

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra fyziologie živočichů**

---

**VLIV SACHARIDOVÉ SNÍDANĚ NA  
HLADINY VYBRANÝCH HORMONŮ  
ENERGETICKÉ HOMEOSTÁZY U  
PACIENTEK S ANOREXIA NERVOSA**

**THE EFFECT OF HIGH CARBOHYDRATE BREAKFAST  
TO SELECTED HORMONAL PARAMETERS OF  
ENERGY HOMEOSTASIS IN PATIENTS WITH  
ANOREXIA NERVOSA**

Diplomová práce

studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Praha 2009

Jana Kopečková

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857. Dále je součástí rozsáhlé 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).

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením vedoucí práce RNDr. Jary Nedvídkové, CSc. a odborného konzultanta Doc. RNDr. Stanislava Vybírala, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Endokrinologický ústav a Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu ústavu a univerzity.

V Praze dne.....*4.5.2009*.....

*Jana Jiráková*  
.....

podpis

Můj dík za pomoc, podporu a odborné rady při vypracování diplomové práce patří RNDr. Jaře . Nedvídkové, CSc. z Endokrinologického ústavu, doc. RNDr. Stanislavu Vybíralovi, CSc. z Katedry fyziologie živočichů a RNDr. Daně Sedláčkové. Za technickou výpomoc v laboratoři děkuji Dianě Riegerové a Nadě Procházkové.

# OBSAH

<b>OBSAH</b>	<b>4</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b>	<b>6</b>
<b>1 ÚVOD</b>	<b>8</b>
<b>2 LITERÁRNÍ PŘEHLED</b>	<b>10</b>
<b>2.1 LEPTIN</b>	<b>12</b>
2.1.1 LEPTINOVÝ RECEPTOR (OB-R)	14
2.1.2 VZTAH LEPTINU A OSTATNÍCH HORMONŮ	14
2.1.3 ZMĚNY V HLADINÁCH LEPTINU PO PŘÍJMU POTRAVY	15
<b>2.2 GHRELIN</b>	<b>16</b>
2.2.1 RECEPTORY GHRELINU	19
2.2.2 VZTAH GHRELINU A OSTATNÍCH HORMONŮ	19
2.2.3 ZMĚNY V HLADINÁCH GHRELINU PO PŘÍJMU POTRAVY	19
<b>2.3 OBESTATIN</b>	<b>21</b>
2.3.1 OBESTATINOVÝ RECEPTOR	22
2.3.2 ZMĚNY V HLADINÁCH OBESTATINU PO PŘÍJMU POTRAVY	22
<b>2.4 ANOREXIA NERVOSA</b>	<b>23</b>
2.4.1 DIAGNOSTICKÁ KRITÉRIA	23
2.4.2 METABOLICKÉ A ENDOKRINNÍ ZMĚNY U PACIENTEK S AN	24
2.4.3 ZMĚNY SLEDOVANÝCH HORMONŮ U PACIENTEK S AN	25
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>26</b>
<b>3.1 KRITÉRIA VÝBĚRU PROBANDEK – KONTROLNÍCH OSOB A PACIENTEK S AN</b>	<b>26</b>
<b>3.2 PRŮBĚH VYŠETŘENÍ</b>	<b>26</b>
<b>3.3 METODY STANOVENÍ</b>	<b>32</b>
3.3.1 ZPRACOVÁNÍ PLAZMY	32

<b>3.3.2 RADIOIMUNOCHEMICKÉ STANOVENÍ</b>	<b>32</b>
3.3.2.1. STANOVENÍ LEPTINU	35
3.3.2.2 STANOVENÍ TOTAL GHRELINU	37
3.3.2.3 STANOVENÍ OBESTATINU	39
<b>3.3.3 STANOVENÍ KONCENTRACÍ HORMONŮ VE VZORCÍCH</b>	<b>42</b>
<b>3.3.4 STANOVENÍ INZULINU</b>	<b>42</b>
<b>3.3.5 STANOVENÍ GLUKÓZY</b>	<b>42</b>
<b><u>3.4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ</u></b>	<b><u>44</u></b>
<b><u>4 VÝSLEDKY</u></b>	<b><u>45</u></b>
<b><u>4.1. GRAFICKÉ ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ</u></b>	<b><u>45</u></b>
4.1.1 BAZÁLNÍ HODNOTY MĚŘENÝCH PARAMETRŮ	45
4.1.2 PRŮBĚH HLADIN STANOVOVANÝCH HORMONŮ PO PODÁNÍ SACHARIDOVÉ SNÍDANĚ	47
4.1.3 POROVNÁNÍ PRŮBĚHU HLADIN STANOVOVANÝCH HORMONŮ PO PODÁNÍ SACHARIDOVÉ SNÍDANĚ	52
<b><u>4.2 VÝSLEDKY</u></b>	<b><u>55</u></b>
<b><u>5 DISKUSE</u></b>	<b><u>57</u></b>
<b><u>6 ZÁVĚR</u></b>	<b><u>63</u></b>
<b><u>7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</u></b>	<b><u>65</u></b>
<b><u>8 DALŠÍ SEZNAMY</u></b>	<b><u>86</u></b>
<b><u>8.1 SEZNAM OBRÁZKŮ</u></b>	<b><u>86</u></b>
<b><u>8.2. SEZNAM PŘÍLOH</u></b>	<b><u>86</u></b>
<b><u>8.3 SEZNAM TABULEK</u></b>	<b><u>86</u></b>
<b><u>8.4 SEZNAM GRAFŮ</u></b>	<b><u>87</u></b>

## Seznam použitých zkratk

<b><math>\alpha</math>-MSH</b>	$\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -melanocyty stimulující hormon)
<b><math>\beta</math>-MSH</b>	$\beta$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\beta$ -melanocyty stimulující hormon)
<b><math>^{125}\text{I}</math></b>	izotop jódu s nukleonovým číslem 125
<b>Ab</b>	antibody (protilátka)
<b>ADP</b>	adenosindifosfát
<b>Ag</b>	antigen
<b>Ag<sup>o</sup></b>	značený antigen
<b>AgRP</b>	agouti-related peptide
<b>AN</b>	anorexia nervosa (mentální anorexie)
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>BMI</b>	body mass index
<b>BN</b>	bulimia nervosa (mentální bulimie)
<b>Bq</b>	becquerel - jednotka radioaktivity
<b>CART</b>	cocaine-amphetamine related transcript (peptidy transkripčně regulované kokainem a amfetaminem)
<b>Ci</b>	curie - jednotka radioaktivity
<b>CNS</b>	centrální nervová soustava
<b>cpm</b>	counts per minute (impulzy za minutu) - jednotka radioaktivity
<b>Da</b>	dalton - atomová hmotnostní jednotka
<b>DSM-IV</b>	Diagnostický a statistický manuál americké Psychiatrické asociace, 4. vydání
<b>ECLIA</b>	elektrochemoluminiscenční imunoanalýza
<b>EDTA</b>	disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
<b>G-6-PD</b>	glukóza-6-fosfát-dehydrogenáza
<b>G-6-PO<sub>4</sub></b>	glukóza-6-fosfát
<b>GH</b>	growth hormone (růstový hormon)
<b>GHS-R</b>	growth hormone secretagogue receptor
<b>GIT</b>	gastrointestinální trakt
<b>GPCR</b>	G-protein coupled receptor (receptor spřažený s G-proteinem)

<b>IgG</b>	imunoglobulin G
<b>IS</b>	inzulinová senzitivita
<b>IU l<sup>-1</sup></b>	International Unit (mezinárodní jednotka) na litr - jednotka koncentrace
<b>J</b>	joule - odvozená jednotka práce, energie a tepla
<b>keV</b>	kiloelektronvolt (10 <sup>3</sup> elektronvoltů)– jednotka energie
<b>MgO</b>	oxid hořečnatý
<b>mRNA</b>	messenger ribonucleic acid (messenger ribonukleová kyselina)
<b>NADP</b>	nikotinamidadeninukleotidfosfát
<b>NaI</b>	jodid sodný
<b>NPY</b>	neuropeptid Y
<b>OB-R</b>	leptinový receptor
<b>POMC</b>	proopiomelanocortin
<b>RIA</b>	radioimmunoassay (radioimunochemické stanovení)
<b>Tl</b>	thalium
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor necrosis factor $\alpha$

# 1 ÚVOD

Příjem potravy patří k základům udržení stabilních životních funkcí nejen u člověka. Energetický obsah potravy může organismus po zpracování v trávicím traktu přímo využít nebo uložit v podobě zásob, zejména tuků v adipocytech [1]. U některých osob může dojít k narušení tohoto elementárního pochodu, což vede k závažným somatickým, psychickým a sociálním důsledkům. Tyto poruchy nazýváme poruchami příjmu potravy. Řadíme mezi ně především mentální anorexii (anorexia nervosa, AN), mentální bulimii (bulimia nervosa, BN) a obezitu.

V mé diplomové práci jsem se zaměřila na změny v hladinách vybraných hormonů ovlivňujících příjem potravy, které slouží jako základní indicie energetické homeostázy, u pacientek s AN v porovnání se zdravými kontrolními ženami po příjmu potravy (snídaně) s přesně definovanou nutriční hodnotou. U pacientek s AN jsou plazmatické koncentrace hormonů stejně jako jejich odpovědi na kalorický příjem narušeny z důvodu narušeného potravního chování trvajících delší dobu. Výsledky studií, které sledují hormonální a metabolické změny u pacientů s poruchami příjmu potravy, jsou důležité pro pochopení patofyziologie zmíněných onemocnění a pro potenciální možnost léčit tyto poruchy díky poznatkům o hormonech ovlivňujících příjem potravy a jejich regulačních vztazích.

### **Cíle diplomové práce:**

- porovnání bazálních hladin hormonů leptinu, ghrelinu a obestatinu v plazmě u zdravých kontrolních žen a pacientek s AN
- sledování průběhu plazmatických hladin hormonů ghrelinu a obestatinu a jejich poměru po příjmu potravy s přesně definovanou nutriční hodnotou (sacharidová snídaně s celkovým obsahem energie 1604 kJ), porovnání průběhu hladin hormonů u zdravých žen a při onemocnění AN
- sledování vztahu plazmatických hladin hormonů ghrelinu a obestatinu s hladinami inzulínu a glukózy po příjmu potravy s přesně definovanou nutriční hodnotou (sacharidová snídaně s celkovým obsahem energie 1604 kJ), porovnání těchto vztahů u zdravých žen a při onemocnění AN

## 2 Literární přehled

Příjem potravy, její zpracování, ukládání a čerpání tukových rezerv jsou řízeny centrální nervovou soustavou (CNS) na základě mnohočetných nervových a hormonálních signálů. Důsledkem příjmu jídla je zvýšení koncentrace glukózy, mastných kyselin a dalších nutrientů v krvi, které navodí, spolu s mechanickými a smyslovými podněty, změny hladin řady tkáňových hormonů [1]. Klíčovou úlohu pro energetickou bilanci má hypotalamus, který zaznamenává hormonální i nervové signály z tkání a zpětnovazebně vysílá signály, které řídí příjem potravy a energetickou homeostázu. Příjem potravy je primárně řízen laterálním hypotalamem, ve kterém se nachází centrum hladu, zatímco ventromediální hypotalamus, ve kterém je umístěno centrum sytosti, omezuje příjem potravy kontrolou míry nasycení. Peptidy gastrointestinálního traktu (GIT) působí na centra v nucleus arcuatus v hypotalamu po navázání na receptory neuronů, které podněcují chuť k jídlu a obsahují neuropeptid Y (NPY) a agouti-related peptid (AgRP) nebo apetit inhibujících neuronů, které obsahují proopiomelanokortin (POMC) a peptidy transkripčně regulované kokainem a amfetaminem (CART). Aktivace orexigenních AgRP-NPY jader zvyšuje chuť k jídlu a metabolismus, zatímco aktivace POMC-CART neuronů má opačný efekt [2, 3]. Centrální regulace příjmu potravy zahrnuje komplexní vztahy mezi neuropeptidy, mediátory a dalšími mozkovými přenašeči informací na různých úrovních nervového systému. V periferní oblasti jsou hlavními signálními hormony pro energetickou rovnováhu leptin, který omezuje příjem potravy, a ghrelin signalizující hladovění [1].

V tabulce jsou shrnuty hlavní peptidy s orexigenním a anorexigenním působením vyskytující se v organismu.

**Tabulka 2.1** Orexigenní a anorexigenní peptidy

<b>OREXIGENNÍ PEPTIDY</b>	<b>ANOREXIGENNÍ PEPTIDY</b>
NPY	$\alpha$ -MSH
AgRP	$\beta$ -MSH
ghrelin	POMC
pankreatický polypeptid	CART
orexin A	cholecystokinin
orexin B	peptid YY
galanin	leptin
obestatin?	amylin
	glukagon-like peptid 1
	glukagon-like peptid 2
	exendin-4
	glycentin
	oxyntomodulin
	glukagon

## 2.1 Leptin

Leptin byl objeven v roce 1994 Zhangem a ost. [4]. Tento proteinový produkt je kódován obese (ob) genem a primárně ho syntetizují a uvolňují adipocyty. Jeho název pochází z řeckého slova *leptos* znamenající štíhlý. Jedná se o proteohormon o 167 aminokyselinách (16 kDa). Jeho terciární strukturu tvoří čtyři antiparalelní  $\alpha$  helixy, které jsou spojeny jedním dlouhými a dvěma krátkými spoji (Obrázek 2.1). Kromě bílého a hnědého tuku je syntetizován v placentě, žaludku, epitelu prsu. 25-30% leptinu je produkováno v žaludku žlázami v oblasti fundu parientálními buňkami a pepsinogen-sekretujícími buňkami. Slouží jako signál, který informuje mozek o tukových zásobách organismu, snižuje příjem potravy a zvyšuje spotřebu energie [4].

Adipocytární hormon leptin se účastní dlouhodobé regulace tělesné hmotnosti, energetické bilance a tělesné teploty [5]. Kromě regulace příjmu potravy je efektivní ve snižování hladin glukózy a inzulínu v krvi [6]. Sekrece leptinu je vyšší v subkutánním tuku ve srovnání s viscerálním tukem [7, 8].

V posledních letech se zvyšuje zájem o leptin jako o potenciální mediátor protektivního účinku tukové tkáně na kostní tkáň [9]. Hladiny leptinu jsou mnohem vyšší u žen než u mužů, což poukazuje na to, že koncentrace leptinu může být závislá na množství estrogenů. Estrogeny ubývají po menopauze, což přispívá k odbourávání kostní hmoty. Někteří autoři však poukazují na to, že nižší hladiny leptinu u mužů jsou dány potlačujícím vlivem cirkulujících androgenů [10, 11, 12, 13]. Vliv leptinu na tvorbu kostí zatím není zcela objasněn, ale tomuto výzkumu je věnována velká pozornost, protože by mohl vést k objevení prostředků na léčbu osteoporózy u žen po menopauze [14].

Leptin také hraje důležitou roli v angiogenezi, hematopoéze (proliferace a diferenciace hematopoetických buněk) a má vliv i na imunitní systém [15], dále urychluje hojení ran [16]. Během výživové nedostatečnosti a u stavů s nízkými hladinami cirkulujícího leptinu je normální imunitní funkce potlačena. K imunosupresi však nedochází, je-li leptin exogenně podán [17].

Produkce leptinu je ovlivňována množstvím tukové tkáně a rytmicky se mění v průběhu 24 hodin, kdy dochází k vzestupu na maximální hodnoty mezi půlnocí a časnými ranními hodinami asi o 20 – 40 % a k poklesu na nejnižší hodnoty časně

časnými ranními hodinami asi o 20 – 40 % a k poklesu na nejnižší hodnoty časně odpoledne mezi 12-15 hodinou [18]. U pacientek s AN noční vzrůst hladin leptinu chybí [19].

U kuřáků byly nalezeny významně vyšší sérové koncentrace leptinu [20]. Vyšší leptinémie (plazmatická hladina leptinu) byla zaznamenána v průběhu gravidity [21], protože je leptin produkován placentou již od 8. týdne těhotenství. Je zjištělý i v amniových buňkách a v amniové tekutině hlavně v období 2. a 3. trimestru [22].

Normu pro leptinémii je velmi těžké určit, ale u jedinců s normální tělesnou konstitucí se nejčastěji pohybuje v rozmezí 1 - 10 ng ml<sup>-1</sup> [5].

Leptin cirkuluje zčásti vázaný na plazmatické proteiny a vstupuje do CNS difuzí přes kapilární spoje v hypotalamu a do choroidálního plexu prostřednictvím svého receptoru. V hypotalamu se leptin váže na receptory, které stimulují uvolnění anorexigenních peptidů POMC a CART, a inhibují uvolnění orexigenních peptidů NPY a AgRP [23].

Pokles cirkulujících hladin leptinu pozorovaný při omezení příjmu kalorií je pravděpodobně kritickým znamením pro CNS podporující adaptaci organismu na stav hladovění [24]. Vzhledem k tomu, že hladiny leptinu jsou úzce spojeny s množstvím tělesného tuku, dochází u pacientek s AN k jejich výraznému snížení odpovídajícímu jejich nízkému body mass indexu (BMI) [25, 26, 27, 28, 29, 30] (Obrázek 2.2).



**Obrázek 2.1** Terciární struktura leptinu [31]

*Terciární struktura leptinu je tvořena čtyřmi antiparalelními  $\alpha$  helixy spojenými jedním dlouhým a dvěma krátkými spoji*

### **2.1.1 Leptinový receptor (OB-R)**

Receptory pro leptin byly identifikovány v roce 1995 skupinou Tartaglii a ost. Patří k typu I cytokinových receptorů a jsou exprimovány v CNS i na periférii [32, 33]. Všechny doposud popsané izoformy receptoru pro leptin mají shodnou extracelulární část tvořenou 816 aminokyselinami. Délka intracelulárních částí receptoru je u různých izoformem odlišná (od 34 po 303 aminokyseliny). Leptinové receptory se dělí na izoformy s krátkou a dlouhou intracelulární doménou a na izoformu cirkulující neboli solubilní. Mezi izoformy s krátkou intracelulární částí patří OB-Ra, OB-Rc, OB-Rd, dlouhou intracelulární část tvořenou 302 aminokyselinami má receptor OB-Rb a cirkulující forma je označována OB-Re [34]. Dlouhá izoforma zprostředkovává většinu z početných účinků leptinu [35]. Solubilní leptinový receptor, tedy forma tvořená pouze extracelulární doménou, která je uvolňována do krevního oběhu, slouží patrně jako vazebný protein pro leptin [36].

Po určení struktury leptinového receptoru bylo dále pátráno po jeho výskytu v různých tkáních a orgánech. U lidí bylo nejvíce receptorů pro leptin zjištěno v srdci, játrech, tenkém střevě, prostatě a ovariích [33], žaludku a placentě [37]. Jedná se však převážně o izoformu leptinového receptoru s krátkou intracelulární doménou [33]. Vysoká koncentrace dlouhé izoformy byla nalezena pouze v hypotalamu [38, 39].

### **2.1.2 Vztah leptinu a ostatních hormonů**

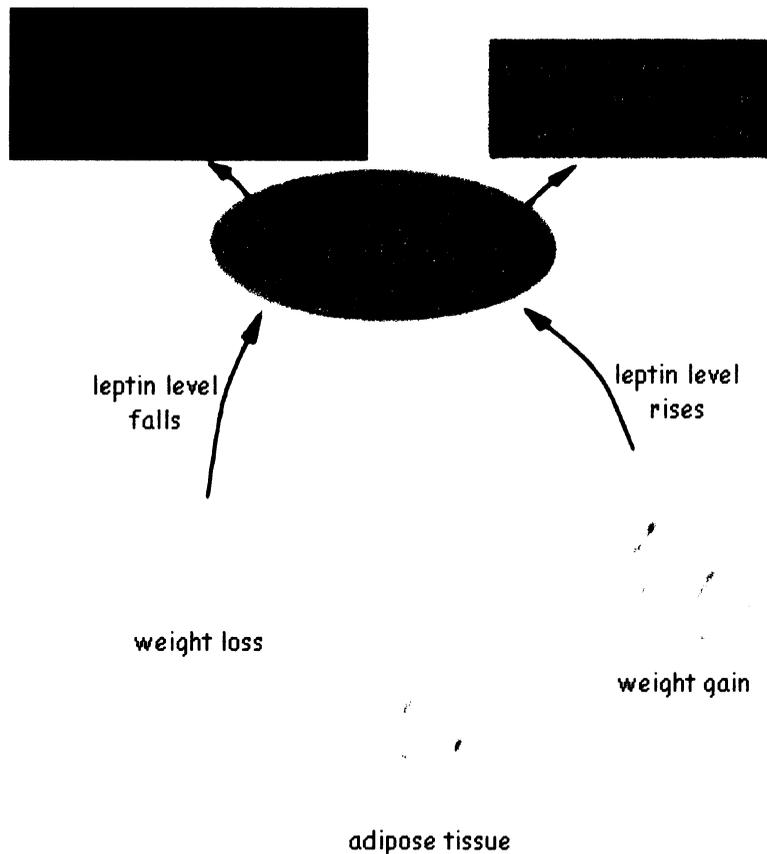
Hladiny leptinu jsou zvyšovány inzulinem, glukokortikoidy, TNF- $\alpha$  a estrogény, jeho koncentrace naopak snižovány androgeny, volnými mastnými kyselinami a růstovým hormonem (GH) [16].

