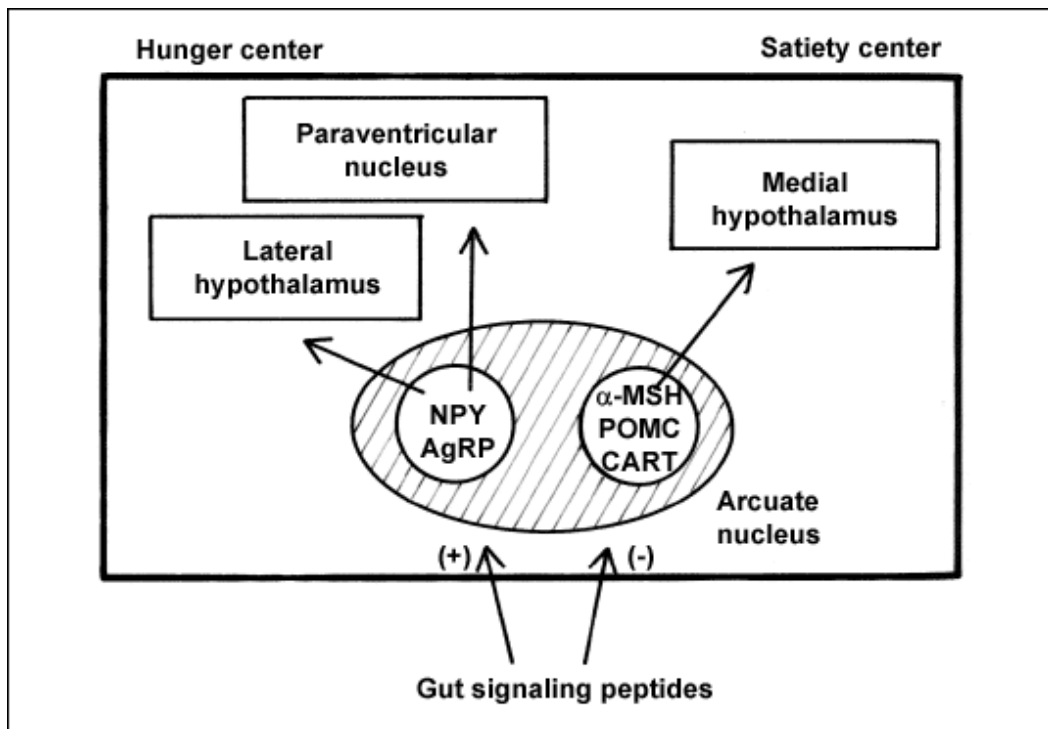
Za dva důležité systémy regulující příjem potravy jsou považovány systém zajišťující krátkodobou regulaci, který se týká zejména prevence přejídání během každého jídla a systém zajišťující dlouhodobou regulaci, který souvisí s udržováním energetických zásob v podobě tuků. Za hlavní řídicí centrum příjmu potravy je od poloviny 20. století pokládán hypothalamus, klíčová oblast centrální nervové soustavy (CNS), která souvisí s kontrolou chuti k jídlu a příjmu potravy (Konturek et al., 2005). Hlavním řídicím centrem je hypothalamus. V hypothalamu dochází k interakci dvou center, laterálního hypothalamu, který je centrem hladu produkujícím orexigenní hormony a ventromediálního hypothalamu, jež produkuje anorexigenní hormony a omezuje tak příjem potravy. Centrum sytosti pracuje na základě inhibice centra hladu, které je neustále aktivní a je tlumeno jen po příjmu potravy (Nedvídková, Nedvídek, 2007).

Nucleus tractus solitarius (NTS) v mozkovém kmeni slouží jako vstupní brána pro signály vedoucí z gastrointestinálního traktu do center v hypothalamu (Obrázek 3.1).



Obrázek 3.1 Model regulace příjmu potravy v hypothalamu (Konturek et al., 1995). Ghrelin uvolňovaný ze žaludku při lačnění aktivuje neurony obsahující neuropeptid Y (NPY)/agouti-related peptid (AgRP) v nucleus arcuatus (ARC) a stimuluje tak laterální hypothalamickou oblast (LHA), která je centrem hladu a produkuje orexigenní hormony. Inhibiční systém pro-opiomelanocortin (POMC)/ cocaine amphetamine regulated transcript (CART) je zodpovědný za pocit sytosti, který je stimulován leptinem a inhibuje dráhu NPY/AgRP navozenou ghrelinem. Hormony uvolňované gastrointestinálním traktem působí na hypothalamická centra přes nucleus tractus solitarius (NTS) a ovlivňují tak příjem potravy.

Hormony uvolňované periferními orgány gastrointestinálního (GI) traktu, zejména z mukosy a tukových tkání, které jsou zahrnuty v dlouhodobé koordinaci přijímání potravy a energetického výdeje, se signalizují prostřednictvím nucleus tractus solitarius (NTS) do dalších oblastí centrální nervové soustavy (CNS). Peptidy uvolňované ze žaludeční mukosy působí prostřednictvím nucleus arcuatus (ARC), jehož neurony jsou lokalizovány na spodní části hypothalamu okolo třetí komory mozkové, na stimulaci chuti k jídlu aktivací neuronů obsahující neuropeptid Y (NPY) a agouti-related peptid (AgRP) nebo na potlačení chuti k jídlu přes neurony obsahující pro-opiomelanocortin (POMC) - odvozený α -melanocyty stimulující hormon (α -MSH) a cocaine amphetamine regulated transcript (CART) peptidy na centra hladu v laterální oblasti hypothalamu (LHA) a centrum sytosti v nucleus paraventricularis (PVN) v mediálním hypothalamu (Konturek et al., 2005) (Obrázek 3.2).



Obrázek 3.2 Peptidy uvolňované z trávicích orgánů působí prostřednictvím neuronů NPY/AgRP na příjem potravy v LHA a PVN nebo přes POMC a α -MSH neurony navozující pocit sytosti v mediálním hypothalamu (Konturek et al., 1995).

3.2. HORMON GHRELIN

Ghrelin je gastrointestinální hormon řadící se mezi peptidy. Byl objeven metodou označovanou jako reverzní farmakologie. To znamená, že nejdříve byl nalezen syntetický analog GHS (growth hormone secretagogues), poté receptor GHS-R a následně jeho ligand ghrelin (Kojima et al., 2005).

První molekula GHS objevená roku 1976 G.Y. Bowersem byla derivátem met-enkefalinu. GHS působí prostřednictvím receptoru GHS-R, který byl objeven roku 1996 Merckem a jeho kolegy. GHS-R jsou s G-proteinem spřažené receptory (GPCR) se sedmi transmembránovými doménami (Kojima et al., 2005).

GHS-receptor je odlišný od receptoru pro GHRH. GHRH používá dráhu přes GHRH-receptory a cAMP dependentní proteinkinázu A.

GHS aktivuje dráhu fosfolipasy C a dochází tak ke zvýšení hladiny vápenatých iontů. Vše probíhá přes inositoltrifosfát (IP3), který zprostředkovává přenos signálu (Hosoda et al., 2002).

Při objevu ghrelinu Kojima a ost. použili buňky produkující GHS-R z vaječníku čínského křečka ke sledování změn v intracelulárních koncentracích vápníku. Nejvyšší hladiny aktivního GHS-R byly nalezeny v žaludečním extraktu. Ligand pro GHS-R byl pojmenován ghrelin (Hosoda et al., 2002).

3.2.1. SYNTÉZA GHRELINU

Ghrelin vzniká odštěpením 28 aminokyselin ze základní molekuly preproghrelinu složené ze 117 aminokyselin. Ze zbytku se odštěpuje 23 aminokyselin, které tvoří hormon obestatin.

Ghrelin je syntetizován zejména v žaludeční sliznici X/A-podobnými buňkami, které představují asi 20% endokrinních buněk v oxyntických žlázách v lamina propria. Průměr těchto buněk je druhově odlišný. Většina z těchto buněk je v kontaktu s basolaterální membránou, která je napojena na krevní řečiště, ale není v přímém kontaktu s žaludečním lumen. Distálněji ve střevě jsou tyto buňky v kontaktu s cévami a stejně tak se střevním lumen.

Buňky fundu obsahují více ghrelinu než buňky pyloru. Ghrelin je sekretován v klesajícím množství ve směru duodenum, jejunum, tlusté střevo. V menším množství je hormon syntetizován v dalších tkáních jako například v plicích, slinivce břišní, vaječnicích, kůře nadledvinek, placentě a dalších (Cummings et al., 2005).

Ghrelin byl zjištěn i v hypothalamu v ARC, místě důležitém pro kontrolu chuti k jídlu. Gen je v hypothalamu exprimován v seskupení neuronů ležících mezi jádrem dorzoventrálním, paraventrikulárním a nucleus arcuatus. Tyto neurony mají eferentní spoje k centrálním syntézám orexigenních neuropeptidů NPY, AgRP a anorexigenních neuropeptidů POMC, CART a ghrelin zde pravděpodobně moduluje sekreci těchto orexigenních regulátorů a neurotransmiterů.

V hypofýze savců jsou cílovým místem účinku ghrelinu somatotropní buňky. Exprese je zde vysoká po narození a klesá směrem k pubertě. Buňky nádorů hypofýzy také obsahují ghrelin (Kojima et al., 1999)

3.2.2. IZOFORMY GHRELINU

Acylovaný i neacylovaný ghrelin byl ve významném množství nalezen v žaludeční tkáni i v krvi. V cirkulaci je asi stonásobně více neacylovaného ghrelinu, který je stabilnější (Nedvídková, Nedvídek, 2007). Molekulová hmotnost acylovaného ghrelinu je 3315 Da a neacylovaného 3189 Da (Kojima et al., 2004). Obě tyto formy ghrelinu dohromady patří do tzv. total ghrelinu, jehož koncentrace v plazmě je kolem 100-150 fmol/ml (Kojima et al., 2005).

Neacylovaný ghrelin

Neacylovaný ghrelin není neaktivní peptid a jeho účinky jsou pravděpodobně zprostředkovány GHS receptory, které rozpoznávají ghrelin nezávisle na jeho acylaci. Neacylovaný ghrelin se neváže na receptor GHS-R1a, který je schopen rozpoznat pouze ghrelin v jeho acylované formě, proto jeho aplikace nemá účinek na sekreci růstového hormonu, PRL, ACTH ani na množství insulinu. Mechanismy, které regulují interakce mezi acylovaným a neacylovaným ghrelinem na úrovni receptorů, v současné době nejsou objasněny (Broglio et al., 2004a).

Acylovaný ghrelin

Ghrelin prochází posttranslační úpravou, kdy je hydroxylová skupina na třetím serinu esterifikována kyselinou oktanovou. Celá tato sekvence Gly-Ser-Ser(octanoyl)-Phe tedy představuje aktivní jádro molekuly potřebné pro vazbu na GHS-R 1a. Acylace je tedy nezbytná k navázání ghrelinu na jeho receptor GHS-R1a a pro další fyziologické účinky (Gnanapavan et al., 2002, Kojima et al., 2001, Muccioli et al., 2002). Pro aktivaci ghrelinových receptorů je postranní řetězec nutný, i když receptory pro ghrelin stejně efektivně jako ghrelin v celé délce aktivuje i krátký peptid, obsahující jen první 4 nebo 5 zbytků ghrelinu (Lely et al., 2004) (Obrázek 3.3).



Obrázek 3.3 Struktura lidského acylovaného ghrelin (St-Pierre et al., 2003). Gly= Glycin, Ser= Serin, Phe= Fenylalanin, Leu= Leucin, Pro= Prolin, Glu= K.glutam., His= Histidin, Gln= Glutamin, Arg= Arginin, Val= Valin, Lys= Lysin, Ala= Alanin

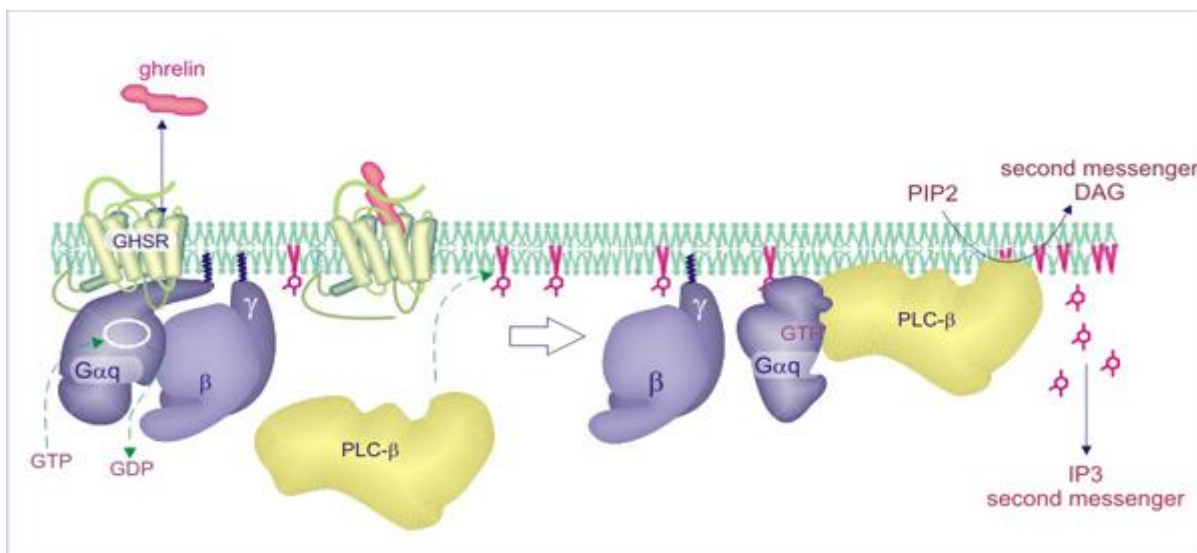
3.2.3. RECEPTOR PRO GHRELIN

Receptor pro ghrelin patří mezi receptory spřažené s G-proteiny (GPCR) se sedmi transmembránovými (TM) doménami. Receptor pro ghrelin byl nalezen v mnoha tkáních (srdce, plíce, játra, ledviny, žaludek, pankreas, tenké střevo, tuková tkáň a buňky imunitního systému). Je homologní v 52% s receptorem pro motilin (19 AMK), hormon žaludku, který má rovněž vliv na kontraktilitu žaludeční

stěny a sekreci HCl. Gen pro GHS-R je tvořen dvěma exony. První exon kóduje domény TM-1 až TM-5 a druhý exon kóduje domény TM-6 až TM-7 (Kojima et al., 2005).

