2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy

Disertační práce

Vyšetření významu peptidů regulujících příjem potravy a nutriční stav u dětí a adolescentů

MUDr. Jiří Bronský

Školitel: Doc. MUDr. Richard Průša, CSc.
Ústav klinické biochemie a patobiochemie
UK 2.LF a FN Motol, Praha

Praha 2006

OBSAH

Obsah 2

Poděkování 9

Cíle práce 10

Seznam zkratek 11

1 Přehled současného stavu znalostí 14

1.1 Poruchy příjmu potravy a nutričního stavu organismu 14

1.1.1 Úvod 14

1.1.2 Základní pojmy 14

1.1.2.1 Změny příjmu potravy 14

1.1.2.2 Změny nutričního stavu 15

1.1.3 Obezita 16

1.1.4 Mentální anorexie 17

1.1.5 Syndrom anorexie a kachexie při nádorových onemocněních 17

1.1.6 Crohnova nemoc 18

1.1.7 Celiakie 18

1.2 Regulační mechanismy příjmu potravy a nutričního stavu 19

1.2.1 Obecné regulační mechanismy 19

1.2.2 Přehled základních regulačních center 20

1.2.2.1 Hypothalamus 20

1.2.2.1.1 Neuroanatomický podklad 21

1.2.2.1.2 Hypothalamická jádra 22

1.2.2.2 Gastrointestinální trakt 24

1.2.2.3 Tuková tkáň jako endokrinně aktivní orgán 25

1.2.3 Vzájemná interakce signálů 27

1.2.4 Další funkce regulačních peptidů 28

1.2.5 Klinické aspekty 28

1.2.6 Výzkum regulačních peptidů 29
1.3 Základní charakteristika studovaných regulačních peptidů 30
1.3.1 Orexin A 30
1.3.1.1 Úvod 30
1.3.1.2 Výsledky experimentálních prací 31
1.3.1.2.1 Orexiny a potravní chování 31
1.3.1.2.2 Orexiny a regulace cyklu spánku a bdění 32
1.3.1.2.3 Ostatní funkce orexinů 33
1.3.1.3 Závěr 34
1.3.2 Ghrelin 34
1.3.2.1 Úvod 34
1.3.2.2 Struktura ghrelinu 35
1.3.2.3 Regulace sekrece ghrelinu 36
1.3.2.4 Ghrelin v lidské plazmě 37
1.3.2.5 Funkce ghrelinu 37
1.3.2.6 Ghrelin a regulace energetické rovnováhy 38
1.3.2.6.1 Vliv ghrelinu na příjem potravy 38
1.3.2.6.2 Vliv ghrelinu na energetickou spotřebu 39
1.3.2.7 Nevyřešené otázky 41
1.3.2.8 Závěr 41
1.3.3 Adiponektin 41
1.3.3.1 Úvod 41
1.3.3.2 Receptory pro adiponektin 42
1.3.3.3 Regulace sekrece adiponektinu 43
1.3.3.4 Funkce adiponektinu v organismu 43
1.3.3.4.1 Vliv na metabolismus glukózy a lipidů 44
1.3.3.4.2 Adiponektin a ateroskleróza 45
1.3.3.5 Adiponektin, TNF-alfa a kortizol 46

1.3.3.6 Adiponektin v séru 46
1.3.3.7 Analytické aspekty 47
1.3.3.8 Klinický význam 48
1.3.4 Amylin 48
1.3.4.1 Úvod 48
1.3.4.2 Experimentální poznatky a klinické důsledky 50
1.3.4.2.1 Vztah amylinu, inzulínu a glukagonu 50
1.3.4.2.2 Diabetes mellitus 50
1.3.4.2.3 Úloha amylinu v regulaci příjmu potravy 51
1.3.4.2.4 Amylin a kostní metabolismus 53
1.3.4.2.5 Vliv amylinu na kosterní sval 53
1.3.4.2.6 Ostatní funkce amylinu 54
1.3.4.3 Pramlintid 54
1.3.4.4 Závěr 54
1.3.5 Leptin 55
1.3.6 Inzulínu podobné růstové faktory (IGF); IGF-1 57
1.3.7 IGF vázající proteiny (IGFBP); IGFBP-3 59
1.3.8 Pankreatické hormony; Inzulín a C-peptid 60
2 Metody 64
2.1 Soubory pacientů 64
2.1.1 Soubor obézních pacientů 64
2.1.2 Soubor pacientek s mentální anorexií 65
2.1.3 Soubor pacientů s Crohnovou nemocí 66
2.1.4 Soubor pacientů s celiakální sprue 66
2.1.5 Soubor pacientů s osteoporózou 67
2.1.6 Kontrolní skupiny 67
2.2 Laboratorní metody 69
2.2.1 Stanovení orexinu A 69

2.2.2 Stanovení ghrelinu 70
2.2.3 Stanovení adiponektinu 70
2.2.4 Stanovení amylinu 71
2.2.5 Stanovení ostatních analytů 73
2.2.5.1 Leptin 73
2.2.5.2 IGF-1 75
2.2.5.3 IGFBP-3 78
2.2.5.4 Inzulín 81
2.2.5.5 C-peptid 83
2.3 Antropometrické metody 86
2.4 Statistické metody 87
3 Výsledky 88
3.1 Pacienti s obezitou 88
3.1.1 Antropometrická data u obézních dětí 88
3.1.2 Orexin A u obézních jedinců 88
3.1.2.1 Plazmatické hladiny orexinu A 88
3.1.2.2 Sérové hladiny leptinu, IGF-1 a IGFBP-3 89
3.1.2.3 Vztah hladin orexinu A k věku a pohlaví 91
3.1.2.4 Korelace hladin orexinu A a leptinu s antropometrickými parametry 91
3.1.2.5 Změny hladin orexinu A ve vztahu k odpovědi na redukční terapii 93
3.1.2.6 Korelace s biochemickými parametry 93
3.1.3 Ghrelin u obézních jedinců 94
3.1.3.1 Plazmatické hladiny celkového ghrelinu 94
3.1.3.2 Vztah hladin ghrelinu k věku a pohlaví 95
3.1.3.3 Korelace hladin ghrelinu s antropometrickými parametry 95
3.1.3.4 Změny hladin ghrelinu ve vztahu k odpovědi

na redukční terapii 95
3.1.3.5 Korelace s biochemickými parametry 96
3.1.4 Adiponektin u obézních jedinců 97
3.1.4.1 Sérové hladiny adiponektinu 97
3.1.4.2 Sérové hladiny inzulínu a C-peptidu 99
3.1.4.3 Vztah hladin adiponektinu k věku a pohlaví 99
3.1.4.4 Korelace hladin adiponektinu s antropometrickými parametry 100
3.1.4.5 Změny hladin adiponektinu ve vztahu k odpovědi na redukční terapii 101
3.1.4.6 Korelace s biochemickými parametry 101
3.2 Pacientky s mentální anorexií 102
3.2.1 Antropometrická data u pacientek s mentální anorexií 102
3.2.2 Orexin A u pacientek s mentální anorexií 102
3.2.2.1 Plazmatické hladiny orexinu A 102
3.2.2.2 Sérové hladiny leptinu, IGF-1 a IGFBP-3 103
3.2.2.3 Vztah hladin orexinu A k věku a menarché 105
3.2.2.4 Korelace s antropometrickými parametry 105
3.2.2.5 Korelace s biochemickými parametry 106
3.2.3 Ghrelin u pacientek s mentální anorexií 107
3.2.3.1 Plazmatické hladiny ghrelinu 107
3.2.3.2 Vztah hladin ghrelinu k věku a menarché 108
3.2.3.3 Korelace hladin ghrelinu s antropometrickými parametry 108
3.2.3.4 Korelace s biochemickými parametry 109
3.2.4 Adiponektin u pacientek s mentální anorexií 110
3.2.4.1 Sérové hladiny adiponektinu 110
3.2.4.2 Sérové hladiny inzulínu a C-peptidu 111
3.2.4.3 Vztah hladin adiponektinu k věku a menarché 111

3.2.4.4 Korelace s antropometrickými parametry 112
3.2.4.5 Korelace s biochemickými parametry 112
3.3 Pacienti s Crohnovou nemocí, celiakií a zdravé kontroly 114
3.3.1 Antropometrická data 114
3.3.2 Plazmatické hladiny orexinu A 115
3.3.3 Sérové hladiny leptinu, IGF-1 a IGFBP-3 115
3.3.4 Korelace orexinu A s antropometrickými a biochemickými parametry 116
3.3.5 Rozdíly vzhledem k pohlaví 117
3.4 Amylin u pacientů s osteoporózou 118
3.4.1 Charakteristika pacientů 118
3.4.2 Plazmatické hladiny amylinu 118
3.4.3 Hladiny amylinu vzhledem k věku 120
3.4.4 Hladiny amylinu vzhledem k pohlaví 120
3.4.5 Hladiny amylinu vzhledem k antropometrickým parametrům 120
4 Diskuse 121
4.1 Orexin A 121
4.1.1 Hladiny orexinu A 121
4.1.2 Vztah hladin orexinu A k věku 122
4.1.3 Vztah hladin orexinu A k tělesné výšce, pohlaví a menarché 123
4.1.4 Vztah hladin orexinu A k tělesné hmotnosti 125
4.1.5 Orexin A u pacientů s Crohnovou nemocí a s celiakií 126
4.2 Ghrelin 127
4.2.1 Hladiny ghrelinu 127
4.2.2 Vztah hladin ghrelinu k věku 128
4.2.3 Vztah hladin ghrelinu k tělesné výšce, pohlaví a menarché 130

4.2.4 Vztah hladin ghrelinu k tělesné hmotnosti 134
4.3 Adiponektin 137
4.3.1 Hladiny adiponektinu 137
4.3.2 Vztah hladin adiponektinu k věku 138
4.3.3 Vztah hladin adiponektinu k tělesné výšce, pohlaví a menarché 139
4.3.4 Vztah hladin adiponektinu k tělesné hmotnosti 140
4.3.5 Vztah hladin adiponektinu k inzulínové senzitivitě 143
4.4 Amylin 145
5 Závěr 148
6 Souhrn (Summary) 149
7 Použitá literatura 151
8 Seznam publikací 178
8.1 Původní práce a přehledné články v časopisech s definovaným impakt faktorem 178
8.2 Ostatní původní práce a přehledné články 179
8.3 Oponovaná abstrakta v časopisech s definovaným impakt faktorem 180
8.4 Ostatní přednášky a postery 181
9 Přílohy 188

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěl poděkovat všem, kteří mi v průběhu práce poskytovali cenné rady a připomínky, zejména svému školiteli Doc. MUDr. Richardu Průšovi, CSc. za odborné vedení v průběhu celého studia, také Prof. MUDr. Jiřímu Nevoralovi, CSc. za odborné připomínky z klinického pohledu, všem, kteří se podíleli na laboratorní části práce, zejména Ing. Martě Pechové a RNDr. Jaře Nedvídkové, CSc. za cenné rady z oblasti problematiky regulačních peptidů a dohled nad jejich laboratorním stanovením. Také bych chtěl vyjádřit dík všem, kteří mi vypomohli se sběrem a zpracováním biologických vzorků a antropologům za pomoc při hodnocení nutričního stavu pacientů. MUDr. Martinu Chadovi, PhD. a Ing. Karlu Kotaškovi, PhD. děkuji za uvedení do problematiky vědecké metody a statistického zpracování dat.

Na závěr bych chtěl vyjádřit poděkování svojí manželce Evě, dceři Anežce, rodině a všem přátelům, kteří mne podporovali v průběhu celého postgraduálního studia.

Práce vznikla s podporou grantů IGA MZ NE/7443-3, GAUK 46/2003C, GAUK 59/2004C a nadačního příspěvku Institutu DANONE.

CÍLE PRÁCE

Cílem našeho výzkumu bylo objasnit úlohu některých regulačních peptidů centrálního nervového systému, gastrointestinálního traktu a tukové tkáně v patogenezi změn tělesné hmotnosti a nutričního stavu u dětských pacientů s obezitou, mentální anorexií, Crohnovou nemocí a celiakální sprue. Radioimunoanalýzou byly stanoveny plazmatické hladiny orexinu A, celkového ghrelinu a sérové hladiny leptinu a enzymovou imunoanalýzou byly stanoveny sérové hladiny adiponektinu u zdravých jedinců a u výše uvedených patologických stavů a zhodnocen vliv nutriční intervence na tyto hladiny. Dále jsme stanovili plazmatické hladiny amylinu u dospělých pacientů s osteoporózou.

Konkrétní cíle navržené pro tento projekt zahrnovaly:

1. Stanovení plazmatických hladin orexinu A, celkového ghrelinu a sérových hladin adiponektinu u obézních dětí a zjištění jejich vztahu k sérové hladině leptinu a IGF-1. Určení vlivu redukce tělesné hmotnosti na změny těchto hladin.
2. Stanovení plazmatických hladin orexinu A, celkového ghrelinu a sérových hladin adiponektinu u pacientů s mentální anorexií a zjištění jejich vztahu k sérové hladině leptinu a IGF-1. Určení vlivu realimentace na změny těchto hladin.
3. Stanovení plazmatických hladin orexinu A u zdravých jedinců, u dětských pacientů s Crohnovou nemocí a s celiakální sprue.
4. Stanovení plazmatických hladin amylinu u dospělých pacientů s osteoporózou, diabetem II. typu a u kontrolní skupiny pacientů

SEZNAM ZKRATEK

AβP	beta-amyloid
ACTH	adrenokortikotropní hormon
AgRP	agouti-related peptid
ALS	acid labile subunit
ANS	autonomní nervový systém
anti-tTG	protilátky proti tkáňové transglutamináze
ARC	nucleus arcuatus hypothalamu
BMI	body mass index
CART	kokainem a amfetaminem regulovaný transkript
CCK	cholecystokinin
CGRP	calcitonin gene - related peptide
CNS	centrální nervový systém
CNTF	ciliární neurotropní růstový faktor
cpm	counts per minute
CRH	kortikotropin-releasing hormon
CV	variační koeficient
CVO	cirkumventrikulární orgány
DM	diabetes mellitus
DMV	dorsální motorické jádro nervus vagus
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	enzymová imunoanalýza
EMA	protilátky proti endomysiu
ENS	enterický nervový systém
GABA	gama-aminomáselná kyselina
GH	růstový hormon
GHRP	growth hormone-releasing peptide
GHRH	growth hormone-releasing hormone

GHS	sekretagoga růstového hormonu
GHS1a	receptor pro GHS typu 1a
GHS1b	receptor pro GHS typu 1b
GIT	gastrointestinální trakt
GLP-1	glukagon-like peptid-1
GM-CSF	kolonie stimulující faktor granulocytů a monocytů
GPCR	receptor sdružený s G-proteinem
HCRT-1	hypocretin-1
HCRT-2	hypocretin-2
HDL	high density lipoprotein
HEB	hematoencefalická bariéra
HSD	hydroxysteroid dehydrogenáza
HT	hypothalamus
IAPP	islet amyloid polypeptide
IDE	insulin-degrading enzyme
ICHS	ischemická choroba srdeční
IFN-γ	interferon gama
IGF	inzulínu podobný růstový faktor
IGFBP	vazebný protein pro IGF
IGFBPrp	IGFBP related peptides
IRMA	imunoradiometrická analýza
K_3EDTA	ethylendiamintetraoctan draselný
IL	interleukin
LDL	low density lipoprotein
LHA	laterální hypothalamická oblast
MCH	melanin-koncentrující hormon
MMM	mozkomíšní mok
α-MSH	melanokortin
MUP	4-methylumbelliferyl fosfát

mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NO	oxid dusnatý
NPY	neuropeptid Y
NT	neurotensin
NTS	nucleus tractus solitarii
OX1R	orexinový receptor typu 1
OX2R	orexinový receptor typu 2
OX A	orexin A
OX B	orexin B
PC 1	prohormon-konvertáza typu 1
POMC	proopiomelanokortin
PPAR-γ	receptor aktivovaný peroxisomovým proliferátorem-gamma
PPMRP	pre-pro-motilin-related peptide
PrP	prionový fragment
PSA	prostatický specifický antigen
PVN	paraventrikulární jádro hypothalamu
PYY	peptid YY
RIA	radioimunoanalýza
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
SD	směrodatná odchylka
SDS	SD skóre
SEKK	systém externí kontroly kvality
SEM	střední chyba průměru
SMS	somatostatin
TAG	triacylglyceroly
TNF-α	tumor nekrotizující faktor-alfa
UCP 1, 2	uncoupling protein 1, 2
WHO	světová zdravotnická organizace

1. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ZNALOSTÍ

1.1. Poruchy příjmu potravy a nutričního stavu organismu

1.1.1. Úvod

Téma výživy nabývá v moderní společnosti velkého významu, především vzhledem ke vzrůstajícímu výskytu poruch nutričního stavu i poruch příjmu potravy v populaci. Na etiologii těchto změn má kromě životního stylu nezanedbatelný vliv také individuální konstituce organismu, který je vystaven sníženému nebo naopak zvýšenému příjmu živin. Pro konkrétního jedince je riziko vzniku poruchy nutričního stavu dáno jak stravovacími návyky a fyzickou aktivitou, tak jeho genetickou výbavou, která určuje bazální metabolickou spotřebu a reakci organismu za podmínek nadměrné nebo nedostatečné nabídky kalorií. V této práci jsou popsány některé peptidové hormony, které se účastní regulace příjmu potravy a stavu výživy organismu.

1.1.2. Základní pojmy

Zmiňujeme-li se o problematice regulačních peptidů, je třeba odlišit krátkodobý vliv na ***příjem potravy*** a dlouhodobé vlivy na ***nutriční stav organismu***.

1.1.2.1. Změny příjmu potravy

Z hlediska příjmu potravy můžeme odlišit skupinu ***peptidů orexigenních*** (např. orexin A, ghrelin, neuropeptid Y), které při experimentální aplikaci působí zvýšení příjmu potravy a jejich exprese se obvykle zvyšuje nalačno a klesá po nasycení. Proto lze v průběhu dne vysledovat v jejich krevních hladinách určitou periodicitu závislou na počtu a rozvržení denních jídel. Tyto peptidy se podílejí na biologické reakci jako signály hladu a spouštějí komplexní odpověď organismu vedoucí k vyhledávání a zvýšení příjmu potravy. Jsou zapojeny do nervových drah a okruhů, které zprostředkovávají průvodní emocionální a vegetativní projevy příjmu potravy. Průvodním emocionálním projevem může být např. pocit hladu, vegetativním projevem je např. zvýšená motilita a sekrece trávicího traktu (slinění). Na

opačném konci spektra jsou ***anorexigenní peptidy*** (např. cholecystokinin, amylin, leptin), jejichž účinek je komplementární k předchozí skupině peptidů a hladiny v krevním řečišti reagují na příjem potravy opačným způsobem.

1.1.2.2. Změny nutričního stavu

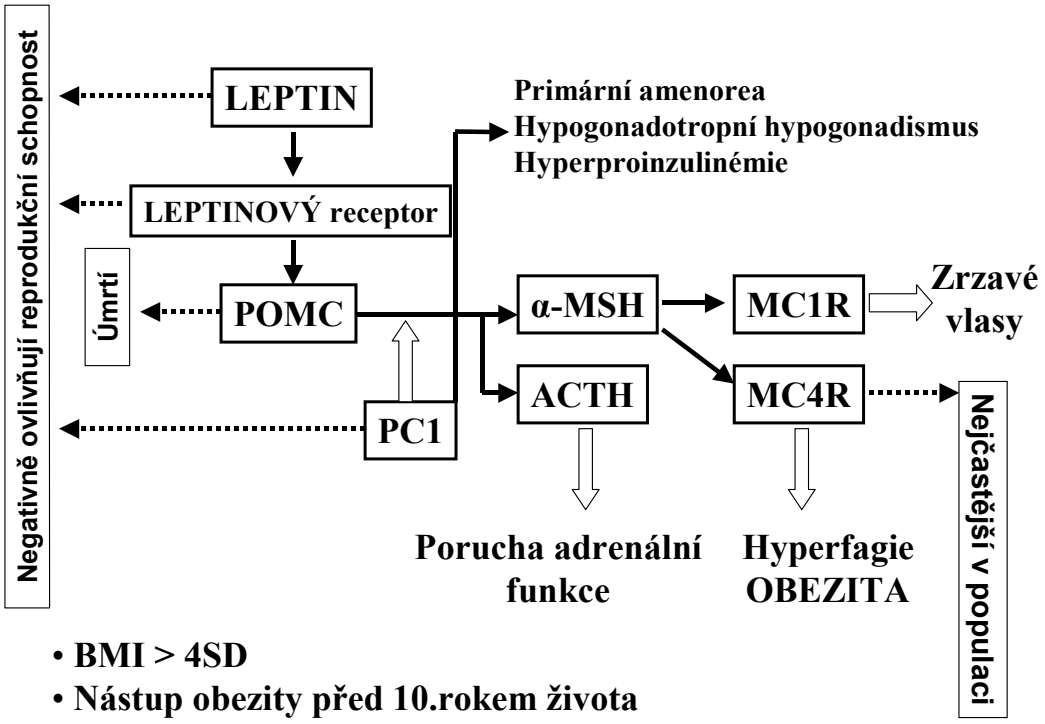
Výše popsané změny jsou fyziologické a regulují příjem potravy u všech jedinců bez ohledu na jejich nutriční stav. Naopak změna nutričního stavu nastává v případě dlouhodobé poruchy regulačních mechanismů příjmu potravy nebo energetické spotřeby.

V případě dlouhodobě převažujícího příjmu potravy nad energetickým výdejem se v organismu nadměrně ukládá energie v podobě tuku - vzniká ***obezita***. Nejčastější příčinou je nesprávný životní styl spojený s nadměrným příjmem stravy a nízkou pohybovou aktivitou. Jedná se o vůlí ovlivnitelný psychosociální jev, který je při vhodné edukaci v dlouhodobém horizontu reverzibilní. V takovém případě je porucha nutričního stavu provázena sekundárními změnami v systému regulačních peptidů, které při dlouhodobé normalizaci nutričního stavu vymizí.

Byly ovšem popsány i geneticky podmíněné poruchy (syndromy i monogenní vady), jejichž součástí je rozvoj obezity (obr. 1). U těchto stavů je na podkladě vrozené poruchy v systému regulačních peptidů zvýšený příjem potravy nebo snížený energetický výdej. Výskyt těchto poruch je v populaci relativně vzácný a jejich ovlivnění dietním a pohybovým režimem je obtížné.

V případě dlouhodobě sníženého příjmu potravy, který je nedostačující pro energetický výdej organismu, se spotřebovávají tukové zásoby a vzniká podvýživa, ***malnutrice***. Příčinou může být snížená nabídka stravy - častá v rozvojových zemích nebo v civilizovaném světě u nutričně rizikových skupin (např. pacienti s chronickým onemocněním, kojenci atd.). Také v tomto případě dochází k sekundárním změnám v systému regulačních peptidů, které s normalizací nutričního stavu odezní.

Zvláštní příčinou malnutrice je *mentální anorexie*. Jedná se o komplexní primární poruchu příjmu potravy, která při dlouhodobém trvání vede k závažné podvýživě, metabolickému a hormonálnímu rozvratu organismu. Příčina vzniku této choroby není doposud plně objasněna. Předpokládá se, že se na ní významně podílí porucha regulačních hormonů centrálního nervového systému. U této choroby není vzácností familiární výskyt a její terapeutické ovlivnění je obtížné.



Obrázek 1: Monogenně podmíněná obezita u lidí

Legenda: POMC – proopiomelanokortin, PC1 – prohormon konvertáza typu 1, alfa-MSH – melanokortin, ACTH – adrenokortikotropní hormon, MC1R, MC4R – melanokortinové receptory typu 1 a 4

1.1.3. Obezita

Obezita je civilizační chorobou postihující především vyspělé populace (Lévy a spol. 1995). Podle rozsáhlé holandské studie z roku 2000 (Frederiks a spol. 2000) se od roku 1980 počet obézních dětí v Holandsku zdvojnásobil. Od tří let věku je obézní jedno dítě z pěti. Věk, ve kterém se děti stanou obézními, se snížil na průměrně 5,5 roku. Největší výskyt obezity je mezi městskými dětmi méně vzdělaných rodičů. Česká republika patří k zemím s nejvyšším výskytem obezity v Evropě.

Kromě zvýšeného kalorického příjmu, špatných stravovacích návyků a nedostatku pohybu se na rozvoji obezity podílí i genetické vlivy. Tělesná hmotnost je stejně jako řada jiných antropologických znaků determinována polygenně, avšak v nedávné době byly objeveny i mutace v genech pro jednotlivé složky zpětnovazebného okruhu mezi tukovou tkání a CNS, které vedou velmi brzo po narození k výrazné obezitě (Montague a spol. 1997, Yeo a spol. 1998).

1.1.4. Mentální anorexie

Mentální anorexie je závažná porucha příjmu potravy, která je charakterizována výraznou podvýživou, dysfunkcí menstruačního cyklu a poruchou vnímání tělesného schématu. Postihne během života 0,5% žen a má nejvyšší mortalitu ze všech psychiatrických onemocnění. V její etiologii hrají kromě mnoha dalších významnou úlohu i genetické faktory. Nutriční podpora je jako léčba v akutní fázi postačující, ale dosažení dlouhodobého vyléčení bez psychologicko-psychiatrické intervence je velmi obtížné. V souvislosti s tímto onemocněním jsou zmiňovány abnormality v serotoninovém systému v mozku, ale specifická dysfunkce jediného neurotransmiterového systému nemůže vysvětlit všechny aspekty choroby. Je třeba zkoumat také vliv dopaminu a gonadálních steroidů, vzhledem k výraznému výskytu mentální anorexie u dívek v období puberty, zvláště u těch, které měly menarché v nízkém věku. Také objev leptinu, orexinů a jiných neuropeptidů může, vzhledem k jejich účasti na regulaci příjmu potravy, přispět k objasnění patogeneze a zlepšení terapie tohoto onemocnění (Vitiello a spol. 2000).

1.1.5. Syndrom anorexie a kachexie při nádorových onemocněních

Syndrom anorexie a kachexie při nádorových onemocněních je charakterizován progresivní ztrátou tělesné hmotnosti a chuti k jídlu. Doprovází mnoho typů nádorových onemocnění a je jednou z příčin časného úmrtí zvláště u dětských pacientů. U zdravého člověka je úbytek na váze fyziologicky silným podnětem ke zvýšené chuti k jídlu a příjmu potravy. Tento mechanismus však u některých pacientů s nádorovým onemocněním selhává. Předpokládá se, že cytokiny (interleukiny 1 a 6, tumor nekrotizující faktor - alfa, interferon - gama) nebo neuropeptidy produkované nádorem (Arihara a spol. 2000) nebo hostitelským organismem mohou imitovat účinek leptinu, který informuje CNS o množství tukové tkáně v organismu. Tím je narušena signalizace hypothalamických neuropeptidů. Výsledkem je prohlubující se kachexie se současným poklesem chuti k jídlu a příjmu potravy (Inui a spol. 1999).

1.1.6. Crohnova nemoc

Crohnova nemoc je závažné nespecifické zánětlivé onemocnění trávicího traktu, které se v dětském věku projevuje kromě gastrointestinální symptomatologie (průjmy, bolesti břicha) také poruchou růstu a nutričního stavu. Často je onemocnění provázeno chronickým nechutenstvím, na jehož patogenezi se může podílet řada mechanismů. Příčinou mohou být zánětlivé mediátory (cytokiny), které jsou produkovány v místě zánětu a působením na autonomní nervová zakončení nebo prostřednictvím cirkulace na hypothalamická centra imitovat působení některých přirozených anorexigenních regulačních peptidů (např. leptinu) a tím vést k anorexii a dlouhodobě nepříznivému nutričnímu stavu. Na rozvoji nechutenství se ovšem může podílet také dysbalance mezi regulačními hormony, které za fyziologických okolností udržují rovnovážný příjem potravy odpovídající nutričním potřebám organismu. Za podmínek chronického zánětlivého onemocnění mohou vznikat primární nebo sekundární změny v expresi těchto peptidů. Obdobným mechanismem by bylo možno vysvětlit i vznik kostní nemoci, na které se kromě dlouhodobého nedostatku minerálů a jiných nutrientů může podílet i nerovnováha v regulačních peptidech nutričního stavu.

1.1.7. Celiakie

Celiakie (glutensenzitivní enteropatie) je trvalá nesnášenlivost lepku, při které vzniká poškození sliznice tenkého střeva u vnímavých jedinců. Prevalence onemocnění v populaci je vysoká – podle některých údajů až 1:300. Symptomatologie celiakie je velmi bohatá a liší se dle věku. Mezi nejčastější symptomy v kojeneckém období patří anorexie, neprospívání a gastrointestinální symptomatologie (průjmy). Ve školním věku se onemocnění projevuje častěji poruchami růstu, anemií a osteopenií až osteoporózou. U dospělých se kromě výše jmenovaných symptomů setkáváme i s poruchami fertility a projevy souvisejícími se sdruženými autoimunitními onemocněními (thyreopatie atd.). Z výše patrných údajů vyplývá, že celiakie je často spojena s poruchou příjmu potravy a nutričního stavu organismu. Jednotlivé symptomy napovídají, že v patogenezi tohoto onemocnění by mohla být zahrnuta řada regulačních peptidů, které se v rámci primárních nebo sekundárních změn podílejí na vzniku malnutrice nebo se naopak organismus změnou jejich exprese snaží zachovat dostatek energetických zásob při chronickém onemocnění. Také na patogenezi poruchy růstu a kostní nemoci se mohou podílet regulační peptidy, které mají vliv na vyplavování růstového

hormonu nebo jsou spojujícím článkem mezi regulací nutričního stavu a vývojem kostní hmoty.

1.2. Regulační mechanismy příjmu potravy a nutričního stavu

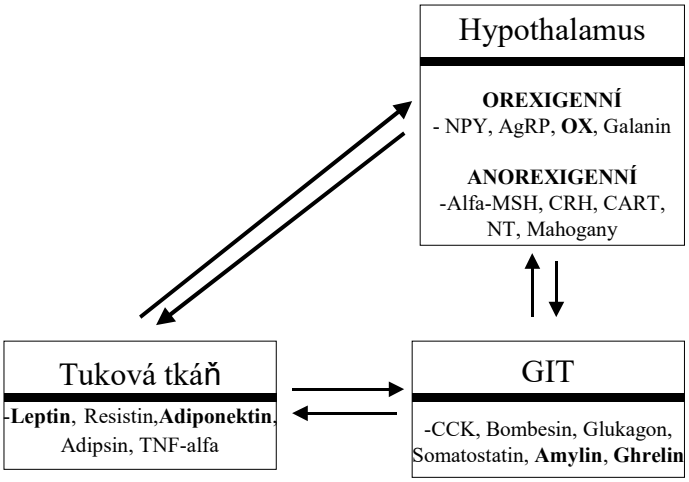
1.2.1. Obecné regulační mechanismy

Příjem potravy a nutriční stav organismu jsou regulovány souhrou několika systémů. Jedná se zejména o centrální nervový systém, trávicí trakt a tukovou tkáň (obr. 2).

Základním centrem regulace je **hypothalamus** - oblast mozku, která obsahuje skupiny neuronů uspořádaných do ***centra hladu*** a ***centra sytosti***. Tyto neurony produkují celou řadu orexigenních (orexin A a B, neuropeptid Y, galanin) a anorexigenních peptidů (kortikotropin-releasing hormon, melanokortin, agouti-related protein), které ovlivňují hypothalamická centra navzájem, ale také působí na ostatní oblasti centrálního nervového systému a koordinují tak komplexní odpověď organismu na stav výživy a aktuální příjem kalorií. K těmto oblastem patří centra spánku a bdění, limbický systém zprostředkující emocionální složku a centra v prodloužené míše, jejichž prostřednictvím je přes bloudivý nerv (nervus vagus) zprostředkována vegetativní složka regulace, zejména motilita a sekrece trávicího traktu.

Buňky **trávicího traktu** jsou místem produkce řady regulačních peptidů (ghrelin, cholecystokinin, peptid YY, oxyntomodulin, amylin). Ty jsou vyplavovány jako reakce na přítomnost tráveniny v žaludečním nebo střevním lumen. Jsou tvořeny zejména buňkami žaludeční a střevní sliznice a endokrinními buňkami slinivky břišní. Cílová místa působení těchto hormonů jsou zejména v oblasti gastrointestinálního traktu a hypothalamu, kde zpětnou vazbou - přímo nebo prostřednictvím bloudivého nervu - ovlivňují příjem potravy.

Původní představy o **tukové tkáni** jako o pasivním úložišti energie ve formě tukových zásob jsou dnes již překonány. V současné době víme, že tuková tkáň je hormonálně vysoce aktivní orgán, který je místem produkce celé řady regulačních peptidů (leptin, TNF-alfa, adiponektin, resistin). Jejich tvorba je ovlivněna množstvím a velikostí adipocytů a místem působení jsou zejména receptory v hypothalamu, jejichž prostřednictvím je centrální nervový systém informován o množství tukové tkáně v organismu.



Obrázek 2: Regulační mechanismy příjmu potravy a nutričního stavu

Legenda: NPY – neuropeptid Y, AgRP – agouti-related protein, OX – orexiny, alfa-MSH – melanokortin, CRH – kortikotropin-releasing hormon, CART – kokainem a amfetaminem regulovaný transkript, NT – neurotensin, TNF-alfa – tumor nekrotizující faktor alfa, CCK - cholecystokinin

1.2.2. Přehled základních regulačních center

1.2.2.1. Hypothalamus

Hypothalamus (HT) je důležitou diencefalickou strukturou účastnící se regulace řady klinicky významných fyziologických dějů. Jeho jádra jsou sídlem exprese genů mnoha neuropeptidů i klasických neurotransmiterů ovlivňujících homeostázu organismu od regulace tělesné teploty a uvolňování hypofyárních hormonů až po synchronizaci jednotlivých složek autonomního nervového systému. Jednotlivá hypothalamická jádra tvoří řadu neuropeptidů, které mají vztah k potravnímu chování jedince (Bronský a spol. 2003a). Již před mnoha lety se prokázalo, že potravní chování má své regulační centrum v hypothalamické oblasti, nicméně až nedávná léta přinesla objasnění mnoha detailních poznatků a identifikaci řady nových neuropeptidů. Jejich krátký přehled spolu s uvedením příslušných anatomicko-fyziologických a klinických vztahů je uveden v následující stati.

1.2.2.1.1. Neuroanatomický podklad

Již dlouhou dobu je známo, že v regulaci energetické rovnováhy hrají významnou roli jednotlivá jádra bazálního hypothalamu, zejména ventromediální, dorsomediální, paraventrikulární a laterální. Zjištění, že tyto neurální mechanismy ovlivňují potravní chování, bylo učiněno na základě řady experimentů, v nichž byly provedeny diskrétní léze v hypothalamických oblastech, nebo chirurgicky přerušeny neurální dráhy (Shughrue a spol. 1996, Alvarez a spol. 1996, Goldstone a spol. 1997, Koylu a spol. 1997, Lambert a spol. 1998, Mountjoy a spol. 1994, Huszar a spol. 1997). S vyjímkou lézí v laterální hypothalamické oblasti vedly všechny tyto experimenty k trvale zvýšené chuti k jídlu či zvýšenému příjmu potravy. Bohužel základní otázky týkající se lokalit, do nichž jsou signály stimulující apetit, vyhledávání, přijímání a trávení potravy propagovány, dráhy, jimiž se informace šíří a cílové tkáně, zůstávaly po dlouhý čas nezodpovězeny.

Orexigenní neuropeptidy (zvyšují příjem potravy)	Lokalizace genu	Počet amino-kyselinových zbytků
Neuropeptid Y	7p15.1	36
Galanin	11q13.3-q13.5	30
β-endorfin	2p23.3	31
Dynorfin	20pter-p12.2	17
Enkefalin	20pter-p12.2	32
Melanin-koncentrující hormon	12q23-q24	19
Orexin A	17q21	33
Orexin B	17q21	28
Anorexigenní neuropeptidy (snižují příjem potravy)		
Kortikotropin-releasing hormon	8q13	41
Urocortin	2p23-p21	40
Neurotensin	12q21	13
Glukagon-like peptid 1	2q36-q37	30
Kokainem a amfetaminem regulovaný transkript	5q13.2	89
Melanokortin	2p23.3	13
Agouti protein	20q11.2	16
Agouti-related peptid	16q22	112

Tabulka 1: Orexigenní a anorexigenní neuropeptidy hypothalamu

Intenzivní výzkum v posledních několika letech vedl nejprve k identifikaci orexigenních a anorexigenních neurotransmiterů v hypothalamu (tab. 1). Následovala přesná lokalizace jejich produkce, uvolňování a receptivních oblastí. Byly také podány důkazy morfologického vztahu mezi neurony produkujícími jednotlivé neurotransmitery / neuromodulátory. To, že některé neurony mohou být původcem více než jednoho signálu regulujícího potravní chování (Hökfelt a spol. 2000, Stanley a spol. 1993, Spina a spol. 1996, Stanley a spol. 1983, Hahn a spol. 1998), podpořilo dřívější názor, že v hypothalamu je lokalizován složitý okruh schopný regulovat potravní chování.

1.2.2.1.2. Hypothalamická jádra

Hypothalamus řídí homeostázu celého organismu třemi různými mechanismy (Kingsley a spol. 1996):

1) Prvním z nich jsou **descendentní spojení** s mozkovým kmenem a míchou, podílející se na regulaci autonomního nervového systému (ANS). Hypothalamus slouží jako základní integrační centrum ANS a je propojen s jádry mozkového kmene a s míchou prostřednictvím *fasciculus longitudinalis dorsalis*, *fasciculus mamillaris princeps* a *fasciculus telencephalicus medialis*. Dráhy, jakými se do hypothalamu dostávají senzorické informace, nejsou doposud uspokojivě prozkoumány. Zdá se, že většina z nich přichází přes kmenovou retikulární formaci a mají svůj původ v řadě buněčných typů, jež mohou produkovat katecholaminy, serotonin, či acetylcholin.

2) Hypothalamus sám o sobě slouží jako **endokrinní orgán**, který prostřednictvím sekrece do krevního oběhu reguluje množství fyziologických a endokrinních funkcí. Doposud nebylo možné blíže určit korelaci specifických autonomních funkcí s individuálními HT jádry. Je však zřejmé, že existuje určitá regionální specializace: Oblasti <u>předního HT</u> jsou blízce asociované s parasympatickými funkcemi. Např. stimulace v blízkosti *nucleus anterior* způsobuje zpomalení srdečního rytmu, snížení krevního tlaku, periferní vasodilataci, slinění, zvýšenou peristaltiku a pocení. Naopak <u>zadní a laterální</u> oblasti jsou asociovány se sympatickými funkcemi a jejich drážděním je možno vyvolat opačné reakce.

Dřívější dělení regulačních systémů na endokrinní (chemický, ovlivňující každou buňku v těle) a nervový (elektrický, ovlivňující specifické efektorové skupiny buněk) je dnes již zastaralé. CNS je díky existenci tzv. cirkumventrikulárních orgánů (CVO) s chybějící hematoencefalickou bariérou (HEB) konfrontován s krevními endokrinními přenašeči. Mezi CVO řadíme těchto sedm oblastí: *area postrema, epifýza, subkomisurální a subfornikální oblast, organum vasculosum laminy terminalis, eminentia mediana* a *neurohypofýza*. CVO obsahují neurony, ale mají některé charakteristické rysy endokrinních žláz. Např. běžná nervová tkáň je schopna používat jako jediný zdroj energie glukózu a to prostřednictvím cyklu trikarboxylových kyselin. CVO jsou schopné jako zdroj energie využívat též volné mastné kyseliny a navíc je mohou metabolizovat cestou hexózo-monofosfátového shuntu, což je cesta pro neurony nedostupná. CVO mají vyšší kapilární densitu než okolní nervová tkáň a tyto kapiláry jsou též strukturálně odlišné (perikapilární prostor, fenestrace a povrchové ”pits”). Je prokázáno, že povrch ”pits” je pokryt specializovanými receptory, které váží cirkulující hormony a přeměňují chemický signál na neuronální. CNS je tedy předmětem hormonální regulace a CVO tvoří pojítko mezi endokrinním a nervovým systémem.

3) Konečně, svými spojeními se strukturami koncového mozku hraje HT velmi důležitou, avšak zatím ne příliš jasnou roli v **regulaci chování**. Hypothalamus leží v klíčovém bodě celé neurální osy. Kříží se v něm descendentní vlivy z kortikálních oblastí a regulace nejprimitivnějších funkcí organismu: trávení, kardiovaskulárních funkcí, dýchání, tělesné teploty, obranných mechanismů a sexuálních funkcí. Dále slouží jako ohnisko, z něhož mohou být ascendentní informace vhodně distribuovány do celého nervového systému a integrovány s descendentními příkazy. Zdá se, že přes tato spojení jsou behaviorální mechanismy integrovány do fyziologických homeostatických mechanismů přežití. Např. potravní chování je nedělitelnou složkou trávení. Některé zajímavé studie ukazují, jak mohou léze či stimulace HT struktur ovlivnit stereotypní chování orientované na přežití. HT pravděpodobně ovlivňuje stereotypní chování recipročními interakcemi s kortikálními strukturami. Nejvýznamnějšími z nich jsou *jádra amygdaly, hipokampální formace, septální jádra, gyrus cinguli* a *prefrontální kortex*.

1.2.2.2. Gastrointestinální trakt

Gastrointestinální trakt (GIT) je inervován autonomním nervovým systémem. Jednak převážně excitačními parasympatickými (cholinergními) vlákny prostřednictvím n.vagus a pelvických nervů, dále pak inhibičními sympatickými (noradrenergními) vlákny prostřednictvím splanchnických nervů. Langley byl první, kdo poukázal na existenci třetího regulačního systému skládajícího se z myenterického (Auerbachova) a submukózního (Meissnerova) nervového plexu (Langley 1921). Myenterický plexus kontroluje motorickou aktivitu GIT, submukózní plexus se podílí na regulaci jeho sekreční aktivity. Systém těchto dvou nervových pletení byl později pojmenován enterický nervový systém (ENS). Na rozdíl od parasympatických nervových vláken inervujících střevo, kterých je asi 20 tisíc, bylo v ENS popsáno 100 miliónů neuronů, které slouží jako lokální senzory, interneurony i efektory. ENS může být chápán jako součást CNS, která byla během vývoje organismu oddělena, ale zachovává si s CNS oboustrannou komunikaci prostřednictvím aferentních a eferentních drah parasympatiku a sympatiku.

Eferentní signály z CNS jsou do GIT přenášeny zejména prostřednictvím prepangliových vláken vagového parasympatiku, který převažuje během většiny interdigestivní i digestivní fáze a koordinuje exogenní i endogenní sekreci a motilitu v GIT. Naopak postgangliová splanchnická vlákna zprostředkovávají signály sympatiku především za podmínek stresu, adaptace a nocicepce (Janig a spol. 1986).

Aferentní signály z GIT jsou přenášeny do CNS prostřednictvím vláken n. vagus a spinálních nervů. Přenášejí informace z řady senzorů v trávicím traktu, které reagují na mechanické podněty (distenze, kontrakce), chemické látky (trávenina v lumen GIT), neuro-hormonální vlivy (regulační hormony trávicího traktu), neurotransmitery, neuromodulátory, cytokiny a mediátory zánětu produkované mikroby v trávicím traktu (Langley a spol. 1994, Holzer a spol. 1992).

Excitace gastrointestinálních mechano- chemo- a nociceptorů ve sliznici, svalovině nebo v seróze GIT může být zdrojem pro intramurální a extramurální reflexy. Intramurální reflexy jsou zprostředkovány lokálními senzorickými neurony, interneurony a efektorovými neurony. Ovlivňují motorickou, sekreční a vaskulární aktivitu v krátkém úseku GIT. Extramurální reflexy se odehrávají na úrovni prevertebrálních ganglií, míchy nebo mozkového kmene (Wingate a spol. 1981, Langley a spol. 1994, Blaugrund a spol. 1996, Janig a spol. 1986, Holzer a spol. 1992). Aferentní vlákna splanchnických nervů procházejí

intervertebrálními ganglii do zadních rohů míšních, kde jsou zapojena do míšních reflexů ovlivňujících motilitu a sekreci GIT (Maggi a spol. 1991, Green a spol. 1988). Většina aferentních vagových vláken je zakončena v *nucleus tractus solitarii* (NTS) mozkového kmene. Tato oblast je interneurony propojena s dorsálním motorickým jádrem vagu (DMV) v oblasti dorsálního vagálního komplexu. Tím je uzavřen okruh zprostředkující tzv. vago-vagální reflexy koordinující řadu funkcí trávicího traktu. Některé signály z GIT jsou přenášeny do vyšších etáží CNS prostřednictvím ascendentních spojení z NTS do hypothalamu, zejména do PVN a nucleus arcuatus (ARC), dále do centrálního jádra amygdaly, jádra stria terminalis a ventrálního thalamu, kde ovlivňují potravní chování (Berthoud a spol. 1990).

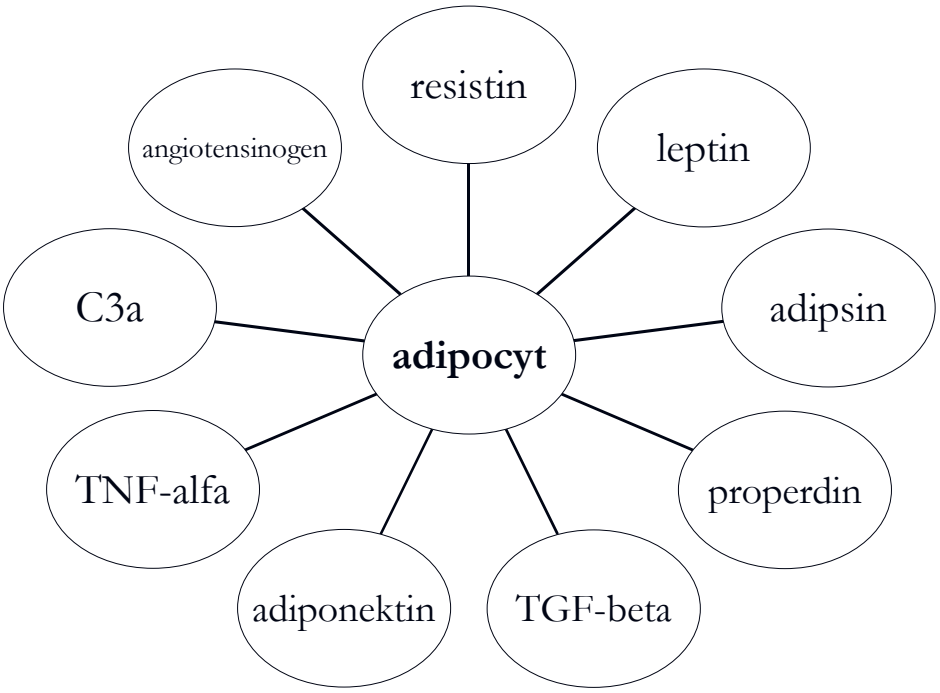
O tom, že většina aferentních signálů z GIT je do CNS přenášena prostřednictvím nervus vagus, svědčí i skutečnost, že na vagových zakončeních byly identifikovány receptory pro cholecystokinin (CCK1-receptor), leptin (Ob-receptor), peptid YY (Y2-receptor) a mechanoreceptory. Tyto signály se pravděpodobně vzájemně potencují a následně ovlivňují regulační centra příjmu potravy v hypothalamu (Moriarty a spol. 1997, Burdyga a spol. 2002, Barrachina a spol. 1997).

1.2.2.3. Tuková tkáň jako endokrinně aktivní orgán

Na základě recentních údajů lze funkce tukové tkáně v organismu rozdělit do několika základních oblastí. Adipocyty jsou místem skladování energetických zásob ve formě tuků, produkují řadu hormonálně aktivních substancí ovlivňujících fyziologické děje v ostatních tkáních organismu, ale také jsou efektorovým orgánem eferentních signálů z CNS, který se podílí na bazálním metabolismu organismu.

Nejméně půl století je známo, že příjem potravy a míra bazálního metabolismu jsou regulovány ve vztahu k množství tělesného tuku v organismu (Kennedy a spol. 1953). V poslední době byla identifikována řada působků produkovaných adipocyty, z nichž mnohé již byly v minulosti popsány také v souvislosti s jinými tkáněmi organismu. Jedná se zejména o komponenty renin-angiotensinového systému, inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-1), adenosin, interleukin-1 a 6, TNF-alfa, inhibitor aktivátoru plasminogenu a další (Kim a Moustaid-Moussa 2000). Dále jsou v adipocytech produkovány hormony, které hrají významnou úlohu v regulaci nutričního stavu organismu a inzulínové senzitivity. Jedná se o

leptin, resistin a proteiny odvozené od komplementu, mezi něž patří adiponektin, adipsin a protein stimulující acylaci (obr. 3).



Obrázek 3: Tuková tkáň jako endokrinně aktivní orgán

Legenda: C3a – protein odvozený od komplementu, TNF-alfa – tumor nekrotizující faktor alfa, TGF-beta – transforming growth factor beta

Tyto hormony jsou secernovány do cirkulace a ovlivňují fyziologické děje v ostatních tkáních organismu. Leptin je nejdůležitějším periferním anorexigenním signálem regulujícím v dlouhodobém horizontu příjem potravy a nutriční stav organismu. Jeho objev v roce 1994 významně změnil pohled na etiopatogenezi obezity. Neopomenutelná je také jeho úloha v regulaci sekrece gonadotropinů v rámci interakce mezi tukovou tkání a reprodukčními orgány. Adiponektin a resistin jsou hormony regulující inzulínovou senzitivitu organismu. Společnou podmínkou k sekreci těchto molekul je závislost na aktivaci nukleárního receptoru. Ligandy PPAR-gamma stimulují produkci adiponektinu a inhibují produkci resistinu. Důsledkem je zvýšení periferní inzulínové senzitivity. Tímto mechanismem je pravděpodobně zprostředkován účinek thiazolidindionů – perorálních antidiabetik zvyšujících inzulínovou senzitivitu. Retinová kyselina naopak inhibuje aktivaci PPAR-gamma a tím blokuje produkci leptinu a adiponektinu (Zhang a spol. 2002).

Tuková tkáň není pouze místem produkce regulačních hormonů, ale zároveň je metabolicky aktivním efektorovým orgánem eferentních drah z CNS, který se podílí na bazální metabolické spotřebě organismu. Za tuto funkci jsou zodpovědné tzv. **uncoupling proteiny**. Jedná se o molekuly, které se vyskytují zejména v buňkách tzv.hnědé tukové tkáně a kosterního svalstva. Jejich prostřednictvím je organismus schopen uvolňovat energii ve formě tepla namísto jejího ukládání ve formě chemických sloučenin. Tyto proteiny hrají významnou roli v celkové energetické bilanci organismu. Hnědá tuková tkáň má u člověka význam při tvorbě tepla v novorozeneckém období, v pozdějším věku tuto funkci přebírá kosterní svalovina, která obsahuje odlišný typ uncoupling proteinů.

1.2.3. Vzájemná interakce signálů

Regulace příjmu potravy a nutričního stavu organismu probíhá prostřednictvím vzájemné interakce tří základních systémů. Hypothalamus je řídícím centrem, gastrointestinální trakt registruje množství a kvalitu přijaté stravy a tuková tkáň poskytuje informaci o množství energetických zásob v organismu. Hypothalamická centra sytosti a hladu produkují orexigenní a anorexigenní regulační peptidy, které jsou propojeny do interaktivní sítě signálů. Výstupem jsou eferentní dráhy do ostatních oblastí CNS, kde probíhá regulace chuti k jídlu, registrování pocitu hladu a změny potravního chování, které vedou k vyhledání stravy a přípravě k její konzumaci. Zároveň jsou neurony produkující orexiny napojeny na spánková centra a synchronizují tak denní stravovací rytmus s cyklem spánku a bdění. Další eferentní dráhy z hypothalamických center vedou do vegetativních center v prodloužené míše, kde prostřednictvím eferentních drah autonomního nervového systému ovlivňují motilitu a sekreční aktivitu gastrointestinálního traktu a energetickou spotřebu v mitochondriích tukové tkáně a kosterního svalstva. Hypothalamické neurony mají na svém povrchu receptory pro orexigenní a anorexigenní hormony trávicího traktu a tukové tkáně a některé z nich jsou glukosenzitivní. Zároveň registruje hypothalamus periferní orexigenní a anorexigenní signály prostřednictvím aferentních vláken nervus vagus a nadřazených drah CNS. Tím vyhodnocuje množství energetických zásob v organismu, stadium procesu příjmu potravy a aktuální hladinu glykemie v cirkulaci. Obecně lze říci, že tuková tkáň je zdrojem signálů pro dlouhodobou regulaci příjmu potravy a nutričního stavu organismu, naopak hormony trávicího traktu se podílejí především na krátkodobých regulačních mechanismech ovlivňujících pocity hladu a příjem potravy v průběhu dne.

1.2.4. Další funkce regulačních peptidů

Nutriční regulační peptidy mají kromě vlivu na příjem potravy a stav výživy organismu také řadu dalších funkcí, které vycházejí z jejich zapojení do komplexních neuroendokrinních drah. Hypothalamické neuropeptidy orexiny regulují cyklus spánku a bdění a jejich chybění je spojováno se vznikem narkolepsie - onemocnění, při němž pacient nekontrolovaně upadá do záchvatů spánku i při běžných denních činnostech. Ghrelin stimuluje sekreci růstového hormonu, má také vliv na cyklus spánku a bdění, dále na kardiovaskulární funkce, regulace endokrinní funkce slinivky břišní a metabolismu glukózy a je také zkoumán v souvislosti s protinádorovým působením. Amylin zasahuje do regulace metabolismu glukózy, působí na zlepšení kvality kostní hmoty a účastní se mechanismů ovlivňujících krevní tlak. Leptin u žen řídí reprodukční aktivitu a nástup menstruačního cyklu. Dále hraje významnou roli v imunitních funkcích organismu a při zánětlivých procesech. Také má vliv na kardiovaskulární systém a ovlivňuje vznik osteoporózy ve stáří. Adiponektin má protizánětlivý vliv na cévní stěnu a tím také působí proti rozvoji aterosklerózy. Z výše uvedených údajů je patrné, že regulace nutričního stavu je složitý proces, který je prostřednictvím regulačních peptidů spojen s celou řadou dalších funkcí v organismu.

1.2.5. Klinické aspekty

V souvislosti s klinickým významem studia hypothalamických neuropeptidů je zmiňována řada patologických stavů. Je známo, že poruchy příjmu potravy při léčbě nádorových onemocnění nelze přičítat pouze nežádoucím účinkům chemoterapeutik. Za jednu z příčin tohoto tzv. cancer anorexia-cachexia syndromu je považována dysregulace v expresi hypothalamických neuropeptidů, která může být vyvolána působením různých látek, mimo jiné cytokinů, tvořených v přítomnosti nádoru (Inui a spol. 1999). Obdobná situace může nastat i při působení stresového podnětu (např. zánět, trauma, infekční onemocnění). Otázkou zůstává, zda uvedené změny mohou být způsobeny neuropeptidem produkovaným přímo tumory. To bylo zjištěno v případě neuroblastomu a ganglioneuroblastomu (Arihara a spol. 2000). Velká pozornost se v poslední době soustředila na orexiny a jejich vztah k narkolepsii (Nevšímalová a spol. 2000). Také otázka vrozených dispozic k obezitě, mentální anorexii či diabetu je detailně diskutována právě ve vztahu k hypothalamu a jeho regulačním

neuropeptidům. Některá výše uvedená onemocnění vyznačující se poruchami příjmu potravy a poruchou energetické rovnováhy byla mezi kliniky označována jako „diencefalózy", tzn., že primární porucha těchto chorob by mohla spočívat v alteraci exprese hypothalamických neuropeptidů, jejich receptorů a vzájemných vazeb. Slibnou je možnost budoucí cílené medikamentózní nebo mikrochirurgické intervence u hypothalamických poruch. Naopak peroperační poškození hypothalamických jader může vést k dysregulaci neuroendokrinních funkcí. Také některé nejasnosti v oblasti autonomních regulací (Moráň a spol. 2000) by mohly být v budoucnu vysvětleny na základě důkladného studia hypothalamických neuropeptidů a jejich vzájemných vztahů.

Znalost míst tvorby a působení hypothalamických neuropeptidů podílejících se na regulaci energetické rovnováhy a příjmu potravy může být v budoucnu důležitá při posuzování klinického dopadu a vnějších projevů hypothalamických poškození, ať už se jedná o tumory, traumata, krvácení či operační zákroky. Při vhodné integraci poznatků základního výzkumu s klinickým pozorováním, zobrazovacími, histopatologickými a biochemickými metodami bude možné posuzovat patofyziologické procesy na mnohem detailnější úrovni a vyvinout cílenější terapeutické postupy.

1.2.6. Výzkum regulačních peptidů

Oblast regulačních peptidů nutričního stavu je vzhledem ke svému významu celosvětově intenzivně zkoumána. V odborné literatuře je možno nalézt na toto téma mnoho publikací. Některé z nich se zabývají ***tkáňovým účinkem*** regulačních peptidů, například na buňky tukové tkáně, nadledvin a slinivky břišní, ale také změnou exprese peptidů v posmrtných řezech z mozkové tkáně, především z hypothalamu. Většina dostupných vědeckých publikací popisuje experimenty na ***zvířecích modelech***, kde je možno vysledovat i změny příjmu potravy a nutričního stavu při aplikaci regulačních peptidů do krevního řečiště, břišní dutiny nebo centrálního nervového systému organismu. Většina experimentů na ***lidských modelech*** je omezena z etických důvodů na sledování změn hladin regulačních peptidů v krvi jedinců se změnou nutričního stavu.

1.3. Základní charakteristika studovaných regulačních peptidů

Z regulačních peptidů nutričního stavu jsme do naší studie zařadili orexin A, ghrelin, adiponektin, leptin a amylin. Základní informace o těchto regulačních hormonech jsou shrnuty v tabulce 2.

Leptin (adipocyt)	7q31.3	16 kDa	146 amk	stabilní glykosylace
Orexin A (hypothalamus)	17q21	3,5 kDa	33 amk	stabilní cyklizace
Amylin (beta-buňky Langerhansových ostrůvků)	12p12.3	3,6 kDa	37 amk	stabilní redukce, deamidace
Adiponektin (adipocyt)	3q27	30 kDa	247 amk	stabilní homotrimery
Ghrelin (žaludeční sliznice)	3p26	3,3 kDa	28 amk	nestabilní N-octanoyl

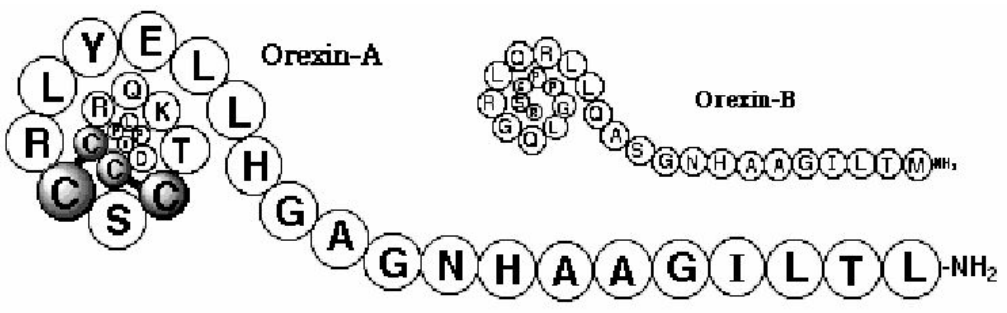
Tabulka 2: Základní cfharakteristika studovaných orexigenních a anorexigenních peptidů
Legenda: kDa – kilodaltony, amk – počet aminokyselinových zbytků

1.3.1. Orexin A

1.3.1.1. Úvod

Orexiny jsou hypothalamické neuropeptidy objevené v roce 1998 dvěma nezávislými týmy. Sakurai (Sakurai a spol. 1998, Sakurai 1999) je nazval orexin A a B (OX A, OX B) pro jejich účinky na zvýšení příjmu potravy (*orexis* = řecky chuť) a De Lecea (De Lecea a spol. 1998) je pro podobnost se secretinem nazval hypocretin 1 a 2 (Hcrt 1, Hcrt 2). Jsou produkovány především buňkami dorzálního, laterálního a perifornikálního hypothalamu. Axony těchto buněk inervují řadu struktur, jako nucleus arcuatus, paraventrikulární jádro thalamu, septální jádra, řadu míst v mozkovém kmeni a v míše (Peyron a spol. 1998, Taheri a spol. 1999, Van den Pol 1999). Orexin A (33 aminokyselinových zbytků) i orexin B (28

aminokyselinových zbytků) vznikají z jedné prekurzorové molekuly – preproorexinu (130 aminokyselinových zbytků), jehož gen je u člověka lokalizován na lokusu 17q21 (obr. 4). Doposud byly objeveny dva typy orexinových receptorů – OX1R a OX2R, které jsou distribuovány v CNS i v periferních tkáních.



