

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Beáta Rác

JINÉ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ DENNÍ HLADINU MELATONINU

MELATONIN A VYBRANÉ HORMONY V PRŮBĚHU DNE A V ZÁVISLOTI NA RŮZNÝCH STIMULECH

OTHER FACTORS INFLUENCING DAYTIME MELATONIN LEVELS

MELATONIN AND OTHER HORMONES DURING A DAY AND AFTER DIFFERENT STIMULI

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Karel Vondra, DrSc.

Školitel-konzultant: MUDr. Michaela Dušková, PhD.

Praha, 2015

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 17.6.2015

Beáta Rác

Podpis:

Identifikační záznam:

RÁCZ, Beáta. Jiné faktory ovlivňující denní hladinu melatoninu.
[Other factors influencing daytime melatonin levels]. Praha, 2015.

Počet stran - 130, počet příloh 3. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Endokrinologický ústav. Školitel Vondra, Karel, školitel-konzultant: Dušková, Michaela.

Poděkování:

Tato disertační práce by nevznikla bez podpory a pochopení mých spolupracovníků a vedení Endokrinologického ústavu v Praze.

Především bych ráda poděkovala panu profesoru Karlu Vondrovi za profesionální vedení, mnoho cenných rad, morální podporu, bezmeznou ochotu a trpělivost, kterou mi věnoval.

Velké poděkování patří panu profesoru Luboslavu Stárkovi a paní doktorce Michaele Duškové za cenné rady, připomínky, vstřícnost a pomoc při realizaci studie.

Ráda bych také poděkovala panu Ing. M. Hillovi, DrSc. za vedení při analýze a statistickém vyhodnocení dat. Současně děkuji celému týmu Oddělení steroidů a proteofaktorů Endokrinologického ústavu za podporu a pomoc.

Předložená práce byla podporována granty NT 12340-5.

Obsah

I. Seznam zkratk.....	1-2
II. Souhrn.....	3
III. Summary.....	4
IV. Hypotéza a cíle projektu.....	5
V. Úvod.....	6-40
1. Cirkadiánní rytmus.....	6-7
2. Melatonin.....	8-17
2.1. Chemická struktura a syntéza.....	8-10
2.2. Mechanismus účinku.....	11-12
2.3. Přehled nejdůležitějších funkcí melatoninu.....	12-13
Melatonin jako antioxidant.....	12
Melatonin a regulace spánku.....	12
Melatonin a neurodegenerativní nemoci.....	13
Antiproliferační účinek.....	13
Melatonin a stárnutí.....	13
2.4. Gastrointestinální melatonin.....	14-16
2.5. Některé základní rozdíly mezi epifyzárním a gastrintestinálním melatoninem.....	17
3. Orexin.....	18-24
3.1. Lokalizace, biosyntéza a receptorový mechanismus působení.....	18-20
3.2. Orexin, příjem potravy a energetický metabolismus.....	21-23
3.3. Jiné orexinové účinky na GIT.....	23-24
4. Ghrelin.....	25-30
4.1. Syntéza, mechanismus účinku.....	25-27
4.2. Lokalizace ghrelinových buňek, ovlivnění sekrece žaludeční šťávy.....	27-28
4.3. Ghrelin v CNS.....	28
4.4. Ghrelin a příjem potravy.....	29
4.5. Ghrelin a poruchy příjmu potravy.....	29-30
4.6. Ghrelin a inzulín.....	30
5. Steroidní hormony.....	31-38
5.1. Kortizol.....	33-35
5.2. Dehydroepiandrosteron – DHEA a jeho derivát.....	36-37
5.3 Testosteron.....	38
6. Gonadotropiny.....	39-40
VI. Metodika.....	41-49
VII. Výsledky.....	50-65
VIII. Diskuze.....	68-73
IX. Závěr.....	74-75
X. Souhrn závěrů.....	76
XI. Literatura.....	77-99
XII. Vlastní práce.....	100-101
XIII. Seznam příloh.....	102

I. Seznam zkratek

SCN -suprachiasmatický nucleus

CLOCK-circadian locomotor output cycles kaput

BMAL1-brain and muscle arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-like 1

MT1-melatoninový receptor typu 1

MT2 -melatoninový receptor typu 2

MT3-melatoninový receptor typu 3

cAMP-cyklický adenosin monofosfát

cGMP-cyklický guanosin monofosfát

RZR/ROR-retinoid Z receptor/syrotčí retinoidem spojený receptor

NADH-redukovaný nikotin-amid-dinukleotid

GIT-gastrointestinální trakt

CCK2-receptor pro cholecystokinin

5-HT3-5-hydroxytryptamin

NO-syntáza-oxid-dusnatý

OX1R-orexinový receptor typu 1

OX2R-orexinový receptor typu 2

Hcrt1-hypocretinový receptor typu 1

Hcrt2-hypocretinový receptor typu 2

VMN-ventromediální jádro hypotalamu

DMN-dorzomediální jádro hypotalamu

PVN-paraventriculární jádro hypotalamu

ATP-adenosin-trifosfát

TRH-tyreotropin uvolňující hormon

GABA-kyselina gama-aminomáselná

NPY-neuropeptid Y

ICV-intacerebroventrikulárně

CNS-centrální nervový systém

GHS-R-receptor pro ghrowth hormone secretagoge

PLC-fosfolipáza C
AGRP-agouti related neuropeptide
STH-somatotropní hormon
SHBG-sexuální hormon vážící globulin
CRH-kortikotropin uvolňující hormon
ACTH-adrenokortikotropní hormon
Osa HPA- osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny
AVP-vazopressin
DHEA-dehydroepiandrosteron
DHEAS-dehydroepiandrosteron sulfát
REM-rapid eye movement
LH-luteinizační hormon
FSH-folikulostimulující hormon
GnRH-gonadotropin uvolňující hormon
RIA-radio immuno assay
ECLIA-electrochemiluminescence
EDTA-kyselina etylendiamintetraoctová
GC/MS-gas chromatography/mass spectrometry
He-helium

II. Souhrn

Úvod: Cirkadiánní rytmy jsou důležité k adaptaci organismu ke změnám prostředí. Endogenní hodiny (pacemaker) mají periodu zhruba 24 hodin. Melatonin je produkován v epifýze v průběhu tmy. Hlavním extrapineálním zdrojem melatoninu a zároveň hlavním zdrojem v průběhu světla je zažívací ústrojí. Je málo studií, které se zabývají účinkem potravy na hladinu steroidů.

Cíle: U osmi zdravých premenopauzálních žen ve dvou konsekvenčních studiích objasnit vliv potravy na hladinu melatoninu a dalších vybraných hormonů.

Výsledky: 1) Sledování v průběhu 16 hodin: Hladiny melatoninu signifikantně klesly dvě hodiny po obědě. Hladiny kortizolu klesaly po celý den a navíc 2 hodiny po obědě došlo k dalšímu poklesu. Nalezli jsme zatím nepopsané změny hladiny estradiolu a SHBG po jídlech.

2) Monitorace po různých stimulech: Hladiny melatoninu se začaly zvyšovat od 20. minuty, maxima dosáhly v 40. minutě po i.v. aplikaci glukózy. OGTT vedl k opožděnému nárůstu hladiny melatoninu oproti i.v.GTT. Hladiny kortizolu klesaly a to nejvíce při i.v.GTT. Při snídani došlo ve 40. minutě ke zvýšení hladiny kortizolu. OGTT a i.v. GTT vedly k jakéhosi platu v kortizolových hladinách.

Závěr: Přes určité nedostatky v profilu studie jsme našli u některých hormonů změny hladiny v souvislosti s jídlem.

III. Summary

Circadian rhythms are important for the adaptation of the organism to the changes of the environment. The internal biological clock (pacemaker) has a rhythm which is slightly longer or shorter than 24 hours. Melatonin is a pineal hormone produced during the dark period. The gastrointestinal tract is the main extrapineal source and the main source of melatonin during the light period. There are missing studies which are focused on the effects of the food on steroid hormones.

Aim: To elucidate the effect of the food on selected hormone levels in two consequent studies of eight healthy nonsmoker premenopausal women in follicular phase of their menstrual cycle.

Results: 1) 16 hours long monitoring: The levels of melatonin decreased significantly two hours after lunch. Cortisol levels were decreasing throughout the whole day and an additional decrease was found two hours after lunch. We were the first to report the significant connections of estradiol and SHBG to food intake.

2) Monitoring after different stimuli: Levels of melatonin increased 40 minutes after the i.v. application of glucose. In oGTT this increase was slower. Cortisol has decreased after the application of glucose, more apparently after its i.v. application. The breakfast led to increase of cortisol levels. OGTT and i.v.GTT caused some kind of plateau of cortisol levels.

Conclusion: Even though, there were mistakes in the profile of the study, we proved the connections between some hormones and food intake.

IV. Cíle projektu a hypotéza

Hypotéza

Melatonin je hormon, který je zapojen do řízení cirkadiánních rytmů. Jeho hlavním zdrojem je epifýza, kde je syntetizován v průběhu noci. Jelikož nejdůležitějším extrapineálním zdrojem a zároveň hlavním zdrojem melatoninu v průběhu světla je zažívací ústrojí, příjem potravy by mohl ovlivnit hladinu melatoninu.

Cíle práce

a) Monitorace hladiny melatoninu a dalších hormonů po dobu 16 hodin

1. Stanovit hladiny melatoninu u dobře definovaného souboru žen v průběhu 16 hodin sledování
2. Najít a popsat vztah melatoninu s příjmem standardní potravy v průběhu dne
3. Stanovit hladiny orexinu, ghrelinu v průběhu celého sledování, najít a popsat jejich vztah k příjmu potravy
4. Stanovit hladiny kortizolu i dalších vybraných steroidních hormonů v průběhu celého dne, najít a popsat jejich vztah k příjmu potravy

b) Změny hladiny melatoninu a dalších hormonů po vybraných stimulech

1. Stanovit změny hladiny melatoninu v závislosti na aplikaci různých stimulů u dobře definovaného souboru žen
2. Sledovat změny hladin vybraných steroidních hormonů ve vztahu k příjmu potravy

V. Úvod

1. Cirkadiánní rytmus

Fyziologie organismu se liší výrazně ve dne a v noci. To představuje jakýsi adaptační mechanismus, který umožní čelit změnám prostředí v průběhu dne, jako je například změna teploty, světla a tmy, dostupnost potravy a další. Rytmičké fyziologické změny nejsou řízeny pouze změnami prostředí, protože mnoho z nich přetrvává i za konstantních podmínek. To svědčí o existenci endogenních „biologických hodin“ (pacemakeru), udržujících rytmus i v případě chybějících vnějších vlivů (Dunlap et al., 2004). Délka periody pacemakeru je lehce kratší/delší než je 24 hodin, i když to nazýváme termínem cirkadiánním. Cirkadiánní hodiny jsou nastavovány podmínkami zevního prostředí (například světlem, teplotou), aby nedošlo k posunutí fáze. V případě, že chybí takový popud, biologické hodiny běží volně, podle jejich endogenního rytmu. Nejjednodušší koncepcí cirkadiánních hodin je, že existuje endogenní oscilátor, který přijímá signály z prostředí (vstupní dráha) a řídí fyziologické rytmy (výstupní dráha) (Dickmeis, 2009). U savců byl endogenní oscilátor identifikován v suprachiasmatickém jádru (SCN) hypotalamu (Reppert a Weaver, 2002). SCN přijímá vstupní signály přes retinohypotalamický trakt z očí. Retinální gangliové buňky, které exprimují speciální fotonpigment, melanopsin, se zdají být buňkami, které jsou zodpovědné za převedení signálu do SCN (Berson 2007, Hankins et al., 2008). Zde světlo spouští procesy, které končí se změnou genové exprese a aktivity neuronů SCN (Antle a Silver, 2005, Maywood et al., 2007). Výstupní signály ze SCN směřují do mnoha oblastí mozku (například dorzomediální jádro, paraventrikulární jádro, ale i další) (Saper et al., 2005).

Vazbou CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) a BMAL1 (Brain and Muscle Aryl-hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-like 1) na takzvaný E-box dojde k aktivaci transkripce genů PER (period) a CRY (cryptochrom). Akumulace proteinů trvá několik hodin a vrcholí ke konci cirkadiánního denního času. Hromadění proteinů vede k inhibici transkripční aktivity CLOCK/BMAL1 (Reppert a Weaver, 2001).

Pacemakerové neurony mají synchronizovanou aktivitu, komunikují navzájem a řídí rytmy vně SCN (Hastings a Herzog, 2004). Komunikace mezi pacemakerovými neurony je umožněna na podkladě jak humorálních, tak i neuronálních signálů (Silver et al., 1996). Kromě centrálního nervového systému, CLOCK geny byly nalezeny i v periférních tkáních. Oscilace v periférii je oproti centrálnímu opožděna o asi 3-9 hodin. To svědčí o tom, že periférní pacemakery podléhají suprachiasmatickému jádru (Zylka et al., 1998).

Cirkadiánní expozice světlu a cirkadiánní chybění světla (přesněji jeho modrého spektra večer) je důležitá i k produkci hormonů (Roberts, 2010).

2. Melatonin

Po mnoho let byla epifýza považována pouze za rudimentární orgán. Teprve v roce 1958 došlo ke změně názoru poté, co Aaron Lerner a jeho pracovní skupina izolovali novou látku, která byla chemicky určena jako N-acetyl-5-metoxytryptamin a nazvána melatonin (Lerner et al., 1958). Tento objev povzbudil zájem i o epifýzu. Postupně byl melatonin izolován téměř ze všech živých organismů, od člověka přes živočichy až k rostlinám. U člověka je melatonin produkován hlavně v epifýze, ale byl identifikován i v mnoha jiných orgánech, jako jsou slzné žlázy, sítnice, zažívací trakt, ale i další (Karasek, 2006, Pandi-Perumal et al., 2006).

2.1. Chemická struktura a syntéza

Prvním krokem při syntéze melatoninu je vychytávání aminokyseliny L-tryptofanu z tělního oběhu do epifýzy, kde je tato aminokyselina hydroxylována na 5-hydroxytryptofan (enzymem katalyzující reakci je tryptofan-5-hydroxyláza). Poté dojde k dekarboxylaci (pomocí aromatické karboxylázy L-aminokyselin) na serotonin. Dalším klíčovým krokem v syntéze melatoninu je N-acetylace serotoninu (N-acetyltransferázou) na N-acetylserotonin, který je pomocí hydroxyindol-O-metyltransferázy (Axelrod et al., 1965) přeměněn na melatonin. Aktivita N-acetyltransferázy je řízena přítomností/absencí světla (Vaneček, 1998). Tma její aktivitu stimuluje, světlo potlačuje (Illnerová a Vaneček, 1980). Melatonin není v epifýze skladován (vzhledem k lipifilitě volně prochází membránou), ale je rychle uvolněn do oběhu (Reiter, 2003).

Denně je syntetizováno kolem 30 µg melatoninu (Lane et al., 1985).

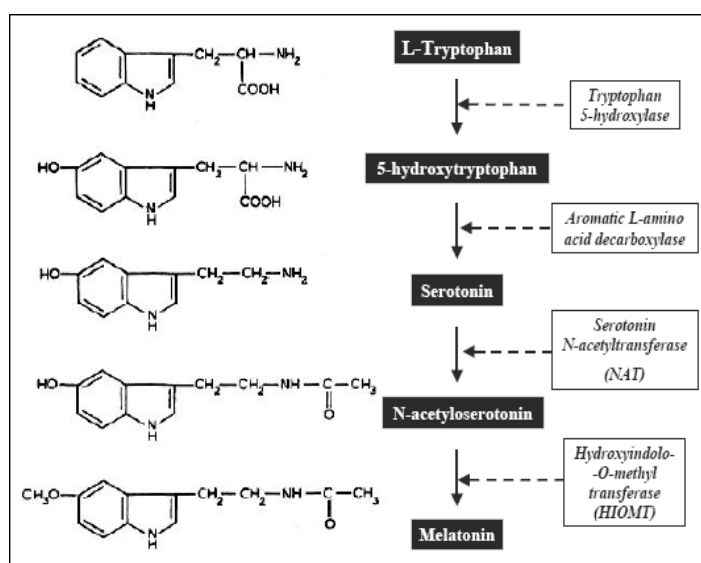
Poločas melatoninu v oběhu je kolem 10 až 60 minut (Fourtillan al., 2000). Hlavním místem jeho degradace jsou játra, kde je degradováno až 90 % melatoninu (Kopin et al., 1961). V prvním kroku dojde k jeho hydroxylaci a poté k sulfataci. Vzniklé konjugáty jsou vyloučeny močí. Pouze velmi malé množství je vyloučeno v nezměněné formě močí.

Syntéza melatoninu je řízena střídáním světla a tmy. Až 80 % melatoninu je syntetizováno během noci. Rytmus syntézy melatoninu je řízen cirkadiánním pacemakerem, který se nachází v suprachiasmatickém jádru hypotalamu (Reppert a Weaver, 2002).

V průběhu dne jsou plazmatické hladiny melatoninu nízké (10 - 20 pg/ml), v noci výrazně stoupají k hladinám až 80 - 120 pg/ml, s maximem mezi 24:00 - 03:00. Sekrece melatoninu se zvyšuje kolem 21:00 - 22:00, k jejímu útlumu dochází v ranních hodinách (07:00 - 09:00)(Bartness a Goldman, 1989). Velmi úzký vztah k rytmické sekreci melatoninu má jeho hlavní močový metabolit 6-sulfatoxymelatonin (Benloucif et al., 2008). Rytmus melatoninové sekrece se objevuje již kolem 6. - 8. týdne po narození a ustálen je kolem 21. - 24. týdne. Nejvyšší hladiny v noci dosahuje mezi 4. - 7. rokem života (Kennaway et al., 1992). Ta se pak udržuje až do 35. - 40. roku života, poté nastává postupný pokles. Kolem 70. let jsou noční hladiny melatoninu již podobné hladinám denním (Karasek, 2004).

Náhlé světlo během tmy syntézu melatoninu významně potlačí, i když byly pozorovány individuální rozdíly v citlivosti na světlo dané pravděpodobně jak genetickými faktory, tak vlivem prostředí (Arendt, 1995).

Amplituda noční sekrece melatoninu je pravděpodobně daná geneticky a vykazuje značnou individuální variabilitu. Někteří jedinci produkují méně (více) melatoninu během života než ostatní (Bergiannaki et al., 1995).



Obrázek číslo 1: Syntéza melatoninu

Obrázek číslo 1 byl převzat v nezměněné formě: KONTUREK, S.J., P.C. KONTUREK a T. BRZOWSKI. *Melatonin in gastroprotection against stress-induced acute gastric lesions and in healing of chronic gastric ulcers* [online]. 2006 [cit. 2015-06-10]. Dostupné z: http://jpp.krakow.pl/journal/archive/11_06_s5/articles/04_article.html.