Receptor GHS-R1a

GHS-R 1a je tvořen 366 AMK. Je receptorem pro dva ligandy, a to acyl ghrelin a des-Q(14)ghrelin. Exprese GHS-R 1a byla prokázána v předním laloku hypofýzy a hypothalamu. Rovněž byl nalezen v periferních orgánech jako žaludek, střeva, slinivka, ledviny a srdce (Kojima et al., 2005) (Obrázek 3.4).



Obrázek 3.4 Signální dráha po navázání ghrelinu na receptor (www.cellbiol.net). Po navázání ghrelinu na receptor (GHSR) dojde k výměně GDP za GTP na podjednotce Gαq. Podjednotka Gαq s navázaným GTP se oddělí od komplexu Gβγ a naváže se na membránu na enzym fosfolipasu C (PLCβ) blízko substrátu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP2). Enzymatická reakce následně vede ke tvorbě druhých posílů jako je inositol-1,4,5-trifosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG)

Receptor GHS-R1b

Receptor typu 1b je odvozený pouze z prvního exonu a kóduje pět ze sedmi TM domén. Receptor typu 1b je tak na C-konci zkrácený na rozdíl od typu 1a a je farmakologicky inaktivní a jeho funkce nebyla doposud definována (Kojima et al., 2005).

3.2.4. GHRELIN A RŮSTOVÝ HORMON

GH je multifunkční hormon sekretovaný somatotrofními buňkami předního laloku hypofýzy. Růstový hormon stimuluje lipolýzu vedoucí ke zvýšení hladin mastných kyselin v oběhu. Jeho sekrece je kontrolována mnoha faktory, zejména dvěma hypothalamickými neuropeptidy. Uvolňování růstového hormonu je stimulováno GH-releasing hormonem (GHRH) a inhibováno somatostatinem (Kojima et al., 2005). GH-releasing hormon působí skrze dráhu přes GHRH-receptory a cAMP dependentní proteinkinasu A.

Další hormon, který má také vliv na uvolnění GH, je ghrelin, který objevil a pojmenoval Kojima a ost. Ghrelin působí skrze dráhu fosfolipasy C a dochází tak ke zvýšení hladiny vápenatých iontů. Vše probíhá přes IP3, který zprostředkovává přenos signálu (Hosoda et al., 2002).

Ve studii Broglio a ost. (2004) byla pozorována u pacientek s mentální anorexií snížená odpověď GH po aplikaci ghreluinu (Broglio et al., 2004a). Vysvětlením pro oslabenou reakci růstového hormonu po aplikaci ghreluinu by mohla být možnost, že u pacientek s mentální anorexií dochází ke chronickému zvýšení hladin ghreluinu, což by mohlo navodit desensitizaci v uvolnění růstového hormonu (Broglio et al., 2004a, Yamazaki et al., 2002)

3.2.5. ÚČINKY GHRELINU

Plasmatické hladiny ghreluinu odrážejí krátkodobé změny příjmu potravy i dlouhodobé změny nutričního stavu organismu. Plasmatické hladiny ghreluinu jsou snižené po příjmu potravy a u obézních jedinců, naopak zvýšené jsou při lačnění a u pacientů s mentální anorexií. Plasmatické hladiny ghreluinu u člověka negativně korelují s body mass indexem (BMI), množstvím tělesného tuku, velikostí adipocytů, plazmatickými hladinami insulínu, glukosy a leptinu. Vzestup hladin ghreluinu bezprostředně před příjmem potravy naznačuje, že ghrelin hraje úlohu v přípravné fázi jako metabolický signál pocitu hladu.

Mezi hlavní účinky ghreluinu patří vliv na regulaci příjmu potravy a energetickou homeostasu. GI trakt a mozek jsou těsně spojeny při regulaci příjmu

potravy (Ueno et al., 2005).

Intravenosní podání ghrelinu zvyšuje u zdravých osob energetický příjem a rovněž chuť k jídlu (Ueno et al., 2005, Wren et al., 2001). To rovněž přispívá k významu ghrelinu jako perifernímu orexigennímu peptidu.

Ghrelín má roli i v kardiovaskulárním systému. Má ochrannou funkci proti srdečním poruchám. Intravenosní aplikace významně snižuje střední arteriální tlak, aniž by došlo ke změně rychlosti srdeční činnosti a také zvyšuje minutový objem srdeční u zdravých osob a pacientů s chronickými srdečními poruchami (Nagaya et al., 2001a, Nagaya et al., 2001b, Ueno et al., 2005).

Ghrelín ovlivňuje hladiny glukosy v oběhu pomocí GH, zvyšování insulinové resistance a stimulaci glukoneogeneze (Muller et al., 2001, Ueno et al., 2005). Vliv ghrelinu na sekreci insulinu zůstává rozporuplný. Intravenosním podáním ghrelinu dojde k indukci hyperglykemie redukcí sekrece insulinu a to beze změny hladiny GH (Broglia et al., 2001, Ueno et al., 2005). Aplikací acyl ghrelinu dochází ke snížení hladiny insulinu a zvýšení hladiny glukosy. Podáním acyl i desacyl ghrelinu současně nedojde ke změnám v hladinách glukosy a insulinu. Desacyl ghrelín tedy zřejmě inhibuje vliv acyl ghrelinu na hladinu glukosy a insulinu (Broglia et al., 2004a).

3.2.6. REGULACE SEKRECE

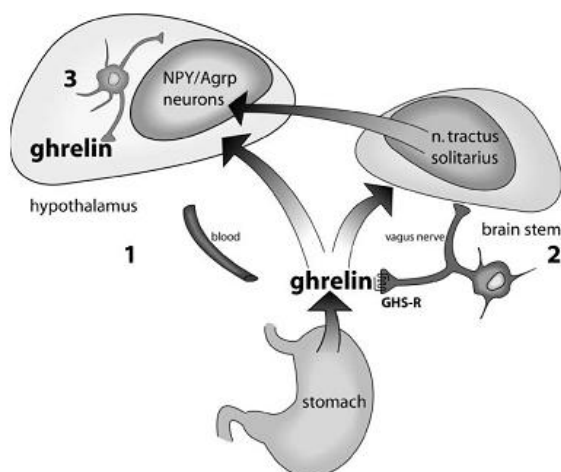
Sekrece ghrelinu je především pod vlivem metabolické kontroly. Jeho hladina je zvýšena při lačnění a snížena po jídle, příjmu sacharidů a vyplavení insulinu (Broglia et al., 2004a). Největší vliv má na množství hormonu nutriční stav organismu, proto se zvýšené hladiny ghrelinu vyskytují u pacientů s mentální anorexií, ale naopak jsou sníženy u pacientů trpících obezitou (Broglia et al., 2004a, Muccioli et al., 2002).

Kolem druhé hodiny ranní dosahuje plasmatická koncentrace ghrelinu svého maxima. Během dne se jeho hladina zdvojnásobí před každým jídlem a klesá na původní hodnotu hodinu po jídle (Ueno et al., 2004, Yildiz et al., 2004;).

Aplikací ghrelinu se u zdravých osob zvýší pocit hladu (Muller et al., 2001; Ueno et al., 2004). Tyto výsledky naznačují, že by zvýšení hladiny ghrelinu signalizovalo zahájení příjmu potravy. Místem degradace ghrelinu jsou

pravděpodobně ledviny, čemuž nasvědčují zvýšené hladiny tohoto hormonu u osob s poruchou funkce ledvin (Nedvídková, Nedvídek, 2007).

Signály hladu, které jsou ghrelinem převáděny do CNS, zahrnují vlákna nervu vagu. Nervus vagus obsahuje aferentní i eferentní vlákna a je zahrnut rovněž do sekrece GH z hypofýzy. Ghrelin přenášený do mozku při hladovění působí cestou zahrnující aferentní vlákna nervu vagu, který vytváří dráhu mezi trávicím traktem a NTS v mozkovém kmeni, který následně komunikuje s hypothalamem. Dalším možným způsobem přepravy ghreluinu z periferie krevním řečištěm do CNS by mohl být přechod přes hematoencefalickou bariéru (Korbonits et al., 2004). Unikátní primární struktura ghreluinu určuje rozsah i směr transportu přes hematoencefalickou bariéru (Banks et al., 2002) (Obrázek 3.5). Vliv ghreluinu na kontrakci žaludku je zprostředkován cholinergní cestou nervu vagu (Hosoda et al., 2002).



Obrázek 3.5 Možné způsoby transportu ghreluinu do mozku (Korbonits et al., 2004). 1. Ghrelin uvolněný ze žaludeční tkáně je transportován krví a působí na nucleus arcuatus (ARC) v hypothalamu. 2. Ghrelin se signalizuje přes nervus vagus do mozkového kmene, kde působí na nucleus tractus solitarius, který komunikuje s hypothalamem. 3. Ghrelin vznikající přímo v hypothalamu a jeho spojení s neurony obsahující NPY a AgRP.

3.2.7. GHRELIN A ANOREXIA NERVOSA

Vysoké hladiny ghrelinu u pacientek s mentální anorexií by mohl být kompenzačním mechanismem při hladovění a měl by podpořit zvýšení příjmu kalorií. (Tanaka et al., 2003a). Redukovaný příjem potravy u pacientek s mentální anorexií navzdory chronickému zvýšení hladiny ghrelinu by mohl svědčit o snížené citlivosti k účinkům ghrelinu (Misra et al., 2005). Několik studií ukázalo, že pacientky s anorexií jsou méně citlivé k účinkům, které má ghrelin, jak na chuť k jídlu tak na dobu působení GH (Broglia et al., 2004b).

U pacientek s mentální anorexií zůstávají postprandiální hladiny ghrelinu vysoké a neklesají ani po dvou hodinách po požití potravy (Nedvídková et al., 2003). Rozdílné koncentrace ghrelinu u pacientek s mentální anorexií a u obézních pacientů mohou naznačovat, že ghrelin by mohl být dobrým ukazatelem nutričního stavu organismu (Soriano et al., 2004). Nedostatečně potlačená sekrece ghrelinu po jídle by mohla být důležitým faktorem v patofyziologii u pacientů s poruchami příjmu potravy. Odchytky v uvolňování ghrelinu nebo v jeho účinnosti by měly být zahrnuty při úpravě jídelníčku jak u pacientek s anorexií, tak i u obézních lidí (Date et al., 2005).

3.2.8. GHRELIN A BULIMIA NERVOSA

U pacientek s mentální bulimií bylo nejprve zaznamenáno, že hladiny ghrelinu na lačno jsou zvýšené (Tanaka et al., 2003b). Patrné bylo toto zvýšení u pacientů se záchvatovitým zvracením. To potvrzuje myšlenku, že epizody opakovaného zvracení v kontrastu se záchvatovitým přejídáním mají vliv na hladiny ghrelinu při lačnění. Přesto další studie nezaznamenala významné rozdíly v plasmatické koncentraci ghrelinu u pacientů s bulimií a zdravých osob (Monteleone et al., 2008)

3.3. HORMON OBESTATIN

Z pre-proghrelinu se také odvozuje peptid o 23 AMK. Byl objeven v žaludku potkana na sklonku roku 2005 Zhangem a ost.

Původně se předpokládalo, že obestatin potlačuje pocit hladu a má tak opačný fyziologický účinek než ghrelin. Podle Zhanga a ost. (2005) obestatin potlačuje u potkanů příjem potravy, a to jak po periferní aplikaci, tak při jeho podání do mozkových komor, a tím vyvolá pokles hmotnosti. Mimo to byla v původní studii popsána inhibice vyprazdňování žaludku a jejunálních kontrakcí po obestatinu. Inhibice jejunálních kontrakcí by se mohla uplatňovat v navození pocitu sytosti prostřednictvím aferentních signálů bloudivého nervu. V dalších studiích se ale nepodařilo prokázat u potkanů, že by obestatin ovlivnil ghrelinem indukovanou zvýšenou motilitu (Gourcerol et al., 2006)

Jiná studie tvrdí, že obestatin nemá protichůdné účinky ke ghrelinu. Ve studii Sedláčkové a ost. byl pozorován pozitivní vztah mezi obestatinem a total ghrelinem během postprandiální změny hladin těchto hormonů. Plasmatické hladiny obestatinu se signifikantně snížily po sacharidové snídani u zdravých osob a tento průběh probíhal podobným způsobem i u ghrelinu (total, acyl i desacyl). Obdobné působení obestatinu a total ghrelinu v postprandiálním období tak ukazuje, že se tyto dva produkty (tedy ghrelin a obestatin) jednoho genu mohou účastnit stejným způsobem při příjmu potravy u zdravých jedinců (Sedláčková et al., 2008).

U obézních osob ve srovnání s pacientkami s poruchami příjmu potravy a zdravými kontrolami jsou plasmatické hladiny obestatinu nalačno nižší (Zamrazilová et al., 2008).