Obrázek 4: Struktura lidského orexinu A a orexinu B

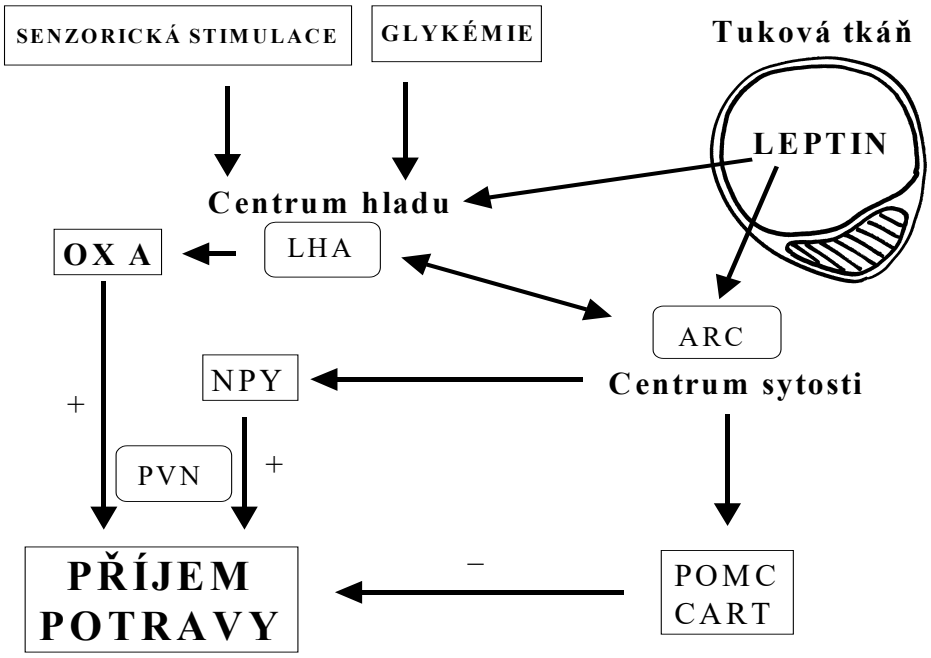
1.3.1.2. Výsledky experimentálních prací

Přesto, že orexiny jsou známy krátkou dobu, byla provedena řada experimentů na hlodavcích, vyšších savcích i pozorování na člověku. Na základě jejich výsledků je možno definovat úlohu orexinů v regulaci příjmu potravy, spánkových rytmů i v jiných oblastech (Bronský a spol. 2002b, Bronský a spol. 2003c).

1.3.1.2.1. Orexiny a potravní chování

Příslušnost orexinů ke skupině orexigenních neuropeptidů dokládá řada odborných studií. Jejich aplikace do mozkového komorového systému zvyšuje příjem potravy v závislosti na dávce a hladovění způsobuje zvýšení exprese preproorexinové mRNA v hypothalamu (Rodgers a spol. 2000, Sartin a spol. 2001). Selektivní antagonista OX1R snižuje u krys příjem potravy (Haynes a spol. 2000). Buňky, které produkují orexiny, mají na svém povrchu receptory pro leptin (Funahashi a spol. 2000), jsou v přímém kontaktu s buňkami tvořícími neuropeptid Y (Horvath a spol. 1999) a jsou aktivovány hypoglykemií (Moriguchi a spol. 1999) (obr. 5). U obézních pacientů byly zjištěny snížené plazmatické hladiny orexinu A (Adam a spol. 2002).

V poslední době se více zdůrazňuje úloha orexinů v souvislosti s poruchami spánku. Buňky produkující orexiny jsou inervovány vlákny ze suprachiasmatického jádra, které je centrem cirkadiánní aktivity (Abrahamson a spol. 2001). Nervová vlákna obsahující orexiny jsou bohatě zastoupena v locus coeruleus, kde orexin A působí v závislosti na histaminergním systému na zvýšení bdělosti (Hagan a spol. 1999, Huang a spol. 2001). Orexiny pravděpodobně regulují cholinergní a monoaminergní aktivitu v průběhu spánkového cyklu (Mignot 2001).



Obrázek 5: Zapojení orexinu A do hypothalamických regulačních okruhů

Legenda: OX A – orexin A, LHA – laterální hypothalamická oblast, ARC – nucleus arcuatus hypothalamu, NPY – neuropeptid Y, PVN – paraventrikulární jádro hypothalamu, POMC – proopiomelanokortin, CART – kokainem a amfetaminem regulovaný transkript

1.3.1.2.2. Orexiny a regulace cyklu spánku a bdění

V roce 1999 byla objevena souvislost mezi inaktivací preproorexinového genu a vývojem symptomů podobných narkolepsii u myší (Chemelli a spol. 1999, http://www.cell.com/cgi/content/full/98/4/437/DC1). V témže roce byla popsána mutace v genu pro OX2R způsobující narkolepsii u psů (Lin a spol. 1999). U většiny lidských pacientů s touto chorobou byla nalezena snížená koncentrace orexinů v mozkomíšním moku a později i v plazmě (Nishino a spol. 2000, Higuchi a spol. 2002). Studie post mortem

prokázaly u těchto pacientů snížené množství neuronů produkujících orexin v hypothalamu o 80-100% (Thannickal a spol. 2000).

Na podkladě experimentů se zvířaty byl hledán genetický korelát narkolepsie v lidské populaci. Autoři z České republiky se podíleli na objevu mutace v preproorexinovém genu (Leu16Arg) způsobující narkolepsii u člověka (Peyron a spol. 2000, Nevšímalová a spol. 2000). Deficit orexinu je přítomen u většiny pacientů trpících narkolepsií s kataplexií.

Narkolepsie se projevuje stavy krátkodobého imperativního spánku a nálezem iniciálního REM spánku. Obvykle začíná mezi 15. a 25. rokem života. Její frekvence v populaci je 0,02 - 0,2%. Bývá asociována s řadou symptomů, jako je např. spánková paralýza (neschopnost pohybu při usínání nebo probuzení), hypnagogické halucinace (podobné snu, nastávající při usínání) a spánkový myoklonus (periodické pohyby končetin). Jediným specifickým doprovodným symptomem je kataplexie - svalová atonie vyvolaná emocionálním podnětem, typicky smíchem či zlostí (http://www.med.stanford.edu/school/psychiatry/narcolepsy).

Narkolepsie je u člověka často sdružena s mírnou obezitou, což může být způsobeno sníženou fyzickou aktivitou během dne nebo vlivem sekundární dysregulace hormonů ovlivňujících příjem potravy v důsledku deficitu orexinů.

Většina případů narkolepsie se nevyskytuje familiárně, ale byla popsána její asociace s polymorfismem v HLA-DR2 a DQB1*0602, což poukazuje na možnou autoimunitní reakci, jejímž cílem by mohla být populace neuronů produkujících orexiny (Hungs a Mignot 2001, Mignot 2001, Nevšímalová a spol. 2000).

1.3.1.2.3. Ostatní funkce orexinů

Na základě anatomické lokalizace vláken neuronů obsahujících orexin a orexinových receptorů lze považovat tyto neuropeptidy za spojovací element mezi neuroregulačním, neuroendokrinním a autonomním systémem (Blanco a spol. 2001, Date a spol. 1999, Karteris a spol. 2001). Je známa řada změn vyvolaných experimentálním působením orexinů. Jejich aplikace do mozkových komor působí zvýšení metabolismu, aktivaci sympatiku a vyplavování kortizolu, zatímco produkce prolaktinu a růstového hormonu je snížena (Mignot 2001). Orexiny také regulují tělesnou teplotu v závislosti na stavu bdělosti (Yoshimichi a spol. 2001) a stimulují vyplavování kortizolu z lidských adrenokortikálních buněk (Mazzocchi a spol. 2001).

1.3.1.3. Závěr

Dle současných poznatků hrají orexiny důležitou úlohu v propojení systémů regulace příjmu potravy, spánku, autonomního nervového systému a neuroendokrinních funkcí. Vzhledem k tomu, že jejich existence je známa pouze několik let, bude řada otázek teprve zodpovězena po dalším výzkumu. Úplná fyziologická úloha orexinů v lidském organismu je zatím nejasná, avšak řada experimentů a studií, zvláště v oblasti spánkové medicíny, by mohla v blízké době vést ke klinické aplikaci. Pokud se podaří prokázat účast orexinů při vzniku poruch příjmu a trávení potravy, bude možné zkoumat jejich farmakologickou léčbu ovlivněním orexinových receptorů.

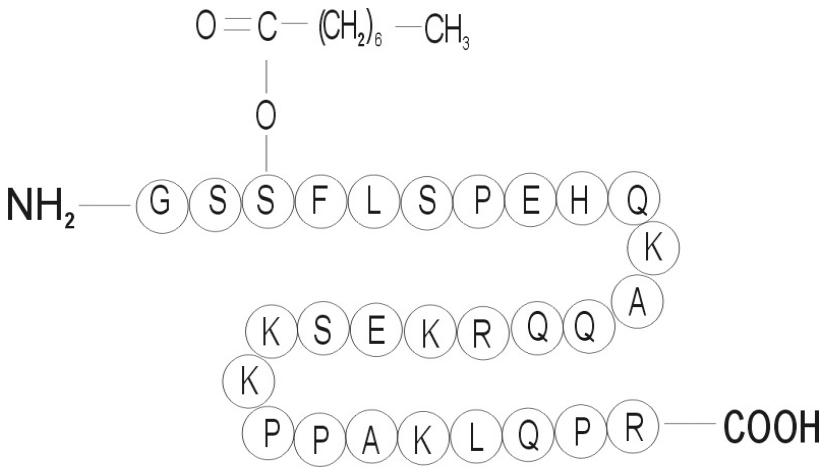
1.3.2. Ghrelin

1.3.2.1. Úvod

Ghrelin je peptidový hormon složený z 28 aminokyselinových zbytků (obr. 6). Byl objeven japonskými vědci v roce 1999 (Kojima a spol. 1999) jako přirozený ligand „sirotčího" receptoru GHS1a, který je specifický pro skupinu syntetických peptidů (*growth hormone secretagogues - GHS*) podporujících vyplavování růstového hormonu (GH) (Smith a spol. 2001). Ghrelin je tvořen především v enteroendokrinních buňkách žaludeční sliznice (Kojima a spol. 1999, Date a spol. 2000). V menší míře je také tvořen ve sliznici tenkého a tlustého střeva, pankreatu, ledvinách, placentě, štítné žláze, hypothalamu a hypofýze (Date a spol. 2000). Gastrektomie vede ke snížení plazmatických hladin ghrelinu o 65 - 80 %. Aborálním směrem se přítomnost ghrelinu v tkáních gastrointestinálního traktu snižuje. Ghrelin je také produkován některými žaludečními a střevními karcinoidy a medulárním karcinomem štítné žlázy. Gen pro ghrelinový prekurzor je umístěn na krátkém raménku chromosomu 3 (3p26-p25). Kóduje aminokyselinovou sekvenci pre-pro-ghrelinu, který má 117 aminokyselinových zbytků a molekulovou hmotnost 12911. Jeho následným štěpením vzniká molekula ghrelinu s relativní molekulovou hmotností 3315.

1.3.2.2. Struktura ghrelinu

Ghrelin je prvním známým přirozeným peptidem v lidském organismu, jehož **serinová hydroxylová skupina je acylována *n*-oktanoylovým radikálem** (Kojima a spol. 1999). Tato acylace je klíčová pro schopnost ghrelinu prostupovat přes hematoencefalickou bariéru a schopnost vazby a aktivace GHS1a receptoru (Smith a spol. 2001). Na základě *in vitro* experimentů bylo zjištěno, že „aktivním jádrem" peptidu je sekvence Gly-Ser-Ser(*n*-oktanoyl)-Phe, která vazbou na GHS1a receptor zvyšuje intracelulární koncentraci Ca^{2+}. V plazmě cirkuluje v několikanásobně větším množství **neacylovaný derivát ghrelinu**, který není schopen se vázat na GHS1a receptor, ale je zodpovědný za kardiovaskulární a antiproliferativní účinky ghrelinu (Cassoni a spol. 2001). Třetí formou přítomnou v organismu je **Des-Gln-14-ghrelin**, který je výsledkem alternativního štěpení ghrelinového prekurzoru, obsahuje také acylaci na ser3 a liší se od ghrelinu pouze chybějícím glutaminovým zbytkem. Tento endogenní ligand GHS1a receptoru vykazuje shodné fyziologické účinky s ghrelinem (Hosoda a spol. 2000).



Obrázek 6: Struktura ghrelinové molekuly

Aminokyselinová sekvence ghrelinu je z 36 % shodná s motilinem a peptid odvozený od pre-pro-motilinu (PPMRP) produkovaný enteroendokrinními buňkami žaludeční sliznice je identický s pre-pro-ghrelinem, kromě pozice ser26, která u PPMRP není acylovaná oktanoylovým zbytkem. Motilin – stejně jako ghrelin - vykazuje pozitivní efekt na vyplavování růstového hormonu a příjem potravy, ale není schopen vazby na ghrelinový GHS1a receptor (Tomasetto a spol. 2000).

1.3.2.3. Regulace sekrece ghrelinu

Ghrelin je tvořen v celé řadě orgánů, především v žaludku. Buňky tvořící ghrelin neústí do lumen gastrointestinálního traktu. Pravděpodobně reagují na fyzikální a chemické podněty z basolaterální strany a úzce komunikují s kapilární sítí v lamina propria. Zde je ghrelin secernován do cirkulace a ovlivňuje cílové tkáně prostřednictvím krevního řečiště jako klasický endokrinní signál. Tento periferní signál pravděpodobně odráží sumaci krátkodobých a dlouhodobých změn v energetické rovnováze a předává informace do CNS.

V pankreatu je ghrelin produkován některými alfa-buňkami (Date a spol. 2002). U krys působí inzulínem vyvolaná hypoglykemie nebo podání leptinu stimulaci sekrece ghrelinu. Podání glukózy sekreci ghrelinu potlačuje, pravděpodobně přímým účinkem na žaludeční buňky, které ghrelin produkují.

Vagotomie a hypofyzektomie také působí vzestup plazmatických hladin ghrelinu, ale u lidí s deficitem růstového hormonu nebyly zvýšené hladiny pozorovány. U krys bylo popsáno zvýšení hladin ghrelinu se stoupajícím věkem. (Guan a spol. 1997, Dornonville a spol. 2001, Date a spol. 2000).

V placentě je ghrelin přítomen především v cytotrofoblastu, méně pak v syncytiotrofoblastu. Úloha ghrelinu v autokrinních, parakrinních i endokrinních mechanismech fetálně-maternální interakce je předmětem studií (Gualillo a spol. 2001). Hladiny ghrelinu vzrůstají ve třetím týdnu těhotenství a klesají v pozdních stadiích gestace. U novorozenců byla popsána přítomnost imunoreaktivního ghrelinu v pupečníkové krvi (Chanoine a spol. 2002).

Ghrelin je přítomen také v normálních (kortikotropních, thyrotropních, laktotropních a somatotropních) i nádorových hypofyzárních buňkách. Jeho úloha v této tkáni je diskutována vzhledem k tomu, že pouze 5 % hypofyzárního ghrelinu je v acylované formě.

Produkce pre-pro-ghrelinu byla u hlodavců prokázána v mesangiálních buňkách a podocytech ledvin. Přítomnost mRNA pro ghrelin a pro GHS receptor byla popsána v T a B lymfocytech a neutrofilních granulocytech. Některé studie poukazují na pozitivní vliv nízkomolekulárních GHS na imunitní systém.

Ghrelin a GHS mohou hrát také významnou úlohu při vzniku poruch kostního metabolismu – tak, jak to bylo již popsáno např. u amylinu – pankreatického anorexigenního hormonu (Cornish a spol. 2000, Bronský a spol. 2003d). Některé studie na hlodavcích

prokázaly zmnožení kostní hmoty a zvýšení kostní denzity po podávání GHS. Gastrektomie působí ztrátu kostní hmoty a snížení kostní denzity.

1.3.2.4. Ghrelin v lidské plazmě

Plazmatické hladiny ghrelinu odrážejí krátkodobé změny příjmu potravy i dlouhodobé změny nutričního stavu organismu. Při extrapolaci poznatků ze zvířecích experimentů na člověka je nutná obezřetnost, protože stanovování ghrelinu v lidské plazmě naráží na řadu technických překážek. Naměřené hodnoty se mohou značně lišit v závislosti na použitém antiséru a jsou ovlivněny i použitou extrakční procedurou, která může stanovení předcházet. Doposud nebyly u člověka publikovány referenční hladiny plazmatického ghrelinu a publikované práce vycházejí z relativních diferencí v naměřených hodnotách. Plazmatické hladiny ghrelinu jsou snížené po příjmu potravy a u obézních jedinců (Bronský a spol. 2003b), naopak ke zvýšení dochází při lačnění a u pacientů s mentální anorexií. Plazmatické hladiny ghrelinu u člověka negativně korelují s body mass indexem, množstvím tělesného tuku, velikostí adipocytů, plazmatickými hladinami inzulínu, glukózy a leptinu (Tschöp a spol. 2001, Ravussin a spol. 2001, Becker a spol. 1999). Vzestup hladin ghrelinu bezprostředně před příjmem potravy naznačuje, že ghrelin hraje úlohu v přípravné fázi – jako signál hladu. Intravenózní podání ghrelinu zdravým dobrovolníkům vyvolalo pocity hladu (Wren a spol. 2001). Byla také popsána asociace mutací na 51. a 72. kodonu v pre-pro-ghrelinovém genu (Arg51Gln, Leu72Met) s rozvojem obezity (Ukkola a spol. 2001).

1.3.2.5. Funkce ghrelinu

Ghrelin plní v organismu řadu fyziologických funkcí. Kromě výrazné schopnosti stimulovat vyplavování růstového hormonu, prolaktinu a ACTH mezi ně patří orexigenní aktivita (zvýšení příjmu potravy), vliv na cyklus spánku a bdění, žaludeční motilitu a sekreci, kardiovaskulární funkce, regulace endokrinní funkce pankreatu a metabolismu glukózy a antiproliferativní efekt (Date a spol. 2002, Cassoni a spol. 2001). Ghrelin je významným regulačním prvkem metabolické rovnováhy organismu, který vyvažuje neuroendokrinní a metabolickou odpověď na stav hladovění a v tomto smyslu je považován za komplementární prvek k leptinu.

1.3.2.6. Ghrelin a regulace energetické rovnováhy

Ghrelin je prvním objeveným orexigenním hormonem tvořeným žaludeční tkání. Je jedním z nejsilnějších orexigenních a adipogenních hormonů přítomných v savčím organismu. Zmnožení tukové tkáně může být způsobeno nejen zvýšením příjmu potravy, ale i snížením energetického výdeje organismu. Ghrelin, stejně jako leptin, působí v obou těchto složkách energetického regulačního mechanismu.

1.3.2.6.1. Vliv ghrelinu na příjem potravy

U hlodavců působí opakované aplikace ghrelinu zvýšení tělesné hmotnosti na podkladě zmnožení tukové tkáně. Tyto změny jsou signifikantní již po 48 hodinách. Nedochází však ke změnám longitudinálního růstu ani zmnožení svalové hmoty (Tschöp a spol. 2000). Stejný efekt má i podání syntetických agonistů GHS-receptoru – NNC 26-0161 (Ipamorelin), GHRP-2 a GHRP-6. Tento efekt je pravděpodobně zprostředkován leptin-responsivními neurony ve specifických hypothalamických jádrech (Nakazato a spol. 2001). GHS zvyšují aktivitu v hypothalamických neuronech, na nichž jsou přítomny receptory pro ghrelin, GHS a GHRP. V buňkách tukové tkáně byla pomocí RT-PCR prokázána přítomnost mRNA pro GHS receptor (Kojima a spol. 1999). Není tedy vyloučeno, že adipogenní efekt ghrelinu je způsoben přímým účinkem tohoto hormonu na tukovou tkáň. Stejně tak je zvažován i podíl aktivace hypothalamo-hypofyzo-adrenální osy na tomto ději - ghrelinem vyvolaný Cushingův syndrom (Arnaldi a spol. 2003).

Ghrelin si zachovává svůj orexigenní účinek i při podání do periferie, narozdíl od jiných známých orexigenních peptidů (neuropeptid Y (NPY), agouti-related protein (AgRP), melanin-koncentrující hormon (MCH)), které jsou účinné pouze při centrální aplikaci. Periferní i centrální aplikace ghrelinu u hlodavců způsobuje výrazné zvýšení příjmu potravy, které je závislé na dávce (Tschöp a spol. 2000). Tento efekt nastává velmi rychle – cca do 60 minut. Dlouhodobá infuse ghrelinu do třetí mozkové komory vede u krys k výraznému a trvalému zvýšení chuti k jídlu. Při podání ghrelinu do CNS je jeho účinek srovnatelný s účinkem NPY, zatímco periferní aplikace je méně účinná. Toto konstatování platí i pro ostatní GHS. Mezi GHS, u kterých byla prokázána orexigenní aktivita, patří Ipamorelin, Hexarelin, GHRP-2 a GHRP-6.

Otázkou zůstává, zda ghrelin prochází přes hematoencefalickou bariéru, či zda působí prostřednictvím některého z cirkumventrikulárních orgánů s parciálním chyběním hematoencefalické bariéry (jako je např. ventromediální oblast nucleus arcuatus), které jsou přístupné pro látky cirkulující v krevním oběhu. Právě v těchto oblastech byla prokázána exprese GHS receptoru. Dickinson et al. prokázal, že periferní aplikace ghrelinu zvyšuje expresi produktů časných genů (c-Fos a EGR-1) v neuronech nucleus arcuatus, které koexprimují neuropeptid Y, AgRP a GHS receptor (Hewson a Dickson 2000).

Ghrelin pravděpodobně uplatňuje svůj vliv na energetický metabolismus prostřednictvím dvou hypothalamických systémů. První z nich zahrnuje neurony produkující **neuropeptid Y**, druhý je zprostředkován **receptory pro melanokortin** a jejich agonisty a antagonisty: anorexigenním α-melanocyty stimulujícím hormonem (alfa-MSH), jenž je derivátem proopiomelanokortinu (POMC), a orexigenním AgRP, který je produkován týmiž buňkami, které tvoří NPY – (Bronský a spol. 2004) (obr. 7). Pro toto tvrzení existuje řada důkazů: jednorázové i opakované podání ghrelinu zvyšuje produkci NPY a AgRP, dlouhodobá stimulace GHS receptorů působí zvýšení exprese mRNA pro AgRP, ghrelin je neúčinný u myší s vyřazeným genem pro NPY a současné podání antagonistů receptorů pro NPY blokuje orexigenní efekt ghrelinu (Nakazato a spol. 2001).

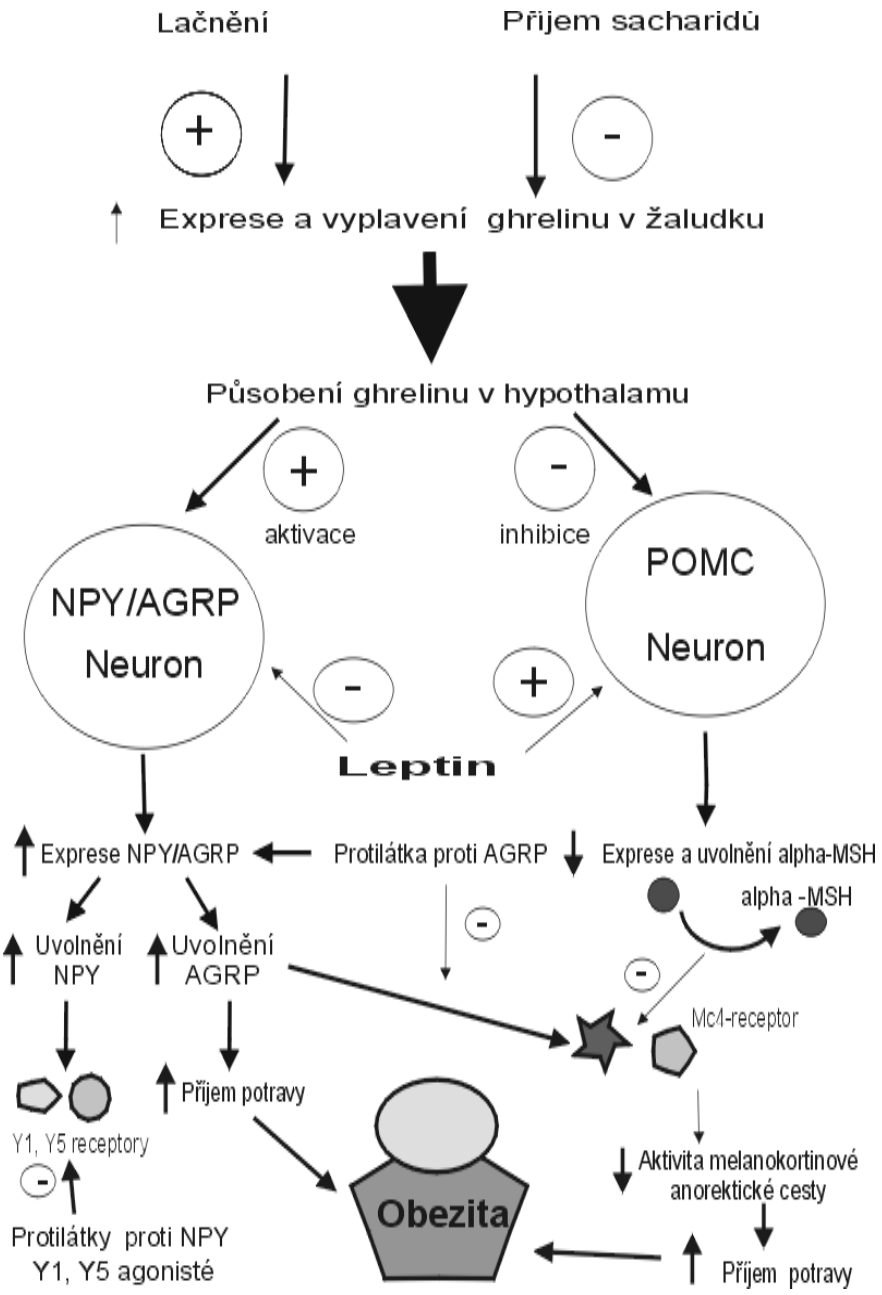
NPY hraje pravděpodobně důležitější roli při zprostředkování krátkodobého efektu ghrelinu, zatímco AgRP se účastní jak při krátkodobém, tak i dlouhodobém podání. Dalšími pravděpodobnými molekulami, které se mohou na účincích ghrelinu podílet jsou POMC, kokainem a amfetaminem regulovaný transkript (CART), melanin-koncentrující hormon (MCH), orexiny A a B (hypokretiny 1, 2), ciliární neurotropní růstový faktor (CNTF), kyselina gama-aminomáselná (GABA) a galanin (Horvath a spol. 2001, Bronský a spol. 2003a, 2004).

1.3.2.6.2. Vliv ghrelinu na energetickou spotřebu

Po jednorázové aplikaci ghrelinu hlodavcům nebyly zjištěny signifikantní změny ve 24hodinové spotřebě energie, ale v prvních 3 hodinách po jeho aplikaci bylo pozorováno výrazné snížení energetického výdeje. Nepřímou kalorimetrií bylo zjištěno významné zvýšení respiračního kvocientu, které je nezávislé na zvýšení příjmu potravy (Tschöp a spol. 2000). Na podkladě elektrofysiologických studií bylo zjištěno, že na přenosu ghrelinového signálu se účastní nejen eferentní, ale i aferentní složka bloudivého nervu. Intravenózní podání ghrelinu

již v malých dávkách snižuje aferentní aktivitu v gastrických větvích n.vagus (Asakawa a spol. 2001).

Podání ghrelinu a některých agonistů jeho receptoru tedy vede k pozitivní energetické bilanci a působí zvýšení množství tukové tkáně jak prostřednictvím zvýšeného příjmu potravy, tak i snížením oxidativní utilizace tukové tkáně.



Obrázek 7: Role ghrelinu v hypothalamické regulaci příjmu potravy

Legenda: NPY – neuropeptid Y, AgRP – agouti-related protein, POMC – proopiomelanokortin, alpha-MSH – melanokortin, Y1, Y5 – receptory pro neuropeptid Y

1.3.2.7. Nevyřešené otázky

Řada studií dokládá existenci několika typů ghrelinových receptorů s odlišnými účinky na regulaci energetického metabolismu a vyplavování růstového hormonu. Selektivním ovlivněním pouze určité skupiny těchto receptorů by bylo možné dosáhnout velmi specifického efektu.

Biologický poločas a clearance ghrelinu a agonistů jeho receptorů vykazuje vysokou variabilitu. Pozornost by tedy měla být věnována i farmakodynamice a farmakokinetice těchto látek.

Stále je nutné dořešit otázku vlivu opakovaného, kontinuálního a pulsatilního podání ghrelinu a agonistů jeho receptorů na energetickou rovnováhu v organismu.

Také je třeba posoudit do jaké míry je možno výše uvedená fakta zjištěná na zvířecích modelech aplikovat do humánní medicíny. I přesto, že GHS jsou v klinických studiích používány řadu let, nikdy nebyl pozorován jejich adipogenní efekt. V některých ze studií byl popsán vznik inzulínové resistence vyvolaný používáním GHRP-6. K popisovaným vedlejším účinkům patří pocity hladu, které se objevují až u 80 % probandů.

1.3.2.8. Závěr

Zjednodušeně řečeno, ghrelin je „hormon hladu", který zajišťuje dostatek kalorií pro působení růstového hormonu. Řadí se do rozrůstající se skupiny orexigenních peptidů, které se podílejí na regulaci příjmu potravy a nutričního stavu organismu (Bronský a spol. 2003a, 2004). Na základě analýzy výsledků zvířecích experimentů, ale i důkladného studia genové exprese ghrelinu u lidských jedinců za fyziologických i patologických okolností, lze vytyčit možné oblasti využití ghrelinu a jeho analog ve farmakoterapii závažných poruch nutričního stavu, růstu a vývoje organismu.

1.3.3. Adiponektin

1.3.3.1.Úvod

Adiponektin je predominantní sekretorický protein tukové tkáně (Scherer a spol. 1995). Strukturálně je příbuzný skupině cytokinových molekul a proto je v literatuře někdy označován jako adipocytokin nebo adipokin. Také je možno se setkat s řadou synonym, jako

např. ACRP-30 (adipocyte compliment related protein-30kDa), apM-1 (adipose tissue most abundant gene transcript-1), GBP28 (gelatin-binding protein of 28 kDa), nebo Adipo-Q (Hu a spol. 1996). Adiponektin tvoří asi 0,01% celkové sérové bílkoviny. Jeho molekula se skládá z 247 aminokyselinových zbytků, N-terminální doména je podobná kolagenu typu VIII a C-terminální globulární doména vykazuje strukturální podobnost s C1q faktorem komplementu. Adiponektin má v krevním řečišti tendenci tvořit homotrimery a oligomerní struktury vyššího řádu díky interakcím mezi oblastmi podobnými kolagenu. V séru je možno detekovat i samostatný C-terminální fragment. Adiponektinový gen má označení AMP1 a je umístěn na lokusu 3q27. Toto místo je dle vědeckých výzkumů zodpovědné za náchylnost k diabetu mellitu II. typu (DM II. typu) a metabolickému syndromu (Filippi a spol. 2004).

1.3.3.2.Receptory pro adiponektin

Doposud bylo identifikováno několik adiponektinových receptorů (Yamauchi a spol. 2003). Základními dvěma typy jsou AdipoR1 a AdipoR2, které mají 7 transmembránových domén, ale jsou strukturálně, topologicky i funkčně odlišné od receptorů sdružených s G-proteinem (GPCR). Jejich N terminální doména je intracelulární a C terminální doména extracelulární (narozdíl od GPCR). AdipoR1 se vyskytuje ubikvitně, ale převážně je umístěn na povrchu buněk kosterní svaloviny. Jeho gen je umístěn na lokusu 1p36. AdipoR2 je predominantně exprimován v jaterní tkáni a gen je lokalizován na 12p13. cDNA kódující AdipoR1 a AdipoR2 byly izolovány v roce 2003. Dalším známým typem receptoru je tzv. T-cadherin, který váže hexamerní a vysokomolekulární formy adiponektinu.

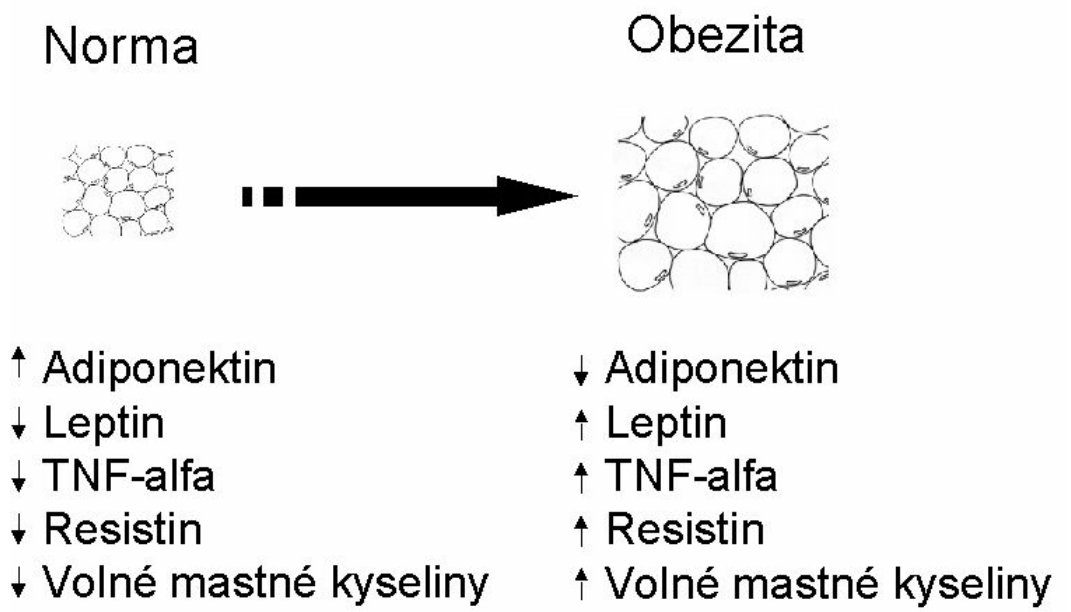
AdipoR1 a AdipoR2 způsobují zvýšení aktivity ligandů AMPK, PPAR-alpha a p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase, MAPK14). Zvyšují oxidaci mastných kyselin ve tkáních a vychytávání glukózy z krevního řečiště. AdipoR1 a AdipoR2 jsou fylogeneticky vysoce konzervované, lidský AdipoR2 je z 95,2% identický s myším proteinem. AdipoR1 a AdipoR2 sdílí vysokou strukturální homologii (u myší 66,7% identity). Adiponektin vykazuje pouze nevýrazný efekt na produkci cAMP, cGMP a hladiny intracelulárního kalcia. AdipoR1 je vysoce afinitní receptor pro globulární doménu adiponektinu, ale nízkoafinitní pro celou molekulu adiponektinu, AdipoR2 vykazuje střední afinitu pro obě formy.

1.3.3.3.Regulace sekrece adiponektinu

Produkce adiponektinu v bílé tukové tkáni vzrůstá během diferenciace adipocytů. Hypertrofie adipocytů vyvolaná stravou s vysokým obsahem tuků způsobuje naopak snížení produkce a sekrece všech hormonů zvyšujících inzulínovou senzitivitu (včetně adiponektinu) a zvýšení hormonů přispívajících k inzulínové rezistenci (obr. 8) (Kershaw a spol. 2004). Snížení syntézy a sekrece adiponektinu způsobuje zvýšený kalorický příjem zvláště za podmínek leptinové deficience či rezistence. Jeho produkce a sekrece je také stimulována IGF-1. Thiazolidindiony (antidiabetika zvyšující inzulínovou sensitivitu – agonisté receptoru aktivovaného peroxisomovým proliferátorem - PPAR gamma) stimulují expresi adiponektinového genu a zvyšují hladiny adiponektinu u obézních myší a u obézních pacientů s inzulínovou rezistencí (obr. 9) (Lihn a spol. 2005, Moore a spol. 2001).

1.3.3.4.Funkce adiponektinu v organismu

Na základě předchozích studií bylo prokázáno, že adiponektin zajišťuje homeostázu glukózy a lipidů, působí proti řadě rizikových faktorů spojených s obezitou a zvyšuje inzulínovou senzitivitu. Při endoteliálním postižení se akumuluje ve stěně cév, moduluje endoteliální odpověď na zánět tím, že inhibuje fagocytózu monocytomakrofágových buněk a brání uvolnění adhezivních molekul indukované působením TNF-alfa.



Obrázek 8: Exprese produktů tukové tkáně u neobézních a obézních jedinců

Legenda: TNF-alfa – tumor nekrotizující faktor alfa

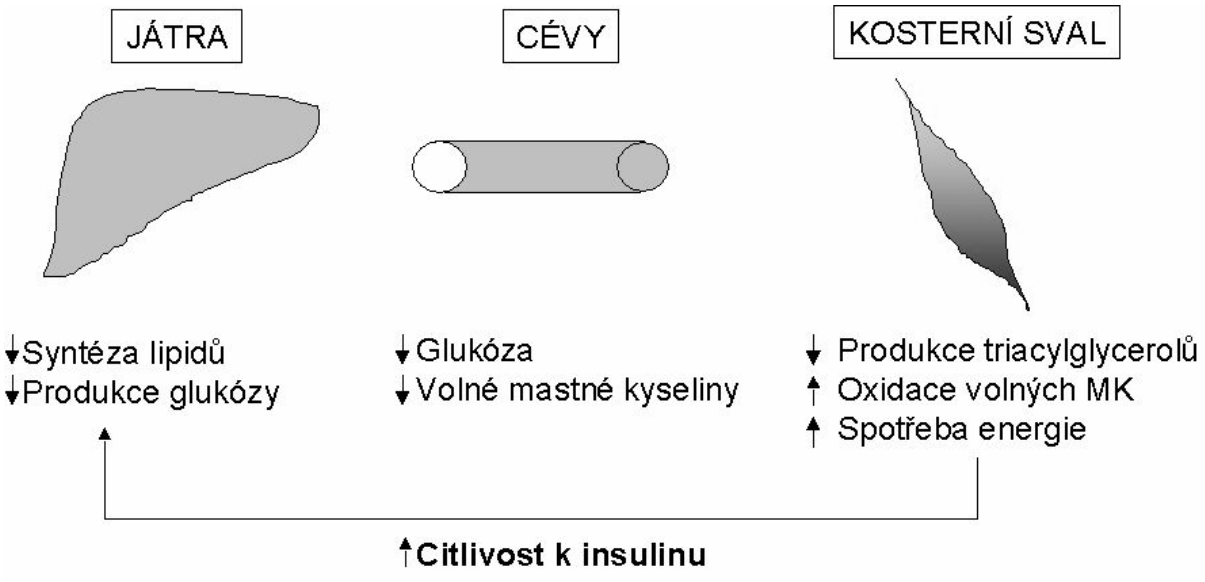
Obrázek 9: Faktory ovlivňující produkci adiponektinu

Legenda: IGF-1 – inzulínu podobný růstový faktor 1, TNF-alfa – tumor nekrotizující faktor alfa

1.3.3.4.1. Vliv na metabolismus glukózy a lipidů

Aplikace adiponektinu neobézním diabetickým myším vede ke snížení koncentrace glukózy, které je nezávislé na inzulínu. Adiponektin pravděpodobně reguluje produkci či aktivitu molekul účastnících se metabolismu triacylglycerolů (CD36, acyl CoA oxidáza, 5´-aktivovaná proteinkináza, PPAR-gamma). Tím indukuje oxidaci mastných kyselin. Intracelulární obsah lipidů ve svalovině stanovený pomocí spektroskopie magnetickou resonancí negativně koreluje s koncentracemi adiponektinu v séru.

Snížení produkce PPAR-gamma chrání před rozvojem obezity a DM II.typu (Berger a spol. 2005, Maeda a spol. 2001). Zvýšené koncentrace adiponektinu jsou asociovány se sníženým rizikem DM II. typu (Hug a spol. 2002). Adiponektin snižuje syntézu lipidů a produkci glukózy v játrech a způsobuje snížení koncentrace glukózy a volných mastných kyselin v krvi. Ve svalovině snižuje produkci triacylglycerolů a zvyšuje oxidaci mastných kyselin. Adiponektin také zvyšuje citlivost hepatocytů k inzulínu. Doposud není objasněno, zda je tento efekt přímý nebo nepřímý - prostřednictvím snížení koncentrace cirkulujících lipidů účinkem na svalovou tkáň (obr. 10) (Matsuzawa a spol. 2004).



Obrázek 10: Účinky adiponektinu v jednotlivých orgánech

Legenda: MK – mastné kyseliny

1.3.3.4.2. Adiponektin a ateroskleróza

Adiponektin má antiaterogenní, antifibrotický a protizánětlivý efekt, obzvláště v endoteliálních a monocyto-makrofágových buňkách (Ouchi a spol. 1999, Yokota a spol. 2000). U pacientů s ICHS jsou snížené koncentrace sérového adiponektinu - ty jsou také asociovány s některými rizikovými faktory kardiovaskulárních onemocnění jako je mužské pohlaví, hypertenze, obezita, DM II. typu (Fortuno a spol. 2003). U myší deficientních v genu pro adiponektin dochází k výraznějšímu ztluštění intimy poškozených arterií. Tomuto jevu lze předejít aplikací adiponektinu. Adiponektin in vitro brání produkci adhezivních molekul v endoteliálních buňkách a potlačuje adhezi monocytů. Adiponektin také negativně reguluje růst myelomonocytárních progenitorových buněk a snižuje produkci TNF-alfa v buňkách monocyto-makrofágového systému a v pěnových buňkách. Adiponektin oslabuje biologické účinky TNF-alfa a všeobecně potlačuje jeho sekreci. V experimentálních modelech hraje adiponektin protektivní roli vaskulárního poškození a v časných fázích aterosklerotických procesů (Chen a spol. 2005, Lindsay a spol. 2005).

1.3.3.5.Adiponektin, TNF-alfa a kortizol

TNF-alfa je cytokin, který má v organismu obdobné účinky jako kortizol. TNF-alfa iniciuje katabolismus ve většině tkání a byl definitivně identifikován jako faktor způsobující úbytek tělesného tuku. TNF-alfa ovšem také snižuje energetický výdej. Je prokázáno, že snižuje aktivitu uncoupling proteinů UCP1 a UCP2 a tím redukuje množství spotřebovaných kalorií a snižuje termogenní aktivitu. To je alespoň částečně způsobeno jeho katabolickým efektem na tkáně bohaté na UCP1 a UCP2. PPAR-gamma působí negativně na produkci TNF-alfa.

TNF-alfa má velmi úzký vztah ke kortizolu. Zvyšuje množství dostupného kortisolu v buňkách. Když jsou glukokortikoidy secernovány, jsou obvykle neaktivní. Potřebují ke své aktivaci dehydrogenázy. Je prokázáno, že enzymy patřící do skupiny 11-beta HSD (hydroxysteroid dehydrogenázy) modulují kortizon k tvorbě aktivního kortizolu. TNF-alfa zvyšuje intracelulární aktivitu některých 11-beta HSD enzymů. Tímto způsobem je zprostředkován jeho proteolytický a apoptotický efekt.

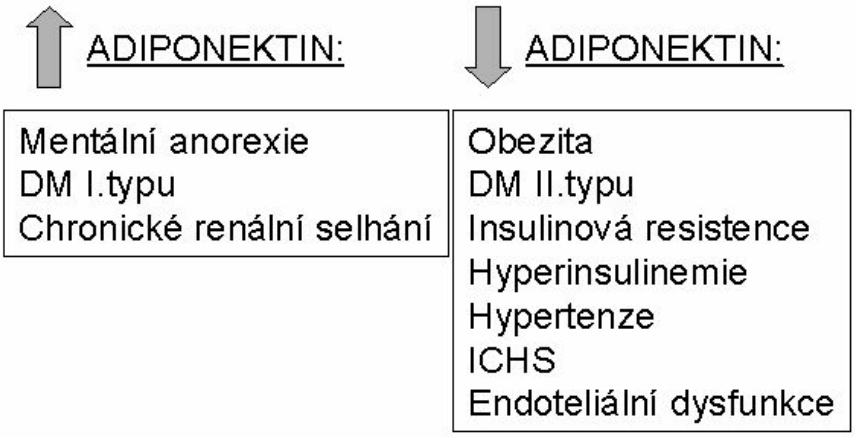
Zdá se, že ztráta tělesného tuku navozená působením noradrenalinu chrání proti apoptotickému efektu TNF-alfa. TNF-alfa reprezentuje odlišný způsob redukce tělesného tuku nezávislý na hormon-senzitivní lipáze, který vede k trvalé destrukci tukových buněk. To by mohlo být prospěšné pro extrémně obézní jedince, ale převažující negativní účinky TNF-alfa na svalovou tkáň brání jeho využití v redukční terapii obezity. TNF-alfa má účinky jak pozitivní (zvýšené odbourávání tuku), tak negativní (zvýšené odbourávání svalstva).

TNF-alfa je produkován bílou tukovou tkání. Jeho koncentrace jsou výrazně zvýšené u obézních jedinců. Přispívá ke zvýšení inzulínové rezistence tím, že interferuje se signalizační kaskádou inzulínového receptoru. TNF-alfa také potlačuje produkci adiponektinu v tukové tkáni. Tento negativní efekt je inhibován thiazolidindiony. Naopak, adiponektin oslabuje biologické účinky TNF-alfa a potlačuje jeho sekreci (Bruun a spol. 2003).

1.3.3.6.Adiponektin v séru

Sérové koncentrace adiponektinu jsou zvýšené u konstitučně štíhlých jedinců a nízké u obézních (Arita a spol. 1999). Inzulínová rezistence je u pacientek s mentální anorexií signifikantně snížená a u obézních pacientů zvýšená. Při normalizaci tělesné hmotnosti se sérové koncentrace adiponektinu vracejí do referenčního rozmezí i navzdory malým změnám

body mass indexu (BMI) (Yang a spol. 2001). Abnormální příjem potravy a potravní chování u pacientů s poruchou příjmu potravy může vést ke změnám hladin cirkulujícího adiponektinu (Delporte a spol. 2003). U lidí byla prokázána negativní korelace mezi hladinami adiponektinu a BMI, procentem tělesného tuku, koncentracemi inzulínu na lačno a hladinou triacylglycerolů v plasmě. Byla nalezena pozitivní korelace s HDL chlesterolem (Kazumi a spol. 2004). Chirurgická léčba morbidní obezity žaludeční bandáží vede ke zvýšení hladin adiponektinu v séru u diabetiků i nediabetických pacientů (Holdstock a spol. 2003). Sérové koncentrace adiponektinu jsou snížené u pacientů s poruchou glukózové tolerance a DM II. typu a negativně korelují s hladinami plazmatické glukózy měřenými ve 2.hodině orálního glukózového tolerančního testu (Hotta a spol. 2000, Weyer a spol. 2001) (obr. 11).



Obrázek 11: Změny hladin adiponektinu u jednotlivých patologických stavů
Legenda: DM – diabetes mellitus, ICHS – ischemická choroba srdeční

1.3.3.7.Analytické aspekty

Pro stanovování adiponektinu jsou v současné době k dispozici kompetitivní radioimunoassay (RIA) a sandwichové enzymové imunosorbentní (ELISA) metody. V roce 2004 publikoval Suominen a spol. práci, v níž hodnotil parametry různých biochemických metod pro stanovování adiponektinu (Suominen a spol. 2004). Srovnával metodu ELISA a RIA u l59 pacientů ve věkovém rozmezí 18-65 let. Adiponektin stanovoval v séru získaném z venózní krve odebrané ráno nalačno. Došel k závěru, že obě tyto metody jsou vhodnými kandidáty pro zavedení do klinické praxe pro jejich vysokou linearitu a uspokojivou dobu trvání měření (cca 4 hodiny). Obě metody mají nízké koeficienty analytické variability pohybující se okolo 5 % jak ve srovnání v rámci jedné procedury (intraassay), tak mezi

různými soupravami téhož výrobce (interassay). Analytický detekční limit je 0,28 ug/ml. Ve srovnání obou metod byly analytické parametry ELISA metody příznivější než u metody RIA.

Dále se Suominen zabýval i stabilitou vzorků séra ke stanovení adiponektinu. Vstupní hodnota referenčního séra před zamražením byla 15,7 ug/ml. Po 8 rozmrazovacích cyklech se koncentrace pohybovaly na hodnotách okolo 16,3 $\pm$ 0,8 (SD) ug/ml. Vypočtený koeficient variability činil 4,9 %. Lze tedy říci, že stabilita adiponektinu v séru je velmi dobrá i po několikanásobném opakovaném zamražení biologického materiálu.

1.3.3.8.Klinický význam

Na základě experimentálních prací můžeme předpokládat, že adiponektin bude do budoucna vhodným kandidátem pro vývoj léků ovlivňujících obezitu a DM II. typu. Cirkulující hladiny adiponektinu se zdají být vhodným biomarkerem pro sledování inzulínové senzitivity ve spektru pacientů se zvýšenou inzulínovou rezistencí, jako např. diabetici II. typu, pacienti s obezitou či metabolickým syndromem "X" a během terapeutické intervence u těchto stavů (Matsuzawa a spol. 1999). Aplikace adiponektinu, rekombinantního adiponektinu, nebo léků stimulujících sekreci nebo působení adiponektinu může v budoucnu vést ke zlepšení inzulínové senzitivity a glukózové tolerance a k nápravě hyperglykémie asociované s obezitou. Vliv thiazolidindionů na sekreci adiponektinu může alespoň z části vysvětlit hypoglykemizující účinek těchto léků u pacientů s DM II. typu. Z analytického hlediska je imunochemická metoda stanovování adiponektinu vhodná k zavedení do rutinního provozu. Adiponektin je biomarkerem spojujícím jednotlivé složky metabolického syndromu a může v klinické praxi nalézt široké využití.

1.3.4. Amylin

1.3.4.1.Úvod

Amylin (IAPP - islet amyloid polypeptide) je polypeptidový hormon složený z 37 aminokyselinových zbytků. Poprvé byl izolován v roce 1987 z pankreatu diabetiků II. typu (Cooper a spol. 1987). Jeho sekvence je ve 44% shodná s CGRP peptidem (calcitonin gene - related peptide), a ve 20% s kalcitoninem a adrenomedulinem (Wimalawansa 1997). Gen pro amylin se nachází na chromozomálním lokusu 12p12.3 – p12.1.

Prekurzorem amylinu je propeptid proIAPP, který je složen ze 67 aminokyselinových zbytků. Z něj vzniká proteolýzou na C a N konci zralý peptid. Proteolýza proIAPP v pankreatických beta-buňkách nastává současně se štěpením proinzulínu a je zprostředkována prohormon konvertázami typu 2 a 3 (Higham a spol. 2000). Amylin je tvořen spolu s inzulínem v beta-buňkách pankreatu a je spolu s ním vylučován do cirkulace. Amylin a amylinová mRNA byly prokázány také v plicní tkáni, endokrinních buňkách žaludku a střeva, v řadě struktur CNS včetně hypothalamu a v řadě tumorů - inzulínom, gastrinom, karcinoid, osteoblastom (Guidobono 1998).

Amylin patří do skupiny tzv. autocytotoxických proteinů. Za určitých okolností může být toxický pro pankreatické beta-buňky, stejně jako např. prionový fragment (PrP) nebo beta-amyloid (AβP) pro neurony. Mechanismem toxicity je interakce s iontovými kanály vedoucí k instabilitě buněčné membrány a k vzestupu intracelulární koncentrace ionizovaného kalcia (Kourie a Shorthouse 2000). Podle jiných studií se na cytotoxickém efektu amylinu podílí oxidativní stres (Schubert a spol. 1995).

Denní profil plazmatických hladin amylinu je u zdravých lidí podobný dennímu profilu inzulínu. Clearance amylinu z organismu je pomalejší než clearance inzulínu a proto není vzájemný poměr plazmatických hladin těchto dvou hormonů konstantní (Clodi a spol. 1998).

Receptory pro amylin nebyly doposud plně charakterizovány. Amylin působí jako agonista na receptorech pro CGRP, kalcitonin a adrenomedulin, které jsou vázány na G-protein a působí prostřednictvím zvýšení koncentrace cAMP. V ledvinách působí amylin vasodilataci prostřednictvím CGRP1 receptoru (Guidobono 1998; Chin a spol. 1994).
Na degradaci amylinu se podílí enzym IDE (inzulín-degrading enzyme, insulysin, inzulináza; 110 kDa), který se nachází v cytosolu a v peroxizómech mnoha buněčných typů. Tato thiol-metaloendopeptidáza je zodpovědná především za degradaci inzulínu, ke kterému má nejvyšší afinitu, ale také glukagonu, atriálního natriuretického peptidu a dalších substrátů, které vzájemně kompetují o vazebná místa na IDE (Kurochkin 2001). Během stárnutí lidského organismu dochází postupně k paralelnímu snižování sekrece amylinu a inzulínu (Dechenes 1998).

1.3.4.2.Experimentální poznatky a klinické důsledky

Amylin v experimentu potlačuje sekreci glukagonu, zpomaluje vyprazdňování žaludku a snižuje příjem potravy a žaludeční sekreci. Dále působí na příčně pruhované svalstvo a kostní tkáň, jeho receptory jsou přítomny v distálních tubulech ledvin.

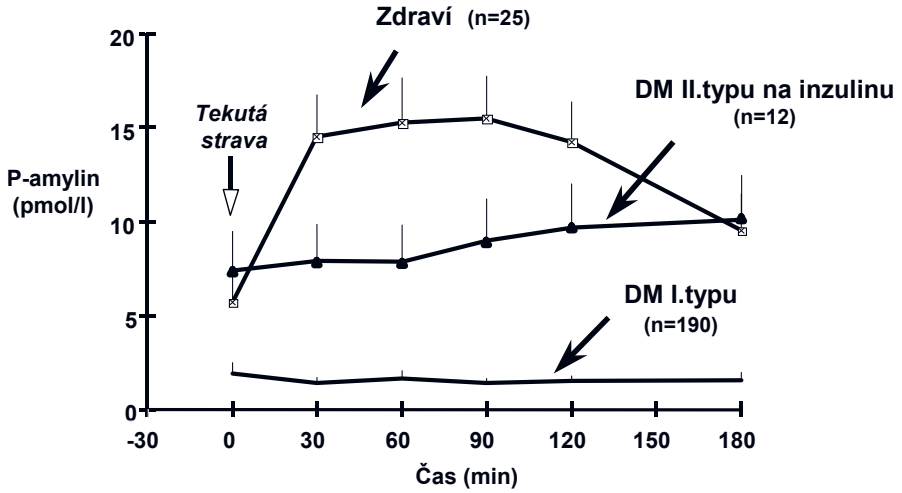
1.3.4.2.1. Vztah amylinu, inzulínu a glukagonu

Glukagon produkovaný pankreatickými alfa-buňkami brání vzniku vážných hypoglykemických stavů tím, že stimuluje glykogenolýzu v jaterní tkáni. U pacientů s DM I. a II. typu je přítomna neadekvátní hypersekrece glukagonu, která přispívá k velmi obtížné korekci postprandiální glykemie. U těchto pacientů je nemožné adekvátně potlačit uvolňování glukózy z jaterních zásob. Exogenně podaný inzulín nezvyšuje koncentraci inzulínu v portálním řečišti, kde postprandiálně přetrvává abnormálně vysoký poměr glukagon/inzulín, což vede k nadměrnému uvolňování jaterních zásob glukózy do cirkulace.

Sekrece glukagonu je ovlivněna koncentrací glukózy a inzulínu v plazmě. Glukagonostatický efekt amylinu se projevuje především za normoglykemických podmínek (Gedulin a spol. 1997). Není způsoben přímým vlivem na pankreatickou tkáň, ale je pravděpodobně zprostředkován centrálním nervovým systémem (Silvestre a spol. 2001). Inaktivace genu pro amylin vede ke změnám charakteristickým pro diabetes – zvýšení hladin glukózy, snížení hladin inzulínu a nižší tvorba inzulínové mRNA.

1.3.4.2.2. Diabetes mellitus

Jedním z nedostatků inzulínové terapie diabetu je snížená možnost ovlivnění postprandiální hyperglykemie, která se významnou měrou podílí na vzniku závažných komplikací zhoršujících kvalitu života a prognózu pacientů. Míra postprandiální koncentrace plazmatické glukózy je určena rychlostí, s níž se přijatá potrava dostává do tenkého střeva. U zdravých jedinců postprandiální vzestup koncentrace amylinu v plazmě zpomalí vyprazdňování žaludku a tím i vzestup glykemie. U pacientů s DM I. typu a v pozdní fázi DM II. typu nastává deficit amylinu a mechanismus synchronizace vzestupu glykemie s vyplaveným inzulínem je porušen (obr. 12).



Fineman et al., *Diabetologia* 1996; 39 (s1): A147

Obrázek 12: Deficit amylinu u diabetiků I. a II. typu

Rozvoj DM II. typu je spojen se vznikem charakteristických depozit amyloidových fibril tvořených amylinem nebo jeho prekurzorem a heparansulfátem v pankreatických beta-buňkách. Výskyt amyloidových depozit je spojen s vyšší frekvencí výskytu hyperglykemie (Verchere a spol. 1996).

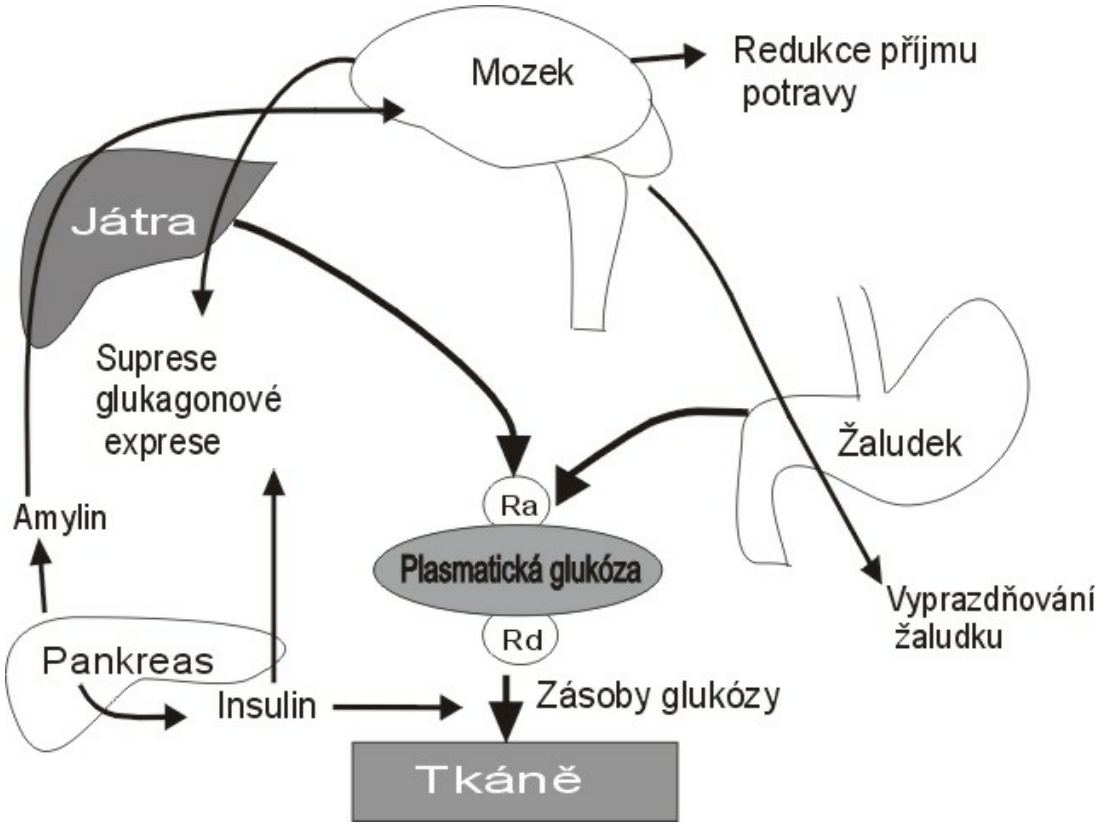
K léčbě diabetiků ve fázi inzulínové rezistence by tedy bylo vhodné použít blokátory amylinu, zatímco při nutnosti exogenní aplikace inzulínu by měl být amylin substituován, aby se snížily nevýhody inzulínové terapie (riziko hypoglykemie, postprandiální hyperglykemie).