2.2. Mechanismus účinku

Melatonin působí cestou membránových i jaderných receptorů. Nejlépe jsou popsány specifické receptory typu 1 a 2 (MT1, MT2), které patří do rodiny receptorů spojených s proteinem G (Dubocovich et al., 2000). Receptor typu 1 byl nalezen na chromosomu 4q35.1 a obsahuje 350 aminokyselin (Slaugenhaupt et al., 1995). Receptor typu 2 se nachází na chromosomu 11q21-22 a je složen z 363 aminokyselin (Reppert et al., 1995). Melatonin vázaný na MT1 aktivuje signální cestu, která vede k inhibici adenylát-cyklázy a následně k produkci inositol-fosfátu (Godson et al., 1997). Aktivace receptoru typu MT2 souvisí s jinou signální cestou, která vede k produkci cAMP a cGMP (cyklický adenosin-monofosfát a cyklický guanosin-monofosfát) (Petit et al., 1999). Existuje i třetí typ receptoru (MT3), který není tak dobře prostudován. Jeho struktura vykazuje 95 % homologii s lidskou kinon-reduktázou-2 a je zapojen do regulace nitroočního tlaku (Nosjean et al., 2000, Pintor et al., 2001). U člověka je receptor typu 1 exprimován hlavně v suprachiasmatickém jádru, v mozečku, v hipokampu, v talamu a v mozkové kůře (Mazzuchelli et al., 1996). Receptor typu 2 je exprimován hlavně v mozečku a v hipokampu. Melatoninové receptory jsou i v mnoha periférních tkáních, jako je kůže, ledviny, játra, střeva, žlučník, srdce a další (Ekmekcioglu, 2006).

Melatonin prochází jako malá lipofilní molekula buněčnou membránou a účinkuje jako cytoplazmatická nebo jaderná molekula. Jeho genomická funkce je zprostředkována cestou receptorů typu RZR/ROR (retinoid Z-receptor/syrotčí retinoidem spojený receptor) (Becker-Andre et al., 1994).

Tato receptorová rodina obsahuje 3 podtypy, a to receptory typu α , β , γ . Receptor RZR/ROR je exprimován též v nádorových buňkách (například v nádorech tlustého střeva). Předpokládá se, že protinádorový účinek melatoninu zprostředkovává právě jaderný receptor typu RZR/ROR (Winczik et al., 2002).

2.3. Přehled nejdůležitějších funkcí melatoninu

Melatonin jako antioxidant

Melatonin účinkuje jako „vychytávač“ volných toxických radikálů. Navíc aktivuje antioxidantní enzymy (Reiter et al., 1998). Melatonin je prekurzorem takových molekul, jako jsou N-acetyl-N-formyl-5-metoxykynuramin a N-acetyl-5-metoxykynuramin, které mají protektivní účinky (interakce s reaktivními kyslíkovými a dusíkovými radikály, ochrana mitochondrií, inhibice a down-regulace cyklooxygenázy-2). Melatonin zesiluje účinek jiných antioxidantů, jako jsou např. vitamin C a analoga tokoferolu (Trolox), dále redukovaný glutation a NADH (redukovaný nikotinamid-dinukleotid). Melatonin je čtyřikrát účinnější antioxidant než glutation (Tan et al., 2007).

Melatonin a regulace spánku

Již od 70. let se zkoumá účinek melatoninu na synchronizaci cirkadiánního rytmu a na navození spánku. U pacientů s chronickou primární insomnií byla pozorovaná výrazně nižší hladina melatoninu (Riemann et al., 2002). U jiných poruch spánku, jako je narkolepsie, byla pozorována pouze menší odchylka melatoninového rytmu. Jiní autoři naopak zpochybňují jeho roli v mechanismu usínání. Lavie et al. ve své studii poukazují na rozdílné zapojení melatoninu do regulace spánku. Ve stejné

studii tvrdí, že melatonin není zapojen do aktivace spánku, ale ovlivňuje mechanismus probouzení (Lavie et al., 1997).

Melatonin a neurodegenerativní nemoci

Koncentrace melatoninu je snížena u některých, ale ne u všech pacientů s Alzheimerovou nemocí. Pokles noční hladiny melatoninu byl pozorován u preklinické i u klinicky manifestní formy Alzheimerovy nemoci (Cardinali et al., 2010).

Melatonin se podílí na ochraně neuronů i při jiné neurodegenerativní nemoci, a to Parkinsonově nemoci. Ve studiích vedlo podávání melatoninu k redukci autooxidace dopaminu, ale nemělo žádný vliv na zpomalení progresu nemoci (Srinivasan et al., 2006).

Antiproliferační účinek

Melatonin byl účinný u experimentálně navozených tumorů u zvířat. V kombinaci s kyselinou retinovou vedl ke kompletnímu zastavení růstu a redukci počtu nádorových buněk přes apoptózu u hormonálně závislých buněk karcinomu prsu MCF-7 (Margheri et al., 2012).

V mnoha studiích melatonin potlačoval rozvoj a růst solidních tumorů u zvířat. Jeho antiproliferační účinek spočívá v inhibici buněčného cyklu (Sánchez et al., 2011).

Melatonin a stárnutí

Melatonin je jediný antioxidant, jehož hladina od středního věku postupně klesá, a tento pokles významně koreluje s celkovým poklesem antioxidantní kapacity séra u člověka (Bubenik et al., 2011). V pokročilém věku, kdy trpí až 40 – 70 % seniorů různými poruchami spánku, je vyšší výskyt nádorových i neurodegenerativních nemocí.

2.4. *Gastrointestinální melatonin*

Nejdůležitějším extrapineálním zdrojem melatoninu je zažívací ústrojí. Přítomnost melatoninu v zažívacím traktu signalizuje, že melatonin je zapojen do patofyziologie trávení. Hlavními prekurzory melatoninu jsou hormony serotonin a tryptofan, které ovlivňují gastrointestinální motilitu. Melatonin je produkován v enterochromafinních buňkách a jeho uvolňování závisí na periodicitě příjmu potravy (Martin et al., 1998). Koncentrace melatoninu v tkáních gastrointestinálního traktu (GIT) může být až stokrát vyšší, než je jeho koncentrace v krvi (Bubeník 2001). V kterémkoliv momentu dne GIT obsahuje až 400krát více melatoninu než epifýza (Huether et al., 1994). Jeho uvolňování ze zažívacího traktu do oběhu je též ovlivněno některými složkami potravy, a to hlavně tryptofanem (Bubenik, 2002).

Vyšší hladinu melatoninu vykazují rostliny ve vyšších nadmořských oblastech a rostliny středozemního původu. Příčinou je pravděpodobně vyšší intenzita UV záření. Předpokládá se, že melatonin poskytuje rostlinám ochranu proti poškození, které způsobuje světlo (Tan et al., 2011).

Hattori a jeho pracovní skupina prokázali jako první, že podávání rostlinné potravy bohaté na melatonin vede ke zvýšení plazmatické hladiny melatoninu (Hattori et al., 1995). Kromě uvolňování do oběhu je melatonin uvolňován i do lumen zažívacího traktu a podléhá enterohepatálnímu cyklu. Předpokládá se, že lumenální melatonin by se mohl podílet na synchronizaci jednotlivých fází trávení (Bubenik et al., 1999).

Hladina melatoninu ve žluči je 10 až 40 násobně vyšší, než je v ostatních částech GIT. Tato vysoká koncentrace pravděpodobně slouží k ochraně sliznice před toxickými radikály (Tan et al., 1999).

Motilita zažívacího traktu závisí na střídání cyklu tmy a světla (přesněji motilita ve dne je vyšší). Dle studie Kasimayovy et al. (2005) může melatonin v zažívacím traktu účinkovat přes receptory typu CCK2 a 5-HT3 (receptor pro cholecystokinin a 5-hydroxy-tryptamin).

Melatonin účinkuje jako přirozený antagonist serotoninu v GIT (Quastel et al., 1965). Serotonin indukuje spastickou kontrakci střeva, melatonin obnovuje peristaltiku. Pravděpodobně je účinek melatoninu na hladkou svalovinu zprostředkován přes MT2 receptory (Luchcella et al., 1997). Melatonin zkracuje čas průchodu potravy GIT. Myorelaxační účinek melatoninu je všeobecné povahy, podobný účinek má melatonin i na hladkou svalovinu jiných orgánů.

Bubeník a jeho pracovní tým testovali účinky melatoninu a serotoninu na zažívací trakt. Pozorovali částečnou blokaci serotoninem indukovaného poklesu rychlosti pasáže potravy melatoninem. Dále pozorovali redukci serotoninem indukovaného napětí a kontrakci střev. Melatonin chrání proti poškození při ischemické reperfuzi, vylučuje volné radikály, aktivuje syntézu některých enzymů antioxidantního systému, stimuluje obnovu buněk a uvolňování prostaglandinu. Z domácích zvířat prasata velice často trpí vředovou chorobou žaludku. Bylo prokázáno, že koncentrace melatoninu v sliznici žaludku je v korelaci s výskytem a se závažností žaludečního vředu. Čím nižší je hladina melatoninu, tím vyšší je incidence a závažnost vředu. Zvířata krmená stravou, která měla vysoký obsah vláknin, měla vyšší hladinu melatoninu v žaludku a tím měla i nižší incidenci vředů (Bubeník et al., 1998). Ve studii Bubeník et al. byly navozeny příznaky ulcerózní kolitidy umyšší aplikací dextran - sodiumsulfátu (n=24), čili zvířata ztratila

chuť k jídlu a hmotnost, objevila se krev ve stolici, došlo ke ztrátě ochlupení. Následně jim aplikovali melatonin. Týden po aplikaci melatoninu došlo ke zmírnění příznaků ulcerózní kolitidy a 7 týdnů po aplikaci melatoninu myším všichni jedinci opět byli zdraví (Pentney a Bubeník, 1995).

S věkem hladiny melatoninu klesají, zvyšuje se množství viscerálního tuku, zvyšuje se plazmatická hladina leptinu a inzulínu. V některých studiích bylo konstatováno, že melatonin vedl ke snížení plazmatické hladiny leptinu a inzulínu, dále po jeho aplikaci došlo ke snížení množství abdominálního tuku (Wolden-Hanson et al., 2000).

Song et al. popisují po podávání melatoninu zlepšení příznaků dráždivého tračníku (Song et al., 2005).

Již jeden den půstu u myši vede ke zvýšení hladiny melatoninu v GIT (Bubenik et al., 1992). Sotak et al. popisují upregulaci exprese MT1 receptorů v tenkém střevě po hladovění (Sotak et al., 2000).

Suplementace melatoninu se zdá být zajímavá díky jeho rozmanitým účinkům na organizmus. Užívání melatoninu jako potravinového doplňku je však stále kontroverzní.

Exogenně podaný melatonin je dobře tolerován. Nebyl prokázán žádný významnější vedlejší účinek ani v případě podávání jeho vysokých dávek (30 - 60 mg/den) (Jacob et al., 2002). Naopak byl prokázán jeho účinek na krevní tlak, přes down-regulaci NO-syntázy a vychytáváním radikálů NO (Scheer et al., 2004).

Problémem při melatoninové suplementaci může být doba podávání. Obvykle je doporučována aplikace v době ulehnutí k spánku. Melatonin podávaný v průběhu dne může navodit ospalost, spánek a únavu, a proto jeho podávání v této denní době není doporučováno.

2.5. Některé základní rozdíly mezi epifyzárním a gastrintestinálním melatoninem

Je několik základních rozdílů mezi melatoninem produkovaným v zaživacím traktu a v epifýze (Bubenik, 2008):

	GIT	Epifýza
místo produkce:	enterochromafinní buňky GIT	epifýza
druh sekrece:	stálá	cirkadiánní
způsob účinku:	edokrinní, parakrinní, luminální	endokrinní
akumulace z cirkulace:	prokázána	nejistá
účinek hladovění:	zvýšení hladiny	pokles hladiny

3. Orexiny

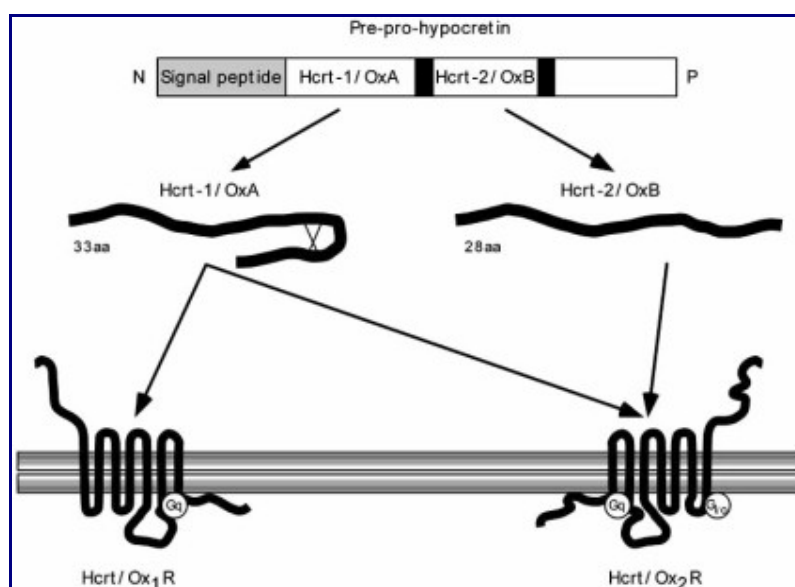
V roce 1998 dvě skupiny izolovaly téměř současně novou substanci z mozku potkanů. Jedna skupina pojmenovala objevený neuropeptid orexin podle řeckého slova orexis (orexis = chuť), která souvisí s jedním z hlavních účinků nově objeveného neuropeptidu - s regulací chuti a příjmu potravy (Sakurai et al., 1998). Druhá skupina novou substanci pojmenovala podle místa produkce v hypotalamu jako hypocretin (De Lecea et al., 1998). Orexiny jsou neuropeptidy zapojené do regulace bdění a spánku. Dysfunkce orexinového systému hraje zřejmě roli v rozvoji narkolepsie. Druhou hlavní funkcí orexinů je ovlivnění jídelního chování a zapojení do okruhu zprostředkujícího pocítování "odměny", který jednoznačně souvisí s přejídáním a následnou obezitou v důsledku příjmu jídla bez potřeby kalorií.

3.1. Lokalizace, biosyntéza a receptorový mechanismus působení

Orexigenní neurony jsou umístěny v oblasti laterálního, dorsomediálního a perifornikálního hypotalamu (de Lecea et al., 1998, Sakurai et al., 1998). Orexigenní neurony představují pouze malou populaci buněk. Avšak axony vycházející z těchto neuronů prostupují celým centrálním nervovým systémem (Peyron et al., 1998).

Orexin-A (hypocretin-1) a orexin-B (hypocretin-2) jsou produktem štěpení společného prekurzorového peptidu, preproorexinu. U člověka je složen ze 131 aminokyselin, gen pro preproorexin se nachází na chromosomu 17q21. Orexin-A je peptid o 33 aminokyselinách, ve svém řetězci obsahuje dvě disulfidické vazby (mezi molekulami cysteinu v polohách 6-12 a 7-14). Struktura orexinu-A je vysoce konzervována (Sakurai et al., 1998).

Orexin-B má lineární strukturu, je složen z 28 aminokyselin (Sakurai et al., 1998), jeho struktura není tak konzervována, jako je struktura orexinu-A, a vykazuje mezidruhovou variabilitu. Orexin-B lidí a hlodavců se liší ve 2 aminokyselinách. Struktura orexinu-A a B na C-terminálním konci peptidového řetězce je vysoce homologní, zatímco N-terminální konec je více divergentní (vykazuje jenom 11% homologii) a to naznačuje, že C-terminální konec bude hrát důležitou roli ve funkci orexinů (Takai et al., 2006).



Obrázek číslo2: Struktura orexinu

Legenda k obrázku: Orexin-A/hypocretin-1 (Hcrt-1/OxA) Orexin-B/hypocretin-2 (Hcrt-2/OxB) jsou odvozeny ze společného prekurzorového peptidu, Pre-pro-orexinu (pre-pro-hypocretinu). Po odštěpení signálního peptidu na N-terminálním konci dojde ke vzniku orexinu-A (hypocretinu-1) o 33 aminokyselinách, který obsahuje 2 disulfidické vazby, a orexinu-B (hypocretinu-2) o 28 aminokyselinách, který má lineární strukturu. Oba orexiny se vážou na receptory, které jsou spojeny s proteinem G. Orexin-A se váže jak na orexinový receptor typu 1 (Hcrt/Ox₁R), ale i na orexinový receptor typu 2 (Hcrt/Ox₂R), zatímco orexin-B se váže pouze na orexinový receptor typu 2.

Obrázek číslo 2 byl převzat v nezměněné formě: NUÑEZ, A., M.L. RODRIGO-ANGULO, I.D. ANDRÉS a M. GARZÓN. *Hypocretin/Orexin Neuropeptides: Participation in the Control of Sleep-Wakefulness Cycle and Energy Homeostasis*. [online]. Current Neuropharmacology, 2009 [cit. 2015-06-10]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2724663/>.

Přesná regulace exprese preproorexinového genu není zatím známa. V experimentu hladovění vyvolalo zvýšení jeho exprese. Dále některé studie našly, že orexinové neurony exprimují receptory pro leptin. Kontinuální intracerebroventrikulární injekce leptinu vedla ke snížení transkriptů preproorexinové mRNA (Yamanaka et al., 2003). Regulace produkce orexinů by tedy mohla souviset i s leptinem (Hakansson et al., 1999).

Existují dva druhy orexinových receptorů, receptor typu 1 (OX1R) a 2 (OX2R) (Sakurai et al., 1998). Orexinové receptory patří do rodiny receptorů spojených s proteinem G. Stimulace orexinového receptoru typu 1 vede přes Gq protein k aktivaci fosfolipázy C a ke spouštění fosfatidyl-inositolové kaskády. OX1R je určen pro vazbu orexinu-A. Na receptor se může vázat i orexin-B, ale jeho vazba má mnohonásobně nižší afinitu. Stimulací orexinového receptoru typu 2 dojde k aktivaci buď inhibičního G proteinu (Gi), nebo k aktivaci Gq proteinu, jako u receptoru typu 1 (Zhu et al., 2003). OX2R je neselektivním receptorem jak pro orexin-A, tak i orexin-B, oba ligandy se na něj vážou podobnou afinitou (Sakurai et al., 1998).

OX1R je široce exprimován ve ventromediálním (VMN) a dorsomediálním (DMN) jádru hypotalamu. Orexinový receptor typu 2 je exprimován hlavně v paraventriculárním jádru (PVN), ve VMN a v nucleus arcuatus (Zhang et al., 2005). Oba typy receptorů vykazují 64% homologii aminokyselin.

Kromě výskytu v centrálním nervovém systému jsou orexinové receptory identifikovány i v periferních orgánech, jako je zažívací trakt, endokrinní pankreas, nadledviny nebo tuková tkáň (Digby et al., 2006). Zůstává otázkou, zda může být orexin syntetizován přímo v periferních tkáních.

Za světla vykazují orexinové neurony zvýšenou aktivitu. V klidu jsou naopak za tmy (Lee et al., 2005).

Další mediátory, které mají excitační vliv na orexinové neurony, jsou například ghrelin, cholecystokinin, TRH (tyreotropin-releasing hormon), ale i ATP, nebo acetylcholin (Sakurai, 2005). Inhibiční účinek má například glukóza, již zmíněný leptin, ale i GABA (kyselina gamma-aminomáselná), NPY (neuropeptid Y) a další (Matsuki et al., 2009). Je zajímavé, že hodnota pH ovlivňuje excitaci nebo inhibici orexinových neuronů. Acidita orexinové neurony stimuluje, zásaditost je inhibuje (Williams et al., 2007).