Korelace obestatinu s total ghrelinem byla nalezena u obézních osob (Vicennati et al., 2007). Některé studie nacházejí korelaci mezi obestatinem a hodnotou BMI u pacientek s mentální anorexií a obézních osob (Nakahara et al., 2008), další u zdravých jedinců (Lippl et al., 2008).

3.3.1. RECEPTOR PRO OBESTATIN

Pro biologickou aktivitu obestatinu je důležitá amidace karboxylového zakončení (Zhang et al., 2005). Obestatin se podle Zhanga a ost. (2005) váže v cílových tkáních na receptor GPR39 (orphan G-protein-coupled receptor 39), který je příbuzný s receptory ghrelinu a motilinu. V dalších studiích se ale vazba obestatinu na receptor GPR39 nepotvrdila (Holst et al., 2007, Lauwers et al., 2006,).

Na rozdíl od ghrelinu, který svou vazbou na receptor GHS-R stimuluje sekreci GH, po podání obestatinu nedochází ke stimulaci sekrece GH jak v experimentech in vitro (Zhang et al., 2005), tak in vivo (Nogueiras et al., 2007).

K určení receptorů, na které se obestatin váže, a objasnění mechanismů jeho účinku, jsou tedy zapotřebí další studie.

3.4. PORUCHY PŘÍJMU POTRAVY

Poruchy příjmu potravy jsou charakterizovány jako kontinuum patologického, biopsychosociálně podmíněného potravního chování. K nejzávažnějším onemocněním patří anorexia nervosa (AN) a bulimia nervosa (BN). Mezi poruchy příjmu potravy se rovněž řadí i psychogenní přejídání spojené s obezitou. Vývojové, psychologické, sociální a biologické faktory se podílejí různou měrou na vzniku a průběhu těchto onemocnění (Papežová et al., 2002).

V současné době není jasné, zda li změny v uvolňování regulačních látek, které se účastní při příjmu potravy, předcházejí poruchám potravního chování, nebo jsou-li tyto změny výsledkem nutričních změn v důsledku onemocnění. Přesto bylo navrženo, ale ne prokázáno, že ačkoliv změny hormonů a ostatních regulačních látek jsou druhotným jevem mizícím po zotavení, zřejmě přispívají jak k odlišnému potravnímu chování, tak k průběhu a zakončení onemocnění (Monteleone et al. 2008).

3.4.1. BULIMIA NERVOSA

Samotný pojem bulimie má vlastní historii. Pojem *bolimos* označoval zlého démona a původně znamenal velký hlad. Roku 1874 Gull popsal nenasytnou chuť k jídlu u anorektické pacientky. Mnoho desetiletí byla podle lékařů mentální bulimie součástí mentální anorexie. V roce 1979 britský lékař Gerald Russell použil termín *bulimia nervosa* a definoval mentální bulimii jako variantu mentální anorexie. Teprve roku 1987 byla mentální bulimie označena za samostatnou diagnózu a sjednocena britskou terminologií na mentální bulimii - *bulimia nervosa* (Krch, 1999).

Bulimia nervosa je onemocnění spadající mezi poruchy příjmu potravy. Projevuje se záchvatovitým přejídáním a následným úmyslným zvracením. Během těchto záchvatů nemají postižení žádnou kontrolu nad svým jednáním a množstvím zkonsumované potravy. Záchvaty není možné potlačit silou vůle. Následkem toho trpí pacienti pocity viny.

Stejně jako u AN se také zde pacienti trvale a přehnaně zajímají o svoji hmotnost. Pacienti často experimentují s dalšími prostředky, které jim pomáhají ke

snížení hmotnosti. Mezi takové látky patří například projímadla či prostředky potlačující chuť k jídlu (anorektika).

Zvláště ve stresových situacích a ve stavech duševního vypětí bývá příjem potravy vnímán jako příjemná náhražka neuspokojených tělesných potřeb. Na druhé straně bývá přejídání nebo také násilné vyvolávání zvracení považováno za výraz podprahové agresivity. V této souvislosti lze vysvětlit také často pozorovaný sklon pacientů způsobovat si během stavů vypětí malá až středně těžká zranění, například řezné rány na předloktí.

Význam stresu se však individuálně liší. U BN je kromě „aktuálního stresu“ často popisován „stres vývojový“, jako je ztráta rodičů, zanedbání rodičovské péče, zneužívání dítěte, vysoká kritičnost a nároky nebo alkoholismus (Fairburn et al., 1997). Onemocnění se objevuje většinou u nevyrovnané osobnosti s nízkou snášenlivostí frustrace. Je často doprovázeno poruchou nahlížení na vlastní tělesnou schránku. S BN bývá také spjata zvláštní porucha osobnosti, takzvaný "borderline-syndrom", který je charakteristický extrémním výkyvem nálady a pocitů. Bulimii často předchází anorexie, někdy také nadváha.

ZDRAVOTNÍ NÁSLEDKY

Jako u většiny psychických onemocnění, tak i u pacientů s BN dochází dle stupně pokročilosti ke snížení jejich pracovní výkonnosti, zhoršení společenských kontaktů i osobních vztahů.

Ze zdravotního hlediska bývá často pozorováno zvětšení příušní žlázy, které bývá způsobeno opakujícím se dávením a zvracením, zpomalené vyprazdňování žaludku, zácpa, záněty slinivky břišní, křeče a svalová slabost. Metabolickými následky jsou snížená hladina draslíku, edémy, metabolická alkalóza. Díky kontaktu se silně kyselým obsahem žaludku s dutinou ústní mohou vznikat poškození zubní skloviny, jakož i záněty jícnu (esophagitis) či poškození stěny jícnu, které způsobí krvácení. Zaznamenána jsou také zranění jícnu vznikající při násilném vyvolávání zvracení pomocí pletacích jehlic, drátů, dřevěných tyčinek (www.anabell.cz).

DIAGNOSTICKÁ KRITÉRIA PODLE MKN-10 (F 50.2)

- opakované epizody přejídání (nejméně dvakrát týdně po dobu 3 měsíců) při nichž je v krátké době konzumováno velké množství jídla
- neustálé zabývání se jídlem a silná neodolatelná chuť po jídle
- snaha potlačit „výkrmný“ účinek jídla jedním nebo více z následujících způsobů
 - vyprovokované zvracení
 - zneužívání projímadel, anorektik, thyreoidálních preparátů nebo diuretik, vynechávání léčby insulinem u diabetiků
 - střídavá období hladovění
- pocit přílišné tloušťky spojený s neodbytnou obavou z tloustnutí (pacient usiluje o nižší než premorbidní a často přiměřenou hmotnost), často je v anamnéze epizoda anorexie nebo intenzivnějšího omezování se v jídle (www.uzis.cz)

4. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

- srovnání bazálních plasmatických hladin hormonů ghrelinu a obestatinu u pacientek s mentální bulimií a u zdravých žen
- sledování změn ghrelinu a obestatinu v plasmě po příjmu rozpuštěné vlákniny u pacientek s mentální bulimií a zdravých žen
- sledování změn ghrelinu a obestatinu v plasmě po příjmu rozpuštěné vlákniny s glukosou u pacientek s mentální bulimií a u zdravých žen
- sledování průběhu změn plasmatických hladin ghrelinu a obestatinu po příjmu rozpuštěné vlákniny s glukosou a rozpuštěné vlákniny bez glukosy u pacientek s mentální bulimií a u zdravých kontrolních žen
- sledování pocitu touhy k jídlu ve vztahu k plasmatickým hladinám ghrelinu během testů

Pro změření hormonů ghrelinu a obestatinu jsem zvolila metodu radioimunochemického stanovení (RIA).

5. MATERIÁL A METODY

5.1. KRITÉRIA PRO VÝBĚR KONTROLNÍCH OSOB A PACIENTEK S BN

Skupina kontrolních osob se skládala ze šesti zdravých žen (průměrný věk: $23,83 \pm 1,1$ let, průměrná hodnota BMI: $20,85 \pm 0,87$ kg/m²). Kontrolním osobám nebyla diagnostikována závažná onemocnění jako onemocnění štítné žlázy, jater, srdeční choroby či diabetes mellitus. Kontrolní osoby v historii neprodělaly mentální anorexii ani bulimii.

Skupinu pacientek s BN tvořilo šest žen (průměrný věk: $26,6 \pm 5,2$ let, průměrná hodnota BMI: $19,2 \pm 1,44$ kg/m²), kterým byla diagnostikována mentální bulimie, a byly hospitalizovány na Psychiatrické klinice 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Dva dny před odběrem krve pacientky s BN a kontrolní osoby nesměly pít alkohol, kouřit, pít černý čaj a kávu, jíst čokoládu, výrobky s kakaem, banány a ořechy. Před začátkem testu podepsaly pacientky a kontrolní osoby informovaný souhlas. Rovněž byly obě skupiny vyšetřeny lékařem na oddělení Funkční diagnostiky Endokrinologického ústavu. Během testu pacientky i zdravé kontrolní osoby vyplnily zdravotní dotazník a před každým odběrem byla zaznamenána touha najíst se a další vjemy související s příjmem potravy. Krev byla odebírána dle protokolu v -30, 0, 30, 60, 90, 150 a 210. minutě (Příloha 1). Po odběru v 0 té minutě byla podána 1. týden rozpuštěná vláknina (4g Psyllia ve 300 ml vody), 2. týden rozpuštěná vláknina s glukosou (4g Psyllia ve 300 ml vody a 78 g glukosy).

Informovaný souhlas

Vážená slečno/ paní,

děkujeme Vám, že jste projevila zájem podílet se na klinickém experimentu, jehož výsledky by měly přispět ke zlepšení léčby nemocných s poruchou příjmu potravy. Dříve, než vyslovíte souhlas s Vaší účastí ve studii, je důležité, abyste si přečetla následující informace o tom, co pro Vás zapojení do studie obnáší, a porozuměla tomu.

V první řadě Vás musíme upozornit, že Vaše účast v tomto výzkumu je zcela dobrovolná, máte právo účast odmítnout a nebudou z toho plynout pro Vás žádné následky, kromě ztráty práva na finanční odměnu.

V současné době probíhá výzkum (vládní grantová agentura ČR), který je zaměřen na studium vlivu vegetativního nervového systému na látkovou výměnu a jeho interakce s hormony ovlivňujícími příjem potravy a jejich změny při poruchách regulace tělesné hmotnosti. Endokrinologický ústav je naším předním pracovištěm, které se zabývá diagnostikou, léčbou a výzkumem onemocnění souvisejících s poruchou žláz s vnitřní sekrecí (endokrinních) a metabolismu. Tomuto ústavu byl přidělením grantového projektu svěřen výše uvedený výzkumný úkol.

V případě Vašeho souhlasu budete podrobena těmto úkonům:

Odběrový test, který spočívá v několika odběrech krve ze žíly při jednom vpichu. Při tomto testu Vám bude zavedena kanyla a krev bude odebírána v 30 min. intervalech po dobu cca 3,5 hod. (tzn. 7 odběrů, celkem 65 ml krve). První odběr bude probíhat ráno nalačno před 8. hodinou v Endokrinologickém ústavu, po tomto odběru Vám bude podána snídaně, kterou byste měla sníst během 15 ti minut. Druhý odběr bude následovat 30 min. po ukončení snídaně a další odběry opět po 30 ti minutách. Při odběrovém testu budete v klidu na lůžku, můžete ležet nebo sedět, odpočívat, poslouchat hudbu nebo si číst, nesmíte spát. Dva dny před testem nebudete pít alkohol, černou kávu, černý čaj a vše, co obsahuje

kofein, dále nebudete jíst čokoládu, výrobky s kakaem, banány, ořechy a nebudete užívat acylpyrin (aspirin). Krev bude použita ke stanovení gastrointestinálních hormonů, vzorky krve nebudou uchovávány pro jiné studie.

Tento test bude probíhat celkem 2x, druhý test je týden po prvním.

Pro případ potřeby uvádíme telefonní číslo na Endokrinologický ústav: 224 905 111, kde Vás podle Vaší žádosti spojí s:

Vedoucím LNE..... RNDr. Jara Nedvídková, CSc.

Předsedkyní etické komise..... MUDr. Dagmar Pohunková

Prohlášení:

Přečetla jsem si všechny výše uvedené informace a dostalo se mi příležitosti zeptat se na vše, co jsem potřebovala pro pochopení toho, co účast ve studii pro mne představuje. Dobrovolně dávám svůj souhlas k účasti ve studii, studie a všechna s ní související vyšetření mi byly dostatečně vysvětleny.

V Praze dne:.....

Podpis vyšetřované:.....

Podpis osoby, která souhlas získala:.....

Zdravotní dotazník

Datum

Značka pacienta

Jméno a příjmení

Rodné číslo

Diagnóza

Jaká jste prodělala závažná onemocnění, operace?	
Užíváte nějaké léky (dlouhodobě, momentálně) ?	
Užíváte hormonální antikoncepci (jakou, jak dlouho)?	
Máte pravidelný menstruační cyklus?	
V jaké fázi menstruačního cyklu jste nyní?	
Případně od kdy jste bez menstruace?	
V kolik hodin obvykle vstáváte?	
V kolik hodin obvykle chodíte spát?	
Jste spíše ranní nebo noční typ?	
Jste zvyklá sportovat?	
Jakými sporty se zabýváte a jak často?	
Kouříte (kolik cigaret denně)?	
Snídáte ráno (pravidelně, nepravidelně)?	
Jste vegetariánka?	
Glykémie před pokusem: po pokusu:	
Kdy se u vás poprvé objevilo onemocnění ?	
Jaký mělo od té doby průběh, byla jste už někdy hospitalizována?	