1.3.4.2.3. Úloha amylinu v regulaci příjmu potravy

Amylin se účastní regulačních dějů v mechanismu příjmu potravy na centrální i periferní úrovni (Bronský a spol. 2002) (obr. 13). V centrálním nervovém systému působí jako neuroendokrinní hormon a prostřednictvím receptorů v *nucleus accumbens*, *dorsální raphe* a *area postrema* působí inhibičně na příjem potravy a snižuje motorickou aktivitu. V *area postrema* zvyšuje amylin koncentraci cGMP. Předpokládá se, že amylin působí anorexii prostřednictvím serotoninu, protože zvyšuje transport tyrosinu a tryptofanu do mozku a má pozitivní vliv na serotoninový metabolismus (Guidobono 1998).

Intraperitoneálně podaný amylin snižuje příjem potravy o 60 %. Tento efekt je částečně blokován antagonisty dopaminového receptoru typu 2 (Lutz a spol. 2001). Destrukce nebo blokáda periferních složek nervového systému neovlivňuje anorektický efekt amylinu (Lutz a spol. 1998). Je také možné, že amylin inhibuje působení oxidu dusnatého (NO), který způsobuje relaxaci žaludečního fundu (Guidobono 1998).

Subkutánní injekce amylinu zvyšuje příjem tekutin a jeho zvýšené postprandiální uvolňování se může podílet na mechanismu synchronizace příjmu potravy a tekutin (Riediger a spol. 1999). Opakované subkutánní podávání amylinu zvyšuje tělesnou hmotnost a množství tukové tkáně (Cornish a spol. 1998a).



Obrázek 13: Role amylinu a inzulínu v regulaci postprandiální glykemie
Legenda: Ra – rychlost vstupu glukózy do cirkulace (kontrolována amylinem), Rd – rychlost vstupu plazmatické glukózy do buněk (kontrolována inzulínem)

Periferně nebo centrálně aplikovaný amylin má výrazné inhibiční účinky na bazální žaludeční sekreci, které jsou závislé na dávce. Také inzulínem stimulovaná žaludeční sekrece je amylinem potlačena (Guidobono 1998). Amylin má protektivní vliv při rozvoji žaludečních vředů vzniklých na podkladě působení indomethacinu či alkoholu. Tento efekt se však

projevuje pouze při centrální aplikaci, což výrazně komplikuje možnost jeho terapeutického využití.

Subkutánně nebo intracerebroventrikulárně aplikovaný amylin zpomaluje v závislosti na dávce vyprazdňování žaludku a posun tráveniny ve střevě. Centrální efekt je pravděpodobně zprostředkován přes nervus vagus, periferní působení je závislé na dopaminergní transmisi (Guidobono 1998).

1.3.4.2.4. Amylin a kostní metabolismus

Amylin patří do skupiny peptidů podobných kalcitoninu. Jeho efekt na kost je dán chemickou strukturou hormonu, který se v plazmě vyskytuje v několika formách. Intaktní amylin a fragment složený z prvních osmi aminokyselinových zbytků – amylin (1 – 8) působí jako mitogen stimulující proliferaci osteoblastů (Cornish a spol. 2000). Amylin (8 – 37) a amylin deamidovaný na karboxylovém konci působí opačným způsobem. Také redukce amylinu, která vede k rozštěpení disulfidového můstku vede ke ztrátě osteogenetické aktivity (Cornish a spol. 1998b). Inhibici kostní resorpce působí pouze intaktní amylin. Amylin pravděpodobně působí na kost prostřednictvím dvou různých receptorů, z nichž jeden je umístěn na osteoblastech a druhý na osteoklastech.

Při dlouhodobém subkutánním podávání amylinu u experimentálních zvířat se ukazatelé kostní formace zvyšují o 30-100% a ukazatelé resorpce vykazují pokles přibližně o 70%. Dochází také k vzestupu objemu trabekulární kosti, ke ztluštění kortikalis a růstu kosti do délky. Tento anabolický efekt je přímo úměrný podané dávce (Cornish a spol. 2000; Cornish a spol. 1998b).

Vliv amylinu na kostní metabolismus člověka není doposud dostatečně prozkoumán a je třeba uskutečnit řadu studií ke zhodnocení využitelnosti syntetických analogů amylinu k farmakologické léčbě.

1.3.4.2.5. Vliv amylinu na kosterní sval

V kosterním svalu působí amylin zvýšení glykogenolýzy, aerobní glykolýzy, produkce laktátu, cAMP, zvýšení aktivity Na^+/K^+ ATPázy a glykogen fosforylázy. Intracelulární poměr $[Na^+]/[K^+]$ a aktivita glykogen syntázy jsou sníženy (James a spol. 1999). Amylin snižuje inzulínovou senzitivitu kosterního svalu a snižuje inzulínovou sekreci, čímž se může podílet

na vzniku a rozvoji DM II. typu. Naopak u pacientů s DM I. typu může být nedostatek amylinu zodpovědný za nadměrnou inzulínovou senzitivitu kosterního svalstva a vyšší riziko hypoglykemických stavů doprovázejících aplikaci inzulínu.

1.3.4.2.6. Ostatní funkce amylinu

Amylin značený izotopem ^{125}I se váže v experimentu na receptory v kůře ledvin asociované s distálními tubuly a juxtaglomerulárním aparátem. U krys s experimentálně vyvolanou hypertenzí byla pozorována pozitivní korelace mezi hodnotami systolického krevního tlaku a množstvím amylinu navázaného v renálním kortexu. Amylin se tedy může podílet na regulaci renálních funkcí a krevního tlaku a může hrát roli při vzniku arteriální hypertenze (Wookey a spol. 1997). V cévním řečišti působí amylin vasodilataci.

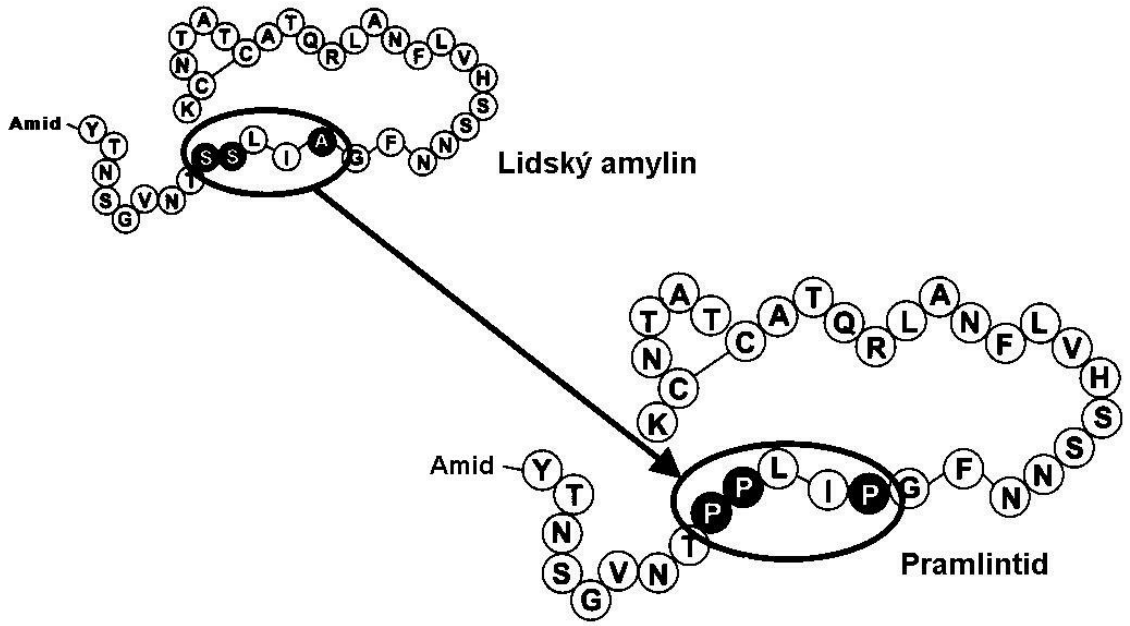
1.3.4.3.Pramlintid

Lidský amylin vykazuje řadu vlastností, které jej činí nevhodným pro klinické využití. Jedná se zejména o malou rozpustnost, nestabilitu v roztoku, velkou tendenci k agregaci a adhezi. Proto byl záměnou dvou serinových a jednoho alaninového zbytku v pozicích 25, 28 a 29 za tři prolinové zbytky (obr. 14) vyvinut syntetický analog AC137 (*pramlintid*), který nevýhody amylinu postrádá, ale zachovává si stejnou aktivitu při interakci s jeho receptorem. Pramlintid snižuje sekreci glukagonu a prodlužuje poločas vyprazdňování žaludku, ale neovlivňuje pasáž tráveniny tenkým ani tlustým střevem. Přesný mechanismus, jakým pramlintid působí na žaludek, není doposud znám. Pravděpodobně je zprostředkován přes nervus vagus (Samsom a spol. 2000).

1.3.4.4.Závěr

Amylin je peptid s řadou fyziologických funkcí. Jeho působení na sekreci glukagonu a na kosterní svalstvo moduluje působení inzulínu. Využití amylinu v kombinaci s inzulínovou terapií snižuje riziko postprandiální hyperglykemie. Amylin má anorektický efekt a zpomaluje žaludeční motilitu a sekreci. Proto může být v budoucnu využit k léčbě pacientů s poruchami příjmu potravy a funkce gastrointestinálního traktu. Intaktní amylin způsobuje proliferaci osteoblastů. Na základě experimentálních poznatků bude možné zařadit amylin nebo jeho

syntetické analogy do terapeutických schémat řady patologických stavů, jako je např. diabetes mellitus, osteoporóza nebo hypertenze (Wolffenbuttel a Graal 1996).

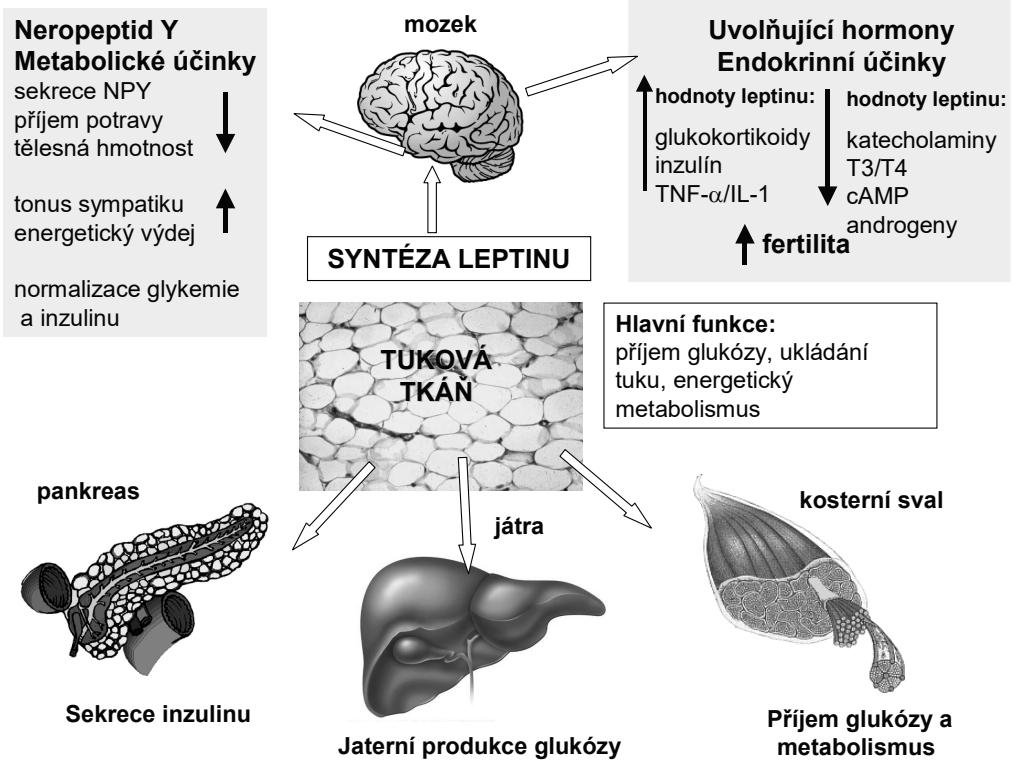


Obrázek 14: Struktura amylinu a pramlintidu

1.3.5. Leptin

Leptin je cytokin produkovaný buňkami tukové tkáně a jeho sérové hladiny vysoce významně korelují s množstvím tukové tkáně v organismu. Jeho objev byl publikován v roce 1994 (Zhang a spol. 1994), i když již v roce 1950 byla popsána genová mutace v leptinovém genu (*ob gen*) u myší, která vedla k rozvoji morbidní obezity a diabetu již v časném věku. Leptin má v organismu řadu receptorů (Tartaglia 1997). Dlouhá forma leptinového receptoru má v intacelulární doméně 303 aminokyselinových zbytků, zatímco krátká forma jen 34. Extracelulární domény obou typů receptorů jsou shodné. Mutace v genu pro leptinový receptor (*db gen*) vede také ke vzniku obezity. Krátká forma leptinového receptoru se vyskytuje především v buňkách choroideálního plexu a předpokládá se, že se účastní regulace transportu leptinu ze séra přes hematoencefalickou bariéru (Malik a Young, 1996). Schwartz a spol. popsal korelaci plazmatických hladin leptinu s jeho hladinami v mozkomíšním moku (Schwartz a spol. 1996). Podání rekombinantního leptinu do CNS vede ke snížení příjmu potravy a tělesné hmotnosti u leptin-deficitních myší. Periferním podáním se dosáhne obdobného efektu, ale při použití vyšších dávek (Pelleymounter a spol. 1995). Dlouhá forma

leptinového receptoru je exprimována na hypothalamických neuronech, které produkují NPY. Podání leptinu inhibuje tvorbu NPY. (Stephens a spol. 1995). Je pravděpodobné, že centrální účinky leptinu jsou do jisté míry zprostředkovány přes NPY. Tyto účinky jsou také částečně ovlivněny signály zprostředkovanými přes melanokortinový receptor typu 4 (Zemel 1998).



Obrázek 15: Účinky leptinu v organismu

Legenda: TNF-alfa – tumor nekrotizující faktor alfa, IL-1 – interleukin 1, T3 – trijodtyronin, T4 – tyroxin, cAMP – cyklický adenosin monofosfát

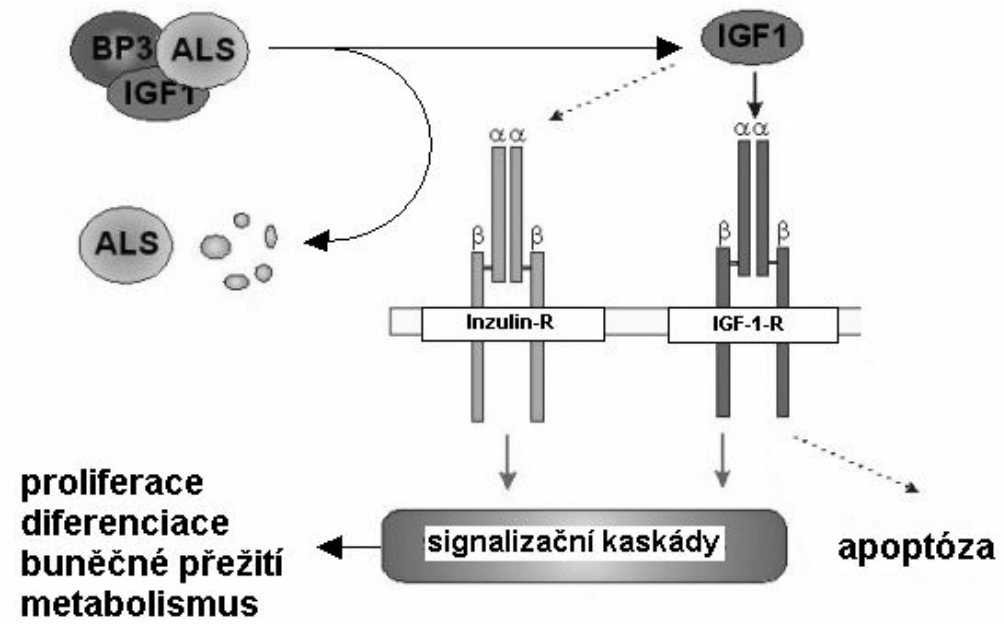
Také neurony produkující orexiny jsou spolu s leptinem zapojeny do hypothalamických regulačních okruhů příjmu potravy. Chronická intraperitoneální aplikace leptinu působí signifikantní snížení exprese preproorexinové mRNA v hypothalamu. I přesto, že hlavním místem působení leptinu je CNS, byla v nedávné době publikována práce, která popisuje rozvoj řady symptomů leptinové deficience při blokádě exprese leptinového receptoru v buňkách tukové tkáně (Huan a spol. 2003). Leptin je hlavním signálem adipocytů, který zprostředkuje centrálnímu nervovému systému informaci o množství tukové tkáně v organismu a následně inhibuje příjem potravy. Leptin má v organismu řadu dalších funkcí, z nichž nejdůležitější je pozitivní vliv na sekreci gonadotropinů (obr. 15).

1.3.6. Inzulínu podobné růstové faktory (IGF); IGF-1

IGF (inzulín-like growth factors) byly identifikovány v roce 1957 a v roce 1972 nazvány „somatomediny“ a rozděleny na bazický somatomedin C a neutrální somatomedin A. V roce 1978 Rinderknecht a Humbel izolovali z lidské plazmy dva aktivní somatomediny, které nazvali pro podobu s inzulínem IGF 1 a 2. Jedná se o velmi podobné polypeptidové molekuly s jedním řetězcem a třemi sulfidovými můstky. IGF-1 je jednořetězcový bazický peptid tvořený 70 aminokyselinovými zbytky s molekulovou hmotností 7,65 kDa a IGF 2 je lehce kyselý peptid tvořený 67 aminokyselinovými zbytky s molekulovou hmotností 7,47 kDa. Nejpodstatnější pro zprostředkování účinku růstového hormonu (GH) je IGF-1. IGF-2 pravděpodobně sehrává významnou roli především v embryonálním a časném fetálním vývoji. Homologie v sekvenci mezi IGF-1 a IGF-2 je 62% a obě tyto molekuly mají navíc i 40% homologii s proinzulínem. IGF-1 má s molekulou inzulínu společných 48% aminokyselinových zbytků v úsecích A a B, navíc má ovšem zachovaný spojovací úsek C, který se u inzulínu odštěpuje v podobě C-peptidu, a přídatný úsek D. Trojrozměrná struktura molekul inzulínu a IGF-1 je podobná, vzájemná zkřížená afinita vůči opačnému receptoru je však malá a překryv účinků je málo podstatný. Důležitým rozdílem mezi IGF-1 a inzulínem je jejich odlišný poločas v krvi. Zatímco inzulín má poločas 4 minuty a jeho sekrece je pulsatilní, reaguje tedy na akutní změny metabolické situace, poločas IGF-1 je přibližně 15 hodin. To znamená, že reguluje metabolismus v dlouhodobějším horizontu. Delší poločas je zajištěn vazbou na plazmatické vazebné proteiny. Stanovení hladiny celkového IGF-1 z jednoho krevního odběru podává validní a reprodukovatelnou informaci o jeho sekreci.

Existují dva typy receptorů – pro IGF-1 a 2. Hlavním zdrojem cirkulujícího IGF jsou játra, geny pro IGF jsou ale lokalizovány ve většině tkání. Lokální - autokrinní a parakrinní - působení IGF je považováno za důležitý moment v regulaci růstu a diferenciace tkání. Z tohoto důvodu je třeba při interpretaci poznatků o IGF vždy důsledně diferencovat mezi cirkulujícími hladinami IGF a jeho tkáňovými hladinami. IGF-1 se podílí na řízení sekrece GH negativní zpětnou vazbou. Supresní efekt IGF-1 na sekreci GH je zprostředkován především na úrovni hypofýzy, méně zřejmě na úrovni hypothalamu, kde bylo prokázáno, že snižuje produkci a sekreci GH-releasing hormonu (GHRH) a zvyšuje produkci a sekreci somatostatinu (SMS). Tento mechanismus představuje tzv. dlouhou zpětnou vazbu. Za krátkou zpětnou vazbu je považován útlum sekrece GH po podání exogenního GH, který je zprostředkován především na hypothalamické úrovni poklesem SMS.

IGF-I ovlivňuje aktivitu většiny buněk organismu (obr. 16). Stimuluje buněčnou proliferaci a diferenciaci, zvyšuje proteosyntézu a ovlivňuje řadu specifických funkcí jednotlivých tkání, např. tvorbu steroidních hormonů v pohlavních žlázách, syntézu glykosaminoglykanů v buňkách chrupavky či aktivitu NK-buněk (subpopulace T-lymfocytů, natural killers). IGF-1 obecně stimuluje ty buněčné funkce, které jsou spojeny s výstavbou organismu. Přináší signál, že organismus disponuje dostatkem energie a živin. Začne-li organismus trpět proteoenergetickou malnutricí nebo je ohrožen infekcí či jiným zánětem, hladina IGF-1 klesá. Za takové situace dospělý organismus katabolizuje, kachektizuje, dítě přestává růst. Ustává proteoanabolismus, klesá růstová aktivita a organismus šetří zbytky dostupné energie pro základní životní funkce.



Obrázek 16: Působení IGF-1 v organismu

Legenda: IGF-1 – inzulínu podobný růstový faktor 1, BP3 – vazebný protein pro IGF typu 3, ALS - acid labile subunit, Inzulín-R – receptor pro inzulín, IGF-1-R – receptor pro IGF-1

IGF-1 je secernován jednak endokrinně aktivními hepatocyty, jednak parakrinně a autokrinně v řadě jednotlivých tkání. Parakrinní a autokrinní sekrece umožňuje dosahovat v místě produkce vysokých koncentrací IGF-1, které by pro organismus jako celek byly nevýhodné. Mezi tkáně s významnou lokální produkcí IGF-1 patří epifyzární růstová chrupavka, kde IGF-1 stimuluje proliferaci a diferenciaci chondroblastů a osteoblastů, a tím určující měrou přispívá k longitudinálnímu růstu kostí.

Sekreci IGF-1 ovlivňují srovnatelnou měrou tři faktory: růstový hormon, výživa, cytokiny. Důkazem přímého vlivu GH na sekreci IGF-1 je tzv. „psychosociální nanismus“ u dobře živených dětí z dětských domovů. Růst se upravuje po úspěšné adopci deprivovaného dítěte. Chronická proteoenergetická malnutrice suprimuje hladiny IGF-1. Nízké hladiny IGF-1 byly nalezeny u dětí s celiakií, u pacientek s mentální anorexií a u dětí s cystickou fibrózou. Také aktivace imunitního systému při různých formách zánětu vede k supresi hladin IGF-1. To bylo prokázáno u pacientů v septickém stavu, při systémových onemocněních či malignitách, ale i po polytraumatu či vážném operačním zákroku. Signálem k supresi hladiny IGF-1 jsou velmi pravděpodobně cytokiny, zvláště interleukin-6. Dále je sekrece IGF-1 modulována i dalšími působky, zelména pohlavními hormony, inzulínem, kortizolem a hormony štítné žlázy. O IGF-1 se v poslední době často uvažuje jako o působku důležitém v onkogenezi. IGF-1 zvyšuje proliferaci buněk a současně působí antiapoptoticky. Nejčastěji citovanými typy nádorů jsou v této souvislosti karcinom prsu, karcinom prostaty a bronchogenní karcinom (Jenšovský 2000).

1.3.7. IGF vázající proteiny (IGFBP); IGFBP-3

Jak v cirkulaci, tak i v tkáních jsou IGF vázány na specifické bílkoviny (IGFBP-inzulín-like growth factor binding proteins), řetězce skládající se z 200 – 300 aminokyselinových zbytků. Dosud bylo identifikováno celkem šest IGFBP a intenzivně se zkoumá skupina „superfamily IGFBPrp“ (IGFBP related peptides), kterých je zatím známo deset a které patří mezi tzv. mozaikové proteiny. IGFBP váží za normálních okolností naprostou většinu IGF-I a jen okolo 1% zůstává ve formě volné. Nejvíce IGF-1 je vázáno na IGFBP-1-3. Podle různých autorů 75-95% veškerého IGF-1 nebo 2 cirkuluje v podobě terciálního komplexu (molekulová hmotnost 150 kDa), který se skládá z IGF-1 nebo IGF-2, IGFBP-3 a tzv. ALS (acid labile subunit, molekulová hmotnost 85 kDa). Tento komplex není schopen opustit cévní řečiště a vazba IGF v této podobě vede k významné prolongaci plazmatického poločasu IGF, např. pro IGF-1 z 10 minut na 12-15 hodin.

Koncentrace IGFBP v séru jsou ovlivňovány jednak vlivy hormonálními a jednak vlivy nutričními. Hladiny IGFBP-3 jsou zvyšovány vyššími hladinami GH. Z tohoto důvodu někteří autoři doporučují stanovování IGFBP-3 v diagnostice deficitu GH u dětí i dospělých. Inverzním způsobem se chová IGFBP-2. Hladiny IGFBP-1 významně kolísají v průběhu dne a jsou ovlivňovány koncentrací glukózy a inzulínu.

Fyziologická role IGFBP není zatím zcela jasná. V případě interakce IGF a IGFBP nevystačíme se známým schématem hormonů „volných“ a hormonů „vázaných“ (jako např. u hormonů thyroidálních). IGFBP nepůsobí pouze zprostředkovaně prostřednictvím ovlivňování aktivity IGF. Ukazuje se, že IGFBP mají velmi důležité funkce týkající se růstu a buněčné apoptózy nezávislé na IGF. Na možnost buněčných receptorů pro IGFBP-3 bylo upozorněno poprvé v roce 1993. Dále bylo prokázáno, že IGFBP vstupují do interakce s virovými onkoproteiny a mohou se tak podílet na řízení procesu apoptózy a maligní transformace a tím brzdit progresi tumorů.

Funkce IGFBP tedy mohou spočívat:

- v omezení přístupu volného IGF k jeho receptorům,
- v prevenci IGF vyvolané hypoglykémie,
- v regulaci transportu IGF mezi intra- a extravaskulárním prostorem,
- v prolongaci poločasu IGF v cirkulaci,
- v zesílení aktivity IGF tvorbou pomalu se uvolňujícího poolu IGF,
- ve vlivu na buněčnou proliferaci a smrt prostřednictvím IGFBP receptorů.

Dalším faktorem, který je nutné do tohoto komplikovaného systému zahrnout, jsou IGFBP – proteázy. Proteolytická aktivita řídící odbourávání IGFBP se podílí na zvyšování hladin volného IGF a jeho větším přístupu k receptorům. IGFBP – proteázy mohou být kritickým místem celé řady maligních i benigních proliferačních onemocnění. První biochemicky definovanou IGFBP – proteázou byl PSA (prostatický specifický antigen). Kategorie IGFBP – proteáz zahrnují kalikreiny, katepsiny a metaloproteinázy (Jenšovský 2000).

1.3.8. Pankreatické hormony; Inzulín a C-peptid

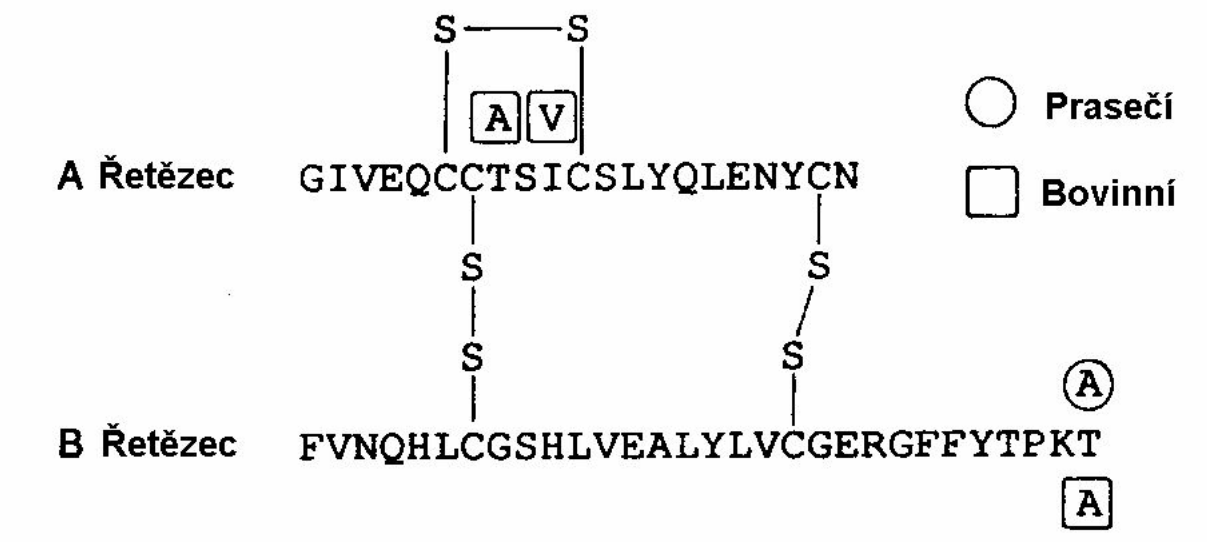
V lidském pankreatu jsou 1-2 miliony Langerhansových ostrůvků, které jsou složeny z několika typů buněk (A, B, D, F). Secernují především čtyři hormony: inzulín, glukagon, somatostatin a pankreatický polypeptid. Hormony jsou uvolňovány do portálního řečiště a hlavním místem působení inzulínu a glukagonu jsou játra. Somatostatin – nejprve zjištěný v hypothalamu jako inhibitor sekrece růstového hormonu – je v pankreatických ostrůvcích ve

vyšší koncentraci než v hypothalamu a působí jako lokální regulátor sekrece inzulínu a glukagonu. Pankreatický peptid působí na sekreci v gastrointestinálním traktu.

Inzulín je vzorovým peptidovým hormonem. Byl jako první vyčištěn, krystalován a syntetizován chemickými i molekulárně biologickými technikami. Studie jeho biosyntézy vedly k významné koncepci propeptidu. Inzulín má důležité léčebné uplatnění. 5% populace rozvinutých zemí má diabetes mellitus. V roce 1921 Banting a Best použili směs kyseliny a ethanolu a extrahovali z pankreatické tkáně ostrůvkový faktor, který měl silné hypoglykemizující působení. Gen pro lidský inzulín je umístěn na krátkém raménku chromozómu 11. Jeho syntéza v bakteriálních systémech exprese za použití technologie rekombinantní DNA poskytuje výborný zdroj tohoto hormonu pro nemocné diabetem.

Inzulín je polypeptid složený ze dvou řetězců A a B, které jsou spojeny dvěma disulfidovými můstky. Ty spojují aminokyselinové zbytky na pozicích A7 s B7 a A20 s B19. Třetí disulfidový můstek je uvnitř řetězce A a spojuje aminokyselinové zbytky A6 a A11. Umístění těchto můstků je neměnné a u většiny živočišných druhů má A řetězec 21 a B řetězec 30 aminokyselinových zbytků (obr. 17). Relativní molekulová hmotnost inzulínu je 5734. Inzulín tvoří také komplexní struktury. V pankreatických B buňkách je ve vysoké koncentraci zinek a tvoří komplexy s inzulínem a proinzulínem. Inzulín také tvoří isologní dimery, a to vodíkovými vazbami mezi peptidovými skupinami B24 a B26 zbytků obou monomerů. Při vysokých koncentracích se tyto dimery organizují v hexamery obsahující dva atomy zinku. Za fyziologických koncentrací je však inzulín pravděpodobně ve formě monomerní.

Inzulín je syntetizován jako preprohormon (Mr=11 500), z něhož odštěpením hydrofobní sekvence v endoplasmatickém retikulu vzniká molekula proinzulínu (Mr=9000), která má konformaci potřebnou pro tvorbu disulfidových můstků. Molekula proinzulínu je transportována do Golgiho aparátu, kde začíná proteolýza a ukládání do sekrečních granul. 95% proinzulínu se konvertuje na inzulín a v granulech jsou přítomna ekvimolární množství C-peptidu (obr. 18). Po příslušné stimulaci zralá granula splývají s plazmatickou membránou a uvolňují svůj obsah do extracelulární tekutiny.

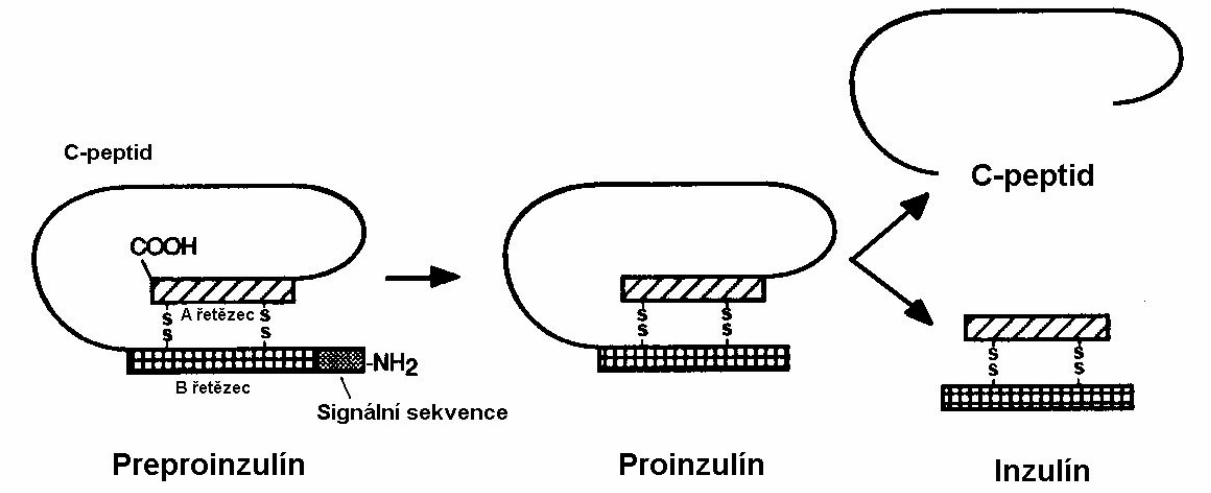


Obrázek 17: Primární struktura molekuly lidského inzulínu a aminokyselinové modifikace prasečího a bovinního inzulínu

Proinzulíny mají délku 78 až 86 aminokyselinových zbytků, přičemž v délce C-peptidové oblasti je variabilita. Proinzulín má méně než 5% biologické aktivity inzulínu a jeho biologický poločas je 17 minut. Vzhledem k tomu, že proinzulín u některých radioimunoanalýz silně zkříženě reaguje s inzulínovými antiséry, může být stanovení inzulínu v některých případech (např. u tumorů ostrůvkových buněk) nadhodnoceno.

C-peptid nemá známou biologickou aktivitu. Z antigenního hlediska je samostatnou molekulou. Proto imunoanalýza C-peptidu může odlišit inzulín endogenně secernovaný od inzulínu exogenního. Také přispívá ke kvantitativnímu stanovení inzulínové sekrece, když přítomnost protilátek proti inzulínu znemožňuje přímé měření. Biologický poločas C-peptidu je 30-40 minut.

Při sekreci inzulínu se účastní řada mediátorů. Nejvýznamnějším fyziologickým podnětem pro sekreci inzulínu je zvýšení koncentrace glukózy v plazmě. Alfa-adrenergní agonisté, zejména adrenalin, inhibují sekreci inzulínu, naopak beta-adrenergní agonisté ji stimulují. Sekrece inzulínu se také zvyšuje po chronickém působení nadměrných hladin GH, kortizolu, placentárního laktogenu, estrogenů a gestagenů. Sekreci inzulínu také stimuluje řada farmak. Nejčastěji se v terapii u lidí používá sulfonylureových sloučenin.



Obrázek 18: Syntéza inzulínu v buňce

Inzulínový receptor je glykoprotein s tyrozinkinázovou aktivitou. Je to heterotetramer složený ze dvou podjednotek označovaných alfa a beta. V konfiguracfi alfa2-beta2 jsou podjednotky spojeny disulfidovými vazbami. Obě podjednotky jsou silně glykosylovány. Alfa-podjednotka (Mr=135 000) je uložena extracelulárně a váže inzulín pravděpodobně svou doménou bohatou na cystin. Beta-podjednotka (Mr=95 000) je transmembránový protein, který zprostředkovává přenos signálu. Cytoplazmatická část beta-podjednotky má tyrozinkinázovou aktivitu a jedno autofosforylační místo. Inzulínový receptor se trvale syntetizuje a degraduje. Jeho poločas je 7 - 12 hodin. Gen receptoru pro lidský inzulín je na chromozómu 19.

Na rozdíl od IGF nemá inzulín plazmatický vazebný protein, proto je jeho poločas za normálních podmínek pouze 4 minuty. Hlavními orgány metabolismu inzulínu jsou játra, ledviny a placenta. Mezi účinky inzulínu patří hypoglykemizující efekt daný zvýšením vychytávání plazmatické glukózy jednotlivými tkáněmi. Dále inzulín stimuluje lipogenezi v tukové tkáni a inhibuje glukoneogenezu a lipolýzu v játrech. Inzulín má také vliv na metabolismus proteinů - stimuluje vychytávání neutrálních aminokyselin ve svalech. Tento účinek je dlouhodobý a je patrně zprostředkován na úrovni translace mRNA. Inzulín také stimuluje proliferaci řady buněčných kultur (Granner 1993).

2. METODY

2.1. Soubory pacientů

Orexin A, ghrelin a adiponektin byly měřeny u obézních dětí před 5 týdenní redukcí tělesné hmotnosti a po ní v lázeňském zařízení (Léčebna Dr.Filipa v Poděbradech) a u pacientek s mentální anorexií před 8 týdenní psychiatrickou léčbou a realimentací a po ní v rámci hospitalizace na Klinice dětské psychiatrie UK 2.LF a FN Motol, Praha. Orexin A byl také měřen u dětských pacientů s Crohnovou nemocí a s celiakální sprue vyšetřených v rámci gastroenterologického oddělení při Pediatrické klinice UK 2.LF a FN Motol, Praha a u zdravých kontrol získaných z ambulance dětské ORL kliniky UK 2.LF a FN Motol, Praha. Amylin byl stanoven u pacientů s osteoporózou a u kontrolní skupiny pacientů sledovaných v rámci odborné ambulance při Ústavu klinické biochemie a patobiochemie UK 2.LF a FN Motol, Praha. Kontrolní skupina pacientů s diabetem II.typu byla vybrána ve spolupráci s diabetologickou ambulancí Interní kliniky UK 2.LF a FN Motol, Praha.

2.1.1. Soubor obézních pacientů

Do studie bylo zařazeno 58 obézních dětí (33 dívek a 25 chlapců). Do studie jsme zařadili pacienty s poměrem tělesné hmotnosti k výšce nad 97. percentilem vzhledem ke standardům pro českou dětskou populaci založeným na 5. celonárodním antropologickém výzkumu dětí a mládeže 1991 realizovaném Státním zdravotním ústavem v Praze (Lhotská a spol. 1993). Percentilové grafy jsou uvedeny v příloze č.1. Průměrný věk pacientů byl 13,6 $\pm$ 0,5 (průměr $\pm$ SEM) let (rozpětí 7,8 – 18,1) u dívek a 12,4 $\pm$ 0,6 let (7,0 – 18,5) u chlapců. Průměrná tělesná výška byla 160,0 $\pm$ 2,0 cm (134,6 – 177,6) u dívek a 157,2 $\pm$ 3,1 cm (126,8 –178,7) u chlapců. Tělesná hmotnost a BMI včetně SD skóre (SDS) jsou uvedeny v tabulce 3.

Redukce tělesné hmotnosti byla dosažena během 5 týdnů kombinací sníženého příjmu stravy (vyvážená nízkokalorická dieta v rozmezí 1200 kcal - 1700 kcal denně v závislosti na věku) a zvýšeného energetického výdeje (alespoň 180 minut denně běh, plavání, míčové hry, aerobik). Ke snížení tělesné hmotnosti nebyly používány žádné léky.

Ke stanovení sledovaných analytů jsme odebrali 10 ml venózní krve nalačno mezi 7. a 9. hodinou ranní z kubitální vény do 2 zkumavek (5 ml do zkumavky obsahující K3-EDTA a inhibitor proteáz Aprotinin (antilysin, Spofa) v množství 100 ul (0,6 TIU)/1 ml krve; 5 ml

srážlivé krve do standardních sérových zkumavek (S-Monovette, Sarstedt)). Vzorky byly od každého z pacientů odebrány v den přijetí do lázeňského zařízení a po 5 týdnech programu redukce tělesné hmotnosti. Zkumavky byly následně transportovány na ledové tříšti a centrifugovány (2000 x g, 15 min. při 4° C). Separovaná plazma a sérum byly skladovány při – 80° C do doby zpracování. Zároveň s odběrem vzorků bylo provedeno antropologické vyšetření pacientů.

2.1.2. Soubor pacientek s mentální anorexií

Do studie bylo zařazeno 36 dívek s diagnózou mentální anorexie (10 premenarcheálních a 26 postmenarcheálních). Do studie jsme zařadili pacientky s BMI pod 18,5. Průměrný věk ve skupině premenarcheálních dívek byl 13,9 ± 0,4 let (rozpětí 12,6 – 16,6) a u postmenarcheálních 15,4 ± 0,3 let (13,5 – 18,8). Průměrná tělesná výška byla 158,2 ± 2,7 cm (148,5 – 176) u premenarcheálních dívek a 166,0 ± 1,3 cm (156,5 – 182,2) u postmenarcheálních. Tělesná hmotnost a BMI včetně SD skóre jsou uvedeny v tabulce 3.

Zvýšení tělesné hmotnosti bylo dosaženo během 8 týdnů kombinací přísného stravovacího režimu se zvýšeným dohledem nad jídlem a psychiatrické léčby (psychodynamická terapie, kognitivní psychoterapie, skupinová psychoterapie, rodinná terapie, ergoterapie, arteterapie, muzikoterapie). Během hospitalizace nebyly pacientkám podávány žádné léky zvyšující příjem potravy.

Vzorky ke stanovení jednotlivých analytů byly získávány a zpracovávány stejným způsobem jako u obézních pacientů (viz. kapitola 2.1.1.). Interval mezi dvěma odběry vzorků krve byl 8 týdnů. Zároveň s odběrem vzorků bylo provedeno antropologické vyšetření pacientek.

průměr ± SEM	Hm. před (kg)	(SDS)	Hm. po (kg)	(SDS)	BMI před (kg/m2)	(SDS)	BMI po (kg/m2)	(SDS)
Obezita	74,2 ± 2,8	(+ 3,55)	67,4 ± 2,6	(+ 2,62)	28,8 ± 0,6	(+ 3,94)	26,1 ± 0,6	(+ 2,92)
- Dívky	74,2 ± 3,0	(+ 3,46)	67,8 ± 2,8	(+ 2,66)	28,6 ± 0,6	(+ 3,69)	26,1 ± 0,6	(+ 2,81)
- Chlapci	74,2 ± 5,2	(+ 3,55)	66,8 ± 4,9	(+ 2,55)	29,1 ± 1,1	(+ 4,28)	26,1 ± 1,1	(+ 3,08)
Mentální anorexie	42,4 ± 1,0	(- 1,47)	48,6 ± 1,0	(- 0,66)	15,8 ± 0,3	(- 1,71)	18,0 ± 0,2	(- 0,85)
- Premenarcheální	38,6 ± 1,5	(-1,46)	44,1 ± 1,6	(- 0,92)	15,4 ± 0,5	(- 1,54)	17,5 ± 0,4	(- 0,81)
- Postmenarcheální	43,9 ± 1,1	(- 1,47)	50,3 ± 1,1	(- 0,56)	15,9 ± 0,33	(- 1,77)	18,2 ± 0,2	(- 0,86)

Tabulka 3: Základní antropometrické údaje pacientů s obezitou a mentální anorexií před terapeutickou intervencí a po ní

Legenda: Hm. – hmotnost, BMI – body mass index, SDS – SD skóre

2.1.3. Soubor pacientů s Crohnovou nemocí

Do studie byli zařazeni dětští a adolescentní pacienti s nově diagnostikovanou Crohnovou nemocí. Pro stanovení diagnózy byla používána následující kritéria: klinická – bolesti břicha, průjmy, zvracení, krev ve stolici; biochemická – zvýšené zánětlivé parametry, hypergamaglobulinemie, pozitivita sérových protilátek proti *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA); radiodiagnostická – typický nález na enteroklýze; endoskopická –nález zánětlivě změněné sliznice při endoskopickém vyšetření a histologická – nález lymfoplasmocytárního zánětu a/nebo granulomů v bioptických vzorcích střevní sliznice. Pacienti nejevili známky poruch cyklu spánku a bdění a v předchorobí nebyli léčeni žádnou protizánětlivou terapií, ani jinými léky, které by mohly ovlivnit chuť k jídlu a příjem potravy. Do studie bylo zařazeno celkem 23 pacientů (15 chlapců a 8 dívek). Průměrný věk, tělesná výška, tělesná hmotnost a BMI včetně SD skóre jsou uvedeny v tabulce 4. Odběr krve byl proveden ráno nalačno a vzorky ke stanovení orexinu A byly získávány a zpracovávány stejným způsobem jak bylo popsáno u obézních pacientů (viz. kapitola 2.1.1.). Zároveň s odběrem vzorků bylo provedeno antropologické vyšetření pacientů.

2.1.4. Soubor pacientů s celiakální sprue

Do studie byli zařazeni dětští a adolescentní pacienti s nově diagnostikovanou celiakální sprue. Diagnóza byla stanovena na základě klinických příznaků (neprospívání, poruchy růstu, gastrointestinální symptomatologie), pozitivity sérových protilátek proti endomysiu (EMA) a tkáňové transglutamináze (anti-tTG) a histologického nálezu atrofické střevní sliznice z enterobioptického vzorku proximálního jejuna. Pacienti nejevili známky poruch cyklu spánku a bdění a nebyli v předchorobí léčeni bezlepkovou dietou. Do studie bylo zařazeno celkem 18 pacientů (9 chlapců a 9 dívek). Průměrný věk, tělesná výška, tělesná hmotnost a BMI včetně SD skóre jsou uvedeny v tabulce 4. Odběr krve byl proveden ráno nalačno a vzorky ke stanovení orexinu A byly získávány a zpracovávány stejným způsobem jak bylo popsáno u obézních pacientů (viz. kapitola 2.1.1.). Zároveň s odběrem vzorků bylo provedeno antropologické vyšetření pacientů.

průměr ± SEM	Věk (r)	TV (m)	(SDS)	THM (kg)	(SDS)	BMI (kg/m2)	(SDS)
Crohnova nemoc	14,8 ± 0,5	1,56 ± 0,03	(- 0,92)	47,0 ± 3,1	(- 1,04)	18,0 ± 0,7	(- 0,72)
Celiakální sprue	10,6 ± 1,0	1,36 ± 0,06	(- 1,04)	33,6 ± 4,1	(- 0,79)	16,8 ± 0,7	(- 0,49)
Kontrolní skupina	12,8 ± 0,6	1,55 ± 0,03	(- 0,09)	46,1 ± 2,4	(0,00)	18,7 ± 0,5	(- 0,03)

Tabulka 4: Základní antropometrické údaje pacientů s Crohnovou nemocí, celiakální sprue a kontrolní skupiny
Legenda: TV – tělesná výška, THM – tělesná hmotnost, BMI – body mass index, SDS – SD skóre

2.1.5. Soubor pacientů s osteoporózou

Do studie bylo zařazeno 28 patientů (3 muži a 25 postmenopauzálních žen) s průměrným věkem 65 let; rozmezí 42 – 82 let) s diagnózou osteoporózy (OP). Pacienti byli zařazeni na základě klinických kritérií (bolest v axiálním skeletu a/nebo v kyčelních kloubech), které byly přítomny u 28 pacientů, nebo dříve radiologicky prokázaných fraktur (kyčelního kloubu, žeber nebo kompresivních fraktur obratlů) – přítomno u 11 pacientů. Diagnóza byla také nepřímo podpořena biochemickými kritérii (změny sérových hladin kalcia, alkalické fosfatázy a osteokalcinu) jako markery kostní remodelace. U všech pacientů jsme provedli vyšetření DEXA (dual-energy X-ray absorptiometry) v úrovni mezi 2. a 4. lumbálním obratlem a v úrovni levého kyčelního kloubu. Jako průkaz osteoporózy byla považována kostní densita méně než - 2,5 standardní odchylky (SD) vzhledem k věku pacienta (T-skóre < -2,5). Pacienti s osteoporózou nevykazovali žádné známky poruchy funkce pankreatických beta-buněk: u těchto pacientů byly jak hladiny plazmatické glukosy nalačno, tak hladiny C-peptidu v referenčních mezích.

Vzorky ke stanovení jednotlivých analytů byly získávány a zpracovávány stejným způsobem jako u obézních pacientů (viz. kapitola 2.1.1.). Odběr byl proveden jednorázově ráno nalačno v rámci pravidelné ambulantní kontroly.

2.1.6. Kontrolní skupiny

Ke studii, ve které jsme stanovovali hladiny orexinu A u pacientů s Crohnovou nemocí a s celiakální sprue byla pro porovnání vybrána kontrolní skupina dětských pacientů z ambulantní složky Kliniky ušní, nosní a krční UK 2.LF a FN Motol, Praha, kteří přicházeli k předoperačnímu vyšetření v rámci přípravy na plánované drobné chirurgické zákroky

v oblasti hlavy a krku. Pacienti neměli žádné známky poruch příjmu potravy, jejich nutriční stav byl v normálním rozmezí vzhledem k věku a tělesné výšce. Pacienti dále nejevili známky poruch cyklu spánku a bdění ani zánětlivého onemocnění. Do studie bylo zařazeno celkem 28 pacientů (14 chlapců a 14 dívek). Průměrný věk, tělesná výška, tělesná hmotnost a BMI včetně SD skóre jsou uvedeny v tabulce 4. Odběr krve byl proveden ráno nalačno a vzorky ke stanovení orexinu A byly získávány a zpracovávány stejným způsobem jak bylo popsáno u obézních pacientů (viz. kapitola 2.1.1.). Zároveň s odběrem vzorků bylo provedeno antropologické vyšetření pacientů.

Ke studii, ve které jsme stanovovali hladiny amylinu u pacientů s osteoporózou byly pro porovnání vybrány 2 kontrolní skupiny pacientů. Kontrolní skupina pacientů sledovaných pro mírnou dyslipidemii v metabolické ambulanci Ústavu klinické biochemie a jako negativní kontrola skupina pacientů s pozdním stadiem diabetu II. typu, u kterých jsme na základě literárních údajů předpokládali snížené plazmatické hladiny amylinu.

Do studie bylo zahrnuto 10 pacientů s pozdním stadiem DM II. typu (5 mužů, 5 žen; průměrný věk 64 let; rozmezí 53 – 79 let). Jako marker snížené funkce beta buněk byly použity sérové hladiny C-peptidu, které se pohybovaly na dolní hranici referenčního rozmezí (300 pmol/l).

Jako kontrolní skupinu jsme vybrali 24 pacientů (11 mužů, 13 žen; průměrný věk 53 let; rozmezí 35 – 73 let), kteří jsou dlouhodobě sledováni pro mírnou kompensovanou sekundární dyslipidemii v metabolické ambulanci (CG). Všichni tito pacienti byli léčeni výhradně dietními opatřeními a pohybovým režimem tak, aby bylo dosaženo poklesu sérových hladin cholesterolu a triacylglycerolů do referenčního rozmezí.

Na základě předchozího dlouhodobého ambulantního sledování pacientů, detailní analýzy údajů ze zdravotnické dokumentace a jejich fyzikálního vyšetření jsme neshledali žádné anamnestické ani klinické známky osteoporózy (bolesti, fraktury) ani v jedné z kontrolních skupin. Ani opakované vyšetření biochemických parametrů kostní remodelace neprokázalo jejich hodnoty mimo referenční meze.

Pacienti s dyslipidemií nevykazovali žádné známky poruchy funkce pankreatických beta-buněk. U těchto pacientů byly jak hladiny plazmatické glukosy nalačno, tak hladiny C-peptidu v referenčních mezích.

Vzorky ke stanovení jednotlivých analytů byly získávány a zpracovávány stejným způsobem jako u obézních pacientů (viz. kapitola 2.1.1.). Odběr byl proveden jednorázově ráno nalačno v rámci pravidelné ambulantní kontroly.

2.2. Laboratorní metody

2.2.1. Stanovení orexinu A

Pro stanovení plazmatických hladin orexinu A jsme vyvinuli metodu kombinující extrakční proceduru pro izolaci orexinu A z plazmy s následným stanovením koncentrace pomocí radioimunoanalýzy (RIA). Orexin A byl stanovován z plazmy. Odběr a zpracování vzorku bylo provedeno přesně dle instrukcí ke kitu pro měření plazmatických hladin orexinu A RIA metodou (Phoenix Pharmaceuticals, Mountain View, CA, USA). Odběr krve byl prováděn na základě informovaného souhlasu pacienta, u osob mladších 18 let se souhlasem jejich zákonného zástupce. Vzor formuláře informovaného souhlasu je uveden v příloze č. 2. Odběr a zpracování vzorků je zmíněno v předchozí části metodiky.

Jeden RIA kit je určen pro stanovení 125 vzorků. Měření jsme prováděli v dubletu. Před vlastním stanovením jsme provedli extrakci orexinu A z plazmy metodou acidifikace plasmy 1% trifluorooctovou kyselinou (HPLC grade, TFA), centrifugace (6000-17000xg, 20 min, 4°C), promytí plazmy v koloně (SEP-COLUMN obsahující 200 mg C18 (Code RK-SEPCOL-1, Diagnostics inc., Lake Forest, CA, USA)) 60% acetonitrilem (HPLC grade) v 1% trifluorooctové kyselině a evaporace v centrifugovém koncentrátoru (MAXI dry plus, Heto, Melsungen, Germany). Následovalo rozpuštění v pufru pro radioimmunoassay. Použitá radioimunoanalýza je založena na principu kompetitivní vazby a využívá polyklonálních králičích protilátek proti humánnímu orexinu A a kozích protilátek proti králičím imunoglobulinům k oddělení navázané a volné frakce. Jako standard je používán lidský orexin A. Inkubace s primární protilátkou a značeným tracerem probíhala při 4°C po dobu 24 hodin. Následná inkubace se sekundární protilátkou probíhala při pokojové teplotě po dobu 90 minut. Množství radioaktivity v každém vzorku bylo vyhodnoceno gama počítačem a vyjádřeno jako počet impulsů za minutu (cpm). Referenční křivka byla odvozena od sériového ředění standardů (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 a 128 pg/ml). Z referenční křivky byla na základě cpm odečtena výsledná koncentrace peptidu ve vzorku a přepočtena dle předchozího ředění na 1 ml plazmy. Intra-analytický a inter-analytický variační koeficient je 5,2% a 14,2 %. Nejnižší detekovatelná koncentrace je 1 pg/ml. Metoda nemá zkříženou reaktivitu s fragmentem 16-33 lidského orexinu A, s orexinem B, amidem agouti-related proteinu (83-132), neuropeptidem Y, alfa-MSH ani lidským leptinem.

2.2.2. Stanovení ghrelinu

Pro stanovení plazmatických hladin celkového ghrelinu byla použita metoda kompetitivní radioimunoanalýzy. Ghrelin byl stanovován z plazmy. Odběr a zpracování vzorku bylo provedeno přesně dle instrukcí ke kitu pro měření plazmatických hladin celkového ghrelinu RIA metodou (Phoenix Pharmaceuticals, Mountain View, CA, USA). Odběr krve byl prováděn na základě informovaného souhlasu pacienta, u osob mladších 18 let se souhlasem jejich zákonného zástupce. Odběr a zpracování vzorků je zmíněno v předchozí části metodiky.

Jeden RIA kit je určen pro stanovení 125 vzorků. Ke stanovení se používá 100 ul plazmy od každého pacienta. Měření jsme prováděli v dubletu. Použitá radioimunoanalýza je založena na principu kompetitivní vazby a využívá polyklonálních králičích protilátek proti humánnímu celkovému ghrelinu a kozích protilátek proti králičím imunoglobulinům k oddělení navázané a volné frakce. Jako standard je používán lidský ghrelin.

Inkubace s primární protilátkou a značeným tracerem probíhala při 4°C po dobu 24 hodin. Následná inkubace se sekundární protilátkou probíhala při pokojové teplotě po dobu 90 minut. Množství radioaktivity v každém vzorku bylo vyhodnoceno gama počítačem a vyjádřeno jako cpm. Referenční křivka byla odvozena od sériového ředění standardů (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 a 128 pg/ml). Z referenční křivky byla na základě cpm odečtena výsledná koncentrace peptidu ve vzorku a přepočtena dle předchozího ředění na 1 ml plazmy. Intra-analytický a inter-analytický variační koeficient je 7,4 % a 13,5 %. Nejnižší detekovatelná koncentrace je 10 pg/ml. Metoda nemá zkříženou reaktivitu s fragmentem 1-14 lidského ghrelinu, se sekretinem, vasoaktivním intestinálním peptidem, galaninem, neuropeptidem Y ani orexinem A a B.

2.2.3. Stanovení adiponektinu

Pro stanovení sérových hladin adiponektinu byla použita metoda enzymové imunoanalýzy. Adiponektin byl stanovován ze séra. Odběr a zpracování vzorku bylo provedeno přesně dle instrukcí ke kitu pro měření sérových hladin adiponektinu ELISA metodou (Linco Research, Inc., St.Charles, Missouri, USA). Odběr krve byl prováděn na základě informovaného souhlasu pacienta, u osob mladších 18 let se souhlasem jejich zákonného zástupce. Odběr a zpracování vzorků je zmíněno v předchozí části metodiky.

Jeden ELISA kit je určen pro stanovení 96 vzorků. Ke stanovení se používá 10 ul séra od každého pacienta, které je před stanovením naředěno v poměru 1:500. Měření jsme prováděli v dubletu. Použitá sandwichová enzymová imunoanalýza využívá primárních monoklonálních protilátek proti humánnímu adiponektinu a sekundárních biotinem značených myších monoklonálních protilátek proti humánnímu adiponektinu. Na biotin imobilizovaného komplexu se váže křenová peroxidáza konjugovaná se streptavidinem. Reakce substrátu (3, 3´, 5, 5´-tetrametylbenzidin) s křenovou peroxidázou vede ke zvýšení absorbance měřené spektrofotometricky při 450 – 590 nm. Jako standard je používán rekombinantní lidský adiponektin o koncentraci 200 ng/ml. Ke kontrole kvality je použito ředěné lidské sérum o dvou různých koncentracích adiponektinu (očekávané rozmezí je 3,5 – 7,2 ng/ml a 17,3 – 35,9 ng/ml).

Po přidání sekundární protilátky probíhala inkubace po dobu 2 hodin, následně po přidání křenové peroxidázy po dobu 30 minut a po přidání substrátu po dobu 10 minut – ve všech třech případech při pokojové teplotě. Referenční křivka byla odvozena od sériového ředění standardů (1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 a 100 ng/ml). Z referenční křivky byla na základě absorbance odečtena koncentrace peptidu ve vzorku v ng/ml a vynásobena 500 dle předchozího ředění k získání výsledné koncentrace v ug/ml séra. Intra-analytický a inter-analytický variační koeficient je 3,5% a 6,5 %. Nejnižší detekovatelná koncentrace je 0,5 ug/ml séra. Metoda nemá zkříženou reaktivitu s lidským amylinem, C-peptidem, GLP-1, inzulínem, leptinem, resistinem, ani lidskými cytokiny IL 1-beta, 2, 4-8, 10, 12, 13, IFN-gama, TNF-alfa ani GM-CSF.