Leptin redukuje intracelulární hladiny lipidů v kosterním svalu, játrech a pankreatických  $\beta$ -buňkách, a tím zlepšuje inzulinovou senzitivitu [40].

Kromě regulace tělesné hmotnosti je leptin efektivní ve snižování hladin glukózy a inzulinu v krvi [6]. Plazmatické hladiny leptinu a inzulinu jsou výrazně sníženy u pacientek s AN ve srovnání se zdravými ženami při zachování normálních hladin glukózy v krvi [41].

### 2.1.3 Změny v hladinách leptinu po příjmu potravy

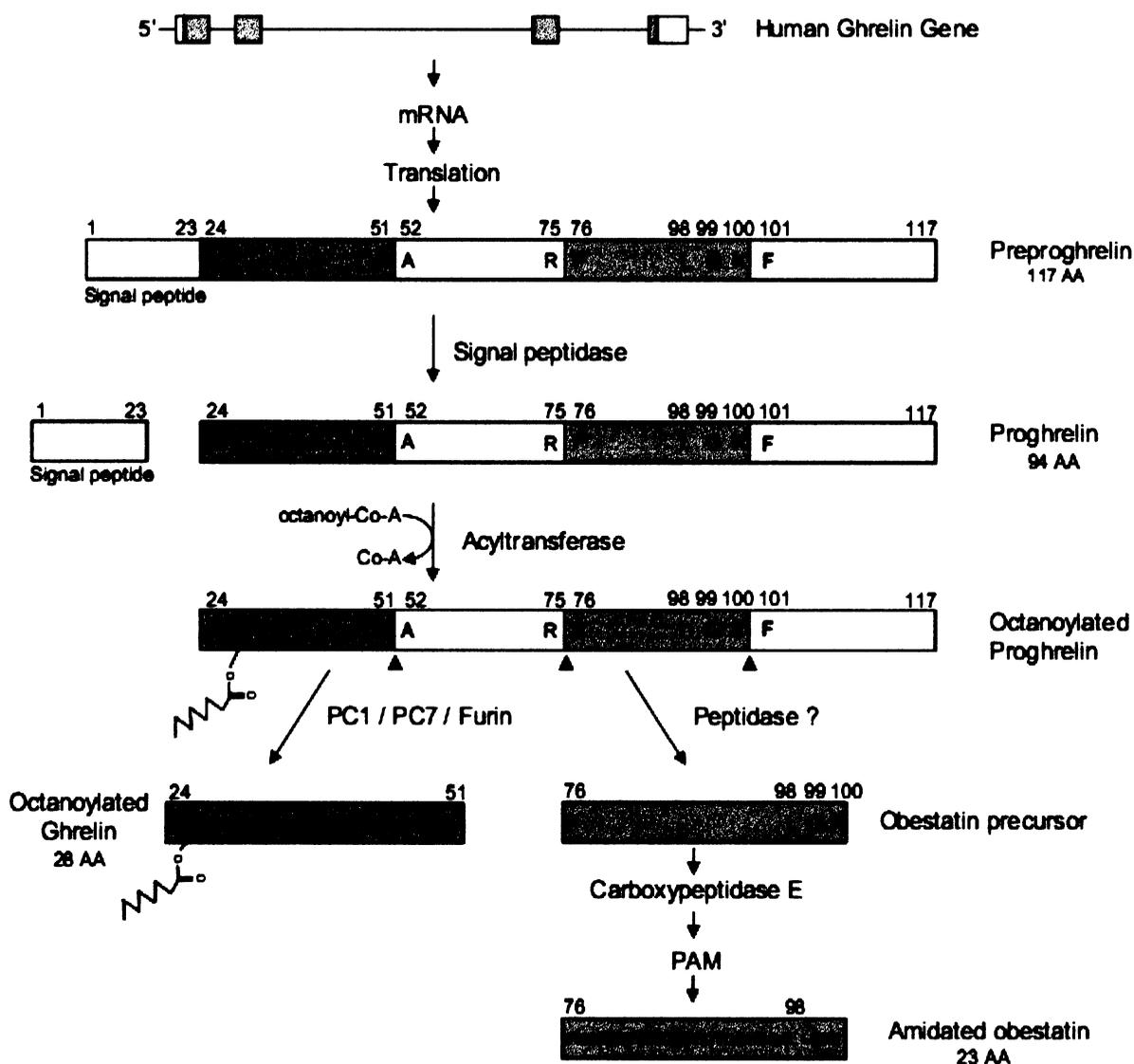
Řada studií potvrdila, že plazmatické koncentrace leptinu nejsou akutně ovlivněny příjmem potravy [5, 42, 43, 44, 45]. Hladiny leptinu výrazně klesají až po 36-ti hodinovém hladovění [46, 47], proto leptin patří k hormonům, které se účastní dlouhodobější regulace příjmu potravy.



**Obrázek 2.2** Působení leptinu při snížení (vlevo) a zvýšení (vpravo) hmotnosti [48]  
*Při snižování hmotnosti dochází ke zmenšení adipocytů a ke snížení uvolňování leptinu. Působením leptinu na jádra hypotalamu, která se účastní regulace příjmu potravy, dojde ke stimulaci příjmu potravy, snížení výdeje energie, snížení teploty těla, snížení reprodukční funkce a zvýšení parasympatické aktivity. Zvýšením hmotnosti dojde ke zvětšení adipocytů, a tím roste i plazmatická hladina leptinu. Odpovědí organismu je snížení příjmu potravy, zvýšení výdeje energie a aktivity sympatiku.*

## 2.2 Ghrelin

Žaludeční hormon ghrelin byl objeven v roce 1999 Kojimou a ost. a byl pojmenován podle hindského slova *ghre* pro růst [49]. Příslušný gen nekóduje pouze jeden hormon, ale hned dva. Ghrelin vzniká odštěpením 28 aminokyselin ze základní molekuly preproghrelinu složené ze 117 aminokyselin. Ze zbytku se odštěpuje dalších 23 aminokyselin, které tvoří druhý hormon – obestatin [50] (Obrázek 2.3, 2.4).



**Obrázek 2.3** Vznik ghrelinu a obestatinu [51]

*Gen pro ghrelin a obestatin se skládá ze čtyř exonů a tří intronů. Funkční úseky genu jsou přepsány do mRNA a následně dochází k translaci, která vede ke vzniku preproghrelinu (117 aminokyselin). Signální peptidáza odštěpí prvních 23 aminokyselin*

a vzniká proghrelin (94 aminokyselin). Na nyní třetí aminokyselině proghrelinu, na serinu, dojde k esterifikaci kyselinou oktanovou. Dalším štěpením (proteázami proproteín convertase subtilisin/kexin type enzymes – typ 1, 7 a furin) vzniká ghrelin (prvních 28 aminokyselin esterifikovaného proghrelinu) a prekurzor obestatinu. Z tohoto prekurzoru jsou odštěpeny 2 aminokyseliny carboxypeptidázou E. Zbýlých 23 aminokyselin tvoří obestatin, který je amidován na C-konci amino skupinou, kterou poskytuje v předchozím kroku odštěpený glycin. Tato amidace je katalyzována enzymem peptidyl  $\alpha$ -amidating monoxygenázou (PAM). (ghrelin: G = glycin, S = serin, F = fenylalanin, L = leucin, P = prolin, E = kyselina glutamová, H = histidin, Q = glutamin, R = arginin, V = valin, K = lysin, A = alanin; obestatin: F = fenylalanin, N = asparagin, A = alanin, P = prolin, D = kyselina asparagová, V = valin, G = glycin, I = isoleucin, K = lysin, L = leucin, S = serin, Y = tyrozin, Q = glutamin, H = histidin).

Ghrelin má dvě hlavní izoformy, a to acyl a desacyl ghrelin. Acyl ghrelin má unikátní posttranslační úpravu, kterou je hydroxylová skupina na třetím serinu esterifikovaná kyselinou oktanovou (Obrázek 2.4). Postranní řetězec je nutný pro aktivaci ghrelinových receptorů, i když receptory pro ghrelin stejně efektivně jako ghrelin v celé délce aktivuje i krátký peptid, obsahující jen první 4 nebo 5 aminokyselin. Celá tato sekvence G-S-S(octanoyl)-F tedy představuje aktivní jádro molekuly potřebné pro vazbu na receptor ghrelinu GHS-R 1a (growth hormone secretagogues receptor typ 1a) [52].

Druhá forma ghrelinu nemá octanoyl a nazývá se desacyl ghrelin. Tato forma ghrelinu je v lidském těle v daleko větším množství a nedokáže aktivovat receptory GHS-R 1a, nicméně může mít jiné účinky, např. antiproliferační a vliv na kardiovaskulární systém, a to pravděpodobně vazbou na podtyp receptoru z rodiny GHS-R [53]. V krvi se vyskytuje současně aktivní a neaktivní forma peptidu, neaktivní forma má delší poločas rozpadu [54]. Molekulová hmotnost acylovaného ghrelinu je 3,315 kDa a neacylovaného 3,189 kDa [53]. Obě tyto formy ghrelinu dohromady se nazývají celkový (total) ghrelin [54].

Acyl ghrelin je nezbytný pro uvolňování růstového hormonu, udržení energetické rovnováhy organismu, motility gastrointestinálního traktu a srdeční činnosti. Desacyl ghrelin působí na kardiovaskulární systém, účinky na modulaci

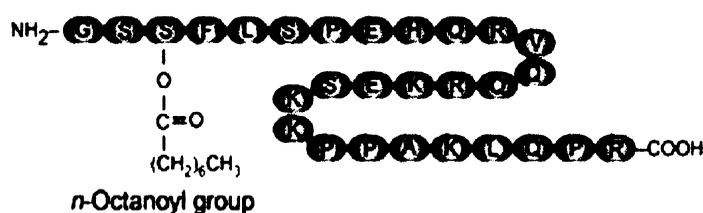
proliferace buněk a adipogenezi. Jeho působení je neendokrinní a přes jiné podtypy receptorů GHS-R [55].

Diurnální rytmicita ghrelinu je shodná s rytmicitou leptinu (maximum je v noci). Hladiny ghrelinu korelují pozitivně s věkem [56].

Ghrelin je nejvíce produkován specifickými buňkami sliznice žaludku a v menší míře pak ve střevech, slinivce, hypofýze, ledvinách, placentě [57], srdci, imunitním systému, vaječnicích a varlatech [58]. Obsah ghrelinu v CNS je nízký a je soustředěn zejména v oblasti nucleus arcuatus v hypotalamu. Ve střevě koncentrace ghrelinu postupně klesá směrem od dvanáctníku k tračníku [54]. Místem degradace ghrelinu jsou pravděpodobně ledviny, jak vyplývá ze studií u pacientů s poruchou funkce ledvin, u kterých byly nalezeny zvýšené hladiny tohoto hormonu [1].

Vliv ghrelinu na příjem potravy je dvojitý – krátkodobý a dlouhodobý. Hladiny ghrelinu jsou sníženy u obézních osob [59, 60] a zvýšeny u pacientek s AN a BN [59, 61, 62]. U AN je tato abnormalita pravděpodobně výsledkem adaptace organismu kompenzující abnormální potravní chování a udržující energetickou homeostázu [63].

Fyziologické účinky ghrelinu zahrnují mnoho orgánů i soustav. K hlavním patří stimulace uvolňování GH, orexigenní aktivita, kontrola žaludeční motility a kyselá sekrece žaludku, vliv na funkci slinivky a metabolismus glukózy, stimulace sekrece hormonů adenohipofýzy, které spouštějí sekreci kortikoidů a prolaktinu, působení na mužské pohlavní orgány, vliv na spánek a antiproliferační efekt na neoplastické linie buněk [52, 57].



**Obrázek 2.4** Primární struktura acyl ghrelinu [64]

(G = glycin, S = serin, F = fenylalanin, L = leucin, P = prolin, E = kyselina glutamová, H = histidin, Q = glutamin, R = arginin, V = valin, K = lysin, A = alanin)

### **2.2.1 Receptory ghrelinu**

Receptory pro ghrelin GHS-R jsou typické receptory spřažené s G-proteinem (GPCR) se sedmi transmembránovými doménami [54]. Dva typy GHS-R mRNA jsou pravděpodobně výsledkem alternativního sestřihu pre-mRNA a byly identifikovány dva receptory GHS-R 1a a GHS-R 1b.

GHS-R 1a tvořený 366 aminokyselinami je receptorem pro dva přirozené ligandy, a to acyl ghrelin a des-Q(14)ghrelin. Acylace ghrelinu je tedy nezbytná pro vazbu na GHS-R 1a a také pro další endokrinní funkce a fyziologické účinky [65, 66, 67]. Funkce receptoru GHS-R 1b není dosud definována [52]. Exprese GHS-R 1a byla prokázána v hypotalamu a předním laloku hypofýzy, a periferních orgánech, jako je žaludek, střeva, slinivka, ledviny, srdce, plíce a další. mRNA pro ghrelinové receptory je také exprimována v hippocampu, což je oblast spojená s učením a pamětí. Existence receptorů pro ghrelin v hippocampu podporuje představu účasti ghrelinu v paměťových procesech [54].

### **2.2.2 Vztah ghrelinu a ostatních hormonů**

Mnoho studií se zabývalo možnou rolí inzulínu v regulaci hladin ghrelinu. Ačkoliv některé studie uvádějí, že vysoké dávky inzulínu, nebo kombinace inzulínu a glukózy snižují hladiny ghrelinu [68, 69, 70], jiné studie u inzulín-deficientních pacientů s diabetem typu I ukazují, že zvýšení hladin inzulínu po příjmu potravy není nezbytné pro snížení hladin ghrelinu po jídle [71]. Postprandiální snížení hladin ghrelinu je shodné se zvýšením hladin glukózy a inzulínu [43, 56, 59, 72, 73]. Regulační vliv inzulínu na postprandiální snížení hladin ghrelinu je tedy spíše aditivní [74].

### **2.2.3 Změny v hladinách ghrelinu po příjmu potravy**

U dospělých jedinců se hladina ghrelinu zdvojnásobí před jídlem a klesá na nejnižší úroveň během jedné hodiny po jídle [54, 56, 73, 75]. St-Pierre a ost. (2004) uvádí, že existuje významná korelace mezi hladinami ghrelinu a denním příjmem kalorií [76]. Podle Nedvídkové a ost. (2003) není akutní odpověď ghrelinu na příjem potravy

závislá na nutriční hodnotě přijaté potravy, ale spíše souvisí s přítomností potravy v žaludku, protože u zdravých žen snižuje nekalorická vláknina hladiny ghrelinu ve stejném rozsahu jako kalorická strava [63]. Caixás a ost. (2002) zmiňuje, že ani složení potravy, ani obsah kalorií nehraje významnou roli v poklesu plazmatických hladin ghrelinu po jídle [77]. Není tedy zatím zcela objasněno, zda záleží více na kalorické hodnotě potravin, zastoupení nutrientů v přijaté potravě, distenzi žaludku či dalších faktorech.

U zdravých osob snižují sacharidy přijaté v potravě hladiny ghrelinu nejvíce, oproti tomu tuky nejméně [43].

## 2.3 Obestatin

Obestatin je amidovaný peptid složený z 23 aminokyselin kódovaný stejným genem jako ghrelin. Jeho název pochází z latinských slov *obedere* (hltať) a *statin* (potlačení). Jako první ho popsal Zhang a ost. v roce 2005 jako peptid aktivující receptor spážený s G-proteinem GPR39 [50]. U hlodavců byl obestatin nalezen v tenkém i tlustém střevě, žaludku a slezině [50, 78]. Zhang prezentoval objev inhibujícího účinku obestatinu na příjem potravy [50], ale mnoho dalších studií [79, 80, 81, 82, 83, 84] kromě dvou [85, 86] autoři s teorií o anorexigenních vlastnostech obestatinu nesouhlasí. Kromě anorexigenního účinku obestatinu Zhang prezentoval i vliv obestatinu na potlačení vyprazdňování žaludku, inhibici kontrakcí lačníku a tedy antagonistickou funkci obestatinu (oproti ghrelinu) na energetickou homeostázu a GIT funkce [50, 87, 88]. Další autoři nenašli žádný účinek obestatinu na příjem potravy a tělesnou hmotnost [80, 81, 89, 90], de Smet a ost. (2007) nepotvrdili ani působení obestatinu na vyprazdňování žaludku (studie na hlodavcích) [91].

Literární údaje o obestatinu jsou značně rozporuplné, ale již nyní je zřejmé, že se nejedná o peptid antagonistující roli ghrelinu. Řada nových studií nachází zvýšené hladiny obestatinu u pacientek s AN a také jeho souběžný pokles s ghrelinem po příjmu potravy [28, 92, 93, 94].

Hladiny obestatinu v plazmě jsou výrazně nižší u obézních osob ve srovnání se zdravými kontrolami i pacientkami s AN [41, 95]. Zvýšené hladiny obestatinu u AN mohou sloužit jako marker odrážející akutní i chronické změny nutričního stavu organismu u této poruchy příjmu potravy [94].

Obestatin nekoreluje s věkem [95, 96], u žen byly nalezeny hladiny vyšší než u mužů [96]. Studie Vicennatiové a ost (2007) uvádí pozitivní korelaci s hladinami cholesterolu a triglyceridů [97], studie Lippla a ost. (2008) negativní korelaci s hladinami inzulínu [96]. Korelace obestatinu s total ghrelinem byla nalezena pouze u obézních osob, ne u zdravých jedinců [97]. Některé studie nacházejí korelaci mezi obestatinem a hodnotou BMI u pacientek s AN a obézních osob [92], další u zdravých žen i mužů [96].

### **2.3.1 Obestatinový receptor**

Obestatin byl původně charakterizován jako peptid aktivující receptor spřažený s G-proteinem GPR39 [50]. Studie Moechase a ost. (2006) uvádí, že obestatin hraje důležitou roli v regulaci GIT a metabolických funkcí díky interakci s receptorem GPR39 [90], ale někteří autoři tuto hypotézu nepotvrdili. Chartrel a ost. (2007) neprokázali vazbu značeného obestatinu na GPR39 a nepozorovali žádný vliv obestatinu na buňky obsahující tento receptor [98]. Podobné výsledky byly pozorovány v dalších studiích [86, 99]. Zhang a ost. (2007), kteří byli první, kdo přiřadili obestatin k receptoru GPR39, následně usoudili, že v jejich studii došlo k chybě [100]. Dle všech uvedených výsledků je tedy nepravděpodobné, že je obestatin ligandem receptoru GPR39 jak bylo původně naznačeno. Je třeba dalších studií k určení receptoru, na který se obestatin váže.

### **2.3.2 Změny v hladinách obestatinu po příjmu potravy**

Vztah obestatinu s dalšími hormony i jeho změny po příjmu potravy jsou zatím předmětem zkoumání a výsledky jsou většinou rozporuplné. V některých studiích, kde byl obestatin podán periferně nebo centrálně potkanům, nebyl prokázán jeho vliv na příjem potravy [79, 81, 91, 101]. Naopak ve studii Sedláčkové a ost. (2008) bylo prokázáno, že se plazmatické hladiny obestatinu signifikantně snížily po sacharidové snídani u zdravých osob a toto snížení probíhalo podobným způsobem jako u ghrelinu (total, acyl i desacyl). Obdobné působení obestatinu a total ghrelinu v postprandiálním období tak ukazuje, že tyto dva produkty jednoho genu účinkují podobným způsobem u zdravých jedinců [102]. Studie Sedláčkové a ost. (2008) a Parka a ost. (2007) ukazují spíše aditivní roli těchto dvou peptidů v postprandiální odpovědi a nekorespondují s předešlými pozorováními nulového účinku příjmu potravy na hladiny obestatinu [102, 103].

## 2.4 Anorexia nervosa

AN je porucha charakterizovaná zejména úmyslným snižováním tělesné hmotnosti. U některých pacientů je omezování se v jídle naopak doprovázeno zvýšeným zájmem o jídlo (myslí na něj, sbírají recepty, rádi vaří apod.) a někdy i zvýšenou nebo změněnou chutí, například na sladké. Jde zřejmě o přirozenou adaptační reakci organismu, stejně tak jako v případě výrazného oslabení chuti k jídlu po několika týdnech hladovění. Anorektičtí pacienti neodmítají jíst proto, že by neměli chuť, ale proto, že nechťejí. Jejich averze k jídlu je projevem nesmiřitelného a narušeného postoje k tělesné hmotnosti, vlastním proporcím a množství tělesného tuku [104].