Poznámky:

Určila byste příčinu nemoci (stres, problémy v rodině,	
s přítelem, modeling)?	
Jak často jste zvracela před nástupem do nemocnice?	
Zvracíte nyní (jak často)?	
Jakou jste měla v dospělosti maximální a minimální	
tělesnou hmotnost a kdy?	
Jakou jste měla hmotnost při nástupu do nemocnice?	

Dotazník pocitů hladu a sytosti

Jméno a příjmení:

Datum:

Odovězte prosím na každou z následujících otázek umístěním svislé čárky na úsečku tak jak to odpovídá vašim pocitům

1) Jak velká je vaše touha najíst se ?

velmi malá |-----| velmi silná

2) Jak velký hlad pociťujete ?

vůbec žádný |-----| velký hlad

3) Jak plný se cítíte ? (Máte pocit plnosti břicha?)

vůbec se necítím plný |-----| cítím se velice plný

4) Jak moc byste toho nyní mohl sníst ?

vůbec nic |-----| velmi mnoho

5.2. STANOVENÍ HORMONŮ V KREVNÍ PLASMĚ

5.2.1. PŘÍPRAVA PLASMY

Krev byla sbírána do dvou typů zkumavek a to K₂EDTA a Na₂EDTA s aprotininem. Pro stanovení total ghrelinu a obestatinu byly použity zkumavky Na₂EDTA s aprotininem. Po odběru byly zkumavky uloženy v ledové lázni a k získání plasmy centrifugována po dobu 25 minut při 3000 otáčkách za minutu a 4 °C, následně byla plazma zamrazena při -30 °C.

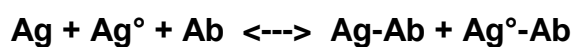
5.2.2. MĚŘENÍ HORMONŮ

Pro stanovení hormonů ghrelinu a obestatinu byla použita metoda radioimunochemického stanovení (Radioimmunoassay, RIA). Metoda byla vyvinuta Rosalyn S. Yalow a Solomon Aaron Berson v 50. letech 20. Století (Yalow, Berson, 1960). V roce 1977 získala Rosalyn Sussman Yalow Nobelovu cenu za objev RIA metody pro insulin.

RIA metoda je velmi citlivá a specifická. Používá se ke změření koncentrace antigenu (např. hladiny hormonu v krvi).

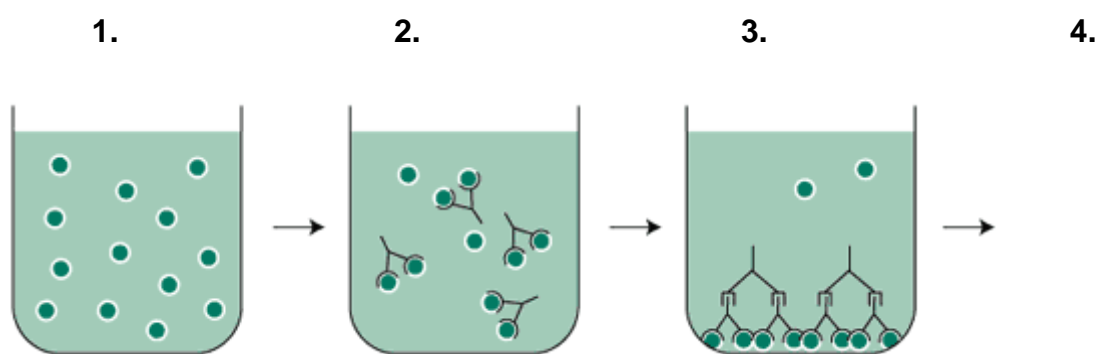
Principem imunochemické reakce je specifická reakce založená na kompetici antigenu (stanovovaný analyt - Ag) a značeného antigenu (radioindikátor - Ag^o) o vazebná místa specifické protilátky - Ab. Kompetice obou antigenů o vazebná místa protilátky je docílena přítomností omezeného množství protilátky. Výsledkem reakce je vznik dvou komplexů antigen-protilátka a to s neznačeným a značeným antigenem, přičemž množství značeného komplexu je nepřímo úměrné původnímu množství stanovovaného antigenu (tzn., že čím je vyšší koncentrace analytu ve stanovovaném vzorku, tím menší množství značeného komplexu [Ag^o-Ab] při reakci vznikne) (<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz>) (Obrázek 5.1).

Schéma reakce:

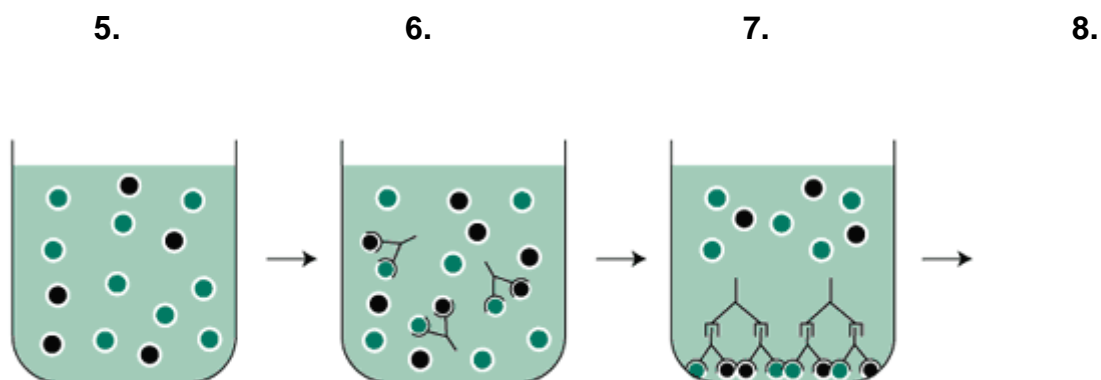


Ag= antigen (ligand), Ag[°]= antigen značený radioaktivním izotopem, Ab= protilátka pro stanovovaný antigen

Kontroly



Neznámé vzorky



Obrázek 5.1 Radioimunochemické stanovení (RIA) (<http://4e.plantphys.net>). Kontroly: 1. Známé množství radioaktivně značeného antigenu. 2. Přidá se ustálené množství specifické protilátky. 3.

Přidáním protilátky proti imunoglobulinu vznikne sraženina komplexu značené protilátky a antigenu.

4. Změření radioaktivity ve vzniklém komplexu. Neznámé vzorky: 5. Smícháme známé množství radioaktivně značeného

antigenu s neznačeným antigenem. 6. Po přidání primární protilátky značený a neznačený antigen soutěží o vazebná místa na protilátce. 7. Přidáním sekundární protilátky vzniká sraženina antigen-protilátka obsahující značený a neznačený antigen. 8. Rozdíl radioaktivity mezi kontrolou a neznámým vzorkem je úměrný množství neznačeného antigenu v neznámém vzorku.

5.2.3. ZMĚŘENÍ KONCENTRACE HORMONŮ VE VZORCÍCH

Pomocí gama měřiče Berthold Multi-Cristal counter LB2104, (Berthold Technologies, Německo) byla měřena odezva vzorků. Gamma záření je změřeno jako počet impulsů za minutu (cpm, counts per minute), který je pomocí kalibrační závislosti převeden na koncentraci měřené látky. Detekční systém je založen na bázi krystalů NaI aktivovaných Tl. Krystal je zapouzdřen v hliníkovém obalu, který odráží světelné fotony zpět do krystalu, a tím zvyšuje účinnost detekce. Spodní stěna krystalu je překryta skleněnou destičkou kvůli hygroskopickým vlastnostem NaI, a viskózním olejem je světlovodivě spojena s čelní stěnou fotonásobiče (www1.lf1.cuni.cz, www.astronuklfyzika.cz). Pro měření všech hormonů bylo použito gama záření emitované izotopem ^{125}I v kanálu odpovídajícím energii 16 – 84 keV a měření proběhlo po dobu 1 minuty.

5.2.4. STANOVENÍ TOTAL GHRELINU

Na stanovení total ghrelinu byl použit Ghrelin (Total) RIA Kit (Linco research, Inc.,USA).

Při stanovení dochází ke kompetici radioaktivně značeného ghrelinu ^{125}I a neznačeného ghrelinu. Čím vyšší je množství ghrelinu ve vzorku, tím je množství radioaktivně značeného ghrelinu vázajícího se na protilátku nižší.

DODÁVANÁ ČINIDLA KITU:

- Ghrelin (Total) Assay Buffer = ředící roztok (připraven k použití)
- Ghrelin(Total) Antibody = králičí antisérum specifické pro ghrelin (připraven k použití)
- ^{125}I -Ghrelin = izotopově značený ghrelin, obsahuje < 56 kBq (lyofilizát)
- Ghrelin (Total) Label Hydrating Buffer = rozpouštědlo pro lyofilizovaný izotop (připraveno k použití)
- Ghrelin (Total) Standard (lyofilizát)
- Ghrelin (Total) Quality Controls 1 and 2 = kontroly kvality 1 a 2 (lyofilizát)
- Precipitating Reagent = precipitační činidlo obsahující Goat anti – Rabbit IgG Serum (připraveno k použití)

POSTUP STANOVENÍ:

1. Příprava reagentů:

- ^{125}I – Ghrelin – rozpustíme v 13,5 ml Ghrelin (Total) Label Hydrating Buffer
- Ghrelin (Total) Standard – přidáme 2 ml destilované nebo deionizované vody a promícháme do úplného rozpuštění
- Ghrelin (Total) Quality Controls 1 and 2 – rozpustíme v 1 ml destilované nebo deionizované vody

2. Následující postup dle návodu v tabulce 5.1

Tabulka 5.1 Stanovení total ghrelin.

DEN 1.					
	KROK 1	KROK 2	KROK 3	KROK 4	
ČÍSLO ZKUMAVKY	PŘIDÁNÍ ŘEDÍCÍHO ROZTOKU (μl)	PŘIDÁNÍ STANDARDU/ KONTROLY/ VZORKU (μl)	PŘIDÁNÍ SPECIFICKÉ PROTILÁTKY (μl)		
1, 2	-	-	100	ZVORTEXUJEME, PŘIKRYJEME A INKUBUJEME 20-24 HODIN PŘI 4°C	
3, 4	300	-	100		
5, 6	200	-	100		
7, 8	100	100 ze zkumavky 6	100		
9, 10	100	100 ze zkumavky 5	100		
11, 12	100	100 ze zkumavky 4	100		
13, 14	100	100 ze zkumavky 3	100		
15, 16	100	100 ze zkumavky 2	100		
17, 18	100	100 ze zkumavky 1	100		
19, 20	100	100 rekonstituovaného standardu	100		
21, 22	100	100 kontroly 1	100		
23, 24	100	100 kontroly 2	100		
25, 26	100	100 neznámého vzorku	100		
DEN 2.		DEN 3.			
	KROK 5	KROK 6	KROK 7		KROK 8
ČÍSLO ZKUMAVKY	PŘIDÁNÍ ¹²⁵I - ghrelinu (μl)	ZVORTEXUJEME, PŘIKRYJEME A INKUBUJEME 22-24 HODIN PŘI 4°C	PŘIDÁNÍ PRECIPITAČNÍHO ČINIDLA (ml)		INKUBACE 20 MINUT PŘI 4°C, CENTRIFUGACE 20 MINUT PŘI 4°C, ODSÁTÍ SUPERNATANTU A ZMĚŘENÍ NA GAMA MĚŘIČI
1, 2	100		-		
3, 4	100		1		
5, 6	100		1		
7, 8	100		1		
9, 10	100		1		
11, 12	100		1		
13, 14	100		1		
15, 16	100		1		
17, 18	100		1		
19, 20	100		1		
21, 22	100		1		
23, 24	100		1		
25, 26	100		1		

5.2.5. STANOVENÍ OBESTATINU

Na stanovení obestatinu byl použit Obestatin (Human, Monkey) RIA Kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc.,USA).

DODÁVANÁ ČINIDLA KITU:

- RIA Buffer = ředící roztok
- Standard Obestatin (Human, Monkey) (lyofilizát)
- Rabbit antiserum specific for the Obestatin (Human, Monkey) (lyofilizát)
- ¹²⁵I – Obestatin (Human, Monkey) = obsahuje < 1,5 µCi (lyofilizát)
- Goat Anti – Rabbit IgG Serum (lyofilizát)
- Normal Rabbit Serum (lyofilizát)
- Positive Control (lyofilizát)

POSTUP STANOVENÍ:

1. Příprava reagentů:

Den 1:

- RIA Buffer – rozpustíme ve 150 ml destilované vody, důkladně promícháme
- Standard Obestatin (Human, Monkey) – přidáme 1 ml ředícího roztoku, důkladně promícháme, skladujeme v ledové lázni
- Positive Control – rozpustíme v 500 µl ředícího roztoku, skladujeme v ledu
- Rabbit antiserum specific for the Obestatin (Human, Monkey) – promícháme ve 13 ml ředícího roztoku, skladujeme v ledu
- Standard A – 50 µl Standard Obestatin (Human, Monkey) + 990 µl ředícího roztoku
- Standard B – 500 µl rozředěného standardu A + 500 µl ředícího roztoku
- Standard C – 500 µl rozředěného standardu B + 500 µl ředícího roztoku

- Standard D – 500 µl rozředěného standardu C + 500 µl ředícího roztoku
- Standard E – 500 µl rozředěného standardu D + 500 µl ředícího roztoku
- Standard F – 500 µl rozředěného standardu E + 500 µl ředícího roztoku
- Standard G – 500 µl rozředěného standardu F + 500 µl ředícího roztoku
- Standard H – 500 µl rozředěného standardu G + 500 µl ředícího roztoku

Den 2 :

- ¹²⁵I – Obestatin (Human, Monkey) – přidáme 13 ml ředícího roztoku a následně mícháme do úplného rozpuštění
- Goat Anti – Rabbit IgG Serum – přidáme 13 ml ředícího roztoku a následně mícháme do úplného rozpuštění
- Normal Rabbit Serum – přidáme 13 ml ředícího roztoku a následně mícháme do úplného rozpuštění

2. Následující postup dle návodu v tabulce 5.2

Tabulka 5.2 Stanovení obestatin.