2.2.4. Stanovení amylinu

Měřili jsme plazmatické hladiny celkového amylinu a neredukovaného amylinu nalačno. Ke stanovení jsme použili sendvičovou enzymovou imunoanalýzu s fluorescenční detekcí využívající monoklonální protilátky (Linco Research, Inc., St.Charles, Missouri, USA). Metodika byla poprvé popsána v roce 1996 (Percy a spol. 1996). Měření probíhala v dubletu s využitím 50 µl vzorku v každé reakci.

U metody stanovující celkový amylin se primární protilátka váže na epitop v blízkosti střední části peptidu a detekuje redukovaný amylin a amylinovou kyselinu (deamidovaný amylin), ale nikoliv amylinový fragment 1-20. Detekční protilátka se váže k redukovanému nebo neredukovanému amylinu, ale ne k amylinové kyselině. S využitím této eseje můžeme

detekovat jak redukovaný tak neredukovaný amylin složený ze všech 37 aminokyselin s amidovaným C-koncem peptidu. Percy a spol. popsal, že tato metoda může také detekovat amylinu podobné peptidy (amylin-like peptides). Intraanalytický variační koeficient je 2,5 % a interanalytický 10 %.

U metody stanovující neredukovaný amylin se primární protilátka váže na intaktní disulfidový můstek mezi pozicemi 2 a 7 a rozpoznává celkový amylin, amylinovou kyselinu (deamidovaný amylin), amylinový fragment 1-20, ale nikoliv redukovaný amylin. Detekční protilátka se váže na redukovaný nebo neredukovaný amylin, ale ne na amylinovou kyselinu. S využitím této eseje můžeme detekovat pouze neredukovaný amylin složený ze všech 37 aminokyselin s amidovaným C-koncem. Intraanalytický variační koeficient je 2,2 % a interanalytický 5,9 %.

Detekční protilátka v obou metodách je konjugována se streptavidin-alkalickou fosfatázou. Substrátem je 4-methylumbelliferyl fosfát (MUP) a fluorescenční signál snímaný při 355 nm a 460 nm je proporcionální k množství amylinu přítomného ve vzorku. Nejnižší detekovatelná koncentrace amylinu je v obou esejích 1 pmol/l. Zkřížená reaktivita s lidským glukagonem, GLP-1, inzulínem, pankreatickým polypeptidem, adrenomedullinem, kalcitoninem a CGRP je v obou esejích méně než 1%. Není známa analytická interference s plazmatickými proteiny, glukózou či triacylglyceroly.

Základní charakteristiky laboratorních metod použitých ke stanovení regulačních peptidů jsou uvedeny v tabulce 5.

	Metoda	Citlivost Vzorek	Linearita	CV intra	CV inter	Poznámka
S-leptin	RIA Linco	0,5 ug/l 200 ul	1-100 ug/l	3,9 %	6,2 %	stabilní při 4 st. C
P-amylin	ELISA Linco	1 pmol/l 50 ul	1-100 pmol/l	2,5 %	10 %	IF, MUP
S-adipo-nektin	ELISA Linco	0,5 mg/l 10 ul	1,5-100 mg/l	3,5 %	6,5 %	S, P stabilní
P-ghrelin	RIA Phoenix	10 ng/l 100 ul	10-2000 ng/l	7,4 %	13,5 %	labilní, led aprotinin
P-orexin	RIA Phoenix	1 ng/l 100 ul	10-2000 ng/l	5,2 %	14,2 %	extrakce aprotinin

Tabulka 5: Shrnutí základních charakteristik laboratorních metod použitých ke stanovení regulačních peptidů
Legenda: S – sérum, P – plazma, RIA – radioimunoanalýza, ELISA – enzymová imunoanalýza, CV – variační koeficient, IF – imunofluorescenční detekce, MUP – 4-methylumbelliferyl fosfát

2.2.5. Stanovení ostatních analytů

Ostatní sledované analyty (leptin, IGF-1, IGFBP-3, inzulín a C-peptid) jsou rutinně stanovovány v laboratořích Ústavu klinické biochemie a patobiochemie UK 2.LF a FN Motol, Praha dle zásad správné laboratorní práce. Tyto metody jsou certifikovány pro klinické použití ve zdravotnickém zařízení a jsou pravidelně evaluovány interním a externím systémem kontrol kvality.

2.2.5.1. Leptin

Leptin byl stanovovaný ze séra metodou RIA (výrobce Linco Research, Inc., Missouri, USA, dodavatel DRG Brno, ČR, 1 souprava pro 125 stanovení).

Princip metody:

Při reakci dochází ke kompetitivní reakci při vazbě značeného a neznačeného antigenu na protilátku. Množství ^{125}I- značeného leptinu navázaného k protilátce je nepřímo úměrné koncentraci leptinu obsaženého v pacientském séru.

Preanalytické požadavky:

K analýze se používá sérum (odběr minimálně 2 ml krve). Po přijetí vzorku do laboratoře je nutno vzorek stočit v centrifuze při 1000 g po dobu minimálně 10 minut. Vzorky se musí zpracovat do 24 hodin nebo pro delší skladování se vzorky skladují při – 20 °C. Vzorky je možno maximálně 5 x rozmrazit a znovu zamrazit. Ke stanovení je třeba 200 µl séra, spolu s mrtvým objemem při pipetování je třeba počítat alespoň s 300-500 µl séra potřebných pro analýzu.

Reagencie:

Všechny reagencie jsou stabilní při 2 – 8 °C do data exspirace soupravy.

- Assay Buffer – 20 ml, 0,05 M fosfátový pufr obsahující 0,025 M EDTA, 1 % BSA, 0,08 % azid sodný a 0,05 % Triton X-100 o pH 7,4.
- Antiserum – 13 ml, Králičí protilátka proti lidskému leptinu v Assay Buffer.
- ^{125} I-Human Leptin – lyofilizovaný, 13,5 ml. ^{125} I – značený lidský leptin, čištěný HPLC, specifická aktivita 135 µCI/µg.

- Label Hydrating Buffer - 13,5 ml, pufr obsahující králičí IgG. K naředění značeného leptinu.
- Standards – 8 standardů po 1 ml obsahujících 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10, 20, 50 a 100 μg/l čištěného rekombinantního lidského leptinu v Assay Buffer. Pro každé stanovení je nutno vytvořit v dubletech novou kalibrační křivku, která je zkontrolována přiloženými kontrolami. Výsledky vzorků jsou vypočítány interpolací z kalibrační křivky.
- Quality Controls 1 & 2 – kontrolní vzorky obsahující 2 hladiny po 2 ml čištěného rekombinantního lidského leptinu v Assay Buffer.
- Precipitating Reagent – 130 ml, srážecí činidlo (kozí protikráličí IgG a obsahující 3 % PEG a 0,05 % Triton X-100 v 0,05 M fosfátovém pufr obsahující 0,025 M EDTA, 1 % BSA, 0,08 % azid sodný). Nutné před použitím vychladit na 4 °C.

Standardizace (návaznost měření):

Návaznost měření není definována.

Analytické znaky metody:

- Pracovní rozsah - rozpětí kalibrační křivky udané výrobcem: 0.5 – 100 μg/l
- Citlivost – limit detekce, definovaný jako nejnižší koncentrace leptinu významně se lišící od nuly (s pravděpodobností 95%) je 0,5 μg/l
- Specifita – u krysího a myšího leptinu je specifita < 0,2 %, u ostatních analytů nebyla detekována.
- Linearita ředění: výsledky získané výrobcem se pohybují v rozmezí od 88 do 100 % výsledků očekávaných.
- Recovery deklarované výrobcem se pohybuje v rozmezí 103 až 105 %.

Referenční rozmezí:

Referenční rozmezí u zdravých pacientů s BMI 18 – 25 stanovené výrobcem:

Muži: 2,0 – 5,6 μg/l

Ženy: 3,7 – 11,1 μg/l

Výpočet a vyjádření výsledku:

Výsledek získaný interpolací z kalibrační křivky je vydáván na celá čísla v μg/l.

Kontrola kvality:

Kontrola se zařazuje vždy při stanovení kalibrační křivky. Používají se firemní kontroly, jejichž deklarované rozmezí je uvedeno na štítku.

2.2.5.2. IGF-1

IGF-1 byl stanovován ze séra imunoradiometrickou analýzou (IRMA) (výrobce Beckman-Coulter, Francie, dodavatel Immunotech Praha, ČR, 1 souprava pro 100 stanovení).

Princip metody:

Stanovení je založeno na sendvičové imunoradiometrická metodě. V soupravě jsou použity myší monoklonální protilátky proti dvěma různým epitopům IGF-1. Je nezbytné předem provést extrakci kyselým etanolem za účelem uvolnění IGF-1 z jeho komplexů s vazebnými proteiny. Vzorky extrahované kyselým etanolem a standardy jsou inkubovány ve zkumavkách pokrytých primární protilátkou v přítomnosti sekundární monoklonální protilátky značené pomocí ^{125}I. Po inkubaci je obsah zkumavek odsát a měří se vázaná radioaktivita. Neznámé hodnoty se určí interpolací z kalibrační křivky. Vázaná radioaktivita je přímo úměrná koncentraci IGF-1 ve vzorcích.

Preanalytické požadavky:

K analýze se používá sérum (odběr minimálně 2 ml krve). Plasma se odebírá do zkumavek obsahujících heparin nebo EDTA. Po odběru jsou vzorky dopraveny do laboratoře. Materiál musí být náležitě uložen a zabezpečen v přepravním pouzdru. Po přijetí vzorku do laboratoře je nutno vzorek stočit v centrifuze při 1000 g po dobu minimálně 10 minut. Vzorky se musí zpracovat do 24 hodin po odběru uchované dobře uzavřené při 2 – 8 °C. Pro delší skladování se vzorky skladují při – 20 °C. Po rozmražení se už nesmí znovu mrazit. Ke stanovení je třeba 25 µl séra, spolu s mrtvým objemem při pipetování je třeba počítat alespoň s 50 µl séra potřebných pro analýzu.

Reagencie:

Všechny reagencie jsou stabilní při 2 – 8 °C do data exspirace soupravy.

- IGF-1 značený ^{125}I, radioindikátor: 1 lahvička (55 ml) připravený k použití. Lahvička obsahuje ke dni výroby méně než 370 kBq ^{125}I značeného imunoglobulinu v roztoku s proteiny, azidem sodným (< 0,1%) a barvivem.
- Zkumavky potažené monoklonální protilátkou proti IGF-1 – 2x50 kusů.

  IGF-1 standardy: 5 lahviček – lyofilizáty v tlumivém roztoku obsahujícím rekombinantní IGF-1 v koncentračním rozmezí od 0 do 3000 μg/l. Standardy se neextrahují. Pro každé stanovení je nutno vytvořit v dubletech novou kalibrační křivku, která je zkontrolovaná přiloženou kontrolou. Výsledky vzorků jsou vypočítány interpolací z kalibrační křivky.
- 1 lahvička „nulového standardu“ – 2 ml. Obsahuje tlumivý roztok a je v kapalné formě.
- Promývací roztok (20 x): 1 lahvička (50 ml). Roztok musí být před použitím zředěn 950 ml destilované vody. Zředěný roztok je stabilní při 2 – 8°C do data exspirace.
- Kontrolní vzorek – 1 lahvička – lyofilizát. Kontrolní vzorek obsahuje IGF-1 v tlumivém roztoku a musí být extrahován stejným postupem jako vorky.
- Pomocné roztoky:
- Extrakční roztok, kyselý roztok etanolu – připravíme smícháním 875 ml absolutního etanolu a 125 ml 2M HCl. Takto připravený roztok může být skladován po dobu 3 měsíců ve skleněné lahvi uzavřené zátkou při teplotě 2 – 8 °C.
- Destilovaná voda.

Standardizace (návaznost měření):

Metoda IGF1 je navázána na mezinárodní referenční standard IRR/IGF-1, číslo 87/518.

Analytické znaky metody:

- Pracovní rozsah - rozpětí kalibrační křivky udané výrobcem: 0 – 3000 μg/l
- Citlivost – limit detekce, definovaný jako nejnižší koncentrace IGF-1 významně se lišící od nuly (s pravděpodobností 95%) je 12 μg/l.
- Kontrolní materiál: Firemní kontrola – rozsah očekávaných koncentrací je uveden na štítku lahvičky. Deklarovaný rozsah očekávaných koncentrací: 87 – 162 μg/l, střední hodnota 125 μg/l.

Referenční rozmezí:

Referenční rozmezí bylo stanoveno výrobcem pro různé věkové skupiny a pohlaví a je uvedeno v tabulce 6.

chlapci			dívky		
věk (r)	průměr (ng/ml)	SD (ng/ml)	věk (r)	průměr (ng/ml)	SD (ng/ml)
2	146	74	2	149	77
3	144	80	3	158	77
4	139	68	4	166	72
5	174	65	5	153	73
6	185	97	6	37	66
7	215	108	7	209	83
8	240	95	8	221	89
9	267	50	9	236	60
10	264	50	10	294	88
11	284	76	11	411	147
12	311	87	12	448	161
13	369	70	13	556	176
14	519	136	14	553	161
15	645	82	15	499	91
16	634	78	16	578	85
17	589	117	17	588	121
18	527	130	18	513	115

Tabulka 6: Referenční rozmezí pro IGF-1 dle věku a pohlaví

Výpočet a vyjádření výsledku:

Výsledek získaný interpolací z kalibrační křivky je vydáván na celá čísla v μg/l. Ke každému výsledku je dopočtena a uvedena směrodatná odchylka vypočtená ze souboru normálních pacientů vzhledem k věku a pohlaví pacienta. U dospělých pacientů, tj. nad 18 let, se směrodatná odchylka neuvádí.

Kontrola kvality:

Kontrola se zařazuje vždy při stanovení kalibrační křivky. Používá se firemní kontrola, jejíž deklarované rozmezí je uvedeno štítku. Dále se používá vnitřní kontrola tzv. pool 1 a pool 2. Tyto kontroly jsou připravovány úsekovou laborantkou smícháním pacientských sér

hodnoty okolo 40 – 70 μg/l (pool 1) a 600 -900 μg/l (pool 2). Séra jsou smíchána, odstředěna, rozalikvótována do eppendorfek a zamražena.

Externí kontrola kvality je zajištěna účastí v kontrolním cyklu systému externí kontroly kvality (SEKK) – účast v českém kontrolním cyklu Endokrinologie 2 4x ročně, analyzují se dva různé vzorky. Podle úspěšnosti v cyklu získává laboratoř Osvědčení o účasti.

2.2.5.3. IGFBP-3

IGFBP-3 je stanovovaný ze séra metodou IRMA (výrobce Diagnostic Systems Laboratories, Inc., USA, dodavatel Lacomed Praha, ČR, 1 souprava pro 100 stanovení).

Princip metody:

Stanovení je založeno na sendvičové imunoradiometrická metodě, ve které jsou analyzované vzorky měřeny v sendviči mezi dvěma protilátkami. První protilátka je navázaná na stěnu zkumavky, druhá je značena aktivitou. Analyt obsažený ve vzorku je vázán k oběma protilátkám ve formě komplexu. Nenavázané reagencie jsou odstraněny odmytím.Vázaná radioaktivita je přímo úměrná koncentraci IGFBP-3 ve vzorcích.

Preanalytické požadavky:

K analýze se používá sérum (odběr minimálně 2 ml krve). Po přijetí vzorku do laboratoře je nutno vzorek stočit v centrifuze při 1000 g po dobu minimálně 10 minut. Vzorky se musí zpracovat do 48 hodin po odběru uchované dobře uzavřené při 2 - 8 °C. Pro delší skladování se vzorky skladují při -20 °C po dobu 8 týdnů. Po rozmražení se už nesmí znovu mrazit. Ke stanovení je třeba 10 μl séra, spolu s mrtvým objemem při pipetování je třeba počítat alespoň s 50 μl séra potřebných pro analýzu.

Reagencie:

Všechny reagencie jsou stabilní při 2-8 °C do data exspirace soupravy.

- IGFBP-3 Standard/Sample diluent: 1 lahvička – 55 ml – označená A, obsahující 0 ng/ml IGFBP-3 v pufru obsahujícím BSA a azid sodný.
- IGFBP-3 Standards: 5 skleniček s lyofilizovanými standardy v pufru s BSA a azidem sodným, značených B-F, obsahující předem definované koncentrace IGFBP-3. Rekonstituovat každý standard v 1 ml deionizované vody. Po rekonstituci mohou být

standardy uchovávány při 2 – 8 °C 48 hodin, zamražené alikvóty při – 20 °C dva týdny. Standardy obsahují IGFBGP-3 v koncentračním rozmezí cca od 2,0 do 100 μg/l. Pro každé stanovení je nutno vytvořit v dubletech novou kalibrační křivku, která je zkontrolovaná přiloženou kontrolou. Výsledky vzorků jsou vypočítány interpolací z kalibrační křivky.

- Anti-IGFBP-3 (^{125}I) Reagent: 1 lahvička, žluté zbarvení, 22 ml, obsahující < 370 kBq značené kozí ^{125}I anti-IGFBP-3 v pufru s BSA a azidem sodným. Uchovávat při 2 – 8 °C do data expirace.
- Anti-IGFBP-3 – potahované zkumavky: zelené. 100 plastových zkumavek s kozí anti-IGFBP-3 polyklonálním imunoglobulinem imobilizovaným na stěnu zkumavky. Uchovávat při 2 – 30 °C do data exspirace.
- IGFBP-3 Controls: Kontrolní vzorky – 2 lahvičky – lyofilizát. Kontrolní vzorek obsahuje IGFBP-3 v pufru s BSA a azidem sodným.Rozsah očekávaných koncentrací je uveden na štítku lahvičky spolu s objemem vody, potřebným pro rozpuštění lyofilizátu. Po naředění spotřebovat do 48 hodin při 2 – 8 °C nebo déle uchovávat při -20 °C v alikvótech.

Standardizace (návaznost měření):

DSL-6600 ACTIVE® IGFBP-3 IRMA standardy a kontroly jsou navázány na rekombinantní DNA-derivovaný neglykosylovaný lidský IGFBP-3 (mol. hm. 28,75 kDa) exprimovaný v E. coli získané z Celtrix Pharmaceuticals, Inc.

Analytické znaky metody:

- Pracovní rozsah - rozpětí kalibrační křivky udané výrobcem: 2,0 – 100 μg/l
- Citlivost – limit detekce, definovaný jako nejnižší koncentrace IGFBP-3 významně se lišící od nuly (s pravděpodobností 95%) je 0,5 μg/l.
- Kontrolní materiál: Firemní kontrola – rozsah očekávaných koncentrací je uveden na štítku lahvičky. Deklarovaný rozsah očekávaných koncentrací: Nízká kontrola: 0,35 – 0,55 μg/l, střední hodnota 0,45 μg/l; vysoká kontrola: 3,3 – 5,7 μg/l; střední hodnota 4,5 μg/l

Referenční rozmezí:

Referenční rozmezí bylo stanoveno výrobcem pro různé věkové skupiny a pohlaví a je uvedeno v tabulce 7.

chlapci			dívky		
Věk (r)	průměr (mg/l)	SD (mg/l)	věk (r)	průměr (mg/l)	SD (mg/l)
2	1,720	0,740	2	2,000	0,880
3	1,850	0,800	3	2,055	0,665
4	1,980	0,600	4	2,300	0,730
5	2,215	0,965	5	2,380	0,920
6	2,345	1,155	6	2,485	1,165
7	2,770	1,410	7	2,675	1,155
8	3,160	1,230	8	2,700	1,280
9	3,200	0,830	9	2,850	1,150
10	3,095	1,025	10	3,260	1,110
11	3,270	1,620	11	4,220	1,990
12	3,800	1,360	12	4,390	2,450
13	3,875	1,245	13	5,010	2,680
14	4,620	2,420	14	4,710	2,660
15	5,170	1,990	15	4,175	1,955
16	4,900	2,190	16	4,850	1,900
17	4,550	1,820	17	4,875	1,595
18	4,755	1,795	18	4,460	1,200

Tabulka 7: Referenční rozmezí pro IGFBP-3 dle věku a pohlaví

Výpočet a vyjádření výsledku:

Výsledek získaný interpolací z kalibrační křivky je vydáván na celá čísla v mg/l. Ke každému výsledku je dopočtena a uvedena směrodatná odchylka vypočtená ze souboru normálních pacientů vzhledem k věku a pohlaví pacienta. U dospělých pacientů, tj. nad 18 let, se směrodatná odchylka neuvádí.

Kontrola kvality:

Kontrola se zařazuje vždy při stanovení kalibrační křivky. Používá se firemní kontrola, jejíž deklarované rozmezí je uvedeno na štítku.

2.2.5.4. Inzulín

Inzulín je stanovovaný ze séra chemiluminiscenční analýzou na analyzátoru Immulite 1000 (DPC).

Princip metody:

Stanovení je založeno na reakci jednoho epitopu inzulínu s monoklonální myší protilátkou navázanou na polystyrenové kuličce a druhého epitopu s polyklonální kuřecí protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou. Reakce probíhá 60 minut při 37 °C. Nenavázaný materiál se odstraní odstředivým promýváním. Přidá se substrát fosforečný ester adamantyl dioxetanu, který hydrolyzuje stykem s alkalickou fosfatázou za vzniku nestabilního meziproduktu. Ten se ihned rozpadá za produkce záření, které se detekuje luminometrem. Intenzita vzniklého záření je přímo úměrná koncentraci inzulínu ve vyšetřovaném vzorku.

Preanalytické požadavky:

Pacient k odběru musí být nalačno a nevyžaduje zvláštní přípravu k odběru. Žilní krev se odebírá do zkumavky a po odstředění se oddělí sérum. Nelze použít EDTA. Po přijetí vzorku do laboratoře je nutno vzorek stočit v centrifuze při 1000 g po dobu minimálně 10 minut. Vzorky séra je možné skladovat 7 dní při 2 - 8 °C nebo 2 měsíce při -20 °C. Rozmrazení vzorků je možné pouze jednou a to při teplotě 15 - 28 °C. Ke stanovení je třeba 100 µl séra, spolu s mrtvým objemem je třeba počítat alespoň 200 µl séra potřebných pro samostatnou analýzu.

Analyzátor:

Imunochemický chemiluminiscenční analyzátor Immulite 1000 (DPC) je samostatnou jednotkou, která zahrnuje dávkování vzorků i reagencií, inkubaci, detekci a automatické vyhodnocení výsledků. Analyzátor je určen k nepřetržitému provozu.

Reagencie:

1. Souprava: Inzulín (LKIN1 nebo LKIN5). Souprava obsahuje nádobku s reagencií (LIN2), obsahující 6,5 ml konjugátu alkalické fosfatázy s kuřecí polyklonální protilátkou proti inzulínu v pufru, sáčky s testovacími jednotkami (LIN2), obsahující polystyrenové kuličky s imobilizovanou myší monoklonální protilátkou proti inzulínu,

2 lyofilizované kalibrátory s nízkou (LINL) a vysokou (LINH) koncentrací inzulínu a 2 lyofiliované kontroly s nízkou (LINC1) a vysokou (LINC2) koncentrací inzulínu. Souprava se skladuje při 2 - 8 °C. Všechny reagencie se používají s ohledem na expiraci, která je uvedena na vnějším obalu soupravy. V případě překročení expirační doby na tuto skutečnost upozorní software analyzátoru. Kalibrátory je možné po rekonstituci skladovat 60 dnů při -20 °C. Kontroly je možné po rekonstituci skladovat 60 dnů při -20 °C.

2. Diluent: Inzulín Sample Diluent (LINZ). Diluent se používá k ředění vzorků s koncentrací vyšší než 400 mIU/l. Diluent se skladuje při 2 - 8 °C 30 dnů, nebo při -20 °C 6 měsíců.
3. Pomocné roztoky:

- Chemiluminiscenční substrát (LSUBX) - detekční roztok obsahující adamantyl dioxetan
- Wash Modul (LPWS2) – promývací roztok
- Probe cleaning kit (LKPM)- čistící roztok

Kalibrace:

Součástí soupravy je firemní kalibrační křivka a dva kalibrátory označené (LINL) "Adjustor Low" a (LINH) "Adjustor High" (dodavatel DPC Czech, výrobce DPC). Pomocí těchto kalibrátorů se provádí úprava kalibrační křivky vždy, když se změní šarže soupravy, po uplynutí 14 dnů od poslední úpravy nebo v případě, kdy výsledek analýzy kontrolního vzorku je mimo povolené meze.

Kalibrátory jsou v lyofilizované formě. Rekonstituují se přidáním přesně 4,0 ml destilované vody a ponecháním stát po dobu 30 minut za občasného opatrného promíchání krouživým pohybem. Potom se rozpipetují a zamrazí na -20 °C. Po kalibraci se provede stanovení kontrolního materiálu. (Inzulín controls-kat. č. LINC1 a LINC2)

Standardizace (návaznost měření):

Metoda Immulite Inzulín je navázána na referenční standard WHO NIBSC IRP 1 číslo 66/304.

Analytické znaky metody:

Pracovní rozsah - rozpětí kalibrační křivky udané výrobcem: 0 – 300 mU/l

Analytická citlivost: 2 mU/l

Analytické znaky metody

Kontrola	průměr	CV (%)	Bias (%)
Hladina 1	9,81 mU/l	18,8	6,6
Hladina 2	47,54 mU/l	9,1	1,1

Interference:

Hemolýza neinterferuje, vysoké koncentrace bilirubinu (více než 100 mg/dl) snižují výsledky. Cirkulující protilátky proti inzulínu u pacientů léčených zvířecími formami inzulínu interferují.

Referenční rozmezí stanovené výrobcem:

Pro obě pohlaví: 15 – 60 let: 6 – 27 mU/l

60 – 90 let: 6,6 – 36,7 mU/l

nad 90 let: 2,4 – 19 mU/l

Kritické hodnoty nejsou definovány.

Výpočet a vyjádření výsledku:

Výsledek je vydáván na 1 desetinné místo v mU/l.

Kontrola kvality:

Kontrola se provádí denně na 2 hladinách. (Kontrolní materiál Inzulín Control). Výsledky kontrol se průběžně kontrolují a zaznamenávají a dále se řídí obecnými pravidly pro vnitřní kontrolu kvality.

SEKK – účast v českém kontrolním cyklu 4x ročně, analyzují se dva různé vzorky. Na základě účasti v cyklu získává laboratoř Osvědčení o účasti.

2.2.5.5. C-peptid

C-peptid je stanovovaný ze séra chemiluminiscenční analýzou na analyzátoru Immulite 1000 (DPC).

Princip metody:

Stanovení je založeno na rovnovážné kompetitivní reakci následované chemiluminiscenční detekcí. Na polystyrenové kuličce v reagenční zkumavce je navázána králičí polyklonální protilátka proti C-peptidu. Kulička se inkubuje při 37 °C 60 minut se vzorkem a alkalickou fosfatázou značeným C-peptidem, kdy dochází ke kompetitivní reakci. Nenavázaný materiál se odstraní odstředivým promýváním. Přidá se substrát fosforečný ester adamantyl dioxetanu, který hydrolyzuje s alkalickou fosfatázou za vzniku nestabilního meziproduktu. Ten se ihned rozpadá za produkce záření, které se detekuje luminometrem. Intenzita vzniklého záření je nepřímo úměrná koncentraci C-peptidu ve vyšetřovaném vzorku.

Preanalytické požadavky:

Pacient k odběru musí být nalačno a nevyžaduje zvláštní přípravu k odběru. Žilní krev se odebírá do zkumavky a po odstředění se oddělí sérum. Po odběru je vzorek na ledu dopraven do laboratoře. Po přijetí vzorku do laboratoře je nutno vzorek stočit v centrifuze při 1000 g po dobu minimálně 10 minut. Vzorky séra je možné skladovat 3 hodiny při 2 - 8 °C nebo 2 měsíce při -20 °C. Rozmrazení vzorků je možné pouze jednou a to při teplotě 15 - 28 °C. Ke stanovení je třeba 50 µl séra, spolu s mrtvým objemem je třeba počítat alespoň 150 µl séra potřebných pro samostatnou analýzu.

Analyzátor:

Imunochemický chemiluminiscenční analyzátor Immulite 1000 (DPC) je samostatnou jednotkou, která zahrnuje dávkování vzorků i reagencií, inkubaci, detekci a automatické vyhodnocení výsledků. Analyzátor je určen k nepřetržitému provozu.

Reagencie:

1. Souprava: C-Peptide (LKPE1 nebo LKPE5). Souprava obsahuje nádobky s reagencií (LPE2), obsahující konjugát alkalické fosfatázy s C-peptidem v pufru, sáčky s reagenčními zkumavkami (LPE1), obsahujícími polystyrenové kuličky potažené polyklonální králičí protilátkou proti C-peptidu, a 2 lyofilyzované kalibrátory s nízkou (LPEL) a vysokou (LPEH) koncentrací C-peptidu. Souprava se skladuje při 2 - 8 °C. Všechny reagencie se používají s ohledem na expiraci, která je uvedena na vnějším obalu soupravy. V případě překročení expirační doby na tuto skutečnost upozorní software analyzátoru. Kalibrátory je možné po rekonstituci skladovat -20 °C až do data exspirace soupravy.

2. Diluent: C-Peptide Sample Diluent (LPEZ). Diluent se používá k ředění vzorků s koncentrací vyšší než 4.634 pmol/l. Diluent se skladuje při 2 - 8 °C 30 dnů, nebo při -20 °C až do data exspirace vyznačeného na obalu.
3. Pomocné roztoky:

- Chemiluminiscenční substrát (LSUBX) - detekční roztok obsahující adamantyl dioxetan -
- Wash Modul (LPWS2) – promývací roztok
- Probe cleaning kit (LKPM)- čistící roztok

Kalibrace:

Součástí soupravy je firemní kalibrační křivka a dva kalibrátory označené LPEL "Adjustor Low" a LPEH "Adjustor High" (dodavatel DPC Czech, výrobce DPC). Pomocí těchto kalibrátorů se provádí úprava kalibrační křivky vždy, když se změní šarže soupravy, po uplynutí 14 dnů od poslední úpravy nebo v případě, kdy výsledek analýzy kontrolního vzorku je mimo povolené meze. Kalibrátory jsou v lyofilizované formě. Rekonstituují se přidáním přesně 4,0 ml destilované vody a ponecháním stát po dobu 30 minut za občasného opatrného promíchání krouživým pohybem. Potom se rozpipetují po 0,5 ml a zamrazí na -20 °C.

Po kalibraci se provede stanovení kontrolního materiálu (Tri-level C-peptide Control module – kat. č. LPECM).

Standardizace (návaznost měření):

Metoda Immulite C-peptid je navázána na referenční standard WHO IRP 1 číslo 84/510.

Analytické znaky metody:

Pracovní rozsah - rozpětí kalibrační křivky udané výrobcem: 166 - 2317 pmol/l.

Mez stanovitelnosti: 2317 pmol/l

Mez detekce: 99 pmol/l

Analytické znaky metody

Kontrola	**průměr**	**CV (%)**	**Bias (%)**
Hladina 1	263,13 pmol/l	19,6	3
Hladina 2	942,5 pmol/l	5,8	1,7
Hladina 3	1787,7 pmol/l	7,8	1,8

Interference:

Bilirubin o koncentracích více než 100 mg/l způsobuje falešné zvýšení hodnot. Hemolýza nezpůsobuje interferenci.

Referenční rozmezí stanovené výrobcem:

180 – 930 pmol/l pro obě pohlaví a všechny věkové skupiny. Kritické hodnoty nejsou definovány.

Výpočet a vyjádření výsledku:

Výsledek je vydáván na celá čísla v pmol/l.

Kontrola kvality:

Kontrola se provádí denně na 3 hladinách. (Kontrolní materiál Tri Level C-peptide Control Module). Výsledky kontrol se průběžně kontrolují a zaznamenávají a dále se řídí obecnými pravidly pro vnitřní kontrolu kvality.

2.3. Antropometrické metody

Antropometrická měření byla provedena ihned po krevních odběrech. K hodnocení nutričního stavu sledovaných pacientů byly použity základní antropometrické parametry (tělesná výška a tělesná hmotnost). Body mass index (BMI) byl stanoven výpočtem podle vzorce: BMI = tělesná hmotnost (kg) / tělesná výška (m^2)

Vzhledem k tomu, že rozložení antropometrických parametrů v dětském a adolescentním období není lineární, byla antropometrická data statisticky posouzena také po převodu na SD skóre (SDS, standard-deviation score).

Jako referenční standard antropometrických dat pro dětskou populaci do 18 let byly použity výsledky 5. celonárodního antropologického výzkumu dětí a mládeže 1991 realizovaného Státním zdravotním ústavem v Praze (Lhotská a spol. 1993). Percentilové grafy pro chlapce i dívky jsou uvedeny v příloze 1.

2.4. Statistické metody

Statistická analýza dat byla provedena s využitím statistického software Prism 4.0 od firmy Graph Pad, Inc. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± střední chyba průměru (mean ± SEM). Pokud není uvedeno jinak, byla všechna data normálně distribuována. Korelace jsou vyjádřeny jako Pearsonův (pro normálně rozložená data) nebo Spearmanův (pro nenormálně rozlořená data) korelační koeficient. U skupin s normálním rozložením dat byly rozdíly v rámci každé ze skupin probandů posouzeny párovým t-testem, rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly porovnány nepárovým t-testem. V případě signifikantně rozdílného rozptylu mezi skupinami byla použita Welchova korekce. U skupin s nenormálním rozložením dat byl k hodnocení rozdílů v rámci skupin použit Wilcoxonův test, rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly porovnány Mann-Whitneyho testem. Ve studii amylinu u pacientů s osteoporózou byl vzhledem k nenormálnímu rozložení hladin amylinu pro porovnání dat mezi jednotlivými skupinami použit neparametrický Kruskal-Wallisův test (non-parametric one-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA)) s následným Dunnovým post testem. Ve stejné studii i ve studii pacientů s Crohnovou nemocí a s celiakií byl pro hodnocení dat s normálním rozložením použit parametrický test one-way ANOVA s následným Bonferoniho post testem. Za statisticky signifikantní byla považována hodnota p = 0,05.

3. VÝSLEDKY

3.1. **Pacienti s obezitou**

3.1.1. Antropometrická data u obézních dětí

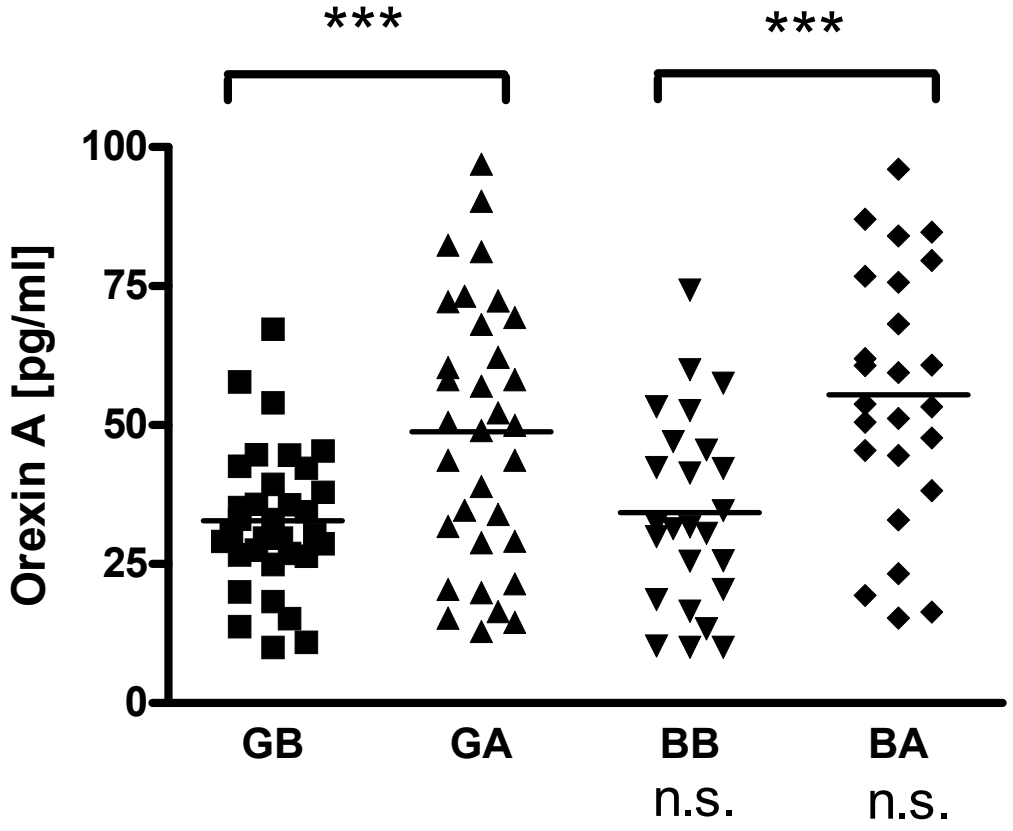
U chlapců i dívek byl srovnatelný věk (p = 0,1147, n.s.), tělesná výška (p = 0,4491, n.s.), iniciální tělesná hmotnost (p = 0,9987, n.s. –Welchova korekce) a BMI (p = 0,6736, n.s. – Welchova korekce). Jak u chlapců tak u dívek byly změny tělesné hmotnosti i BMI během redukční terapie vysoce signifikantní (p < 0,0001).

Podle změn tělesné hmotnosti jsme rozdělili pacienty do dvou skupin: Pacienti se špatnou odpovědí na redukční terapii (low-responders - LR; 23 dívek - GLR, 12 chlapců - BLR) kteří dosáhli méně než 10 % snížení iniciální tělesné hmotnosti (7,8 ± 0,38 %) a pacienti s dobrou odpovědí na redukční terapii (high-responders - HR; 10 dívek - GHR, 13 chlapců - BHR) kteří dosáhli více než 10 % snížení iniciální tělesné hmotnosti (11,8 ± 0,32 %). Rozdíl ve snížení tělesné hmotnosti mezi LR a HR skupinami byl statisticky signifikantní (p < 0,0001).

3.1.2. Orexin A u obézních jedinců

3.1.2.1. Plazmatické hladiny orexinu A

Plazmatické hladiny orexinu A u dívek před redukční terapií (girls before - GB) byly 32,8 ± 2,2 pg/ml (rozmezí 9,7 – 67,3) a po redukci tělesné hmotnosti (girls after - GA) 48,8 ± 4,1 pg/ml (12,9 – 96,9), p = 0,0003. Hladiny orexinu A u chlapců před redukční terapií (boys before - BB) byly 34,0 ± 3,5 pg/ml (4,6 – 74,3) a po redukci tělesné hmotnosti (boys after - BA) 55,5 ± 4,6 pg/ml (15,3 – 96,0), p < 0,0001 (obr. 19). Když byli hodnoceni chlapci a dívky společně, byly hladiny orexinu A 33,3 ± 2,0 pg/ml (all before - AB) a 51,7 ± 3,1 pg/ml (all after - AA), p < 0.0001. Plazmatické hladiny orexinu A u AB signifikantně korelovaly s AA (r = 0,4089; p = 0,0014).



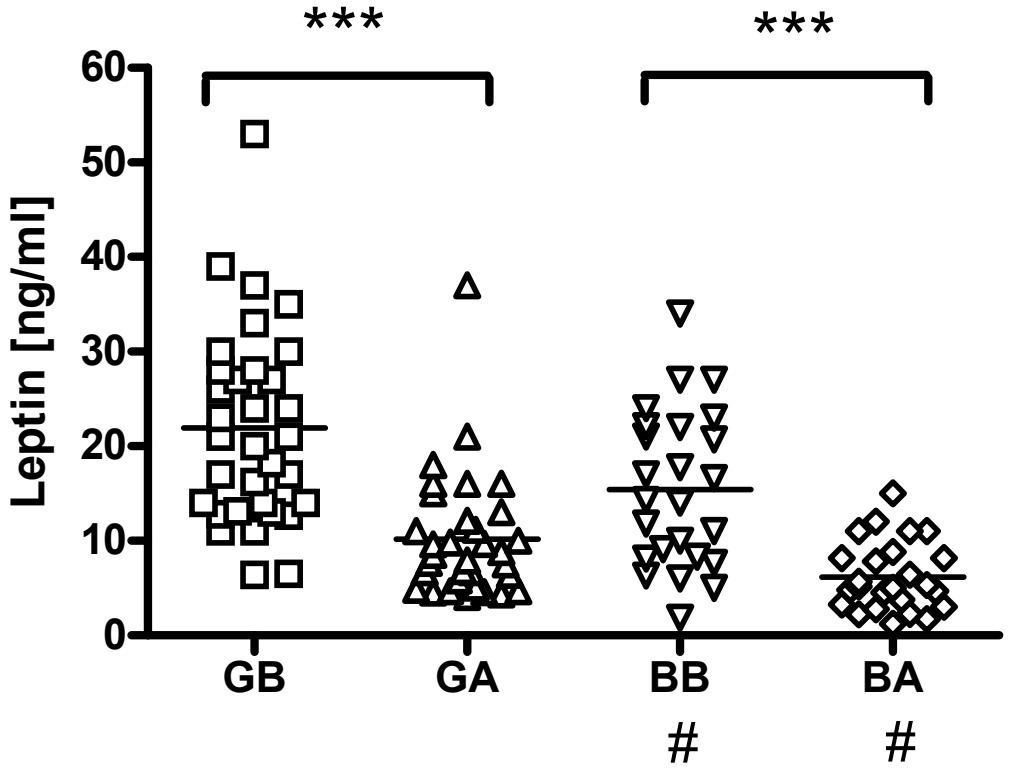
Obrázek 19: Plazmatické hladiny orexinu A u obézních jedinců před redukcí tělesné hmotnosti a po ní

Legenda: GB – dívky před redukcí, GA – dívky po redukci, BB – chlapci před redukcí, BA – chlapci po redukci; Byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl v obou skupinách před redukcí a po ní (*), ale nikoliv mezi chlapci a dívkami (n.s.).

3.1.2.2. Sérové hladiny leptinu, IGF-1 a IGFBP-3

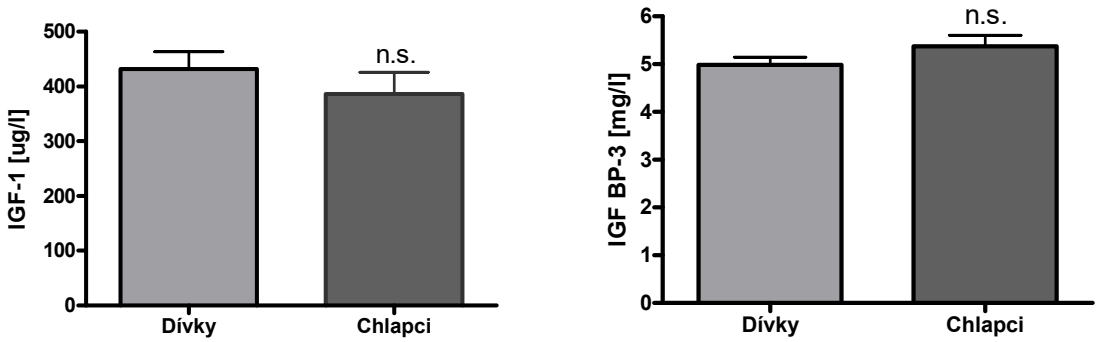
Sérové hladiny leptinu u GB byly 21,9 ± 1,8 ng/ml a u GA 10,2 ± 1,1 ng/ml ($p < 0,0001$). U BB byly koncentrace 15,4 ± 1,7 ng/ml a u BA 6,2 ± 0,7 ng/ml ($p < 0,0001$). Když byli hodnoceni chlapci a dívky společně, byly hladiny leptinu 19,1 ± 1,3 (AB) a 8,4 ± 0,8 ng/ml (AA), $p < 0,0001$ (obr. 20).

Sérové hladiny IGF-1 u dívek byly 431,8 ± 31,9 ug/l a u chlapců 386,6 ± 39,5 ug/l. Hladiny IGFBP-3 u dívek byly 5,0 ± 0,2 mg/l a u chlapců 5,4 ± 0,2 mg/l. Jak hladiny IGF-1 tak IGFBP-3 byly měřeny pouze před redukcí tělesné hmotnosti a nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly mezi chlapci a dívkami jak u IGF-1 ($p = 0,3716$) tak u IGFBP-3 ($p = 0,1600$) (obr. 21).



Obrázek 20: Sérové hladiny leptinu u obézních jedinců před redukcí tělesné hmotnosti a po ní

Legenda: GB – dívky před redukcí, GA – dívky po redukci, BB – chlapci před redukcí, BA – chlapci po redukci; Byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl v obou skupinách před redukcí a po ní (*) i rozdíl mezi chlapci a dívkami (#).

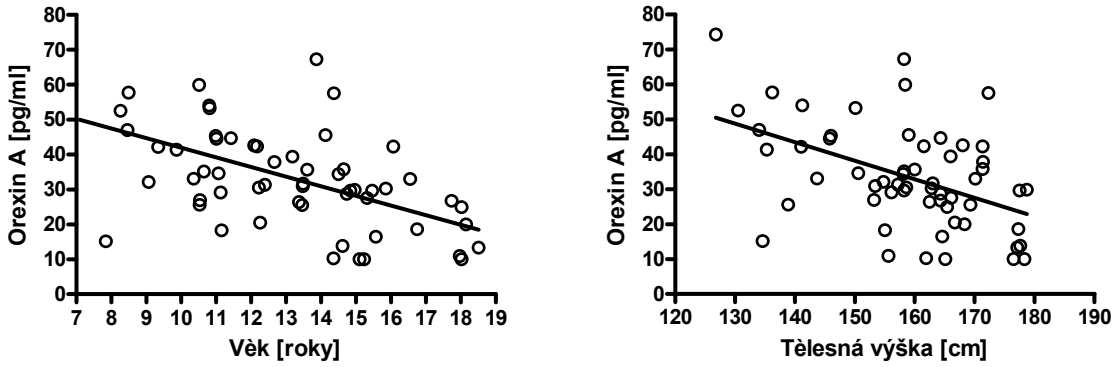


Obrázek 21: Sérové hladiny IGF-1 a IGFBP-3 u obézních jedinců před redukcí tělesné hmotnosti

Legenda: Ani u jednoho z parametrů nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi chlapci a dívkami (n.s.).

3.1.2.3. Vztah hladin orexinu A k věku a pohlaví

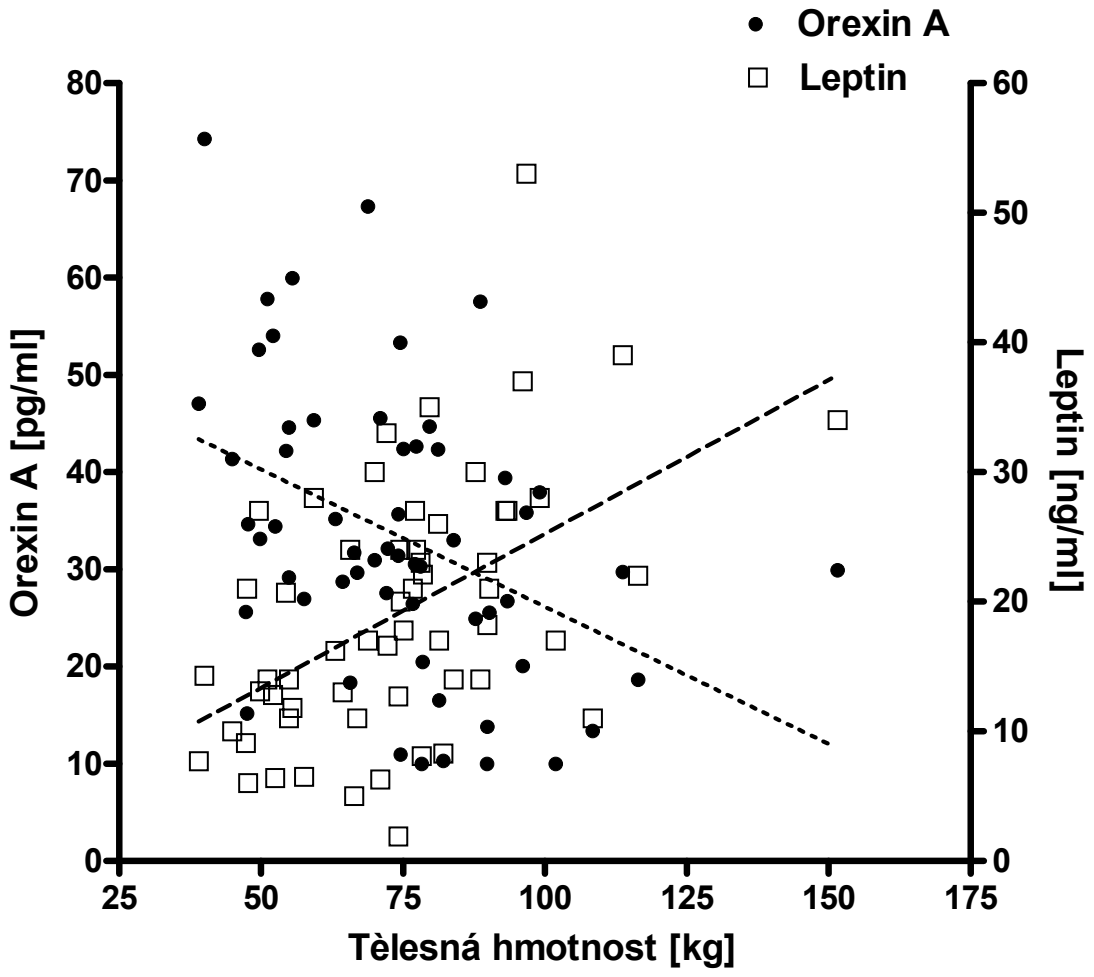
Nalezli jsme silnou negativní korelaci mezi hladinami orexinu A a věkem (r = -0,5395; p < 0,0001) (obr. 22). Hladiny orexinu A nebyly signifikantně odlišné mezi chlapci a dívkami ani před redukcí tělesné hmotnosti (p = 0,7842, Welchova korekce) ani po ní (p = 0,2842), ačkoli u chlapců byly průměrné hladiny orexinu A mírně vyšší jak před redukcí tělesné hmotnosti tak i po ní (obr. 19). Nalezli jsme pozitivní korelaci mezi hladinami leptinu a věkem (r = 0,3370; p = 0,0097). Hladiny leptinu byly signifikantně nižší u chlapců než u dívek jak před redukcí (p = 0,0126) tak po redukci tělesné hmotnosti (p = 0,0053, Welchova korekce) (obr. 20).



Obrázek 22: Korelace plazmatických hladin orexinu A s věkem a tělesnou výškou u obézních jedinců

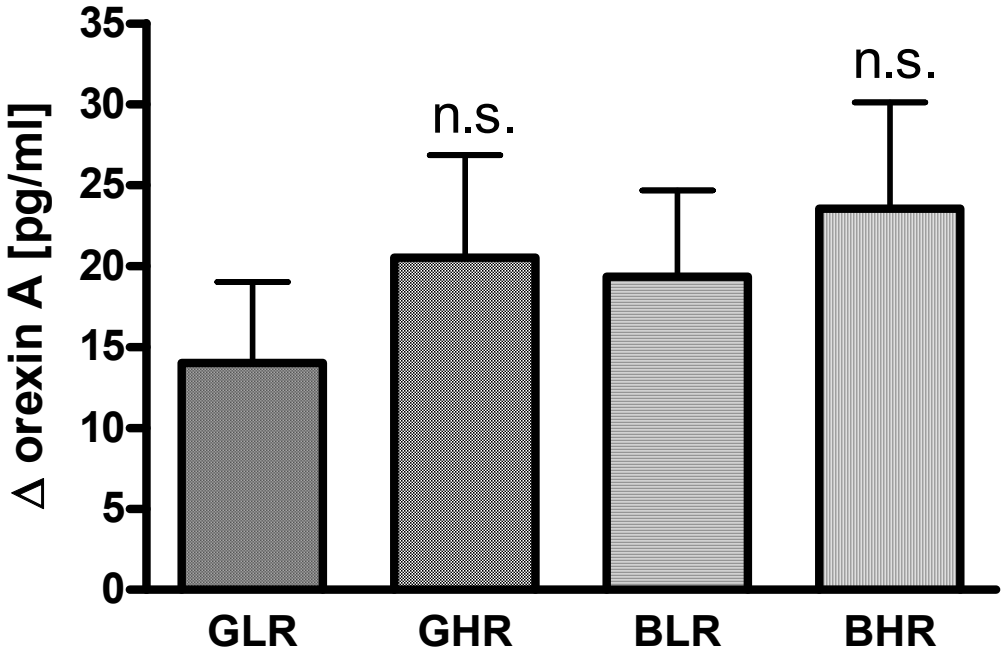
3.1.2.4. Korelace hladin orexinu A a leptinu s antropometrickými parametry

Zjistili jsme negativní korelaci mezi hladinami orexinu A a tělesnou výškou (r = -0,4751; p = 0,0002) (obr. 22). Plasmatické hladiny orexinu A negativně korelovaly s tělesnou hmotností (r = -0,4030; p = 0,0017) a BMI (r = -0,2607; p = 0,0481) narozdíl od hladin leptinu, kde byla v obou případech nalezena korelace pozitivní (r = 0,5068; p < 0,0001, respektive r = 0,5764; p < 0,0001) (obr. 23).



Obrázek 23: Korelace plazmatických hladin orexinu A a sérových hladin leptinu s tělesnou hmotností u obézních jedinců

Po převedení antropometrických dat na SD skóre jsme nenalezli žádný vztah mezi hladinami orexinu A a SDS tělesné výšky ($r = 0{,}07795$; $p = 0{,}5608$), SDS tělesné hmotnosti ($r = -0{,}03772$; $p = 0{,}7786$) nebo SDS BMI ($r = -0{,}02343$; $p = 0{,}8614$). Naopak leptin koreloval pozitivně s tělesnou výškou ($r = 0{,}3318$; $p = 0{,}0109$), SDS tělesné výšky ($r = 0{,}3175$; $p = 0{,}0152$), SDS tělesné hmotnosti ($r = 0{,}6251$; $p < 0{,}0001$) a SDS BMI ($r = 0{,}5445$; $p < 0{,}0001$).



Obrázek 24: Změny plazmatických hladin orexinu A u obézních jedinců během redukce tělesné hmotnosti ve vztahu k úspěšnosti redukční léčby

Legenda: GLR – dívky s redukcí tělesné hmotnosti < 10 %, GHR – dívky s redukcí tělesné hmotnosti > 10 %, BLR – chlapci s redukcí tělesné hmotnosti < 10 %, BHR – chlapci s redukcí tělesné hmotnosti > 10 %; Ani v jedné ze skupin nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl (n.s.).

3.1.2.5. Změny hladin orexinu A ve vztahu k odpovědi na redukční terapii

Ve skupině HR jsme nalezli významnější zvýšení hladin orexinu A ve srovnání s LR skupinou jak u dívek (20,5 ± 6,3 vs 14 ± 5,0 pg/ml, p = 0,4585) tak u chlapců (23,5 ± 6,6 vs 19,3 ± 5,4 pg/ml, p = 0,6281) (obr. 24), ale tyto rozdíly nebyly statisticky signifikantní. Ani změna sérových hladin leptinu nebyla statisticky signifikantní mezi HR a LR skupinou jak u dívek (p = 0,1778) tak u chlapců (p = 0,4126). Při současném statistickém hodnocení dívek i chlapců v HR skupině byla nalezena tendence k negativní korelaci mezi zvýšením hladin orexinu A snížením hladin leptinu (r = -0,3849, p = 0,0698).

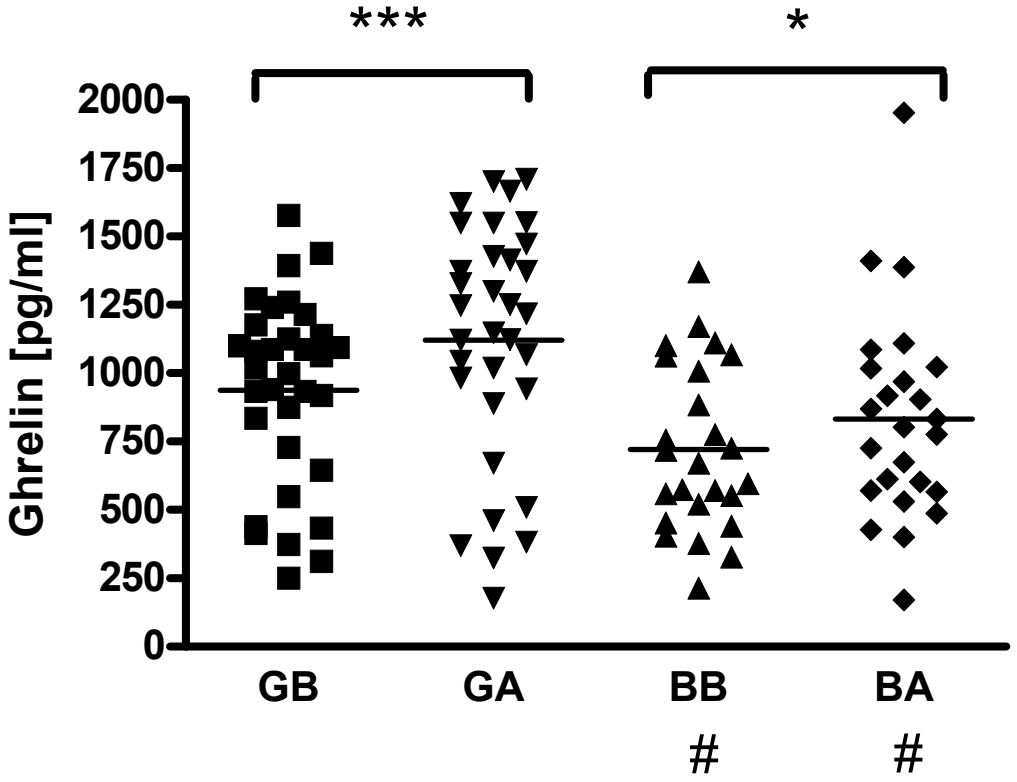
3.1.2.6. Korelace s biochemickými parametry

Nenalezli jsme korelaci mezi plasmatickými hladinami orexinu A a sérovými hladinami leptinu ani před redukcí tělesné hmotnosti (r = -0,04193; p = 0,7547) ani po ní (r =

-0,2249; p = 0,0897). Nenalezli jsme korelaci mezi těmito dvěma parametry ani když byly samostatně posouzeny skupiny HR a LR. Také jsme nenalezli korelaci mezi plasmatickými hladinami orexinu A a sérovými hladinami IGF-1 (r = -0,03414; p = 0,7992) nebo IGFBP-3 (r = 0,07766; p = 0,5623).

3.1.3. Ghrelin u obézních jedinců

3.1.3.1. Plazmatické hladiny celkového ghrelinu



Obrázek 25: Plazmatické hladiny ghrelinu u obézních jedinců před redukcí tělesné hmotnosti a po ní

Legenda: GB – dívky před redukcí, GA – dívky po redukci, BB – chlapci před redukcí, BA – chlapci po redukci; Byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl v obou skupinách před redukcí a po ní (*), i rozdíl mezi chlapci a dívkami (#).