Anorexia nervosa je důsledkem vlivu sociálních a kulturních faktorů, nepříznivých životních událostí, chronických obtíží, nedostatečných sociálních a rozhodovacích dovedností a nakonec i biologických a genetických faktorů. Prevalence tohoto onemocnění je odhadována na 0,5 až 2 případy na 1000 žen, s nejvyšší četností výskytu ve věku 12 až 19 let. AN se může vyskytovat i u mužů, avšak četnost je zde asi 10krát nižší než u žen. Podle řady studií má incidence AN v poslední době trvale stoupající trend [105]. Z dat Ústavu zdravotnických informací a statistiky vyplývá, že ročně je v České republice hospitalizováno v průměru kolem 500 pacientek s AN. Podle odborníků 5% pacientek na následky nemoci umírá, proto AN patří k psychickým onemocněním s velmi vysokou mortalitou. Zvýšené riziko je u příbuzných anorektiček, zejména sester anorektiček a jednovaječných dvojčat. Mezi rizikové oblasti patří modeling a některé sporty jako například atletika a balet. Více bývají postiženi jedinci s perfekcionistickými rysy a ctižádostí [106].

### 2.4.1 Diagnostická kritéria

Diagnostická kritéria podle Diagnostického a statistického manuálu americké Psychiatrické asociace, 4. vydání (DSM-IV) [107]

- A. tělesná hmotnost je udržována pod minimální váhou odpovídající věku a výšce (úbytek váhy vedoucí k udržení hmotnosti na méně než 85 % očekávané hmotnosti nebo nedostatečný přírůstek na váze během období růstu vedoucí k hmotnosti nižší než 85 % očekávané hmotnosti)
- B. intenzivní obava z přírůstku na váze

C. porucha vnímání vlastního těla

D. amenorea, tedy absence menstruačního cyklu nejméně 3 po sobě následující měsíce. Tato porucha chybí u dívek, které užívají hormonální antikoncepci

Specifické typy anorexia nervosa [106]:

Restriktivní typ – váhový úbytek je dosažen především omezením příjmu potravy, hladověním nebo přehnaným cvičením. Pacientky se nepřejídají ani nezvracejí

Purgativní typ – dochází k přísnému omezení příjmu potravy, které je střídáno epizodami záchvatovitého přejídání a zvracení.

#### **2.4.2 Metabolické a endokrinní změny u pacientek s AN**

AN je onemocnění, které ve svých důsledcích postihuje celý organismus. K projevům, které můžeme vidět na první pohled, patří zhoršená kvalita vlasů (slabé, vypadávají), nehtů, kůže a zubů. Pacientky mají potíže se srdeční činností (nízký krevní tlak, bradykardie, bušení srdce), ledvinami (ledvinové kameny, selhání ledvin z nedostatku tekutin), s funkcí GITu (nadýmání, zácpy), narušen je i imunitní systém organismu. Dochází k poruchám soustředění, vznehlivosti a náladovosti [108].

AN je spojena s řadou endokrinních abnormalit. Předpokládá se však, že většina, ne-li všechny z těchto odchylek, jsou sekundární reakcí na snížený příjem potravy a podvýživu, a nikoliv primární příčinou této nemoci [109]. Jedním z diagnostických kritérií AN je amenorea trvající déle než 3 měsíce. U pacientek s AN dochází k zásadnímu narušení pulzativní sekrece hypotalamického hormonu gonadoliberinu s následnou změnou sekrece luteinizačního a folikuly stimulujícího hormonu. Přesný mechanismus vzniku této abnormality není objasněn, předpokládá se však, že jednou z příčin je velmi pravděpodobně pokles tukových zásob v organismu.

U pacientek s AN se často vyskytují změny v ose hypotalamus-hypofýza-štítná žláza. Jedná se o změny nazývané též „syndrom nízkého T3“, který se vyznačuje sníženou koncentrací trijodtyroninu, nižší nebo normální hladinou tyroxinu a normální hladinou tyreotropního hormonu. Snížená hladina trijodtyroninu je důsledkem snížené periferní přeměny tyroxinu na trijodtyronin, která je nahrazována zvýšenou tvorbou metabolicky inaktivního reverzního trijodtyroninu. Převaha tvorby tohoto hormonu nad

aktivní formou je součástí komplexní ochranné metabolické reakce, jejímž cílem je co nejnvýraznější snížení energetických potřeb a ztrát energie formou výdeje tepla apod.

U pacientek s AN je zvýšena bazální sekrece růstového hormonu. Tato abnormalita je patrně důsledkem zvýšené frekvence pulzů, v nichž je růstový hormon produkován. Předpokládá se, že příčinou změny pulzativity je snížená produkce hypotalamického hormonu somatostatinu [110].

AN je velmi komplexní onemocnění, proto k endokrinním změnám u pacientek patří samozřejmě i odchylky v hladinách dalších hormonů a peptidů (např. inzulin, C-peptid, cholecystokinin, produkty tukové tkáně – leptin, adiponectin a další)

### **2.4.3 Změny sledovaných hormonů u pacientek s AN**

Anorexia nervosa je onemocnění postihující mnoho dějů v organismu. Hladiny hormonů účastnících se regulace příjmu potravy jsou proto značně odlišné od stavu pozorovaného u zdravých jedinců. U některých dochází také k narušení jejich cirkadiánní rytmicity. Hladiny leptinu jsou u pacientek s AN oproti zdravým ženám významně sníženy [25, 26, 27, 28, 29, 30]. Toto snížení odpovídá poklesu příjmu potravy i snížení procenta tuku v organismu. Oproti tomu hladiny antagonisty leptinu, ghrelinu, jsou u skupiny s AN významně zvýšeny [59, 61, 62]. Co se koncentrace hormonu obestatinu u pacientek s AN týče, některé studie uvažují o jeho protichůdné roli oproti ghrelinu, jiné naopak našly orexigenní působení obestatinu [102, 103].

Studie zabývající se výzkumem hladin hormonů ovlivňujících příjem potravy a energetický metabolismus u zdravých jedinců a u osob trpících některou z poruch příjmu potravy se snaží objasnit mechanismy působení všech faktorů ovlivňujících příjem potravy. Výsledky by měly přispět k pochopení vzniku těchto závažných onemocnění a jejich následné úspěšnější léčbě.

## 3 Experimentální část

### 3.1 Kritéria výběru probandek – kontrolních osob a pacientek s AN

Soubor kontrolních osob tvořily ženy české národnosti ve věku 18 – 30 let (průměrný věk  $24,00 \pm 0,84$  let,  $n = 10$ ). Tyto ženy netrpěly žádnými závažnými onemocněními, jako je diabetes mellitus, onemocnění štítné žlázy, vysoký krevní tlak, kardiovaskulární onemocnění, onemocnění jater nebo urogenitální soustavy. V minulosti neprodělaly žádnou z poruch příjmu potravy a neužívaly žádné léky kromě antikoncepce. Průměrná hodnota BMI byla  $20,7 \pm 0,36$  kg m<sup>-2</sup>. Všechny ženy před testem podepsaly informovaný souhlas se zařazením do studie, která byla schválena etickou komisí Endokrinologického ústavu.

Sledovaný soubor pacientek tvořilo 9 žen (průměrný věk  $24,83 \pm 1,03$  let,  $n = 9$ ) s DSM-IV diagnostikovanou anorexia nervosa (průměrný BMI:  $15,8 \pm 0,35$  kg m<sup>-2</sup>), které byly hospitalizovány na Psychiatrické klinice 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy. V lékařských záznamech byly všechny pacientky vedeny jako restriktivní typ AN. Odběru krve se pacientky účastnily na začátku hospitalizace.

### 3.2 Průběh vyšetření

Jeden den před dnem testu nesměly účastnice studie pít a jíst vše, co obsahuje kofein a užívat léčiva obsahující kyselinu acetylsalicylovou. Všechny kontrolní ženy i pacientky podepsaly informovaný souhlas (Příloha 3.1) se zařazením do studie a byly požádány o vyplnění dotazníku o zdravotním stavu (Příloha 3.2). Vlastní experiment probíhal v Endokrinologickém ústavu, byl vždy prováděn nalačno, vleže na lůžku. Všechny účastnice absolvovaly vstupní pohovor s lékařem (osobní anamnézu) a základní lékařské vyšetření (měření krevního tlaku a pulzu, hmotnosti, procenta tuku, glykémie). Byly informovány, že v průběhu testu nesmí jíst, pít a spát.

Vyšetření začínalo v 7:30 ráno a trvalo přibližně tři a půl hodiny. Vleže na lůžku byla do kubitální žíly zavedena kanyla pro odběr krve. První odběr byl prováděn nalačno, poté byla podána snídaně o celkovém obsahu energie 1604 kJ, skládající se

z 81,9 g sacharidů, 8,8 g proteinů a 3,4 g tuků (celková hmotnost potravy: 140 g, složení: bílé pečivo – 90 g, jahodová marmeláda – 50 g), na jejíž sněžení měly účastnice 15 minut. Půl hodiny po ukončení snídaně byl nabírán druhý odběr a další vždy po třiceti minutách. Celkem byly odebrány vzorky krve v časech – 0, 30, 60, 90, 120 a 150 minut (Příloha 3.3). Po celou dobu vyšetření byl celkový stav žen sledován lékařem. Po ukončení testu byla změřena glykémie, vyjmuta kanyla, změřen tlak a zdravotní stav zkontrolován lékařem. Po ukončení testu dostaly účastnice občerstvení.

## 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 prvé 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. Odmítnutí účasti ve studii Vás v žádném případě nezavazuje práva na lékařskou péči, kterou budete jako pacient potřebovat. Bližší informace můžete získat od našich pracovníků, kteří se problematikou zabývají (řešitel grantu).

V současné době je plánován výzkum (Interní grantová agentura Ministerstva zdravotnictví ČR), který je zaměřen na studium hormonů ovlivňujících příjem potravy 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 tomuto úkonu:

**Odběrový test**, který spočívá v několika odběrech krve ze žíly při jednom vpichu. Při tomto testu Vám bude zavedena kanylka a krev bude odebírána v 30 min. intervalech po dobu cca 3,5 hod. (tzn. 6 odběrů, celkem 54 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. Jeden den 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 a katecholaminů, vzorky krve nebudou uchovávány pro jiné studie.

### 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:.....

### **Příloha 3.1 Informovaný souhlas**

## 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?	
<u>Tělesné míry:</u>	
Obvod pasu:	
Obvod boků:	
Krevní tlak:	
Puls:	
Glykémie před testem:                      po testu:	

Kdy se u vás poprvé objevilo onemocnění ?	
Jaký mělo od té doby průběh, byla jste už někdy hospitalizována?	
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?	

**Příloha 3.2 Zdravotní dotazník**

**Protokol pro odběr krve**  
(studie REALIMENTACE)

Datum .....

Značka pacienta .....

Jméno a příjmení .....

Rodné číslo .....

Diagnóza .....

1. **0.min.** – odběry krve:  
**1 x růžová zkumavka 4 ml (Na<sub>2</sub>EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !**  
**3 x fialová zkumavka 3 ml (K<sub>2</sub>EDTA) – do ledové lázně !**

**SNÍDANĚ – 15 minut**

2. **30.min.** (30 min. po ukončení snídaně) – odběry krve:  
**1 x růžová zkumavka 4 ml (Na<sub>2</sub>EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !**  
**1 x fialová zkumavka 3 ml (K<sub>2</sub>EDTA) – do ledové lázně !**

3. **60. min.** – odběry krve:  
**1 x růžová zkumavka 4 ml (Na<sub>2</sub>EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !**  
**2 x fialová zkumavka 3 ml (K<sub>2</sub>EDTA) – do ledové lázně !**

4. **90. min.** – odběry krve:  
**1 x růžová zkumavka 4 ml (Na<sub>2</sub>EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !**  
**2 x fialová zkumavka 3 ml (K<sub>2</sub>EDTA) – do ledové lázně !**

5. **120. min.** – odběry krve:  
**1 x růžová zkumavka 4 ml (Na<sub>2</sub>EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !**  
**1 x fialová zkumavka 3 ml (K<sub>2</sub>EDTA) – do ledové lázně !**

6. **150. min.** – odběry krve:  
**1 x růžová zkumavka 4 ml (Na<sub>2</sub>EDTA + aprotinin) – do ledové lázně !**  
**3 x fialová zkumavka 3 ml (K<sub>2</sub>EDTA) – do ledové lázně !**

**Příloha 3.3 Odběrový protokol**

### 3.3 Metody stanovení

#### 3.3.1 Zpracování plazmy

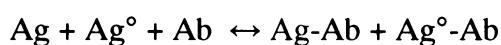
Odběry krve byly prováděny do dvou typů zkumavek. Jedny obsahovaly K<sub>2</sub>EDTA a druhý typ Na<sub>2</sub>EDTA a aprotinin. Pro stanovení ghrelinu a obestatinu byla použita krev ze zkumavek s aprotininem, pro zbytek stanovení krev ze zkumavek obsahujících K<sub>2</sub>EDTA. Ihned po odběru byly zkumavky umístěny do ledové lázně. Pro získání plazmy byla krev centrifugována 25 minut při 3000 otáčkách za minutu a 4 °C, následně byla plazma zamrazena při -30 °C.

#### 3.3.2 Radioimunochemické stanovení

Ke stanovení leptinu, ghrelinu i obestatinu byly použity komerční kity pro radioimunochemického stanovení (Radioimmunoassay, RIA). Jedná se velmi senzitivní a specifickou imunochemickou techniku, která využívá radioizotopů k detekci antigenů nebo protilátek v biologických tekutinách (Obrázek 3.1). Tuto metodu objevili v 50. letech 20. století Rosalyn Yalow a Solomon Aaron Berson [111]. V roce 1977 obdržela R. Yalow Nobelovu cenu za objev metody RIA pro inzulin, která znamenala velký průlom v endokrinologii.

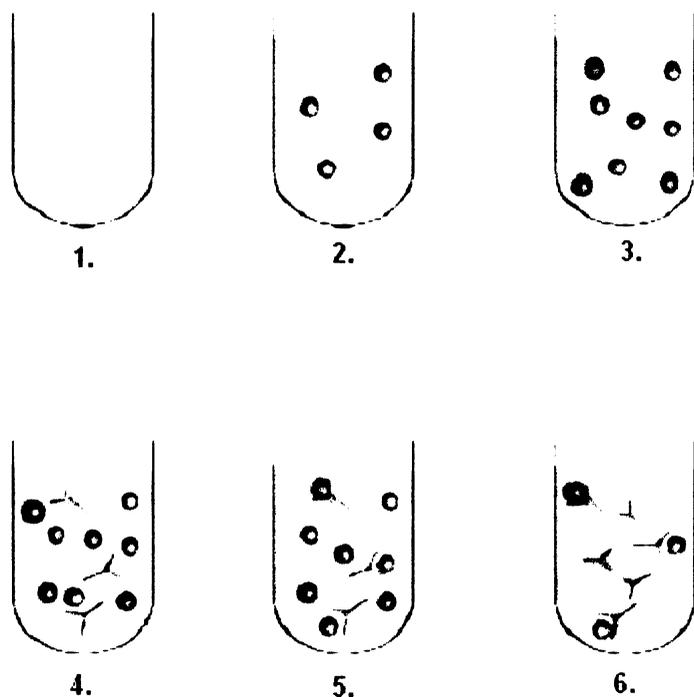
Technika stanovení používá tři základní složky:

1. antigen (ligand) – specifická látka, kterou stanovujeme (Ag)
2. značený antigen – též specifická látka s navázaným radioaktivním izotopem (Ag<sup>o</sup>)
3. protilátka – specifická pro antigen, který stanovujeme (Ab)



Metoda RIA je založena na kompetitivní vazebné reakci [112]. Kompetice obou antigenů o vazebná místa protilátky je docíleno 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<sup>o</sup>-Ab] při reakci vznikne). Kvantitativní vyhodnocení reakce je založena na detekci

radioaktivity. Nejčastěji se jako radioaktivní značka používá izotop  $^{125}\text{I}$  (vykazující  $\gamma$ -záření) připojený na tyrosin [113].



**Obrázek 3.1** Schéma průběhu metody radioimmunoassay (RIA) [114]

- ... antigen
- ...  $^{125}\text{I}$  – značený antigen
- Y ... primární protilátka
- Y ... sekundární protilátka

*Do zkumavky s ředícím roztokem přidáme známe množství neznačeného antigenu (1.+2.). Ten soutěží o vazebná místa protilátky. Následně se přidá do směsi radioaktivně značený antigen (3.) a primární protilátka (4.). Radioaktivně značený antigen je vytěšňován z vazebných míst protilátky neznačeným antigenem. Pomocí sekundární protilátky dojde ke vzniku sraženiny Ab (protilátka) – Ag (antigen) (5.).*

*Antigen navázaný na protilátku je separován od volného antigenu v supernatantu (6.).  
Poté se měří radioaktivita vzniklého komplexu.*

### 3.3.2.1. Stanovení leptinu

Ke stanovení leptinu jsem použila HUMAN LEPTIN RIA KIT (Linco Research Inc., USA).

Obsah kitu:

1. Assay Buffer – ředící roztok - připraven k použití
2. Human Leptin Antibody – protilátka specifická pro lidský leptin – připravena k použití
3.  $^{125}\text{I}$  – Human Leptin – izotopově značený lidský leptin (obsahuje <math>1,5 \mu\text{Ci} = 56 \text{ kBq}</math>) – lyofilizát
4. Label Hydrating Buffer – rozpouštědlo pro lyofilizovaný izotopově značený lidský leptin – připraveno k použití
5. Human Leptin Standards – (0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100 ng ml<sup>-1</sup>) - připraveny k použití
6. Quality Controls 1 and 2 – kontroly kvality 1 a 2 – připraveny k použití
7. Precipitating Reagent – precipitační činidlo – připraveno k použití

Příprava reagensů:

**$^{125}\text{I}$  – Human Leptin** – přidáme 13,5 ml Label Hydrating Buffer, dobře promícháme, necháme stát alespoň 30 minut při pokojové teplotě dokud se vše nerozpustí

Následující postup byl dle návodu v tabulce 3.1:

**Tabulka 3.1** Stanovení leptinu

Den 1.					
	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4	Krok 5
Číslo zkumavky	Přidání ředícího roztoku (μl)	Přidání standardu / kontroly / vzorku (μl)	Přidání <sup>125</sup> I- leptinu (μl)	Přidání leptinové protilátky (μl)	
1, 2	-	-	100	-	Zamícháme na vortexu, přikryjeme a inkubujeme 20-24 hodin při 4 °C
3, 4	300	-	100	-	
5, 6	200	-	100	100	
7, 8	100	100 z 0,5 ng ml <sup>-1</sup>	100	100	
9, 10	100	100 z 1 ng ml <sup>-1</sup>	100	100	
11, 12	100	100 z 2 ng ml <sup>-1</sup>	100	100	
13, 14	100	100 z 5 ng ml <sup>-1</sup>	100	100	
15, 16	100	100 z 10 ng ml <sup>-1</sup>	100	100	
17, 18	100	100 z 20 ng ml <sup>-1</sup>	100	100	
19, 20	100	100 z 50 ng ml <sup>-1</sup>	100	100	
21, 22	100	100 z 100 ng ml <sup>-1</sup>	100	100	
23, 24	100	100 kontroly 1	100	100	
25, 26	100	100 kontroly 2	100	100	
27, 28	100	100 neznámého vzorku	100	100	

Den 2.		
Krok 6	Krok 7	Krok 8
Přidání precipitačního činidla (ml)	Zamícháme na vortexu a inkubujeme 20 minut při 4 °C	Centrifugujeme 20 minut při 4 °C, odsajeme supernatant a měříme na gama měřiči (viz. pododíl 3.3.3)
-		
1		
1		
1		
1		
1		
1		
1		
1		
1		
1		
1		
1		

### 3.3.2.2 Stanovení total ghrelinu

Ke stanovení total ghrelinu jsem použila GHRELIN (Total) RIA KIT (Linco Research Inc., USA).

Obsah kitu:

1. Ghrelin (Total) Assay Buffer – ředící roztok – připraven k použití
2. Ghrelin (Total) Antibody – králičí protilátka specifické pro ghrelin – připraveno k použití
3.  $^{125}\text{I}$  – Ghrelin – izotopově značený ghrelin (obsahuje  $< 1,5 \mu\text{Ci} = 56 \text{ kBq}$ ) – lyofilizát
4. Ghrelin (Total) Label Hydrating Buffer – rozpouštědlo pro lyofilizovaný izotopově značený ghrelin – připraveno k použití
5. Ghrelin (Total) Standard – lyofilizát
6. Ghrelin (Total) Quality Controls 1 and 2 – kontroly kvality 1 a 2 – lyofilizáty
7. Precipitating Reagent – precipitační činidlo obsahující Goat anti – Rabbit IgG Serum – připraveno k použití

Příprava reagensů:

**$^{125}\text{I}$  – Ghrelin** – rozpustíme v 13,5 ml Ghrelin (Total) Label Hydrating Buffer

**Ghrelin (Total) Standard** – přidáme 2 ml destilované nebo deionizované vody a pečlivě promícháme dokud se vše nerozpustí

**Ghrelin (Total) Quality Controls 1 and 2** – rozpustíme v 1 ml destilované nebo deionizované vody

Následující postup byl dle návodu v tabulce 3.2:

**Tabulka 3.2** Stanovení ghrelinu

Číslo zkumavky	Den 1.			
	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4
1, 2	Přidání ředícího roztoku (μl)	Přidání standardu/kontroly/vzorku (μl)	Přidání specifické protilátky (μl)	Zamícháme na vortexu, přikryjeme a inkubujeme 20-24 hodin při 4 °C
3, 4	-	-	100	
5, 6	300	-	100	
7, 8	200	-	100	
9, 10	100	100 ze zkumavky 6	100	
11, 12	100	100 ze zkumavky 5	100	
13, 14	100	100 ze zkumavky 4	100	
15, 16	100	100 ze zkumavky 3	100	
17, 18	100	100 ze zkumavky 2	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	

Číslo zkumavky	Den 2.		Den 3.	
	Krok 5	Krok 6	Krok 7	Krok 8
1, 2	Přidání <sup>125</sup> I - ghrelinu (μl)	Zamícháme na vortexu, přikryjeme a inkubujeme 22-24 hodin při 4 °C	Přidání precipitačního činidla (ml)	Inkubujeme 20 minut při 4 °C, centrifugujeme 20 minut při 4 °C, odsajeme supernatant a měříme na gama měřiči (viz. pododíl 3.3.3)
3, 4	100		-	
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		

### 3.3.2.3 Stanovení obestatinu

Ke stanovení obestatinu jsem použila OBESTATIN (Human, Monkey) RIA KIT (Phoenix Pharmaceuticals Inc., USA).