DEN 1.									
KROK 1		KROK 2		KROK 3		KROK 4			
ČÍSLO ZKUMAVKY	PŘIDÁNÍ ŘEDÍČÍHO ROZTOKU (μl)	PŘIDÁNÍ STANDARDU/ VZORKU (μl)		PŘIDÁNÍ PRIMÁRNÍ PROTILÁTKY (μl)		ZVORTEXUJEME, PŘIKRYJEME A INKUBUJEME 16-24 HODIN PŘI 4°C			
1, 2	-	-		-					
3, 4	200	-		-					
5, 6	100	-		100					
7, 8	-	100 ze standardu H		100					
9, 10	-	100 ze standardu G		100					
11, 12	-	100 ze standardu F		100					
13, 14	-	100 ze standardu E		100					
15, 16	-	100 ze standardu D		100					
17, 18	-	100 ze standardu C		100					
19, 20	-	100 ze standardu B		100					
21, 22	-	100 ze standardu A		100					
23, 24	-	100 pozitivní kontroly		100					
25, 26	-	100 neznámého vzorku		100					

DEN 2.			DEN 3.							
KROK 5		KROK 6	KROK 7	KROK 8	KROK 9	KROK 10	KROK 11			
ČÍSLO ZKUMAVKY	PŘIDÁNÍ ¹²⁵ I - obestatinu (μl)	ZVORTEXUJEME, PŘIKRYJEME A INKUBUJEME 16-24 HODIN PŘI 4°C	PŘIDÁNÍ ANTI-KRÁLIČÍHO IgG SÉRA (μl)	PŘIDÁNÍ NORMÁLNÍHO KRÁLIČÍHO SÉRA (μl)	ZVORTEXUJEME A INKUBUJEME 90 MINUT PŘI POKOJOVÉ TEPLOTĚ	PŘIDÁNÍ ŘEDÍČÍHO ROZTOKU (μl)	ZVORTEXUJEME, KROMĚ ZKUMAVEK č. 1,2 CENTRIFUGUJEME 20 MINUT PŘI 4°C, ODSAJEME SUPERNATANT (KROMĚ ZKUMAVEK č. 1,2) A ZMĚŘÍME NA GAMA MĚŘIČI			
1, 2	100			-		-			-	
3, 4	100			100		100			500	
5, 6	100			100		100			500	
7, 8	100			100		100			500	
9, 10	100			100		100			500	
11, 12	100			100		100			500	
13, 14	100			100		100			500	
15, 16	100			100		100			500	
17, 18	100			100		100			500	
19, 20	100			100		100			500	
21, 22	100			100		100			500	
23, 24	100			100		100			500	
25, 26	100		100	100		500				

5.3. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Výsledky jsou vyhodnoceny jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru

(standard error of mean, SEM) (Obrázek 5.2).

Pro výpočet významnosti jsem použila dvouvýběrový t-test v programu Microsoft office Excel 2003. Dvouvýběrový t-test vychází z určení rozdílu středních hodnot a odchylky tohoto rozdílu.

$$SEM = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

Obrázek 5.2 Výpočet střední chyby průměru (SEM); n= počet pozorování,
 x_i = příslušné měření, \bar{x} = aritmetický průměr změřených hodnot

6. VÝSLEDKY

Postprandiální plasmatické hladiny ghrelinu total a obestatinu se snížily po podání vlákniny s glukosou u kontrolních osob i u pacientek s BN. Podání rozpuštěné vlákniny bez glukosy nevyvolalo pokles v hladinách sledovaných hormonů u obou skupin. Hladiny obou hormonů jsou porovnávány s bazálními hodnotami, které byly změřeny v 0 minutě před podáním rozpuštěné vlákniny.

U zdravých kontrolních osob hladina plasmatického total ghrelinu poklesla na nejnižší hodnotu v 60. minutě a to z hladiny $859 \pm 316,3$ pg/ml na 662 ± 242 pg/ml ($p < 0,05$) po podání vlákniny s glukosou. Obdobný průběh jsme pozorovali i u obestatinu, který poklesl z bazální hladiny $217 \pm 41,7$ na nejnižší hodnotu $185 \pm 37,2$ pg/ml ($p < 0,05$) v 90. minutě po podání vlákniny s glukosou.

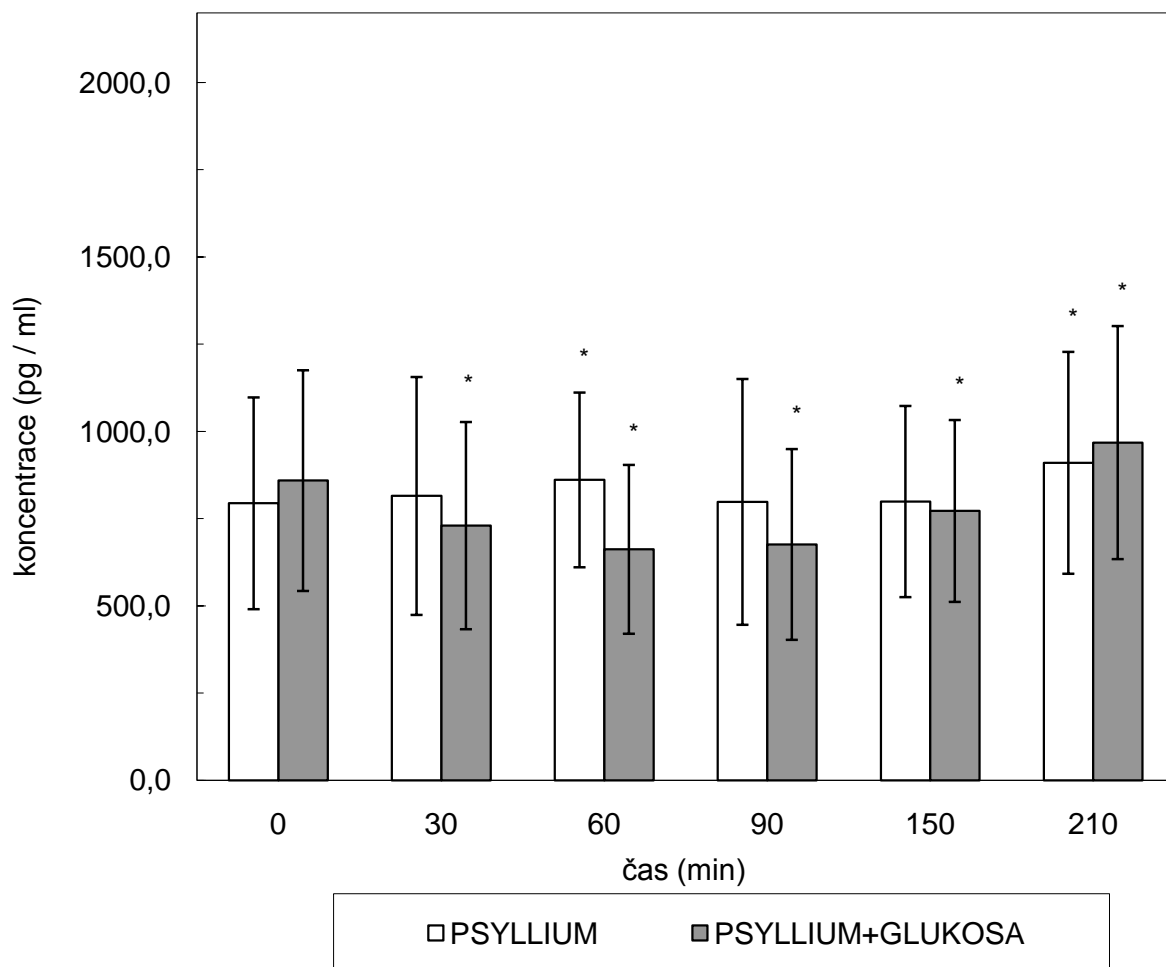
U pacientek s BN plasmatické hladiny ghrelinu poklesly rovněž po konzumaci glukosou obohacené vláknině. Na nejnižší hladinu poklesla hodnota ghrelinu v 60. minutě z 1178 ± 290 na $934 \pm 181,4$ pg/ml ($p < 0,05$). Hladina obestatinu u pacientek s BN se snížila z $239 \pm 42,3$ na nejnižší hodnotu $216 \pm 38,4$ pg/ml ve 30. minutě.

Konzumace rozpuštěné vlákniny bez glukosy nenavodila stejný trend v poklesu hladin u plasmatických hormonů ghrelinu total a obestatinu u pacientek s BN i u zdravých kontrol. Naopak podáním samotné rozpuštěné vlákniny u kontrolních osob došlo ke vzestupu ghrelinu i obestatinu v plasmě během první hodiny, kdy nejvyšších hodnot dosahoval v 60. minutě ghrelin ($861 \pm 250,4$ pg/ml, $p < 0,05$) i obestatin ($217 \pm 41,4$ pg/ml, $p < 0,05$).

U pacientek s BN byl nárůst po samotné vláknině signifikantní ve 150. minutě (267 ± 29 pg/ml, $p < 0,05$).

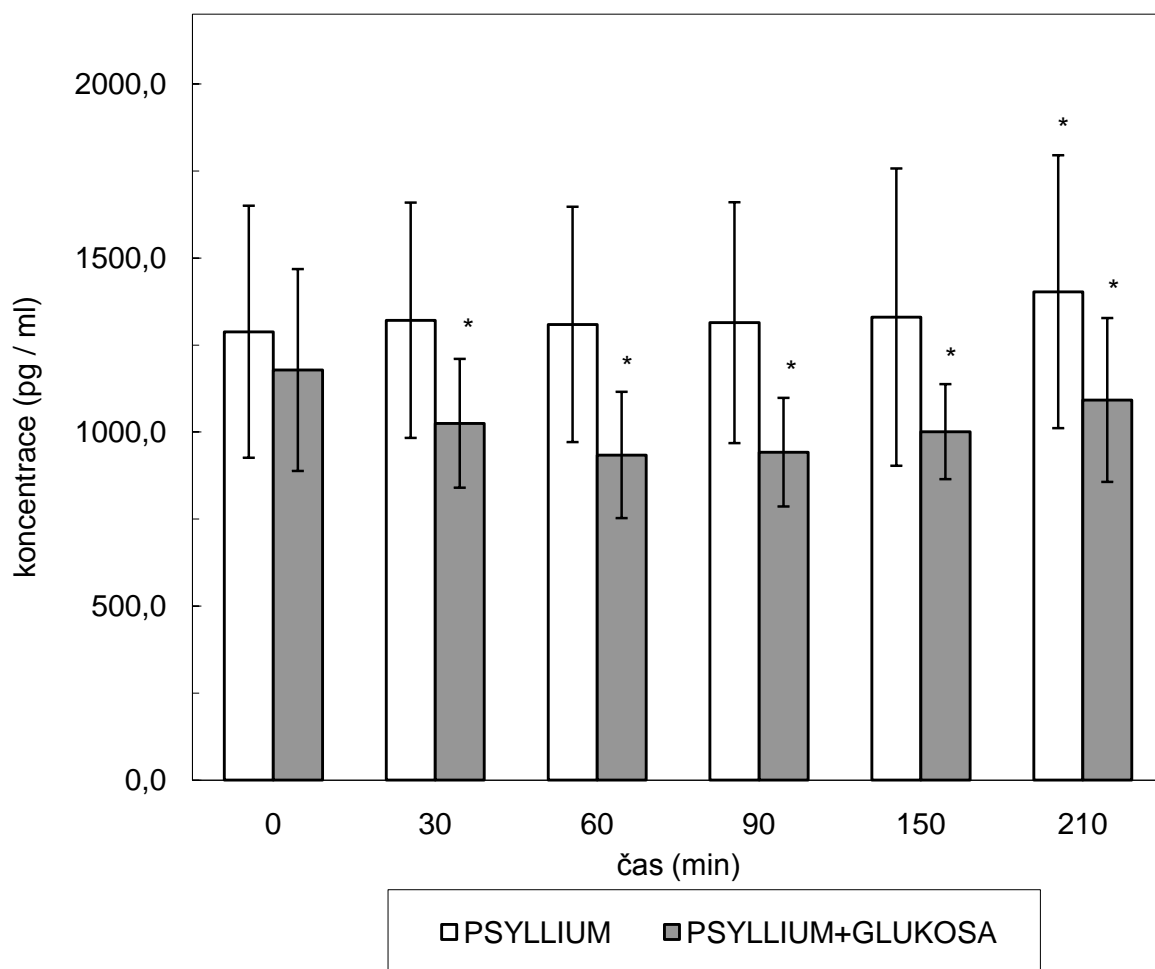
Touha najíst se u kontrolních osob byla během celého testu větší po podání vlákniny bez glukosy. Po vypití rozpuštěné vlákniny s glukosou touha najíst se klesala během prvních 90 ti minut obdobně jako hladina plasmatického ghrelinu. U pacientek s mentální bulimií byla touha k jídlu již na počátku menší v porovnání s kontrolami. Podání samotné vlákniny nevyvolalo pokles, nýbrž dlouhodobý vzestup v touze přijmout potravu. Podáním vlákniny obohacené glukosou došlo podobně jako u kontrolních osob k poklesu potřeby přijímat jídlo.