3.2. Orexin, příjem potravy a energetický metabolismus

Energetická homeostáza je definována jako rovnováha mezi přijatou a vydanou energií. Hypotalamus je klíčovým systémem pro regulaci energetické homeostázy, kontinuálně monitoruje signály odrážející energetický stav organismu a podle toho iniciuje odpovídající chování a metabolickou odpověď (Suzuki et al., 2012). Orexinové neurony funkčně interagují s neurony hypotalamu senzitivními na glukózu, které jsou umístěny v oblasti ventromediálního (neurony glukózou excitované) a laterálního hypotalamu (neurony glukózou inhibované). Orexin-A specificky inhibuje glukózo-senzitivní neurony ventromediálního hypotalamu (Shiraishi et al., 2000), zatímco na glukózo-senzitivní neurony laterálního hypotalamu má opačný účinek (Liu et al., 2001).

Intramuskulární aplikace glukagonu u zdravých dobrovolníků i u jedinců s diabetem typu 1 vedla ke snížení plazmatické hladiny orexinu. Role glukagonu v regulaci tělesné hmoty, příjmu potravy a glukózového metabolismu může být tedy alespoň částečně zprostředkována přes ovlivnění sekrece orexinů (Arafat et al., 2014).

V oblasti prodloužené míchy orexinové neurony inervují i neurony solitárního traktu, které přijímají z periferie senzorické signály, jako je například hladina glukózy v portální žíle, nebo distenze žaludku (Messina et al., 2014).

Aktivita orexinových neuronů je významněji inhibovatelná glukózou, zvýšení hladiny glukózy vede k hyperpolarizaci, pokles glykémie k depolarizaci neuronů. Naopak elektrická aktivita orexinových neuronů je výrazněji stimulovatelná ghrelinem (Yamanaka et al., 2003). Výzkumy posledních let přinášejí důkazy, že orexiny stimulují syntézu glukózy v játrech (Stanley et al., 2010) a utilizaci glukózy ve svazech (Yi et al., 2009).

Orexin-A ovlivňuje tělesnou teplotu přes aktivaci sympatického nervového systému a to souvisí s regulací příjmu potravy (Girault et al., 2012).

Aplikace orexinu do mozkových komor (intracerebroventrikulárně - ICV) u hlodavců vedla k iniciaci příjmu potravy a vody (Kunii et al., 1999). Inutsuka et al. (2014) prokázali, že k ovlivnění příjmu potravy a metabolismu selektivní stimulací orexinových neuronů stačila aktivace 30 % orexinových neuronů.

Bylo popsáno, že dietou indukovaná obezita u potkanů byla spojena s poklesem spontánní pohybové aktivity a se změnami v orexinovém systému - exprese OXR byla zrcadlovým obrazem závažnosti dietou indukované obezity u pokusných zvířat. Denní aplikace orexinu-A do oblasti rostrálního laterálního hypotalamu zabránila rozvoji dietou indukované obezity bez poklesu příjmu potravy. Navíc bylo vypočteno, že u potkanů krmených vysokotučnou dietou, u kterých byl denně aplikován orexin, bylo asi 61 % přijaté energie použito na pokrytí spotřeby energie ke spontánní fyzické aktivitě, která byla ovlivněna orexinem-A (Perez-Leighton et al., 2012).

Podání antagonisty OXR1 (SB-334867) vede k poklesu příjmu

u potkanů, a to nejenom se snížením množství přijaté stravy, ale i rychlejším nástupem sytosti (Parise et al., 2011, Ischii et al., 2005). Systémovou aplikací orexinového antagonisty došlo k omezení přejídání potkanů držených na vysokotučné dietě (Choi et al., 2010). Chronické podávání vysokých dávek SB-334867 u myší s mutací leptinového receptoru vedlo k redukci příjmu potravy a hmotnosti a tento účinek byl spojen se zlepšením glukózové homeostázy (Haynes et al., 2002). To platí i obráceně: u myší s deficiencí receptoru ORX1 dojde k rozvoji obezity, když jsou drženy na dietě s vysokým obsahem tuků. Aplikace agonisty orexinu-B po dobu 14 dní vede k poklesu spotřeby potravy s vysokým obsahem tuků a k redukci dietou indukované obezity (Funato et al., 2009). Z výzkumů posledních let jednoznačně vyplývá, že orexiny nepochybně ovlivňují jídelní chování, a to přes jejich zapojení do okruhu zprostředkujícího pociťování "odměny" (reward), který jednoznačně souvisí s přejídáním a následnou obezitou v důsledku příjmu jídla bez potřeby kalorií. Navíc vede k preferenci jídel s vysokým energetickým obsahem (Borgland et al., 2010). Zapojení orexinů do systému odměňování je vysvětleno jejich bohatou projekcí do oblastí mozku, kde se nacházejí dopaminergní a opioidní neurony, které mají důležitou roli v rozvoji závislosti (Aston-Jones, 2009). Blokace receptoru ORX1 vede u myší k nárůstu samoadministrace sacharinu (Cason a Aston-Jones, 2013). Aplikace orexinu-A intracerebroventrikulárně vede k nárůstu spotřeby vody i roztoku s obsahem sacharinu (Furudono et al., 2006).

3.3. Jiné orexinové účinky na GIT

Přibývají důkazy, že orexiny by mohly být vytvářeny i mimo CNS. Stále však není prokázáno, zda cirkulující orexiny jsou centrálního, nebo periferního původu.

V zažívacím traktu se nachází velké množství orexinových receptorů (v myenterickém i submukózním plexu, a také v mukóze). To svědčí o zapojení orexinů do regulace funkcí zažívacího traktu (Ehrstrom et al., 2005). Edwards et al. (1999) popisují větší účinek orexinu-A než orexinu-B na gastrointestinální motilitu. Intracerebroventrikulární injekce orexinu-A ovlivňuje gastrointestinální motorickou odpověď (Baccari, 2010). V pokusech měl orexin-A kontrakční účinek na segment duodena (Korczyński et al., 2006). Mechanismus kontrakčního účinku orexinu na duodenum je komplexní, zahrnuje jak účinek zprostředkovaný přes receptory spojené s vápníkovými kanály, tak i uvolnění vápníkových iontů z intracelulárních zásob (Larsson et al., 2005), ale i neuronální mechanismy (Grabauskas a Moises, 2003).

4. Ghrelin

Sekretagoga růstového hormonu jsou malé syntetické molekuly, které stimulují uvolnění růstového hormonu působením na receptor GHS-R (growth hormone secretagogue receptors) (Howard et al., 1996). GHS-R je spřažen s proteinem G (Engelstoft et al., 2013). Vzhledem k tomu, že sekretagoga jsou syntetické molekuly, předpokládalo se, že musí existovat i endogenní ligand tohoto receptoru. Tato hypotéza se potvrdila v roce 1999, když z potkaního žaludku izolovali japonští vědci peptid, který byl nazván ghrelin. Název nového peptidu o 28 aminokyselinách byl odvozen od slova "ghre", které podle slovního kořene znamená grow, čili růst (**G**rowth **H**ormone **R**eleasing **I**nducing) (Kojima et al., 1999).

Plazmatická koncentrace ghrelinu závisí na pohlaví. Vyšší koncentrace celkového ghrelinu (ale ne ghrelinu aktivního) byly detekovány u žen. Tento rozdíl je pravděpodobně působen vlivem estrogenů (Makovey et a., 2007).

4.1. Syntéza, mechanismus účinku

Gen pro ghrelin je lokalizován na 3p25-26 chromozomu. Gen pro ghrelinový receptor byl identifikován též na třetím chromozomu, a to v pozici 3q26-27. Ghrelin vzniká štěpením pre-pro-ghrelinu (Seim et al., 2007).

Struktura ghrelinu je vysoce konzervována, posledních 10 aminokyselin na N-terminálním konci je identických u savců. Potkaní a lidský ghrelin se liší pouze ve dvou aminokyselinách (Kojima et al., 1999).

Ke své aktivitě je nezbytná n-octanoylace na třetím serinovém zbytku (vzácně u některých druhů na threoninu) (Kojima et al., 1999). Katalyzujícím enzymem je ghrelin-O-acyltransferáza (Yang et al., 2008). Ghrelin je prvním známým peptidem, který je modifikován mastnou kyselinou.

V potkaním žaludku byl identifikován i další typ ghreluinu v malém množství (des-GLN-14-ghrelin) (Hosoda et al., 2000). V lidském žaludku postupně purifikovali malé množství odlišných forem ghreluinu, které můžeme dělit do 4 skupin, podle typu acylace na třetím serinovém zbytku: neacylovaný, octanoylovaný, decanoylovaný, decenoylovaný. Všechny formy jsou odvozeny od stejného prekurzoru, přes alternativní metabolické cesty a obsahují 27, eventuálně 28 aminokyselin (Hosoda et al., 2003). Neacylovaná forma (takzvaný deacyl-ghrelin) se vyskytuje v významném množství v žaludku i v krvi (Hosoda et al., 2000). V krvi dokonce množství neacylované formy přesahuje množství acylovaného ghreluinu.

V plazmě se ghrelin váže na HDL. Protože HDL obsahuje paraoxonázu, která je potentní esteráza, teoreticky by mohl být zapojen do deacylace acylovaného ghreluinu (Beaumont et al., 2003).

Existují 2 typy ghrelinových receptorů: GHS-R typ 1a a GHS-R typ 1b (Howard et al., 1996). Receptor typu 1b je farmakologicky inaktivní.

Po vazbě ghreluinu na receptor dojde k aktivaci PLC (fosfolipázy C), následně ke vzniku IP₃ (inositol - 1,4,5- trifosfát) a DAG (diacylglycerol) a ke zvýšení intracelulární hladiny Ca²⁺. Receptory GHS-R se nachází v hypotalamu, v hipokampu a v hypofýze (Howard et al., 1996).

Receptor ghreluinu je homologní s motilinovým receptorem

(obsahují sekvenci o 8 identických aminokyselinách) a mají podobnou funkci (tj. stimulace sekrece žaludeční šťávy a motility) (Asakawa et al., 2001).

4.2. Lokalizace ghrelinových buněk, ovlivnění sekrece žaludeční šťávy

Ghrelín je hormon, který je secernován převážně v žaludku (Kojima et al., 1999). V žaludku ghrelinové buňky mají vyšší zastoupení ve fundu, než v pyloru. Ghrelinové buňky jsou lokalizovány v mukóze. Takzvané X/A-podobné buňky obsahují kulaté, kompaktní granule, které byly identifikovány jako ghrelín (Date et al., 2000).

Počet X/A-podobných buněk je velmi nízký při narození a přibývá po narození (Wiedmer et al., 2007). Kromě žaludku ghrelín je produkován též v duodenu, jejunu, pankreatu (Lai et al., 2007), v plicích (Volante et al., 2002), pohlavních žlázách (Barreiro a Tena-Sempere, 2004), v ledvinách (Yabuki et al., 2006). V tenkém střevě množství ghrelinových buněk klesá od duodena distálním směrem. (Hosoda et al., 2000).

Ghrelínové buňky v žaludku mají na povrchu gastrinové receptory (Fukumoto et al., 2008). Centrální i periferní administrace ghreluinu vede k vzestupu sekrece žaludeční šťávy (Date et al., 2001, Masuda et al., 2000). Vagová stimulace je důležitá pro přenos ghrelinových signálů, a to jak ve smyslu ovlivnění sekrece růstového hormonu (Date et al., 2002), tak i pro ovlivnění příjmu potravy a sekrece žaludeční šťávy. Bilaterální vagotomie i podávání atropinu vede k vymizení ghrelinového účinku na sekrece žaludeční šťávy (Masuda et al., 2000), dále vagotomie vede i k vymizení ghrelinového účinku na příjem potravy (Date et al., 2002). Na rozdíl od gastrinu, jehož hladina se zvyšuje příjmem potravy, hladina ghreluinu se zvyšuje při hladovění (Cummins et al., 2001).

Ghrelin v pokusech byl téměř stejně účinný na uvolnění žaludeční šťávy, jako je gastrin. Navíc účinek ghrelinu byl závislý na dávce (Yakabi et al., 2006).

Ghrelinové buňky pankreatu nejsou terminálně diferencované, jsou to progenitorové buňky, které mohou dát vznik buňkám Langerhansových ostrůvků (buňkám B, PP, A) (Arnes et al. 2012). Hladina ghrelinu v pankreatu není ovlivněna hladověním .

4.3. Ghrelin v CNS

Hladina ghrelinu v CNS je nízká přesto, že receptory GHS-R jsou zastoupeny hojně v CNS (Guan et al., 1997). V CNS ghrelin byl nalezen v nucleus arcuatus, který je známý pro regulace příjmu potravy (Kojima et al., 1999), dále byly identifikovány ghrelin obsahující neurony v oblasti třetí mozkové komory, dorzálního, ventrálního a paraventriculárního jádra. Tato jádra vysílají projekce do oblasti neuronů, které produkují NPY (Neuropeptid Y) a AGRP (agouti-related neuropeptide) a mohou stimulovat uvolnění těchto orexigenních peptidů (Nakazato et al., 2001, Wang et al., 2013).

Somatotropní buňky obsahující růstový hormon jsou cílem ghrelinu v oblasti hypofýzy .

Mezi nejdůležitější účinky ghrelinu patří ovlivnění uvolňování růstového hormonu (STH) in vivo a in vitro, v závislosti na dávce (Takaya et al., 2000). Intravenózní aplikace ghrelinu vede k uvolnění růstového hormonu u potkanů i u lidí. Stejně jako intracerebroventrikulární injekce u potkanů, která se zdá být více potentní než intravenózně aplikovaný ghrelin.

4.4. Ghrelin a příjem potravy

Ghrelin je orexigenní hormon, který stimuluje příjem potravy (orexis znamená řecky chuť). Hladina ghrelinu v plazmě se zvyšuje při hladovění a snižuje po příjmu potravy (Cummings et al., 2001). Navíc dle stejné studie hladiny ghrelinu jsou zvýšeny již před zahájením příjmu potravy. To ukazuje na to, že ghrelin může být signálem pro iniciaci příjmu potravy.

Intracerebroventrikulární injekce ghrelinu vedla u potkanů k stimulaci příjmu potravy a k nárůstu hmotnosti a to také u zvířat, která díky genetické modifikace měla deficit růstového hormonu (Nakazato et al., 2001). Hladiny ghrelinu jsou nižší u obézních osob než u osob štíhlých (Marzullo et al., 2006). Nejdůležitějším faktorem pro regulaci sekrece ghrelinu je strava. Plazmatická hladina ghrelinu je zvýšena při hladovění a snižuje se asi hodinu po příjmu potravy. Není úplně jasné, které faktory jsou zapojeny do regulace sekrece ghrelinu. Pravděpodobně klíčová je glykémie, protože aplikace glukózy (ať již perorálně, nebo intravenózně) vede k poklesu plazmatické hladiny ghrelinu. Sedláčková et al. sledovali pokles hladiny ghrelinu i obestatinu po snídani s vysokým obsahem uhlohydrátů u zdravých lidí (Sedláčková et al., 2008).

V noci v průběhu spánku dojde ke zvýšení plazmatické hladiny ghrelinu. Tento nárůst hladiny je utlumen u obézních lidí, nebo v případě spánkové deprivace (Schmid et al., 2008). Všeobecně štíhlí lidé mají vyšší hladiny ghrelinu, zatímco lidé trpící obezitou mají hladiny ghrelinu nižší (Tschöp et al., 2001).

4.5. Ghrelin a poruchy příjmu potravy

Lidé, kteří trpí onemocněním anorexia nervosa, mají signifikantně vyšší hladiny ghrelinu. Realimentace a nárůst hmotnosti u nich

vede k úpravám ghrelinových hladin (Nakahara et al., 2007). Zvýšení plazmatické hladiny celkového ghrelinu reflektuje stav dlouhodobé negativní energetické bilance a je pravděpodobně kompenzačním mechanismem, který má organizmu zajistit zvýšení chuti k jídlu a adekvátní zvýšení energetického příjmu (Kršek et al., 2002). Podobné změny byly pozorovány i v případě bulimických pacientů (Tanaka et al., 2002).

4.6. Ghrelin a inzulín

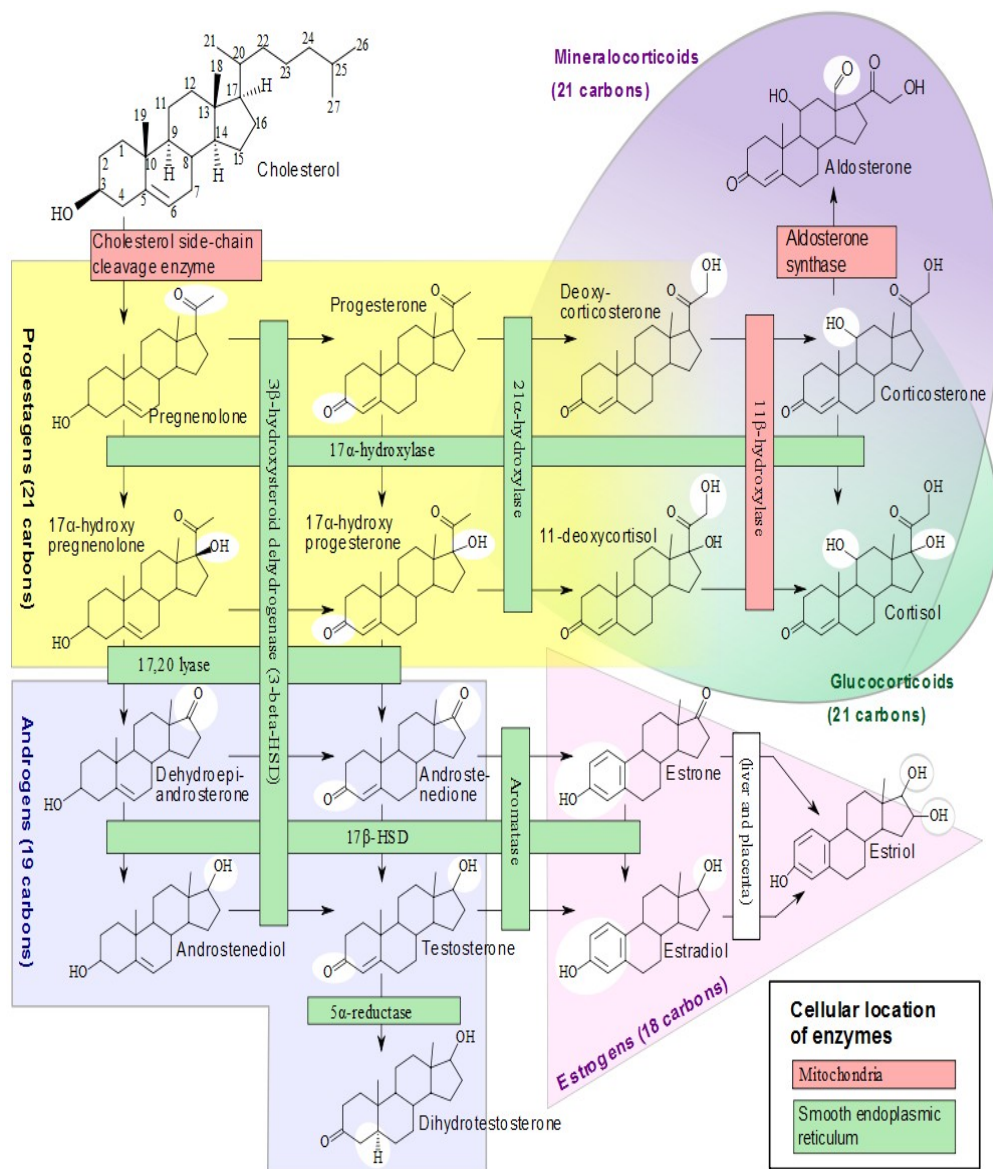
Acylovaný ghrelin stimuluje sekreci inzulínu. Zvýšení hladiny inzulínu na podkladě zpětné vazby blokuje syntézu a sekreci ghrelinu, čili u hyperinzulinémie jsou pozorovány snížené hladiny ghrelinu. Intravenózní aplikace ghrelinu vede ke zvýšení glykémie a poklesu inzulínu (Broglio et al., 2003). Předpokládá se, že roli v poklesu inzulínu hraje modifikace inzulínové senzitivity (Castañeda et al., 2010).