Obsah kitu:

1. RIA Buffer – ředící roztok - koncentrát
2. Standard Obestatin (Human, Monkey) – lyofilizát
3. Rabbit antiserum specific for the Obestatin (Human, Monkey) – lyofilizát
4.  $^{125}\text{I}$  – Obestatin (Human, Monkey) – obsahuje  $< 1,5 \mu\text{Ci}$  – lyofilizát
5. Goat Anti – Rabbit IgG Serum – lyofilizát
6. Normal Rabbit Serum – lyofilizát
7. Positive Control - lyofilizát

Příprava reagensů 1. den:

**RIA Buffer** – přidáme 150 ml destilované vody a dobře promícháme

**Standard Obestatin (Human, Monkey)** – přidáme 1 ml ředícího roztoku, dobře promícháme a skladujeme v ledové lázni

**Positive Control** – přidáme 500  $\mu\text{l}$  ředícího roztoku, dobře promícháme a skladujeme v ledu

**Rabbit anti – obestatin (Human, Monkey) serum** – přidáme 13 ml ředícího roztoku, dobře promícháme, skladujeme v ledu

**Standard A** – 50  $\mu\text{l}$  Standard Obestatin (Human, Monkey) + 990  $\mu\text{l}$  ředícího roztoku

**Standard B** – 500  $\mu\text{l}$  A + 500  $\mu\text{l}$  ředícího roztoku

**Standard C** - 500  $\mu\text{l}$  B + 500  $\mu\text{l}$  ředícího roztoku

**Standard D** - 500  $\mu\text{l}$  C + 500  $\mu\text{l}$  ředícího roztoku

**Standard E** - 500  $\mu\text{l}$  D + 500  $\mu\text{l}$  ředícího roztoku

**Standard F** - 500  $\mu\text{l}$  E + 500  $\mu\text{l}$  ředícího roztoku

**Standard G** - 500  $\mu\text{l}$  F + 500  $\mu\text{l}$  ředícího roztoku

**Standard H** - 500  $\mu\text{l}$  G + 500  $\mu\text{l}$  ředícího roztoku

Příprava reagensů 2. den:

**$^{125}\text{I}$  – Obestatin (Human, Monkey)** - přidáme 13 ml ředícího roztoku a řádně promícháme dokud se vše nerozpustí

**Goat Anti – Rabbit IgG Serum** – přidáme 13 ml ředícího roztoku a dobře promícháme

**Normal Rabbit Serum** - přidáme 13 ml ředícího roztoku a dobře promícháme

Následující postup byl dle návodu v tabulce 3.3:

**Tabulka 3.3** Stanovení obestatinu

Číslo zkumavky	Den 1.				Zamícháme na vortexu, přikryjeme a inkubujeme 16 - 24 hodin při 4 °C
	Krok 1	Krok 2	Krok 3	Krok 4	
1, 2	Přidání ředícího roztoku (μl)	Přidání standardu/ vzorku (μl)	Přidání primární protilátky (μl)		
3, 4	200	-	-		
5, 6	100	-	100		
7, 8	-	100 standardu H	100		
9, 10	-	100 standardu G	100		
11, 12	-	100 standardu F	100		
13, 14	-	100 standardu E	100		
15, 16	-	100 standardu D	100		
17, 18	-	100 standardu C	100		
19, 20	-	100 standardu B	100		
21, 22	-	100 standardu A	100		
23, 24	-	100 pozitivní kontroly	100		
25, 26	-	100 neznámého vzorku	100		

Číslo zkumavky	Den 2.		Krok 7	Krok 8	Den 3.		Krok 11
	Krok 5	Krok 6			Krok 9	Krok 10	
Číslo zkumavky	Přidání <sup>125</sup> I - obestatinu (μl)	Zamícháme na vortexu, přikryjeme a inkubujeme 16 - 24 hodin při 4 °C	Přidání Anti-králičího IgG séra (μl)	Přidání normálního králičího séra (μl)	Zamícháme na vortexu a inkubujeme 90 minut při pokojové teplotě.	Přidání ředícího roztoku (μl)	Zamícháme na vortexu a centrifugujeme všechny zkumavky kromě č. 1 a 2 20 minut při 4 °C, odsajeme supernatant (kromě č. 1, 2) a měříme na gama měřiči (viz. pododíl 3.3.3)
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	

### **3.3.3 Stanovení koncentrací hormonů ve vzorcích**

Odezva vzorků byla měřena pomocí gama měřiče Berthold Multi-Crystal counter LB2104, (Berthold Technologies, Německo). Pro měření gama záření se používají vícekanálové scintilační detektory, které jsou schopné analyzovat současně více vzorků (v mém případě 12). Radioaktivita je měřena jako počet impulzů za minutu (counts per minute, cpm). Ty jsou pomocí kalibrační závislosti převedeny na koncentraci sledované látky. Detekční systém je založen na bázi krystalů NaI aktivovaných Tl. Krystal je zapouzdřen v hliníkovém obalu, jehož vnitřní stěny jsou pokryty vrstvou MgO, 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. Celý detektor je umístěn v olověném stínítku [115, 116]. Pro měření všech hormonů bylo použito gama záření emitované izotopem  $^{125}\text{I}$  v kanálu odpovídajícím energii 16 – 84 keV, při které byla nejvyšší detekční účinnost, měření probíhalo 1 minutu.

### **3.3.4 Stanovení inzulinu**

Inzulin byl stanoven metodou elektrochemoluminiscenční imunoanalýzy (ECLIA). Jedná se o metodu sendvičového typu, kdy biotinylovaná monoklonální protilátka proti inzulinu a monoklonální protilátka proti inzulinu značená rutheniovým komplexem (tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) – komplex) reagují za tvorby sendvičového komplexu. Po přidání mikročastic potažených streptavidinem se komplex váže na pevnou fázi prostřednictvím interakce mezi biotinem a streptavidinem. Reakční směs je nasáta do měřicí komůrky, kde jsou mikročástice zachyceny magnetickým polem na povrchu elektrody. Nenavázané složky jsou odstraněny. Přivedené napětí na elektrodě vyvolá chemiluminiscenční emisi fotonů, která je změřena fotonásobičem [117].

### **3.3.5 Stanovení glukózy**

Ke stanovení glukózy byla použita klasická hexokinázová metoda. Hexokinázový komplex se skládá ze dvou spřažených reakcí:





### **glukóza-6-fosfát-dehydrogenáza**

Hexokináza katalyzuje fosforylaci glukózy adenosintrifosfátem (ATP) za vzniku glukóza-6-fosfátu (G-6-PO<sub>4</sub>) a adenosindifosfátu (ADP). Druhý enzym glukóza-6-fosfát-dehydrogenáza (G-6-PD) katalyzuje oxidaci glukóza-6-fosfátu nikotinamidadeninukleotidem (NADP<sup>+</sup>) za vzniku NADPH + H<sup>+</sup>. Vzestup absorbance NADPH (absorpční maximum při 340 nm) je přímo úměrný koncentraci glukózy ve vzorku [112]. Absorbance je měřena spektrofotometricky.

Pro hodnocení inzulinové resistance jsem použila homeostatický model zkoušky inzulinové resistance (homeostatic model assesment of insulin resistance, HOMA, také HOMA - IR), získaný dle následujícího vzorce:

$$\text{HOMA} = \text{hladina inzulinu nalačno (mIU l}^{-1}\text{)} * \text{hladina glukosy nalačno (mmol l}^{-1}\text{)} / 22,5$$

Inzulin a glukóza byly stanovoveny na Oddělení klinické biochemie a hematologie Endokrinologického ústavu, kterému bych touto cestou chtěla za pomoc poděkovat.

### 3.4 Statistické zpracování výsledků

Výsledky jsou uváděny jako aritmetický průměr  $\pm$  střední chyba průměru (standard error of mean, SEM).

Výpočet střední chyby průměru:

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

$n$  ... počet pozorování

$x_i$  ... příslušné měření

$\bar{x}$  ... aritmetický průměr naměřených hodnot

Pro určení významnosti výsledků byl použit Studentův dvouvýběrový t-test, který vychází z určení rozdílu středních hodnot a odchylky tohoto rozdílu. Pro výpočty byl použit program Microsoft Office Excel 2003.

## 4 Výsledky

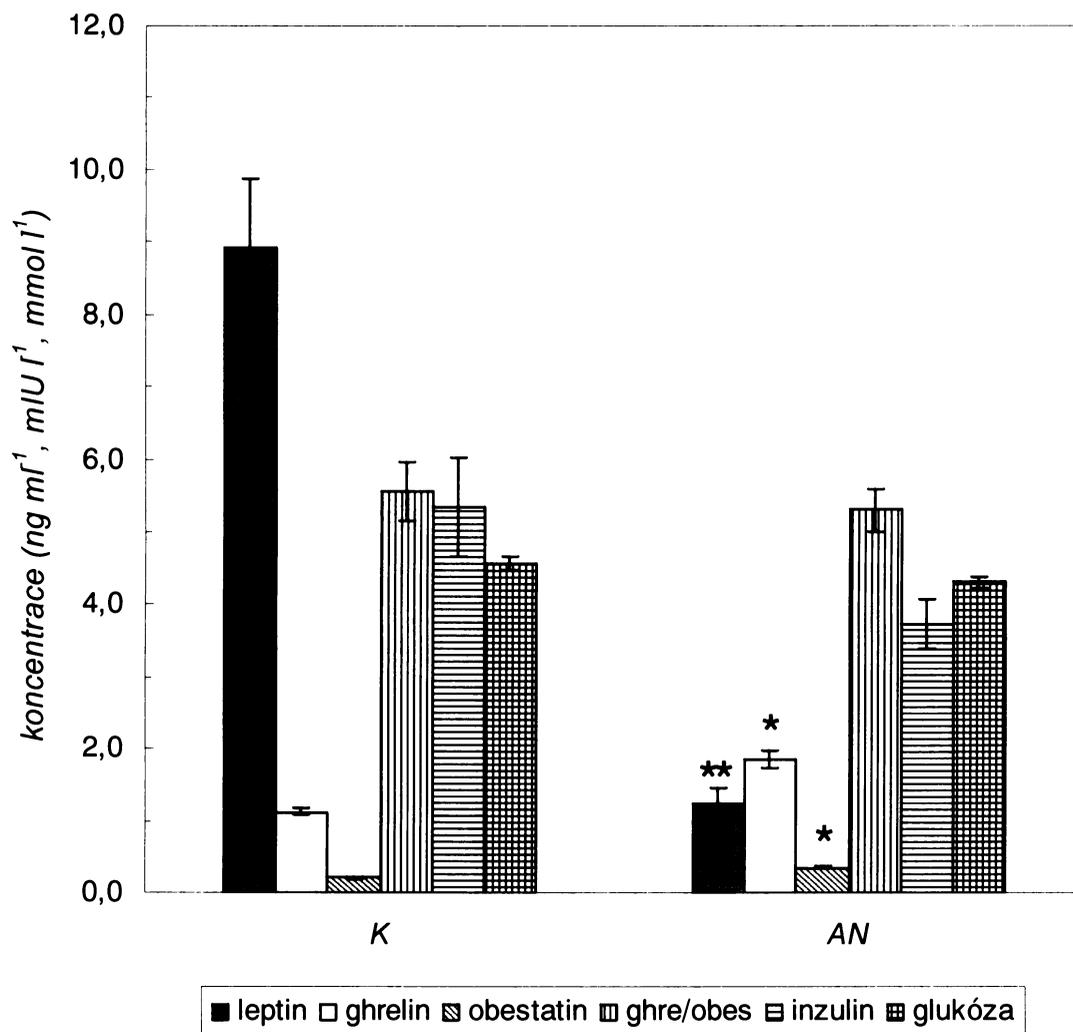
### 4.1. Grafické zpracování výsledků

#### 4.1.1 Bazální hodnoty měřených parametrů

**Tabulka 4.1** Bazální hladiny sledovaných parametrů

(K = kontrolní ženy, n = 10; AN = pacientky s anorexia nervosa, n = 9; hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM; ghre/obes označuje poměr bazální koncentrace ghrelinu a obestatinu; \* označuje rozdíl mezi skupinami na hladině významnosti  $p < 0,05$  ; \*\* označuje rozdíl mezi skupinami na hladině významnosti  $p < 0,01$ ; jednotky pro jednotlivé hormony jsou uvedeny v tabulce)

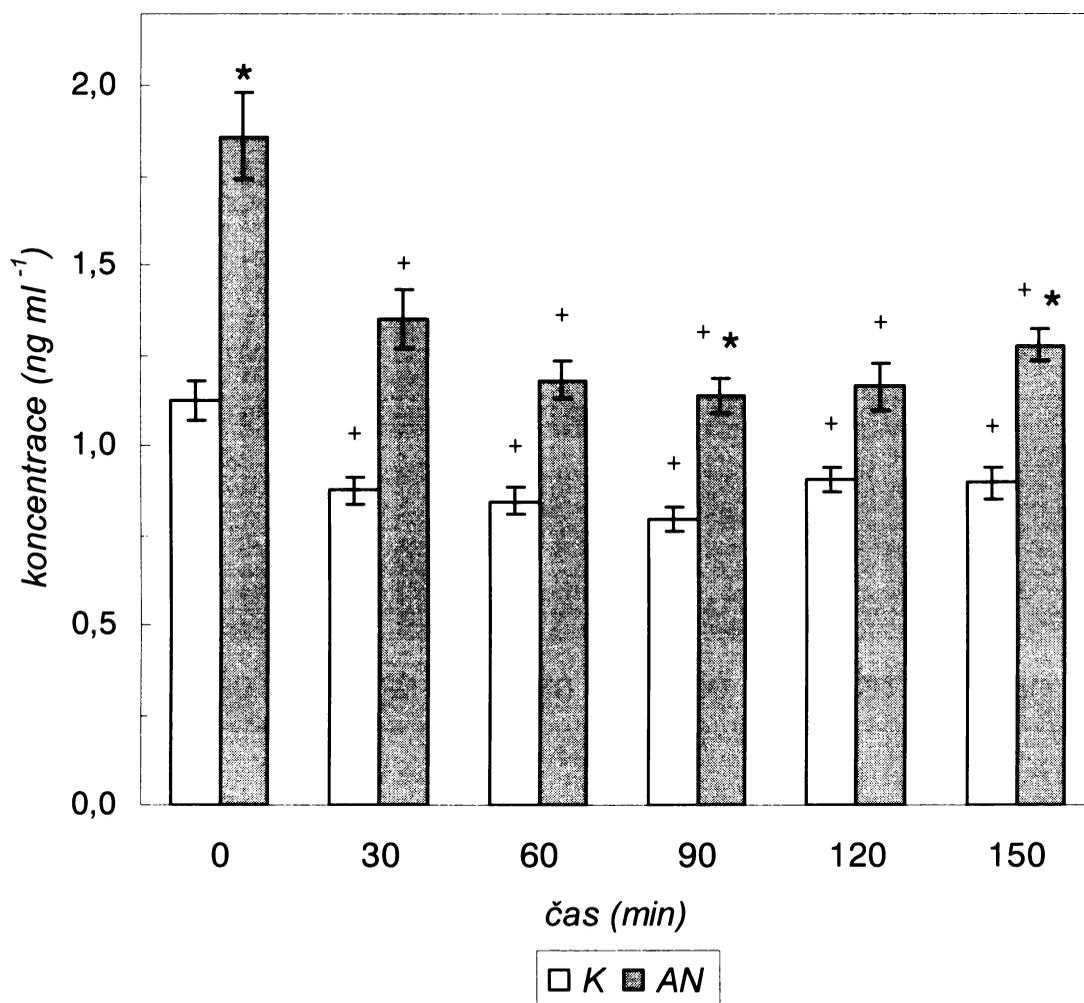
	jednotky	K	AN
BMI	kg m <sup>-2</sup>	20,72 ± 0,36	15,76 ± 0,35*
leptin	ng ml <sup>-1</sup>	8,93 ± 0,93	1,23 ± 0,22**
ghrelin	ng ml <sup>-1</sup>	1,12 ± 0,05	1,86 ± 0,12*
obestatin	ng ml <sup>-1</sup>	0,21 ± 0,01	0,35 ± 0,01*
ghre/obes		5,55 ± 0,40	5,30 ± 0,29
inzulin	mIU l <sup>-1</sup>	5,33 ± 0,67	3,73 ± 0,35
glukóza	mmol l <sup>-1</sup>	4,57 ± 0,11	4,31 ± 0,08



**Graf 4.1** Porovnání bazálních hodnot sledovaných parametrů u zdravých kontrolních žen a pacientek s anorexia nervosa

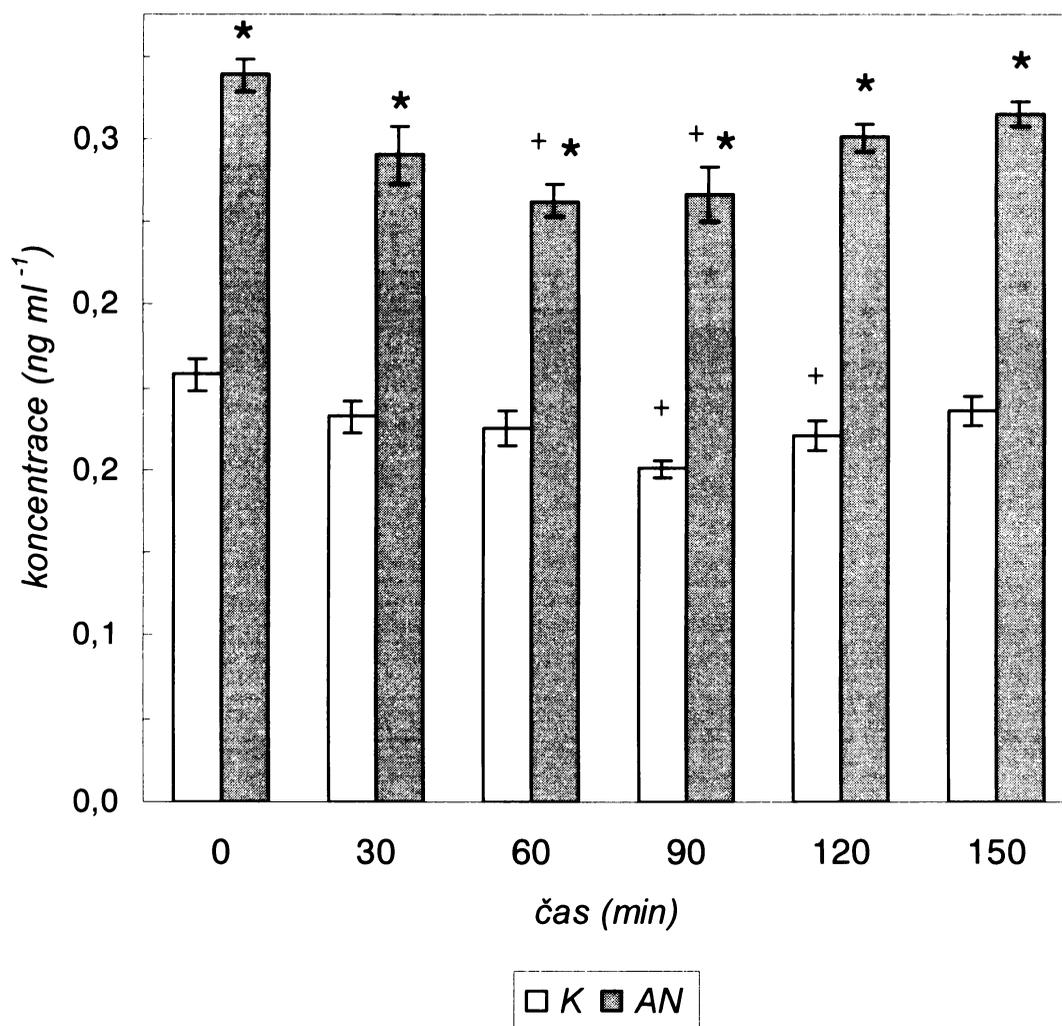
(K = kontrolní ženy, n = 10; AN = pacientky s anorexia nervosa, n = 9; hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, plazmatické hladiny leptinu, ghrelinu a obestatinu jsou uvedeny na ose y v ng ml<sup>-1</sup>, ghre/obes značí poměr hladin ghrelinu ku obestatinu, který je bezrozměrný, plazmatické hladiny inzulinu a glukózy jsou uvedeny na ose y v mIU l<sup>-1</sup> a mmol l<sup>-1</sup> respektive; \* označuje rozdíl mezi skupinami na hladině významnosti p < 0,05; \*\* označuje rozdíl mezi skupinami na hladině významnosti p < 0,01)