6.1. GRAFICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ



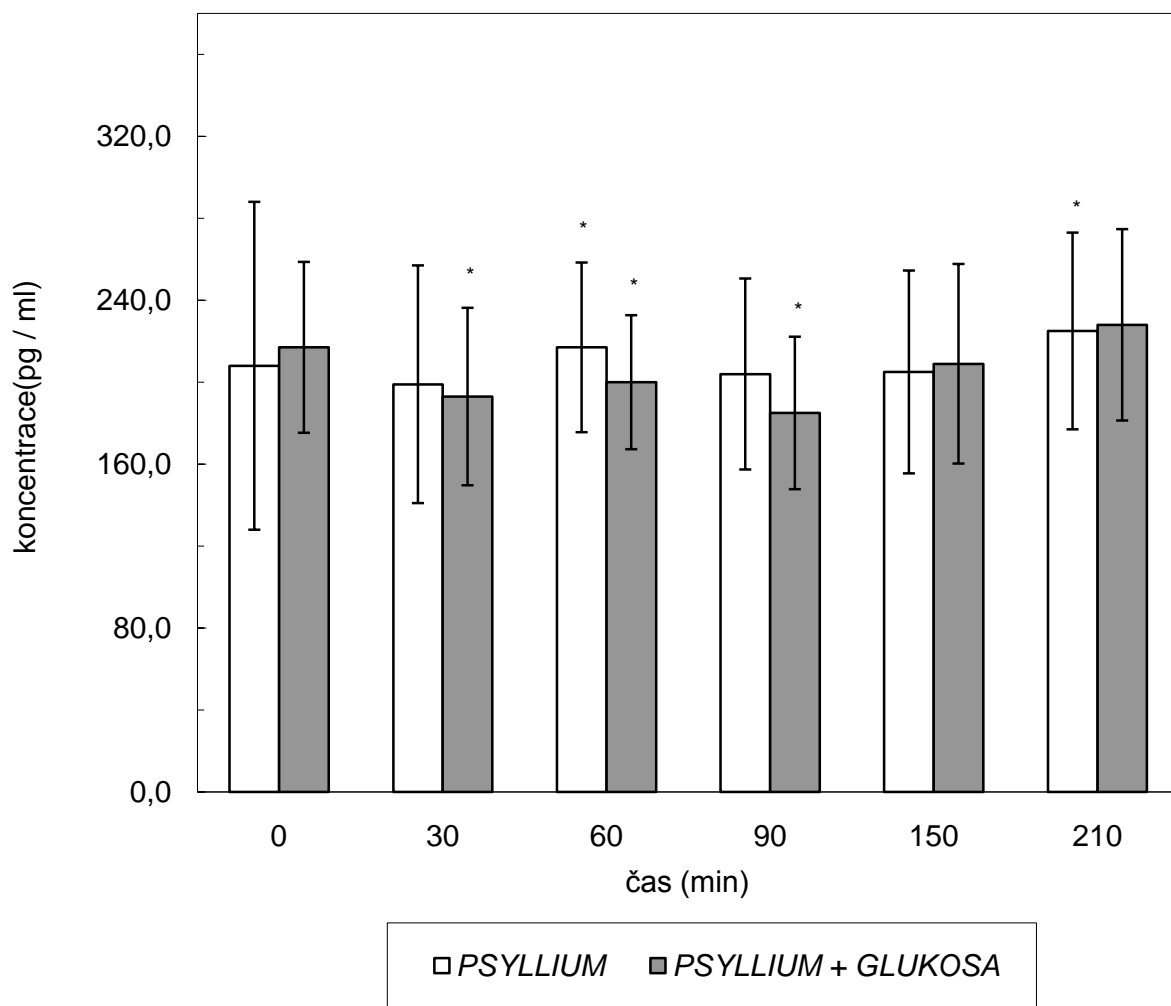
Graf 6.1 Průběh plasmatických hladin ghrelinu po podání rozpuštěné vlákniny a rozpuštěné vlákniny s glukosou u kontrolních žen.

(PS= psyllium, PS + GLUKOSA= psyllium s glukosou; n= 6; vláknina byla podána po odběru v 0 minutě a hladina naměřena v 0 minutě byla považována za bazální hladinu, hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, * označuje rozdíl od bazální hodnoty na hladině významnosti $p < 0,05$)



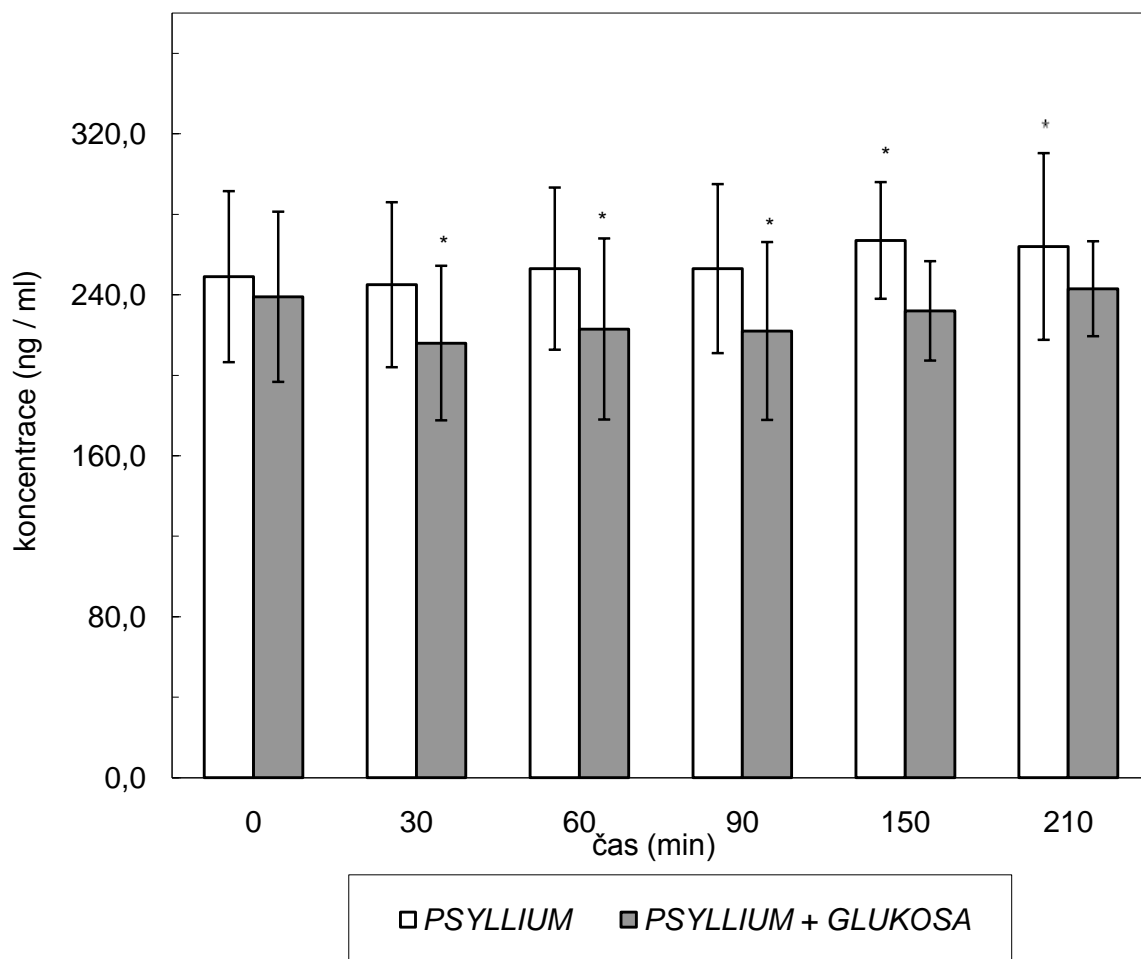
Graf 6.2 Průběh plasmatických hladin ghrelinu po podání rozpuštěné vlákniny a rozpuštěné vlákniny s glukosou u pacientek s mentální bulimií.

(PS= psyllium, PS + GLUKOSA= psyllium s glukosou; n= 6; vláknina byla podána po odběru v 0 minutě a hladina naměřena v 0 minutě byla považována za bazální hladinu, hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, * označuje rozdíl od bazální hodnoty na hladině významnosti $p < 0,05$)



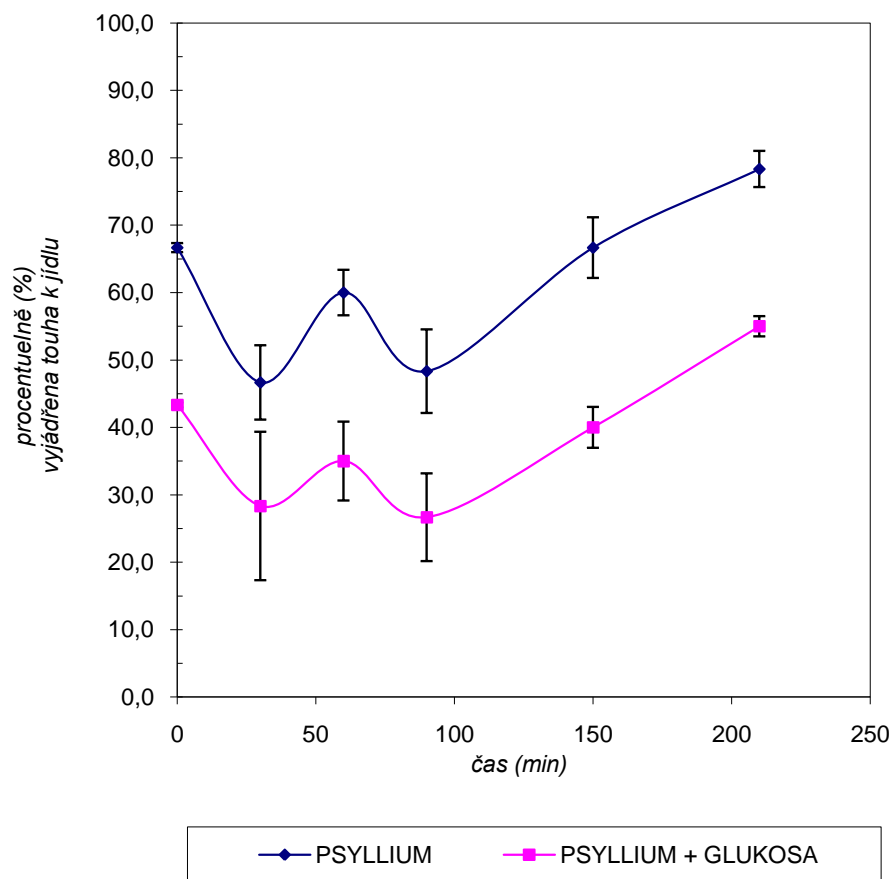
Graf 6.3 Průběh plasmatických hladin obestatinu po podání rozpuštěné vlákniny a rozpuštěné vlákniny s glukosou u kontrolních žen.

(PS= psyllium, PS + GLUKOSA= psyllium s glukosou; n= 6; vláknina byla podána po odběru v 0 minutě a hladina naměřena v 0 minutě byla považována za bazální hladinu, hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, * označuje rozdíl od bazální hodnoty na hladině významnosti $p < 0,05$)



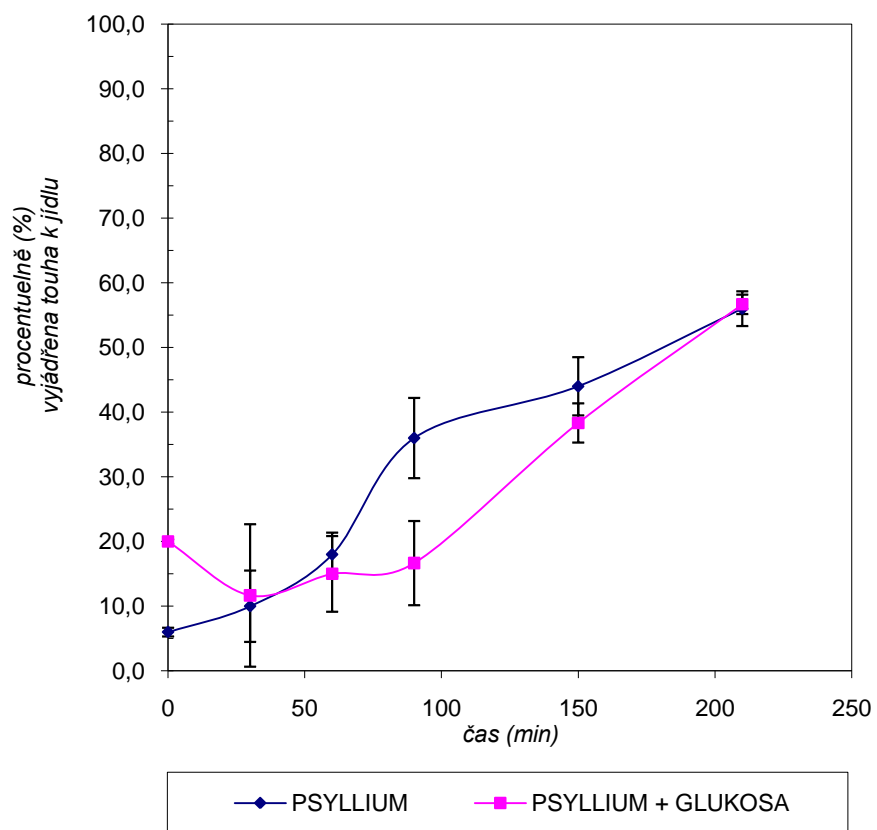
Graf 6.4 Průběh plasmatických hladin obestatinu po podání rozpuštěné vlákniny a rozpuštěné vlákniny s glukosou u pacientek s mentální bulimií.

(PS= psyllium, PS + GLUKOSA= psyllium s glukosou; n= 6; vláknina byla podána po odběru v 0 minutě a hladina naměřena v 0 minutě byla považována za bazální hladinu, hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, * označuje rozdíl od bazální hodnoty na hladině významnosti $p < 0,05$)



Graf 6.5 Touha přijímat potravu v průběhu testu u kontrolních žen.