5. Steroidní hormony

Steroidní hormony jsou hormony lipofilní povahy, které jsou syntetizovány z prekursoru cholesterolu kromě pohlavních žláz také v nadledvinách, ale i lokálně v jiných tkáních, jako je mozek (neurosteroidy) a placenta. V plazmě jsou převážně vázány na plazmatické bílkoviny (albumin, nebo specifické globuliny, jako kortikosteroid vážící globulin-CBG, sexuální hormon vážící globulin-SHBG), pouze malá část hormonů se nachází ve volné formě (1-10%). V cílových tkáních mohou účinkovat dvojitým způsobem:

- genomově přes intracelulární receptory, tato funkce zabere řádově hodiny až dny, ale má také přetrvávající účinek;
- nengenomický účinek nastupuje rychle, řádově v minutách až sekundách – jsou to typické účinky neuroaktivních steroidů na nervové synapse (jako např. interakce steroidů s GABA-receptorem).

Přesto, že denní profily hlavních pohlavních hormonů jsou dobře známy, malé oscilace jejich hladin, které by mohly být spojeny s příjmem potravy, nebyly dosud systematicky studovány. Extenzivní množství studií popisuje účinky steroidů na příjem potravy. Jsou ale značně nedostatečné informace o účinku příjmu potravy na hladiny steroidních hormonů.



Obrázek číslo 3: Syntéza steroidních hormonů

Obrázek číslo 3: HÄGGSTRÖM, Mikael. Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *Wikiversity* [online]. Wikiversity Journal of Medicine 1 (1).

doi: 10.15347/wjm/2014.005, ISSN 20018762, 2014 [cit. 2015-06-10]. Dostupné z: https://en.wikiversity.org/wiki/Wikiversity_Journal_of_Medicine/Diagram_of_the_pathways_of_human_steroidogenesis. Rozměry: 676x600 pixel.

5.1. Kortizol

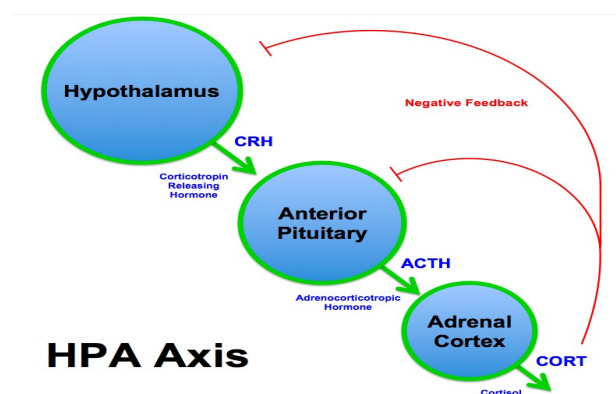
Glukokortikoidy mají mnoho různých funkcí v organismu, přispívají k udržení homeostázy (Norris et al., 2007). Osa HPA (hypotalamus-hypofýza-nadledviny) se svými rytmickými změnami hormonů udržuje citlivost tkání a orgánů a zajišťuje tkáňově a orgánově specifickou reakci organismu na endogenní a exogenní podněty (Šimůnková a Kršek, 2014).

Kortizol je secernován jak cirkadiánním, tak v ultradiánním rytmu (čili za dobu kratší, než je 24 hodin) (Lightman, 2008).

Cirkadiánní rytmus sekrece kortizolu je nejlépe prostudovaným a klasickým příkladem hormonu podléhajícího cyklickým denním změnám. Jeho sekrece je řízena cirkadiánním oscillátorem, který se nalézá v SCN hypotalamu (Moore and Lenn, 1972). Nejnížší hladiny kortizolu jsou kolem půlnoci, poté dochází k postupnému nárůstu (začíná asi 2 hodiny před probuzením) až do rána, kdy dosahuje maxima (kolem 8:00-9:00 hodin)– cortisol awakening response, která je nejvýraznější asi za hodinu po probuzení (Fries et al., 2009). Dále pak dochází během celého dne k postupnému poklesu (Weitzman et al., 1971).

Cirkadiánní rytmus kortizolu je vysoce reprodukovatelný za stabilních podmínek (Selmaoui a Touitou, 2003). Sekrece kortizolu je pod regulací osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny. Centrální pacemaker kontroluje uvolnění kortikotropin uvolňujícího hormonu (CRH) v paraventriculárním jádru. Sekrece CRH je také stimulována stresem (fyzickým nebo emočním). CRH poté stimuluje kortikotropní buňky v předním laloku hypofýzy a následně dojde k uvolnění adrenokortikotropního hormonu (ACTH), který účinkem na kůru nadledvin vede k sekreci kortizolu. K utlumení sekrece dojde na základě negativní zpětné vazby, která je uplatněna na úrovni jak hypofýzy, tak i hypotalamu.

Negativní zpětná vazba na úrovni SCN neexistuje (Oster et al., 2006). Clock geny v kůře nadledvin jsou opožděny oproti těm v SCN o 6 hodin (Fahrenkrug et al., 2008, Ishida et al., 2005). Sekrece ACTH může být stimulována kromě CRH (kortikotropin uvolňující hormon) arginin vazopressinem (AVP) a oxytocinem, které jsou uvolněny do portální krve z nervových zakončení z PVN (paravenikulární jádro) hypotalamu.



Obrázek číslo 4: Osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny

Obrázek číslo 4: SWEIS, Brian M. Basic hypothalamic–pituitary–adrenal axis summary. *Wikimedia: The free media repository* [online]. 2012 [cit. 2015-06-10]. Dostupné z: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HPA_Axis_Diagram_\(Brian_M_Sweis_2012\).png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HPA_Axis_Diagram_(Brian_M_Sweis_2012).png). Rozměry: 789x671.

Cirkadiánní sekreci kortizolu rozdělil Weitzman na 4 fáze:

- a) velice nízká až žádná sekrece – nástup je asi 2 hodiny po usínání a 4 hodiny před probouzením;
- b) preliminární noční sekrece – po 3 až 5 hodinách spánku;
- c) hlavní sekreční fáze – představuje tři až pět epizod sekrece, po 6 až 8 hodinách spánku, pokračuje i v průběhu první hodiny bdělosti;
- d) intermitentní sekreční fáze – představuje čtyři až devět sekrečních epizod mezi 2. až 12. hodinou bdělosti (Weitzman et al., 1971).

Ultradiánní pulzy se objevují frekvencí 1-2/hodina (Weitzman et al., 1971). Největší množství kortizolu je uvolněno v rámci ultradiánních pulzů po ránu. Walker et al. aplikovali CRH formou kontinuální infuze v různých dávkách potkanům. Až do určité dávky pozorovali závislost odpovědi na podané dávce. Po přesáhnutí dané koncentrace CRH (přesněji nad 1 ug/h CRH) již odpověď nebyla závislá na dávce a to naznačuje jakýsi stropový účinek, který znamená maximální aktivaci osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny. Navíc stejní autoři pozorovali, že kontinuální infuze CRH ve vyšších dávkách vedla k oslabení sekrece charakteru ultradiánních pulzů a změnila se v sekrece konstantní (Walker et al., 2012).

5.2. Dehydroepiandrosteron – DHEA a jeho deriváty

Dehydroepiandrosteron je hormon, který byl po prvé izolován a popsán v roce 1934 (Butendant et al., 1934). Jeho sulfát (DHEAS) je nejrozšířenějším cirkulujícím steroidem a předpokládá se, že slouží jako zásoba, jelikož jeho poločas v cirkulaci je 10 až 20 hodin (poločas DHEA je 1-3 hodiny) a také jeho clearance je mnohem pomalejší, než je clearance DHEA (Rosenfeld et al., 1975, Longcope, 1996). DHEAS má i protizánětlivé a imunostimulační účinky (Radford et al., 2010).

DHEA je prekurzorem testosteronu a estrogenu. DHEA vykazuje slabé androgenní účinky a byl popsán i jeho antiglukokortikoidní účinek (hlavně jeho 7- oxygenovaný metabolit, přesněji se jedná o 7 α -hydroxy-DHEA).

V poslední době přibývají poznatky o funkci DHEA i DHEAS jako neuroaktivních steroidů, které mohou být produkovány lokálně, v mozku a účinkují na iontové kanály (Baulieu, 1981, Stárka et al., 2015).

Zájem o DHEA vznikl až když Baulieu ho nazval „hormonem mládí“ (Baulieu, 1996). Plazmatické hladiny DHEA klesají s věkem u většiny jedinců. Mnozí autoři popisují zlepšení celkového zdravotního stavu při pravidelném příjmu 50 mg DHEA.

Významná část DHEA je přeměněna na 7 α -, 7 β -, 16 α -, a 16 β -hydroxyderiváty a to hydroxylací na pozicích C7 a C16.

Stárka a Šulcová izolovali 17 α -hydroxy-DHEA z lidské moče již v roce 1962. Teprve až v roce 2007 bylo nalezeno zapojení tohoto hormonu do udržení rovnováhy mezi kortizolem a kortizonem tím, že systém 7-hydroxy-DHEA a 7-oxo-DHEA kompetuje systémem kortizol-kortizon o aktivitu enzymu 11 β -hydroxysteroid dehydrogenázy (Hennebert et al., 2007). Tato kompetice je vyjádřena v různé míře v různých tkáních, včetně mozku (Morfin a Stárka, 2001).

Pro jeho antiglukokortikoidní účinek se předpokládá, že může být zapojen i do procesu ukládání tuku v organismu (Sedláčková et al., 2012).

Studie z roku 2011 sledovala hladiny DHEAS v průběhu dne (Prom-Wormley et al., 2011). Nejvyšší hladiny našli bezprostředně po probuzení a třicet minut po něm, ale dále v průběhu dne nedošlo k signifikantním změnám hladin DHEAS.

5.3 Testosteron

Brown-Sequard již v roce 1889 rozpoznal účinek "chemických substancí", které izoloval ze zvířecích pohlavních žláz. Až v roce 1960 byl izolován testosteron Butenandtem a jeho týmem. V literatuře je bohatě zdokumentován cirkadiánní rytmus testosteronu u mužů. Je všeobecně známo, že hladiny testosteronu nejsou konstantní v průběhu dne. Hladiny jsou vyšší ráno po probuzení a v průběhu dne dochází k jejich postupnému poklesu. K nárůstu hladiny testosteronu dojde nástupem REM-spánku a tato hladina je udržena až do probuzení (Luboshitzky et al., 1999).

Dříve se předpokládalo, že existuje endogenní rytmus sekrece testosteronu, podobně jak je k tomu u kortizolu (Luboshitzky et al., 2001). Dnes je ale známo, že k nárůstu hladin je nezbytný spánek a to alespoň nepřetržitě po dobu 3 hodin, dále je rozhodující nástup REM-spánku (čím pozdější nástup, tím menší nárůst hladiny testosteronu). U jednoho člověka míra nárůstu hladiny testosteronu iniciovaná spánkem je relativně stabilní, naopak existuje veliká interindividuální variabilita (Axelsson et al., 2005).

6. Gonadotropiny

Pulzatilní sekrece gonadotropinů přímo podléhá regulaci GnRH (gonadotropin uvolňující hormon). Čtyřicetihodinový rytmus gonadotropinové sekrece byl potvrzen jak u mužů (Spratt et al., 1988), tak i u žen (Mortola et al., 1992). U opic s hypotalamickou lézí vedoucí k poruchám sekrece gonadotropinů, konstantní infuze GnRH nevedlo k obnovení sekrece gonadotropinů, zatímco intermitentní podávání GnRH (1x za hodinu, jak je fyziologický pulz gonadotropinů u opic) vedlo k obnovení sekrece LH a FSH (luteální a folikulus stimulující hormon)(Belchetz et al., 1978).

U dospělých mužů (za podmínek dodržení normálního cyklu spánku a bdění) byl pozorován noční nárůst hladiny LH a nárůst hladiny testosteronu v časných ranních hodinách (Spratt et al., 1988).

Spánek má značný účinek na sekreci gonadotropinů v průběhu puberty a v určitých fázích menstruačního cyklu (Kapen et al., 1976). Co se týká oscilace hladiny LH a FSH, je několik studií, které takové změny těchto hormonů dokumentují v časných fázích menstruačního cyklu, ale pochybují o jejich diurnálních změnách v jiných fázích menstruačního cyklu (Filicori 1986, Rossmanith 1991, Soules 1985).

Čtyřicet hodin trvající studie z roku 2005 zkoumala účinek spánku (první noc) a následné spánkové deprivace (druhá noc), která byla následována odpoledním spánkem, na dynamiku pulzové sekrece LH v časně folikulární fázi cyklu. V průběhu spánku byl interval mezi pulzy sekrece LH delší, než v případě bdělosti (nezávisle na denní době). To souvisí s poklesem frekvence pulzu GnRH, která je utlumena spánkem. Amplituda pulzu sekrece LH byla vyšší v průběhu spánku než bdělosti. V průběhu nočního spánku střední hodnoty hladiny LH byly nižší než v případě bdění v noci.

V případě spontánního probouzení v průběhu spánku (potvrzen polysomnograficky) došlo k objevení LH pulzů (s 5-15 minutovým zpožděním), což svědčí o odtlumení sekrece GnRH (Hall et al., 2005). Cirkadiánní rytmy jsou oslabeny i v souvislosti s věkem (van Coevorden et al., 1991).

Folikulární fáze umožní sledování za podmínek relativně nízkých hladin estrogenů, to nejlépe simuluje stav postmeopauzálních žen, u kterých byl prokázán chybějící cirkadiánní rytmus gonadotropinů (Klingman et al., 2011).

Také byl studován účinek nočních směn na reprodukční systém. Menstruační cyklus je charakterizován cyklickou sekrecí reprodukčních hormonů. Noční pracovníci obvykle trpí poruchami spánku a mají zvýšené riziko poruch cirkadiánních rytmtů. To souvisí i se změnou sekrece melatoninu (například pokles metabolitů melatoninu v moči). Tyto faktory bývají spojovány se zvýšeným výskytem poruch menstruačního cyklu u žen , které pracují v noci (Lawson et al., 2011).

Attarchi et al. popisují nižší hladiny FSH, LH, TSH u pracovníků nočních směn, které ale nebyly signifikantní oproti hladinám pracovníků denních směn (Attarchi et al., 2013).

VI. Metody

1. 16 hodinové sledování

Soubor

Studie se zúčastnilo osm žen. Jejich věk byl mezi 25-35 lety (29.48±2.99 roků). Měly normální BMI (21.3±1.3). Všechny byly premenopauzální nekuřačky, zdravé, bez jakékoliv medikace či hormonální kontracepce. Pět dní před provedením testu dodržovaly standardní podmínky, které se ale nelišily příliš od jejich normálního denního režimu (to znamená 8 hodin spánku, příjem jídla podle standardizovaného jídelníčku). Odběry byly ve folikulární fázi cyklu (1.-7. den menstruačního cyklu).

Před testem byly seznámeny s protokolem studie a podepsaly informovaný souhlas. Studie byla schválena Etickou komisí Endokrinologického ústavu v Praze.

V průběhu vlastního testu probandky jedly stejnou stravu v přesných časových intervalech. Studie trvala 16 hodin. V průběhu studie byla povolena běžná pohybová aktivita.

Před prvním odběrem krve byla zavedena intravenózní kanyla do kubitální žíly. První odběr krve se uskutečnil v 6.00 hodin ráno, 30 minut po probuzení, po celonočním půstu. Další odběry byly dle rozpisu: 7.15, 8.15, 10.15, 11.15, 13.15, 14.15, 16.15, 17.15, 19.15, 20.15. Poslední vzorky byly odebrány ve 21.30.

V průběhu studie probandky jedly stravu složením vyváženou:

Snídaně: 6:00-6:15 (celková kalorická hodnota: 515 kcal, celkový obsah bílkovin: 20,58 g, celkový obsah sacharidů: 47,75 g, celkový obsah tuků: 24,9 g)

-chléb Šumava 2 plátky

-kuřecí šunka prsní 50 g

-sýr čerstvý 1 kus

Dopolední svačina: 9:00- 9:15 (kalorická hodnota: 123 kcal, celkový obsah bílkovin: 5,7g, celkový obsah sacharidů: 19,5 g, celkový obsah tuků: 2,25 g)

- ovocný jogurt 150 ml s obsahem tuku 1,5 %

Oběd: 12:00-12:15 (celková kalorická hodnota: 679 kcal, celkový obsah bílkovin: 45,55 g, celkový obsah sacharidů: 100,4 g, celkový obsah tuků: 11,5 g)

-hovězí vývar 200 ml

-krůtí pečeně 150 g

-bramborové knedlíky 100g

-dušené bílé zelí 100 g

Odpolední svačina: 15:00-15:15 (celková kalorická hodnota: 93 kcal, obsah bílkovin: 0,9 g, obsah sacharidů: 26,6 g, obsah tuků: 0 g)

1 kus středně velkého červeného jablka (cca 150 g)

Večeře: 18:00-18:15 (celková kalorická hodnota: 489 kcal, celkový obsah bílkovin: 31,7 g, celkový obsah sacharidů: 51,75 g, celkový obsah tuků: 14,5 g)

-chléb Šumava 2 plátky

-kuřecí šunka prsní 50 g

-sýr Eidam s obsahem tuku 30% 50 g

-1 rajče cca 150 g

Analytické metody

Vzorky byly odebrány do chlazených zkumavek, které obsahovaly 100 µl 5 %-ní EDTA. Vzorky pro stanovení ghrelinu a orexinu byly odebrány do zkoumavky s aprotininem. Plazma byla separována centrifugací v předchlazené centrifuze (4°C) 5 minut při otáčkách 2000g, a zmražena do 30 minut od odběru a uskladněna při teplotách -80°C až do analýzy.

Melatonin byl stanoven použitím komerčního RIA kitu (Laborator Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, Germany). Senzitivita pro melatonin byla 2 pg/ml. Intra-assay a inter-assay koeficienty variace byly 9.8-12.1% a 9.6-12.3 %.