Plazmatické hladiny ghrelinu u GB byly 938,3 ± 59,8 pg/ml (rozmezí 251 – 1578) a u GA 1120 ± 76 pg/ml (177 – 1709), p < 0,0001. Hladiny ghrelinu u BB byly 720,5 ± 60,6 pg/ml (214,3 – 1371) a u BA 832,9 ± 75,5 pg/ml (170,7 – 1952), p = 0,0459 (obr. 25). Když byli hodnoceni chlapci a dívky společně, byly hladiny ghrelinu 844,4 ± 44,9 pg/ml (AB) a

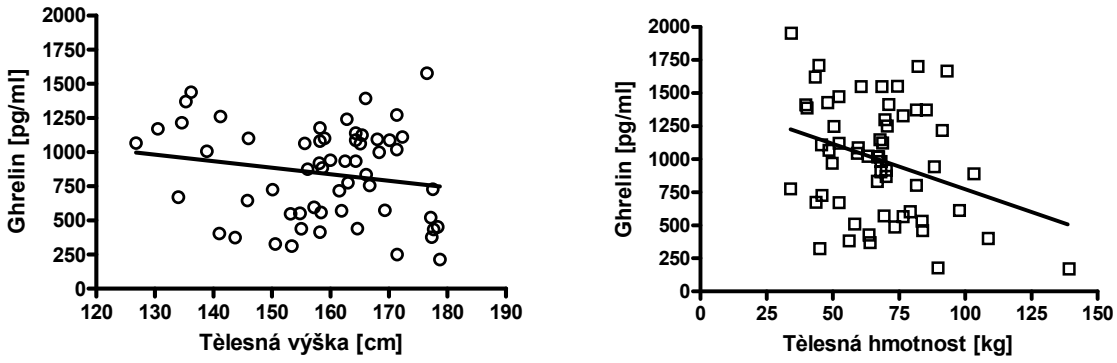
996,5 ± 56,9 pg/ml (AA), p < 0,0001. Plazmatické hladiny ghrelinu u AB signifikantně korelovaly s AA (r = 0,8693; p < 0,0001).

3.1.3.2. Vztah hladin ghrelinu k věku a pohlaví

U chlapců byly signifikantně nižší hladiny ghrelinu než u dívek jak před redukcí tělesné hmotnosti (p = 0,0149) tak po ní (p = 0,011) (obr. 25). U sledované skupiny obézních pacientů jsme nenalezli korelaci mezi hladinami ghrelinu a věkem (r = 0,08927; p = 0,5052).

3.1.3.3. Korelace hladin ghrelinu s antropometrickými parametry

Nalezli jsme negativní korelaci mezi hladinami ghrelinu po redukci tělesné hmotnosti a tělesnou výškou (r = -0,3196; p = 0,0145) (obr. 26) i SDS tělesné výšky (r = -0,2901; p = 0,0272). Plasmatické hladiny ghrelinu negativně korelovaly s tělesnou hmotností po redukci (r = -0,3137; p = 0,0165) (obr. 26), korelace s SDS skóre byla na hranici statistické významnosti (r = -0,2548; p = 0,0536). Před redukcí tělesné hmotnosti byla korelace s hmotností méně významná (r = -0,2501; p = 0,0583) a korelace s BMI byla také na hranici statistické významnosti (r = -0,2325; p = 0,0791). Nenalezli jsme žádný vztah mezi hladinami ghrelinu a SDS BMI.

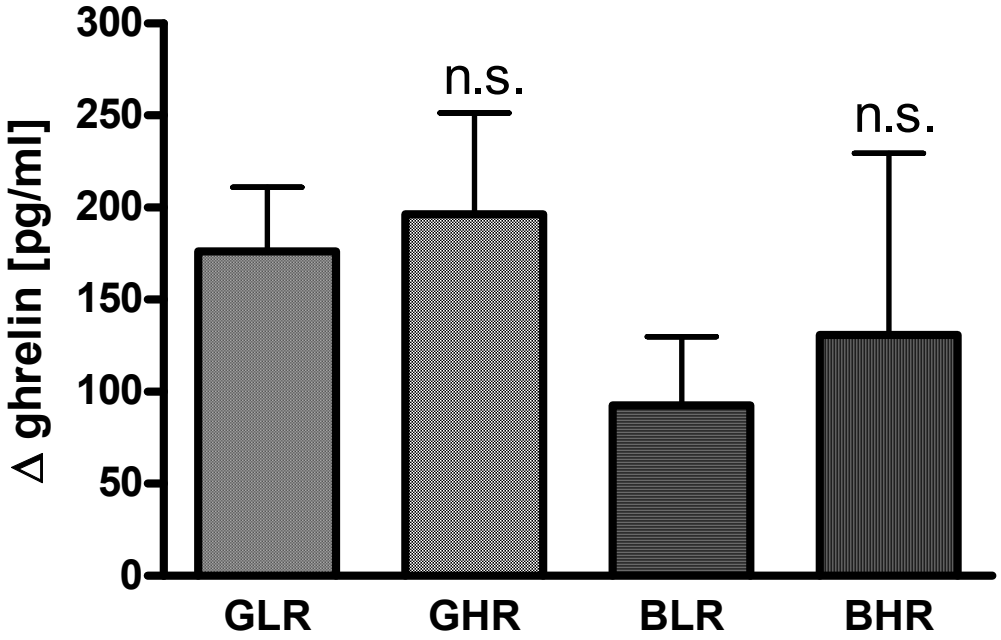


Obrázek 26: Korelace plazmatických hladin ghrelinu s tělesnou výškou a tělesnou hmotností u obézních jedinců

3.1.3.4. Změny hladin ghrelinu ve vztahu k odpovědi na redukční terapii

Ve skupině HR jsme nalezli výraznější zvýšení hladin ghrelinu ve srovnání s LR skupinou jak u dívek (176 ± 35,2 vs 196,3 ± 55,1 pg/ml, p = 0,7557) tak u chlapců (92,7 ±

37,3 vs 130,8 ± 98,7 pg/ml, p = 0,7232, Welchova korekce), ale tyto rozdíly nebyly statisticky signifikantní (obr. 27).

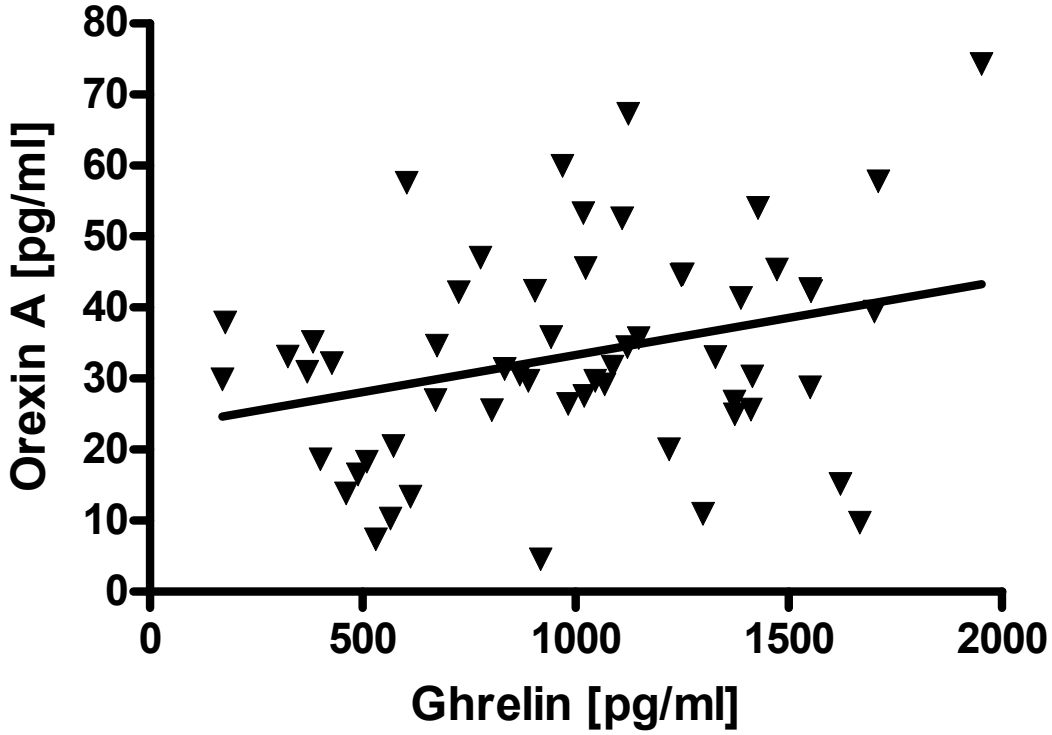


Obrázek 27: Změny plazmatických hladin ghrelinu u obézních jedinců během redukce tělesné hmotnosti ve vztahu k úspěšnosti redukční léčby

Legenda: GLR – dívky s redukcí tělesné hmotnosti < 10 %, GHR – dívky s redukcí tělesné hmotnosti > 10 %, BLR – chlapci s redukcí tělesné hmotnosti < 10 %, BHR – chlapci s redukcí tělesné hmotnosti > 10 %; Ani v jedné ze skupin nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl (n.s.).

3.1.3.5. Korelace s biochemickými parametry

Po redukci tělesné hmotnosti korelovaly hladiny celkového ghrelinu pozitivně s plasmatickými hladinami orexinu A (r = 0,3025, p = 0,0210) (obr. 28). Nenalezli jsme korelaci mezi plasmatickými hladinami ghrelinu a sérovými hladinami leptinu či adiponektinu ani před redukcí tělesné hmotnosti (r = 0,02934; p = 0,8269) ani po ní (r = -0,04516; p = 0,7364). Také jsme nenalezli korelaci mezi plasmatickými hladinami ghrelinu a sérovými hladinami IGF-1 (r = -0,1656; p = 0,2142) nebo IGFBP-3 (r = -0,1338; p = 0,3168).

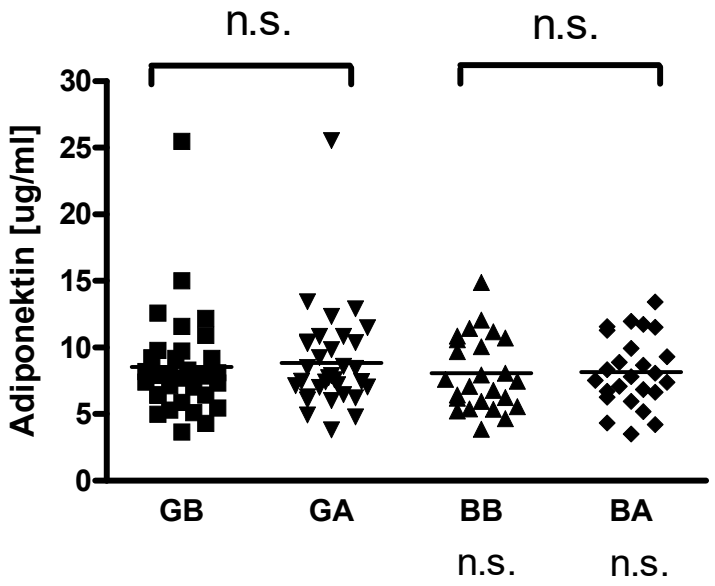


Obrázek 28: Korelace plazmatických hladin ghrelinu a orexinu A u obézních jedinců

3.1.4. Adiponektin u obézních jedinců

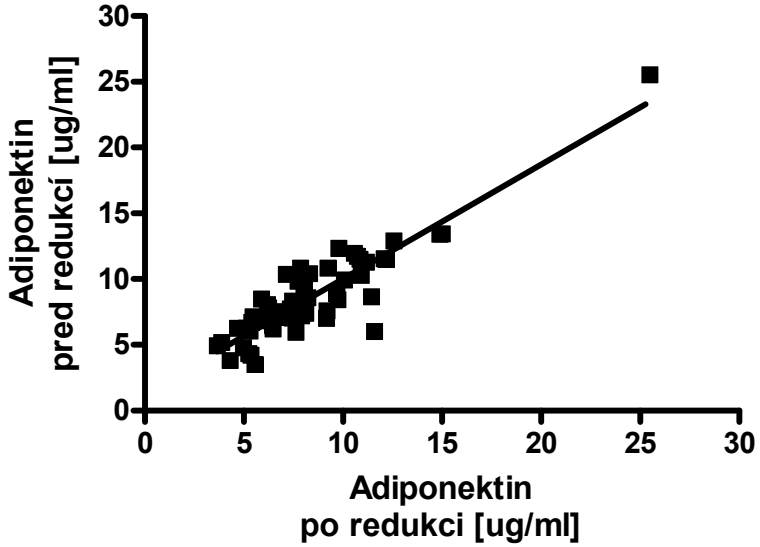
3.1.4.1. Sérové hladiny adiponektinu

Sérové hladiny adiponektinu u GB byly 8,5 ± 0,7 ug/ml (rozmezí 3,7 – 25,5) a u GA 8,8 ± 0,7 ug/ml (3,8 – 25,5), p = 0,3432. Hladiny adiponektinu u BB byly 8,1 ± 0,6 ug/ml (3,9 – 14,9) a u BA 8,2 ± 0,5 ug/ml (3,5 – 13,4), p = 0,6680 (obr. 29). Když byli hodnoceni chlapci a dívky společně, byly hladiny adiponektinu 8,3 ± 0,5 ug/ml (AB) a 8,5 ± 0,4 ug/ml (AA), p = 0,2979. Plazmatické hladiny adiponektinu u AB signifikantně korelovaly s AA (r = 0,8986; p < 0,0001) (obr. 30).



Obrázek 29: Sérové hladiny adiponektinu u obézních jedinců před redukcí tělesné hmotnosti a po ní

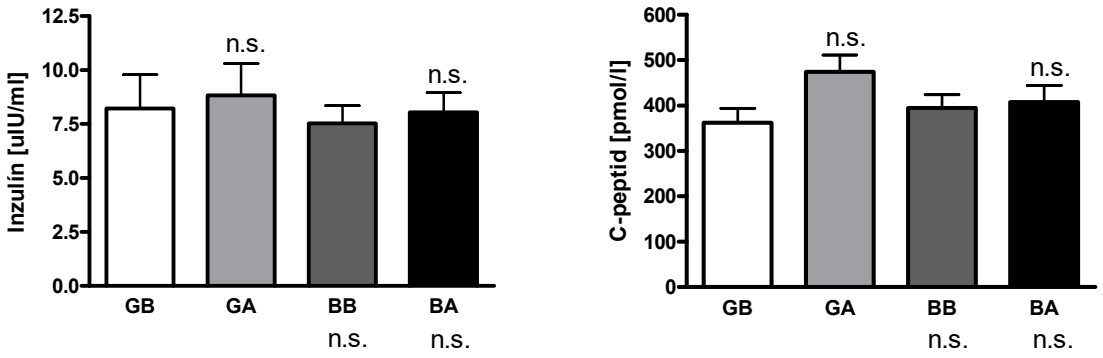
Legenda: GB – dívky před redukcí, GA – dívky po redukci, BB – chlapci před redukcí, BA – chlapci po redukci; Ani v jedné ze skupin nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl před redukcí tělesné hmotnosti a po ní (n.s.), ani rozdíl mezi chlapci a dívkami (n.s.).



Obrázek 30: Korelace sérových hladin adiponektinu u obézních jedinců před redukcí tělesné hmotnosti s hladinami po redukci

3.1.4.2. Sérové hladiny inzulínu a C-peptidu

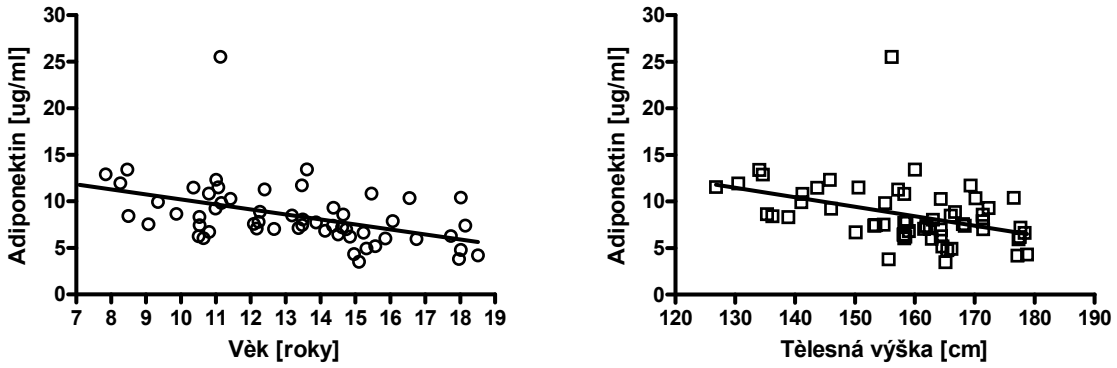
Sérové hladiny inzulínu u GB byly 8,2 ± 1,6 uIU/ml a u GA 8,8 ± 1,5 uIU/ml (n.s.). U BB byly koncentrace 7,5 ± 0,8 uIU/ml a u BA 8 ± 0,9 uIU/ml (n.s.). Když byli hodnoceni chlapci a dívky společně, byly hladiny inzulínu 7,9 ± 1,0 (AB) a 8,5 ± 0,9 uIU/ml (AA) (n.s.). Hladiny inzulínu nebyly signifikantně odlišné mezi chlapci a dívkami ani před redukcí tělesné hmotnosti ani po ní. Naměřené hladiny inzulínu neměly normální rozložení hodnot.
Sérové hladiny C-peptidu u GB byly 362,5 ± 31,6 pmol/l a u GA 474,1 ± 37,1 pmol/l (n.s.). U BB byly koncentrace 394,6 ± 29,1 pmol/l a u BA 407,9 ± 36,4 pmol/l (n.s.). Když byli hodnoceni chlapci a dívky společně, byly hladiny C-peptidu 376,3 ± 21,9 (AB) a 445,6 ± 26,4 pmol/l (AA) (n.s.). Hladiny C-peptidu nebyly signifikantně odlišné mezi chlapci a dívkami ani před ani po redukci tělesné hmotnosti (obr. 31).



Obrázek 31: Sérové hladiny inzulínu a C-peptidu u obézních jedinců před redukcí tělesné hmotnosti a po ní
Legenda: GB – dívky před redukcí, GA – dívky po redukci, BB – chlapci před redukcí, BA – chlapci po redukci; V žádné ze skupin ani u jednoho z parametrů nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl před redukcí tělesné hmotnosti a po ní (n.s.), ani rozdíl mezi chlapci a dívkami (n.s.).

3.1.4.3. Vztah hladin adiponektinu k věku a pohlaví

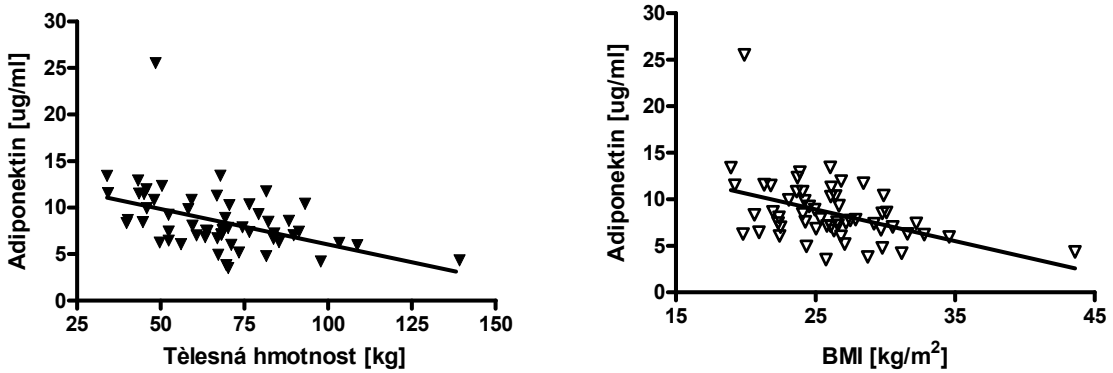
Zjistili jsme významnou negativní korelaci mezi hladinami adiponektinu a věkem (r = -0,4625; p = 0,0003) (obr. 32). Hladiny adiponektinu nebyly signifikantně odlišné mezi chlapci a dívkami před redukcí tělesné hmotnosti (p = 0,5817, Welchova korekce) ani po ní (p = 0,4357, Welchova korekce) ačkoli u chlapců byly průměrné hladiny adiponektinu mírně nižší před redukcí tělesné hmotnosti i po ní (obr. 29).



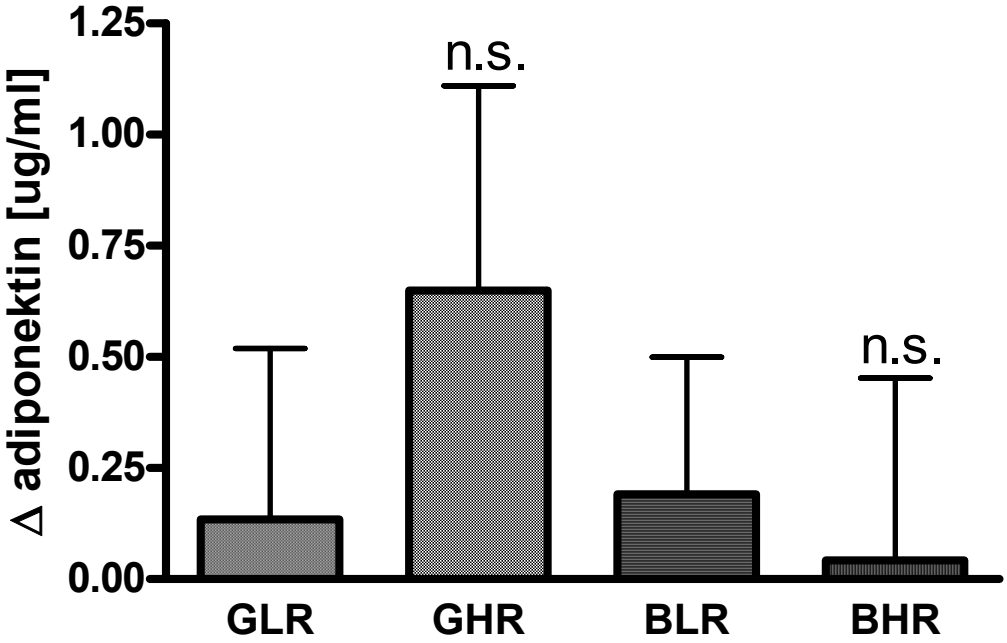
Obrázek 32: Korelace sérových hladin adiponektinu s věkem a tělesnou výškou u obézních jedinců

3.1.4.4. Korelace hladin adiponektinu s antropometrickými parametry

Zjistili jsme negativní korelaci mezi hladinami adiponektinu a tělesnou výškou (r = -0,3998; p = 0,0019) (obr. 32). Sérové hladiny adiponektinu negativně korelovaly před redukcí s tělesnou hmotností (r = -0,3888; p = 0,0026) a BMI (r = -0,3664; p = 0,0047). Po redukci tělesné hmotnosti byly tyto korelace ještě významnější (r = -0,4505; p = 0,0004, respektive r = -0,434; p = 0,0007) (obr. 33). Po převedení antropometrických dat na SD skóre jsme nenalezli žádný vztah mezi hladinami adiponektinu a SDS tělesné výšky, SDS tělesné hmotnosti nebo SDS BMI.



Obrázek 33: Korelace sérových hladin adiponektinu s tělesnou hmotností a BMI u obézních jedinců



Obrázek 34: Změny sérových hladin adiponektinu u obézních jedinců během redukce tělesné hmotnosti ve vztahu k úspěšnosti redukční léčby

Legenda: GLR – dívky s redukcí tělesné hmotnosti < 10 %, GHR – dívky s redukcí tělesné hmotnosti > 10 %, BLR – chlapci s redukcí tělesné hmotnosti < 10 %, BHR – chlapci s redukcí tělesné hmotnosti > 10 %; Ani v jedné ze skupin nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl (n.s.).

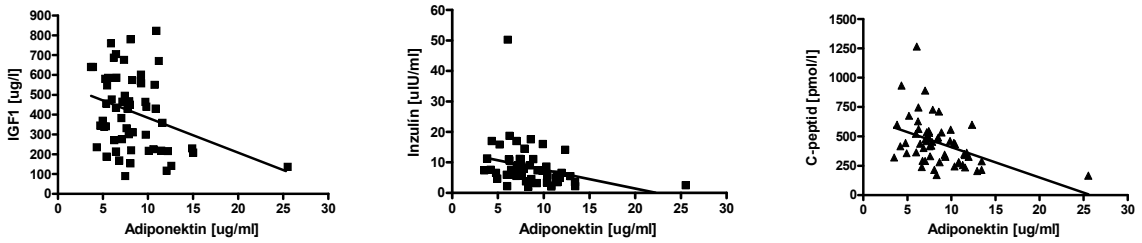
3.1.4.5. Změny hladin adiponektinu ve vztahu k odpovědi na redukční terapii

Ve skupině HR ani LR nedošlo k významné změně v hladinách adiponektinu během redukční terapie. Tyto změny nebyly mezi oběma skupinami statisticky významné (obr. 34).

3.1.4.6. Korelace s biochemickými parametry

Nenalezli jsme korelaci mezi sérovými hladinami adiponektinu a leptinu před redukcí tělesné hmotnosti ani po ní. Nenalezli jsme korelaci mezi těmito dvěma parametry ani když byly samostatně posouzeny skupiny HR a LR. Také jsme nenalezli vztah mezi hladinami adiponektinu a ghrelinu, respektive orexinu A. Sérové hladiny IGF-1 korelovaly negativně se sérovými hladinami adiponektinu před redukcí hmotnosti ($r = -0{,}3219$; $p = 0{,}0137$) (obr. 35) i s hladinami po redukci ($r = -0{,}2743$; $p = 0{,}0372$). Naopak mezi hladinami IGFBP-3 a

adiponektinu korelace nebyla zjištěna. Nalezli jsme negativní korelaci mezi hladinami adiponektinu a inzulínu (Spearman r = -0,4022; p = 0,0017), respektive C-peptidu (r = -0,4065; p = 0,0015) před redukcí tělesné hmotnosti. Tato korelace byla po redukci tělesné hmotnosti v obou případech ještě významnější (Spearman r = -0,429; p = 0,0008, respektive r = -0,4303; p = 0,0007) (obr. 35).



Obrázek 35: Korelace sérových hladin adiponektinu s IGF-1, inzulínem a C-peptidem u obézních jedinců

3.2. Pacientky s mentální anorexií

3.2.1. Antropometrická data u pacientek s mentální anorexií

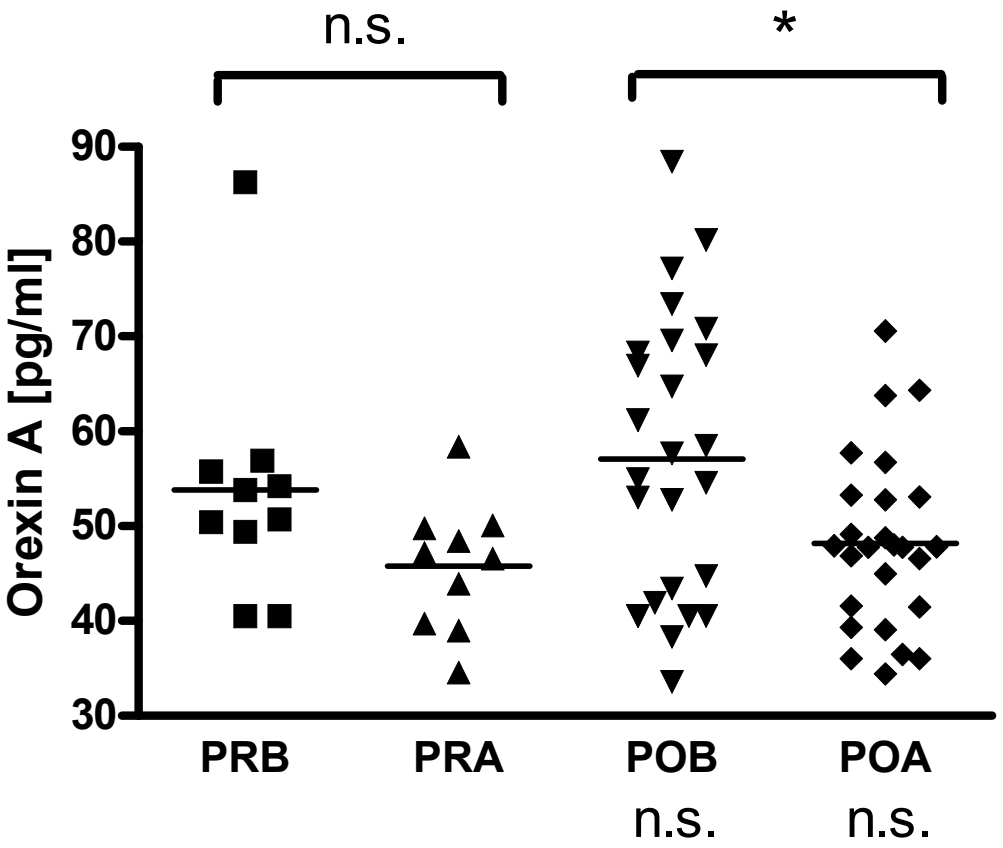
Premenarcheální dívky se od postmenarcheálních lišily průměrným věkem (p = 0,0062), tělesnou výškou (p = 0,006), iniciální tělesnou hmotností (p = 0,015) i hmotností po realimentaci (p = 0,0041). U premenarcheálních i postmenarcheálních dívek byly změny tělesné hmotnosti i BMI během realimentační terapie signifikantní. Tento rozdíl byl více vyjádřen ve skupině postmenarcheálních dívek ($p < 0,01$ vs $p < 0,0001$).

3.2.2. Orexin A u pacientek s mentální anorexií

3.2.2.1. Plazmatické hladiny orexinu A

Plazmatické hladiny orexinu A u premenarcheálních dívek před realimentační terapií (premenarcheal before - PRB) byly 53,9 $\pm$ 4,0 pg/ml (rozmezí 40,5 – 86,3) a po realimentaci (premenarcheal after - PRA) 45,8 $\pm$ 2,2 pg/ml (34,6 – 58,4), p = 0,0937, n.s. Hladiny orexinu A u postmenarcheálních dívek před realimentační terapií (postmenarcheal before - POB) byly

57,1 ± 2,9 pg/ml (rozmezí 33,6 – 88,4) a po realimentaci (postmenarcheal after - POA) 48,2 ± 1,8 pg/ml (34,4 – 70,6), p = 0,0131 (obr. 36). Když byly hodnoceny všechny dívky společně, byly hladiny orexinu A 56,2 ± 2,4 pg/ml (all before - AB) a 47,5 ± 1,4 pg/ml (all after - AA), p = 0.0025.

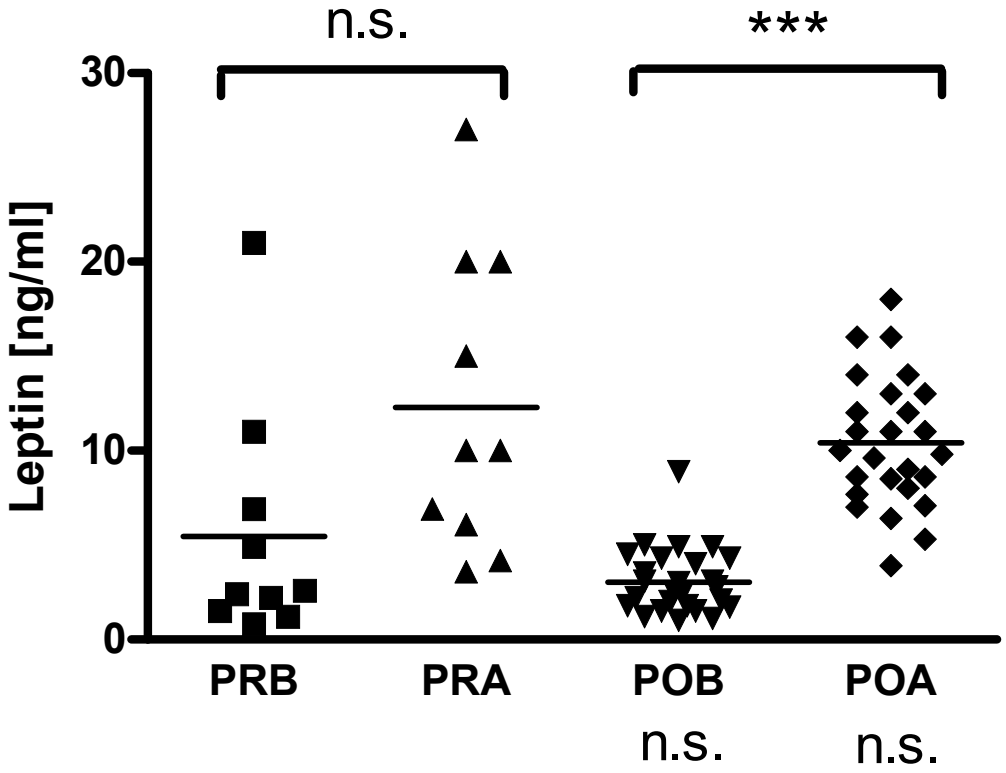


Obrázek 36: Plazmatické hladiny orexinu A u pacientek s mentální anorexií před realimentační léčbou a po ní
Legenda: PRB – premenarcheální dívky před realimentací, PRA – premenarcheální dívky po realimentaci, POB – postmenarcheální dívky před realimentací, POA – postmenarcheální dívky po realimentaci; Byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl ve skupině postmenarcheálních dívek před realimentací a po ní (*), ale nikoliv u premenarcheálních (n.s.), ani rozdíl mezi premenarcheálními a postmenarcheálními dívkami (n.s.).

3.2.2.2. Sérové hladiny leptinu, IGF-1 a IGFBP-3

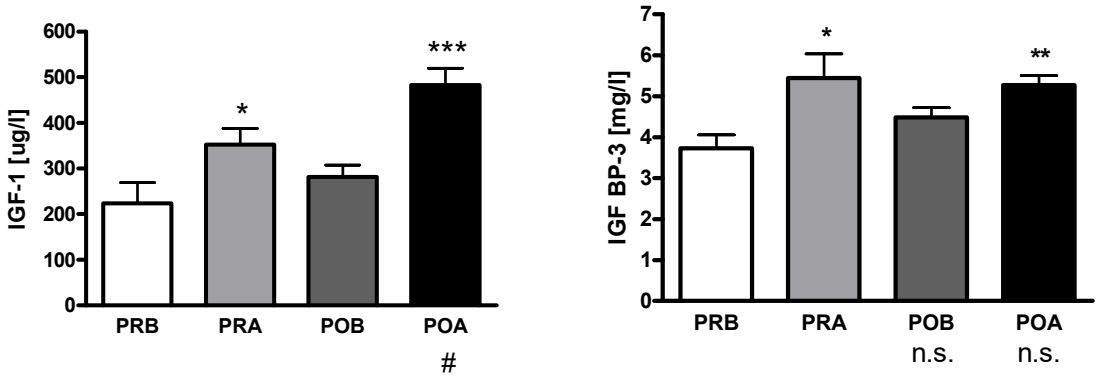
Sérové hladiny leptinu u PRB byly 5,5 ± 2,0 ng/ml a u PRA 12,3 ± 2,5 ng/ml (p = 0,0648). U POB byly koncentrace 3,0 ± 0,3 ng/ml a u POA 10,4 ± 0,7 ng/ml (p < 0,0001). Když byly hodnoceny všechny dívky společně, byly hladiny leptinu 3,7 ± 0,6 (AB) a 10,9 ± 0,8 ng/ml (AA), p < 0,0001, Wilcoxonův test. Hladiny leptinu u AB neměly normální

rozložení hodnot. Hladiny leptinu se signifikantně nelišily mezi premenarcheálními a postmenarcheálními dívkami ani před realimentační terapií ani po realimentaci (obr. 37).



Obrázek 37: Sérové hladiny leptinu u pacientek s mentální anorexií před realimentační léčbou a po ní
Legenda: PRB – premenarcheální dívky před realimentací, PRA – premenarcheální dívky po realimentaci, POB – postmenarcheální dívky před realimentací, POA – postmenarcheální dívky po realimentaci; Byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl ve skupině postmenarcheálních dívek před realimentací a po ní (*), ale nikoliv u premenarcheálních (n.s.), ani rozdíl mezi premenarcheálními a postmenarcheálními dívkami (n.s.).

Sérové hladiny IGF-1 u PRB byly 223,7 ± 45,8 ug/l, u PRA 352,2 ± 35,7 ug/l ($p = 0,0125$), u POB 281,8 ± 25,3 ug/l, u POA 483,2 ± 36,4 ug/l ($p < 0,0001$), u AB 265,7 ± 22,4 ug/l a u AA 446,8 ± 29,6 ug/l ($p < 0,0001$). Hladiny IGF1 po realimentaci se signifikantně lišily mezi premenarcheálními a postmenarcheálními dívkami ($p = 0,0455$) (obr. 38).
Hladiny IGFBP-3 u PRB byly 3,7 ± 0,3 mg/l, u PRA 5,4 ± 0,6 mg/l ($p = 0,0278$), u POB 4,5 ± 0,2 mg/l, u POA 5,3 ± 0,2 mg/l ($p = 0,0033$), u AB 4,3 ± 0,2 mg/l, u AA 5,3 ± 0,2 mg/l ($p = 0,0002$). Mezi premenarcheálními a postmenarcheálními dívkami nebyly nalezeny rozdíly v hladinách IGFBP3 ani před realimentační léčbou ani po ní (obr. 38).



Obrázek 38: Sérové hladiny IGF-1 a IGFBP-3 u pacientek s mentální anorexií před realimentační léčbou a po ní
Legenda: PRB – premenarcheální dívky před realimentací, PRA – premenarcheální dívky po realimentaci, POB – postmenarcheální dívky před realimentací, POA – postmenarcheální dívky po realimentaci; Byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl u IGF-1 i IGFBP-3 ve skupině pre- i postmenarcheálních dívek před realimentací a po ní (*). Také byl nalezen rozdíl v IGF-1 mezi pre- a postmenarcheálními dívkami po realimentaci (#).

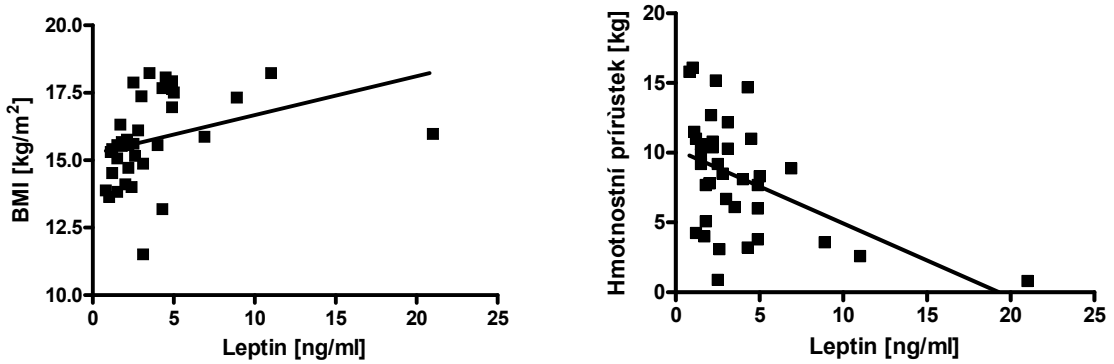
3.2.2.3. Vztah hladin orexinu A k věku a menarché

Ve vyšetřované skupině dívek jsme nenalezli korelaci mezi věkem a hladinami orexinu A ani před realimentací ani po ní. Hladiny orexinu A nebyly signifikantně odlišné mezi premenarcheálními a postmenarcheálními dívkami ani před realimentací ani po ní, ačkoli u postmenarcheálních dívek byly průměrné hladiny orexinu A v obou případech vyšší (obr. 36).

3.2.2.4. Korelace s antropometrickými parametry

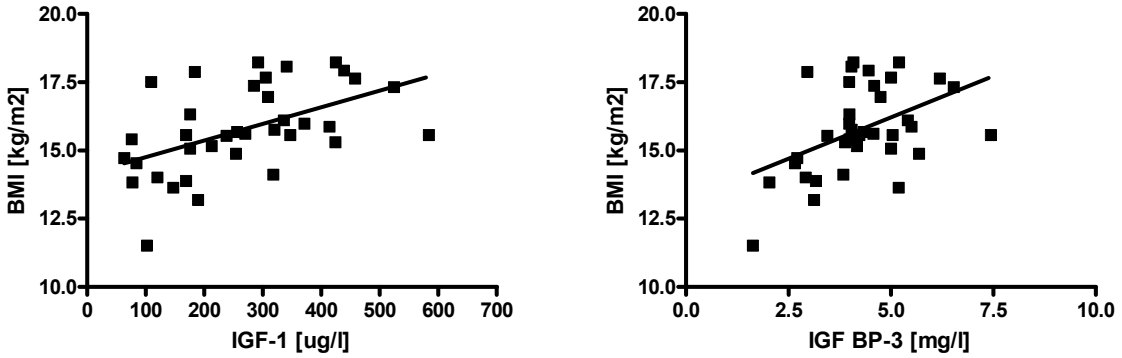
Ve sledované skupině dívek jsme nenalezli korelaci mezi hladinami orexinu A a tělesnou výškou, tělesnou hmotností a BMI ani jejich SD skóre ani před realimentací ani po ní.

Naopak hladiny leptinu před realimentací korelovaly pozitivně s SDS tělesné hmotnosti (Spearman r = 0,3686; p = 0,027), BMI (Spearman r = 0,5996; p = 0,0001), SDS BMI (Spearman r = 0,5761; p = 0,0002) a negativně s hmotnostním přírůstkem během terapie (Spearman r = -0,4573; p = 0,005). Hladiny leptinu po realimentaci korelovaly pozitivně s BMI (r = 0,5008; p = 0,0019) a SDS BMI (r = 0,4252; p = 0,0097) (obr. 39).



Obrázek 39: Korelace sérových hladin leptinu s BMI a hmotnostním přírůstkem u pacientek s mentální anorexií

Sérové hladiny IGF-1 před realimentací korelovaly pozitivně s tělesnou hmotností (r = 0,4948; p = 0,0022), s SDS tělesné hmotnosti (r = 0,3428; p = 0,0407), BMI (r = 0,5068; p = 0,0016) (obr. 40) a SDS BMI (r = 0,3485; p = 0,0373). Hladiny IGF-1 po realimentaci korelovaly pozitivně s BMI (r = 0,4284; p = 0,0091).

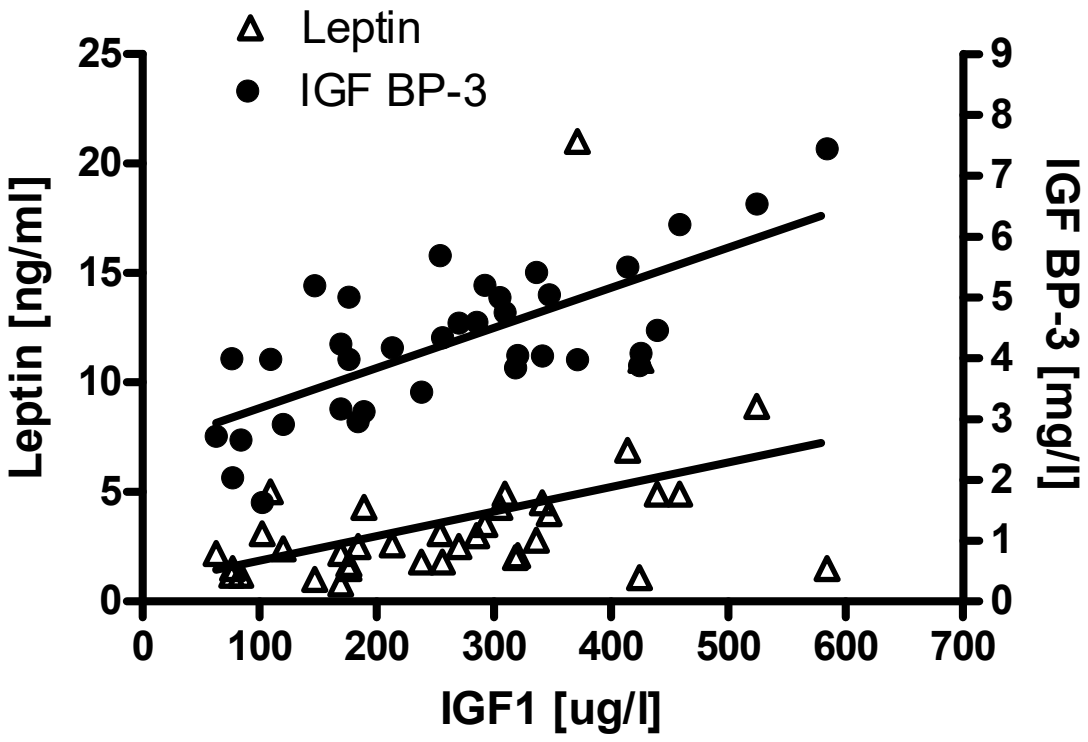


Obrázek 40: Korelace sérových hladin IGF-1 a IGFBP-3 s BMI u pacientek s mentální anorexií

Sérové hladiny IGFBP-3 před realimentací korelovaly pozitivně s tělesnou hmotností (r = 0,3626; p = 0,0298) a BMI (r = 0,4586; p = 0,0049) (obr. 40).

3.2.2.5. Korelace s biochemickými parametry

Nenalezli jsme korelaci mezi plasmatickými hladinami orexinu A a sérovými hladinami leptinu, IGF-1 a IGFBP-3 ani před realimentací ani po ní. Před realimentací jsme nalezli pozitivní korelaci mezi hladinami IGF-1 a leptinu (r = 0,5014, p = 0,0018) a mezi hladinami IGF-1 a IGFBP-3 (r = 0,7253, p < 0,0001) (obr. 41).

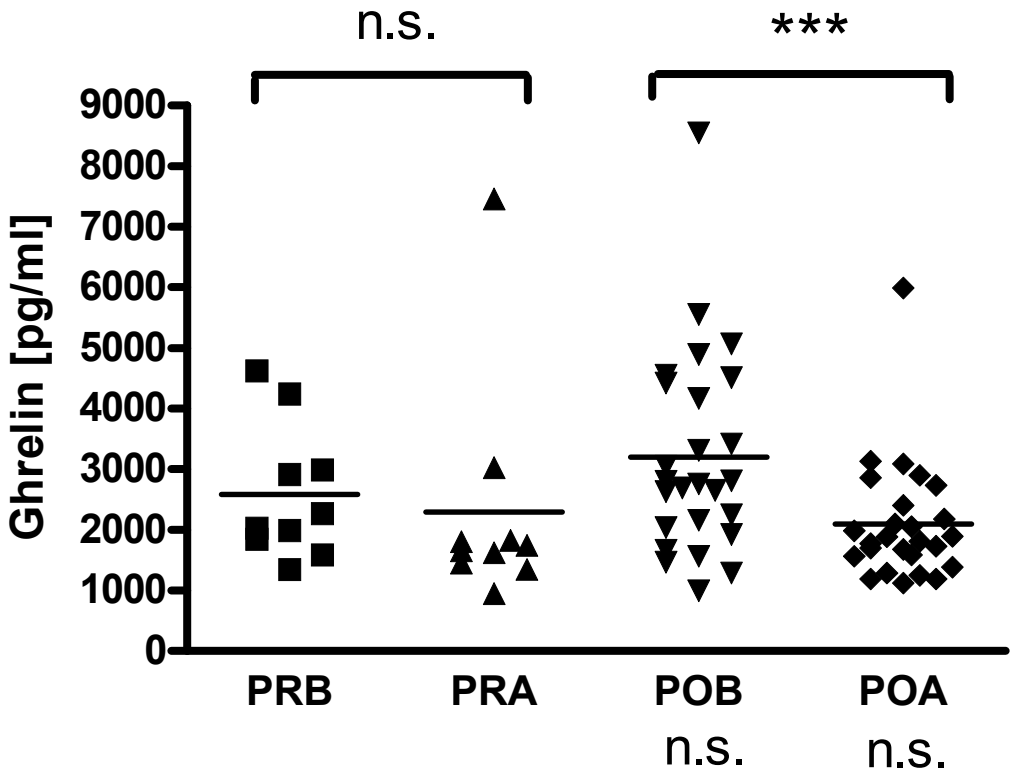


Obrázek 41: Korelace sérových hladin IGF-1 s leptinem a IGFBP-3 u pacientek s mentální anorexií

3.2.3. Ghrelin u pacientek s mentální anorexií

3.2.3.1. Plazmatické hladiny ghrelinu

Plazmatické hladiny ghrelinu u PRB byly 2583 ± 349,8 pg/ml (rozmezí 1348 – 4625) a u PRA 2289 ± 598,1 pg/ml (951,2 – 7455), p = 0,4579, n.s. Hladiny ghrelinu u POB byly 3198 ± 327 pg/ml (rozmezí 992,5 – 8550) a u POA 2095 ± 194,9 pg/ml (1118 – 5986), p < 0,0001 (obr. 42). Když byly hodnoceny všechny dívky společně, byly hladiny ghrelinu 3027 ± 257 pg/ml (AB) a 2148 ± 213 pg/ml (AA), p = 0.0002, Wilcoxonův test. Hladiny ghrelinu po realimentaci neměly normální rozložení hodnot. Plazmatické hladiny ghrelinu u AB signifikantně korelovaly s AA (r = 0,6392; p < 0,0001).



Obrázek 42: Plazmatické hladiny ghrelinu u pacientek s mentální anorexií před realimentační léčbou a po ní
Legenda: PRB – premenarcheální dívky před realimentací, PRA – premenarcheální dívky po realimentaci, POB – postmenarcheální dívky před realimentací, POA – postmenarcheální dívky po realimentaci; Byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl ve skupině postmenarcheálních dívek před realimentací a po ní (*), ale nikoliv u premenarcheálních (n.s.), ani rozdíl mezi pre- a postmenarcheálními dívkami (n.s.).

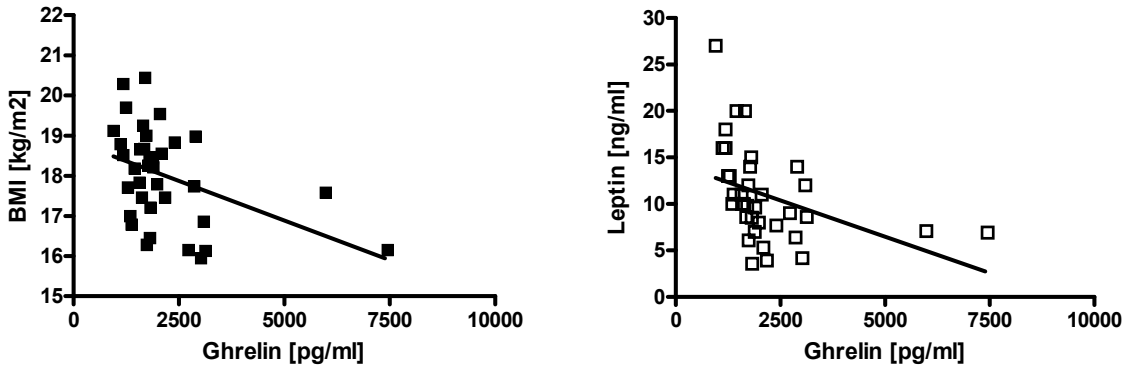
3.2.3.2. Vztah hladin ghrelinu k věku a menarché

Ve vyšetřované skupině dívek jsme nenalezli korelaci mezi věkem a hladinami ghrelinu ani před realimentací ani po ní. Hladiny ghrelinu nebyly signifikantně odlišné mezi premenarcheálními a postmenarcheálními dívkami ani před realimentací ani po ní (obr. 42).

3.2.3.3. Korelace hladin ghrelinu s antropometrickými parametry

Ve sledované skupině dívek jsme nalezli negativní korelaci mezi hladinami ghrelinu před realimentací a SD skóre BMI ($r = -0{,}3826$, $p = 0{,}0213$). Po realimentaci korelovaly

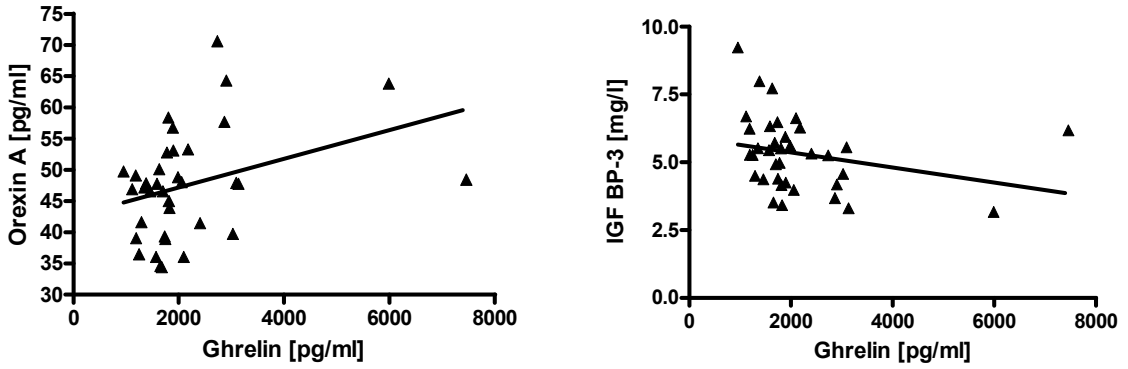
plazmatické hladiny ghrelinu negativně s BMI (Spearman r = -0,4392, p = 0,0074) (obr. 43) a SDS BMI (Spearman r = -0,4942, p = 0,0022).



Obrázek 43: Korelace plazmatických hladin ghrelinu s BMI a leptinem u pacientek s mentální anorexií

3.2.3.4. Korelace s biochemickými parametry

Nalezli jsme negativní korelaci mezi plasmatickými hladinami ghrelinu a sérovými hladinami leptinu před realimentací (Spearman r = -0,3951, p = 0,0171) i po ní (Spearman r = -0,6416, p < 0,0001) (obr. 43). Hladiny ghrelinu po realimentaci také pozitivně korelovaly s hladinami orexinu A (Spearman r = 0,3621, p = 0,03) a negativně s hladinami IGFBP-3 (r = -0,3894, p = 0,0189) (obr. 44).

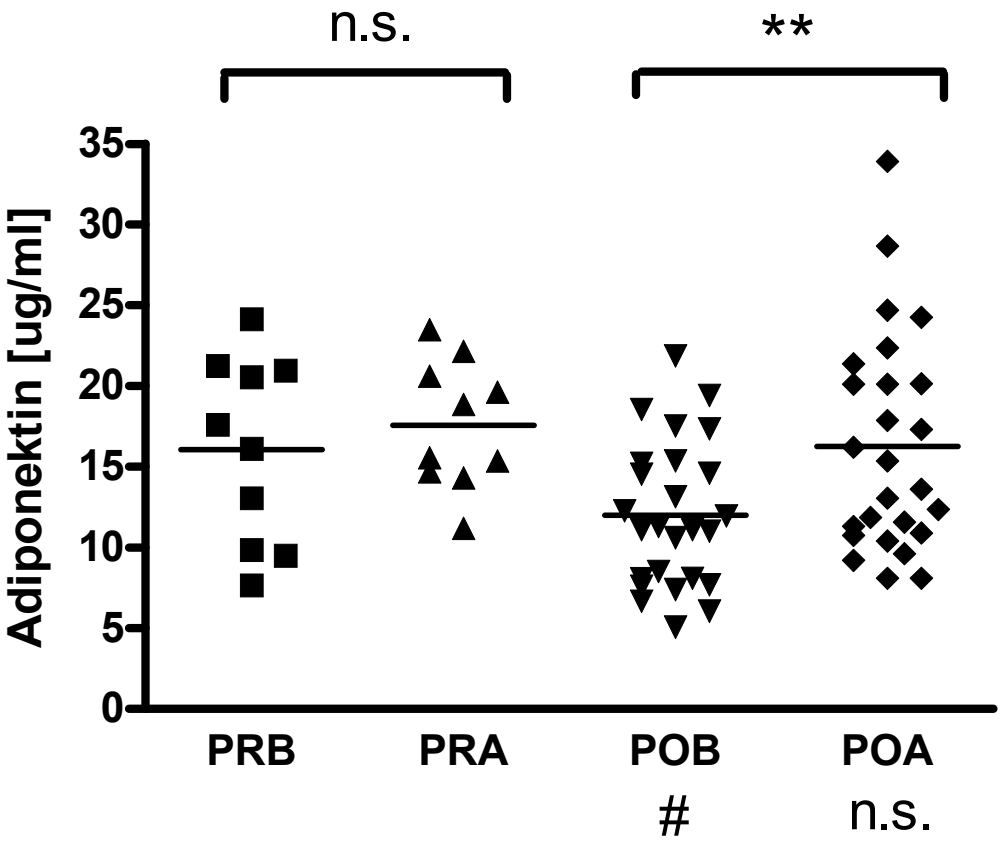


Obrázek 44: Korelace plazmatických hladin ghrelinu s orexinem A a IGFBP-3 u pacientek s mentální anorexií

3.2.4. Adiponektin u pacientek s mentální anorexií

3.2.4.1. Sérové hladiny adiponektinu

Sérové hladiny adiponektinu u PRB byly 16,1 ± 1,8 ug/ml (rozmezí 7,7 – 24,2) a u PRA 17,6 ± 1,2 ug/ml (11,2 – 23,5), p = 0,3837, n.s. Hladiny adiponektinu u POB byly 12,0 ± 0,9 ug/ml (rozmezí 5,1 – 21,9) a u POA 16,3 ± 1,3 ug/ml (8,1 – 33,9), p = 0,0035 (obr. 45). Když byly hodnoceny všechny dívky společně, byly hladiny adiponektinu 13,1 ± 0,9 ug/ml (AB) a 16,6 ± 1,0 ug/ml (AA), p = 0,0024. Sérové hladiny adiponektinu u AB signifikantně korelovaly s AA (r = 0,3514; p = 0,0356).

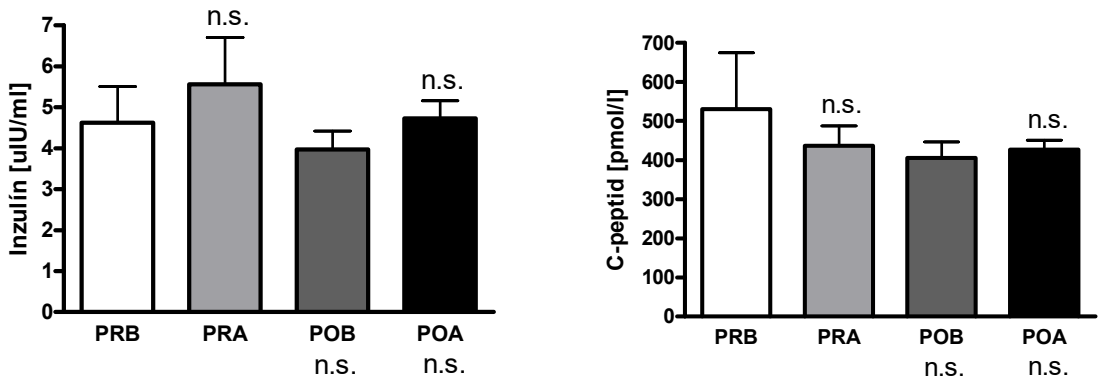


Obrázek 45: Sérové hladiny adiponektinu u pacientek s mentální anorexií před realimentační léčbou a po ní
Legenda: PRB – premenarcheální dívky před realimentací, PRA – premenarcheální dívky po realimentaci, POB – postmenarcheální dívky před realimentací, POA – postmenarcheální dívky po realimentaci; Byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl ve skupině postmenarcheálních dívek před realimentací a po ní (*), ale nikoliv u premenarcheálních (n.s.). Také byl nalezen rozdíl mezi pre- a postmenarcheálními dívkami před realimentací (#).

3.2.4.2. Sérové hladiny inzulínu a C-peptidu

Sérové hladiny inzulínu u PRB byly 4,6 ± 0,9 uIU/ml u PRA 5,6 ± 1,1 uIU/ml (n.s.). U POB byly koncentrace 4 ± 0,5 uIU/ml a u POA 4,7 ± 0,4 uIU/ml (n.s.). Když byly hodnoceny všechny dívky společně, byly hladiny inzulínu 4,2 ± 0,4 (AB) a 5,0 ± 0,4 uIU/ml (AA) (n.s.). Hladiny inzulínu nebyly signifikantně odlišné mezi premenarcheálními a postmenarcheálními dívkami ani před ani po realimentaci.

Sérové hladiny C-peptidu u PRB byly 530,6 ± 143,9 pmol/l a u PRA 436,5 ± 50,9 pmol/l (n.s.). U POB byly koncentrace 406 ± 40,5 pmol/l a u POA 426,8 ± 24,6 pmol/l (n.s.). Když byly hodnoceny všechny dívky společně, byly hladiny C-peptidu 440,6 ± 49,1 (AB) a 429,5 ± 22,3 pmol/l (AA) (n.s.). Hladiny C-peptidu nebyly signifikantně odlišné mezi premenarcheálními a postmenarcheálními dívkami ani před realimentací ani po ní (obr. 46).