#### 4.1.2 Průběh hladin stanovovaných hormonů po podání sacharidové snídane



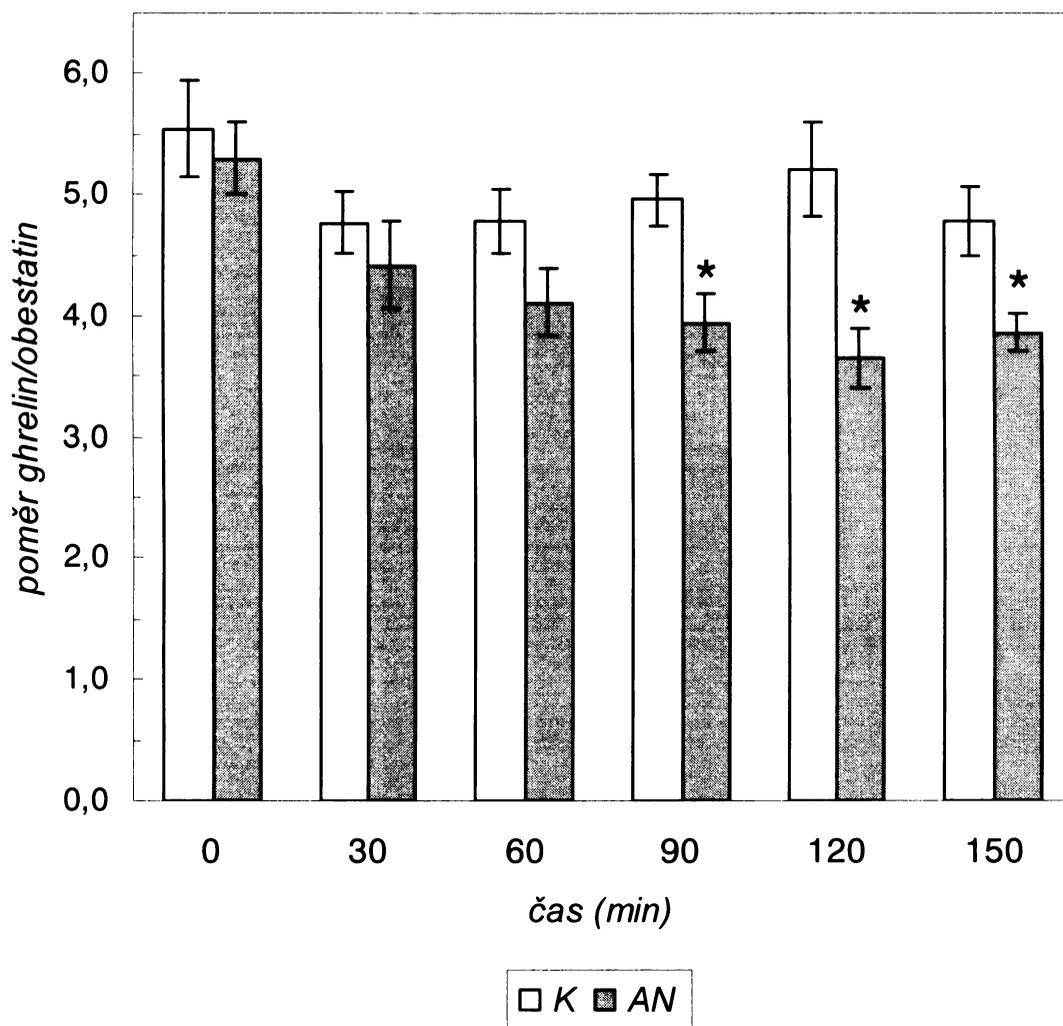
**Graf 4.2** Průběh hladin ghrelinu u zdravých kontrolních žen a pacientek s anorexia nervosa po podání sacharidové snídane

(K = kontrolní ženy, n = 10; AN = pacientky s anorexia nervosa, n = 9; snídane byla podána po odběru v 0. minutě; hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, + označuje rozdíl oproti bazální hodnotě na hladině významnosti  $p < 0,05$ ; \* označuje rozdíl mezi skupinami na hladině významnosti  $p < 0,05$ )



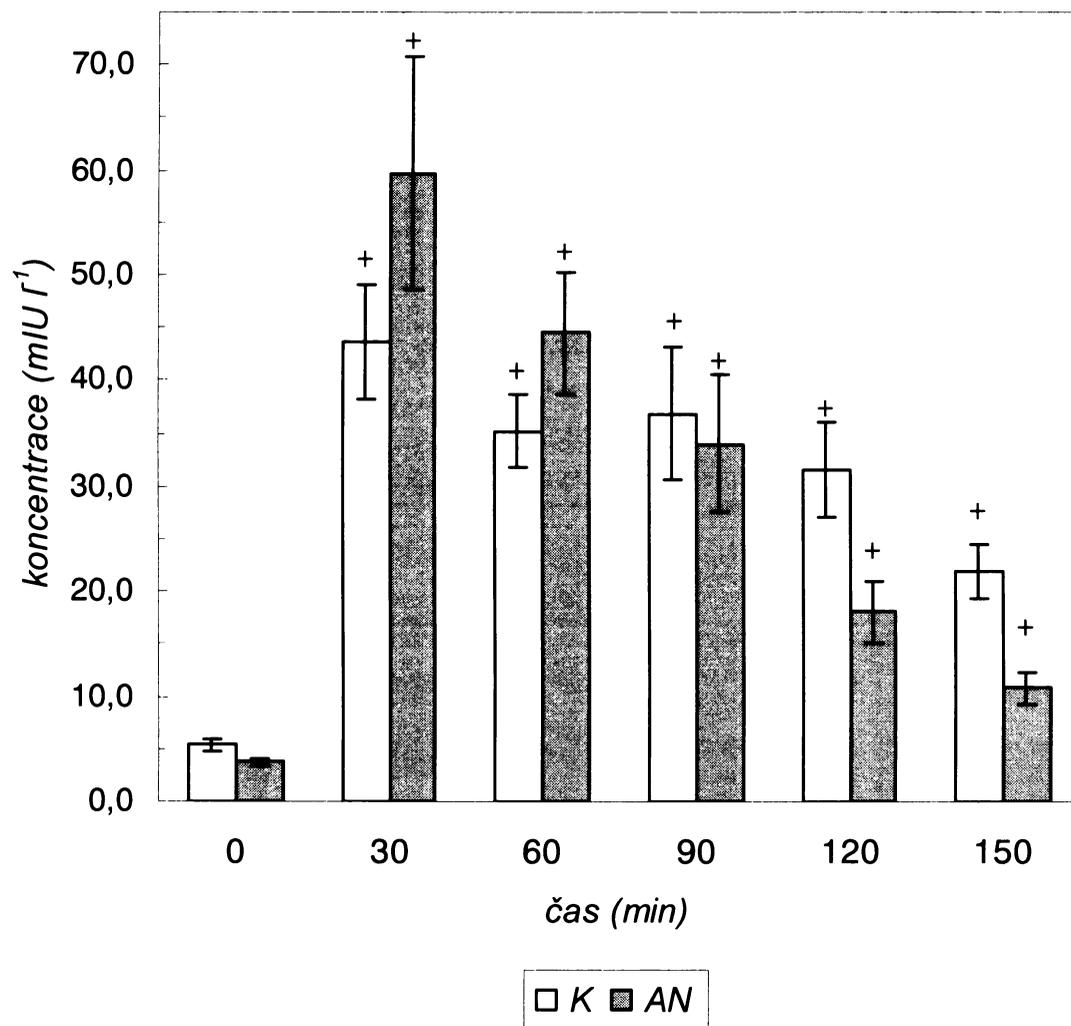
**Graf 4.3** Průběh hladin obestatinu u zdravých kontrolních žen a pacientek s anorexia nervosa po podání sacharidové snídane

(K = kontrolní ženy, n = 10; AN = pacientky s anorexia nervosa, n = 9; snídane byla podána po odběru v 0. minutě; hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, + označuje rozdíl oproti bazální hodnotě na hladině významnosti  $p < 0,05$ ; \* označuje rozdíl mezi skupinami na hladině významnosti  $p < 0,05$ )



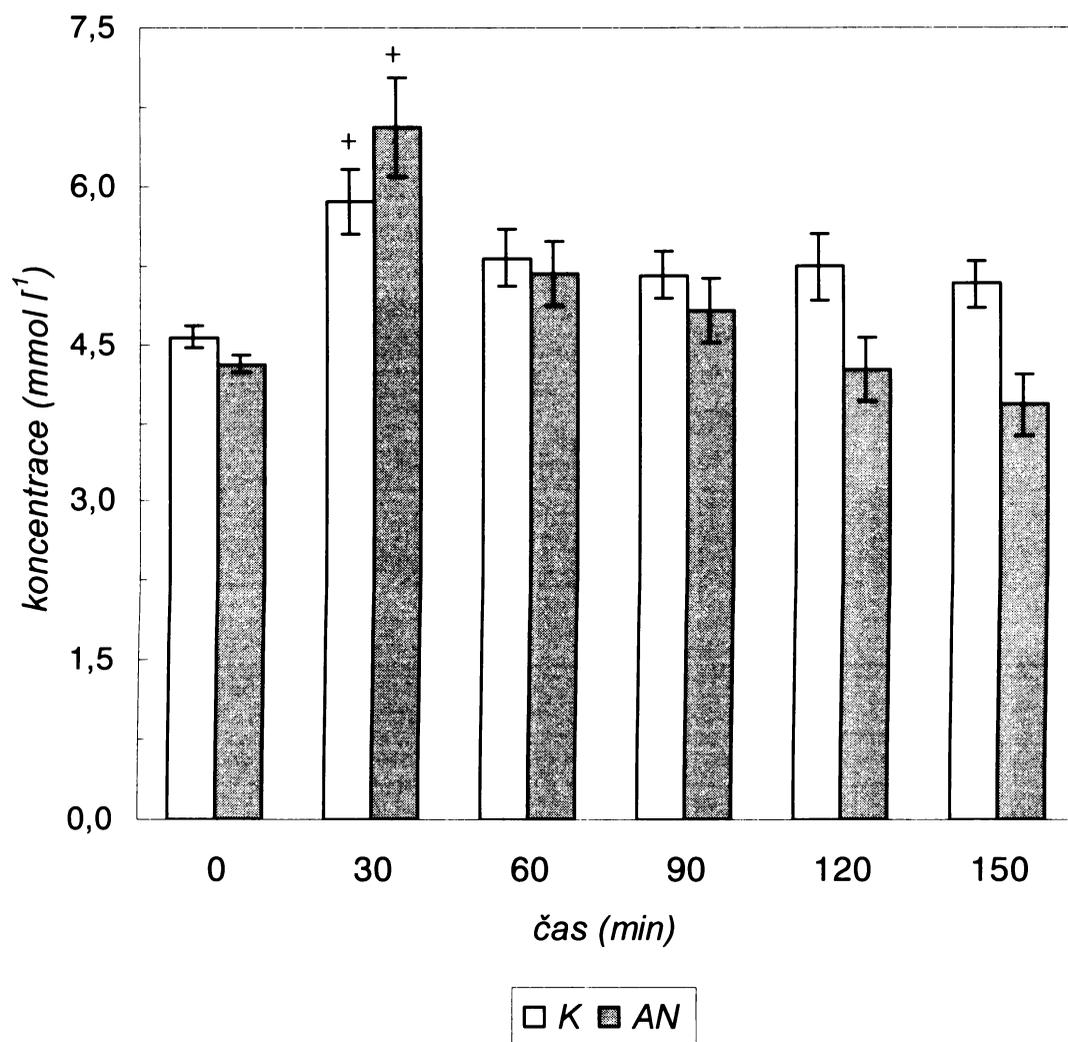
**Graf 4.4** Průběh poměru ghrelin/obestatin u zdravých kontrolních žen a pacientek s anorexia nervosa po podání sacharidové snídane

(K = kontrolní ženy, n = 10; AN = pacientky s anorexia nervosa, n = 9; snídane byla podána po odběru v 0. minutě; hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, \* označuje rozdíl mezi skupinami na hladině významnosti  $p < 0,05$ )



**Graf 4.5** Průběh hladin inzulinu u zdravých kontrolních žen a pacientek s anorexia nervosa po podání sacharidové snídani

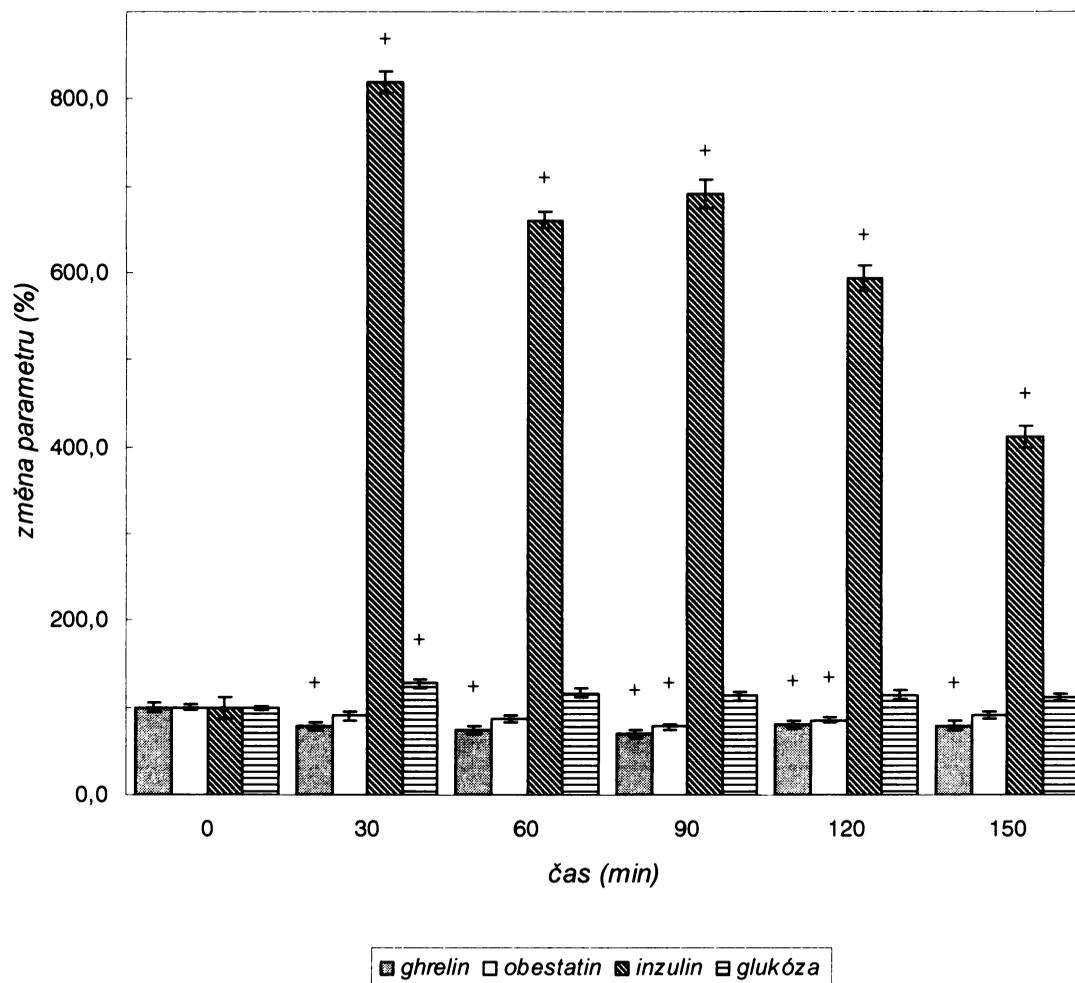
(K = kontrolní ženy, n = 10; AN = pacientky s anorexia nervosa, n = 9; snídani byla podána po odběru v 0. minutě; hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, + označuje rozdíl proti bazální hodnotě na hladině významnosti  $p < 0,05$ )



**Graf 4.6** Průběh hladin glukózy u zdravých kontrolních žen a pacientek s anorexia nervosa po podání sacharidové snídane

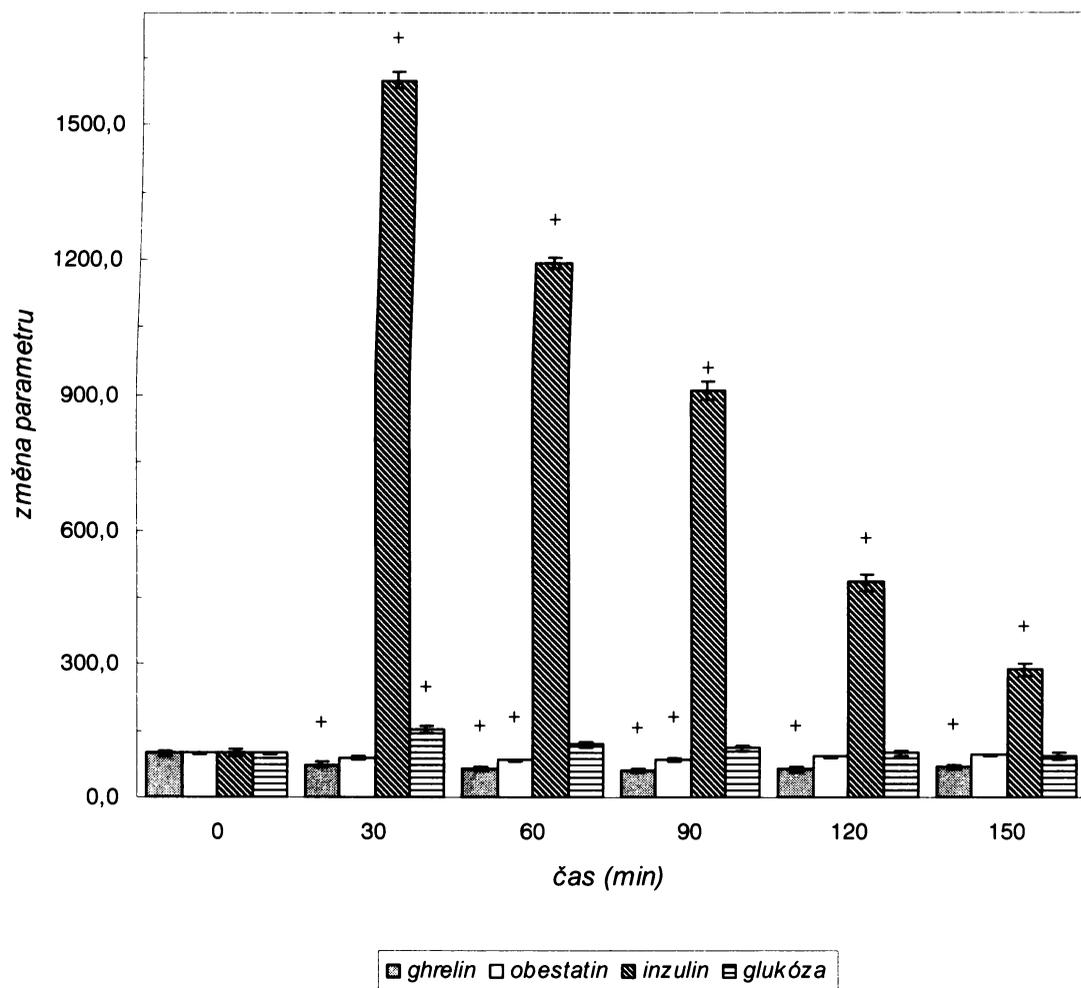
(K = kontrolní ženy, n = 10; AN = pacientky s anorexia nervosa, n = 9; snídane byla podána po odběru v 0. minutě; hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, + označuje rozdíl oproti bazální hodnotě na hladině významnosti  $p < 0,05$ )