(PS= psyllium, PS + GLUKOSA= psyllium s glukosou; n= 6; vláknina byla podána po odběru v 0 minutě a hladina naměřena v 0 minutě byla považována za bazální hladinu, hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM)



Graf 6.6 Touha přijímat potravu v průběhu testu u pacientek s BN.

(PS= psyllium, PS + GLUKOSA= psyllium s glukosou; n= 6; vláknina byla podána po odběru v 0 minutě a hladina naměřena v 0 minutě byla považována za bazální hladinu, hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM)

Tabulka 6.1 Pre- (0 min) a postprandiální(30, 60, 90, 150, 210 min) plasmatické hladiny ghrelinu a obestatinu u pacientek s BN a kontrolních žen.

Pacientky s BN

	0 min	30 min	60 min	90 min	150 min	210 min
<i>Obestatin 1 (pg/ml)</i>	249±42.5	245±41.0	253±40.3	253±42	267±29.0 *	264±46.4*
<i>Obestatin 2 (pg/ml)</i>	239±42.3	216±38.4 *	223±45 *	222±44.2 *	232±24.7	243±23.6
<i>GhreTot 1 (pg/ml)</i>	1288±362	1321±338	1309±338	1314±346	1330±427	1403±392 *
<i>GhreTot 2 (pg/ml)</i>	1178±290	1025±185 *	934±181.4 *	942±156 *	1001±136,5 *	1092±235.4 *

Kontrolní ženy

	0 min	30 min	60 min	90 min	150 min	210 min
<i>Obestatin 1 (pg/ml)</i>	208±80	199±58.0	217±41.4 *	204±46.6	205±49.5	225±48 *
<i>Obestatin 2 (pg/ml)</i>	217±41.7	193±43.3 *	200±32.7 *	185±37.2 *	209±48.7	228±46.7
<i>GhreTot 1 (pg/ml)</i>	794±303.5	815±341	861±250.4 *	798±352.3	799±274	910±318 *
<i>GhreTot 2 (pg/ml)</i>	859±316.3	730±297 *	662±242 *	676±273.4 *	772±260.7 *	968,3±334 *

GhreTot 1 - plasmatické hladiny ghrelinu total po podání rozpuštěné vlákniny,

GhreTot 2 - plasmatické hladiny ghrelinu total po podání rozpuštěné vlákniny s glukosou,

Obestatin 1 - plasmatické hladiny obestatinu po podání rozpuštěné vlákniny,

Obestatin 2 - plasmatické hladiny obestatinu po podání rozpuštěné vlákniny s glukosou,

*označuje rozdíl od bazální hodnoty na hladině významnosti $p < 0.05$, hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM

7. DISKUSE

V mé diplomové práci jsem se zaměřila na hormony GI traktu a to na ghrelin a obestatin. Pozorováním změn v hladinách vybraných hormonů v plasmě po podání rozpuštěné vlákniny Psyllia u pacientek s BN a zdravých žen jsem sledovala, jaký vliv má objem stravy a kalorický obsah stravy na plasmatické hladiny ghreluinu a obestatinu u obou skupin probandů.

Ghrelin se řadí mezi orexigenní hormony. Působí na jádra hypothalamu, a tím stimuluje chuť k jídlu. Ghrelin uvolňovaný ze žaludeční tkáně společně s dalšími signály informuje centrálně kontrolovanou energetickou homeostasu v době, kdy se snižují energetické zásoby a je nutné je obnovit (Lely et al., 2004). U lidí jeho hladina stoupá před jídlem, kdy navozuje pocit hladu a klesá po příjmu potravy (Nedvídková et al., 2003). Důležitou funkci ghreluinu v kontrole potravního chování podporuje fakt, že množství tohoto orexigenního hormonu se mění u pacientů s AN a BN. Někteří autoři našli korelaci hladin ghreluinu s hodnotami BMI a tělesnou hmotností (Katsuki et al., 2004, Poykko et al., 2003, Schutte et al., 2007), jiní autoři tuto korelaci nepotvrdili (Pemberton et al., 2003, Sedláčková et al., 2008;). Jakým způsobem se signalizuje ghrelin do mozku zůstává stále otázkou. Jedním ze způsobů by mohla být cesta zahrnující vlákna nervu vagu. Druhou možností by mohl být transport krevním řečištěm přes hematoencefalickou bariéru (Korbonits et al., 2004). Ovšem ve studii ST-Pierra a ost. (2003) nebyl pozorován u vagotomizovaných myší stimulační účinek intraperitoneálně podaného ghreluinu na příjem potravy, což by přechod přes hematoencefalickou bariéru nepotvrdilo (St-Pierre et al., 2003).

Podle Tanaky a ost. (2003) jsou bazální hladiny plasmatického ghreluinu u pacientek s BN zvýšeny oproti kontrolním osobám, přestože nebyly zjištěny rozdíly v BMI mezi pacientkami s BN a zdravými kontrolami (Tanaka et al., 2003b). Tyto výsledky by mohly naznačovat, že neobvyklé potravní chování s epizodami přejídání a následným zvracením má možná různý efekt na žaludeční sekreci a cirkulující hladiny ghreluinu u pacientek s BN. Naproti tomu v jiné studii byly pozorovány bazální hladiny ghreluinu u pacientek s BN s normální hodnotou BMI

obdobné jako u zdravých žen (Monteleone et al., 2008). Tyto rozdílné literární údaje lze vysvětlit různou dobou trvání onemocnění, počtem sledovaných probandů a mírou onemocnění. Sekrece ghrelinu i obestatinu v GI traktu je stimulována mnoha faktory jako např. nervová stimulace (n.vagus), mechanická stimulace (distenze žaludku) a chemická stimulace (nutrienty obsažené v potravě). Typ nutrietů a kalorická hodnota by mohli mít vliv na odpověď ghrelinu po příjmu potravy i u pacientů s poruchami příjmu potravy (Erdmann et al., 2004). Podle Erdmanna a ost. (2004) dojde ke snížení hladin ghrelinu po příjmu sacharidů, naopak ke zvýšení jeho koncentrace po příjmu tuků, proteinů, ovoci a zelenině (Erdmann et al., 2004). Jiní autoři potvrzují závislost poklesu ghrelinu na typu živin a energetické hodnotě stravy zvolené pro tento druh klinických studií (Erdmann et al., 2004, Nakai et al., 2004, Nedvídková et al., 2003, Otto et al., 2005). V mé diplomové práci jsem pozorovala vliv glukosy na snížení hladin orexigenního hormonu ghrelinu v plasmě u zdravých kontrolních žen a pacientek s BN. Postprandiální pokles ghrelinu po sacharidové snídani byl již pozorován v mnoha studiích (Blom et al., 2005, Marzullo et al., 2006, Monteleone et al., 2003). Shiiya T. a ost. (2002) pozorovali pokles plasmatického ghrelinu také po intravenózní aplikaci glukosy u zdravých osob, což by mohlo nasvědčovat tomu, že uvolnění ghrelinu by nemuselo být závislé na mechanickém dráždění žaludeční stěny (Shiiya et al., 2002)

Ve studii Langer a ost. (2005) bylo zjištěno, že po odnětí části žaludku, který je hlavním místem sekrece ghrelinu, u obézních pacientů, došlo ke snížení plasmatického ghrelinu. Rovněž se tímto zákrokem snížila plocha žaludeční tkáně, která mohla být mechanicky drážděna po jídle (Langer et al., 2005).

Ve studii Nedvídkové a ost. (2003) byl zaznamenán pokles u zdravých kontrolních osob po podání rozpuštěné vlákniny a tím možné zapojení distenze žaludku v regulaci sekrece ghrelinu (Nedvídková et al., 2003). Tyto výsledky se mi nepodařilo potvrdit. Podáním rozpuštěné vlákniny bez sacharidů nedošlo k poklesu plasmatických hladin ghrelinu u pacientek s BN ani u zdravých kontrol. To by naopak mohlo souviset s možností, že pouhá distenze žaludku nemá významný vliv na hormon ghrelin, potažmo i na snížení pocitu hladu, který je tímto hormonem ovlivněn nebo s menší skupinou probandů a zároveň vyšší rozdílností v rámci sledovaných skupin.

Původní domněnka, že obestatin, který byl původně zkoumán Zhangem na myších modelech, je potenciálním anorexigením hormonem, byla vyvrácena několika studii (Gourcerol et al., 2006, Holst et al., 2007, Nogueiras et al., 2007, Yamamoto et al., 2007, Zizzari et al., 2007).

Obdobný postprandiální klesající průběh hladin obestatinu a ghrelinu total, který jsem také zaznamenala, po podání vlákniny s glukosou naznačuje, že tyto dva produkty jednoho genu mohou působit podobně na zvýšení příjmu potravy u zdravých osob (Sedláčková et al., 2008). Výsledky Anderwald-Stadlerové a ost. (2007) ukazují rovněž na korelaci mezi ghrelinem a obestatinem, a rovněž ukazují, že hladiny ghrelinu lze předpovědět díky předem známým hladinám obestatinu (Anderwald-Stadler et al., 2007).

Vztah mezi obestatinem a ghrelinem ovšem stále zůstává neobjasněný. Možným vysvětlením postrprandiálního poklesu obou hormonů by mohlo být, že obestatin působí proti orexigenímu účinku ghrelinu po příjmu potravy, tedy že by mohl existovat mezi těmito hormony nějaký druh negativní zpětné vazby.

8. ZÁVĚR

Předložená diplomová práce sledovala změny v hladinách gastrointestinálních hormonů ghrelinu a obestatinu po podání rozpuštěné vlákniny Psyllia a rozpuštěné vlákniny s glukosou u pacientek s mentální bulimií v porovnání se zdravými ženami. Hodnota Body mass indexu se mezi pacientkami s bulimií a kontrolními osobami významně nelišila.

Prokázali jsme, že plasmatické hladiny sledovaných hormonů u obou skupin probandů po příjmu vlákniny s vysokým obsahem glukosy klesají a tím i možný orexigenní efekt obou hormonů.

Nepodařil se prokázat pokles plasmatických hladin ghrelinu i obestatinu po konzumaci samotné neslazené vlákniny, která měla vyvolat efekt mechanického dráždění žaludeční tkáně. Tím také nebyl prokázán efekt na sekreci hormonů ghrelinu a obestatinu po naplnění žaludku bez příjmu živin. Možnou příčinou, proč jsem nezaznamenala významný pokles v hladinách sledovaných hormonů u kontrolních žen, by mohl být nižší počet probandů ve skupinách, odlišné stravovací návyky v rámci skupiny zdravých žen i pacientek s mentální bulimií a užívání antidepresiv u skupiny pacientek s mentální bulimií. Ovšem u pacientek s mentální bulimií by se mohly hormony ghrelin i obestatin uplatňovat na patologii tohoto onemocnění.

Hormony ghrelin a obestatin přispívající k regulaci energetické homeostasy vznikají ze společného prekurzoru. Je možné, že pokud se organismus vyskytne v energetické nerovnováze způsobené hladověním, či nadměrnou konzumací potravy spojenou s vyvolaným zvracením, může dojít k alternativnímu sestřihu preproghrelinu, ze kterého vzniká ghrelin i obestatin. Ovšem o mechanismu alternativního sestřihu v současné době není mnoho známo.

K lepšímu pochopení patologických stavů, jako je například mentální anorexie, mentální bulimie a obezita, je důležité také sledovat další hormony podílející se na příjmu potravy a potravním chování. Za přínos považuji objasnění mechanismu působení těchto hormonů, které by mohlo vést k rozvoji farmakologických léčiv s účinkem na hormonální nerovnováhu v důsledku onemocnění.

9. LITERATURA

Anderwald-Stadler, M., Krebs, M., Promintzer, M., Mandl, M., Bischof, M.G., Nowotny, P., Kästenbauer, T., Luger, A., Prager, R., and Anderwald, Ch. (2007) Plasma obestatin is lower at fasting and not suppressed by insulin in insulin-resistant humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293: 1393-1398.

Banks, W.A., Tschöp, M., Robinson, S.M., and Heiman, M.L. (2002) Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302(2): 822-7.

Blom, W.A., Stafleu, A., de Graaf, C., Kok, F.J., Schaafsma, G., and Hendriks, H.F. (2005) Ghrelin response to carbohydrate-enriched breakfast is related to insulin. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(2): 367-75.

Broglio, F., Arvat, E., Benso, A., Gottero, C., Muccioli, G., Papotti, M., van der Lely, A.J., Deghenghi, R., and Ghigo, E. (2001) Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(10): 5083-6.

Broglio, F., Gottero, C., Van Koetsveld, P., Prodham, F., Destefanis, S., Benso, A., Gauna, C., Hofland, L., Arvat, E., Van Der Lely, A.J., and Gigo, E. (2004) Acetylcholine regulates ghrelin secretion in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89: 2429-2433. (a)

Broglio, F., Gianotti, L., Destefanis, S., Fassino, S., Abbate Daga, G., Mondelli, V., Lanfranco, F., Gottero, C., Gauna, C., Hofland, L., Van der Lely, A.J., and Ghigo, E. (2004) The endocrine response to acute ghrelin administration is blunted in patients with anorexia nervosa, a ghrelin hypersecretory state. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 60: 592-9. (b)

Cummings, D.E., Foster-Schubert, K.E., and Overduin, J. (2005) Ghrelin and Energy Balance: Focus on Current Controversies. *Current Drug Targets* 6: 153-169.

Date, Y., Toshinai, K., Koda, S., Miyazato, M., Shimbara, T., Tsuruta, T., Nijjima, A., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2005) Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology* 146(8): 3518-25.