Obrázek 46: Sérové hladiny inzulínu a C-peptidu u pacientek s mentální anorexií před realimentační léčbou a po ní

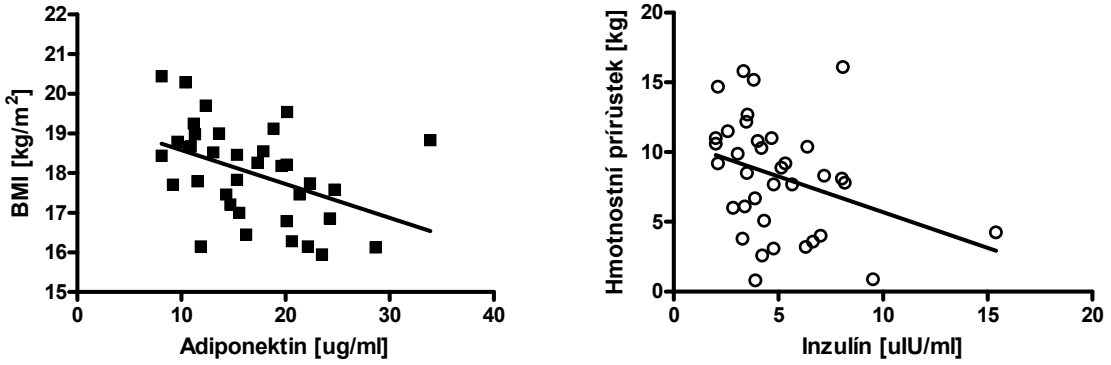
Legenda: PRB – premenarcheální dívky před realimentací, PRA – premenarcheální dívky po realimentaci, POB – postmenarcheální dívky před realimentací, POA – postmenarcheální dívky po realimentaci; V žádné ze skupin ani u jednoho z parametrů nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl před pealimentací a po ní (n.s.), ani rozdíl mezi pre- a postmenarcheálními dívkami (n.s.).

3.2.4.3. Vztah hladin adiponektinu k věku a menarché

Ve vyšetřované skupině dívek jsme nenalezli korelaci mezi věkem a hladinami adiponektinu ani před realimentací ani po ní. Průměrné hladiny adiponektinu u postmenarcheálních dívek před realimentací byly signifikantně nižší než u premenarcheálních ($p = 0,0317$). Po realimentaci nebyl tento rozdíl statisticky významný (obr. 45).

3.2.4.4. Korelace s antropometrickými parametry

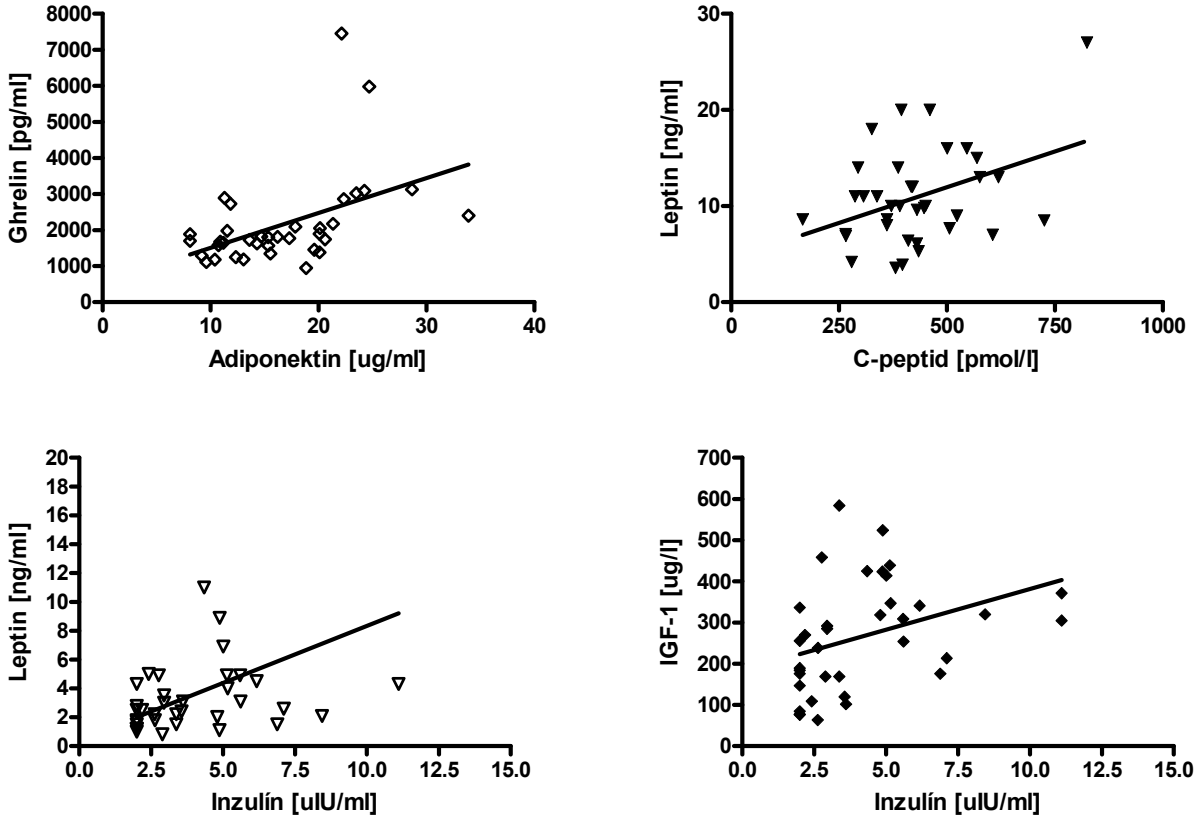
Nalezli jsme negativní korelaci mezi hladinami adiponektinu po realimentaci a BMI (r = -0,4335, p = 0,0083) (obr. 47), respektive SD skóre BMI (r = -0,3999, p = 0,0157). Hladiny inzulínu korelovaly před realimentací pozitivně s SD skóre tělesné hmotnosti (r = 0,347, p = 0,0381) a po realimentaci negativně s hmotnostním přírůstkem (r = -0,3303, p = 0,0491) (obr. 47). Nenalezli jsme žádnou korelaci mezi hladinami C-peptidu a antropometrickými parametry.



Obrázek 47: Korelace sérových hladin adiponektinu s BMI a inzulínu s hmotnostním přírůstkem u pacientek s mentální anorexií

3.2.4.5. Korelace s biochemickými parametry

Po realimentaci jsme nalezli pozitivní korelaci mezi sérovými hladinami adiponektinu a plasmatickými hladinami ghrelinu (Spearman r = 0,566, p = 0,0003). Nenalezli jsme korelaci mezi sérovými hladinami adiponektinu a inzulínu, respektive C-peptidu. Sérové hladiny inzulínu korelovaly před realimentací pozitivně s hladinami leptinu (Spearman r = 0,4291, p = 0,009) a IGF-1 (r = 0,3574, p = 0,0324). Hladiny C-peptidu po realimentaci pozitivně korelovaly s hladinami leptinu (r = 0,3954, p = 0,017) (obr. 48).



Obrázek 48: Korelace sérových hladin adiponektinu s plazmatickými hladinami ghrelinu, sérových hladin C-peptidu a inzulínu s leptinem a inzulínu s IGF-1 u pacientek s mentální anorexií

Souhrn výsledků pro jednotlivé regulační peptidy u obézních pacientů i u pacientek s mentální anorexií je uveden v tabulce 8.

a)

Obézní:	Věk	Pohlaví	TV	THM	BMI	SDS TV	SDS THM	SDS BMI
Orexin A	-	0	-	-	-	0	0	0
Leptin	+	BL	+	+	+	+	+	+
Ghrelin	0	BL	-	-	0	-	0	0
Adiponektin	-	0	-	-	-	0	0	0

b)

Obézní:	Orexin A	Leptin	Ghrelin	Adiponektin	IGF-1	IGF BP-3	Inzulín	C-peptid
Orexin A	X	0	+	0	0	0	NT	NT
Leptin	0	X	0	0	0	0	NT	NT
Ghrelin	+	0	X	0	0	0	NT	NT
Adiponektin	0	0	0	X	-	0	-	-

c)

MA:	Věk	Menarché	TV	THM	BMI	SDS TV	SDS THM	SDS BMI
Orexin A	0	0	0	0	0	0	0	0
Leptin	0	0	0	0	+	0	+	+
Ghrelin	0	0	0	0	-	0	0	-
Adiponektin	0	POL	0	0	-	0	0	-

d)

MA:	Orexin A	Leptin	Ghrelin	Adiponektin	IGF-1	IGF BP-3	Inzulín	C-peptid
Orexin A	X	0	+	0	0	0	NT	NT
Leptin	0	X	-	0	+	0	+	+
Ghrelin	+	-	X	+	0	-	NT	NT
Adiponektin	0	0	+	X	0	0	0	0

Tabulka 8: Souhrn výsledků pro jednotlivé regulační peptidy u obézních pacientů (korelace s antropometrickými (a) a biochemickými (b) parametry) a u pacientek s mentální anorexií (korelace s antropometrickými (c) a biochemickými (d) parametry)

Legenda: znaménko (+) - pozitivní korelace, znaménko (-) - negativní korelace, znaménko (0) – žádná korelace, NT – netestováno, BL – nižší hladiny u chlapců, POL – nižší hladiny u postmenarcheálních dívek; TV – tělesná výška, THM – tělesná hmotnost, BMI – body mass index, SDS - SD skóre, MA – mentální anorexie

3.3. Pacienti s Crohnovou nemocí, celiakií a zdravé kontroly

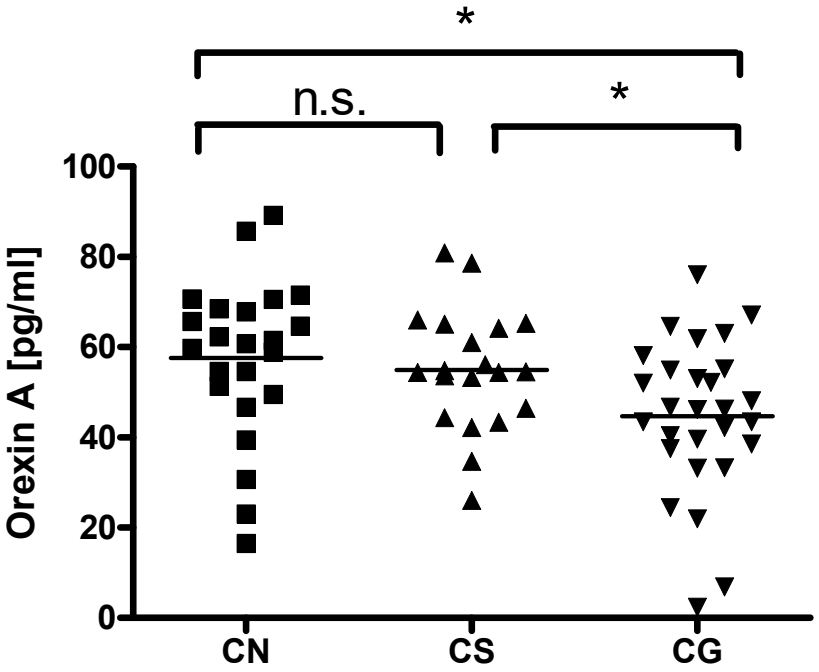
3.3.1. Antropometrická data

Průměrný věk v kontrolní skupině (CG) nebyl statisticky odlišný od pacientů s Crohnovou nemocí (CN) ani s celiakální sprue (CS) (ANOVA, $p > 0,05$). Průměrný věk u CN byl signifikantně vyšší než u CS (ANOVA, $p < 0,001$). Průměrná tělesná výška i tělesná hmotnost byly signifikantně nižší u CS v porovnání s CG i CN. Naopak SDS tělesné hmotnosti bylo signifikantně nižší u CS i CN v porovnání s CG. V hodnotách průměrného BMI nebyl rozdíl mezi jednotlivými skupinami nalezen. SDS tělesné hmotnosti i SDS BMI

bylo signifikantně nižší u CN než u CG. Uvnitř žádné ze sledovaných skupin pacientů nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi chlapci a dívkami v průměrném věku, tělesné výšce ani tělesné hmotnosti.

3.3.2. Plazmatické hladiny orexinu A

Plazmatické hladiny orexinu A ve skupině CN byly 57,6 ± 3,7 pg/ml (rozmezí 16,5 – 89,2), ve skupině CS byly 55,2 ± 3,3 pg/ml (rozmezí 26,1 – 80,9) a ve skupině CG byly 44,8 ± 3,2 pg/ml (rozmezí 2,4 – 76,0), ANOVA, p = 0,0159. Hladiny ve skupině CN i CS byly signifikantně vyšší než v CG (ANOVA, $p < 0,05$) (obr. 49).



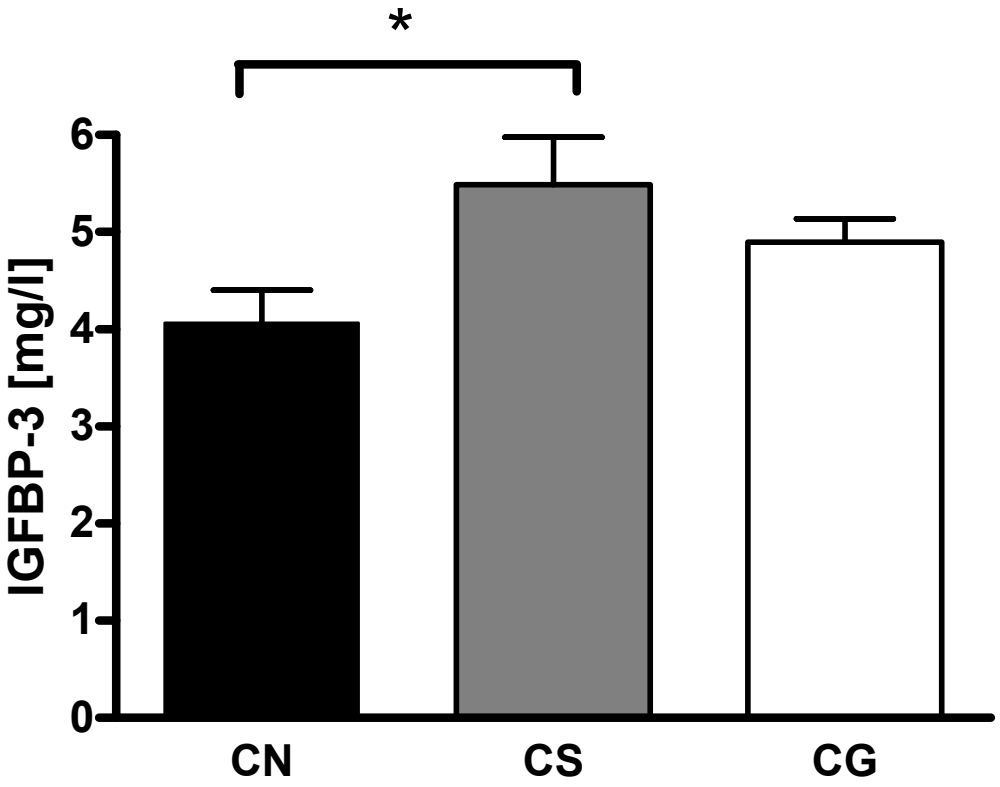
Obrázek 49: Plazmatické hladiny orexinu A u pacientů s Crohnovou nemocí, celiakální sprue a u kontrolní skupiny

Legenda: CN – Crohnova nemoc, CS – celiakální sprue, CG – kontrolní skupina; Průměrné hladiny ve skupině CN i CS byly signifikantně vyšší než v CG (*)

3.3.3. Sérové hladiny leptinu, IGF-1 a IGFBP-3

Sérové hladiny leptinu u CN byly 6,0 ± 1,4 ng/ml, u CS 7,2 ± 1,7 ng/ml a u CG 8,2 ± 1,2 ng/ml (ANOVA, n.s.). Sérové hladiny IGF-1 u CN byly 282,3 ± 50,0 ug/l, u CS 335,2 ±

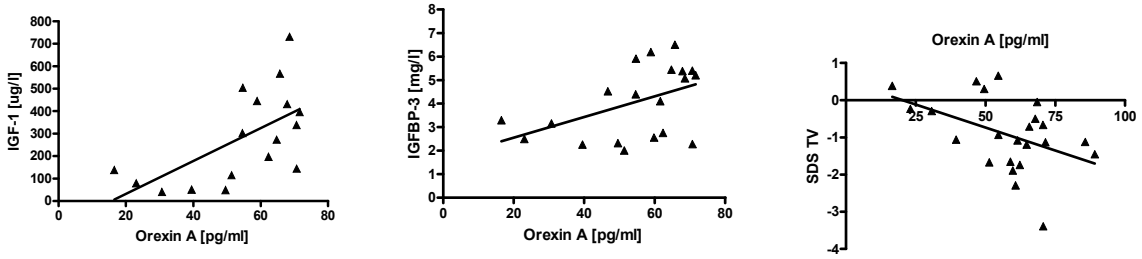
95,7 ug/l a u CG 471,8 ± 42,6 ug/l (ANOVA, n.s.). Sérové hladiny IGFBP-3 u CN byly 4,1 ± 0,3 mg/l, u CS 5,2 ± 0,4 mg/l a u CG 4,9 ± 0,2 mg/l (ANOVA, p = 0,0245). (obr. 50).



Obrázek 50: Sérové hladiny IGFBP-3 u pacientů s Crohnovou nemocí, celiakální sprue a u kontrolní skupiny
Legenda: CN – Crohnova nemoc, CS – celiakální sprue, CG – kontrolní skupina; Průměrné hladiny ve skupině CN i CS byly signifikantně vyšší než v CG (*)

3.3.4. Korelace orexinu A s antropometrickými a biochemickými parametry

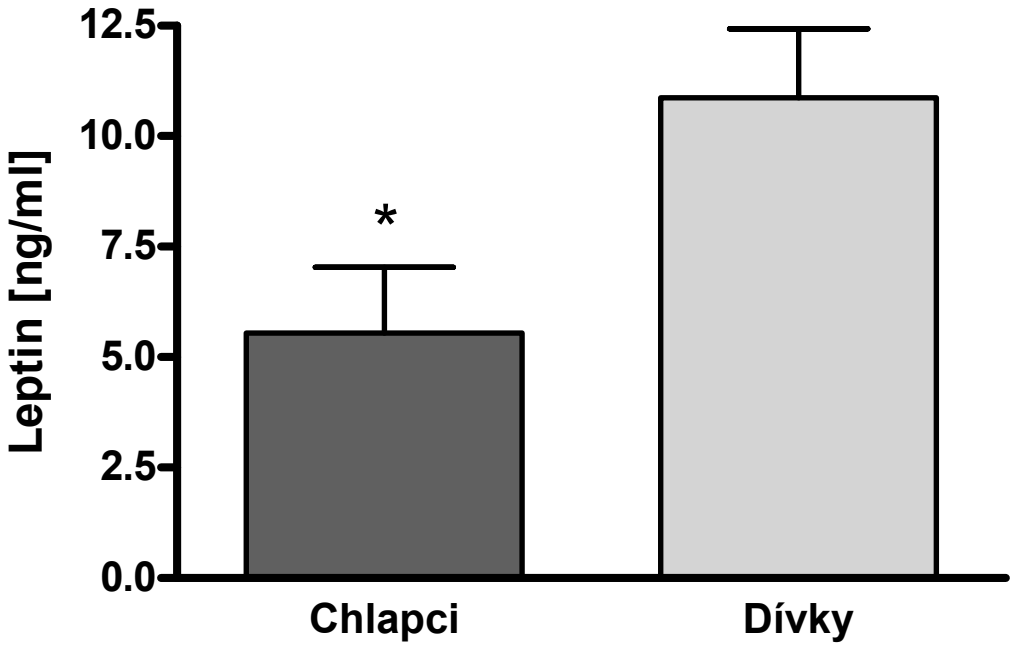
U pacientů s CN korelovaly plazmatické hladiny orexinu A pozitivně s hladinami IGF-1 (r = 0,6129, p = 0,0089) a IGFBP-3 (r = 0,4674, p = 0,0377) a negativně s SDS tělesné výšky (r = -0,4487, p = 0,0317) (obr. 51). U pacientů s CS korelovaly hladiny orexinu A s IGF-1 (r = 0,6464, p = 0,0316). Korelace s hladinami leptinu ani ostatními antropometrickými parametry nalezena nebyla.



Obrázek 51: Korelace hladin orexinu A s IGF-1, IGFBP-3 a SDS tělesné výšky u pacientů s Crohnovou nemocí
Legenda: SDS TV – SD skóre tělesné výšky

3.3.5. Rozdíly vzhledem k pohlaví

Plazmatické hladiny orexinu A ani sérové hladiny IGF-1 nebo IGFBP-3 nebyly statisticky signifikantně odlišné mezi chlapci a děvčaty ani v jedné ze sledovaných skupin (CN, CS a CG). Sérové hladiny leptinu nebyly mezi oběma pohlavími odlišné ve skupinách CN a CS, ale byly signifikantně nižší u chlapců v CG (p = 0,0206) (obr. 52).



Obrázek 52: Sérové hladiny leptinu v kontrolní skupině jsou signifikantně nižší u chlapců ve srovnání s dívkami

3.4. Amylin u pacientů s osteoporózou

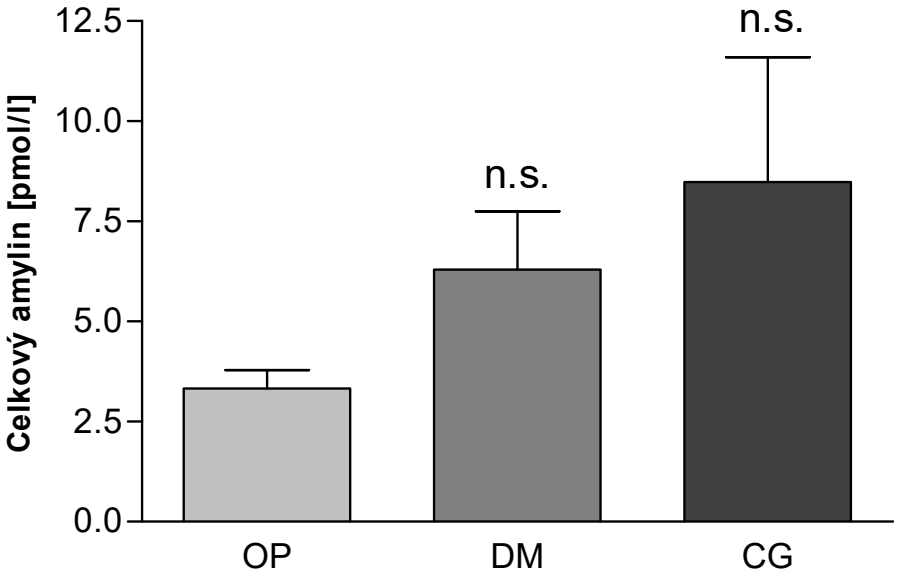
3.4.1. Charakteristika pacientů

Průměrná tělesná hmotnost u pacientů s osteoporózou (OP), diabetiků II.typu (DM) a v kontrolní skupině (CG) byla 64,4 ± 1,4, 71,1 ± 2,2 a 69,3 ± 1,7 kg, průměrná tělesná výška v těchto skupinách byla 1,67, 1,64 a 1,64 m a průměrný BMI byl 23,2 ± 0,7, 26,5 ± 1,1 a 25,8 ± 0,8 kg/m^2. Tělesná výška nebyla mezi jednotlivými skupinami statisticky významně odlišná. Průměrná tělesná hmotnost byla nižší u OP než u CG a BMI u OP byl signifikantně nižší než u CG (One-way ANOVA s Bonferoniho testem, p = 0,0155).

3.4.2. Plazmatické hladiny amylinu

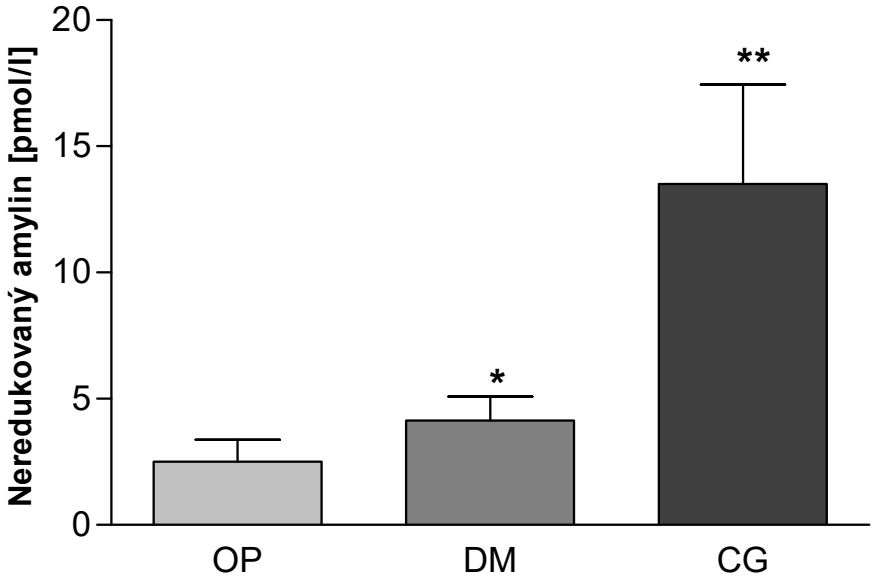
Plazmatické hladiny celkového amylinu u OP byly 3,3 ± 0,5 pmol/l (rozmezí 1-12,3), u pacientů s DM 6,3 ± 1,5 pmol/l (1,1 – 14,2) a u CG 8,5 ± 3,1 pmol/l (1 – 70,9). Průměrné plazmatické hladiny byly nižší u OP než u DM a CG, ale rozdíl nedosáhl statisticky signifikantních hodnot stejně jako při srovnání skupiny DM a CG (Kruskal-Wallisův test, p > 0,05) (obr. 53). Ve skupině CG neodpovídaly výsledky normálnímu rozložení hodnot.

Plazmatické hladiny neredukovaného amylinu u OP (n = 28) byly 2,5 ± 0,9 pmol/l (1 – 19,9), u DM (n = 10) 4,2 ± 1,0 pmol/l (1,9 – 11) a u CG (n = 5) 13,5 ± 3,9 pmol/l (2,5 – 26,6). Plazmatické hladiny byly signifikantně nižší u OP než u DM a CG (Kruskal-Wallisův test, souhrnná hladina p = 0,0003) (obr. 54). Rozdíl hladin neredukovaného amylinu mezi DM a CG nebyl statisticky odlišný. Ve skupině OP neodpovídaly výsledky normálnímu rozložení hodnot.



Obrázek 53: Plazmatické hladiny celkového amylinu nalačno u různých skupin pacientů

Legenda: OP – pacienti s osteoporózou, DM – pacienti s diabetem II.typu, CG - kontrolní skupina; Mezi jednotlivými skupinami nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl (n.s.).



Obrázek 54: Plazmatické hladiny neredukovaného amylinu nalačno u různých skupin pacientů

Legenda: OP – pacienti s osteoporózou, DM – pacienti s diabetem II.typu, CG - kontrolní skupina; Byl nalezen statisticky signifikantní rozdíl mezi OP a DM, respektive CG (*).

3.4.3. Hladiny amylinu vzhledem k věku

Ani po adjustaci na věk se hladiny celkového amylinu mezi jednotlivými skupinami signifikantně nelišily, ale u OP byly průměrné hladiny stále nižší než u DM a CG. Hladiny neredukovaného amylinu u pacientů s OP po adjustaci na věk zůstaly signifikantně nižší ve srovnání s DM a CG na hladině významnosti $p < 0,05$. V žádné ze skupin jsme nenalezli korelaci mezi věkem a hladinami celkového nebo redukovaného amylinu.

3.4.4. Hladiny amylinu vzhledem k pohlaví

U žen byly průměrné hladiny celkového amylinu nižší ve skupině OP (3,1 $\pm$ 0,4 pmol/l) než u CG (8,2 $\pm$ 5,3 pmol/l), ale tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní. Hladiny neredukovaného amylinu u žen byly signifikantně nižší u OP (2,2 $\pm$ 0,9 pmol/l) než u CG (13,5 $\pm$ 3,9 pmol/l), $p < 0,01$. U 3 mužů ve skupině s OP byly hladiny celkového amylinu 4,6 $\pm$ 2,6 pmol/l a hladiny neredukovaného amylinu 4,5 $\pm$ 3,6 pmol/l. Nenalezli jsme signifikantní rozdíl v hladinách amylinu mezi muži a ženami. Podrobnější statistická analýza nebyla prováděna vzhledem k nízkému počtu mužů ve skupině OP.

3.4.5. Hladiny amylinu vzhledem k antropometrickým parametrům

Po adjustaci na tělesnou hmotnost byly hladiny celkového amylinu u OP nižší než u DM a CG (n.s.). Neredukovaný amylin u pacientů s OP byl statisticky signigfikantně nižší než u CG ($p < 0,01$). V žádné ze skupin nebyla nalezena korelace mezi hladinami celkového nebo neredukovaného amylinu a tělesnou hmotností, výškou nebo BMI.

4. DISKUSE

4.1. Orexin A

4.1.1. Hladiny orexinu A

V naší studii se pohybovaly průměrné plazmatické hladiny orexinu A v rozmezí 33-34 pg/ml u obézních dětí před redukcí tělesné hmotnosti a v rozmezí 54-58 pg/ml u pacientek s mentální anorexií před realimentační léčbou, u pacientů s Crohnovou nemocí a s celiakií. V průběhu redukce tělesné hmotnosti u obézních jedinců se hladiny normalizovaly podobně jako v průběhu realimentace u pacientek s mentální anorexií. Výsledné hladiny orexinu A se v obou případech pohybovaly okolo 45-50 pg/ml, což je hodnota odpovídající průměrným hladinám orexinu A u kontrolní skupiny. Vzhledem k faktu, že ani všichni obézní jedinci ani pacientky s mentální anorexií nedosáhly během terapie normální tělesné hmotnosti (respektive BMI) ani normálního nutričního stavu organismu se zdá, že k normalizaci hladin orexinu A dochází s předstihem před dosažením normální tělesné hmotnosti během terapeutické intervence. Určit normální hladiny orexinu A pro danou populaci je obtížné vzhledem k faktu, že v současné době je k dispozici řada různých metodických postupů pro stanovení plazmatických hladin orexinu A.

V odborné literatuře se uváděné hladiny orexinu A v plazmě liší podle použité metodiky, např. Arihara a spol. ve své práci uvádí průměrné hladiny orexinu A ráno nalačno u 17 zdravých jedinců 1,94 pmol/l (= 6,9 pg/ml) při použití radioimunoanalýzy s předchozí extrakcí peptidu z plazmy (Arihara a spol. 2001). Adam a spol. popisuje snížené plazmatické hladiny orexinu A u dospělých obézních jedinců ve srovnání s kontrolní skupinou. Do studie byli zařazeni jedinci s BMI v rozmezí 19,8 – 59 kg/m2. Ke stanovení orexinu A v plazmě byla použita radioimunoanalýza s extrakcí. Nejnižší detekovatelná koncentrace byla 40 pg/ml a hladiny orexinu A se pohybovaly v rozmezí od 40 pg/ml u obézních jedinců po 61,4 pg/ml u eutrofických kontrol (Adam a spol. 2002). Tyto hodnoty jsou srovnatelné s hodnotami stanovenými v naší studii u obézních dětí. Komaki a spol. popisuje změny sérových hladin orexinu A během 10 denního lačnění a následné 7 denní realimentace u dospělých jedinců s normální tělesnou hmotností. Ve studii byla použita radioimunoanalýza bez předchozí extrakční procedury. Deklarovaná senzitivita metody byla 18 pg/ml. Průměrné hladiny orexinu A se pohybovaly v rozmezí 29,9 pg/ml na počátku experimentu, 47,9 pg/ml na konci

10 denního lačnění a 33,4 pg/ml po 7 denní realimentaci (Komaki a spol. 2001). Údaje v této studii jsou v souladu s našimi výsledky a poukazují na fakt, že i během krátké nutriční intervence dochází k významným změnám hladin orexinu A.

Je známo, že pacienti s některými formami narkolepsie mají snížené hladiny orexinu A v mozkomíšním moku (MMM). Jejich normální hladina u zdravých jedinců je přibližně 10x vyšší než v plazmě (300-600 pg/ml). U pacientů s narkolepsií jsou často uváděny hladiny orexinu A v MMM pod 100 pg/ml a v odborné literatuře jsou popsány i případy, kdy byly hladiny orexinu A v MMM u těchto pacientů zcela nedetekovatelné. Např. Tsukamoto a spol. uvádí kasuistiku dvou prepubertálních chlapců, u nichž byla hladina orexinu A pod detekčním limitem radioimunoanalýzy (< 40 pg/ml) (Tsukamoto a spol. 2002). Byla také publikována řada prací, v nichž jsou popisovány plazmatické hladiny orexinu A u pacientů s narkolepsií. Higuchi a spol. udává hladiny orexinu A u narkoleptických pacientů v rozmezí 11-25 pg/ml a u zdravých kontrol v rozmezí 20-33 pg/ml při dolním detekčním limitu metody 10 pg/ml (Higuchi a spol. 2002). Dalal a spol. používá radioimunoanalýzu s extrakcí a dolním detekčním limitem 40 pg/ml. U pacientů s narkolepsií popisuje plazmatické hladiny orexinu A v rozmezí 175-847 pg/ml, které nejsou statisticky odlišné od kontrolní skupiny (Dalal a spol. 2001). Nishijima a spol. uvádí plazmatické hladiny orexinu A u dospělých jedinců se syndromem spánkové apnoe s využitím radioimunoanalýzy s předchozí extrakcí. Hladiny uvádí v rozmezí 4,4 pmol/l (= 15,7 pg/ml) ve skupině pacientů a 5,3 pmol/l (= 18,9 pg/ml) v kontrolní skupině (Nishijima a spol. 2003).

Lze tedy říci, že průměrné hladiny orexinu A udávané v literatuře se pohybují v rozmezí 10 – 60 pg/ml v závislosti na studované skupině pacientů a použité metodice. Naše studie odpovídá těmto hodnotám ve všech uváděných experimentech – jak u obézních pacientů, tak u pacientů s Crohnovou nemocí, celiakií i s mentální anorexií. Hladiny orexinu A u pacientů s narkolepsií ve studii Dalal a spol. se liší několikanásobně od běžných plazmatických hodnot a blíží se koncentracím orexinu A udávaným obvykle pro MMM.

4.1.2. Vztah hladin orexinu A k věku

V naší studii jsme nalezli negativní korelaci mezi hladinami orexinu A a věkem u obézních pacientů. Ve skupině pacientek s mentální anorexií, s Crohnovou nemocí, s celiakií ani v kontrolní skupině nebyla tato korelace patrná.

V roce 2002 Matsumura a spol. popsal pozitivní korelaci mezi hladinami orexinu A a věkem u dospělých jedinců (Matsumura a spol. 2002). Porkka-Heiskanen a spol. uvádí na zvířecím experimentu snížené hladiny orexinu A ve tkáňových extraktech laterálního hypothalamu u jednoletých a dvouletých krys ve srovnání s tříměsíčními (Porkka-Heiskanen a spol. 2004). Naopak Kanbayashi ve své práci nenalezl rozdíly v hladinách orexinu A v MMM s ohledem na věk. Ani Higuchi ve své práci srovnávající plazmatické hladiny orexinu A u narkoleptických pacientů nenalezl signifikantní korelaci s věkem. Dalal a spol. také nenalezl korelaci s věkem u skupiny pacientů s narkolepsií ani u zdravých kontrol, stejně jako Nishijima a spol. u dospělých pacientů se syndromem spánkové apnoe (Kanbayashi a spol. 2002, Higuchi a spol. 2002, Dalal a spol. 2001, Nishijima a spol. 2003). V roce 2004 Tomasik a spol. popsal plazmatické hladiny orexinu A a B u dětí od novorozeneckého období po adolescenci (Tomasik a spol. 2004). Uvádí nejvyšší hladiny orexinu A u novorozenců a u dětí během puberty s jejich následným poklesem. Hladiny orexinu A u vyvíjejícího se organismu během dětství a adolescence mohou být ovlivněny mnoha faktory. Proto je jejich srovnání s věkem obtížné a vyžaduje podrobnější analýzu k vyloučení faktorů, které mohou výsledek ovlivnit, jako jsou např. pohlavní hormony během pubertálního zrání.

4.1.3. Vztah hladin orexinu A k tělesné výšce, pohlaví a menarché

Ve skupině obézních jedinců jsme nalezli negativní korelaci mezi plazmatickými hladinami orexinu A a tělesnou výškou a u pacientů s Crohnovou nemocí jsme zjistili negativní vztah mezi hladinami orexinu A a SD skóre tělesné výšky. Ve skupinách pacientů s mentální anorexií, celiakií ani v kontrolní skupině nebyla mezi těmito veličinami nalezena významná korelace.

Orexin A byl v odborné literatuře zmíněn v souvislosti s regulací sekrece růstového hormonu (GH) jak *in vitro* tak *in vivo* (Chen a Xu 2003, Seoane a spol. 2004, Lopez a spol. 2004). V naší studii jsme zjistili pozitivní korelaci mezi hladinami orexinu A a IGF-1 u pacientů s Crohnovou nemocí i s celiakií, ale nikoliv v kontrolní skupině. U pacientů s Crohnovou nemocí navíc orexin A pozitivně koreloval i s hladinami IGFBP-3. Produkce IGF-1 je pouze částečně ovlivňována sekrecí GH. Dalším z faktorů, které mohou ovlivnit jeho tvorbu je nutriční stav jedince. Je pravděpodobné, že účinek poruchy nutričního stavu u obézních jedinců nebo podvýživa u pacientek s mentální anorexií a u pacientů s Crohnovou nemocí a s celiakií může ovlivňovat sekreci IGF-1. Tuto hypotézu podporuje fakt, že hladiny

IGF-1 a jeho vazebného proteinu pozitivně korelovaly s tělesnou hmotností a BMI u pacientek s mentální anorexií. U těchto pacientek byly hladiny IGF-1 a IGF BP-3 měřeny před realimentací i po ní a byl zaznamenán signifikantní vzestup obou parametrů během terapeutické intervence. Efekt orexinu A na sekreci GH tedy nemusí být patrný na jeho vztahu k IGF-1. Pro přesnější zhodnocení vztahu orexinu A a GH u našich pacientů by bylo vzhledem k vysoké intraindividuální variabilitě v sekreci GH nutné provést stanovení GH nalačno za standardních podmínek.

V našem experimentu jsme nenalezli signifikantní rozdíl mezi plazmatickými hladinami orexinu A u chlapců a dívek ani v jedné ze studovaných skupin. U obézních chlapců byly průměrné hladiny před redukcí tělesné hmotnosti i po ní mírně vyšší než u dívek. Tento jev popisuje také např. Arihara a spol., který nalezl mírně vyšší průměrné hladiny plazmatického orexinu A u dospělých mužů než u žen, ale tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní (Arihara a spol. 2001). Matsumura uvádí plazmatické hladiny orexinu A v různých věkových skupinách u dospělých jedinců, ale ani v jednom ze sledovaných věkových pásem není patrná pohlavní diference. Ani Higuchi a spol. nenalezl rozdíl v hladinách orexinu A v závislosti na pohlaví u dospělých pacientů s narkolepsií a u zdravých kontrol. Dalal a spol. ani Tomasik a spol. nenalezli pohlavní rozdíly v hladinách plazmatického orexinu A (Matsumura a spol. 2002, Higuchi a spol. 2002, Dalal a spol. 2001, Tomasik a spol. 2004). Fakt, že hladiny orexinu A jsou v některých pracích mírně vyšší u chlapců, respektive mužů, než u žen, by bylo možno vysvětlit tím, že zjištěné plazmatické hladiny orexinu A nemusejí odpovídat plně jeho hypothalamické produkci i přesto, že byl prokázán jeho průnik přes hematoencefalickou bariéru prostou difusí (Kastin a Akerstrom 1999). V odborné literatuře byly popsány zdroje orexinu A mimo CNS. Jeho exprese byla prokázána např. v GIT myší (Sánchez de Miguel a Burrell 2002) u lidí pak v myenterickém plexu a endokrinních buňkách GIT, pankreatu a placentě (Nakabayashi a spol. 2003), dále v nadledvinách (Randeva a spol. 2001) a testes (Karteris a spol. 2004, Jöhren a spol. 2001, Mitsuma a spol. 2000). Poslední zmiňovaná lokalizace může být příčinou mírně vyšších hladin orexinu A u chlapců ve srovnání s děvčaty i přesto, že např. Nakabayashi a spol. přítomnost orexinu A v testes imunohistochemicky nepotvrdil (Nakabayashi a spol. 2003).

V naší studii jsme nezjistili statisticky signifikantní rozdíl mezi plazmatickými hladinami orexinu A u premenarcheálních dívek ve srovnání s postmenarcheálními. Tento rozdíl nebyl patrný ani před realimentací, ani po ní. Postmenarcheální dívky měly průměrné hladiny orexinu A v obou případech mírně vyšší. Vzhledem k tomu, že počet pacientek ve skupině premenarcheálních dívek byl nízký, mohl mít tento fakt vliv na statistickou

významnost rozdílu. V odborné literatuře jsme nenalezli práci, která hodnotí orexin A ve vztahu k menarché. Proto nelze naše výsledky spolehlivě konfrontovat. Případná možnost vlivu gonadálních steroidů na sekreci orexinu A již byla diskutována ve vztahu orexinu A k věku. K evaluaci těchto vztahů je zapotřebí dalších studií se stanovením sérových hladin pohlavních hormonů a zjištěním jejich korelace s hladinami orexinu A.

4.1.4. Vztah hladin orexinu A k tělesné hmotnosti

V naší studii jsme poprvé popsali změny plazmatických hladin orexinu A u obézních dětí a adolescentů během redukce tělesné hmotnosti. Naše výsledky podporují hypotézu, že plazmatické hladiny orexinu A u dětí mohou být ovlivněny změnami tělesné hmotnosti. O tom svědčí jejich signifikantní zvýšení ve skupině dívek i chlapců během redukční terapie a naopak snížení u premenarcheálních i postmenarcheálních dívek během realimentace. Ve skupině obézních pacientů, kteří lépe reagovali na redukční terapii (HR) byly změny hladin orexinu A větší než ve skupině LR. Tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní, pravděpodobně v důsledku malého počtu jedinců v každé ze studovaných skupin. U obézních dětí jsme prokázali negativní korelace s tělesnou hmotností a BMI. Tuto negativní korelaci popisuje také např. Adam a spol. u dospělých obézních pacientů (Adam a spol. 2002). Tomasik a spol. popsal negativní korelaci mezi orexinem A a BMI a pozitivní korelaci s kalorickou spotřebou u dětí s normálním nutričním stavem (Tomasik a spol. 2004). Naopak Komaki a spol. u obézních pacientů, Nishijima a spol. u pacientů se syndromem spánkové apnoe ani Higuchi et al a Dalal a spol. u pacientů s narkolepsií nenalezli korelaci mezi orexinem A a BMI, respektive procentem tělesného tuku (Komaki a spol. 2001, Nishijima a spol. 2003, Higuchi a spol. 2002, Dalal a spol. 2001). Matsumura a spol. dokonce uvádí pozitivní korelaci plazmatických hladin orexinu A a BMI, respektive množstvím tělesného tuku u pacientů s chronickou obstruktivní plicní nemocí (Matsumura a spol. 2003).

U pacientů s Crohnovou nemocí, s celiakií ani u pacientek s mentální anorexií nebyla korelace mezi orexinem A a tělesnou hmotností ani BMI nalezena. Jak ve skupině pacientů s Crohnovou nemocí, tak s celiakií jsme ve srovnání s kontrolní skupinou zjistili signifikantně zvýšené hladiny orexinu A, které se blížily hladinám zjištěným u pacientek s mentální anorexií. U těchto pacientek byly dříve popsány výrazné dysregulace v hormonálním řízení příjmu potravy a nutričního stavu, které se vyznačují výrazným přebytkem jak stimulačních (orexigenních), tak inhibičních (anorexigenních) regulačních hormonů (Inui 2001). Hladiny

orexinu A u pacientů s Crohnovou nemocí, s celiakií ani u pacientek s mentální anorexií nebyly doposud v literatuře publikovány. Proto nelze výsledky dosažené v naší studii porovnat s výsledky jiných autorů.

U obézních jedinců při redukci tělesné hmotnosti dochází současně se vzestupem plazmatických hladin orexinu A k poklesu sérových hladin leptinu. U pacientek s mentální anorexií je tomu naopak. Proto je otázkou, zda jsou změny hladin orexinu podmíněny změnami hladin leptinu. V naší práci jsme tento fakt neprokázali. Svědčí proti tomu nepřítomnost korelace uvedených analytů v periferní cirkulaci bez ohledu na redukci tělesné hmotnosti. I přesto, že již dříve bylo prokázáno, že neurony produkující orexin A v laterální hypothalamické oblasti jsou ve velmi úzkém vztahu k neuronům exprimujícím receptory pro leptin (Funahashi a spol. 2003), jsou do regulačních mechanismů hypothalamické exprese orexinu A pravděpodobně zahrnuty komplexnější regulační mechanismy (Archer a spol. 2002, Kok a spol. 2002). Těmi mohou být například další z regulačních peptidů (buď periferních – např. ghrelin, cholecystokinin nebo centrálních – neuropeptid Y, agouti-related protein), které mohou ovlivňovat produkci orexinu A v laterálním hypothalamu. Podobný účinek by mohly mít i mediátory zánětu u Crohnovy nemoci. Je známo, že některé cytokiny mohou v CNS imitovat vliv anorexigenních regulačních peptidů a tím významně ovlivnit příjem potravy a z dlouhodobého hlediska i nutriční stav organismu. K identifikaci těchto faktorů jsou zapotřebí další podrobnější studie.

4.1.5. Orexin A u pacientů s Crohnovou nemocí a s celiakií

V naší studii jsme nalezli signifikantně zvýšené hladiny orexinu A u nově diagnostikovaných, dosud neléčených pacientů jak s Crohnovou nemocí tak s celiakální sprue ve srovnání se zdravými kontrolami. Hladiny orexinu A u těchto dvou onemocnění nebyly doposud v literatuře popsány. Jedinou zmínkou o orexigenních a anorexigenních regulačních peptidech jsou dvě práce popisující hladiny ghrelinu u pacientů s celiakií a práce zmiňující produkci adiponektinu v mesenteriální tukové tkáni u pacientů s Crohnovou nemocí, která je diskutována níže (Yamamoto a spol. 2005). Peracchi a spol. popisuje signifikantně zvýšené hladiny plazmatického ghrelinu u neléčených dospělých pacientů s celiakií ve srovnání se zdravými kontrolami a pozitivní korelaci těchto hladin s rozsahem slizničního postižení. U pacientů léčených bezlepkovou dietou byly hladiny ghrelinu srovnatelné s kontrolní skupinou (Peracchi a spol. 2003). Vzhledem k tomu, že orexin A i ghrelin se řadí mezi orexigenní

peptidy, lze říci, že naše výsledky týkající se orexinu A u pacientů s celiakií jsou v souladu s výše uvedenými poznatky u ghrelinu. Naopak Capristo a spol. popisuje srovnatelné hladiny ghrelinu u pacientů s neléčenou celiakií a u zdravých kontrol a jejich signifikantní pokles během dvouroční léčby bezlepkovou dietou (Capristo a spol. 2005). Autor se domnívá, že tyto změny mohou být pouze částečně vysvětleny změnami tělesného složení během léčby bezlepkovou dietou a proto je třeba dalších studií k objasnění mechanismů ovlivňujících regulaci nutričního stavu u těchto pacientů. Hladiny orexinu A uvedené v naší studii byly stanoveny u nově diagnostikovaných (neléčených) pacientů a k prokázání dynamických změn by bylo vhodné stanovit rozdíly v hladinách jednotlivých regulačních peptidů s časovým odstupem.

4.2. Ghrelin

4.2.1. Hladiny ghrelinu

V naší studii se pohybovaly průměrné hladiny ghrelinu v rozmezí 721-938 pg/ml u obézních dětí před redukcí tělesné hmotnosti a v rozmezí 2583-3198 pg/ml u pacientek s mentální anorexií před realimentační léčbou. V průběhu redukce tělesné hmotnosti u obézních jedinců se hladiny přiblížily hladinám u pacientek s mentální anorexií po realimentaci, ale rozdíl ve výsledných hladinách byl stále patrný. Dá se tedy předpokládat, že narozdíl od orexinu A, ghrelin reaguje na změny tělesné hmotnosti prolongovaně a ani po 5, respektive 8 týdnech terapeutické intervence nedojde k jejich plné normalizaci. Vzhledem k tomu, že ani všichni obézní jedinci ani pacientky s mentální anorexií nedosáhly během terapie normální tělesné hmotnosti (respektive BMI) ani normálního nutričního stavu organismu, při pokračující terapeutické intervenci by se sledované hladiny ghrelinu pravděpodobně i nadále měnily. V odborné literatuře se uváděné plazmatické hladiny celkového ghrelinu liší podle použité metodiky. Rigamonti a spol. uvádí průměrné hladiny ghrelinu ráno nalačno u 12 zdravých jedinců s normální tělesnou hmotností 245 pg/ml při použití radioimunoanalýzy detekující celkový ghrelin v plazmě. Stejný autor uvádí u morbidně obézních pacientů průměrné hladiny 136 pg/ml a u pacientek s mentální anorexií 630 pg/ml (Rigamonti a spol. 2002). Soriano-Guillén a spol. udává průměrné hladiny u zdravých kontrol stanovené radioimunoanalytickou metodou 796 pg/ml (Soriano-Guillén a spol. 2004a). Shiiya a spol. uvádí průměrné hodnoty u zdravých kontrol 132,4 pmol/l (= 439 pg/ml) (Shiiya a spol. 2002).

Tanaka a spol. ve své studii použil ke stanovení ghrelinu v plazmě radioimunoanalýzu s předchozí extrakcí peptidu. U zdravých kontrol uvádí průměrné hladiny ghrelinu 123,4 pmol/l (= 409 pg/ml), u pacientek s restriktivním typem mentální anorexie 233,8 pmol/l (= 775 pg/ml) a u pacientek s bulimií 347,4 pmol/l (= 1152 pg/ml) (Tanaka a spol. 2003c). Tolle a spol. uvádí pro radioimunoanalýzu bez extrakce průměrné hodnoty u zdravých kontrol 208 pg/ml a u pacientek s mentální anorexií 491 pg/ml (Tolle a spol. 2003). Otto a spol. ve své práci používá komerčně dostupnou radioimunoanalýzu. Plazmatické hladiny ghrelinu se v této práci pohybovaly v rozmezí 514 pg/ml u zdravých kontrol až po 1057 pg/ml u pacientek s mentální anorexií (Otto a spol. 2001). Nedvídková a spol. ve své práci popisuje porušenou odpověď ghrelinu na příjem potravy u pacientek s mentální anorexií, u nichž průměrné hladiny ghrelinu byly signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny (1801 vs 796 pg/ml), u které po stimulaci stravou došlo k jejich signifikantnímu poklesu (Nedvídková a spol. 2003). Leidy a spol. uvádí vzestup hladin plazmatického ghrelinu u žen s normální tělesnou hmotností během tříměsíčního fyzického tréninku ze 770 na 1322 pmol/l (t.j. z 2553 na 4382 pg/ml) (Leidy a spol. 2004). Chanoine a spol. popsal v roce 2002 přítomnost ghrelinu v pupečníkové krvi u 90 donošených novorozenců. Imunoreaktivní ghrelin byl přítomen ve všech vzorcích již před prvním kojením dítěte a průměrné hladiny se pohybovaly okolo 187 pmol/l (= 620 pg/ml) s širokým rozmezím od 66 do 594 pmol/l (= 219 – 1969 pg/ml) (Chanoine a spol. 2002).

Lze tedy říci, že průměrné hladiny ghrelinu udávané v literatuře se pohybují v rozmezí stovek až tisíců pg/ml v závislosti na studované skupině pacientů a použité metodice. Naše studie odpovídá hodnotám srovnatelným s publikovanými pracemi v obou uváděných experimentech – jak u obézních pacientů, tak u pacientek s mentální anorexií.

V roce 2003 Espelund a spol. publikoval práci, v níž upozorňuje na nutnost konsensu v metodice stanovování ghrelinu. Popisuje řadu komerčně dostupných i laboratorně vyvinutých technik pro stanovování ghrelinu z plazmy a séra s využitím extrakční procedury nebo bez ní. Upozorňuje na fakt, že tato různorodost může ovlivnit jak dosažené výsledky, tak závěry vyvozené na jejich základě (Espelund a spol. 2003).

4.2.2. Vztah hladin ghrelinu k věku

V naší studii jsme nenalezli korelaci mezi hladinami ghrelinu a věkem ani u obézních pacientů ani ve skupině pacientek s mentální anorexií. Tato korelace není tedy přítomná ani

při různém věkovém rozložení probandů v jednotlivých skupinách (ve skupině obézních dětí od 6,9 do 18,5 let a ve skupině pacientek s mentální anorexií od 12,6 do 18,8 let).

Ani Shiiya a spol. ve své práci popisující plazmatické hladiny ghrelinu u obézních jedinců, pacientek s mentální anorexií a u zdravých kontrol nenalezl v kontrolní skupině žádnou korelaci ghrelinu s věkem (Shiiya a spol. 2002). Ghizzoni a spol. také nenalezl signifikantní vztah mezi chronologickým ani kostním věkem a sekrecí ghrelinu u prepubertálních eutrofických dětí ani u dětí s porušenou sekrecí růstového hormonu (Ghizzoni a spol. 2005). Bellone a spol. v sérii několika prací popisuje srovnatelné hladiny ghrelinu od novorozeneckého období po dospělost (Bellone a spol. 2002, 2003, 2004). Naopak Soriano-Guillén a spol. popisuje v kontrolní skupině štíhlých dětí signifikantně vyšší hladiny plazmatického ghrelinu u prepubertálních jedinců ve srovnání s postpubertálními. Je otázkou, zda je tento rozdíl způsoben věkem nebo vlivem dalších mechanismů, jako je např. pubertální vývoj a s ním spojených hormonálních změn. Tentýž autor v jiné studii zabývající se hladinami ghrelinu od novorozeneckého do adolescentního období popisuje signifikantní vzestup hladin ghrelinu bezprostředně po narození, který dosahuje vrcholu ve 2 letech života. Následně hladiny ghrelinu postupně klesají během dětství a dospívání. Autor také uvádí signifikantní negativní korelaci hladin ghrelinu s věkem. Vrchol sekrece ghrelinu tak odpovídá vrcholu sekrece GH během časného postnatálního období, kdy také dochází k významným změnám v příjmu potravy a nutričním stavu jedince (Soriano-Guillén a spol. 2004a,b). Paik a spol. popsal negativní korelaci mezi hladinami ghrelinu a věkem u 39 pacientů s Prader-Willi syndromem s průměrným věkem 6,2 let (Paik a spol. 2004). Inversní korelaci s věkem u pacientů s Prader-Willi syndromem ve věkovém rozmezí 4,5 – 14,6 let uvádí ve své práci i Haqq (Haqq a spol. 2003). Ikezaki ve své práci popisuje tendenci k negativní korelaci na hranici statistické významnosti mezi hladinami ghrelinu a věkem u 49 japonských dětí a adolescentů ve věkovém rozmezí 5-19 let (Ikezaki a spol. 2002). Celi a spol. uvádí srovnatelné hladiny acylovaného i celkového ghrelinu mezi prepubertálními a postpubertálními zdravými kontrolami, ale signifikantně vyšší hladiny u prepubertálních jedinců s diabetem 1.typu ve srovnání s postpubertálními (Celi a spol. 2005). V roce 2003 publikoval Whatmore a spol. práci popisující sérové hladiny ghrelinu stanovované RIA metodou, která detekuje aktivní i neaktivní ghrelin. Studie byla provedena na 121 zdravých dětech ve věkovém rozmezí 5-18 let. Výsledky této studie poukázaly na negativní korelaci hladin ghrelinu a věku, respektive pubertálního stadia (Whatmore a spol. 2003). Rigamonti a spol. také popisuje signifikantně nižší hladiny plazmatického ghrelinu u starších pacientů s normální tělesnou hmotností (věk 67-91 let) ve srovnání s mladšími (věk 27-39 let). Autor

vidí příčinu nižších hladin ghrelinu u starších jedinců ve zhoršené funkci žaludeční sliznice, která je hlavním zdrojem ghrelinu v organismu a ve stáří se snižuje její tloušťka, délka slizničních žlázek i počet funkčních endokrinně aktivních buněk (Rigamonti a spol. 2002). Nelze však vyloučit ani jiné vlivy jako např. změny v sekreci růstového hormonu a inzulínu nebo odlišné tělesné složení u starších pacientů.

Nepřítomnost korelace s věkem v naší studii může být způsobena mnoha faktory. Je známo, že bazální koncentrace plazmatického ghrelinu nalačno se liší u obézních pacientů a u pacientů s mentální anorexií ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých jedinců. Vzhledem k tomu, že výše uvedené studie popisují negativní korelaci s věkem pouze u zdravých kontrol, je možné, že porušená bazální sekrece ghrelinu u pacientů s patologickým nutričním stavem může vést k porušené korelaci hladin ghrelinu vzhledem k základním biologickým parametrům jedince, mezi něž patří i věk. Údaje o vztahu hladin ghrelinu k věku u dětí a adolescentů jsou na základě výsledků výše uvedených prací rozporuplné. Zdá se, že na bazální hladiny plazmatického ghrelinu má vliv řada fyziologických mechanismů (růst a vývoj sliznice trávicího traktu, hormony trávicího traktu, tukové tkáně, vlivy centrálního nervového systému, polymorfismy v genu pro ghrelin atd.), které pravděpodobně nejsou lineárně závislé na věku jedince, ale také na jeho genetickém pozadí a momentálním nutričním stavu organismu.