### 4.1.3 Porovnání průběhu hladin stanovených hormonů po podání sacharidové snídane



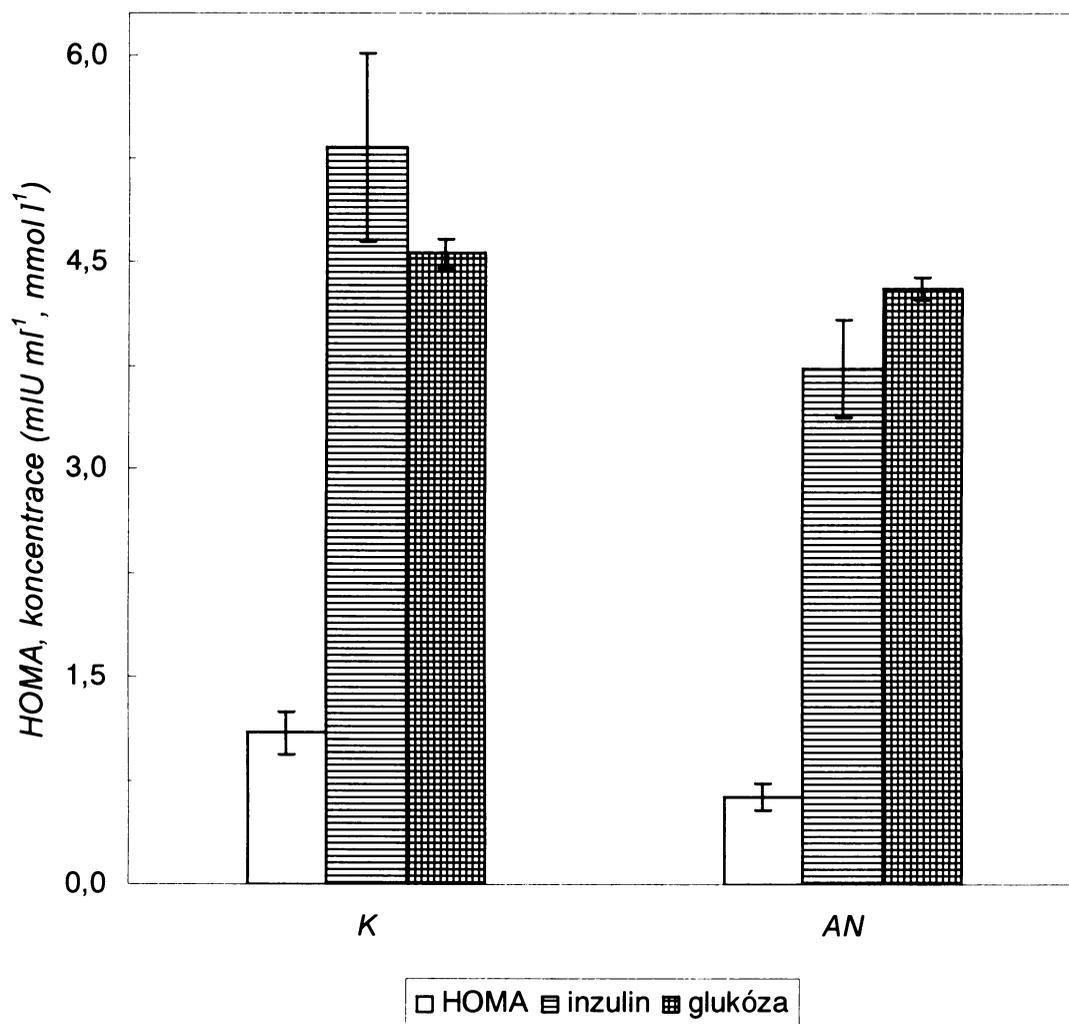
**Graf 4.7** Časový průběh změn sledovaných parametrů v procentech u skupiny kontrolních žen

(n = 10; snídane byla podána po odběru v 0. minutě; bazální hodnota je vyjádřena jako 100 %; hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, + označuje rozdíl oproti bazální hodnotě na hladině významnosti  $p < 0,05$ )



**Graf 4.8** Časový průběh změn sledovaných parametrů v procentech u skupiny pacientek s anorexia nervosa

(n = 9; snídaně byla podána po odběru v 0. minutě; bazální hodnota je vyjádřena jako 100 %; hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, + označuje rozdíl oproti bazální hodnotě na hladině významnosti  $p < 0,05$ )



**Graf 4.9** Porovnání indexu homeostatického modelu zkoušky inzulinové rezistence (HOMA) a bazálních hladin inzulinu a glukózy u zdravých kontrolních žen a pacientek s anorexia nervosa

(K = kontrolní ženy, n = 10; AN = pacientky s anorexia nervosa, n = 9; hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM, HOMA značí homeostatický model zkoušky inzulinové rezistence, který je bezrozměrný, plazmatické hladiny inzulinu a glukózy jsou uvedeny na ose y v mIU l<sup>-1</sup> a mmol l<sup>-1</sup>, respektive)

## 4.2 Výsledky

Bazální plazmatické hladiny adipocytárního hormonu leptinu byly výrazně sniženy u skupiny pacientek s AN ( $K = 8,93 \pm 0,93 \text{ ng ml}^{-1}$ ;  $AN = 1,23 \pm 0,22 \text{ ng ml}^{-1}$ ;  $p < 0,01$ ). Oproti tomu plazmatické hladiny jeho antagonisty, ghrelinu, byly nalačno u pacientek zvýšeny ( $K = 1,12 \pm 0,05 \text{ ng ml}^{-1}$ ;  $AN = 1,86 \pm 0,12 \text{ ng ml}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ). Podobně byly zvýšeny hladiny obestatinu před podáním snídaně s vysokým obsahem sacharidů u pacientek s AN ( $K = 0,21 \pm 0,01 \text{ ng ml}^{-1}$ ;  $AN = 0,35 \pm 0,01 \text{ ng ml}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ). Bazální hladiny inzulínu a glukózy nevykazují významný rozdíl mezi studovanými skupinami (inzulín:  $K = 5,33 \pm 0,67 \text{ mIU l}^{-1}$ ;  $AN = 3,73 \pm 0,35 \text{ mIU l}^{-1}$ ; glukóza:  $K = 4,57 \pm 0,11 \text{ mmol l}^{-1}$ ;  $AN = 4,31 \pm 0,08 \text{ mmol l}^{-1}$ ) (Tabulka 4.1, Graf 4.1).

Plazmatické hladiny ghrelinu po podání sacharidové snídaně klesaly u obou skupin. U zdravých kontrolních žen dosáhly minima v 90. minutě ( $0,79 \pm 0,03 \text{ ng ml}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ), stejně tak u pacientek s AN ( $1,14 \pm 0,05 \text{ ng ml}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ). Významný je i rozdíl mezi sledovanými skupinami v 0., 90. a 150. minutě (Graf 4.2).

Plazmatické koncentrace obestatinu po podání snídaně klesly u obou skupin. U kontrolních žen dosáhly minima okolo 90. minuty ( $K = 0,16 \pm 0,01 \text{ ng ml}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ), nejnižší hodnota u pacientek s AN byla naměřena v 60. minutě ( $AN = 0,29 \pm 0,01 \text{ ng ml}^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ). Ve všech časech měření byl významný rozdíl mezi skupinou kontrolních žen a pacientek s AN (Graf 4.3).

Poměr ghrelin/obestatin vykazoval u obou skupin pokles po příjmu potravy. Mezi skupinami byl nalezen statisticky významný rozdíl v 90., 120. a 150. minutě (Graf 4.4).

Plazmatické hladiny inzulínu i glukózy se po podání sacharidové snídaně zvýšily. Maxima dosáhly bezprostředně po jídle (inzulín:  $K = 43,64 \pm 5,52 \text{ mIU l}^{-1}$ ;  $AN = 59,70 \pm 11,01 \text{ mIU l}^{-1}$ ; glukóza:  $K = 5,85 \pm 0,30 \text{ mmol l}^{-1}$ ;  $AN = 6,55 \pm 0,47 \text{ mmol l}^{-1}$ ). Po 150-ti minutách trvání testu se hladiny inzulínu nevrátily na původní hodnotu stejně jako hladiny glukózy u zdravých žen, u pacientek s AN klesla koncentrace glukózy pod bazální hodnotu (Graf 4.5, Graf 4.6).

HOMA index byl u pacientek s AN nižší než u kontrolních žen ( $K = 1,09 \pm 0,15$ ;  $AN = 0,63 \pm 0,10$ ), ale vzhledem k rozptylu hodnot nedosáhl rozdíl statistické významnosti (Graf 4.9).

## 5 Diskuse

Tato diplomová práce se zabývá sledováním hladin vybraných parametrů, které ovlivňují příjem potravy, a jejich změnami u pacientek s AN nalačno a po příjmu sacharidové snídaně. Bylo zjištěno, že bazální plazmatické hladiny anorexigenu leptinu byly u pacientek s AN oproti kontrolám sníženy, zatímco bazální plazmatické hladiny orexigenu ghrelinu a předpokládaného anorexigenu obestatinu byly zvýšené. Bazální hladiny glukózy a inzulínu byly srovnatelné s hladinami nalezenými u kontrolních žen. Po snídani s vysokým obsahem sacharidů hodnoty ghrelinu i obestatinu v krevním oběhu klesaly, hladiny inzulínu a glukózy se zvýšily.

Pro účely diplomové práce jsem měřila pouze bazální plazmatické hladiny leptinu, tedy před příjmem snídaně bohaté na sacharidy. Z řady publikovaných studií [5, 42, 43, 44, 45] vyplývá, že leptin se účastní spíše dlouhodobé regulace příjmu potravy. Někteří autoři sledovali a porovnávali změny plazmatických hladin leptinu během celého dne u zdravých osob a u pacientek s AN. Jejich studie ukázaly, že hladiny leptinu se u pacientek s AN v krátkém časovém úseku neměnily [118]. Nepublikované výsledky naší laboratoře také u náhodně vybraného malého souboru pacientek s AN a kontrolních žen neukazují po příjmu sacharidové snídaně významné změny hladin leptinu [nepublikované výsledky]. Mírné výkyvy v hladinách jsou pravděpodobně způsobeny pouze diurnálním rytmem, který u pacientek s AN chybí [118, 119, 120, 121]. Výsledky tedy potvrdily, že pacientky s AN mají bazální hladiny anorexigenního peptidu leptinu snižené. Někteří autoři pozorovali závislost plazmatických hladin leptinu na množství tělesného tuku – u osob s redukováným množstvím tělesného tuku jsou hladiny leptinu nižší, oproti tomu u obézních osob jsou výrazně zvýšené [122, 123, 124, 125, 126, 127]. Značná rozporuplnost literárních údajů zabývajících se vztahem leptinu a tělesných parametrů je způsobena tím, že řada autorů koreluje hladiny leptinu s hodnotami BMI, který je obecně považován za měřítko tělesného složení. Tento index má však své nedostatky, neboť nezahrnuje například stavbu těla či množství svalstva. Pro porovnání jsem však tuto korelaci také zjišťovala, ale nebyla nalezena stejně jako u autorů Casanueva a ost. (1997) a Eckert a ost. (1997) [19, 128] narozdíl od dalších autorů [125, 129, 130, 131]. Rozpory ve zjištěných datech jsou řadou autorů

vysvětlovány těžko vymežitelným typem anorexie. Také doba trvání anorexie může ovlivňovat vztah BMI s plazmatickými hladinami leptinu.

Gastrointestinální hormon ghrelin je označován za antagonistu leptinu. Jeho vliv na příjem potravy je zcela opačný, působením na jádra hypotalamu zvyšuje totiž příjem potravy a tím i tělesnou hmotnost. Na rozdíl od leptinu jsem u pacientek s AN naměřila bazální plazmatické koncentrace orexigenního peptidu ghreluinu významně zvýšené podobně jako řada dalších autorů [67, 74, 132, 133, 134]. Některé studie uvádějí korelaci hladin ghreluinu s hodnotami BMI, tělesnou hmotností a krevním tlakem [135, 136, 137], jiní autoři podobně jako já takovou závislost nenalezli [102, 138]. Někteří autoři pozorovali i vliv věku, pohlaví, plazmatických hladin růstového hormonu, glukózy a inzulínu na hladinu ghreluinu v krevním oběhu [56, 75, 139, 140, 141]. Řada dalších však tyto vztahy nepotvrdila [59, 142].

Hladiny ghreluinu po podání sacharidové snídaně sice klesají asi hodinu po příjmu potravy [54, 63], ale absolutní koncentrace ghreluinu u pacientek s AN zůstávají zvýšené. Zdá se, že tento pokles je závislý na obsahu makronutrientů. Po příjmu potravy s vysokým obsahem sacharidů byl u zdravých osob nalezen výraznější pokles hladin ghreluinu než po potravě s vysokým obsahem tuků či proteinů [134, 143, 144]. Podle Erdmanna a ost. (2004) dochází k poklesu ghreluinu po příjmu sacharidů, naopak ke zvýšení jeho hladin dojde po tucích, proteinech, ovoci a zelenině [72]. I další autoři potvrzují závislost poklesu ghreluinu na typu živin a na energetickém obsahu stravy použité pro tento typ klinických studií [63, 72, 145, 146]. Tanaka a ost. (2003) pozoroval pokles zvýšených hladin ghreluinu po orálním podání glukózy v závislosti na typu AN. U restriktivního typu AN našel patrný pokles, zatímco u purgativního typu odezva na podání glukózy chyběla [147]. Jako důvod rozdílů nalezených ve studiích, kterých se účastní pacientky s AN, je udávána rozmanitost klinických charakteristik pacientek a také doba trvání nemoci. V lékařských záznamech byly všechny mnou sledované pacientky vedeny jako restriktivní typ AN.

Obestatin je nedávno objevený peptid, o jehož funkci se předpokládalo, že je úzce spjata s ghrelinem, ale s opačným, tedy anorexigenním účinkem. Oba tyto hormony vznikají ze stejného prekurzoru, proghreluinu. Po prvních zprávách,

popisujících údajnou opačnou roli obestatinu ve srovnání s ghrelinem u hlodavců [50], řada autorů tuto domněnku v klinických studiích nepotvrdila [28, 92, 93, 94]. Sedláčková a ost. (2008) prezentovala souběžný pokles hladin obestatinu a ghrelinu po sacharidové snídani u zdravých osob [102]. Naše i další výsledky ukazují, že bazální hodnoty ghrelinu i obestatinu jsou u pacientek s AN vyšší ve srovnání se zdravými kontrolami [28, 92, 93, 94]. I po příjmu potravy vykazoval obestatin stejný klesající trend jako ghrelin u obou sledovaných skupin. Tento pozitivní vztah obestatinu a ghrelinu po příjmu potravy u pacientek s AN naznačuje, že tyto produkty stejného genu působí obdobným způsobem nejen u zdravých osob, ale také u pacientek s AN. Předložené výsledky podporují tedy názor, že obestatin je agonistou ghrelinu, ale s odlišným mechanismem působení. Výsledky Anderwald-Stadlerové a ost. (2007) ukazují korelaci mezi hladinami ghrelinu a obestatinu, a dále ukazují, že hladiny ghrelinu lze díky předem známým hladinám obestatinu předpovědět [148]. Při statistickém zpracování výsledků byla nalezena korelace mezi těmito dvěma peptidy u obou sledovaných skupin ( $p < 0,1$ ). Lippl a ost. (2008) ve své studii provedené na 321 osobách uvádí, že koncentrace obestatinu koreluje s BMI, věkem a koncentrací inzulínu u zdravých a obézních osob [96]. Z uvedených výsledků toto nevyplývá, což může být způsobeno výrazně nižším počtem osob ve skupině.

Řada studií uvádí možnost, že regulace energetické homeostázy závisí na poměru mezi ghrelinem a obestatinem [28, 95, 97]. Výsledky Monteleoneho a ost. (2008) a Zamrazilové a ost. (2008) ukazují, že ve srovnání se zdravými ženami pacientky s AN mají zvýšené hladiny jak obestatinu a ghrelinu [28, 41], tak zvýšený poměr ghrelin/obestatin a tento poměr je významně pozitivně korelován s tělesnou hmotností a BMI [28]. Také u obézních osob byl nalezen tento poměr zvýšený [95]. Monteleone dále uvádí, že nerovnovážený metabolický stav může pravděpodobně ovlivnit expresi genu pro preproghrelin a/nebo sestřih na jeho produkty, a že rozhodující účinek na příjem potravy a energetickou homeostázu může mít poměr ghrelin/obestatin. U pacientek s AN dochází ke zvýšené expresi genu pro preproghrelin, což vede ke zvýšení produkce ghrelinu a obestatinu, které se však pravděpodobně nevyskytují v poměru 1:1 [28]. Monteleone svá pozorování a výsledky zdůvodňuje vysokým výskytem purgativního typu pacientek ve skupině, který mohl způsobit tento rozpor.

Prozatím nepublikované výsledky naší laboratoře u pacientek s AN podporují pozorování Germaina a ost. (2009) [93], který popsál pokles poměrů acyl ghrelin/obestatin a total ghrelin/obestatin u pacientek s AN ve srovnání s konstitučně štíhlými a také kontrolními ženami. Předložené výsledky také ukazují, že po sacharidové snídani dochází ke snížení tohoto poměru u obou skupin, nejnižších hodnot bylo dosaženo více než 90 minut po příjmu potravy. Ve studii Sedláčkové a ost. (2008) koreloval poměr ghrelin/obestatin pozitivně s hodnotami BMI u zdravých žen, zatímco samotné hladiny ghrelinu či obestatinu tuto korelaci nevykazovaly [102]. V našich výsledcích se tato korelace neobjevila ani u zdravých žen, ani u pacientek s AN. Všechny zmíněné údaje ukazují na zajímavou roli rovnováhy mezi těmito dvěma hormony, ale přesný význam poměru ghrelin/obestatin musí být podroben dalšímu zkoumání.

Inzulin je hormon, jehož vyplavení je podněcováno vzestupem koncentrace glukózy v krvi a tím i v extracelulárním prostoru. Má stimulační vliv na syntézu leptinu v lidských adipocytech. Čtyř až šestihodinová hyperinzulinémie však ještě neukázala výrazné zvýšení exprese leptinové mRNA v lidských adipocytech in vivo [149]. Ke zvýšení plazmatických hladin leptinu je tedy nutné podstatně delší působení inzulinu (in vitro 48 až 72 hodin) [150]. Vzhledem k těmto zjištěním a našemu relativně krátkodobému sledování hormonů po podání snídaně (150 minut) nebyl vztah mezi hladinami leptinu a inzulinu sledován.

HOMA index se používá k určení stupně inzulinové senzitivity (IS). Je založen na výpočtu, který charakterizuje udržení negativní odezvy mezi játry a pankreatickými  $\beta$ -buňkami regulující koncentrace glukózy i inzulinu [151]. Studie, které se zabývají IS u pacientek s AN přinášejí rozdílné výsledky. Větší počet studií uvádí zvýšenou IS [27, 152, 153], jiní autoři pozorovali sníženou IS [154] nebo nezměněnou [155]. Bazální hladiny glukózy se podle Dostálové a ost. (2008) neliší u zdravých osob a pacientek s AN, zatímco hladiny inzulinu jsou výrazně sníženy. HOMA u AN našli tito autoři rovněž výrazně nižší [156]. V předložených výsledcích se toto nepodařilo zcela potvrdit. Stejně jako Dostálová a ost. (2008) jsme nenalezli rozdíl v bazálních hladinách glukózy mezi sledovanými skupinami, oproti jejím výsledkům jsme však nenašli významný rozdíl v hladinách inzulinu mezi skupinou kontrol a pacientek s AN. HOMA

index jsme u pacientek s AN zjistili nižší, ale kvůli rozptylu hodnot ve skupině nedosáhl tento rozdíl statistické významnosti.

Studie týkající se uvolňování ghrelinu po příjmu sacharidové snídaně ukázaly, že pokles plazmatických hladin ghrelinu je paralelní se zvýšením hladin inzulinu [56, 59, 68, 70, 71, 72, 73]. Objevila se však i studie, která korelaci mezi postprandiálními změnami cirkulujícího ghrelinu a glukózy s inzulinem u zdravých žen nepotvrdila [77]. Monteleone a ost. (2003) odůvodňují tento nálezní odlišnou energetickou hodnotou přijaté potravy než jaká byla použita v ostatních studiích [43]. Dalšími důvody může být i diurnální rytmus vyplavování hormonů. Stejně jako Monteleone a ost. (2003) [43] jsme nenalezli korelaci mezi hladinami inzulinu, glukózy a ghrelinu u zdravých žen a pacientek s AN. Podle Erdmanna a ost. (2004) má inzulin inhibiční vliv na uvolňování ghrelinu, což může být podmíněno určitou prahovou koncentrací inzulinu a/nebo glukózy [72].

Studie sledující vztah hladin inzulinu a ghrelinu jsou poměrně četné, oproti tomu vztahem hladin inzulinu a obestatinu se zabývalo velmi málo autorů. Snížené koncentrace obestatinu jsou spojeny s diabetem a inzulinovou rezistencí, která je vyjadřována pomocí HOMA indexu [103, 157]. Studie Anderwald-Stadlerové a ost. (2007) předpokládá, že inzulin a celková IS může být regulátorem sekrece obestatinu [148]. Ve skupinách, které jsme sledovali, byla korelace hladin inzulinu a obestatinu zjištěna pouze u zdravých osob ( $p < 0,05$ ), což podporuje představu o významném vztahu těchto dvou hormonů. Úloha obestatinu v energetické homeostáze, regulaci tělesné hmotnosti a IS je však stále nejasná a je zapotřebí dalších studií k jejímu objasnění [50, 81, 100].

Záporná korelace mezi poměrem ghrelin/obestatin a hladinami inzulinu je prezentována ve studii Gil-Campose a ost. (2006) [158]. Podle těchto autorů může mít tato korelace zásadní účinek při regulačním vlivu inzulinu na hladiny cirkulujícího ghrelinu [158]. Ve studovaných skupinách se však žádná korelace mezi koncentrací inzulinu a poměrem ghrelin/obestatin neobjevila.

Mechanismus, kterým by inzulin ovlivňoval uvolňování obestatinu a ghrelinu, je prozatím nejasný. Inzulinová signální kaskáda byla nalezena v GIT, který tak může být považován za tkáň citlivou na inzulin [159]. Inzulinem způsobený pokles plazmatických

hladin obestatinu a ghrelinu může být výsledkem na inzulinu závislé inhibice produkce společného prekursoru těchto dvou peptidů nebo uvolňování hormonů z buněk, které je produkují [148].