C-peptid byl stanoven metodou ECLIA (elektrochemiluminiscenc immunoassay, Modular E 170 analyzátor, Roche). Detekční hranice kitu byla 0.003-13.3 nmol/l, nebo 0.01-40.0 ng/ml pro plazmu. Intra- a inter-assay koeficienty variace byly 1.5% a 2.3%. Glykémie byla stanovena enzymatickou referenční metodou s hexokinázou (Cobas Integra 400 plus analyzátor, Roche). Detekční rozpětí kitu byl 0.12-40 mmol/l (2.16-720 mg/dl). Intra-set a inter-set reproducibilita byla 1.7% a 2.6%. Plazmatická hladina ghrelinu byla stanovena komerčně dostupným RIA kitem (Linco Research, Inc., St. Charles, Missouri, USA, detekční rozpětí: 93-6000 pg/ml). Orexin-A byl stanoven komerčně dostupným RIA kitem (Phoenix Pharmaceutical, Inc., detekční rozpětí: 10-1280 pg/ml). Kortizol byl stanoven konvenční metodou RIA od firmy Immunotech (France). SHBG byl stanoven metodou IRMA od firmy Immunotech (France). LH a FSH byly stanoveny metodou IRMA (Immunotech, France).

Analýza steroidů pomocí GC/MS

Steroidy i jejich polární konjugáty byly stanoveny podle metody GC/MS (Hill et al., 2010). Steroidy byly zakoupeny od firmy

Steraloids (Newport, RI, USA), Sylon B od firmy Supelco (Bellefonte, PA, USA), methoxylamin-hydrochlorid od firmy Sigma (St. Louis, MO, USA) a rozpouštědla od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Přístroje

Sestava GCMS-QP2010 Plus od firmy Shimadzu (Kjóto, Japonsko) skládající se z plynového chromatografu vybaveného automatickou kontrolou průtoku, AOC-20s autosamplerm a samostatným kvadrupólovým detektorem (single quadrupole detector) s volitelným napětím v rozmezí 10 – 195 V. K analýze byla použita středně polární kapilární kolona RESTEK Rtx-50 (průměr 0,25 mm, délka 15 m, tloušťka filmu 0,1 μm). K měření byla použita ionizace elektronovým dopadem (electron impact) s napětím nastaveným na 70 V a emisním proudem 160 μA . Teplota injekčního portu, iontového zdroje a interface byla udržována na teplotě 220°C, 300°C a 310°C v daném pořadí. Analýzy byly provedeny v splitless módu s konstantní lineární rychlostí transportního plynu (He), udržované na 60 cm/s. Průtok plynu pro oplach septa byl nastaven na 3 ml/min. Vzorky byly vstříkovány pomocí vysokotlakého dávkování (200 kPa) a tento tlak byl udržován po dobu 1 minuty. Napětí detektoru bylo nastaveno na 1,4 kV.

Příprava vzorků

Nekonjugované steroidy byly extrahovány z 1 ml krevní plazmy pomocí diethyléru (3 ml). Steroidní konjugáty, které zůstaly v rafinátech po extrakci diethylérem, byly hydrolyzovány a extrahovány. Vzniklá rezidua byla derivatizována pomocí metoxiamin-hydrochloridu a v dalším kroku stanovena pomocí GC/MS kitem (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., detection range 10-1280 pg/ml).

2. Sledování po různých stimulech

K upřesnění některých pozorování o vlivu příjmu potravy na hladinu hormonů jsme se zaměřili také na sledování vlivu různých stimulů na průběh těchto hladin. K tomuto účelu jsme vybrali jako stimul standardní snídani, orální podání glukózy za podmínek orálního glukózového testu, intravenózní glukózu a psyllia, jako model mechanického efektu na gastrointestinální trakt.

Soubor

Tato studie navazovala na 16 hodinové monitorování a zúčastnilo ji stejných osm žen, které absolvovaly i celodenní monitoraci. Z toho vyplývá, že charakteristika skupiny je stejná jako u předchozí studie: věk mezi 25-35 let (29.48 ± 2.99 roků), normální BMI (21.3 ± 1.3), všechny premenopauzální nekuřačky, zdravé, bez jakékoliv medikace, či hormonální kontracepce. Odběry byly uskutečněny ve folikulární fázi cyklu (1-7. den menstruačního cyklu).

I v tomto případě měly pět dní před provedením testu dodržovat standardní podmínky, které se ale nelišily příliš od jejich normálního denního režimu (to znamená 8 hodin spánku, příjem jídla podle standardizovaného jídelníčku).

Před testem byly seznámeny s protokolem studie a podepsaly informovaný souhlas. Studie byla schválena Etickou komisí Endokrinologického ústavu v Praze.

Provedli jsme čtyři rozdílné testy ve čtyřech menstruačních cyklech:

1. oGTT – orální glukózový toleranční test – kde měly pít 75 g glukózy (glukopur) ve 250 ml hořkého čaje na lačno

2. i.v.GTT – intravenózní glukózový toleranční test – kde jsme aplikovali 0,33 g glukózy na kg hmotnosti i.v. na lačno do periferní žíly
3. standardní snídane – kde probandky jedly stravu, jako v případě snídane při 16 hodinové monitoraci (čili chléb Šumava 2 plátky, kuřecí šunka prsní 50 g, sýr čerstvý 1 kus (celková kalorická hodnota snídane: 515 kcal, celkový obsah bílkovin: 20,58g, celkový obsah sacharidů: 47,75 g, celkový obsah tuků: 24,9 g).
4. psyllium – jedná se o nekalorickou vlákninu, která měla představovat mechanickou stimulaci zažívacího traktu cestou distenze – probandky vypily 4 g psyllia v 250 ml čisté vody

Před prvním odběrem krve byla zavedena intravenózní kanyla do kubitální žíly. Studie trvala 120 minut. Schéma odběrů byla následující:

- první odběr byl po celonočním půstu nalačno v 7:30
- další odběry byly v minutách 20, 40, 60, 90, 120

Analytické metody

Vzorky byly odebrány do chlazených zkumavek, které obsahovaly 100 µl 5 %-ní EDTA. Plazma byla separována centrifugací v předchlazené centrifuze (4°C) 5 minut při otáčkách 2000g, zmražena do 30 minut od odběru a uskladněna na teplotách -80°C až do analýzy.

Melatonin byl stanoven použitím komerčního RIA kitu (Laborator Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, Germany). Senzitivita pro melatonin byla 2 pg/ml. Intra-assay a inter-assay koeficienty variace byly 9.8-12.1% a 9.6-12.3 %.

C-peptid byl stanoven metodou ECLIA (elektrochemiluminiscenc immunoassay, Modular E 170 analyzátor, Roche). Detekční hranice kitu byla 0.003-13.3 nmol/l, nebo 0.01-40.0 ng/ml pro plazmu. Intra- a inter-assay koeficienty variace byly 1.5% a 2.3%.

Glykémie byla stanovena enzymatickou referenční metodou s hexokinázou (Cobas Integra 400 plus analyzátor, Roche). Detekční rozpětí kitu byl 0.12-40 mmol/l (2.16-720 mg/dl). Intra-set a inter-set reproducibilita byla 1.7% a 2.6%. Kortizol byl stanoven konvenční metodou RIA od firmy Immunotech (France.)

Analýza steroidů pomocí GC/MS

Steroidy i jejich polární konjugáty byly stanoveny podle metody GC/MS (Hill et al., 2010). Steroidy byly zakoupeny od firmy Steraloids (Newport, RI, USA), Sylon B od firmy Supelco (Bellefonte, PA, USA), methoxylamin-hydrochlorid od firmy Sigma (St.Louis, MO, USA) a rozpouštědla od firmy Merck (Darmstadt, Německo).

Přístroje

Sestava GCMS-QP2010 Plus od firmy Shimadzu (Kjóto, Japonsko) skládající se z plynového chromatografu vybaveného automatickou kontrolou průtoku, AOC-20s autosamplerm a samostatným kvadrupólovým detektorem (single quadrupole detector) s volitelným napětím v rozmezí 10 – 195 V. K analýze byla použita středně polární kapilární kolona RESTEK Rtx-50 (průměr 0,25 mm, délka 15 m, tloušťka filmu 0,1 µm). K měření byla použita ionizace elektronovým dopadem (electron impact) s napětím nastaveným na 70 V a emisním proudem 160 µA. Teplota injekčního portu, iontového zdroje a interface byla udržována na teplotě 220°C, 300°C a 310°C v daném pořadí. Analýzy byly provedeny v splitless módu s konstantní lineární rychlostí transportního plynu (He), udržované na 60 cm/s. Průtok plynu pro oplach septa byl nastaven na 3 ml/min. Vzorky byly vstříkovány pomocí vysokotlakého dávkování (200 kPa) a tento tlak byl udržován po dobu 1 minuty. Napětí detektoru bylo nastaveno na 1,4 kV.

Příprava vzorků

Nekonjugované steroidy byly extrahovány z 1 ml krevní plazmy pomocí diethyléteru (3 ml). Steroidní konjugáty, které zůstaly v rafinátech po extrakci diethyléterem, byly hydrolyzovány a extrahovány. Vzniklá rezidua byla derivatizována pomocí metoxiamin-hydrochloridu a v dalším kroku stanovena pomocí GC/MS.

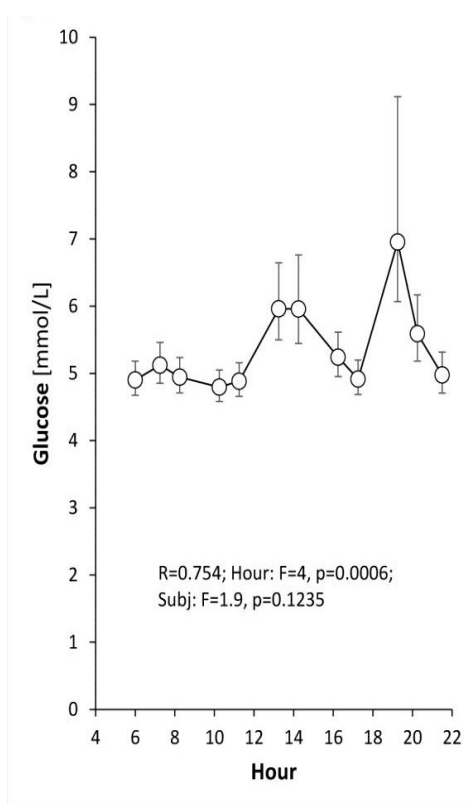
Vyhodnocení dat (obě studie)

Změny hladin hormonů byly hodnoceny modelem ANOVA s opakováním s faktory subjekt a čas. Vzhledem negaussovskému rozdělení dat a nekonstantní variabilitě byla původní data transformována mocninnou transformací k dosažení normálního rozdělení a konstantního rozptylu v datech i reziduích (Meloun et al., 2000) před vlastním testováním ANOVA. Homogenita dat a reziduí po transformaci byla testována metodikou uvedenou v literatuře (Meloun et al., 2004; Meloun et al., 2002).

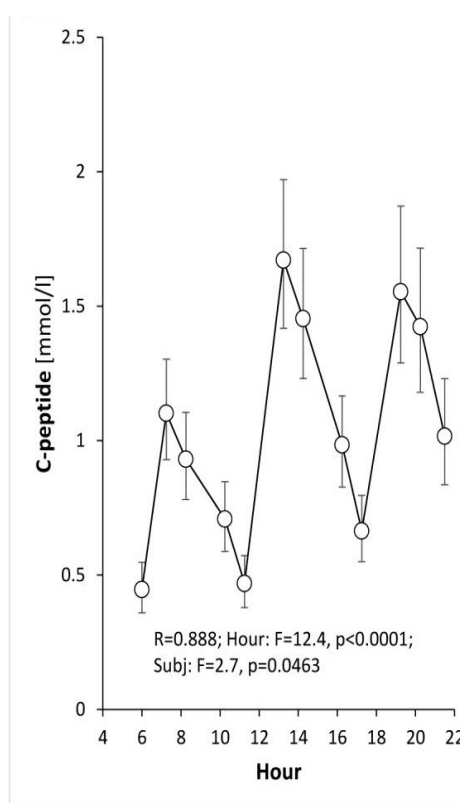
VII. Výsledky

1. 16 hodinové sledování

Hladiny C-peptidu a glukózy byly závislé na příjmu potravy a vykazovaly svá maxima 1 a 2 hodiny po obědě a večeři (Graf 1a, 1b). Změna hladiny C-peptidu a glykémie 1 a 2 hodiny po svačinách (jablko, jogurt) již nebyla zaznamenatelná. Nejvýznamnějším ukazatelem příjmu potravy byl C-peptid ($R=0,888$, $p<0.0001$).



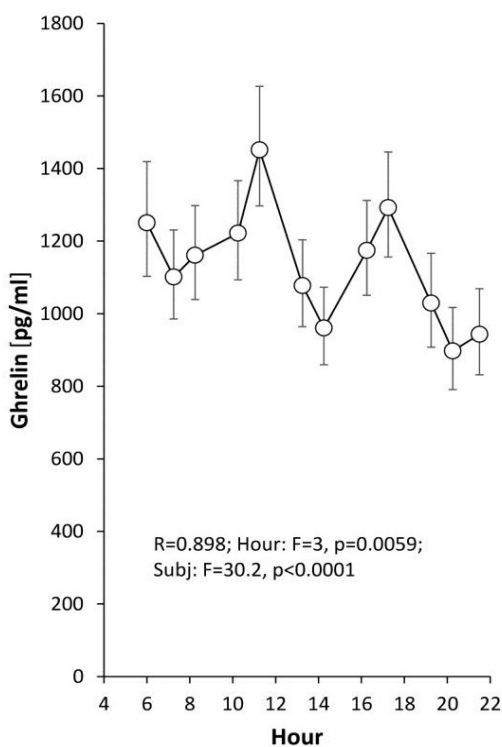
Graf 1a



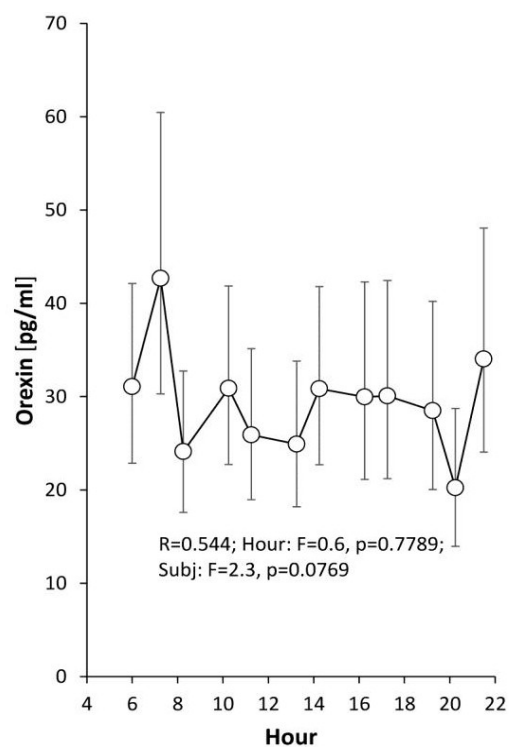
Graf 1b

Graf číslo 1a, 1b: průběh hladin glukózy, C-peptidu v průběhu šestnácti hodinového sledování. Hladiny glukózy (Graf 1a) a C-peptidu (Graf 1b) odrážejí fyziologický stav po příjmu potravy. Jejich maxima jsou dosažena v souvislosti s "velkými" jídly (oběd, večeře).

Hladiny ghrelinu dosáhly maxima těsně v době oběda a večere (Graf 2a). Následně vidíme signifikantní pokles hladin s maximem 2 hodiny po obědě a po večeři. K signifikantním změnám hladiny orexinu nedošlo v průběhu našeho sledování (Graf 2b).



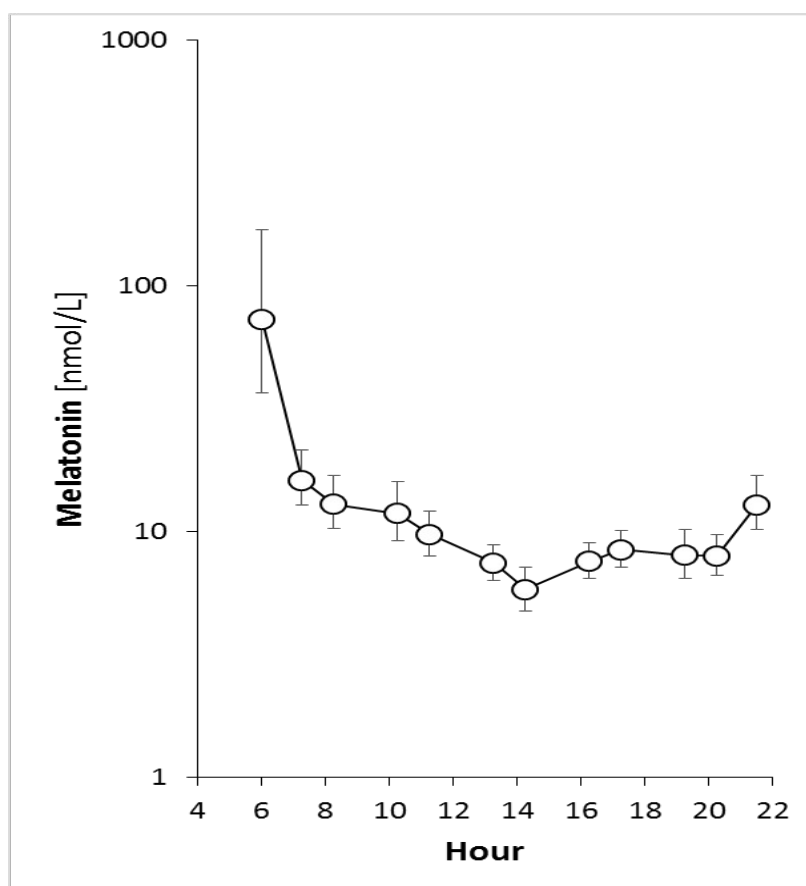
Graf 2a



Graf 2b

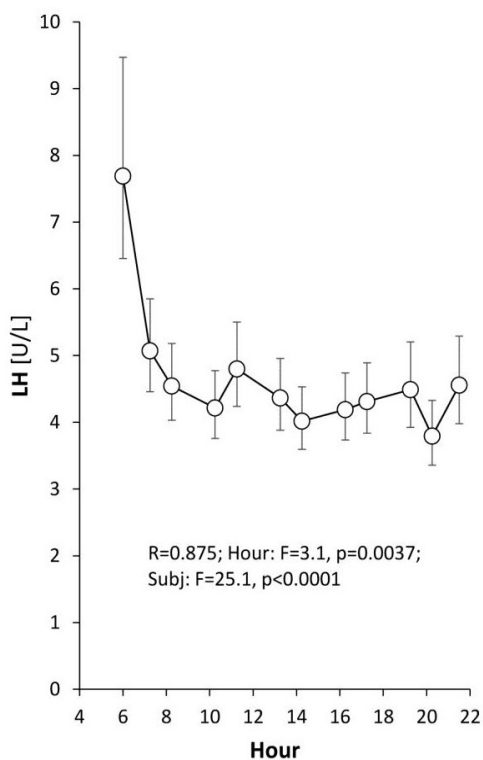
Graf 2a, 2b. Průběh hladin ghrelinu a orexinu v průběhu šesnácti hodinového sledování. Hladiny ghrelinu (Graf 2a) jsou maximální přesně v době před konzumací "velkých" jídel, nadále dojde k poklesu ghrelinových hladin a to s maximem 2 hodiny po obědě a po večeři. Hladiny orexinu (Graf 2a) nevykazují žádné signifikantní změny v souvislosti s příjmem potravy.