Erdmann, J., Töpsch, R., Lippl, F., Gussmann, P., and Schusdziarra, V. (2004) Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake, plasma insulin and glucose. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89: 3048-3054.

Fairburn, C.G., Welch, S.L., Doll, H.A., Davies, B.A., and O'Connor, M.E. (1997) Risk factors for bulimia nervosa. A community-based case-control study. *Arch. Gen. Psychiatry* 54(6): 509-17.

Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S.A., Morris, D.G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A.B., and Korbonits, M. (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87: 2988-2991.

Gourcerol, G., Million, M., Adelson, D.W., Wang, Y., Wang, L., Rivier, J., St-Pierre, D.H., and Tache Y. (2006) Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents. *Peptides* 27: 2811-2819.

Holst, B., Egerod, K.L., Schild, E., Vickers, S.P., Cheetham, S., Gerlach, L.O., Storjohann, L., Stidsen, C.E., Jones, R., Beck-Sickinger, A.G., and Schwartz, T.W. (2007) GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology* 148: 13-20.

Hosoda, H., Kojima, M., and Kangawa K. (2002) Ghrelin and the Regulation of Food Intake and Energy Balance. *Molecular Interventions*, Volume 2, Issue 8: 494-503 .

Katsuki, A., Urakawa, H., Gabazza E.C., Murashima, S., Nakatani, K., Togashi, K., Yano, Y., Adachi, Y., and Sumida, Y. (2004) Circulating levels of active ghrelin is associated with abdominal adiposity, hyperinsulinemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *European journal of endocrinology* 151: 573-577.

Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.

Kojima, M., Hosoda, H., Kaiya, H., and Kangawa, K. (2004) Discovery of ghrelin, an endogenous ligand for the growth-hormone secretagogue receptor. In: *Ghrelin*, Kluwer Academic Publishers, Ghigo, E., Massachusetts, USA, pp. 15-25.

Kojima, M., Hosoda, H., Matsuo, H., and Kangawa, K. (2001) Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 12: 118-122.

Kojima, M., and Kangawa, A.K. (2005) Ghrelin: structure and function. *Physiological Reviews* 85:495-522.

Konturek, P.C., Konturek, J.W., Cześnikiewicz-Guzik, M., Brzozowski, T., Sito, E., and Konturek, S.J. (2005) Neuro-hormonal control of food intake, basic mechanisms and clinical implications. *Journal of Physiology and Pharmacology* 56: 5-25.

Korbonits, M., and Grossman, A.B. (2004) Ghrelin: update on a novel hormonal system. *Eur. J. Endocrinol.* 151 Suppl 1: 67-70.

Krch František David a kolektiv (1999) Poruchy příjmu potravy: vymezení a terapie. Praha: Grada.

Langer, F.B., Reza Hoda, M.A., Bohdjalian, A., Felberbauer, F.X., Zacherl, J., Wenzl, E., Schindler, K., Luger, A., Ludvik, B., and Prager, G. (2005) Sleeve gastrectomy and gastric banding: effects on plasma ghrelin levels. *Obes. Surg.* 15: 1024-1029.

Lauwers, E., Landuyt, B., Arckens, L., Schoofs, L., and Luyten, W. (2006) Obestatin does not activate orphan G protein-coupled receptor GPR39. *Biochemical and biophysical research communications* 351: 21-25.

Lely Van Der, A.J., Tschöp, M., Heiman, M.L., and Ghigo, E. (2004) Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrine Reviews* 25:3: 426-457.

Lippl, F., Erdmann, J., Lichter, N., Tholl, S., Wagenpfeil, S., Adam, O., and Schusdziarra, V. (2008) Relation of plasma obestatin levels to BMI, gender, age and insulin. *Hormone and metabolic research* 40: 806-812.

Marzullo, P., Caumo, A., Savia, G., Verti, B., Walker, G.E., Maestrini, S., Tagliaferri, A., Di Blasio, A.M., and Liuzzi, A. (2006) Predictors of postabsorptive ghrelin secretion after intake of different macronutrients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91(10): 4124-30.

Misra, M., Miller, K.K., Kuo, K., Griffin, K., Stewart, V., Hunter, E., Herzog, D.B., and Klibanski, A. (2005) Secretory dynamics of ghrelin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289(2): 347-56.

Monteleone, P., Castaldo, E., and Maj, M. (2008) Neuroendocrine dysregulation of food intake in eating disorders. *Regul. Pept.* 7, 149(1-3): 39-50.

Monteleone, P., Bencivenga, R., Longobardi, N., Serritella, C., and Maj, M. (2003) Differential responses of circulating ghrelin to high-fat or high-carbohydrate meal in healthy women. *J Clin Endocrinol. Metab.* 88(11): 5510-4.

Muccioli, G., Tschöp, M., Papotti, M., Deghenghi, R., Heiman, and M., Ghigo, E. (2002) Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *European Journal of Pharmacology* 440: 235-254.

Muller, A.F., Janssen, J.A., Hofland, L.J., Lamberts, S.W., Bidlingmaier, M., Strasburger, C.J., and van der Lely, A.J. (2001) Blockade of the growth hormone (GH) receptor unmasks rapid GH-releasing peptide-6-mediated tissue-specific insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(2): 590-593.

Nagaya, N., Kojima, M., Uematsu, M., Yamagishi, M., Hosoda, H., Oya, H., Hayashi, Y., and Kangawa K. (2001) Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280(5): 1483-1487. (a)

Nagaya, N., Miyatake, K., Uematsu, M., Oya, H., Shimizu, W., Hosoda, H., Kojima, M., Nakanishi, N., Mori, H., and Kangawa, K. (2001) Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86(12): 5854-9. (b)

Nakahara, T., Harada, T., Yasuhara, D., Shimada, N., Amitani, H., Sakoguchi, T., Kamiji, M.M., Asakawa, A., and Inui, A. (2008) Plasma obestatin concentrations are negatively correlated with body mass index, insulin resistance index, and plasma leptin concentrations in obesity and anorexia nervosa. *Biological Psychiatry* 64: 252-255.

Nakai, Y., Hosoda, H., Nin, K., Ooya, C., Hayashi, H., Akamizu, T., and Kangawa, K. (2004) Short-term secretory regulation of the active form of ghrelin and total ghrelin during an oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa. *European journal of endocrinology* 150: 913-914.

Nedvídková, J., and Nedvídek, J. (2007) Ghrelin a další hormony příjmu potravy a energetické rovnováhy. V: *Pokroky v endokrinologii*. Stárka L. a kolektiv, Maxdorf, 212-231.

Nedvídková, J., Krykorková, I., Barták, V., Papežová, H., Gold, P.W., Alesci, S., and Pacak, K. (2003) Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88(4): 1678-82.

Nogueiras, R., Pfluger, P., Tovar, S., Arnold, M., Mitchell, S., Morris, A., Perez-Tilve, D., Vazquez, M.J., Wiedmer, P., Castaneda, T.R., DiMarch, R., Tschöp, M., Schurmann, A., Joost, H.G., Williams, L.M., Langhans, W., and Dieguez, C. (2007) Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* 148: 21-26.

Otto, B., Tschöp, M., Frühauf, E., Heldwein, W., Fichter, M., Otto, C., and Cuntz, U. (2005) Postprandial ghrelin release in anorectic patients before and after weight gain. *Psychoneuroendocrinology* 30: 577-581.

Papežová, H., Yamamotová, A., and Uher, R. (2002) Neurobiologie poruch příjmu potravy (PPP). *Psychiatrie* 6(4): 268-275.

Pemberton, C., Wimalasena, P., Yandle, T., Soule, S., and Richards, M. (2003) C-terminal pro-ghrelin peptides are present in the human circulation. *Biochemical and biophysical research communications* 310: 567-573.

Poykko, S.M., Kellokoski, E., Horkko, S., Kauma, H., Kesaniemi, Y.A., and Ukkola, O. (2003) Low plasma ghrelin is associated with insuline resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* 52: 2546-2553.

Sedláčková, D., Dostálová, I., Hainer, V., Beranová, L., Kvasnicková, H., Hill, M., Haluzík, M., and Nedvídková, J. (2008) Simultaneous decrease of plasma obestatin and ghrelin levels after a high-carbohydrate breakfast in healthy women. *Physiol. Res.* 1: 29-37.

Shiia, T., Nakaqzato, M., Mizuta, M., Date, Y., Mondal, M.S.W., Tanaka, M., Nozoe, S., Hosoda, H., Kangawa, K., and Matsukura, S. (2002) Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 240-244.

Schutte, A.E., Huisman, H.W., Schutte, R., van Rooyen, J.M., Malan, L., and Malan, N.T. (2007) Aging influences the level and functions of fasting plasma ghrelin levels. The POWIRS-Study. *Regulatory Peptides* 139: 65-71.

Soriano-Guillén, L., Barrios, V., Campos-Barros, A., and Argente, J. (2004) Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J. Pediatr.* 144(1): 36-42.

St-Pierre, D.H., Wang, L., and Taché, Y. (2003) Ghrelin: a novel player in the gut-brain regulation of growth hormone and energy balance. *News Physiol. Sci.* 18: 242-6.

Tanaka, M., Naruo, T., Yasuhara, D., Tatebe, Y., Nagai, N., Shiia, T., Nakazato, M., Matsukura, S., and Nozoe, S. (2003) Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 28(7): 829-35. (a)

Tanaka, M., Naruo, T., Nagai, N., Kuroki, N., Shiia, T., Nakazato, M., Matsukura, S., Nozoe, S. and (2003) Habitual binge/purge behavior influences circulating ghrelin levels in eating disorders. *J. Psychiatr. Res.* 37(1): 17-22. (b)

Ueno, H., Yamaguchi, H., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2005) Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. *Regulatory Peptides* 126: 11-19.

Vicennati, V., Genghini, S., De lasio, R., Pasqui, F., Pagotto, U., and Pasquali, R. (2007) Circulating obestatin levels and the ghrelin/obestatin ratio in obese women. *Eur. J. Endocrinol.* 157(3): 295-301.

Wren, A.M., Seal, L.J., Cohen, M.A., Brynes, A.E., Frost, G.S., and Murphy, K.G. (2001) Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 5992-5.

Yalow, R.S., Berson, S.A. (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *The Journal of Clinical Investigation* 39: 1157-1175.

Yamamoto, D., Ikeshita, N., Daito, R., Herningtyas, E.H., Toda, K., Takahashi, K., Iida, K., Takahashi, Y., Kaji, H., Chihara, K., and Okimura, Y. (2007) Neither intravenous nor intracerebroventricular administration of obestatin affects the secretion of GH, PRL, TSH and ACTH in rats. *Regul. Pept.* 138: 141-144.

Yamazaki, M., Nakamura, K., Kobayashi, H., Matsubara, M., Hayashi, Y., Kangawa, K., and Sakai, T. (2002) Regulational Effect of Ghrelin on Growth Hormone Secretion from Perfused Rat Anterior Pituitary Cells. *Journal of Neuroendocrinology* 14: 156-162.

Yildiz, B.O., Suchard, M.A., Wong, M.L., McCann, S.M., and Licinio, J. (2004) Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101(28): 10434-9.

Zamrazilová, H., Hainer, V., Sedláčková, D., Papezová, H., Kunesová, M., Bellisle, F., Hill, M., and Nedvídková J. (2008) Plasma obestatin levels in normal weight, obese and anorectic women. *Physiol. Res.* 57 Suppl 1: 49-55.

Zhang, J.V., Ren, P.G., Avsian-Kretchmer, O., Luo, C.W., Rauch, R., Klein, C., and Hsueh, A.J. (2005) Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310: 996-999.

Zizzari, P., Longchamps, R., Epelbaum, J., and Bluet-Pajot, M.T. (2007) Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* 148: 1648-1653

<http://4e.plantphys.net/article.php?ch=0&id=182>

<http://www.anabell.cz/index.php/clanky-a-vase-pribehy/poruchy-prijmu-potravy/10-obecn-o-poruchach-pijmu-potravy/105-mentalni-bulimie>

<http://astronuklfyzika.cz/DetekceSpektrometrie.htm#4>

<http://www.cellbiol.net/ste/alpobesity4.php>

<http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200610/hypertext/BAAAC.htm>

<http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm>

<http://www.uzis.cz/cz/mkn/index.html>

Příloha 1 Protokol pro odběr krve

Datum

Značka pacienta

Jméno a příjmení

Rodné číslo

Diagnóza

1. **-30.min.** – odběry krve:

1 x růžová zkumavka 4 ml (Na₂EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !

1 x fialová zkumavka 4 ml (K₂EDTA) – do ledové lázně !

2. **0.min.** – odběry krve:

1 x růžová zkumavka 4 ml (Na₂EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !

3 x fialová zkumavka 4 ml (K₂EDTA) – do ledové lázně !

SNÍDANĚ – 15 minut

3. **30. min.** – (30 min. po ukončení snídane) - odběry krve:

1 x růžová zkumavka 4 ml (Na₂EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !

1 x fialová zkumavka 4 ml (K₂EDTA) – do ledové lázně !

4. 60. min. – odběry krve:

1 x růžová zkumavka 4 ml (Na₂EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !

1 x fialová zkumavka 4 ml (K₂EDTA) – do ledové lázně !

5. 90. min. – odběry krve:

1 x růžová zkumavka 4 ml (Na₂EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !

1 x fialová zkumavka 4 ml (K₂EDTA) – do ledové lázně !

Následující odběry po hodině !!!

6. 150. min. – odběry krve:

1 x růžová zkumavka 4 ml (Na₂EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !

1 x fialová zkumavka 4 ml (K₂EDTA) – do ledové lázně !

7. 210. min. – odběry krve:

1 x růžová zkumavka 4 ml (Na₂EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !

2 x fialová zkumavka 4 ml (K₂EDTA) – do ledové lázně !