4.2.3. Vztah hladin ghrelinu k tělesné výšce, pohlaví a menarché

Vzhledem k tomu, že ghrelin je zmiňován také jako hormon, který zvyšuje sekreci GH, byla v jednotlivých skupinách naší studie hodnocena také korelace s tělesnou výškou. Hladiny ghrelinu u obézních pacientů po redukci tělesné hmotnosti negativně korelovaly s tělesnou výškou i SDS tělesné výšky. Tento vztah nebyl u pacientek s mentální anorexií nalezen. Stanovení korelace mezi hladinami ghrelinu a GH je technicky obtížné vzhledem k variabilitě sekrece GH během dne. Proto byl pro srovnání zvolen analyt s menší variabilitou – IGF-1. Nenalezli jsme žádnou statisticky významnou korelaci mezi ghrelinem a IGF-1 ani u obézních pacientů, ani ve skupině pacientek s mentální anorexií, u nichž ghrelin negativně koreloval s IGFBP-3. Misra a spol. popisuje mentální anorexii jako onemocnění asociované s vysokými sérovými hladinami GH a nízkými hladinami IGF-1. U adolescentních pacientek s touto diagnózou, které mají porušenou supresi GH po aplikaci glukózy, byly nalezeny signifikantně vyšší hladiny ghrelinu. Přímý vztah mezi hladinami GH a ghrelinu však nebyl

prokázán (Misra a spol. 2004). Ani Ikezaki a spol. ve své práci popisující hladiny plazmatického ghrelinu nalačno u obézních dětí a adolescentů nenalezl korelaci mezi ghrelinem a SDS tělesné výšky (Ikezaki a spol. 2002). Rigamonti nenalezl vztah mezi ghrelinem a IGF-1 ani u dospělých pacientů ve věkovém rozmezí 27-39 let, ani ve skupině starších jedinců (67-91 let) (Rigamonti a spol. 2002). Bellone a spol. popisuje negativní korelaci mezi hladinami ghrelinu a IGF-1, ale nikoliv s GH u 10 eutrofických prepubertálních dětí (Bellone a spol. 2004). Negativní korelaci s tělesnou výškou prokázal Bunt a spol. u desetiletých dětí Pima indiánů, kteří se vyznačují vysokou prevalencí obezity. Tato korelace byla zjištěna i vzhledem k tělesné výšce měřené během následujících několika let sledování této skupiny pacientů (Bunt a spol. 2003). Celi a spol. popisuje u zdravých eutrofických prepubertálních i postpubertálních jedinců pozitivní korelaci ghrelinu s IGFBP-1 (Celi a spol. 2005). Stejnou korelaci nalačno uvádí ve své práci i Soriano-Guillén a spol., za 60, respektive 120 min. po perorální aplikaci glukózy však tento vztah již není patrný. Tentýž autor popisuje také pozitivní korelaci hladin ghrelinu a IGFBP-1 u novorozenců, negativní korelaci s IGF-1 a IGFBP-3 a pozitivní korelaci s IGFBP- 1 a 2 během postnatálního života a puberty (Soriano-Guillén a spol. 2004b,c). V jiné studii téhož autora nebyla u obézních dětí nalezena korelace mezi ghrelinem a IGF-1, respektive IGFBP-2 a 3 ani se sekrecí GH (Soriano-Guillén a spol. 2004a). Naopak Park a spol. popisuje negativní korelaci mezi ghrelinem a tělesnou výškou u skupiny eutrofických dívek i chlapců s průměrným věkem 12,6 let (Park a spol. 2005). Whatmore a spol. v rozsáhlé práci hodnotící hladiny ghrelinu u 121 zdravých dětí a adolescentů ve věkovém rozmezí 5-18 let popisuje negativní korelaci s hladinami IGF-1 a IGFBP-3 a pozitivní korelaci s IGFBP-1, ale neuvádí žádný statisticky významný vztah k IGF-2 ani k SDS tělesné výšky. Autor se domnívá, že tyto výsledky nesvědčí pro fakt, že primární funkcí ghrelinu *in vivo* je regulace sekrece GH. Tímto mechanismem může přechodně působit zejména během pozdních fází gestace a v časném postnatálním období života (Whatmore a spol. 2003). Na úlohu ghrelinu v indukci sekrece GH byla zaměřena práce autorů Ghizzoni a spol., která popisuje vztah mezi 24-hodinovou sekrecí ghrelinu a GH u 10 prepubertálních zdravých jedinců a u 5 jedinců s neurosekretorickou dysfunkcí GH. Autoři prokázali, že sekrece ghrelinu u prepubertálních jedinců je pulsatilní, stejně jako sekrece GH. Závěry studie však naznačují, že ghrelin nemá přímý vliv na pulsatilitu GH, ale vyplavování obou hormonů by mohlo být společně řízeno působením somatostatinu, který pravděpodobně inhibuje sekreci GH přímo, ale také nepřímo prostřednictvím potlačení sekrece ghrelinu (Ghizzoni a spol. 2005).

Aplikace ghrelinu u lidí ve farmakologických dávkách vede ke stimulaci sekrece GH. Otázkou však zůstává, jaká je skutečná fyziologická úloha ghrelinu v organismu. Negativní korelace ghrelinu vzhledem k tělesné výšce, respektive IGF-1 naznačuje možnou úlohu ghrelinu v regulaci tělesného růstu *in vivo*. Regulační mechanismus by mohl být založen na negativní zpětné vazbě mezi IGF-1 a ghrelinem. Naopak některé rozpačité údaje ve vztahu k hladinám GH naznačují, že hlavní fyziologickou funkcí ghrelinu je regulace tělesné hmotnosti a nutričního stavu organismu, nikoliv regulace sekrece GH, která je pravděpodobně pouze sekundární.

Také ve vztahu hladin ghrelinu k pohlaví jsou výsledky studií kontroverzní. V naší studii obézních dětí byly u chlapců signifikantně nižší hladiny ghrelinu než u dívek jak před redukcí tělesné hmotnosti, tak po ní. Tento rozdíl byl patrný i přesto, že u chlapců i dívek byl srovnatelný věk, tělesná výška, iniciální tělesná hmotnost i BMI. Naopak rozdíl v hladinách ghrelinu mezi chlapci a dívkami nebyl nalezen ve skupině obézních dětí ani zdravých kontrol ve studii publikované Bacha a spol., ani ve studii Ikezaki a spol. u 49 japonských dětí a adolescentů v rozmezí 5-19 let věku (Bacha a Arslanian 2005, Ikezaki a spol. 2002). Ve studii popisující stanovení ghrelinu v pupečníkové krvi 90 novorozenců nebyl statisticky signifikantní rozdíl v hladinách mezi chlapci a dívkami (Chanoine a spol. 2002). Pohlavní rozdíly v hladinách ghrelinu nebyly nalezeny ani u 10 letých Pima indiánů (Bunt a spol. 2003). Bellone a spol. neprokázal signifikantní rozdíl v koncentracích ghrelinu mezi chlapci a dívkami u 29 zdravých jedinců a u 36 pacientů s obezitou a v jiné studii prokázal, že hladiny ghrelinu jsou nezávislé na pohlaví od narození do dospělosti (Bellone a spol. 2002, 2003). Shiiya a spol. neprokázal signifikantní rozdíl v závislosti na pohlaví ve studii popisující hladiny ghrelinu u dospělých obézních jedinců, pacientek s mentální anorexií a zdravých kontrol (Shiiya a spol. 2002). Soriano-Guillén a spol. nezjistil signifikantní rozdíly v hladinách ghrelinu v závislosti na pohlaví ani u novorozenců ani u zdravých jedinců v průběhu prepubertálního a pubertálního období (Soriano-Guillén a spol. 2004b). Stejně tak Whatmore a spol. v rozsáhlé studii hodnotící hladiny ghrelinu u zdravých dětí a adolescentů neprokázal významné pohlavní rozdíly (Whatmore a spol. 2003). Tato data korespondují s výsledky studie Ghizzoni a spol. u normálních prepubertálních dětí a u pacientů s deficitem sekrece GH (Ghizzoni a spol. 2005). Rigamonti a spol. neprokázal pohlavní rozdíly ani u dospělých a starších jedinců (Rigamonti a spol. 2002). Ani u pacientů s Prader-Willi syndromem, u obézních dětí ani u zdravých kontrol nebyl uvedený rozdíl prokázán (Paik a spol. 2004). V literatuře jsme nenalezli práci vysvětlující z komplexního hlediska vztah ghrelinu k pohlaví jedince, avšak vzhledem k tomu, že řada jiných hormonů vykazuje ve své

sekreci rozdíly mezi muži a ženami, je možné, že i ghrelin je do určité míry regulován obdobným způsobem. Je známo, že sekrece GH se významně liší mezi muži a ženami a může se během života jedince zvýšit až 20-násobně v závislosti na věku a sexuální maturaci jedince (Veldhuis a spol. 2003). Vzhledem k tomu, že hladiny GH u žen jsou v průměru 2x vyšší než u mužů, mohly by nižší hladiny ghrelinu u pubertálních hochů v naší studii vypovídat o existenci negativní zpětné vazby zprostředkované GH a IGF-1. Odlišnost plazmatických hladin ghrelinu v jednotlivých studiích mezi muži a ženami závisí pravděpodobně na výběru skupiny sledovaných jedinců, jejich věku a pohlavní dospělosti. Jednotlivé studie se proto ve svých závěrech mohou lišit.

Ve skupině pacientek s mentální anorexií nebyl statisticky významný rozdíl mezi premenarcheálními a postmenarcheálními dívkami. Tento rozdíl nebyl patrný ani před realimentací, ani po ní. Vzhledem k tomu, že počet pacientek ve skupině premenarcheálních dívek byl nízký, mohl mít tento fakt vliv na statistickou významnost rozdílu. V odborné literatuře jsme nenalezli práci, která hodnotí hladiny ghrelinu ve vztahu k menarché. Proto nelze naše výsledky spolehlivě konfrontovat. Zvýšení počtu pacientek v obou skupinách by prokázalo rozdíly s větší statistickou významností. Lze se pouze vyjádřit k hladinám ghrelinu vzhledem k pubertálním stadiím. Tento vztah je diskutován v řadě prací. Dostupné studie, které popisují hladiny ghrelinu u dětí a adolescentů a v nichž je zmíněn vztah k pubertálnímu zrání, uvádí rozporuplné údaje o závislosti hladin ghrelinu na stupni pohlavní zralosti. Negativní korelaci hladin ghrelinu s pubertálním zráním popisuje Vivenza a spol. v práci, která se zabývá polymorfismy v ghrelinovém genu ve vztahu k biochemickým a antropometrickým ukazatelům nutričního stavu u dětí a adolescentů (Vivenza a spol. 2004). Naopak Bellone a spol. ve své práci zaměřené na hladiny ghrelinu vzhledem k pohlavní zralosti popisuje zcela nezávislý vztah plazmatického ghrelinu k jednotlivým pubertálním stadiím a v jiné ze svých prací uvádí srovnatelné hodnoty jeho plazmatických koncentrací u prepubertálních dětí a dospělých jedinců (Bellone a spol. 2002, 2003). Vyšší hladiny ghrelinu u prepubertálních dětí s DM 1.typu ve srovnání s postpubertálními uvádí ve své práci Celi a spol. Tento rozdíl však nepozoruje ve skupině zdravých kontrol (Celi a spol. 2005). Nižší hladiny ghrelinu u pacientů s vyšším stadiem zralosti dle Tannera prokázal ve své práci i Soriano-Guillén a spol. Největší rozdíly byly nalezeny mezi Tannerovým stadiem 1 a 2 ve srovnání se stadii 3-5. Tentýž autor v jiné práci popisuje signifikantně vyšší hladiny ghrelinu u jedinců s Tannerovým stadiem 1 ve srovnání se stadiem 5 (Soriano-Guillén a spol. 2004a,b). Také Whatmore uvádí vyšší hladiny ghrelinu u zdravých prepubertálních jedinců ve srovnání s pubertálními (Whatmore a spol. 2003). Na základě výše uvedených údajů je pravděpodobné,

že gonadální steroidy nemají přímý pozitivní vliv na sekreci ghrelinu v pubertálním období. Je možné, že snížení sekrece ghrelinu během puberty může souviset se snižujícími se hladinami se vzrůstajícím věkem, jak již bylo diskutováno výše. Z tohoto pohledu je zajímavé, že pokles hladin ghrelinu v organismu pokračuje i do pozdního stáří, jak prokázal např. Rigamonti (Rigamonti a spol. 2002)

4.2.4. Vztah hladin ghrelinu k tělesné hmotnosti

V naší studii jsme prokázali snížené hladiny plazmatického ghrelinu u obézních dětí ve srovnání s pacientkami s mentální anorexií. Zároveň jsme popsali jejich dynamické změny při redukci tělesné hmotnosti, respektive realimentaci. Tyto výsledky poukazují na fakt, že hladiny ghrelinu jsou velmi významně ovlivněny změnami tělesné hmotnosti organismu a jsou v bezprostředním vztahu k jeho nutričnímu stavu.

Snížené hladiny ghrelinu u obézních jedinců ve srovnání se zdravými kontrolami a jejich postupný vzestup při redukci tělesné hmotnosti popisují i jiní autoři (Bellone a spol. 2002, Bunt a spol. 2003, Bacha a Arslanian 2005). Korbonits a spol. identifikoval pacienty s polymorfismem v ghrelinovém genu (Leu72Met), kteří měli signifikantně vyšší SDS BMI ve srovnání s pacienty, u nichž není tento polymorfismus přítomen (Korbonits a spol. 2002). Haqq a spol. a Paik a spol. uvádí vyšší hladiny ghrelinu u pacientů s Prader-Willi syndromem ve srovnání s kontrolní skupinou (Haqq a spol. 2003, Paik a spol. 2004). Naopak Reinehr a spol. nezaznamenal signifikantní změny hladin ghrelinu u 37 obézních dětí během jednoročního ambulantního programu redukce tělesné hmotnosti. Tyto změny nebyly patrné ani při podrobnější analýze skupiny dětí se signifikantně lepší reakcí na redukční terapii. Iniciální hladiny ghrelinu byly signifikantně nižší u obézních jedinců ve srovnání se zdravými kontrolami (Reinehr a spol. 2005). Kanumakala nezaznamenal signifikantní rozdíl v hladinách ghrelinu mezi pacienty s hypothalamickou obezitou a prostou obezitou z hyperalimentace, u obou skupin však byly hladiny signifikantně odlišné od zdravých eutrofických kontrol (Kanumakala a spol. 2005). Ve skupině HR jsme v naší studii nalezli tendenci k výraznějšímu zvýšení hladin ghrelinu ve srovnání s LR skupinou u obou pohlaví. Soriano-Guillén u obézních jedinců nepozoruje rozdíly v hladinách ghrelinu u pacientů, kteří měli po redukci tělesnou hmotnost větší, resp. menší než 2SD průměrné hmotnosti, ale zároveň nenalezl korelaci mezi hladinami ghrelinu a BMI u obézních pacientů (Soriano-Guillén a spol. 2004a).

V naší studii jsme nalezli negativní korelaci mezi hladinami ghrelinu a tělesnou hmotností před redukcí tělesné hmotnosti a ještě významnější korelaci po její redukci. Negativní korelaci mezi ghrelinem a BMI uvádí i Bacha a spol. u prepubertálních dětí a Paik a spol. u pacientů s Prader-Willi syndromem (Bacha a Arslanian 2005, Paik a spol. 2004). Ikezaki a spol. popisuje u 49 obézních dětí negativní korelaci mezi plazmatickými hladinami ghrelinu nalačno a BMI, resp. obvodem pasu, ale nikoliv s procentem tělesného tuku (Ikezaki a spol. 2002).

V naší práci jsme zjistili signifikantní pokles hladin ghrelinu u pacientek s mentální anorexií během realimentace. Zároveň jsme u těchto pacientek zaznamenali i negativní korelaci mezi hladinami ghrelinu a BMI, respektive SDS BMI. Vyšší hladiny ghrelinu u pacientek s mentální anorexií ve srovnání se zdravými kontrolami byly popsány řadou autorů (Otto a spol. 2001, Broglio a spol. 2004, Tolle a spol. 2003, Tanaka a spol. 2002, 2003a,b,c, Kršek a spol. 2003, Misra a spol. 2004 a další). Vzestup hladin ghrelinu během redukce tělesné hmotnosti díky tříměsíčnímu intenzivnímu tréninku u zdravých žen popisuje Leidy (Leidy a spol. 2004). Tanaka a spol. v sérii prací popisuje negativní korelaci hladin ghrelinu s parametry nutričního stavu, jako je BMI, procento tělesného tuku a sérová koncentrace cholinesterázy jak u pacientek s mentální anorexií, tak u bulimiček i zdravých žen (Tanaka a spol. 2002, 2003a,b,c). Negativní korelaci ghrelinu a BMI uvádí Shiiya a spol. u pacientek s mentální anorexií, obézních jedinců, zdravých kontrol i u pacientů s DM 2.typu (Shiiya a spol. 2002). Negativní korelaci ghrelinu s procentem tělesného tuku uvádí i Nedvídková (Nedvídková a spol. 2003), naopak Celi a spol. nenalezl signifikantní vztah mezi hladinami ghrelinu a množstvím tělesného tuku u zdravých dětí (Celi a spol. 2005). Soriano-Guillén popisuje signifikantní rozdíly v hladinách ghrelinu u donošených novorozenců v závislosti na porodní hmotnosti vztažené ke gestačnímu věku. Tentýž autor uvádí signifikantní negativní korelaci ghrelinu s BMI v kontrolní skupině zdravých prepubertálních i postpubertálních dětí, ale nenalezl tuto korelaci ani u obézních jedinců, ani u pacientek s mentální anorexií (Soriano-Guillén a spol. 2004a,b).

Park a spol. v detailní studii vztahů ghrelinu k antropometrickým parametrům u dětí popisuje negativní korelaci s tělesnou hmotností, BMI, procentem tělesného tuku a obvodem pasu a boků u chlapců i dívek. Také uvádí negativní korelaci s hladinami triacylglycerolů a inzulínu a u chlapců pozitivní korelaci s HDL cholesterolem (Park a spol. 2005). Whatmore nalezl u 121 zdravých dětí a adolescentů ve věkovém rozmezí 5-19 let negativní korelaci mezi hladinami ghrelinu a SDS BMI a SDS tělesné hmotnosti (Whatmore a spol. 2003). Negativní korelaci mezi ghrelinem a BMI popsal Rigamonti a spol. u pacientů s morbidní obezitou,

neléčenou mentální anorexií i u zdravých kontrol v širokém věkovém rozmezí (27-91 let) (Rigamonti a spol. 2002).

V naší studii po redukci tělesné hmotnosti korelovaly hladiny celkového ghrelinu pozitivně s plazmatickými hladinami orexinu A. tyto výsledky nelze spolehlivě konfrontovat s literárními údaji vzhledem k tomu, že jsme v odborné literatuře nenalezli práci popisující korelaci těchto dvou analytů. Oba peptidy se řadí do skupiny orexigenních peptidů a lze tedy předpokládat, že regulace jejich sekrece má společný biochemický podklad a jejich hladiny jsou ovlivněny podobným způsobem v závislosti na nutričním stavu organismu.

V naší studii jsme nezjistili korelaci mezi plazmatickými hladinami ghrelinu a sérovými hladinami leptinu či adiponektinu u obézních jedinců ani před redukcí tělesné hmotnosti ani po ní, ale popsali jsme negativní korelaci mezi ghrelinem a leptinem u pacientek s mentální anorexií. Soriano-Guillén a spol. ve své studii nenalezl tuto korelaci u obézních dětí ani u mentálních anorektiček (Soriano-Guillén a spol. 2004a), ale negativní korelaci mezi ghrelinem a leptinem prokázal Tolle a spol. u konstitučně štíhlých žen a u pacientek s mentální anorexií před realimentací (Tolle a spol. 2003). Naopak Chanoine a spol. popisuje u novorozených chlapců pozitivní korelaci mezi hladinami ghrelinu a leptinu v pupečníkové krvi. Je otázkou, zda je sekrece ghrelinu přímým způsobem ovlivněna těmito produkty tukové tkáně, nebo zda se na její regulaci podílejí jiné faktory, které tvoří spojovací prvek mezi množstvím tělesného tuku a produkcí gastrointestinálních peptidů. Bazální sekrece ghrelinu tak může být ovlivněna např. hypothalamickými centry prostřednictvím eferentních vláken bloudivého nervu nebo jinými produkty adipocytů, jako je např. TNF-alfa nebo resistin. Navíc přirozené vazby mezi jednotlivými regulačními hormony, které jsou funkční u zdravých eutrofických jedinců, mohou být u pacientů s poruchou nutričního stavu modifikovány. U pacientek s mentální anorexií byla např. pozorována tzv. „ghrelinová resistence“, kdy při nadbytku endogenního ghrelinu je oslabena endokrinní odpověď na jeho aplikaci (Broglio a spol. 2004). U těchto pacientek také nedochází k poklesu endogenní produkce ghrelinu po podání standardizované stravy, jak je tomu u zdravých jedinců (Nedvídková a spol. 2003). Tento jev může být součástí chronické adaptace na prolongovanou restrikci potravy a může přispívat k obnově normálního příjmu stravy po odeznění primární příčiny onemocnění.

4.3. Adiponektin

4.3.1. Hladiny adiponektinu

V naší studii se pohybovaly sérové hladiny adiponektinu u obézních dětí před redukcí tělesné hmotnosti v rozmezí 4-15 ug/ml (s jedním odjedinělým odlehlým výsledkem 25,5 ug/ml) a v rozmezí 5-24 ug/ml u pacientek s mentální anorexií před realimentační léčbou. V průběhu redukce tělesné hmotnosti u obézních jedinců se hladiny téměř neměnily, zatímco během realimentace pacientek s mentální anorexií došlo k jejich signifikantnímu vzestupu.

V odborné literatuře se uváděné plazmatické hladiny adiponektinu liší mezi jednotlivými studiemi v závislosti na použité metodice. Pischon a spol. uvádí hladiny adiponektinu u 24 zdravých jedinců v rozmezí 9-22 ug/ml při použití komerční radioimunoanalýzy (Pischon a spol. 2003). Delporte a spol. uvádí průměrné hladiny u zdravých kontrol stanovené radioimunoanalytickou metodou v rozmezí 10-15 ug/ml (Delporte a spol. 2003). Bruun a spol. uvádí průměrné hodnoty měřené stejnou metodou u zdravých kontrol 4,6 ug/ml u obézních jedinců před redukcí tělesné hmotnosti 2,3 ug/ml a po 20 týdenní redukci 3,4 ug/ml (Bruun a spol. 2003). Bacha a spol. uvádí při použití stejné metodiky signifikantně nižší hladiny adiponektinu u černošských dětí (9,9 ug/ml) ve srovnání s bělošskými (15,7 ug/ml) (Bacha a spol. 2005). Arita a spol. popisuje ve své práci vývoj ELISA metody, díky níž stanovil plazmatické hladiny adiponektinu u zdravých dobrovolníků v rozmezí 1,9 – 17 ug/ml (Arita a spol. 1999). Lawlor a spol. uvádí průměrné hladiny adiponektinu u starších zdravých žen 15 ug/ml (Lawlor a spol. 2005).

Lze tedy říci, že průměrné hladiny adiponektinu udávané v literatuře se pohybují v rozmezí 5 – 20 ug/ml v závislosti na studované skupině pacientů a použité metodice. Naše studie odpovídá těmto hodnotám v obou uváděných experimentech – jak u obézních pacientů, tak u pacientek s mentální anorexií.

Adiponektin je potencionálním kandidátem pro klinické využití v biochemické diagnostice zejména u pacientů se symptomy metabolického syndromu. Vzhledem k této skutečnosti je třeba zhodnotit jeho vlastnosti jako biochemického analytu. V roce 2003 publikoval Pischon a spol. práci hodnotící stabilitu adiponektinu ve vzorcích plazmy od 24 dobrovolníků (věkové rozmezí 53-65 let) během 36 hodin a jeho intraindividuální variabilitu v průběhu 1 roku života (Pischon a spol. 2003). Hodnotil stabilitu vzorků plazmy odebrané po 12 hodinovém lačnění do zkumavek s EDTA nebo Na-heparinem. Hladiny adiponektinu byly

stanoveny při počátku studie a za následujících 24 a 36 hodin metodou RIA (Linco). Koncentrace adiponektinu ve vzorcích odebraných do Na-heparinu se signifikantně nelišily, zatímco u vzorků odebraných do EDTA byla koncentrace po 36 hodinách mírně vyšší (p=0,05). Ve vzorcích odebraných v odstupu jednoho roku byly koncentrace adiponektinu mírně nižší, ale po korekci na BMI nebyl rozdíl statisticky signifikantní. Výsledky této studie prokazují, že transport a uchovávání adiponektinu na ledu do 36 hodin od provedení odběru, není pravděpodobně zdrojem systémové chyby měření. Mírně vyšší koncentrace adiponektinu ve vzorcích EDTA po 36 hodinách považuje autor za důsledek disociace polymerních forem adiponektinu na monomerní. Suominen a spol. v roce 2004 publikoval práci, v níž na vzorcích od 59 jedinců popisuje analytickou srovnatelnost radioimunoanalýzy a enzymové imunoanalýzy. Zároveň prokázal dobrou stabilitu adiponektinu ve vzorcích i během opakovaných zamrazovacích cyklů (Suominen a spol. 2004). Vzhledem k nízké intraindividuální variabilitě adiponektinu během delšího časového období a jeho dobrým analytickým vlastnostem je vhodné jeho použití jako biomarkeru inzulínové senzitivity pro výzkumné účely.

4.3.2. Vztah hladin adiponektinu k věku

V naší studii jsme zjistili negativní vztah mezi adiponektinem a věkem u obézních pacientů, nikoliv však u pacientek s mentální anorexií. Pischon a spol. nepopsal signifikantní vztah mezi hladinami adiponektinu a věkem u jedinců ve věkovém rozmezí 53-65 let (Pischon a spol. 2003). Ani Arita a spol. nepopsal uvedenou korelaci u 57 obézních jedinců a 87 zdravých kontrol s průměrným věkem 42,3, respektive 50,4 let (Arita a spol. 1999). Stefan a spol. hodnotil longitudinálně hladiny adiponektinu u prepubertálních Pima indiánů v 5 a 10 letech věku. Hladiny adiponektinu postupně klesaly se vzrůstajícím množstvím tukové tkáně (Stefan a spol. 2002). Negativní vztah mezi hladinami adiponektinu a věkem popisuje také Reinehr a spol. u 42 obézních prepubertálních a pubertálních dětí (Reinehr a spol. 2004). Naopak Lawlor a spol. popisuje pozitivní korelaci mezi hladinami adiponektinu a věkem u starších žen ve věkovém rozmezí 60-79 let (Lawlor a spol. 2005). Údaje o vztahu sérových hladin adiponektinu k věku jsou v odborné literatuře rozporuplné. Největší vliv na výsledky v jednotlivých studiích má dle našeho názoru výběr skupiny zkoumaných jedinců. Zvláště u dětí a adolescentů je posouzení tohoto vztahu obtížné vzhledem k předpokládaným vazbám hladin adiponektinu na vliv pohlavních hormonů, zejména v období pubertálního vývoje. Při

hodnocení výsledků musí být také přihlédnuto k jiným známým regulačním faktorům, které hladiny adiponektinu ovlivňují (množství tukové tkáně, inzulín, TNF-alfa apod.).

4.3.3. Vztah hladin adiponektinu k tělesné výšce, pohlaví a menarché

V naší studii jsme u obézních jedinců prokázali negativní korelaci mezi adiponektinem a tělesnou výškou pacientů. Také sérové hladiny IGF-1 u těchto pacientů korelovaly negativně se sérovými hladinami adiponektinu před redukcí hmotnosti i s hladinami po redukci. Naopak mezi hladinami IGF BP-3 a adiponektinu korelace nebyla. U pacientek s mentální anorexií jsme žádný vztah mezi adiponektinem a tělesnou výškou, IGF-1 ani IGFBP-3 nepozorovali. V roce 2005 popsal Nilsson a spol. potlačení exprese adiponektinu a jeho receptoru typu 2 na kultuře lidských adipocytů vlivem GH. Zároveň popsal snížené hladiny adiponektinu v séru u myší exprimujících gen pro bovinní GH a zvýšené sérové hladiny adiponektinu u myší deficientních v genu pro GH receptor (Nilsson a spol. 2005). Na základě těchto faktů se zdá, že mezi adiponektinem a osou GH existuje v organismu fyziologický vztah, pravděpodobně na základě negativní zpětné vazby prostřednictvím přímého ovlivnění exprese adiponektinového genu v tukové tkáni.

Stejně jako u hladin leptinu se zdá, že hladiny adiponektinu jsou závislé na pohlaví. V několika studiích bylo opakovaně prokázáno, že hladiny adiponektinu jsou vyšší u žen než u mužů (Scherer a spol. 1995, Yamamoto a spol. 2002, Hotta a spol. 2000, Zoccali a spol. 2002). Arita a spol. popsal tento rozdíl u skupiny obézních dospělých jedinců i u zdravých kontrol (Arita a spol. 1999) a Huang a spol. u adolescentů ve věkovém rozmezí 10-19 let (Huang a spol. 2004). Reinehr a spol. popisuje vyšší hladiny adiponektinu u pubertálních dívek ve srovnání s chlapci, ale tento rozdíl nepozoruje u prepubertálních jedinců (Reinehr a spol. 2004). V roce 2002 Nishizawa popsal, že testosteron snižuje plazmatické hladiny adiponektinu (Nishizawa a spol. 2002). Naopak Gavrila a spol. nenachází žádný vztah mezi sérovými hladinami adiponektinu a testosteronu (Gavrila a spol. 2003). Stefan a spol. také nenalezl u Pima indiánů signifikantní rozdíl v hladinách adiponektinu mezi 5 letými ani 10 letými chlapci a dívkami (Stefan a spol. 2002). Ani v naší studii nebyl rozdíl mezi chlapci a dívkami u obézních dětí statisticky významný, i když průměrné hladiny u dívek byly vyšší před redukcí tělesné hmotnosti i po ní. Vyšší hladiny adiponektinu u žen nejsou v souladu ani s poznatkem, že ženy mají obecně vyšší procento tělesného tuku než muži. Naopak nižší hladiny adiponektinu u mužů by mohly souviset s jejich vyšším rizikem vzniku inzulínové

rezistence a aterosklerózy. Je pravděpodobné, že intenzita exprese adiponektinu není determinována pouze množstvím tukové tkáně, ale také jinými faktory, jako např. pohlavními hormony.

Průměrné hladiny adiponektinu v naší studii byly u postmenarcheálních dívek před realimentací signifikantně nižší než u premenarcheálních. Po realimentaci nebyl tento rozdíl statisticky významný. Reinehr a spol. popisuje signifikantně nižší hladiny adiponektinu u pubertálních dětí ve srovnání s prepubertálními (Reinehr a spol. 2004). Na rozdílu hladin adiponektinu vzhledem k menarché se může podílet několik faktorů. Mohlo by se např. jednat o vliv celkového množství tukové tkáně, které je u postmenarcheálních dívek větší, nebo o vliv pohlavních hormonů, jak již bylo diskutováno v části týkající se pohlavních rozdílů v hladinách adiponektinu. Literární údaje o vztahu adiponektinu k menarché u dívek nejsou dostupné, proto nelze naše výsledky spolehlivě konfrontovat.

4.3.4. Vztah hladin adiponektinu k tělesné hmotnosti

Je známo, že hladiny adiponektinu u obézních jedinců jsou signifikantně nižší než u zdravých kontrol (Arita a spol. 1999). Cianflone prokázal tento rozdíl také u 124 dětí ve věku od 2 do 6 let (Cianflone a spol. 2005). V naší studii jsme nenalezli signifikantní změny v hladinách adiponektinu během redukce tělesné hmotnosti u obézních pacientů. Hladiny adiponektinu před redukcí tělesné hmotnosti vysoce signifikantně korelovaly s hladinami po redukci. Tento fakt svědčí pro to, že sérové hladiny adiponektinu u jednotlivých pacientů zůstaly během redukční terapie vysoce stabilní a nedocházelo k jejich výrazným výkyvům. Pacienti, kteří měli nízké hladiny adiponektinu před zahájením terapie, si je zachovávali po celou dobu pěti týdnů trvání studie a obdobně reagovali i pacienti s vyššími hladinami adiponektinu v séru. Vzhledem k celkově nesignifikantní změně hladin během redukční léčby nebyly žádné výrazné změny adiponektinu pozorovány ani při rozdělení pacientů do HR a LR skupin. Naše výsledky jsou v souladu s recentní prací Manigrasso a spol., v níž nebyly pozorovány signifikantní změny v hladinách adiponektinu u dospělých obézních žen během 12 týdenní redukce tělesné hmotnosti (Manigrasso a spol. 2005) a s prací Anderlová a spol., v níž nebyly pozorovány signifikantní změny sérových hladin adiponektinu u obézních žen během třítýdenního podávání stravy o velmi nízké kalorické hodnotě (Anderlová a spol. 2005). Imbeault a spol. dospěl ke stejným výsledkům během 4 denní kalorické restrikce u 15 zdravých mladých mužů (Imbeault a spol. 2004). Naopak zvýšení hladin adiponektinu během

redukce tělesné hmotnosti popisoval u dospělých obézních jedinců Yang (Yang a spol. 2001) a Reinehr a spol. u dětí, které signifikantně snížily svoji hmotnost během redukční terapie trvající 1 rok. U dětí, které na redukční terapii nezareagovaly, nedošlo k signifikantním změnám v hladinách adiponektinu (Reinehr a spol. 2004). Bruun a spol. uvádí zvýšení průměrných hladin adiponektinu v plazmě u dospělých obézních jedinců během 24 týdenní redukce tělesné hmotnosti o 51% a v tukové tkáni zvýšení exprese adiponektinové mRNA o 45% (Bruun a spol. 2003).

Vzhledem k tomu, že v naší studii nedošlo během 5 týdenní redukční terapie k signifikantní změně hladin adiponektinu, zdá se, že tato doba není dostatečná pro nástup regulačních mechanismů, které ovlivňují tvorbu adiponektinu v závislosti na nutričním stavu organismu. Uvedený jev má ovšem i jiné možné vysvětlení. V roce 2003 Matsubara a spol. popsal negativní asociaci hladin adiponektinu s inzulínovou rezistencí u nediabetických pacientů nezávisle na věku, krevním tlaku, celkovém množství tukové tkáně a sérové koncentraci lipidů (Matsubara a spol. 2003). Je tedy možné, že u obézních dětí, které nevyvinou dostatečný stupeň inzulínové rezistence, nedojde během redukce tělesné hmotnosti k signifikantním změnám adiponektinu, protože jeho sérové hladiny neodrážejí bezprostředně množství tukové tkáně v organismu, ale spíše jsou korelátem inzulínové senzitivity. Pro přesnější ověření této hypotézy by bylo nutné stanovit sérové hladiny adiponektinu během redukce tělesné hmotnosti u obézních dětí zároveň se stanovením jejich inzulínové rezistence.

U pacientek s mentální anorexií byly průměrné hladiny adiponektinu vyšší než u obézních jedinců, ale během realimentace došlo k jejich dalšímu zvýšení, které bylo u postmenarcheálních dívek statisticky signifikantní. Řada studií uvádí zvýšené hladiny sérového adiponektinu u pacientek s mentální anorexií ve srovnání se zdravými kontrolami (Nedvídková a spol. 2005, Matsubara a spol. 2002, Delporte a spol. 2003, Iwahashi a spol. 2003), ale výše uvedené studie jsou prováděny na dospělých pacientkách. Zvýšená exprese adiponektinu v mesenteriálním tuku byla prokázána také u jiných pacientů, kteří mohou trpět poruchou nutričního stavu, jako je např. Crohnova nemoc (Yamamoto a spol. 2005). Dle výše uvedených literárních údajů bychom očekávali v naší studii během realimentace pokles v sérových hladinách adiponektinu. Fakt, že zejména postmenarcheální pacientky v naší studii reagovaly opačným způsobem, poukazuje na možný vliv dalších faktorů na produkci adiponektinu v perimenarcheálním období, zejména pohlavních hormonů, jejichž produkce se během dospívání u dívek za fyziologických podmínek významně mění a navíc dochází k jejich negativnímu ovlivnění v důsledku poruchy nutričního stavu u mentální anorexie. O takovémto vlivu svědčí i signifikantní rozdíl v hladinách adiponektinu, který jsme zjistili mezi

pre- a postmenarcheálními dívkami. Také Inui popisuje mentální anorexii jako onemocnění s nadbytkem jak orexigenních tak anorexigenních regulačních peptidů (Inui 2001).

O tom, že hladiny adiponektinu u pacientek s mentální anorexií nemusejí být primárně regulovány množstvím tukové tkáně svědčí fakt, že hladiny adiponektinu v naší studii negativně korelovaly s BMI, ale nikoliv s tělesnou hmotností či sérovými hladinami leptinu. BMI za podmínek malnutrice neodráží spolehlivě množství tukové tkáně v organismu a na jeho hodnotě se významnou měrou podílejí i jiné faktory, jako např. aktuální stav hydratace apod. Iwahashi a spol. popisuje negativní korelaci s BMI pouze u zdravých žen v kontrolní skupině, nikoliv u pacientek s mentální anorexií (Iwahashi a spol. 2003). Je otázkou, zda množství tukové tkáně je u mentálních anorektiček hlavním regulátorem produkce adiponektinu či nikoliv. K objasnění této otázky by bylo vhodné zjistit korelaci mezi sérovými hladinami adiponektinu a množstvím tělesného tuku měřeným exaktní metodou. Každopádně jsou výsledky naší studie v tomto ohledu překvapující a vyžadují dalšího podrobnějšího zkoumání ke správné interpretaci. Vzhledem k tomu, že u mentálních anorektiček v naší studii došlo k signifikantním změnám během 8 týdnů léčby, zdá se, že tato doba je dostatečná pro nástup regulačních mechanismů, které ovlivňují tvorbu adiponektinu v závislosti na nutričním stavu organismu.

Tvorba a sekrece adiponektinu u zdravých jedinců pozitivně koreluje s velikostí adipocytů a negativně s BMI a je signifikantně nižší ve viscerální tukové tkáni než v podkožní (Johnson a spol. 2003). Kwon a spol. popisuje negativní korelaci mezi hladinami adiponektinu a množstvím viscerálního i podkožního tuku a s BMI (Kwon a spol. 2005). V naší studii sérové hladiny adiponektinu u obézních pacientů negativně korelovaly s tělesnou hmotností před její redukcí a ještě významněji po redukci a negativně korelovaly i s BMI. Také u pacientek s mentální anorexií jsme nalezli negativní korelaci s BMI a SDS BMI. Také Matsubara a spol. uvádí negativní korelaci adiponektinu s BMI a celkovým množstvím tělesného tuku u pacientek s mentální anorexií, obézních žen i eutrofických zdravých žen v kontrolní skupině (Matsubara a spol. 2002). Negativní korelaci s BMI uvádí u jedinců s normální tělesnou hmotností také Arita, Yamamoto a Pischon (Arita a spol. 1999, Yamamoto a spol. 2002, Pischon a spol. 2003). Delporte a spol. uvádí negativní korelaci s BMI a množstvím tukové tkáně (Delporte a spol. 2003) a Bruun a spol. také uvádí negativní korelaci s množstvím tělesného tuku u obézních jedinců (Bruun a spol. 2003). Naopak Iwahashi a spol. popisuje lineární negativní korelaci s BMI pouze u zdravých žen v kontrolní skupině, nikoliv u pacientek s mentální anorexií (Iwahashi a spol. 2003).

V naší studii jsme nenalezli korelaci mezi sérovými hladinami adiponektinu a leptinu u obézních pacientů před redukcí tělesné hmotnosti ani po ní, ani když byly samostatně posouzeny skupiny HR a LR. Vztah mezi oběma analyty nebyl nalezen ani u pacientek s mentální anorexií. Gavrila a spol. také nenachází žádný vztah mezi sérovými hladinami adiponektinu a leptinu (Gavrila a spol. 2003). Naopak Matsubara a spol. uvádí negativní korelaci adiponektinu s leptinem u pacientek s mentální anorexií, obézních žen i zdravých kontrol (Matsubara a spol. 2002).

U pacientek s mentální anorexií jsme nalezli pozitivní korelaci mezi hladinami ghrelinu a adiponektinu. Tato korelace nebyla u obézních jedinců prokázána. Na základě literárních údajů je známo, že ghrelin potlačuje expresi adiponektinového genu (Ott a spol. 2002). Možné vysvětlení pozitivního vztahu obou uvedených analytů v naší studii je fakt, že u pacientek s mentální anorexií je trvalá hyperghrelinémie, která následně vede ke ghrelinové resistenci, jak již bylo diskutováno výše. Vzhledem k existenci ghrelinové resistence je možné, že nejen centrální, ale i periferní účinky ghrelinu jsou oslabené a v důsledku toho se nemůže projevit inhibiční efekt ghrelinu na expresi adiponektinového genu v tukové tkáni.

4.3.5. Vztah hladin adiponektinu k inzulínové senzitivitě

Je známo, že hladiny adiponektinu nejsou signifikantně snížené pouze u obézních jedinců, ale také u jiných patofyziologických stavů asociovaných s obezitou, jako je DM 2.typu (Hotta a spol. 2000, Beltowski 2003), a ischemická choroba srdeční (Ouchi a spol. 1999). U jedinců s vyšší inzulínovou senzitivitou svědčí vyšší hladiny adiponektinu pro lepší schopnost oxidace tuků a působí jako ochranný faktor před rozvojem DM 2.typu (Berk a spol. 2003). Vliv adiponektinu na zlepšení oxidace mastných kyselin u lidí popisuje i Thamer a spol.(Thamer a spol. 2003). V naší studii jsme popsali u obézních pacientů negativní korelaci mezi hladinami adiponektinu a inzulínu, respektive C-peptidu před redukcí tělesné hmotnosti. Tato korelace byla po redukci hmotnosti v obou případech ještě významnější. Naopak u pacientek s mentální anorexií se nám nepodařilo vztah mezi adiponektinem, inzulínem a C-peptidem prokázat. Matsubara a spol. uvádí negativní korelaci hladin adiponektinu s hladinami inzulínu a vypočítanou inzulínovou rezistencí u pacientek s mentální anorexií, obézních žen i eutrofických zdravých žen v kontrolní skupině (Matsubara a spol. 2002). Delporte a spol. uvádí pozitivní korelaci adiponektinu s inzulínovou senzitivitou, která byla u pacientek s mentální anorexií o 40% vyšší ve srovnání se zdravými kontrolami (Delporte a

spol. 2003). Pozitivní korelaci mezi hladinami adiponektinu a inzulínovou senzitivitou popisují také další autoři (Bacha a spol. 2005, Kwon a spol. 2005).

Již na zvířecích modelech bylo popsáno, že snížená exprese adiponektinu je asociovaná s obezitou a inzulínovou rezistencí (Maeda a spol. 2002, Ma a spol. 2002) a že během rozvoje obezity a diabetu u myší je potlačena exprese adipogenních genů. Tato pozorování poukazují na možnou existenci negativních zpětnovazebných mechanismů ovlivňujících tvorbu adiponektinu (Diez a Iglesias 2003, Nadler a spol. 2001). U myší s vyřazeným genem pro adiponektin byla popsána pomalejší clearance volných mastných kyselin z plazmy. Podání rekombinantního adiponektinu hlodavcům vede ke snížení hladin glukózy v séru bez současné stimulace inzulínové sekrece (Nedvídková a spol. 2005). Hotta a spol. prokázal, že snížené plazmatické hladiny adiponektinu vedou k rozvoji inzulínové rezistence a diabetu u opic (Hotta a spol. 2001).

Na základě předchozích studií bylo prokázáno, že adiponektin zlepšuje inzulínovou senzitivitu prostřednictvím stimulace oxidace mastných kyselin, snížením hladiny triacylglycerolů v plazmě a zlepšením metabolismu glukózy (Statnick a spol. 2000). Také byl v řadě studií prokázán jeho antiaterogenní efekt díky pozitivnímu vlivu na endoteliální buňky. Adiponektin potlačuje expresi adhezivních proteinů extracelulární matrix v endotelu a produkci cytokinů potencujících aterosklerózu, jako je např. TNF-alfa (Chen a spol. 2003, Bronský a spol. 2005). Jeho snížené hladiny v séru u obézních jedinců mohou být spojovacím článkem mezi obezitou a přidruženými komplikacemi, které jsou součástí tzv. metabolického syndromu, jako je porušená inzulínová senzitivita, dyslipidemie a hypertenze. Také bylo prokázáno, že dospělé pacientky s mentální anorexií a pacienti s DM 1.typu mají vyšší inzulínovou senzitivitu ve srovnání se zdravými kontrolami (Nedvídková a spol. 2005). V naší studii jsme prokázali, že již v časném dětském věku a adolescentním období dochází při poruše nutričního stavu ke změnám sérových hladin adiponektinu. Vzhledem k tomu, že se předpokládá, že jednotlivé složky metabolického syndromu mají patofyziologický základ již v časném dětství, napovídají tyto výsledky o adiponektinu jako možném biomarkeru poruchy inzulínové senzitivity již v období, kdy ještě nejsou přítomny klinické symptomy onemocnění. Adiponektin by se mohl stát vhodným analytem využívaným v diagnostice, ale také spolu se svými receptory vhodným cílem farmakologické léčby u pacientů s poruchou inzulínové senzitivity a nutričního stavu. Dnes je již známo, že léky zvyšující inzulínovou senzitivitu, jako např. thiazolidindiony, vedou prostřednictvím PPAR-gamma ke zvýšení exprese adiponektinové mRNA (Chinetti a spol. 2004, Rocchi a spol. 1999, Diez a Iglesias 2003).

4.4. Amylin

V experimentech na zvířatech se prokázalo, že některé biochemické formy amylinu mohou být vlivnými stimulanty proliferace osteoblastů a intaktní amylin zároveň působí jako inhibitor kostní resorpce. Doposud není zcela jasné, zda tyto funkce vykazuje amylin i u lidských jedinců.

V našem prvním experimentu se hladiny celkového amylinu statisticky signifikantně nelišily od hladin v kontrolní skupině, která nesplnila podmínky normálního rozložení hodnot. I přesto byly průměrné hladiny celkového amylinu nejnižší ve skupině pacientů s osteoporózou ve srovnání s diabetiky a se zdravými kontrolami. Tento fakt může být známkou možného deficitu celkového amylinu u pacientů trpících osteoporózou. Deficit hladin neredukovaného amylinu u pacientů s OP byl statisticky významnější než u celkového amylinu i přes nižší počet pacientů testovaných v jednotlivých skupinách. Na základě těchto poznatků a výsledků předchozích experimentů na zvířatech a *in vitro* (Cornish a spol. 1998 a,b, 2000) se zdá, že stanovování neredukovaného amylinu má vyšší sensitivitu u poruch kostního metabolismu. Je možné, že klíčovou roli ve stimulaci osteoblastů hraje intaktní disulfidický můstek. Tento efekt může být negativně ovlivněn redukčními procesy v lidském organismu, které vedou k rozštěpení disulfidického můstku mezi pozicemi 2 a 8 v aminokyselinové sekvenci amylinové molekuly.

U pacientů s OP jsme nenalezli žádná anamnestická, klinická ani biochemická data, která by poukazovala na dysfunkci pankreatických beta-buněk vedoucí k snížené produkci nebo sekreci amylinu z pankreatické tkáně do periferní cirkulace. K odhalení možných příčin deficitu amylinu u pacientů s osteoporózou je zapotřebí provést podrobnější studie zaměřené na kostní metabolismus. Také biochemická analýza možných modifikací struktury amylinu v lidské plazmě a jeho kinetiky je třeba k objasnění příčiny našich zjištění. V organismu lze nalézt řadu faktorů, které mohou ovlivnit produkci amylinu, jeho uvolňování do cirkulace nebo jeho efekt na kostní tkáň (např. redukce způsobující rozštěpení disulfidického můstku) a tím mohou vést k primárním nebo sekundárním změnám hladin amylinu. V odborné literatuře je k dispozici velmi málo studií, které se zabývají tímto tématem, zvláště pak u lidských jedinců. U pacientů s DM byly hladiny amylinu nižší než v kontrolní skupině. Tento fakt podporuje hypotézu, že porucha funkce pankreatických beta-buněk může vést k deficitu amylinu v periferní cirkulaci.

V naší studii byl průměrný věk pacientů v CG skupině signifikantně odlišný od pacientů s OP. Otázkou je možný vliv tohoto faktoru na odlišnost hladin amylinu v uvedených skupinách. Doposud nebyly publikována data popisující vztah mezi hladinami amylinu nalačno a věkem. Jediná dostupná studie u lidí poukazuje na poruchu sekrece amylinu z pankreatu po stimulaci intravenózní glukózou u starších pacientů (Dechenes a spol. 1998). V naší práci jsme nenalezli žádnou korelaci mezi věkem a hladinami amylinu ani v jedné ze sledovaných skupin. Po korekci vzhledem k věku se statistická významnost v rozdílech hladin amylinu mezi jednotlivými skupinami nezměnila. Je tedy pravděpodobné, že hladiny amylinu u pacientů v naší studii nejsou ovlivněny věkovou strukturou.

Vzhledem k tomu, že osteoporóza je častější u žen, nebyl poměr pohlaví v testované skupině rovnoměrný. Průměrné hladiny amylinu se nelišily mezi muži a ženami. Když jsme porovnali pouze ženy ze skupin OP, DM a CG, výsledky nebyly odlišné od výsledků získaných na základě analýzy celých skupin a prokazovaly deficit amylinu u pacientek s OP.
Vztah mezi tělesnou hmotností a kostní densitou je dobře znám a v poslední době byly publikovány práce popisující vztah mezi tukovou a kostní tkání na molekulární úrovni (Livshitz a spol. 2003). V naší studii jsme zjišťovali, zda mají hladiny amylinu vztah k základním antropometrickým parametrům. Průměrná tělesná hmotnost byla nejnižší ve skupině pacientů s OP a jejich BMI se signifikantně lišil od pacientů v CG. Nenalezli jsme ovšem žádnou korelaci mezi uvedenými parametry a hladinami amylinu ani v jedné ze zkoumaných skupin a rozdíly v hladinách amylinu se nezměnily ani po korekci na tělesnou hmotnost. Tedy ani tento antropologický parametr pravděpodobně neovlivňuje změny plazmatických hladin amylinu.

Metodika stanovující neredukovaný amylin detekuje pouze intaktní molekulu amylinu. Metodika stanovující celkový amylin detekuje navíc také redukovaný amylin a pravděpodobně také některé „amylin-like peptidy". Jedná se o molekuly, které byly prokázány metodou Western blot a jsou větší než molekula intaktního amylinu. Tyto peptidy byly prokázány ve všech vzorcích testovaných na amylin ve studii Percy a spol. (Percy a spol. 1996). Těmito peptidy mohou být např. agregáty amylinu, jeho prekurzory jako např. proamylin, nebo posttranslačně modifikovaný amylin. Tento fakt může vysvětlit rozdíl v koncentracích celkového a neredukovaného amylinu v obou experimentech u skupiny OP a DM. Ve skupině CG byly hladiny získané pomocí metodiky pro celkový amylin nižší než hladiny neredukovaného amylinu, ale výsledek nebyl statisticky signifikantní. Rozdíl může být vysvětlen rozdílným počtem pacientů ve skupině CG v obou experimentech. Porovnání obou metodik za takovýchto podmínek je obtížné, obzvláště s ohledem na interassay

variabilitu. Doposud byl amylin u lidí stanovován pouze v souvislosti s poruchami metabolismu glukózy. Novým a důležitým aspektem naší studie je, že popisuje změny plazmatických hladin tohoto hormonu ve vztahu k jeho méně známé, ale důležité biologické funkci – a tou je jeho efekt na kostní tkáň. Naše studie může pomoci zaměřit se na tento problém a najít možné využití molekuly amylinu pro klinickou praxi, ať už v diagnostické nebo terapeutické rovině.

Počet pacientů zařazených do naší studie není dostatečně velký pro to, abychom určili, zda bude vhodné zařadit amylin do diagnostického schématu u pacientů s osteoporózou.

5. ZÁVĚR

Byly zavedeny jednotlivé metody stanovení regulačních peptidů v laboratoři a evaluovány pro účely studie. Výsledkem našeho projektu je podrobný popis hladin orexinu A, ghrelinu, adiponektinu, leptinu a amylinu u pacientů s různými poruchami nutričního stavu a jejich změny v průběhu nutriční intervence. Dále jsme podrobně zhodnotili jejich vztah k věku, jednotlivým základním antropometrickým parametrům a biochemickým analytům se vztahem k výživě.

Výzkumem jsme přispěli k objasnění některých neuroendokrinních změn při poruchách příjmu potravy také s ohledem na fakt, že jednotlivé regulační peptidy by se v budoucnu mohly stát jejich vhodnými biochemickými markery. Přispěli jsme i k evaluaci jednotlivých metod ke stanovení regulačních peptidů pro výzkumné použití a k možnosti jejich následného zavedení do klinické praxe tak, jak tomu bylo např. u leptinu, který je dnes rutinně stanovován v biochemických laboratořích. Návrh indikací k vyšetření jednotlivých nutričních hormonů je uveden v tabulce 9. Některé regulační peptidy či jejich analoga jsou již experimentálně používány v terapii poruch nutričního stavu a jejich rozšíření do klinické praxe může přinést zlepšení diagnostických i terapeutických postupů.

P-Amylin	**DM 1. a 2. typu, (poruchy kostního metabolismu)**
S-Adiponektin	**metabolický syndrom (obezita, inzulínová resistence atd.)**
P-Ghrelin	**mentální anorexie, malnutrice, poruchy růstu**
S-Leptin	**obezita, infertilita, (poruchy kostního metabolismu)**
P-Orexin A	**narkolepsie, poruchy cyklu spánku a bdění, obezita, mentální anorexie**

Tabulka 9: Návrh indikací k vyšetření nutričních hormonů v klinické praxi

Legenda: S – sérum, P – plazma, DM – diabetes mellitus

6. SOUHRN

Úvod: Regulace příjmu potravy a nutričního stavu je komplexní děj zprostředkovaný vzájemnou souhrou řady regulačních peptidů centrálního nervového systému, gastrointestinálního traktu a tukové tkáně. Tyto systémy jsou propojeny zpětnými vazbami, které informují o příjmu potravy a množství energetických zásob v organismu. Porucha v některé z těchto oblastí může vést ke změně nutričního stavu organismu.

Metody: Radioimunoanalýzou byly stanoveny plazmatické hladiny orexinu A, celkového ghrelinu a sérové hladiny leptinu a enzymovou imunoanalýzou byly stanoveny sérové hladiny adiponektinu u zdravých jedinců a u dětských pacientů s obezitou, mentální anorexií, Crohnovou nemocí a celiakální sprue a byl popsán vliv nutriční intervence na tyto hladiny. Dále byl zhodnocen vztah jednotlivých regulačních peptidů k základním biochemickým a antropometrickým ukazatelům nutričního stavu. Metodou enzymové imunoanalýzy s imunofluorescenční detekcí jsme stanovili plazmatické hladiny celkového a neredukovaného amylinu u dospělých pacientů s osteoporózou, diabetem II. typu a u kontrolní skupiny.

Výsledky: Během redukce tělesné hmotnosti u dětských a adolescentních pacientů s obezitou došlo ke statisticky významným změnám plazmatických hladin orexinu A a celkového ghrelinu, zatímco sérové hladiny adiponektinu se významně neměnily. U pacientek s mentální anorexií během realimentace došlo ke statisticky významným změnám všech tří analytů. Plazmatické hladiny orexinu A u pacientů s Crohnovou nemocí a celiakální sprue byly signifikantně vyšší než u zdravých kontrol. U dospělých pacientů s osteoporózou byly statisticky významně snížené hladiny neredukovaného amylinu ve srovnání s diabetiky II. typu a kontrolní skupinou.

Závěr: Stanovili jsme plazmatické hladiny orexinu A, ghrelinu a amylinu a sérové hladiny adiponektinu a leptinu u pacientů s různými poruchami nutričního stavu a evaluovali jejich vztah k antropometrickým a biochemickým parametrům během terapeutické intervence.

SUMMARY

Introduction: Regulation of food intake and nutritional status is mediated by complex interactions of regulatory peptides of the central nervous system, gastrointestinal tract and adipose tissue. These systems are connected by feedback loops which inform the centre about amount of ingested food and energy reserves in the organism. Dysfunction of any of these regulatory areas may lead to changes in nutritional status of the organism.

Methods: We used radioimmunoassay to measure plasma levels of orexin A, total ghrelin and serum levels of leptin and enzyme immunoassay to measure serum levels of adiponectin in healthy subjects and in children with obesity, anorexia nervosa, Crohn´s disease and celiac disease and we evaluated the influence of nutritional therapy on these levels. Moreover, we evaluated relationship of these regulatory peptides to other biochemical and anthropometrical factors of nutritional status. We also measured plasma levels of total and unreduced amylin by enzyme immunoassay with immunofluorescence detection in adult patients with osteoporosis, type II diabetes mellitus and in the control group.

Results: During reduction of body weight in obese children and adolescents, there were statistically significant changes of plasma orexin A levels and total ghrelin levels, but we haven´t seen any changes in serum levels of adiponectin. In girls with anorexia nervosa during realimentation, statistically significant changes of all three analytes occured. Plasma levels of orexin A in patients with Crohn´s disease and celiac disease were significantly higher than in healthy controls. In adult patients with osteoporosis, there were significantly lower levels of unreduced amylin in comparison with type II diabetic patients and the control group.

Conclusions: We measured plasma levels of orexin A, ghrelin and amylin and serum levels of adiponectinu and leptin in patients with impaired nutritional status and evaluated their relationship to anthropometrical and biochemical parameters during nutritional therapy.

7. POUŽITÁ LITERATURA

ABRAHAMSON EE, LEAK RK, MOORE RY: The suprachiasmatic nucleus projects to posterior hypothalamic arousal systems. *Neuroreport* **12:** 435-440, 2001.

ADAM JA, MENHEERE PP, VAN DIELEN FM, et al.: Decreased plasma orexin-A levels in obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**: 274-276, 2002.

ALVAREZ E, RONCERO I, CHOWEN JA, THORENS B, BLAZQUEZ E: Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J Neurochem* **66**: 920-927, 1996.

ANDERLOVÁ K, KŘEMEN J, DOLEŽALOVÁ R, et al.: The influence of very-low-calorie-diet on serum leptin, soluble leptin receptor, adiponectin and resistin levels in obese women. *Physiol Res*, 2005, v tisku.

ARCHER ZA, FINDLAY PA, RHIND SM, MERCER JG, ADAM CL: Orexin gene expression and regulation by photoperiod in the sheep hypothalamus. *Regul Pept* **104:** 41-5, 2002.

ARIHARA Z, TAKAHASHI K, MURAKAMI O, et al.: Orexin-A in the human brain and tumor tissues of ganglioneuroblastoma and neuroblastoma. *Peptides* **21**: 565-570, 2000.

ARIHARA Z, TAKAHASHI K, MURAKAMI O, et al: Immunoreactive orexin-A in human plasma. *Peptides* **22**: 139-142, 2001.

ARITA Y, KIHARA S, OUCHI N, et al.: Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **257**: 79-83, 1999.

ARNALDI G, MANCINI T, KOLA B, et al.: Cyclical Cushing's syndrome in a patient with a bronchial neuroendocrine tumor (typical carcinoid) expressing ghrelin and growth hormone secretagoguereceptors. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 5834 –5840, 2003.

ASAKAWA A, INUI A, KAGA T, et al.: Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* **120**: 337 – 345, 2001.

BACHA F, SAAD R, GUNGOR N, ARSLANIAN SA: Does adiponectin explain the lower insulin sensitivity and hyperinsulinemia of African-American children? *Pediatr Diabetes* **6**: 100-102, 2005.

BACHA F, ARSLANIAN SA: Ghrelin suppression on overweight children: a manifestation of insulin resistance? *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 2725-2730, 2005.

BARRACHINA MD, MARTINEZ V, WANG L, WEI JY, TACHE Y: Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 10455-10460, 1997.

BECKER AE, GRINSPOON SK, KLIBANSKI A, HERZOG DB: Eating disorders. *N Engl J Med* **340**: 1092 – 1098, 1999.

BELLONE S, CASTELLINO N, BROGLIO F, et al.: Ghrelin secretion in childhood is refractory to the inhibitory effect of feeding. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 1662-1665, 2004.

BELLONE S, RAPA A, VIVENZA D, et al.: Circulating ghrelin levels in newborns are not associated to gender, body weight and hormonal parameters but depend on the type of delivery. *J Endocrinol Invest* **26**: RC9-RC11, 2003.

BELLONE S, RAPA A, VIVENZA D, et al.: Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood. *J Endocrinol Invest* **25**: RC13-RC15, 2002.

BELTOWSKI J: Adiponectin and resistin – new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* **9**: RA55-61, 2003.

BERGER JP: Role of PPARgamma, transcriptional cofactors, and adiponectin in the regulation of nutrient metabolism, adipogenesis and insulin action: view from the chair (Abstract). *Int J Obes Relat Metab Disord, Suppl 1* **29**: S3-4, 2005.

BERK E, KOVERA A, BOOZER C, PI-SUNYER FX, JOHNSON J, ALBU J: Adiponectin levels and insulin sensitivity during low and high fat diets in obese, premenopausal, non-diabetic women. *Obes Res* **11**: A34, 2003.

BERTHOUD HR, JEDRZEJEWSKA A, POWLEY TL: Simultaneuos labeling of vagal innervation of the gut and afferent projections from trhe visceral forebrain with DiI injected into dorsal vagal complex in the rat. *J Comp Neurol* **301**: 65-79, 1990.

BLANCO M, LÓPEZ M, GARCÍA-CABALLERO T, et al.: Cellular localization of orexin receptors in human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 1616-1619, 2001.

BLAUGRUND E, PHAM TD, TENNYSON VN, et al: Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and mash-1-dependence. *Development* **122**: 309-332, 1996.

BROGLIO F, GIANOTTI S, DESTEFANIS S, et al: The endocrine response to acute ghrelin administration is blunted in patients with anorexia nervosa, a ghrelin hypersecretory state. *Clinical Endocrinology* **60**: 592-599, 2004.