## 6 Závěr

Předložená diplomová práce sledovala hladiny vybraných parametrů energetické homeostázy u pacientek s anorexia nervosa po podání sacharidové snídaně o celkové energetické hodnotě 1604 kJ a porovnávala je se zdravými ženami.

U pacientek s anorexia nervosa jsou plazmatické hladiny hormonů ovlivňujících příjem potravy oproti kontrolním ženám změněny. Hladina anorexigenního hormonu leptinu je u pacientek s AN výrazně nižší, což odpovídá sníženému množství tělesného tuku. Hladiny antagonisty leptinu, ghrelinu, jsou zvýšené a nekorelují s BMI. Neprokázali jsme původní předpoklad anorexigenního charakteru nedávno objeveného hormonu obestatinu podobně jako to v poslední době popisuje řada autorů. U pacientek s AN jsme stanovili souběžně vyšší bazální hladiny obestatinu a orexigenního ghrelinu.

Plazmatické hladiny ghrelinu a obestatinu po příjmu potravy s vysokým obsahem sacharidů klesají. To opět přispívá k domněnce orexigenního charakteru obou hormonů ovlivňujících chuť k jídlu a příjem potravy. Změny v jejich hladinách odráží fyziologický stav pacientek s AN. Zdá se, že jak obestatin, tak ghrelin vzájemně modulují svoji sekreci. Oba hormony jsou pokládány za indikátory krátkodobé regulace energetické rovnováhy.

Lze usuzovat, že za stavů jako je například hladovění dochází k alternativnímu sestřihu genu pro preproghrelin, který nese informaci pro ghrelin i obestatin. Mechanismy odpovědné za nerovnováhu v produkci ghrelinu a obestatinu nejsou zcela objasněny, zatím je známo málo o posttranslačním sestřihu preproghrelinu, který může být ovlivněn mnoha faktory. Jak ghrelin, tak obestatin přispívají k regulaci energetické homeostázy nejen vlivem na potravní chování, ale také modulací uvolňování inzulínu a dalších hormonů.

Bazální hodnota poměru ghrelinu ku obestatinu se u pacientek s AN nelišila od kontrolních žen. Z našich nálezů vyplývá, že změna poměru ghrelin/obestatin navozená příjmem potravy se stává zřetelnou až po dosažení minimálních hladin obou hormonů. To vše poukazuje na důležitost udržování rovnováhy mezi sekrecí ghrelinu a obestatinu.

Z předložených výsledků plyne, že existuje vztah mezi uvolňováním sledovaných hormonů a hladinami inzulínu. Zvýšené hladiny inzulínu po podání vysokosacharidové snídaně jsou provázeny poklesem hladin ghrelinu a obestatinu a je

tedy možné, že příjem potravy primárně stimuluje gastrickou sekreci ghrelinu. Je-li podáno a absorbováno dostatečné množství sacharidů vedoucí ke zvýšení plazmatických hladin glukózy a tím inzulinu, je uvolňování ghrelinu následně potlačeno.

Výsledky získané touto studií mohou být výchozím materiálem pro další klinické studie zabývající se sledováním hladin hormonů energetické homeostázy u pacientek s poruchami příjmu potravy.

## 7 Seznam použité literatury

1. Stárka, L. a kolektiv: Pokroky v endokrinologii: Nedvídková, J.; Nedvídek, J.: Ghrelin a další hormony příjmu potravy a energetické rovnováhy. *Maxdorf*, 212-231 (2007).
2. Broberger, C.: Brain regulation of food intake and appetite: molecules and network. *Journal of internal medicine* **258**, 301-327 (2005).
3. Park, A.J.; Bloom, S.R.: Neuroendocrine control of food intake. *Current Opinion in Gastroenterology* **21**, 228-233 (2005).
4. Zhang, F.; Proenca, M.; Maffei, M.; Barone, M.; Leopold M.; Friedman, J.M.: Positional cloning of obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432 (1994).
5. Friedman, J.M.: The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutrition Reviews* **60**, S1-S14 (2002).
6. Shimomura, I.; Hammer, R.E.; Ikemoto, S.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L.: Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* **401**, 73-76 (1999).
7. Fain, J.N.; Madan, A.K.; Hiler, M.L.; Cheema, P.; Bahouth, S.W.: Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissue of obese humans. *Endocrinology* **145**, 2273 – 2282 (2004).
8. Wajchenberg, B.I.: Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews* **21**, 697–738 (2000).

9. Halaas, J.L.; Gajiwala, K.S.; Maffei, M.; Cohen, S.L.; Chait, B.T.; Rabinowitz, D.; Lallone, R.L.; Burley, S.K.; Friedman, J.M.: Weight reducing effects of the plasma protein encoded by the ob gene. *Science* **269**, 543–546 (1995).
10. Rosenbaum, M.; Nicolson, M.; Hirsch, J.; Heymsfield, S.B.; Gallagher, D.; Chu, F.; Leibel, R.L.: Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations leptin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **81**, 3424–3427 (1996).
11. Hadji, P.; Gorke, K.; Hars, O.; Bauer, T.; Emons, G.; Schulz, K.D.: The influence of hormone replacement therapy (HRT) on serum leptin concentrations in postmenopausal women. *Maturitas* **37**, 105–111 (2000).
12. Coll, A.P.; Sadaf Farooqi, I.; O’Rahilly S.: The hormonal control of food intake. *Cell* **129**:2, 251-262 (2007).
13. Wauters, M.; Considine, R.V.; Van Gaal, L.F.: Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Society of the European Journal of Endocrinology* **143**, 293-311 (2000).
14. Petrzel, M.: Action od leptin on bone and its relationship to menopause. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czech Republic* **151**:2, 195–199 (2007).
15. Lu, H.; Li, C.: Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Research* **10**, 81–92 (2000).
16. Margetic, S.; Gazzola, C.; Pegg, G.G.; Hill, R.A.: Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* **26**, 1407–1433 (2002).

17. Farooqi, I.S.; Matarese, G.; Lord, G.M.; Keogh, J.M.; Lawrence, E.; Agwu, C.; Sanna, V.; Jebb, S.A.; Perna, F.; Fontana, S.; Lechler, R.I.; DePaoli, A.M.; O'Rahilly, S.: Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *The Journal of Clinical Investigation* **110**, 1093-1103 (2002).
18. Saladin, R.; De Vos, P.; Guerre-Milo, M.: Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* **377**, 527-529 (1995).
19. Casanueva, F.F.; Diegezh, C.; Popovic, V.; Peino, R.; Considine, R.; Caro, J.: Serum immunoreactive leptin concentrations in patients with anorexia nervosa before and after partial weight recovery. *Biochemical and Molecular Medicine* **60**, 116-120 (1997).
20. Nicklas, B.J.; Tomoyasu, N.; Muir, J.; Goldberg, A.P.: Effects of cigarette smoking and its cessation on body weight and plasma leptin levels. *Metabolism: Clinical and Experimental* **48**:6, 804-808 (1999).
21. Stejskal, D.; Ruzicka, V.; Novak, J.; Jedelsky, L.; Bartek, J.; Horalik, D.: Serum leptin in women during the third trimester of pregnancy. *Vnitřní Lékařství* **44**:10, 593-597 (1998).
22. Masuzaki, H.; Ogawa, Y.; Hosoda, K.; Miyawaki, T.; Hanaoka, I.; Hiraoka, J.; Yasuno, A.; Nishimura, H.; Yoshimasa, Y.; Nishi, S.; Nakao, K.: Glucocorticoid regulation of leptin synthesis and secretion in humans: elevated plasma leptin levels in Cushing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **82**, 2542-2547 (1997).
23. Ahima, R.S.; Saper, C.B.; Flier, J.S.; Elmquist, J.K.: Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinology* **21**, 263 - 307 (2000).
24. Zigman, J.M.; Elmquist, J.K.: Minireview: From anorexia to obesity - The yin and yang on body weight control. *Endocrinology* **144**:9, 3749-3756 (2003).

25. Grispoon, S.; Gulick, T.; Askari, H.; Landt, M.; Lee, K.; Anderson, E.; Ma, Z.; Vignati, L.; Bowsher, R.; Herzog, D.; Klibanski, A.: Serum leptin levels in women with anorexia nervosa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **81**, 3861-3863 (1996).
26. Heer, M.; Mika, C.; Grzella, I.; Heussen, N.; Herpertz-Dahlmann, B.: Bone turnover during inpatient nutritional therapy and outpatients follow-up in patients with anorexia nervosa compared with that in healthy control subjects. *The American journal of clinical nutrition* **80**, 774-781 (2004).
27. Misra, M.; Miller, K.K.; Almazan, C.; Ramaswamy, K.; Aggarwal, A.; Herzog, D.B.; Neubauer, G.; Bren, J.; Klibanski, A.: Hormonal and body composition predictors of soluble leptin receptor, leptin and free leptin index in adolescent girls with anorexia nervosa and controls and relation to insulin sensitivity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**, 3486-3495 (2004).
28. Monteleone, P.; Serritella, C.; Martiadis, V.; Scognamiglio, P.; Maj, M.: Plasma obestatin , ghrelin and ghrelin/obestatin ratio are increased in underweight patients with anorexia nervosa but not in symptomatic patients with bulimia nervosa *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **93**:11, 4418-4421 (2008).
29. Soyka L., Misra M., Frenchman A., Miller K., Grinspoon S., Schoenfeld D., Klibanski A.: Abnormal bone mineral accrual in adolescent girls with anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87**, 4177-4185 (2002).
30. Tolle, V.; Kadem, M.; Bluet-Pajot, M.T.; Frere, D.; Foulon, C.; Bossu, C.; Dardennes, R.; Mounier, C.; Zizzari, P.; Lang, F.; Epelbaum, J.; Estour, B.: Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**, 109-116 (2003).
31. <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2005/Amore/lep-alpha.jpg> (5.2. 2009)

32. Tartaglia, L.A.; Dembski, M.; Weng, X.; Deng, N.; Culpepper, J.; Devos, R.; Richards, G.J.; Campfield, L.A.; Clark, F.T.; Deeds, J.; Muir, C.; Sanker, S.; Moriarty, A.; Moore, K.J.; Smutko, J.S.; Mays, G.G.; Woolf, E.A.; Monroe, C.A.; Tepper, R.I.: Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83**, 1263-1271 (1995).
33. Tartaglia, L.A.: The leptin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 6093-6096 (1997).
34. Lee, G.H.; Proenca, R.; Montez, J.M.; Carroll, K.M.; Darvishzadeh, J.G.; Lee, J.I.; Friedman, J.M.: Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* **379**, 632-635 (1996).
35. Bjorbaek, C.; Kahn, B.B.: Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Progress in Hormone Research* **59**, 305-331 (2004).
36. Haluzík, M.: Poruchy výživy a leptin. *Grada Publishing* 2002 s.18
37. Klok, M.D.; Jakobsdottir, S.; Drent, M.L.: The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity reviews* **8**, 21-34 (2006).
38. Ghilardi, N.; Ziegler, S.; Wiestner, A.; Stoffel, R.; Heim, M.H.; Skoda, R.: Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 6231-6235 (1996).
39. Mercer, J.G.; Hoggard, N.; Williams, L.M.; Lawrence, C.B.; Hannah, L.T.; Trayhurn, P.: Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Letters* **387**, 113-116 (1996).

40. Minokoshi, Y.; Kim, Y.B.: Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **415**, 339-343 (2002).
41. Zamrazilová, H.; Hainer, V.; Sedláčková, D.; Papežová, H.; Kunešová, M.; Bellisle, F.; Hill, M.; Nedvídková, J.: Plasma obestatin levels in normal weight, obese and anorectic women. *Physiological Research* **57**:1, 49-55 (2008).
42. Guerci, B.; Hadjadj, S.; Quilliot, D.; Ziegler, O.; Drouin, P.: No acute response of leptin to an oral fat load in obese patients and during circadian rhythm in healthy controls. *European Journal of Endocrinology* **143**, 649-655 (2000).
43. Monteleone, P.; Bencivenga, R.; Longobardi, N.; Serritella, C.; Maj, M.: Differential responses of circulating ghrelin to high-fat or high-carbohydrate meals in healthy women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**, 5510-5514 (2003).
44. Strader, A.D.; Woods, C.S.: Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* **128**, 175-191 (2005).
45. Teff, K.L.; Elliott, S.S.; Tschöp, M.; Kieffer T.J.; Rader, D.; Heiman, M.; Townsend, R.R.; Keim, N.L.; D'Alessio, D.; Havel P.J.: Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin and increases triglycerides in women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**:6, 2963-2972 (2004).
46. Weigle, D.S.; Duell, P.B.; Connor, W.F.; Steiner, R.A.; Soules, M.R.; Kuiper, J.L.: Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **82**, 561-565 (1997).

47. Kolaczynski, J.W.; Ohannesian, J.P.; Considine, R.V.; Marco, C.C.; Opentanova, I.; Nyce, M.R.; Myint, M.; Caro, J.F.: Response of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves. *Diabetes* **45**, 1511-1515 (1996).
48. <http://bodyworksfitness.files.wordpress.com/2007/09/leptin.jpg> (5.2. 2009)
49. Kojima, M.; Hosoda, H.; Date, Y.; Nakazato, M.; Matsuo, H.; Kangawa, K.: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656-660 (1999).
50. Zhang, J.V.; Ren, P.G.; Avsian-Kretchmer, O.; Luo, C.W.; Rauch, R.; Klein, C.; Hsueh, A.J.: Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gen, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* **310**, 996-999 (2005).
51. Garg, A.: Commentary: The ongoing saga of obestatin: Is it a hormone? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **92**, 3396-3398 (2007).
52. Lely Van Der, A.J.; Tschöp, M.; Heiman, M.L.; Ghigo, E.: Biological, physiological, pathophysiological and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocrine Reviews* **25**:3, 426-457 (2004).
53. Ghigo, E.: Ghrelin. *Kluwer Academic Publishers*, 2004.
54. Kojima, M.; Kangawa, A.K.: Ghrelin: structure and function. *Physiological Reviews* **85**, 495-522 (2005).
55. Broglio, F.; Gottero, C.; Van Koetsveld, P.; Prodam, F.; Destefanis, S.; Benso, A.; Gauna, C.; Hofland, L.; Arvat, E.; Van Der Lely, A.J.; Gigo, E.: Acetylcholine regulates ghrelin secretion in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**, 2429-2433 (2004).

56. Cummings, D.E.; Purnell, J.Q.; Frayo, R.S.; Schmidova, K.; Wisse, B.E.; Weigle, D.S.: A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* **50**, 1714-1719 (2001).
57. Ambrogi, M.; Volpe, S.; Tamarini, C.: Ghrelin: central and peripheral effects a novel peptidyl hormone. *Medical Science Monitor* **9:9**, RA217-224 (2003).
58. Malagon, M.M.; Luque, R.M.; Ruiz-Guerrero, E.; Rodriguez-Pacheco, F.; Garcia-Navarro, S.; Casanueva, F.F.; Gracia-Navarro, F.; Castano, J.P.: Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin – stimulated growth hormone release in somatotrophs. *Endocrinology* **144:12**, 5372-5380 (2003).
59. Shiiya, T.; Nakazato, M.; Mizuta, M.; Date, Y.; Mondal, M.S.; Tanaka, M.; Nozoe, S.; Hosoda, H.; Kangawa, K.; Matsukara, S.: Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87:240-244** (2002).
60. Tschöp, M.; Weyer, C.; Tataranni, P.A.; Devanarayan, C.; Casanueva, F.F.; Deghenghi, R.; Camanni, F.; Ghigo E.: Preliminary evidence that ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. *Journal of Endocrinological Investigation* **23**, 493-495 (2000).
61. Cuntz, U.; Fruhauf, E.; Wawarta, R.; Tschöp, M.; Folwaczny, C.; Riepl, R.; Lehnert, P.; Fichter, M.; Otto, B.: A role for the novel weight-regulating hormone ghrelin in anorexia nervosa. *American Clinical Laboratory* **21**, 22-23 (2002).
62. Otto, B.; Cuntz, U.; Fruhauf, E.; Wawarta, R.; Folwaczny, C.; Riepl, R.L.; Heiman, M.L.; Lehnert, P.; Fichter, M.; Tschöp, M.: Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *European Journal of Endocrinology* **145**, 669-673 (2001).

63. Nedvídková, J.; Krykorková, I.; Barták, V.; Papežová, H.; Gold, P.W.; Alesci, S.; Pacák, K.: Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**:4, 1678-1682 (2003).
64. <http://www.alz-pharma.com/anglais/images/uag.jpg> (5.2. 2009)
65. Gnanapavan, S.; Kola, B.; Bustin, S.A.; Morris, D.G.; McGee, P.; Fairclough, P.; Bhattacharya, S.; Carpenter, R.; Grossman, A.B.; Korbonits, M.: 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 (2002).
66. Kojima, M.; Hosoda, H.; Matsuo, H.; Kangawa, K.: Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **12**, 118-122 (2001).
67. Muccioli, G.; Tschöp, M.; Papotti, M.; Deghenghi, R.; Heiman, M.; Ghigo, E.: Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *European Journal of Pharmacology* **440**, 235-254 (2002).
68. Flanagan, D.E.; Evans, M.L.; Monsod, T.P.; Rife, F.; Heptulla, R.A.; Tamborlane, W.V.; Sherwin, R.S.: The influence of insulin on circulating ghrelin. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **284**, E313-316 (2003).
69. Möhlig, M.; Spranger, J.; Otto, B.; Ristow, M.; Tschöp, M.; Pfeffer, A.F.: Euglycemic hyperinsulinemia, but not lipid infusion, decreases circulating ghrelin levels in humans. *Journal of endocrinological investigation* **25**, RC36-38 (2002).
70. Saad, M.F.; Bernaba, B.; Hwu, C.M.; Jinagouda, S.; Fahmi, S.; Kogosov, E.; Boyadjian, R.: Insulin regulates plasma ghrelin concentration. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87**, 3997-4000 (2002).

71. Murdolo, G.; Lucidi, P.; Di Loreto, C.; Parlanti, N.; De Cicco, A.; Fatone, C.; Fanelli, C.G.; Bolli, G.B.; Santeusano, F.; De Feo, P.: Insulin is required for prandial ghrelin suppression in humans. *Diabetes* **52**, 2923-2927 (2003).
72. Erdmann, J.; Töpsch, R.; Lippl, F.; Gussmann, P.; Schusdziarra, V.: Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake, plasma insulin and glucose. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**, 3048-3054 (2004).
73. Tschöp, M.; Wawarta, R.; Riepl, R.L.; Friedrich, S.; Bidlingmayer, M.; Landgraf, R.; Folwaczny, C.: Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *Journal of Endocrinological Investigation* **24**, RC19-21 (2001).
74. Dostálová, I.; Haluzík, M.: The role of ghrelin in the regulation of food intake in patients with obesity and anorexia nervosa. *Physiological Research*, Epub ahead of print (2008).
75. Ariyasu, H.; Takaya, K.; Tagami, T.; Ogawa, Y.; Hosoda, K.; Akamizu, T.; Suda, M.; Koh, T.; Natsui, K.; Toyooka, S.; Shirakami, G.; Usui, T.; Shimatsu, A.; Doi, K.; Hosoda, H.; Kojima, M.; Kangawa, K.; Nakao, K.: Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **86**, 4753-4758 (2001).
76. St-Pierre, D.H.; Karelis, A.D.; Cianflone, K.; Conus, F.; Mignault, D.; Rabasa-Lhoret, R.; Stonge, M.; Tremblay-Lebeau, A.A.; Poehleman, E.T.: Relationship between ghrelin and energy expenditure in healthy young women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**:12, 5993 – 5997 (2004).
77. Caixás, A.; Bachore, C.; Nash, W.; Pi-Sunyer, F.; Laferrère, B.: Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects.. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **87**:4, 1902 (2002).

78. Dun, S.L.; Brailoiu, G.C.B.E.; Yang, J.; Chang, J.K.; Dun, N.J.: Distribution and biological action of obestatin in the rat. *The Journal of Endocrinology* **191**, 481-489 (2006).
79. Gourcerol, G.; Million, M.; Adelson, D.W.; Wang, Y.; Wang, L.; Rivier, J.; St-Pierre, D.H.; Tache Y.: Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents. *Peptides* **27**, 2811-2819 (2006).
80. 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.; Schwartz, T.W.: GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology* **148**, 13-20 (2007).
81. 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.; Dieguez, C.: Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* **148**, 21-26 (2007).
82. Samson, W.K.; White, M.M.; Price, C.; Ferguson, A.V.: Obestatin acts in brain to inhibit thirst. *The American Journal of Physiology* **292**, R637-R643 (2007).
83. Yamamoto, D.; Ikeshita, N.; Daito, R.; Herningtyas, E.H.; Toda, K.; Takahashi, K.; Iida, K.; Takahashi, Y.; Kaji, H.; Chihara, K.; Okimura, Y.: Neither intravenous nor intracerebroventricular administration of obestatin affects the secretion of GH, PRL, TSH and ACTH in rats. *Regulatory Peptides* **138**, 141-144 (2007).
84. Zizzari, P.; Longchamps, R.; Epelbaum, J.; Bluet-Pajot, M.T.: Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* **148**, 1648-1653 (2007).