Hladiny melatoninu sledují přirozený kurz tohoto hormonu v průběhu celého dne. Ráno jsou hladiny nejvyšší po probuzení, následně dojde k signifikantnímu poklesu a udržuje poměrně stálé a nízké hladiny až do večera, kdy dojde k opětovnému fyziologickému nárůstu hladin. Lze pozorovat navíc další pokles hladiny melatoninu 2 hodiny po obědě (Graf 3).

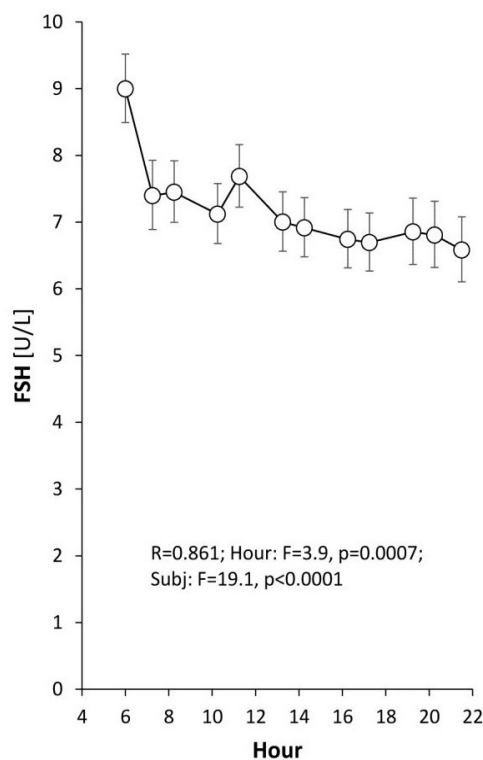


Trvalý pokles hladiny LH a FSH byl pozorovatelný v průběhu celého dne, navíc došlo k dalšímu nesignifikantnímu poklesu hladin po hlavních jídlech (Graf 4a, 4b).

Graf 4a

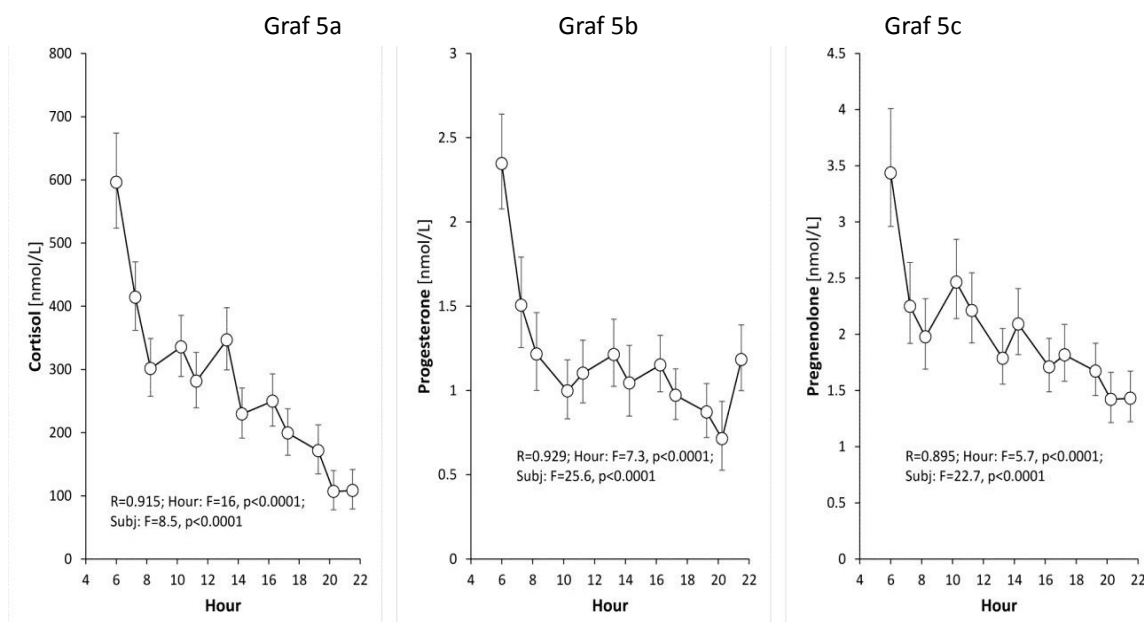


Graf 4b



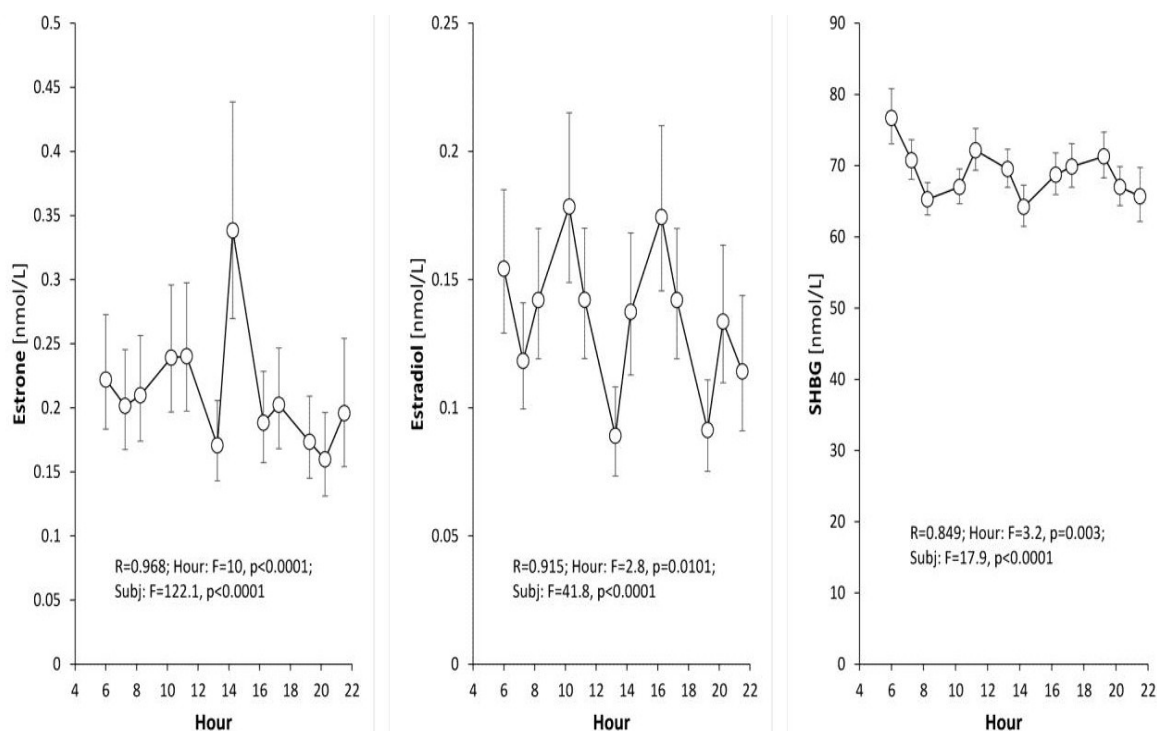
Graf 4a, 4b. Průběh hladin LH a FSH v průběhu šestnácti hodinového sledování. LH (Graf 4a) i FSH (Graf 4b) vykazují klesající tendenci po dobu celého dne. Navíc další nesignifikantní poklesy hladin lze pozorovat po obědě a večeri.

Hladina kortizolu klesala postupně po dobu celého dne, navíc došlo k dalšímu signifikantnímu poklesu hladin kortizolu 2 hodiny po obědě (Graf 5a). Všechny C21 steroidy (kortizol Graf 5a, progesteron Graf 5b, pregnenolon Graf 5c) signifikantně poklesly jednu hodinu po probuzení, dále pak došlo k monotónnímu poklesu jejich hladin po dobu celého dne, kromě již zmíněného kortizolu.



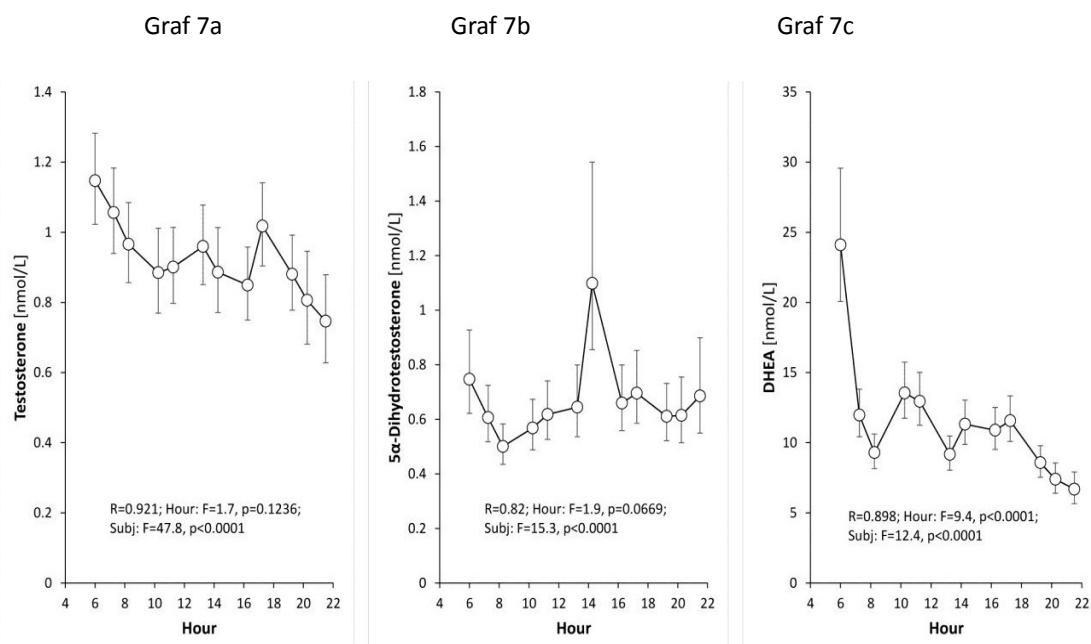
Graf 5a, 5b, 5c. Průběh hladin kortizolu, progesteronu, pregnenolonu v průběhu šestnácti hodinového sledování. Hladiny kortizolu (Graf. 5a) mají klesající tendenci v průběhu celého dne, navíc 2 hodiny po obědě došlo k dalšímu signifikantnímu poklesu hladiny kortizolu. Hladiny progesteronu (Graf 5b) a pregnenolonu (Graf 5c) po iniciálním signifikantním poklesu po ránu udržely monotónně klesající tendenci po celou monitoraci.

SHBG mírně poklesl po jednotlivých jídlech (Graf 6c). Estron (Graf 6a) nevykazuje žádný významný trend průběhu hladin po dobu sledování, i když k určitému poklesu dojde po hlavních jídlech. Hladina estradiolu (Graf 6b) signifikantně poklesla po obědě a večeři.



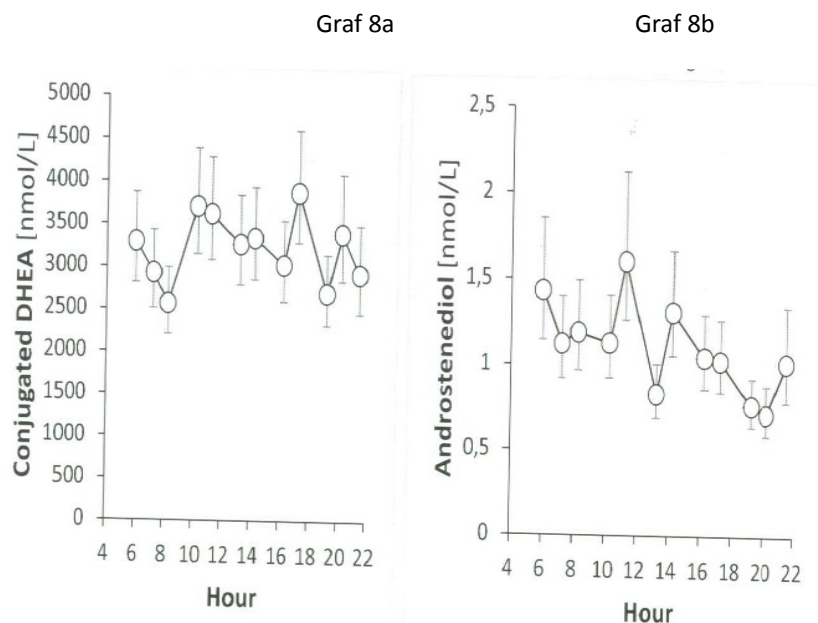
Graf 6a, 6b, 6c. Průběh hladin estronu, estradiolu, SHBG v průběhu šestnácti hodinového sledování. Hladiny estronu (Graf 6a) nevykazují žádný významný trend, přes mírný pokles po obědě a po večeři. Estradiol (Graf 6b) poklesl signifikantně po hlavních jídlech. SHBG (Graf 6c) mírně poklesl po jednotlivých jídlech.

Hladiny testosteronu (Graf 7a) nevykazovaly velikou závislost na příjmu potravy, kromě DHT (Graf 7b), jehož hladiny vykazovaly signifikantní zvýšení 2 hodiny po obědě. Dále k malému zvýšení hladiny testosteronu dojde kolem 14.00 hodin. Volná frakce DHEA (Graf 7c) vykazovala malý, ale signifikantní pokles po oběd i večeři. Navíc u DHEA lze pozorovat určitý peak pozdě dopoledne (mezi 10-12 hodinou).



Graf 7a, 7b, 7c. Průběh hladin testosteronu, DHT, DHEA v průběhu 16 hodin sledování. Hladiny testosteronu (Graf 7a) nevykazují souvislost s příjmem potravy a vykazují klesající tendenci v průběhu dne. Pouze malému zvýšení dojde 2 hodiny po obědě, kolem 14.00 hodin. Hladiny DHT (Graf 7b) vykazují signifikantní nárůst 2 hodiny po obědě. Hladiny DHEA (Graf 7c) poklesly 2 hodiny po obědě a po večeři. U DHEA lze pozorovat určitý peak pozdě dopoledne (mezi 10-12 hodinou).

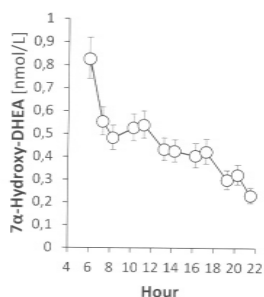
Konjugovaný DHEA poklesl pouze po večeři (Graf 8a). Androstendiol (Graf 8b) poklesl po obědě, ale k jiným významným změnám v souvislosti s příjmem potravy u tohoto hormonu nedošlo.



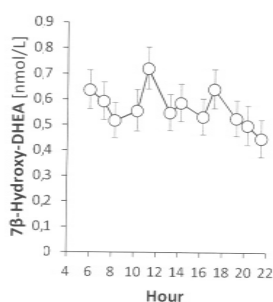
Graf 8a a 8b. Průběh hladin konjugovaného DHEA a androstendiolu v průběhu 16 hodin sledování. Hladina konjugovaného DHEA (Graf 8a) klesla pouze po večeři, na rozdíl od jeho volné frakce (Graf 7c). Androstendiol (Graf 8b) poklesl po obědě, ale k jiným významným změnám jeho hladiny nedošlo v souvislosti s jídlem.

7 α -hydroxy-dehydroepiandrosteron (Graf 9a), 3 β ,7 α ,17 β -hydroxy-androstentriol (Graf 10a) klesali postupně v průběhu dne z ranního maxima k odpoledním nízkým hladinám. Podobně k DHEA, i všechny jeho deriváty vykazovaly nárůst v 10 a 11 hodin přesto, že tento nárůst byl významný pouze pro volné (Graf 7c) a konjugované DHEA (Graf 8a), 7 β -hydroxy-DHEA (Graf 9b) a 16 α -hydroxy-DHEA (Graf 10c). Tyto změny nemají s velkou pravděpodobností vztah k příjmu potravy, jelikož hladiny C-peptidu a glykémie nejsou již 1 a 2 hodiny po příjmu "malých" jídel zvýšené.

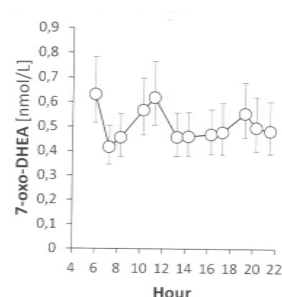
Graf 9a



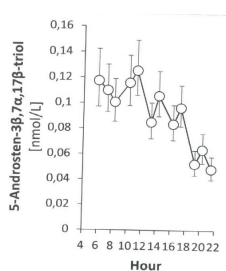
Graf 9b



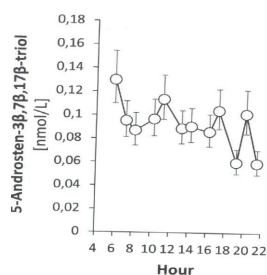
Graf 9c



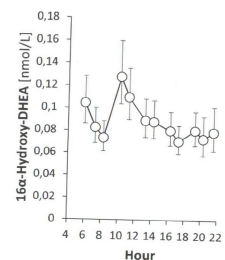
Graf 10a



Graf 10b



Graf 10c



Graf 9 a 10. Průběh hladin derivátů DHEA v průběhu šestnácti hodinového sledování. 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosteron (Graf 9a), 3 β ,7 α ,17 β -hydroxy-androstentriol (Graf 10a) sledovaly stejný profil změny hladin jak DHEA (Graf 7c), na rozdíl od 7-oxo-derivátů (Graf 9c), 7- β -isomeru (Graf 9b), 3 β ,7 β ,17 β -hydroxy-androstenetriolu (Graf 10b).

Tabulka 1. Statistický popis denního profilu vybraných hormonů (konjugáty DHEA kvůli přehlednosti jsou zobrazeny zvlášť v tabulce číslo 2)

substance	Čas		Subjekt	
	H-F	p	S-F	p
ghrelin	3	0,0059	30,2	<0.0001
orexin	0,6	0,7789	2,3	0,0769
melatonin	9,9	<0.0001	7,3	0,0002
glukóza	4	0,0006	1,9	0,1235
C-peptid	12,4	<0.0001	2,7	0,0463
LH	3,1	0,0037	25,1	<0.0001
FSH	3,9	0,0007	19,1	<0.0001
SHBG	3,2	0,003	17,9	<0.0001
kortisol	16	<0.0001	8,5	<0.0001
progesteron	7,3	<0.0001	25,6	<0.0001
pregnenolon	5,7	<0.0001	22,7	<0.0001
testosteron	1,7	0,1236	47,8	<0.0001
DHT	1,9	0,0669	15,3	<0.0001
DHEA	11,42	<0.0001	12,4	<0.0001
estron	10	<0.0001	122,1	<0.0001
estradiol	2,8	0,0101	41,5	<0.0001

Použitá byla ANOVA s opakovaným měřením, časem (H-F) a subjektem (S-F) jako faktory.