BRONSKÝ J, CHADA M, KOTAŠKA K, PRŮŠA R: Amylin – fyziologická úloha v lidském organismu. *Čs Fyziol* **51**: 179-180, 2002.

BRONSKÝ J, CHADA M, KOTAŠKA K, PRŮŠA R: Hypothalamické neuropeptidy ovlivňující příjem potravy a regulaci energetické rovnováhy. *Čes a slov Neurol Neurochir* **66/99**: 8-13, 2003.

BRONSKÝ J, CHADA M, NEVORAL J, et al.: Orexiny - experimentální poznatky a perspektivy v pediatrické praxi. *Čes-slov Pediat* **57**: 600 – 603, 2002.

BRONSKÝ J, KOTAŠKA K, PRŮŠA R: Ghrelin – struktura, funkce a klinické využití. *Čs Fyziol* **53**: 80-85, 2004.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, ZAMRAZILOVÁ H, et al.: Ghrelin, Leptin, IGF1 and IGFBP-3 and Their Relationship in Obese Children During Reduction of Body Weight. *Clin Chem Lab Med, Spec Suppl* **41**: 347, 2003.

BRONSKÝ J, NEVORAL J, PRŮŠA R: Adiponektin - marker insulinové sensitivity. *Čs Fyziol* **54**: 92-96, 2005.

BRONSKÝ J, PECHOVÁ M, NEDVÍDKOVÁ J, et al.: Orexin A Fasting Plasma Levels Increase After Weight Loss In Obese Children and Adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr, Spec Suppl* **36**: 520-583, 2003.

BRONSKÝ J, ZADINA J, PECHOVÁ M, et al.: Amylin Plasma Levels In Patients With Osteoporosis and Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Chem Lab Med, Spec Suppl* **41**: 83, 2003.

BRUUN JM, LIHN AS, VERDICH C, et al.: Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285:** E527-533, 2003.

BUNT JC, SALBE AD, TSCHÖP MH, DELPARIGI A, DAYCHILD P, TATRANNI PA: Cros-sectional and prospective relationschips of fasting plasma ghrelin concentrations with anthropometric measures in Pima Indian children. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 3756-3761, 2003.

BURDYGA G, SPILLER D, MIRRIS R, et al.: Expression of the leptin receptor in rat and human nodose ganglion neurons. *Neuroscience* **109**: 339-347, 2002.

CAPRISTO E, FARNETTI S, MINGRONE G, et al.: Reduced plasma ghrelin concentration in celiac disease after gluten-free diet treatment. *Scand J Gastroenterol* **40**: 430-436, 2005.

CASSONI P, PAPOTTI M, GHÉ C, et al.: Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 1738 – 1745, 2001.

CELI F, BINI V, PAPI F, et al: Circulating acylated and total ghrelin and galanin in children with insulin-treated type 1 diabetes: relationship to insulin therapy, metabolic control and pubertal development. *Clinical Endocrinology* **63**: 139-145, 2005.

CIANFLONE K, LU HL, SMITH J, YU W, WANG HW: Adiponectin, acylation stimulating protein and complement C3 are altered in obesity in very young children. *Clinical Endocrinology* **62**: 567-572, 2005.

CLODI M, THOMASETH K, PACINI G, et al.: Distribution and kinetics of amylin in humans. *Am J Physiol: Endocrinology and Metabolism* **274**: E903 – E908, 1998.

COOPER GJ, WILLIS AC, CLARK A, et al.: Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 8628-8632, 1987.

CORNISH J, CALLON KE, GASSER JA, et al.: Systemic administration of a novel octapeptide, amylin-(1-8), increases bone volume in male mice. *Am J Physiol: Endocrinology and Metabolism* **279**: E730 – E735, 2000.

CORNISH J, CALLON KE, KING AR, et al.: Systemic administration of amylin increases bone mass, linear growth, and adiposity in adult male mice. *Am J Physiol: Endocrinology and Metabolism* **275**: E694 – E699, 1998.

CORNISH J, CALLON KE, LIN CQ-X, et al.: Dissociation of the effects of amylin on osteoblast proliferation and bone resorption. *Am J Physiol: Endocrinology and Metabolism* **274:** E827 – E833, 1998.

DALAL MA, SCHULD A, HAACK M, et al.: Normal plasma levels of orexin A (hypocretin–1) in narcoleptic patients. *Neurology* **56**: 1749-1751, 2001.

DATE Y, KOJIMA M, HOSODA H, et al.: Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthetized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* **141**: 4255 – 4261, 2000.

DATE Y, NAKAZATO M, HASHIGUCHI S, et al.: Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* **51**: 124 – 129, 2002.

DATE Y, UETA Y, YAMASHITA H, et al.: Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 748-753, 1999.

DECHENES CJ, VERCHERE CB, ANDRIKOPOULOS S, KAHN SE: Human aging is associated with parallel reductions in insulin and amylin release. *Am J Physiol: Endocrinology and Metabolism* **275**: E785 – E791, 1998.

DE LECEA L, KILDUFF TS, PEYRON C, et al.: The hypocretins: Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 322-327, 1998.

DELPORTE ML, BRICHARD SM, HERMANS MP, BEGUIN C, LAMBERT M: Hyperadiponectinaemia in anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)* **58**: 22-29, 2003.

DÍEZ JJ, IGLESIAS P: The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* **148**: 293-300, 2003.

DORNONVILLE DE LA COUR C, BJORKQVIST M, SANDVIK AK, et al.: A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept* **99**: 141 – 150, 2001.

ESPELUND U, HANSEN TK, ORSKOV H, FRYSTYK J: Assessment of ghrelin. *APMIS Suppl* **109:** 140-145, 2003.

FILIPPI E, SENTINELLI F, TRISCHITTA V, et al.: Association of the human adiponectin gene and insulin resistance. *Eur J Hum Genet* **12:** 199-205, 2004.

FORTUNO A, RODRIGUEZ A, GOMEZ-AMBROSI J, FRUHBECK G, DIEZ J: Adipose tissue as an endocrine organ: role of leptin and adiponectin in the pathogenesis of cardiovascular diseases. *J Physiol Biochem* **59:** 51-60, 2003.

FREDERIKS AM, VAN BUUREN S, WIT JM, et al.: Body index measurements in 1996-7 compared with 1980. *Arch Dis Child* **82**: 107-112, 2000.

FUNAHASHI H, HORI T, SHIMODA Y, et al.: Morphological evidence for neural interactions between leptin and orexin in the hypothalamus. *Regul Pept* **92**: 31-35, 2000.

FUNAHASHI H, YAMADA S, KAGEYAMA H, TAKENOYA F, GUAN JL, SHIODA S: Co-existence of leptin- and orexin-receptors in feeding-regulating neurons in the hypothalamic arcuate nucleus – a triple labeling study. *Peptides* **24:** 687-694, 2003.

GAVRILA A, CHAN JL, YINNAKOURIS A, KONTOGIANNI M, MILLER LC, ORLOVA C: Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 4823-4831, 2003.

GEDULIN BR, RINK TJ, YOUNG AA: Dose-response for glucagonostatic effect of amylin in rats. *Metabolism* **46**: 67 – 70, 1997.

GHIZZONI L, MASTORAKOS G, VOTTERO A, ZIVERI M, ILIAS I, BERNASCONI S: Spontaneous growth hormone (GH) secretion is not directly affected by ghrelin in either short normal prepubertal children or children with GH neurosecretory dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 5488-5495, 2005.

GOLDSTONE AP, MERCER JG, GUNN I, et al.: Leptin interacts with glucagon-like peptide-1 neurons to reduce food intake and body weight in rodents. *FEBS Lett* **415**: 134-138, 1997.

GRANNER DK: Hormony pankreatu a gastrointestinálního traktu. V MURRAY RK, GRANNER DK, MAYES PA, RODWELL VW: Harper´s biochemistry. Appleton & Lange, Connecticut, USA, 1993. Překlad z anglického originálu KRAML J a spol., H&H, Praha, 584-600, 1998.

GREEN T, DOCRAY GJ: Characterization of the peptidergic afferent innervation of stomach in the rat, mouse and guinea-pig. *Neuroscience* **25**: 181-193, 1988.

GUALILLO O, CAMINOS J, BLANCO M, et al.: Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* **142**: 788–794, 2001.

GUAN XM, YU H, PALYHA OC, et al.: Distribution of mRNA encoding the growth hormone scretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* **48**: 23–29, 1997.

GUIDOBONO F: Amylin and gastrointestinal activity. *Gen Pharmac* **31**: 173–177, 1998.

HAGAN JJ, LESLIE RA, PATEL S, et al.: Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 10911-10916, 1999.

HAHN TM, BREINIGER JF, BASKIN DG, SCHWARTZ MW: Coexpression of AgrP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* **1**: 271-272, 1998.

HAQQ AM, FAROOQI IS, O´RAHILLY S, et al.: Serum ghrelin levels are inversely correlated with body mas index, age, and insulin concentrations in normal children and are markedly increased in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 174-178, 2003.

HAYNES AC, JACKSON B, CHAPMAN H, et al.: A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul Pept* **96**: 45-51, 2000.

HEWSON AK, DICKSON SL: Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* **12**: 1047–1049, 2000.

HIGHAM CE, HULL RL, LAWRIE L, et al.: Processing of synthetic pro-islet amyloid polypeptide (proIAPP) ´amylin´ by recombinant prohormone convertase enzymes, PC2 and PC3, in vitro. *Eur J Biochem* **267**: 4998–5004, 2000.

HIGUCHI S, USUI A, MURASAKI M, et al.: Plasma orexin-A is lower in patients with narcolepsy. *Neurosci Lett* **318**: 61-64, 2002.

HÖKFELT T, BROBERGER C, XU ZQD, SERGEYEV V, UBINK R, DIEZ M: Neuropeptides - an overview. *Neuropharmacology* **39**: 1337-1356, 2000.

HOLDSTOCK C, ENGSTROM BE, OHRVALL M, LIND L, SUNDBOM M, KARLSSON FA: Ghrelin and adipose tissue regulatory peptides: effect of gastric bypass surgery in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 3177-3183, 2003.

HOLZER P: Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous mand splanchic vascular beds. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **121**: 49-146, 1992.

HORVATH TL, DIANO S, VAN DEN POL AN: Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: A novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci* **19**: 1072-1087, 1999.

HORVATH TL, DIANO S, SOTONYI P, et al.: Ghrelin and the regulation of energy homeostasis: a hypothalamic perspective. *Endocrinology* **142**: 4163–4169, 2001.

HOSODA H, KOJIMA M, MATSUO H, KANGAWA K: Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J Biol Chem* **275**: 1995–2000, 2000.

HOTTA K, FUNAHASHI T, BODKIN NL, et al.: Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* **50**: 1126-1133, 2001.

HOTTA K, FUNAHASHI T, ARITA Y, TAKAHASHI M, MATSUDA M: Plasma concentration of a novel adipose specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Artherioscler Tromb Vasc Biol* **20**: 1595-1599, 2000.

HU E, LIANG P, SPIEGELMAN BM: AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* **271**: 10697-10703, 1996.

HUAN JN, LI J, HAN Y, CHEN K, WU N, ZHAO AZ: Adipocyte-selective reduction of the leptin receptors induced by antisense RNA leads to increased adiposity, dyslipidemia, and insulin resistance. *J Biol Chem* **278**: 45638-45650, 2003.

HUANG ZL, QU WM, LI WD, et al.: Arousal effect of orexin A depends on activation of the histaminergic system. *PNAS* **98**: 9965-9970, 2001.

HUANG KC, LUE BH, YEN RF, et al.: Plasma adiponectin levels ad metabolic factors in nondiabetic adolescents. *Obes Res* **12**: 119-124, 2004.

HUG C, LODISH HF: Diabetes, obesity, and Acrp30/adiponectin. *Biotechniques* **33**: 654-658, 2002.

HUNGS M, MIGNOT E: Hypocretin/orexin, sleep and narcolepsy. *BioEssays* **23**: 397-408, 2001.

HUSZAR D, LYNCH CA, FAIRCHILD-HUNTRESS V, et al.: Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* **88**: 131-141, 1997.

CHANOINE JP, YEUNG L, WONG A, BIRMINGHAM CL: Immunoreactive Ghrelin in Human Cord Blood: Relation to Anthropometry, Leptin, and Growth Hormone. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **35**: 282–286, 2002.

CHEMELLI RM, WILLIE JT, SINTON CM, et al.: Narcolepsy in orexin knockout mice: Molecular genetics of sleep regulation. *Cell* **98**: 437-451, 1999.

CHEN C, XU R: The *in vitro* regulation of growth hormone secretion by orexins. *Endocrine* **22:** 57-66, 2003.

CHEN H, MONTAGNANI M, FUNAHASHI T, SHIMOMURA I, QUON MJ: Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascuar endothelial cells. *J Biol Chem* **278**: 45021-45026, 2003.

CHEN MP, TSAI JC, CHUNG FM, et al.: Hypoadiponectinemia is associated with ischemic cerebrovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25***:* 821-826, 2005.

CHIN SY, HALL JM, BRAIN SD, MORTON IK: Vasodilator responses to calcitonin gene-related peptide (CGRP) and amylin in the rat isolated perfused kidney are mediated via CGRP1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **269**: 989–992, 1994.

CHINETTI G, ZAWADSKI C, FRUCHART JC, STAELS B: Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonist of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR. *Biochem Biophys Res Commun* **314**: 151-158, 2004.

IKEZAKI A, HOSODA H, ITO K, et al.: Fasting plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents. *Diabetes* **51**: 3408-3411, 2002.

IMBEAULT P, POMERLEAU M, HARPER ME, DOUCET E: Unchanged fasting and postprandial adiponectin levels following a 4-day caloric restriction in young healthy men. *Clin Endocrinol* **60**: 429-433, 2004.

INUI A: Cancer anorexia-cachexia syndrome: Are neuropeptides the key? *Cancer Res* **59**: 4493-4501, 1999.

INUI A: Eating behavior in anorexia nervosa – an excess of both orexigenic and anorexigenic signalling? *Mol Psychiatry* **6**: 620-624, 2001.

IWAHASHI H, FUNAHASHI T, KUROKAWA N, et al.: Plasma adiponectin levels in women with anorexia nervosa. *Horm Metab Res* **35**: 537-540, 2003.

JAMES JH, WAGNER KR, KING JK, et al.: Stimulation of both aerobic glycolysis and Na^+-K^+-ATPase activity in skeletal muscle by epinephrine or amylin. *Am J Physiol: Endocrinology and Metabolism* **277**: E176–E186, 1999.

JANIG W, MORRISON JFB: Functional properties of spinal visceral afferents supplying abdominal and pelvic organs with special emphasis on visceral nocireception. *Prog Brain Res* **67**: 85-95, 1986.

JENŠOVSKÝ J: Růstový hormon – základní fyziologické poznatky. V JENŠOVSKÝ J, LEBL J, CHRISTIANSEN JS, et al.: Růstový hormon. Galén, Praha, 23-52, 2000.

JOHNSSON J, FLANCBAUM L, ALBU J: Adiponectin release in deep subcutaneous abdominal and visceral tissue depots. *Obes Res* **11**: A34, 2003.

JÖHREN O, NEIDERT SJ, KUMMER M, DENDORFER A, DOMINIAK P: Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* **142:** 3324-3331, 2001.

KANBAYASHI T, YANO T, ISHIGURO H, et al.: Hypocretin-1 (orexin-A) levels in human lumbar CSF in different age groups: infants to elderly persons. *Sleep* **25:** 337-339, 2002.

KANUMAKALA S, GREAVES R, PEDREIRA CC, et al.: Fasting ghrelin levels are not elevated in children with hypothalamic obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 2691-2695, 2005.

KARTERIS E, CHEN J, RANDEVA HS: Expression of human prepro-orexin and signaling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *J Clin Endocrinol Metab* **89:** 1957-1962, 2004.

KARTERIS E, RANDEVA HS, GRAMMATOPOULOS DK, et al.: Expression and Coupling Characteristics of the CRH and orexin type 2 receptors in human fetal adrenals. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 4512-4519, 2001.

KASTIN AJ, AKERSTROM V: Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *J Pharm Exp Ther* **298:** 219-223, 1999.

KAZUMI T, KAWAGUCHI A, HIRANO T, YOSHINO G: Serum adiponectin is associated with high-density lipoprotein cholesterol, triglycerides, and low-density lipoprotein particle size in young healthy men. *Metabolism* **53:** 589-593, 2004.

KENNEDY GC: The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **140**: 578-596, 1953.

KERSHAW EE, FLIER JS: Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* **89:** 2548-2556, 2004.

KIM S, MOUSTAID-MOUSSA N: Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. *J Nutr* **130**: 3110S-3115S, 2000.

KINGSLEY RA, GABLE SR, KINGSLEY TR: Concise text of neuroscience. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, 419-462, 1996.

KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, et al.: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**: 656 – 660, 1999.

KOK SW, MEINDERS AE, OVEREEM S, et al.: Reduction of plasma leptin levels and loss of its circadian rhythmicity in hypocretin (orexin)-deficient narcoleptic humans. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 805-809, 2002.

KOMAKI G, MATSUMOTO Y, NISHIKATA H, et al.: Orexin-A and leptin change inversely in fasting non-obese subjects. *Eur J Endocrinol* **144**: 645-651, 2001.

KORBONITS M, GUEORGUIEV M, O´GRADY E, et al.: A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 4005-4008, 2002.

KOURIE JI, SHORTHOUSE AA: Properties of cytotoxic peptide-formed ion channels. *Am J Physiol: Cell Physiology* **278**: C1063 – C1087, 2000.

KOYLU EO, COUCEYRO PR, LAMBERT PD, LING NC, DE SOUZA EB, KUHAR MJ: Immunohistochemical localization of novel CART peptides in the rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol* **9**: 823-833, 1997.

KRŠEK M, ROSICKÁ M, PAPEŽOVÁ H, et al.: Plasma ghrelin levels and malnutrtion: a comparison of two etiologies. *Eat Weight Disord* **8**: 207-211, 2003.

KUROCHKIN IV: Insulin-degrading enzyme: embarking on amyloid destruction. *Trends Biochem Sci* **26**: 421–425, 2001.

KWON K, JUNG SH, CHOI C, PARK SH: Reciprocal association between visceral obesity and adiponectin: in healthy premenopausal women. *Int J Cardiology* **101**: 385-390, 2005.

LAWLOR DA, SMITH GD, EBRAHIM S, THOMPSON C, SATTAR N: Plasma adiponectin levels are associated with insulin resistance but do not predict future risk of coronary heart disease in women. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 5677-5683, 2005.

LAMBERT PD, COUCEYRO PR, MCGIRR KM, DALL VECHIA SE, SMITH Y, KUHAR MJ: CART peptides in the central control of feeding and interactions with NPY. *Synapse* **29**: 293-298, 1998.

LANGLEY JN: The autonomic nervous system. Part. I. W. Heffer (ed), Cambridge, 1921.

LANGLEY K: The neuroendocrine concept today. *Ann NY Acad Sci* **733**: 1-17, 1994.

LEIDY HJ, GARDNER JK, FRYE BR, et al.: Circulating ghrelin is sensitive to changes in body weight during a diet and exercise program in normal-weight young women. *J Clin Endocrinol Metab* **89:** 2659-2664, 2004.

LÉVY E, LÉVY P, LE PEN C, BASDEVANT A: The economic cost of obesity: French situation. *Int J Obesity* **19**: 788-792, 1995.

LIHN AS, PEDERSEN SB, RICHELSEN B: Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev* **6**: 13-21, 2005.

LIN L, FARACO J, LI R, et al.: The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* **98**: 365-376, 1999.

LINDSAY RS, RESNICK HE, ZHU J, et al.: Adiponectin and coronary heart disease: the Strong Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25:** e15-16, 2005.

LIVSHITZ G, PANTSULAIA I, TROFIMOV S, KOBYLIANSKY E. Genetic variation of circulating leptin is involved in genetic variation of hand bone size and geometry. *Osteoporos Int* **14:** 476–483, 2003.

LHOTSKÁ L, BLÁHA P, VIGNEROVÁ J, ROTH Z, PROKOPEC M. V. celostátní antropometrický výzkum dětí a mládeže 1991 (české země). SZÚ, Praha, 1993.

LOPEZ M, SEOANE LM, TOVAR S, NOGUEIRAS R, DIEQUEZ C , SENARIS R: Orexin–A regulates growth hormone-releasing hormone mRNA content in a nucleus-specific manner and somatostatin mRNA content in a hormone-dependent fashion in the rat hypothalamus. *Eur J Neuroci* **19**: 2080-2088, 2004.

LUTZ TA, ALTHAUS J, ROSSI R, SCHARRER E: Anorectic effect of amylin is not transmitted by capsaicin-sensitive nerve fibres. *Am J Physiol: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **274**: R1777–R1782, 1998.

LUTZ TA, TSCHUDY S, MOLLET A, et al.: Dopamine D_2 receptors mediate amylin´s acute satiety effect. *Am J Physiol: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **280**: R1697–R1703, 2001.

MA K, CABRERO A, SAHA PK, KOJIMA H, LI L , CHANG BH: Increased beta-oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. *J Biol Chem* **277**: 34658-34661, 2002.

MAEDA N, SHIMOMURA I, KISHIDA K, et al.: Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* **8**: 731-737, 2002.

MAEDA N, TAKAHASHI M, FUNAHASHI T, et al.: PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* **50**: 2094-2099, 2001.

MAGGI CA: The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. *J Auton Pharmacol* **11**: 173-208, 1991.

MALIK KF, YOUNG WS: Localization of binding sites in the central nervous system for leptin (OB protein) in normal, obese (ob/ob), and diabetic (db/db) C57BL/6J mice. *Endocrinology* **137**: 1497-1500, 1996.

MANIGRASSO MR, FERRONI P, SANTILLI F, et al.: Association between circulating adiponectin and interleuin-10 levels in android obesity. Effects of weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* **90**: 5876-5879, 2005.

MATSUBARA M, MARUOKA S, KATAYOSE S: Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur J Endocrinol* **147**: 173-780, 2002.

MATSUBARA M, KATYOSE S, MARUOKA S: Decreased plasma adiponectin concentrations in nondiabetic women with elevated homeostasis model assessment ratios. *Eur J Endocrinol* **148**: 343-350, 2003.

MATSUMURA T, NAKAYAMA M, SATOH H, NAITO A, KAMAHARA K, SEKIZAWA K: Plasma orexin-A levels and body composition in COPD. *Chest* **123**:1060-1065, 2003.

MATSUMURA T, NAKAYAMA M, NOMURA A, et al.: Age-related changes in plasma orexin-A concentrations. *Exp Gerontol* **37**: 1127-1130, 2002.

MATSUZAWA Y, FUNAHASHI T, NAKAMURA T: Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann N Y Acad Sci* **892**: 146-154, 1999.

MATSUZAWA Y, FUNAHASHI T, KIHARA S, SHIMOMURA I: Adiponectin and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24:** 29-33, 2004.

MAZZOCCHI G, MALENDOWICZ K, GOTTARDO L, et al.: Orexin-A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 778-782, 2001.

MIGNOT E: A commentary on the neurobiology of the hypocretin/orexin system. *Neuropsychopharmacology* **25**: S6-S13, 2001.

MISRA M, MILLER KK, HERZOG DB, et al.: Growth hormone and ghrelin responses to an oral glucose load in adolescent girls with anorexia nervosa and controls. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 1605-1612, 2004.

MITSUMA T, HIROOKA Y, KAYAMA M, et al.: Radioimmunoassay for orexin A. *Life Sci* **66:** 897-904, 2000.

MONTAGUE CT, FAROOQI IS, WHITEHEAD JP, et al.: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* **387**: 903-908, 1997.

MOORE GB, CHAPMAN H, HOLDER JC, et al.: Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* **286**: 735-741, 2001.

MORÁŇ M, SIEGELOVÁ J, KADAŇKA Z, et al.: Cirkadiánní variabilita krevního tlaku a srdeční frekvence u pacientů se syndromem spánkové apnoe. *Čes a slov Neurol Neurochir* **3**: 147-151, 2000.

MORIARTY P, DIMALINE R, THOMPSON DG, DOCRAY GJ: Characterization of cholecystokininA and cholecystokininB receptors expressed by vagal afferent neurons. *Neuroscience* **79**: 905-913, 1997.

MORIGUCHI T, SAKURAI T, NAMBU T, et al.: Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neurosci Lett* **264**: 101-104, 1999.

MOUNTJOY KG, MORTRUD MT, LOW MJ, SIMERLY RB, CONE RD : Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* **8**: 1298-1308, 1994.

NADLER ST, STOEHR JP, SCHUELLER KL, TANIMOTO G, YANDELL BS: The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11371-11376, 2001.

NAKABAYASHI M, SUZUKI T, TAKAHASHI K, et al.: Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol* **205**: 43-50, 2003.

NAKAZATO M, MURAKAMI N, DATE Y, et al.: A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **409**: 194 – 198, 2001.

NISHIJIMA T, SAKURAI S, ARIHARA Z, TAKAHASHI K: Plasma orexin–A-like immunoreactivity in patients with sleep apnea hypopnea syndrome. *Peptides* **24**: 407-411, 2003.

NISHIZAWA H, SHIMOMURA I, KISHIDA K, MAEDA N, KURIYAMA H, NAGARETANI H: Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte derived protein. *Diabetes* **51**: 2734-2741, 2002.

NEDVÍDKOVÁ J, SMITKA K, KOPSKÝ V, HAINER V: Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res* **54**: 133-140, 2005.

NEDVÍDKOVÁ J, KRYKORKOVÁ I, BARTÁK V, et al.: Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 1678-1682, 2003.

NEVŠÍMALOVÁ S, VAŇKOVÁ J, ŠONKA K, et al.: Deficit hypocretinu (orexinu) u narkolepsie-kataplexie. *Sbor lék:* **101**: 381-386, 2000.

NILSSON L, BINART N, BOHLOOLY-Y M, et al.: Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 1120-1126, 2005.

NISHINO S, RIPLEY B, OVEREEM S, et al.: Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *The Lancet* **355**: 39-40, 2000.

OTT V, FASSHAUER M, DALSKI A, MEIER B, PERWITZ N, KLEIN HH: Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin express. *Horm Metab Res* **34**: 640-645, 2002.

OTTO B, CUNTZ U, FRUEHAUF E, et al.: Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentartions of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* **145**: 669-673, 2001.

OUCHI N, KIHARA S, ARITA Y, MAEDA K, KURIYAMA H: Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* **100**: 2473-2476, 1999.

PAIK KH, JIN D-KJ, SONG SY, et al.: Correlation between fasting plasma ghrelin levels and age, body mass index (BMI), BMI percentiles, and 24-hour plasma ghrelin profiles in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 3885-3889, 2004.

PARK HS, LEE KU, KIM YS, PARK CY: Relationships between fasting plasma ghrelin levels and metabolic parameters in children and adolescents. *Metabolism* **54**: 925-929, 2005.

PELLEYMOUNTER MA, CULLEN MJ, BAKER MB, et al.: Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* **269**: 540-543, 1995.

PERACCHI M, CONTE D, TERRANI C, et al.: Circulating ghrelin levels in celiac patients. *Am J Gastroenterol* **98**: 2474-2478, 2003.

PERCY AJ, TRAINOR DA, RITTENHOUSE J, PHELPS J, KODA JE: Development of sensitive immunoassays to detect amylin and amylin-like peptides in unextracted plasma. *Clin Chem* **42**: 576-585, 1996.

PEYRON C, FARACO J, ROGERS W, et al.: A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* **6**: 991-997, 2000.

PEYRON C, TIGHE DK, VAN DEN POL AN, et al.: Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* **18**: 9996-10015, 1998.

PISCHON T, HOTAMISLIGIL GS, RIMM EB: Adiponectin: Stability in plasma over 36 hours and within-person variation over 1 year. *Clin Chem* **49**: 650-652, 2003.

PORKKA-HEISKANEN T, ALANKO L, KALINCHUK A, HEISKANEN S, STENBERG D: The effect of age on prepro-orexin gene expression and contents of orexin A and B in the rat brain. *Neurobiol Aging* **25**: 231-238, 2004.

RANDEVA HS, KARTERIS E, GRAMMATOPOULOS D, HILLHOUSE EW: Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 4808-4813, 2001.

RAVUSSIN E, TSCHÖP M, MORALES S, et al.: Plasma ghrelin concentration and energy balance: overfeeding and negative energy balance studies in twins. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 4547 – 4551, 2001.

REINEHR T, ROTH CL, ALEXY U, KERSTING M, KIESS W, ANDLER W: Ghrelin levels before and after reduction of overweight due to a low-fat high-carbohydrate diet in obese children and adolescents. *Int J Obes* **29**: 362-368, 2005.

REINEHR T, ROTH C, MENKE T, ANDLER W: Adiponectin before and after weight loss in obese children. *J Clin Endocrinol Metab* **89**: 3790-3794, 2004.

RIEDIGER T, RAUCH M, SCHMID HA: Actions of amylin on subfornical organ neurons and on drinking behavior in rats. *Am J Physiol: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **276**: R514 – R521, 1999.

RIGAMONTI AE, PINCELLI AI, CORRA B, et al.: Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *J Endocrinol* **175**: R1-R5, 2002.

ROCCHI S, AUWERX J: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: a versatile metabolic regulator. *Ann Med* **31**: 342-351, 1999.

RODGERS RJ, HALFORD JCG, NUNES DE SOUZA RL, et al.: Dose-response effects of orexin-A on food intake and the behavioural satiety sequence in rats. *Regul Pept* **96**: 71-84, 2000.

SAKURAI T.: Orexins and orexin receptors: implication in feeding behavior. *Regul Pept* **85**: 25-30, 1999.

SAKURAI T, AMEMIYA A, ISHII M, et al.: Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**: 573-585, 1998.

SAMSOM M, SZARKA LA, CAMILLERI M, et al.: Pramlintide, an amylin analog, selectively delays gastric emptying: potential role of vagal inhibition. *Am J Physiol: Gastrointestinal and Liver Physiology* **278**: G946 – G951, 2000.

SÁNCHEZ DE MIGUEL MJ, BURRELL MA: Immunocytochemical detection of orexin A in endocrine cells of the developing mouse gut. *J Histochem Cytochem* **50**: 63-69, 2002.

SARTIN JL, DYER C, MATTERI R, et al.: Effect of intracerebroventricular orexin-B on food intake in sheep. *J Anim Sci* **79**: 1573-1577, 2001.

SEOANE LM, TOVAR SA, PEREZ D, et al.: Orexin A suppresses in vivo GH secretion. *Eur J Endocrinol* **150**: 731-736, 2004.

SHIYA T, NAKAZATO M, MIZUTA M, et al.: Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 240-244, 2002.

SHUGHRUE PJ, LANE MV, MERCHENTHALER I: Glucagon-like peptide-I receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology* **137**: 5159-5162, 1996.

SCHERER PE, WILLIAMS S, FOGLIANO M, BALDINI G, LODISH HF: A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* **270**: 26746-26749, 1995.

SCHUBERT D, BEHL C, LESLEY R, et al.: Amyloid peptides are toxic via a common oxidative mechanism. *Proc Natl Acad. Sci USA* **92**: 1989 – 1993, 1995.

SCHWARTZ MW, PESKIND E, RASKIND M, BOYKO EJ, PORTE D JR: Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* **2**: 589-593, 1996.

SILVESTRE RA, RODRÍGUEZ-GALLARDO J, JODKA C, et al.: Selective amylin inhibition of the glucagon response to arginine is extrinsic to the pancreas. *Am J Physiol: Endocrinology and Metabolism* **280**: E443 – E449, 2001.

SMITH RG, LEONARD R, BAILEY AR, et al.: Growth-hormone secretagogue receptor family members and ligands. *Endocrine* **14**: 9 – 14, 2001.

SORIANO-GUILLÉN L, BARRIOS V, CAMPOS-BARROS A, ARGENTE J: Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr* **144**: 36-42, 2004.

SORIANO-GUILLÉN L, BARRIOS V, CHOWEN JA, et al.: Ghrelin levels from fetal life through early adulthood: relationship with endocrine and metbolic and anthropometric measures. *J Pediatr* **144**: 30-35, 2004.

SORIANO-GUILLÉN L, BARRIOS V, MARTOS G, CHOWEN JA, CAMPOS-BARROS A, ARGENTE J: Effect of oral glucose administration on ghrelin levels in obese children. *Eur J Endocrinol* **151**: 119-121, 2004.

SPINA M, MERLO-PICH E, CHAN RK, et al.: Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science*: **273**: 1561-1564, 1996.

STANLEY BG, HOEBEL BG, LEIBOWITZ SF: Neurotensin: effects of hypothalamic and intravenous injections on eating and drinking in rats. *Peptides:* **4**: 493-500, 1983.

STANLEY BG, WILLETT III VL, DONIAS HW, HA LH, SPEARS LC: The lateral hypothalamus: a primary site mediating excitatory amino acid-elicited eating. *Brain Res:* **630**: 41-49, 1993.

STATNICK MA, BEAVERS LS, CONNER LJ, COROMINOLA H, JOHNSON D, HAMMOND CD: Decreased expression of apM 1 in omental and subcutaneous adipose tissue of human with type 2 diabetes. *Int J Exp Diabetes Res* **1**: 81-88, 2000.

STEFAN N, BUNT JC, SALBE AD, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y, TATARANNI PA: Plasma adiponectin concentrations in children: relationships with obesity and insulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 4652-4656, 2002.

STEPHENS TW, BASINSKI M, BRISTOW PK, et al.: The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* **377**: 530-532, 1995.

SUOMINEN P: Evaluation of an enzyme immunometric assay to measure serum adiponectin concentrations. *Clin Chem* **50**: 219- 221, 2004.

TAHERI S, MAHMOODI M, OPACKA-JUFFRY J, et al.: Distribution and quantification of immunoreactive orexin A in rat tissues. *FEBS Letters* **457**: 157-161, 1999.

TANAKA M, NARUO T, MURANAGA T, et al: Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol* **146**: R1-R3, 2002.

TANAKA M, NARUO T, NAGAI N, et al.: Habitual binge/purge behavior influeces circulating ghrelin levels in eating disorders. *J Psychiatr Res* **37**: 17-22, 2003.

TANAKA M, NARUO T, YASUHARA D, et al.: Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* **28**: 829-835, 2003.

TANAKA M, TATEBE Y, NAKAHARA T, et al: Eating pattern and the effect of oral glucose on ghrelin and insulin secretion in patients with anorexia nervosa. *Clin Endocrinol* **59**: 574-579, 2003.

TARTAGLIA LA: The leptin receptor. *J Biol Chem* **272**: 6093-6096, 1997.

THAMER C, MACHANN J, TSCHRITTER O, et al.: Relationship between serum adiponectin concentration and intramyocellular lipid store in humans. *Horm Metab Res* **34**: 646-649, 2003.

THANNICKAL TC, MOORE RY, NIENHUIS R, et al.: Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* **27**: 469-474 , 2000.

TOLLE V, KADEM NM, BLUET-PAJOT MT, et al: Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocrinol Metabol* **88**: 109-116, 2003.

TOMASETTO C, KARAM SM, RIBIERAS S, et al.: Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: the motilin-related peptide. *Gastroenterology* **119**: 395 – 405, 2000.

TOMASIK PJ, SPODARYK M, SZTEFKO K: Plasma concentrations of orexins in children. *Ann Nutr Metab* **48**: 215-220, 2004.

TSCHÖP M, SMILEY DL, HEIMAN ML: Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **407**: 908 – 913, 2000.

TSCHÖP M, WAWARTA R, RIEPL RL, et al.: Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* **24**: RC19 – RC21, 2001.

TSUKAMOTO H, ISHIKAWA T, FUJII Y, FUKUMIZU M, SUGAI K, KANBAYASHI T: Undetectable levels of CSF hypocretin-1 (orexin-A) in two prepubertal boys with narcolepsy. *Neuropediatrics* **33**: 51-52, 2002.

UKKOLA O, RAVUSSIN E, JACOBSON P, et al.: Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 3996 – 3999, 2001.

VAN DEN POL AN: Hypothalamic hypocretin (orexin): Robust innervation of the spinal cord. *J Neurosci* **19**: 3171-3182, 1999.

VELDHUIS JD, BOWERS CY: Human GH pulsatility: an ensemble property regulated by age and gender. *J Endocrinol Invest* **26**: 799-813, 2003.

VERCHERE CB, D´ALESSIO DA, PALMITER RD, et al.: Islet amyloid formation associated with hyperglycemia in transgenic mice with pancreatic beta cell expression of human islet amyloid polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3492 – 3496, 1996.

VITIELLO B, LEDRHENDLER I.: Research on eating disorders: Current status and future prospects. *Biol Psychiatry* **47**: 777-786, 2000.

VIVENZA D, RAPA A, CASTELLINO N, et al. Ghrelin gene polymorphisms and ghrelin, insulin, IGF-1, leptin and anthropometric data in children and adolescents. *Eur J Endocrinol* **151**: 127-133, 2004.

WEYER C, FUNAHASHI T, TANAKA S, et al.: Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 1930-1935, 2001.

WHATMORE AJ, HALL CM, JONES J, WESTWOOD M, CLAYTON PE: Ghrelin concentrations in healthy children and adolescents. *Clin Endocrinol* **59**: 649-654, 2003.

WIMALAWANSA SJ: Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: A peptide superfamily. *Crit Rev Neurobiol* **11**: 167 – 239, 1997.

WINGATE DL, EWART WR: The brain-gut axis. In: YAMADA T, ALPERS DH, OWYANG C, POWELL DW, SILVERSTEIN FE: Textbook of Gastroenterology. B. Lippincott Co., Philadelphia, 50-60, 1981.

WOLFFENBUTTEL BH, GRAAL MB: New treatments for patients with type 2 diabetes mellitus. *Postgrad Med J* **72**: 657 – 662, 1996.

WOOKEY PJ, CAO Z, VAN GEENEN RCI, et al.: Increased density of renal amylin binding sites in experimental hypertension. *Hypertension* **30**: 455 – 460, 1997.

WREN AM, SEAL LJ, COHEN MA, et al.: Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 5992, 2001.

YAMAMOTO Y, HIROSE H, SAITO I, et al.: Correlation of the adipocyte derived protein adiponectin with insulin resistance index serum high-density lipoprotein-cholesterol in the Japanese population. *Clin Sci* **103**: 137-142, 2002.

YAMAMOTO K, KIYOHARA T, MURAYAMA Y, et al.: Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn´s disease. *Gut* **54**: 789-796, 2005.

YAMAUCHI T, KAMON J, ITO Y, et al.: Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **423**: 762-769, 2003.

YANG W-S, LEE W-J, FANAHASHI T, et al.: Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 3815-3819, 2001.

YEO GSH, FAROOQI IS, AMINIAN S, et al.: A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. Nat Genet 20: 111-112, 1998.

YOKOTA T, ORITANI K, TAKAHASHI I, et al.: Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* **96**: 1723-1732, 2000.

YOSHIMICHI G, YOSHIMATSU H, MASAKI T, et al.: Orexin-A regulates body temperature in coordination with arousal status. *Exp Biol Med* **226**: 468-476, 2001.

ZEMEL MB: Agouti/melanocortin interactions with leptin pathways in obesity. *Nutr Rev* **56**: 271-274, 1998.

ZHANG Y, MATHENY M, ZOLOTUKHIN S, TUMER N, SCARPACE PJ: Regulation of adiponectin and leptin gene expression in white and brown adipose tissues: influence of beta3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. *Biochim Biophys Acta* **1584**: 115-122, 2002.

ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**: 425-432, 1994.

ZOCCALI C, MALLAMACI F, TRIPEPI G, et al.: Adiponectin, metabolic risk factor, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* **13**: 134-141, 2002.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ

8.1. Původní práce a přehledné články v časopisech s definovaným impakt faktorem

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, ZAMRAZILOVÁ H, PECHOVÁ M, CHADA M, KOTAŠKA K, NEVORAL J, PRŮŠA R: Dynamic changes of orexin A, leptin and anthropometrical data in obese children during reduction of body weight. *Physiol Res* **56**: 2007, přijato do tisku. ISSN 0862-8408. IF = 1,140.

BRONSKÝ J, PRŮŠA R: Amylin fasting plasma levels are decreased in patients with osteoporosis. *Osteopor Int* **15**: 243-247, 2004. ISSN: 0937-941X (Tištěná verze) 1433-2965 (Online verze). IF = 3,799.

BRONSKÝ J, CHADA M, KOTAŠKA K, PRŮŠA R: Hypothalamické neuropeptidy ovlivňující příjem potravy a regulaci energetické rovnováhy. *Čes a slov Neurol Neurochir* **66/99**: 8-13, 2003. ISSN: 1210-7859. IF = 0,047.

CHADA M, PRŮŠA R, BRONSKÝ J, KOTAŠKA K, ŠÍDLOVÁ K, PECHOVÁ M, LISÁ L: Inhibin B, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone during childhood and puberty in males: changes in serum concentrations in relation to age and stage of puberty. *Physiol Res* **52**: 45-51, 2003. ISSN 0862-8408. IF = 1,140.

CHADA M, PRŮŠA R, BRONSKÝ J, PECHOVÁ M, LISÁ L: Inhibin B, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and oestradiol and their relationship to the regulation of follicle development in females during childhood and puberty. *Physiol Res* **52**: 341-346, 2003. ISSN 0862-8408. IF = 1,140.

BRONSKÝ J, PRŮŠA R, NEVORAL J: The role of amylin and related peptides in osteoporosis. *Clin Chim Acta*, v recenzním řízení.

BRONSKÝ J, KARPÍŠEK M, BRONSKÁ E, PECHOVÁ M, JANČÍKOVÁ B, KOTOLOVÁ H, PRŮŠA R, NEVORAL J: Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein (AFABP), and

epidermal fatty acid binding protein (EFABP) – proteins newly identified in human breast milk. *Clin Chem*, v recenzním řízení.

8.2. Ostatní původní práce a přehledné články

BRONSKÝ J, CHADA M, NEVORAL J, KRÁSNIČANOVÁ H, LISÁ L, PRŮŠA R: Orexiny - experimentální poznatky a perspektivy v pediatrické praxi. *Čes-slov Pediat* **57**: 600 – 603, 2002. ISSN 0069-2328.

BRONSKÝ J, CHADA M, KOTAŠKA K, PRŮŠA R: Amylin – fyziologická úloha v lidském organismu. *Čs Fyziol* **51**: 179-180, 2002. ISSN 1210-6313.

BRONSKÝ J: Orexiny – spát či jíst? *Lékařské listy* **1**: 24, 2003. ISSN 0044-1996.

PRŮŠA R, BRONSKÝ J: Molekula roku 2002 – humanin. *Pelikán, Akademický bulletin UK 2.lékařské fakulty* **10**: 15, 2002. ISSN 1214-2670.

PRŮŠA R, ZADINA J, BRONSKÝ J: Aktivovaný koagulační faktor XII u pacientů s hyperglykémií a dyslipoproteinémií. *Vnitř Lék* **50**: 917-922, 2004. ISSN 0042-773X.

BRONSKÝ J, KOTAŠKA K, PRŮŠA R: Ghrelin – struktura, funkce a klinické využití. *Čs Fyziol* **53**: 80-85, 2004. ISSN 1210-6313.

BRONSKÝ J, VESELÁ M, KRÁSNIČANOVÁ H, NEDVÍDKOVÁ J, SCHMIDTOVÁ J, HRDLIČKA M, KOUTEK J, PRŮŠA R, NEVORAL J: Celkový ghrelin v plazmě pacientek s mentální anorexií během osmitýdenní realimentace. *Čes a slov psychiatrie* **101**: 45-48, 2005. ISSN 1212-0383.

BRONSKÝ J: Peptidové hormony v regulaci příjmu potravy a nutričního stavu organismu. *Výživa a potraviny* **5**: 133-134, 2005. ISSN 1211-846X.

BRONSKÝ J, NEVORAL J, PRŮŠA R: Adiponektin - marker insulinové sensitivity. *Čs Fyziol* **54**: 92-96, 2005. ISSN 1210-6313.

BRONSKÝ J.: Význam formulí ve výživě dítěte batolecího věku. *Čtvrtletní noviny Nutricia*, v tisku.

8.3. Oponovaná abstrakta v časopisech s definovaným impakt faktorem

PRŮŠA R, LISÁ L, PECHOVÁ M, BRONSKÝ J, CHADA M: Inhibin B, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone and their relationships in males during childhood and puberty. *Clin Chem Lab Med, Spec Suppl* **40**: 90, 2002. ISSN 1437-8523. IF = 1,685.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, ZAMRAZILOVÁ H, PECHOVÁ M, KOTAŠKA K, PRŮŠA R: Ghrelin, leptin, IGF1 and IGFBP-3 and their relationship in obese children during reduction of body weight. *Clin Chem Lab Med, Spec Suppl* **41**: 347, 2003. ISSN 1437-8523. IF = 1,685.

BRONSKÝ J, ZADINA J, PECHOVÁ M, CHADA M, PRŮŠA R: Amylin plasma levels in patients with osteoporosis and type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med, Spec Suppl* **41**: 83, 2003. ISSN 1437-8523. IF = 1,685.

CHADA M, KOTAŠKA K, BRONSKÝ J, PECHOVÁ M, LISÁ L, PRŮŠA R: Dimeric inhibins, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and oestradiol and their relationship in girls during childhood and puberty. *Clin Chem Lab Med, Spec Suppl* **41**: 94, 2003. ISSN 1437-8523. IF = 1,685.

BRONSKÝ J, PECHOVÁ M, NEDVÍDKOVÁ J, ZAMRAZILOVÁ H, PRŮŠA R: Orexin A fasting plasma levels increase after weight loss in obese children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr, Spec Suppl* **36**: 520-583, 2003. ISSN 0277-2116 (tištěná verze), 1536-4801 (online verze). IF = 1,402.

BRONSKÝ J, PECHOVÁ M, NEDVÍDKOVÁ J, CHADA M, PRŮŠA R: Orexin A and leptin levels change inversely during reduction of body fat in obese children and adolescents. *Clin Chem, Suppl* **49**: A142, 2003. ISSN 0009-9147. IF = 6,501.

PRŮŠA R, BRONSKÝ J, ČEPOVÁ J, PECHOVÁ M: A possible role of amylin in the pathogenesis of osteoporosis. *Clin Chem, Suppl* **49**: A126, 2003. ISSN 0009-9147. IF = 6,501.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, SCHMIDTOVÁ J, HRDLIČKA M, PRŮŠA R, KRÁSNIČANOVÁ H, NEVORAL J: Ghrelin, leptin, IGF-1, IGF BP-3 and their relationship in girls with mental anorexia before and after realimentation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr, Spec Suppl* **39**: S74, 2004. ISSN 0277-2116 (tištěná verze), 1536-4801 (online verze). IF = 1,402.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, PRŮŠA R, VALTROVÁ V, NEVORAL J: Changes of ghrelin plasma levels during decrease of body weight in obese children. *Gut / Endoscopy, Spec Suppl* **53/36**: A11, 2004. ISSN 0017-5749 / 0013-726X. IF = 6,601.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, ŠRÁMKOVÁ D, PECHOVÁ M, PRŮŠA R, NEVORAL J: Adiponectin, insulin and C-peptide serum levels in obese children before and after reduction of body weight. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **40**: 688, 2005. ISSN 0277-2116 (tištěná verze), 1536-4801 (online verze). IF = 1,402.

PRŮŠA R, BRONSKÝ J, ŠRÁMKOVÁ D, PECHOVÁ M, NEVORAL J: Adiponectin serum levels in obese and non-obese children and its relationship to biomarkers of lipid metabolism. *Clin Chem, Suppl* **51**: A232-233, 2005. ISSN 0009-9147. IF = 6,501.

8.4. Ostatní přednášky a postery

BRONSKÝ J, KOTAŠKA K, CHADA M, PRŮŠA R: Orexins - new biomarkers of nutrition. Poster. 6.pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Masarykova univerzita, Brno, 2002, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, PRŮŠA R, MERCER JG: Exprese preproorexinové mRNA v laterálním hypothalamu sibiřských křečků. Přednáška. Studentská vědecká konference UK 2.LF, Praha, 2002, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, PRŮŠA R, LISÁ L: Orexins/hypocretins – new appetite stimulants. Přednáška. European Childhood Obesity Group, 12th Workshop, Praha, 2002, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, PRŮŠA R: Úloha orexinu A v regulaci příjmu potravy. Přednáška. Kinantropologické dny MUDr. V. Soulka, Hradec Králové, 2002, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, CHADA M, PRŮŠA R: Orexins/hypocretins – the role in food intake, digestion and gastrointestinal motility. Poster. Kinantropologické dny MUDr. V. Soulka, Hradec Králové, 2002, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, PRŮŠA R, ČEPOVÁ J: Amylin v souvislosti patobiochemie diabetu mellitu a osteoporózy. Přednáška. FONS, Pardubice, 2002, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, PRŮŠA R: Význam orexinu A a amylinu v regulaci příjmu potravy a trávicích procesů. Poster. FONS, Pardubice, 2002, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, PRŮŠA R, LISÁ L: Orexin A – perspektivy v obezitologii. Přednáška. 9. pracovní den – Obezitologie 2002, Karlovy Vary, 2002, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, LISÁ L, PRŮŠA R: Role Orexinu A v rozvoji obezity. Poster. 9. pracovní den – Obezitologie 2002, Karlovy Vary, 2002, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, PECHOVÁ M, NEDVÍDKOVÁ J, TŮMOVÁ M, PRŮŠA R: Changes of orexin A-plasma levels during weight-reduction therapy in obese children and adolescents. Přednáška. 7. pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Masarykova univerzita, Brno, 2003, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, PECHOVÁ M, ZADINA J, ČEPOVÁ J, BARTÁŠKOVÁ D, PRŮŠA R: Amylin – možné využití v léčbě osteoporózy. Poster. 7. pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Masarykova univerzita, Brno, 2003, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, PECHOVÁ M, ŠRÁMKOVÁ D, PRŮŠA R: Plazmatické hladiny Orexinu A u obézních dětí. Poster. Studentská vědecká konference UK 2.LF, Praha, 2003, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, ZADINA J, PECHOVÁ M, CHADA M, PRŮŠA R: Amylin plasma levels in patients with osteoporosis and type 2 diabetes mellitus. Poster. 15th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Barcelona, Španělsko, 2003.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, ZAMRAZILOVÁ H, PECHOVÁ M, KOTAŠKA K, PRŮŠA R: Ghrelin, leptin, IGF1 and IGFBP-3 and their relationship in obese children during reduction of body weight. Poster. 15th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Barcelona, Španělsko, 2003.

CHADA M, KOTAŠKA K, BRONSKÝ J, PECHOVÁ M, LISÁ L, PRŮŠA R: Dimeric inhibins, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and oestradiol and their relationship in girls during childhood and puberty. Poster. 15th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Barcelona, Španělsko, 2003.

BRONSKÝ J, PECHOVÁ M, NEDVÍDKOVÁ J, ZAMRAZILOVÁ H, PRŮŠA R: Orexin A fasting plasma levels increase after weight loss in obese children and adolescents. Poster. Symposium of European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN), Praha, 2003.

BRONSKÝ J, PECHOVÁ M, NEDVIDKOVÁ J, CHADA M, PRŮŠA R: Orexin A and leptin levels change inversely during reduction of body fat in obese children and adolescents. Poster. 55th Annual Meeting of AACC, Philadelphia, USA, 2003.

PRŮŠA R, BRONSKÝ J, ČEPOVÁ J, PECHOVÁ M: A possible role of amylin in the pathogenesis of osteoporosis. Poster. 55th Annual Meeting of AACC, Philadelphia, USA, 2003.

BRONSKÝ J, PECHOVÁ M, NEDVÍDKOVÁ J, ZAMRAZILOVÁ H, PRŮŠA R: Orexin A fasting plasma levels increase after weight loss in obese children and adolescents. Poster. ESPGHAN Summer School, Almunecar, Španělsko, 2003.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, ZAMRAZILOVÁ H, PECHOVÁ M, KOTAŠKA K, PRŮŠA R: Ghrelin, Leptin, IGF1 and IGFBP-3 and Their Relationship in Obese Children During Reduction of Body Weight. Poster. ESPGHAN Summer School, Almunecar, Španělsko, 2003.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, PECHOVÁ M, ZAMRAZILOVÁ H, PRŮŠA R: Plasma levels of orexin A in the relationship to biochemical and anthropometrical markers of nutritional status. Přednáška. VI. Celostátní sjezd ČSKB, Hradec Králové, 2003, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, PRŮŠA R: Ghrelin and its possible role in childhood obesity. Poster. VI. Celostátní sjezd ČSKB, Hradec Králové, 2003, abstrakt ve sborníku příspěvků.

CHADA M, LISÁ L, PECHOVÁ M, BRONSKÝ J, PRŮŠA R: Regulation of biologically active dimeric inhibin A and inhibin B in healthy girls during childhood and puberty. Poster. VI. Celostátní sjezd ČSKB, Hradec Králové, 2003, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, PRŮŠA R, NEVORAL J: Orexin A a ghrelin v regulaci nutričního stavu u dětí. Přednáška. 14. celostátní konference dětské gastroenterologie a výživy, Karlovy Vary, 2003.

BRONSKÝ J, PRŮŠA R: Ghrelin – a new chapter in the paediatric obesity book? Poster. 12. Tagung "Pädiatrische Forschung mitteleuropäischer Länder", Vídeň, Rakousko, 2003.

VALTROVÁ V, NEVORAL J, KOTALOVÁ R, BRONSKÝ J, KRÁSNIČANOVÁ H, SZITÁNYI P, POZLER O, DĚDEK P, SÝKORA J, KOLEK A, VOSPĚLOVÁ J, FRÜHAUF

P: Infliximab (Remicade) v terapii Crohnovy nemoci (CN) u dětí a mladistvých. Přednáška. Satelitní sympozium firmy Schering-Plough. „Aktualizované standardy léčby infliximabem“, Štiřín, 2004.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, SCHMIDTOVÁ J, HRDLIČKA M, PRŮŠA R, KRÁSNIČANOVÁ H, NEVORAL J: Ghrelin, leptin, IGF-1, IGF BP-3 and their relationship in girls with mental anorexia before and after realimentation. Poster. 2. světový kongres WCPGHAN, Paříž, Francie, 2004.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, SCHMIDTOVÁ J, HRDLIČKA M, KOUTEK J, PRŮŠA R, KRÁSNIČANOVÁ H, NEVORAL J: Ghrelin, leptin, IGF-1, IGF BP-3 a jejich vzájemný vztah u pacientek s mentální anorexií během realimentační a psychiatrické léčby. Poster. Studentská vědecká konference UK 2.LF, Praha, 2004.

VALTROVÁ V, NEVORAL J, BRONSKÝ J, SZITÁNYI P, KOTALOVÁ R, POZLER O, DĚDEK P, SÝKORA J, KOLEK A, FRÜHAUF P: Infliximab (Remicade) v terapii Crohnovy nemoci u dětí. Přednáška. VI. český pediatrický kongres s mezinárodní účastí, Ostrava, 2004, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, SCHMIDTOVÁ J, HRDLIČKA M, KOUTEK J, PRŮŠA R, KRÁSNIČANOVÁ H, NEVORAL J: Imunoreaktivní orexin A u pacientek s mentální anorexií. Přednáška. VI. český pediatrický kongres s mezinárodní účastí, Ostrava, 2004, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, NEDVIDKOVÁ J, PRŮŠA R, VALTROVÁ V, NEVORAL J: Changes of ghrelin plasma levels during decrease of body weight in obese children. Přednáška. United European Gastroenterology Week, Praha, 2004.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, SCHMIDTOVÁ J, HRDLIČKA M, KOUTEK J, KRÁSNIČANOVÁ H, NEVORAL J, PRŮŠA R: Význam stanovení imunoreaktivního orexinu A v periferní plazmě pacientek s mentální anorexií. Poster. FONS 2004, Pardubice, 2004, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, LISÁ L, PECHOVÁ M, PRŮŠA R: Úloha adiponektinu v patogenezi obezity a insulinové resistence u dětí a adolescentů. Poster. FONS 2004, Pardubice, 2004, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, PECHOVÁ M, VALTROVÁ V, PRŮŠA R, NEVORAL J: Stanovování adiponektinu u pacientů s poruchou nutričního stavu. Přednáška. 16. celostátní konference dětské gastroenterologie a výživy, Karlovy Vary, 2004.

VALTROVÁ V, NEVORAL J, KOTALOVÁ R, SZITÁNYI P, BRONSKÝ J: Naše zkušenosti s léčbou idiopatické proktokolitidy u mladistvých infliximabem. Přednáška. 16. celostátní konference dětské gastroenterologie a výživy, Karlovy Vary, 2004.

BRONSKÝ J, VESELÁ M, KRÁSNIČANOVÁ H, NEDVÍDKOVÁ J, SCHMIDTOVÁ J, HRDLIČKA M, KOUTEK J, PRŮŠA R, NEVORAL J: Celkový ghrelin v plazmě pacientek s mentální anorexií během 8 týdenní realimentace. Poster. V. Mezinárodní a mezioborová konference o poruchách příjmu potravy (V. Interdisciplinary Eating Disorders Conference), Praha, 2005.

VALTROVÁ V, NEVORAL J, KOTALOVÁ R, SZITÁNYI P, BRONSKÝ J: Biologická léčba IBD u dětí a mladistvých. Přednáška. Piešťany, Slovenská republika, 2005.

BRONSKÝ J, PECHOVÁ M, ŠRÁMKOVÁ D, NEVORAL J, PRŮŠA R: Vliv redukce tělesné hmotnosti u dětí na sérové hladiny adiponektinu. Přednáška. Studentská vědecká konference UK 2.LF, Praha, 2005, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, NEDVÍDKOVÁ J, ŠRÁMKOVÁ D, PECHOVÁ M, PRŮŠA R, NEVORAL J: Adiponectin, insulin and C-peptide serum levels in obese children before and after reduction of body weight. Poster. Symposium of European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN), Porto, Portugalsko, 2005.

PRŮŠA R, BRONSKÝ J, ŠRÁMKOVÁ D, PECHOVÁ M, NEVORAL J: Adiponectin serum levels in obese and non-obese children and its relationship to biomarkers of lipid metabolism. Poster. XIX International Congress of Clinical Chemistry IFCC/AACC, Orlando, Florida, USA, 2005.

BRONSKÝ J, ŠRÁMKOVÁ D, PECHOVÁ M, PRŮŠA R, NEVORAL J: Immunoreactive adiponectin in serum of obese children. Poster. Konference "Paediatric Research of the Central European Countries", Praha, 2005, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, TOMÁŠOVÁ H, NEVORAL J: Faecal lactoferrin as a biomarker of bowel inflammation in childhood. Přednáška. ESPGHAN summer school, Helsingor, Dánsko, 2005, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J: Regulace příjmu potravy a nutričního stavu. Přednáška. Pracovní dny dětské diabetologie, Karlovy Vary, 2005, abstrakt ve sborníku příspěvků.

BRONSKÝ J, TOMÁŠOVÁ H, VALTROVÁ V, SZITÁNYI P, KOTALOVÁ R, NEVORAL J: Laktoferrin v diagnostice střevních onemocnění u dětí. Přednáška. 17. celostátní konference dětské gastroenterologie a výživy, Hradec Králové, 2005.

BRONSKÝ J, KARPÍŠEK M, BRONSKÁ E, PRŮŠA R, NEVORAL J: Nové proteiny mateřského mléka. Přednáška. 17. celostátní konference dětské gastroenterologie a výživy, Hradec Králové, 2005.

BRONSKÝ J, NEVORAL J, CINEK O, HRADSKÝ O, KOTALOVÁ R, VALTROVÁ V, SZITÁNYI P, LUKÁŠ M: Genetika IBD u dětí v ČR. Přednáška. 17. celostátní konference dětské gastroenterologie a výživy, Hradec Králové, 2005.

VALTROVÁ V, NEVORAL J, KOTALOVÁ R, BRONSKÝ J, SZITÁNYI P, KRATOCHVÍLOVÁ E: Infliximab (Remicade) v léčbě ulcerózní kolitidy - Studie ACT 1 & ACT 2. Přednáška. 17. celostátní konference dětské gastroenterologie a výživy, Hradec Králové, 2005.

9. PŘÍLOHY

Seznam příloh:

Příloha č. 1: Percentilové grafy hmotnosti k výšce dle 5. celonárodního antropologického výzkumu dětí a mládeže, 1991 (Lhotská a spol. 1993)

Příloha č. 2: Informovaný souhlas s účastí ve studii