85. Carlini, V.P.; Schioth, H.B.; Debarioglio, S.R.: Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. *Biochemical and biophysical research communications* **352**, 907-912 (2007).
86. Tremblay, F.; Perreault, M.; Klama, L.D.; Tobin, J.F.; Smith, E.; Gimeno, R.E.: Normal food intake and body weight in mice lacking the G protein-coupled receptor GPR39. *Endocrinology* **148**, 501-506 (2007).
87. Gourcerol, G.; St-Pierre, D.H.; Taché, Y.: Lack of obestatin on food intake: should obestatin be renamed ghrelin-associated peptide (GAP)? *Regulatory Peptides* **141**, 1-7 (2007).
88. Seoane, L.M.; Al-Massadi, O.; Pazos, Y.; Fagotto, U.; Casanueva, F.F.: Central obestatin administration does not modify either spontaneous or ghrelin-induced food intake in rats. *Journal of Endocrinological Investigation* **29**, RC13-RC15 (2006).
89. Gourcerol, G.; Coskun, T.; Craft, L.S.; Mayer, J.P.; Heiman, M.L.; Wang, L.; Million, M.; St-Pierre, D.H.; Taché, Y.: Preproghrelin-derived peptide, obestatin fails to influence food intake in lean or obese rodents. *Obesity* **15**:11, 2643-2652 (2007).
90. Moechars, D.; Depoortere, I.; Moreaux, B.; De Smet, B.; Goris, I.; Hoskens, L.; Daneels, G.; Kass, S.; Ver Donck, L.; Peeters, T.; Coulie, B. : Altered gastrointestinal and metabolic function in the GPR39-obestatin receptor-knockout mouse. *Gastroenterology* **131**, 1131-1141 (2006).
91. De Smet, B.; Thijs, T.; Peeters, T.L.; Depoortere, I.: Effect of peripheral obestatin on gastric emptying and intestinal contractility in rodents. *Neurogastroenterology and Motility* **19**, 211-217 (2007).

92. Nakahara, T.; Harada, T.; Yasuhara, D.; Shimada, N.; Amitani, H.; Sakoguchi, T.; Kamiji, M.M.; Asakawa, A.; Inui, A.: 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 (2008).
93. Germain, N.; Galusca, B.; Grouselle, D.; Frere, D.; Tolle, V.; Zizzari, P.; Lang, F.; Epelbaum, J.; Estour, B.: Ghrelin/obestatin ratio in two populations with low bodyweight: Constitutional thinness and anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* **34**, 413-419 (2009).
94. Harada, T.; Nakahara, T.; Yasuhara, D.; Kojima, S.; Sagiya, K.I.; Amitani, H.; Lavianoc, A.; Naruob, T.; Inuia, A.: Obestatin, acyl ghrelin, and des-acyl ghrelin responses to an oral glucose tolerance test in the restricting type of anorexia nervosa. *Biological Psychiatry* **63**:2, 245-247 (2007).
95. Guo, Z.F.; Zheng, X.; Qin, Y.W.; Hu, J.Q.; Chen, S.P.; Zhang, Z.: Circulating preprandial ghrelin to obestatin ratio is increased in human obesity *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **92**, 1875-1880 (2007).
96. Lippl, F.; Erdmann, J.; Lichter, N.; Tholl, S.; Wagenpfeil, S.; Adam, O.; Schusdziarra, V.: Relation of plasma obestatin levels to BMI, gender, age and insulin. *Hormone and metabolic research* **40**, 806-812 (2008).
97. Vicennati, V.; Genghini, S.; De Iasio, R.; Paqui, F.; Pagotto, U.; Paquali, R.: Circulating obestatin levels and the ghrelin/obestatin ratio in obese women. *European Journal of Endocrinology* **157**, 295-301 (2007).
98. Chartrel, N.; Alvear-Perez, R.; Leprince, J.; Iturrioz, X.; Reaux-Le Goazigo, A.; Audinot, V.; Chomarat, P.; Coge, F.; Nosjean, O.; Rodriguez, M.; Galizzi, J.P.; Boutin, J.A.; Vaudry, H.; Llorens-Cortes, C.: Comment on „Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gen, opposes ghrelin’s effects on food intake“. *Science* **315**, 766-779 (2007).

99. Lauwers, E.; Landuyt, B.; Arckens, L.; Schoofs, L.; Luyten, W.: Obestatin does not activate orphan G protein-coupled receptor GPR39. *Biochemical and biophysical research communications* **351**, 21-25 (2006).
100. Zhang, J.V.; Klein, C.; Ren, P.G.; Kass, S.; Donck, L.V.; Moechars, D.: Response to comment on Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gen, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* **315**:5813, 766 (2007).
101. Bassil, A.K.; Haglund, Y.; Brown, J.; Rudholm, T.; Hellstrom, P.M.; Naslund, E.; Lee, K.; Sanger, G.I.: Little or no ability of obestatin to interact with ghrelin or modify motility in the rat gastrointestinal tract. *British Journal of Pharmacology* **150**, 58-64 (2007).
102. Sedláčková, D.; Dostálová, I.; Hainer, V.; Beranová, L.; Kvasničková, H.; Hill, M.; Haluzík, M.; Nedvídková, J.: Simultaneous decrease of plasma obestatin and ghrelin levels after a high-carbohydrate breakfast in healthy women. *Physiological Research* **57**:1, 29-37 (2008).
103. Park, W.H.; Oh, Y.J.; Kim, G.Y.; Kim, S.E.; Paik K.H.; Han, S.J.; Kim, A.H.; Chu, S.H.; Kwon, E.K.; Kim, S.W.; Jin, D.K.: Obestatin is not elevated or correlated with insulin in children with Prader-Willi syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **92**, 229-234 (2007).
104. Hsu, L.K.G.: *Eating Disorders*, Guilford Press, New York, 1990.
105. Haluzík, M.: *Poruchy výživy a leptin*. Grada Publishing, 2002, s 90.
106. <http://terez.ic.cz> (20.11.2008)

107.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?indexed=google&rid=hstat1b.table.15531>  
(1.4. 2009)

108. <http://www.pppinfo.cz> (20.11.2008)

109. Haluzík, M.: Poruchy výživy a leptin. *Grada Publishing*, 2002, s.91.

110. Haluzík, M.: Poruchy výživy a leptin. *Grada Publishing*, 2002, s. 92.

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

112. Novák, F.: Úvod do klinické biochemie. Univerzita Karlova v Praze, *Karolinum*, 2002, s.91 a 176.

113. <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200610/hypertext/BAAAC.htm>  
(20.11.2008)

114. [http://www.millipore.com/drugdiscovery/dd3/ria\\_kits](http://www.millipore.com/drugdiscovery/dd3/ria_kits) (5.2. 2009)

115. <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text11.htm> (29.3. 2009)

116. <http://astronuklfyzika.cz/DetekceSpektrometrie.htm#4> (29.3. 2009)

117. Návod pro stanovení inzulinu pro použití na imunochemických analyzátoch Elecsys a cobas e (<http://www.roche-diagnostics.cz> 11.10. 2008)

118. Misra, M.; Miller, K.K.; Kuo, K.; Griffin, K.; Stewart, V.; Hunter, E.; Herzog, D.B.; Klibanski, A.: Secretory dynamics of leptin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. **289**, E373-381 (2005).

119. Balligand, J.L.; Brichard, S.M.; Brichard, V.; Desager, J.P.; Lambert, M.: Hypoleptinemia in patients with anorexia nervosa: loss of circadian rhythm and unresponsiveness to short term refeeding. *European journal of endocrinology* **138**, 415–420 (1998).
120. Herpetz, S.; Wagner, R.; Albers, N.; Blum, W.F.; Pelz, B.; Langkafel, M.; Köpp, W.; Henning, A.; Oberste-Berghaus, C.; Mann, K.; Senf, W.; Hebebrand, J.: Circadian plasma leptin levels in patients with anorexia nervosa: relation to insulin and cortisol. *Hormone research* **50**, 197–204 (1998).
121. Stoving, R.K.; Vinten, J.; Handberg, A.; Ebbesen, E.N.; Hangaard, J.; Hansen-Nord, M.; Kristiansen, J.; Hagen, C: Diurnal variation of the serum leptin concentration in patients with anorexia nervosa. *Clinical endocrinology* **48**, 761-768 (1998).
122. Baranowska, B.; Wasilewska-Dziubinska, E.; Radzikowksa, M.; Plonowski, A.; Roguski, K.: Neuropeptide Y, galanin and leptin release in obese women and in women with anorexia nervosa. *Metabolism* **46**, 1384-1389 (1997).
123. Escobar, L.; Freire, J.M.; Espinosa, R. Pajares, M.; Girón, J.A.; Vázquez, J.M.; Chover, A.; Carrasco, M.; Ortero, J.; Gavilán, I.; Segura, E.; Aguilar, M.: Determination of insulin, leptin and neuropeptide Y by radioimmunoanalysis in patients with morbid obesity and anorexia nervosa after therapeutic intervention. *Revista española de medicina nuclear* **21**, 3-11 (2002).
124. Feroon, F.; Considine, V.; Peino, R.; Lado, I.G.; Dieguez, C.; Casanueva, F.F.: Serum leptin concentrations in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa and non-specific eating disorders correlate with body mass index but are independent of the respective disease. *Clinical endocrinology* **46**, 289-293 (1997).

125. Grinspoon, S.; Gulick, T.; Askari, H.; Landt, M.; Lee, K.; Anderson, E.; Ma, Z.; Vignati, L.; Bowsher, R.; Herzog, D.; Klibanski, A.: Serum leptin levels in woman with anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **81**, 3861-3863 (1996).
126. Monteleone, P.; Di Lietto, A.; Tortorella, A.; Longobardi, N.; Maj, M.: Circulating leptin in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa or binge-eating disorder: relationship to body weight eating patterns, psychopathology and endocrine changes. *Psychiatry research* **94**, 121-129 (2000).
127. Weigle, D.S., Cummings, D.E., Newby, P.D. Breen, P.A.; Frayo, R.S.; Matthys, C.C.; Callahan, H.S.; Purnell, J.Q.: Roles of leptin and ghrelin in the loss of body weight caused by a low fat, high carbohydrate diet. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**, 1577–1586 (2003).
128. Eckert, E.D.; Pomeroy, C.; Raymond, N.; Kohler, P.F.; Thuras, P.; Bowers, C.Y.: Leptin in Anorexia Nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **83**, 791-795 (1997).
129. Haluzík, M.; Papežová, H.; Kábrt, J.; Nedvídková, J.: Sérové koncentrace leptinu a nutriční parametry u pacientek s mentální anorexií a mentální bulimií. *Československá psychiatrie* **8**, 20-25 (1998).
130. Haluzík, M.; Papežová, H.; Nedvídková, J.; Kábrt, J.: Serum leptin levels in patients with anorexia nervosa before and after partial refeeding, relationships to serum lipids and biochemical nutritional parameters. *Physiological Research* **48**, 197-202 (1999).
131. Mantzoros, Ch.; Flier, J.S.; Lesem, M.D.; Brewerton, T.D.; Jimerson, D.C.: Cerebrospinal fluid leptin levels in anorexia nervosa: correlation with nutritional status and potential role in resistance to weight gain. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **82**, 1845-1851 (1997).

132. Broglio, F.; Gottero, C.; Arvat, E.; Ghigo, E.: Endocrine and non-endocrine actions of ghrelin. *Hormone research* **59**, 109-117, (2003).
133. Rosická, M.; Kršek, M.; Matoulek, M.; Jarkovská, Z.; Marek, J.; Justová, V.; Lacinová, Z.: Serum ghrelin levels in obese patients: the relationship to serum leptin levels and soluble leptin receptors levels. *Physiological Research* **52**, 61-66 (2003).
134. Ukolla, O.: Endocrinological activities of ghrelin: new insights. *European journal of internal medicine* **14**, 351-356 (2003).
135. Katsuki, A.; Urakawa, H.; Gabazza E.C.; Murashima, S.; Nakatani, K.; Togashi, K.; Yano, Y.; Adachi, Y.; Sumida, Y.: 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 (2004).
136. Poykko, S.M.; Kellokoski, E.; Horkko, S.; Kauma, H.; Kesaniemi, Y.A.; Ukkola, O.: Low plasma ghrelin is associated with insuline resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. *Diabetes* **52**, 2546-2553 (2003).
137. Schutte, A.E.; Huisman, H.W.; Schutte, R.; van Rooyen, J.M.; Malan, L.; Malan, N.T.: Aging influences the level and functions of fasting plasma ghrelin levels. The POWIRS-Study. *Regulatory Peptides* **139**, 65-71 (2007).
138. Pemberton, C.; Wimalasena, P.; Yandle, T.; Soule, S.; Richards, M.: C-terminal pro-ghrelin peptides are present in the human circulation. *Biochemical and biophysical research communications* **310**, 567-573 (2003).
139. Chan, J.L.; Bullen, J.; Lee, J.H.; Yiannakouris, N.; Mantzoros, C.S.: Ghrelin levels are not regulated by recombinant leptin administration and/or three days of fasting in healthy subjects. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**, 335-343 (2004).

140. Rigamonti, A.F.; Pincelli, A.I.; Corra, B.; Viarengo, R.; Bonomo, S.M.; Galimberti, D.; Scacchi, M.; Scarpini, E.; Cavagnini, F.; Muller, E.E.: Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *The Journal of endocrinology* **175**, R1-R5 (2002).
141. Anderwald, C.; Brabant, G.; Bernroider, E.; Horn, R.; Brehm, A.; Waldhausl, W.; Roden, M.: Insulin-dependent modulation of plasma ghrelin and leptin concentrations is less pronounced in type 2 diabetic patients. *Diabetes* **52**, 1792-1798 (2003).
142. Barkan, A.L.; Dimaraki, E.V.; Jessup, S.K.; Symons, K.V.; Ermolenko, M.; Jaffe, C.A.: Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**, 2180-2184 (2003).
143. Blom, W.A.; Stafleu, A.; De Graaf, C.; Kok, F.J.; Schaafsma, G.; Hendriks, H.F.: Ghrelin response to carbohydrate-enriched breakfast is related to insulin. *The American journal of clinical nutrition* **81**, 367-375 (2005).
144. Marzullo, P.; Caumo, A.; Savia, G.; Verti, B.; Walker, G.E.; Maestrini, S.; Tagliaferri, A.; Di Blasio, A.M.; Liuzzi, A.: Predictors of postabsorptive ghrelin secretion after intake of different macronutrients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **91**, 4124-4130 (2006).
145. Nakai, Y.; Hosoda, H.; Nin, K.; Ooya, C.; Hayashi, H.; Akamizu, T.; Kangawa, K.: 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 (2004).
146. Otto, B.; Tschöp, M.; Frühauf, E.; Heldwein, W.; Fichter, M.; Otto, C.; Cuntz, U.: Postprandial ghrelin release in anorectic patients before and after weight gain. *Psychoneuroendocrinology* **30**, 577-581 (2005).

147. Tanaka, M.; Tatebe, Y.; Nakahara, T.; Yasuhara, D.; Sagiya, K.; Muranaga, T.; Ueno, H.; Nakazato, M.; Nozoe, S.; Naruo, T.: Eating pattern and the effect of oral glucose on ghrelin and insulin secretion in patients with anorexia nervosa. *Clinical endocrinology* **59**, 574-579 (2003).
148. Anderwald-Stadler, M.; Krebs, M.; Promintzer, M.; Mandl, M.; Bischof, M.G.; Nowotny, P.; Kästenbauer, T.; Luger, A.; Prager, R.; Anderwald, Ch.: Plasma obestatin is lower at fasting and not suppressed by insulin in insulin-resistant humans. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **293**, E1393-E1398 (2007).
149. Kolaczynski, J.W.; Nyce, M.R.; Considine, R.V.; Boden, G.; Nolan, J.J.; Henry, R.; Mudaliar, S.R.; Olefsky, J.; Caro, J.F.: Acute and chronic effects of insulin on leptin production in man. Studies in vivo and in vitro. *Diabetes* **45**, 699-701 (1996).
150. Wabitsch, M.; Jensen, P.B.; Blum, W.F.; Christoffersen, C.T.; Englaro, P.; Heinze, E.; Rascher, W.; Teller, W.; Tornqvist, H.; Hauner, H.: Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* **45**, 1435-38 (1996).
151. Dostálová, I.; Smitka, K.; Papežová, H.; Kvasničková, H.; Nedvídková, J.: Increased insulin sensitivity in patients with anorexia nervosa: The role of adipocytokines. *Physiological Research* **56**, 587-594 (2007).
152. Delporte, M.L.; Brichard, S.M.; Hermans, M.P.; Beguin, C.; Lambert, M.: Hyperadiponectinaemia in anorexia nervosa. *Clinical endocrinology* **58**, 22-29 (2003).
153. Hermans, M.P.; Lambert, M.J.: HOMA-modelling of insulin sensitivity and beta-cell function in anorexia nervosa. *European eating disorders review : the journal of the Eating Disorders Association* **10**, 41-50 (2002).

154. Pannacciulli, N.; Vettor, R.; Milan, G.; Granzotto, M.; Catucci, A.; Federspil, G.; De Giacomo, P.; Giorgino, R.; De Pergola, G. : Anorexia nervosa is characterized by increased adiponectin plasma levels and reduced nonoxidative glucose metabolism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**, 1748-1752 (2003).
155. Castillo, M.; Scheen, A.; Lefebvre, P.J.; Luycks, A.S.: Insulin-stimulated glucose disposal is not increased in anorexia nervosa. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **60**, 311-314 (1985).
156. Dostálová, I.; Sedláčková, D.; Papežová, H.; Nedvídková, J.; Haluzík, M.: Serum visfatin levels in patients with anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Physiological Research* Epub ahead of print (2008).
157. Qi, X.; Li, L.; Yang, G.; Li, K.; Tang, Y.; Liou, H.; Boden, G.: Circulating obestatin levels in normal subjects and in patients with impaired glucose regulation and type 2 diabetes mellitus. *Clinical endocrinology* **66**, 593-597 (2007).
158. Gil-Campos, M.; Aguilera, C.M.; Canete, R.; Gil, A.: Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *British journal of nutrition* **96**, 201-226 (2006).
159. Croset, M.; Rajas, F.; Zitoun, C.; Hurot, J.M.; Montano, S.; Mithieux, G.: Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* **50**, 740-746 (2001).

## **8 Další seznamy**

### **8.1 Seznam obrázků**

	<b>strana</b>
<b>Obrázek 2.1</b> Terciární struktura leptinu	14
<b>Obrázek 2.2</b> Působení leptinu při snížení (vlevo) a zvýšení (vpravo) hmotnosti	16
<b>Obrázek 2.3</b> Vznik ghrelinu a obestatinu	17
<b>Obrázek 2.4</b> Primární struktura acyl ghrelinu	19
<b>Obrázek 3.1</b> Schéma průběhu metody radioimmunoassay (RIA)	34

### **8.2. Seznam příloh**

<b>Příloha 3.1</b> Informovaný souhlas	29
<b>Příloha 3.2</b> Zdravotní dotazník	30, 31
<b>Příloha 3.3</b> Odběrový protokol	32

### **8.3 Seznam tabulek**

<b>Tabulka 2.1</b> Orexigenní a anorexigenní peptidy	12
<b>Tabulka 3.1</b> Stanovení leptinu	37
<b>Tabulka 3.2</b> Stanovení ghrelinu	39

<b>Tabulka 3.3</b> Stanovení obestatinu	42
---	----

<b>Tabulka 4.1</b> Bazální hladiny sledovaných parametrů	47
--	----

## **8.4 Seznam grafů**

<b>Graf 4.1</b> Porovnání bazálních hodnot sledovaných parametrů u zdravých kontrolních žen a pacientek s anorexia nervosa	48
--	----

<b>Graf 4.2</b> Průběh hladin ghrelinu u zdravých kontrolních žen a pacientek s anorexia nervosa po podání sacharidové snídane	49
--	----

<b>Graf 4.3</b> Průběh hladin obestatinu u zdravých kontrolních žen a pacientek s anorexia nervosa po podání sacharidové snídane	50
--	----

<b>Graf 4.4</b> Průběh poměru ghrelin/obestatin u zdravých kontrolních žen a pacientek s anorexia nervosa po podání sacharidové snídane	51
---	----

<b>Graf 4.5</b> Průběh hladin inzulinu u zdravých kontrolních žen a pacientek s anorexia nervosa po podání sacharidové snídane	52
--	----

<b>Graf 4.6</b> Průběh hladin glukózy u zdravých kontrolních žen a pacientek s anorexia nervosa po podání sacharidové snídane	53
---	----

<b>Graf 4.7</b> Procentuální průběh hladin sledovaných parametrů u skupiny kontrolních žen	54
--	----

<b>Graf 4.8</b> Procentuální průběh hladin sledovaných parametrů u skupiny pacientek s anorexia nervosa	55
---	----

<b>Graf 4.9</b> Porovnání indexu homeostatického modelu zkoušky inzulinové rezistence (HOMA) a bazálních hladin inzulinu a glukózy u zdravých kontrolních žen a pacientek s anorexia nervosa	56
--	----