H-F =ukazuje rozdíly mezi časovými periodami

S-F =ukazuje rozdíly mezi jednotlivými individuálními subjekty

p = statistický význam (statisticky významné hodnoty jsou zvýrazněny tučně)

Tabulka 2. Statistický profil konjugátů DHEA

Hormon	Čas		Subjekt	
	H-F	p	H-S	p
5-androstene-3beta,17beta-diol-C	2.98	0.0027	0.3	<0.0001
DHEA-konjugovaný	3.76	0.0004	10.2	<0.0001
7-oxo-DHEA	3.92	0.0003	12.3	<0.0001
5-androstene-3beta,17beta-diol	4.71	0	10.3	<0.0001
16alpha-OH-DHEA	10.39	0	34.5	<0.0001
16alpha-OH-DHEA konjugovaný	33.29	0	119.5	<0.0001
7beta-OH-DHEA	14.84	0	49.4	<0.0001
5-androstene-3beta,7alpha,17beta-triol	22.65	0	67.1	<0.0001
5-androstene-3beta,7beta,17beta-triol	24.43	0	82.2	<0.0001
7alpha-OH-DHEA	28.95	0	64.5	<0.0001

Použita byla ANOVA s opakovaným měřením, časem (H-F) a subjektem (S-F) jako faktory.

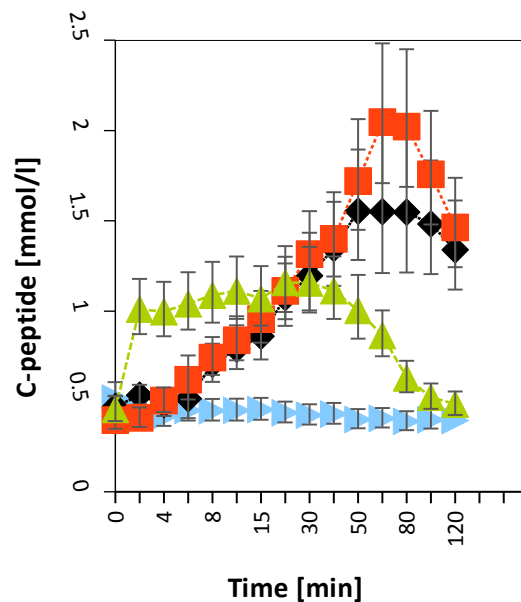
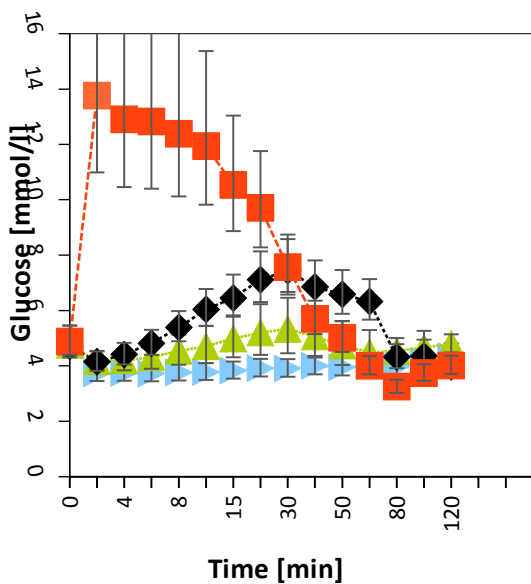
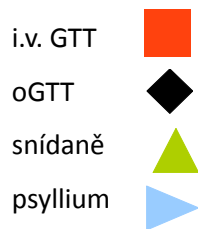
H-F =ukazuje rozdíly mezi časovými periodami

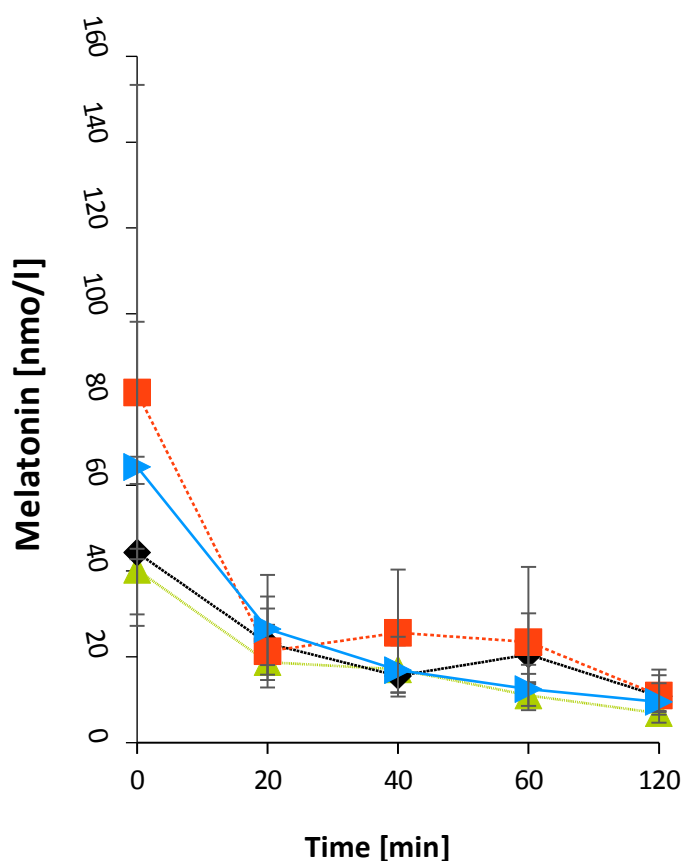
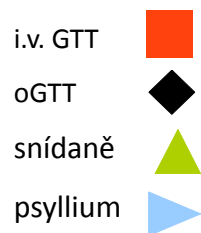
S-F =ukazuje rozdíly mezi jednotlivými individuálními subjekty

p = statistický význam (statisticky významné hodnoty jsou zvýrazněny tučně)

2. Sledování po různých stimulech

Graf číslo 10 a 11: Průběh hladin glykémie a C-peptidu po jednotlivých stimulech. Nejvyšší glykémie byly dosaženy při i.v.GTT. K maximálním hladinám došlo hned na začátku. K normalizaci glykémie došlo již v prvních 40 minutách. Tomu odpovídají i hladiny C-peptidu. Při oGTT došlo k nárůstu glykémie pomaleji, ale zvýšené hladiny přetrvávaly těž déle. Psyllium, což je nekalorická vláknina nevedla ke zvýšení glykémie ani C-peptidu. Standardní snídaneň vedla k fyziologickým změnám hladiny glykémie a C-peptidu.

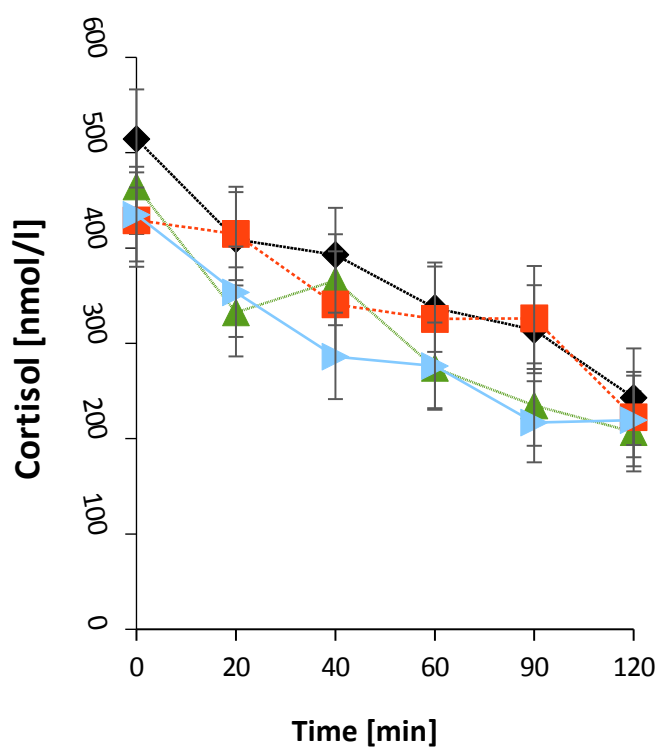




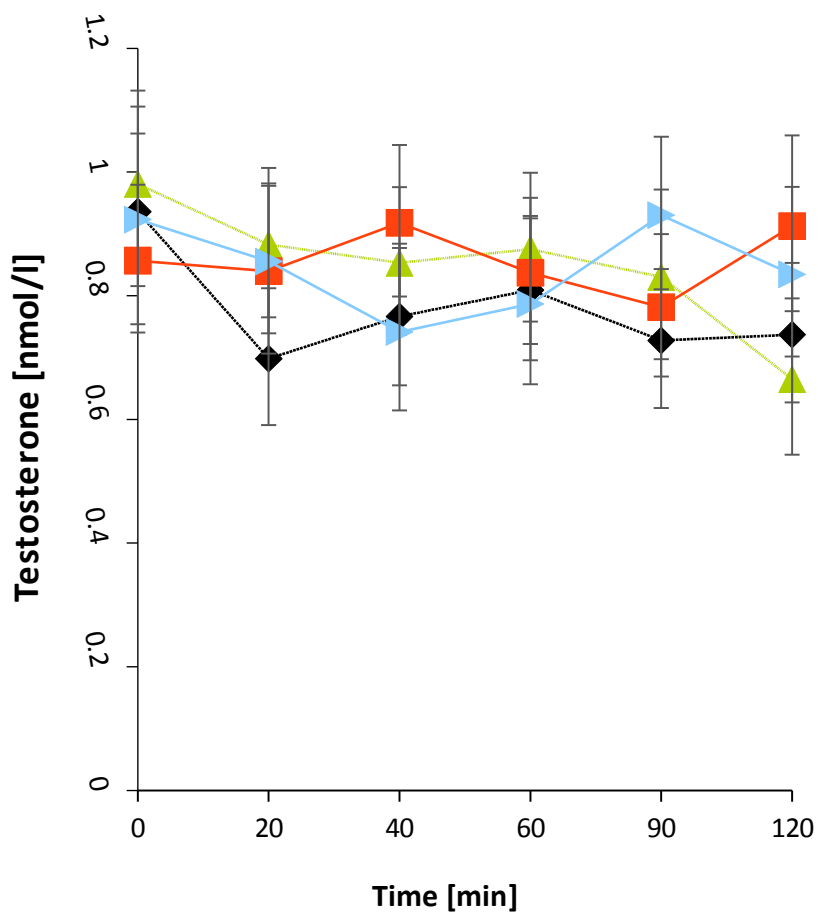
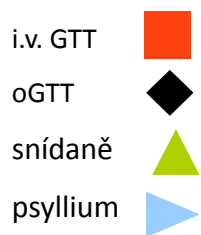
Graf číslo 12: Průběh hladin melatoninu po jednotlivých stimulech. U všech stimulů došlo k poklesu hladiny melatoninu na začátku testu, po prvním odběru. V případě i.v.GTT došlo 20 minut po aplikaci glukózy došlo k nárůstu hladiny melatoninu a tento nárůst přetrval až do 60 minuty. Podobně je tomu i po perorální aplikaci glukózy, i když k nárůstu dojde opožděně oproti parenterálně aplikované glukóze.

Graf číslo 13. Průběh hladiny kortizolu po aplikaci jednotlivých stimulů. Došlo ke zpomalení poklesu hladiny kortizolu po aplikaci jednotlivých stimulů. Toto zpomalení bylo nejvíce vyjádřeno v i.v. GTT, kde přetrvalo do konce 60. minuty. Při snídani došlo v 40. minutě ke zvýšení hladiny kortizolu. Při oGTT i i.v.GTT můžeme sledovat plato v kortizolových hladinách.

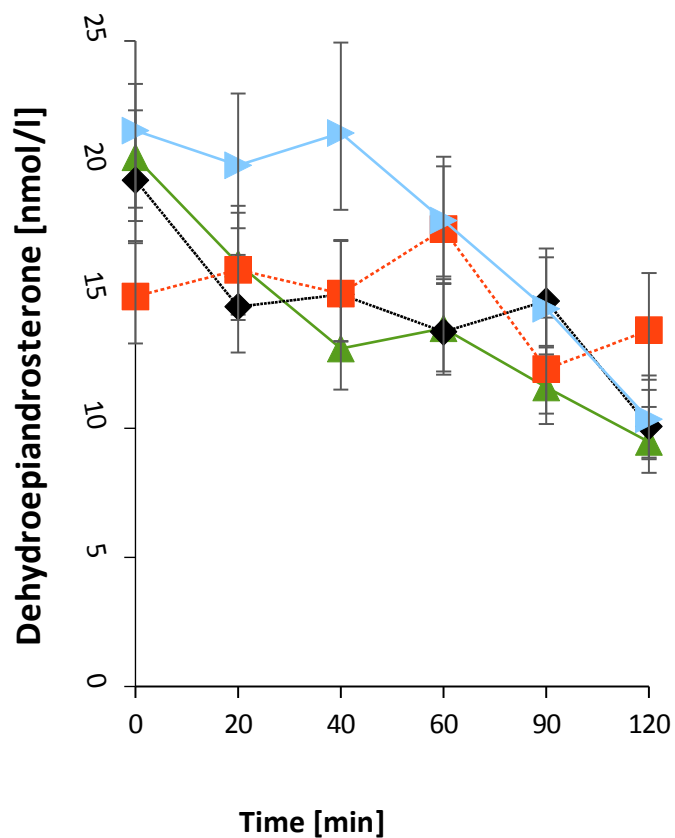
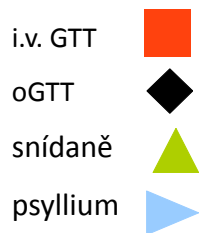
i.v. GTT ■
oGTT ◆
snídane ▲
psyllium ▶



Graf číslo 14. Průběh hladin testosteronu po aplikaci jednotlivých stimulů. Průběh hladiny testosteronu neměl významný vztah k jednotlivým stimulům.



Graf číslo 15. Průběh hladin DHEA po aplikaci jednotlivých stimulů. Po počátečním poklesu lze vidět zvýšení hladiny DHEA u všech stimulů. Toto zvýšení je nejvíce vyjádřeno v případě i.v.GTT, kde ale nárůst byl opožděn oproti ostatním stimulům.



VIII. Diskuze

1) 16 hodinové sledování

Všeobecně je dobře známo, jaký mohou mít jednotlivé hormony vliv na příjem potravy. Naopak pouze u některých hormonů bylo studováno, jak může mít příjem potravy vliv na hormonální hladiny. V této části studie jsme zvolili k sledování vlivu potravy na hladiny hormonů podávání standardní stravy - snídaně, svačiny, oběda, svačiny, večeře. Hladiny hormonů jsme sledovali nalačno, dále vždy jednu a dvě hodiny po jídle, a to od 6:00 ráno do 21:30 večer.

Většina sledovaných hormonů v průběhu celého dne vykazovala signifikantní změny hladin v porovnání hodnot mezi časy a mezi subjekty. Výjimkou byly orexin, testosteron a dihydrotestosteron, kde rozdíly mezi časy nebyly signifikantní, dále nesignifikantní rozdíly mezi subjekty jsme našli u orexinu, glykémie a C-peptidu. Deriváty DHEA (přesněji 7β -hydroxy-DHA, 7-oxo-DHEA, 16α -hydroxy-DHEA) nevykazovaly signifikantní fluktuaci v průběhu dne v závislosti na příjmu potravy.

Všeobecně je dobře znám vztah příjmu potravy k hladinám glykémie i C-peptidu. Jak se dalo očekávat, i v naší studii jsme našli signifikantní zvýšení hladiny jak glykémie, tak i C-peptidu, a to jednu a dvě hodiny po hlavních jídlech, dále i po snídani. Díky tomu, že svačiny představovaly pouze jogurt a jablko, jednu a dvě hodiny po jejich konzumaci se již nedalo pozorovat změny hladiny ani glykémie, ani C-peptidu. C-peptid se ukázal být významnějším prediktorem příjmu potravy od glykémie ($p < 0.0001$ vs $p = 0.0006$).

Vztah ghrelinu a příjmu potravy byl předmětem mnoha studií (Wren et al., 2001, Cummings et al., 2001). Naše výsledky souhlasí s výsledky jiných autorů, čili hladiny ghrelinu klesají po jídle, svého minima dosáhly po velkých jídlech, to znamená po obědě a po večeři.

Orexiny v naší studii nevykazovaly signifikantní změny hladiny v průběhu dne v závislosti na příjmu potravy ($p=0.7789$). Očekávali jsme, že orexinové hladiny budou úzce souviset s příjmem potravy, jelikož se jedná o významné orexigenně působící hormony. Nejpravděpodobněji důvodem této skutečnosti může být, že krev není nejvhodnější pro monitoraci orexinů. Hladiny orexinů standardně jsou stanovovány z mozkomíšního moku, i když jsou studie, které úspěšně monitorovaly orexiny v krvi (Adam et al., 2002, Bronský et al., 2007). Pravdou je, že v těchto studiích nesledovali dynamické změny hladiny orexinů v průběhu dne, ale ve studii Adam et al. stanovovali orexinové hladiny u jednotlivých obézních subjektů, zatímco Bronský et al. sledovali změny hladiny orexinů před a po redukci váhy.

Cirkadiální rytmus melatoninu je dobře prostudován. Ráno po probuzení dojde k poklesu jeho hladiny a nízké hladiny jsou udržovány v průběhu celého dne až do pozdních odpoledních hodin, když dojde opět k nárůstu jeho hladiny. V této studii jsme se kromě sledování hladiny melatoninu v průběhu dne zaměřili i na sledování změny melatoninových hladin v závislosti na příjmu potravy. Vycházeli jsme z toho, že hladiny melatoninu v průběhu dne jsou převážně gastrointestinálního původu, navíc v pokusech potrava bohatá na tryptofan vedla ke zvýšení plazmatické hladiny melatoninu (Hattori et al., 2005). Dle Martina et al. uvolnění gastrointestinálního melatoninu závisí na periodicitě příjmu potravy (Martin et al., 1998). Také nesmíme zapomenout na studie, které poukazují na zapojení melatoninu do metabolismu

uhlohydrátů (Borges-Silva et al., 2007, Stárka et al., 2008). Výsledky naší studie ukázaly náhlý a významný pokles hladiny melatoninu po ránu, ale dále v průběhu dne nedošlo k významným změnám hladiny melatoninu, kromě signifikantního poklesu 2 hodiny po obědě a samozřejmě fyziologickému nárůstu hladin k večeru. Pravděpodobná příčina absence změny po ránu po snídani je, že pokles hladiny melatoninu je krytý ve fyziologickým poklesu jeho hladiny v té denní době. Dále večer dojde k fyziologickému nárůstu hladiny, která pravděpodobně nemůže být "převálcována" potenciálním poklesem, který by mohl být způsoben večeří. Navíc svačiny nejsou dostatečně silné stimuly k ovlivnění melatoninové hladiny. Dlouhý odstup odběrů (hodina a dvě hodiny) od konzumace jídla mohl hrát též roli.

Je znám účinek kortikosteroidů na příjem potravy, glykémie nebo energetický metabolismus, ale existuje jen málo údajů o vlivu příjmu potravy na hladinu kortizolu (Bandin et al., 2014, Simonetta et al., 2001). Podobně jako v případě melatoninu vliv stimulace jídlem byl převážně kryt v nychtemerálním průběhu profilu. Klesající tendence byla udržena po celý den, to souhlasí též s popisem kortizolového chování z literatury (Weitzman et al., 1971). Po prvé popisujeme signifikantní pokles hladiny kortizolu 2 hodiny po obědě .

Všechny zbylé C21 steroidy, které jsme sledovali (progesteron a pregnenolon) podobně jako kortizol klesaly hodinu po probuzení a udržely klesající profil po celý den.

V studii z 1975 účinek hladovění byl prokázán na hladinu LH, ale nikoliv na FSH. U potkanů omezení příjmu potravy vedlo k poklesu plazmatické hladiny LH (po 10 dnech), ale nepozorovali změny v hladinách FSH (ani plazmatického, ani hypofyzárního FSH) (Howland , 1975). Jiná studie, která byla zaměřena na těhotné

muslimské ženy v měsíci Ramadan, našla po 2 týdnech půstu signifikantní pokles FSH (Khoshdel et al., 2014). V naší studii jsme pozorovali pouze nesignifikantní pokles gonadotropinů po hlavních jídlech, ale byl patrný celodenní monotónní pokles jejich hladin. Pravděpodobnou příčinou absence signifikantních změn v souvislosti s příjmem potravy je, že nedochází k tak akutním změnám v hladinách těchto hormonů v závislosti na jídle. Tuto hypotézu podporuje i studie z roku 1992, kde krátkodobý půst (5 dní) potkanů nebyl schopen vést k poklesu GnRH mRNA v hypofýze zvířat.

Překvapivě jsme našli zatím nepopsané signifikantní změny po jídlech jak u estradiolu, tak i u SHBG.

Testosteron nebyl ovlivněn příjmem potravy, ale u dihydrotestosteronu jsme mohli sledovat pokles jeho hladiny 2 hodiny po jídle. Profil testosteronu v průběhu dne odpovídal tomu, jak je to popsáno v literatuře.

Vztah DHEA (a jeho derivátů) k příjmu potravy ještě nebyl dříve studován. Nychtemerální profil DHEA je popsán v literatuře a tomu odpovídaly i naše výsledky, čili došlo k postupnému poklesu jeho hladiny z ranních vysokých hodnot k odpolednímu minimu a tento obraz sledují i jeho konjugáty, i když ne v tak nápadné míře. Co se týká jejich vztahu k příjmu potravy, tak našli jsme pokles hladin DHEA, jeho konjugované formy, androstenediolu a 7α -hydroxydehydroepiandrosteronu jednu a dvě hodiny po jídle (přesněji po obědě a večeři). Jeho jiné metabolity, 7β -hydroxy-DHEA, 7 -oxo-DHEA, 16α -hydroxy-DHEA, naopak nevykazovaly významné změny po jídlech. Proč dojde k peaku v době mezi 10:00 a 12:00 u DHEA a jeho derivátů, ale i u testosteronu, zůstává otázkou a čeká na objasnění. Nicméně podobný nález popsal i Neaves u testosteronu před více než 30 lety (Neaves et al., 1984).

2) Sledování po různých stimulech

K upřesnění některých poznatků o vlivu příjmu potravy na hladiny hormonů jsme se zaměřili také na sledování vlivu různých podnětů na průběh hladin některých vybraných hormonů. Jako podnět jsme zvolili standardní snídani, orální podání glukózy v průběhu oGTT, intravenózní podání glukózy a psyllium umožňující sledovat mechanický efekt potravy na zažívací ústrojí. Časové schéma odběrů v této studii bylo zaměřeno na upřesnění a zachycení akutních a "jemných" změn hladin hormonů vyvolaných studovanými nutričními podněty.

Dle očekávání byla během i.v.GTT vysoká hladina glukózy dosažena nejrychleji, rychle došlo i k její normalizaci, již v průběhu prvních čtyřiceti minut po podání i.v. glukózy. V průběhu oGTT nástup hyperglykémie byl opožděn ve srovnání s intravenózní aplikací, zvýšená glykémie též přetrvávala déle. Psyllium, což je nekalorická vláknina modelující mechanickou distenzi zažívacího traktu, nevedlo k signifikantním změnám glykémie, ani Cpeptidu. Autoři studie z roku 2006 ukázali, že osoby s DMII, které konzumovali jako součást snídane i psyllium, měly nižší postprandiální hladinu glykémie, inzulínu, ale i volných mastných kyselin. Ranní konzumace vlákniny neměla již ale žádný efekt na další jídlo za 4 hodiny (Clark et al., 2006). V naší studii jsme efekt psyllia neprokázali. Standardní snídaně měla simulovat stav, kterému náš organizmus je vystaven

každodenně při stravování. Dosažené výsledky odpovídaly normálním hodnotám u zdravé populace. V současné době přibývají poznatky o tom, jak dietní faktory mohou vést k ovlivnění cirkadiálních rytmů (např. kofein (Sherman et al., 2011), alkohol (Spanagel et al., 2005). Předpokládá se, že tyto změny jsou zprostředkovány právě melatoninem (Peukhuri et al., 2012).

Je známo, že hladovění vede k ovlivnění hladin melatoninu. Restrikce příjmu energie po 2 dnech vedla v uvedené studii k poklesu plazmatické hladiny melatoninu o 20%. Aplikace glukózy v průběhu hladovění vedla k návratu melatoninu k normálním hladinám (Rojdmark et al., 1989). V naší studii jsme pozorovali pokles hladin po prvním odběru nalačno, což odpovídá fyziologickému chování tohoto hormonu. 40 minut po intravenózní aplikaci glukózy došlo ke zvýšení hladiny melatoninu a to přetrvávalo až do 60. minuty. Podobně i po orálním požití glukózy došlo ke zvýšení melatoninu i když později, ve srovnání s i.v. podanou glukózou. Příčinou toho je pravděpodobně pozdější nástup hyperglykémie. Vzhledem k tomu, že snídaně ani nekalorická vláknina nevedly k významnému zvýšení glykémie, nebylo možné pozorovat ani zvýšení hladiny melatoninu.

Vliv kortikoidů na metabolismus glukózy i na zvýšení glykémie je dobře známý (Lecocq et al., 1964). Některé studie popisují zvýšení hladiny cirkulujícího kortizolu po každém příjmu potravy (Follenius et al., 1982). Dle studie z roku 1981 nejdůležitějším stimulem pro postprandiální zvýšení kortizolu jsou proteiny (Slag et al., 1981), jiné studie podobný účinek přisuzují i sacharidům a lipidům (Benedict et al., 2005, Stimson et al., 2014). Pestrá strava a infuze glukózy i inzulínu (Wake et al., 2006) vede k aktivaci přeměny kortizonu na aktivní kortizol indukci enzymu 11 β hydroxysteroid dehydrogenázy 1 (Basu et al., 2004). Dle Stimson et al. na postprandiálním zvýšení kortizolu se podílí ne jenom zvýšená regenerace kortizolu z kortizonu, ale i jeho zvýšená sekrece z nadledvin (Stimson et al., 2014). V naší studii jsme našli zpomalení poklesu hladin kortizolu v souvislosti s jednotlivými stimuly. Pokles byl nejvíce vyjádřen při i.v.GTT a přetrvával do konce 60. minuty. Při snídani došlo v 40. minutě ke zvýšení hladiny kortizolu, což odpovídalo nálezům jiných studií.

V mechanismu může hrát roli i parenterální versus perorální aplikace studovaných stimulů. Na postprandiálním zvýšení kortizolu při perorálním nutričním stimulu se předpokládá podíl signálů z GIT (pravděpodobně inkretiny glucagonlike peptid1 a gastric inhibitory polypeptide, které stimulují osu hypothalamus hypofýza - nadledviny (Herrmann et al., 1995)). Dále je známé, že oGTT vede k "otupení" charakteru poklesu kortizolu (Reynolds et al., 2001). Tím by se dalo vysvětlit námi nalezené plato v kortizolových hladinách. O tom, že psyllium má vliv na zásobení kortikoidy, jsme našli v literatuře pouze jediný článek, který popisuje adrenální krizi u pacienta léčeného prednisonem a současné podávání psyllia (Ahi et al., 2011). Chronické podávání DHEA (po dobu 2 let) v dávce 50 mg/den vedlo ke zlepšení glukózové tolerance a inzulínové senzitivity u osob, které měly poruchu glukózové tolerance (muži i ženy), dále vedlo ke snížení triglyceridů v plazmě (Weiss et al., 2011). Také je známo, že mírná konzumace alkoholu vede ke zvýšení plazmatické DHEAS (Sierksma et al., 2004). Chybí ale studie, které by se zabývaly účinky potravy/glukózy na hladinu DHEA. Naše výsledky ukazují určité zvýšení hladiny DHEA u všech stimulů po přechodném poklesu na začátku testu. Tento nárůst byl nejvýznamněji vyjádřen u i.v.GTT, kde ale nárůst hladiny byl opožděn oproti ostatním stimulům (kromě snídaně) přesto, že by se dal očekávat opačný efekt díky okamžitému zvýšení hladiny glukózy při jejím intravenózním podání a dále dosažením nejvyšších glykemií ze všech testů. Data o chování melatoninu po jednotlivých stimulech přinesla zajímavé poznatky, které mohou přispívat k objasnění například možnosti ovlivnění hladiny tohoto hormonu přirozeně, pouze dietními vlivy. To je důležité, jelikož melatonin se zdá být hormonem, o který je recentně hodně velký zájem a potenciálně má široké spektrum využití. Současně je melatonin dostupný i v České republice na

lékářský předpis na léčbu primární nespavosti (čili nespavosti bez zjištěné příčiny). Určitě by bylo zajímavé, kdybychom přes vědomou kontrolu toho, co jíme event. pijeme, mohli ovlivnit plazmatickou hladinu hormonů, a tím získat jejich benefit na naše zdraví bez nutnosti požívání syntetických hormonů a potravinových doplňků.

IX. Závěr

1) 16 hodinové sledování

1) Monitorace hladiny melatoninu v průběhu dne prokázala signifikantní pokles dvě hodiny po obědě. Ostatní změny hladiny působené jídlem jsou velmi pravděpodobně skryty ve fyziologickém průběhu hladiny melatoninu.

2) Hladiny ghrelinu dosahovaly maximálních hladin před obědem a večeri, dále po příjmu potravy došlo k poklesu hladin s maximem dvě hodiny po jídle.

3) U orexinů jsme nenašli žádnou závislost na příjmu potravy, ani nedošlo k signifikantním změnám hladin v průběhu dne.

4) Kortizol po typickém ranním poklesu udržel klesající tendenci po celý den, navíc signifikantní pokles hladiny byl sledován po obědě.

5) Našli jsme signifikantní změny hladin estradiolu a SHBG po jídlech.

6) Popisujeme pokles hladiny DHEA a jeho konjugátu, dále androstendiolu a 7-alfa-hydroxydehydroepiandrosteronu jednu a dvě hodiny po jídle.

2) Sledování po různých stimulech

1) Hladiny melatoninu klesaly po odběru nalačno fyziologicky, poté určitý nárůst hladiny lze pozorovat v případě i.v.GTT (od 20. minuty a končí v 60. minutě), u oGTT v 60. minutě. U ostatních stimulů ke zvýšení hladiny nedojde.

2) Došlo ke zpomalení fyziologického poklesu kortizolu po aplikaci jednotlivých stimulů, což se nejvíce prokázalo v průběhu i.v.GTT. U snídaně došlo ke zvýšení hladiny kortizolu v 40. minutě.

3) Hladiny DHEA klesaly na začátku testu, poté ale lze pozorovat určité zvýšení hladiny.

X. Shrnutí závěrů

Cíle naše studie byly naplněny. Provedli jsme monitoraci hladiny melatoninu a dalších vybraných hormonů v průběhu dne a následně i po vybraných stimulech. Základní hypotézu, že hladiny melatoninu v průběhu dne lze ovlivnit přes příjem potravy, jsme nemohli jednoznačně prokázat, přestože jsme pozorovali signifikantní změny hladiny melatoninu dvě hodiny po obědě, ale signifikantné změny po dalších jídlech jsme nepozorovali, a to pravděpodobně z důvodu překrývání tohoto jevu fyziologickým rytmem melatoninu v průběhu dne. S provedením rozdílných testů jsme měli napodobovat různé situace v organismu, jednak stimulací přes zažívací trakt, ale i jeho obcházením aplikací glukózy parenterálně, nebo třeba vynecháním kalorického efektu stravy pouze mechanickou distenzí zažívacího traktu, kterou jsme dosáhli aplikací nekalorické vlákniny, jsme sledovali opět změny hladiny melatoninu a některých dalších parametrů a hormonů. Přes určité nedostatky (jako je například nesprávné načasování odběrů, nezařazení hladovění jako referenčního profilu) studie přinesla i zajímavé výsledky, jako pokles hladiny melatoninu dvě hodiny po obědě, ovlivnění hladiny kortizolu jídlem, nebo po prvé popsané signifikantní změny hladiny estradiolu a SHBG v souvislosti s příjmem potravy. Tyto výsledky nám umožní doufat v lepší pochopení souvislosti endokrinního systému (a ne jenom té části, která je známá o zapojení do příjmu potravy a jídelního chování) a příjmu potravy a dává nám vizi o potenciálně možném ovlivnění našich hormonů přes vědomou kontrolu našeho jídelníčku.

XI. Literatura

1. Adam JA, Menheere PP, van Dielen FM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW. Decreased plasma orexin-A levels in obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002; 26(2):274-276.
2. Ahi S, Esmaeilzadeh M, Kayvanpour E, Sedaghat-Hamedani F, Samadanifard SH. A bulking agent may lead to adrenal insufficiency crisis: a case report. *Acta Med Iran* 2011; 49(10):688-689.
3. Antle MC, Silver R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci* 2005; 28(3):145-151.
4. Arafat AM, Kaczmarek P, Skrzypski M, Pruszyńska-Oszmalek E, Kolodziejcki P, Adamidou A, Ruhla S, Szczepankiewicz D, Sassek M, Billert M, Wiedenmann , Pfeiffer AF, Nowak KWm Strowski MZ. Glucagon regulates orexin A secretion in humans and rodents. *Diabetologia* 2014; 57(10): 2108-2116.
5. Arendt J. Melatonin: characteristics, concerns, and prospects. *J Biol Rhythms* 2005; 20(4):291-303.
6. Arnes L, Hill JT, Gross S, Magnuson MA, Sussel L. Ghrelin expression in the mouse pancreas defines a unique multipotent progenitor population. *PLoS ONE* 2012; 7(12): e52026.
7. Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Niiijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001; 120(2):337-345.
8. Aston-Jones G, Smith RJ, Moorman DE, Richardson KA. Role of lateral hypothalamic orexin neurons in reward processing and addiction. *Neuropharm* 2009; 56: 112–121.
9. Attarchi M, Darkhi H, Khodarahmian M, Dolati M, Kashanian M, Ghaffari M, Mirzamohammadi E, Mohammadi S. Characteristics of menstrual cycle in shift workers. *Glob J Health Sci* 2013; 5(3):163-172.

10. Axelrod J, Wurtman RJ, Snyder SH. Control of hydroxyindol O-methyltransferase activity in the rat pineal gland by environmental lighting. *J Biol Chem* 1965; 240:949-954.
11. Axelsson J, Ingre M, Akerstedt T, Holmbäck U. Effects of acutely displaced sleep on testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(8):4530-4535.
- Baccari BC. Orexin and gastrointestinal functions. *Curr Protein Pept Sci* 2010; 11(2): 148–155.
12. Bandín C, Scheer FA, Luque AJ, Ávila-Gandía V, Zamora S, Madrid JA, Gómez-Abellán P, Garaulet M. Meal timing affects glucose tolerance, substrate oxidation and circadian-related variables: A randomized, crossover trial. *Int J Obes (Lond)* 2015; 39(5):828-833.
13. Barreiro ML, Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol Cell Endocrinol* 2004; 226(1-2):1-9.
14. Bartness TJ, Goldman BD. Mammalian pineal melatonin: a clock for all seasons. *Experientia* 1989; 45(10):939-945.
15. Basu R, Singh RJ, Basu A, Chittilapilly EG, Johnson CM, Toffolo G, Cobelli C, Rizza RA. Splanchnic cortisol production occurs in humans: evidence for conversion of cortisone to cortisol via the 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-hsd) type 1 pathway. *Diabetes* 2004; 53(8):2051-2059.
16. Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM, Ramesh BS, Byrne DJ, MacColl GS, Keen JN, Bouloux PM, Mikhailidis DP, Bruckdorfer KR, Vanderpump MP, Srai KS. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. *J Biol Chem* 2003; 278(11):8877-8880.
17. Becker-André M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, André E, Missbach M, Saurat JH, Carlberg C. Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* 1994; 269(46):28531-28534.
17. Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 1978; 202(4368):631-633.

18. Benedict C, Hallschmid M, Scheibner J, Niemeyer D, Schultes B, Merl V, Fehm HL, Born J, Kern W. Gut protein uptake and mechanisms of meal-induced cortisol release. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(3):1692-1696.
19. Benloucif S, Burgess HJ, Klerman EB, Lewy AJ, Middleton B, Murphy PJ, Parry BL, Revell VL. Measuring melatonin in humans. *J Clin Sleep Med* 2008;4(1):66-69.
20. Bergiannaki JD, Soldatos CR, Paparrigopoulos TJ, Syrengeles M, Stefanis CN. Low and high melatonin excretors among healthy individuals. *J Pineal Res* 1995; 18(3):159-164.
21. Berson DM. Phototransduction in ganglion-cell photoreceptors. *Pflugers Arch* 2007; 454(5):849-855.
22. Borges-Silva CD, Takada J, Alonso-Vale MI, Peres SB, Fonseca-Alaniz MH, Andreotti S, Cipolla-Neto J, Pithon-Curi TC, Lima FB. Pinealectomy reduces hepatic and muscular glycogen content and attenuates aerobic power adaptability in trained rats. *J Pineal Res* 2007; 43(1):96-103.
23. Borgland SL, Ungless MA, Bonci A. Convergent actions of orexin/hypocretin and CRF on dopamine neurons: Emerging players in addiction. *Brain Res* 2010; 1314:139-144.
24. Broglio F, Gottero C, Benso A, Prodam F, Destefanis S, Gauna C, Maccario M, Deghenghi R, van der Lely AJ, Ghigo E. Effects of ghrelin on the insulin and glycemic responses to glucose, arginine, or free fatty acids load in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(9):4268-4272.
25. Bronský J, Nedvídková J, Zamrazilová H, Pechová M, Chada M, Kotaska K, Nevoral J, Průša R. Dynamic changes of orexin A and leptin in obese children during body weight reduction. *Physiol Res* 2007; 56(1):89-96.
26. Bubenik GA. Localization, physiological significance and possible clinical implication of gastrointestinal melatonin. *Biol Signals Recept* 2001; 10(6):350-366.
27. Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function and clinical relevance. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2336-2348.
28. Bubenik GA. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 2:33-35.

29. Bubenik GA, Ayles HL, Friendship RM, Brown GM, Ball RO. Relationship between melatonin levels in plasma and gastrointestinal tissues and the incidence and severity of gastric ulcers in pigs. *J Pineal Res* 1998; 24(1):62-66.
30. Bubenik GA, Ball, RO, Pang SF. The effect of food deprivation on brain and gastrointestinal tissue levels of tryptophan, serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, and melatonin. *J Pineal Res* 1992; 12: 115-128.
31. Bubenik GA, Hacker RR, Brown GM, Bartos L. Melatonin concentrations in the luminal fluid, mucosa, and muscularis of the bovine and porcine gastrointestinal tract. *J Pineal Res* 1999; 26(1):56-63.
32. Bubenik GA, Konturek SJ. Melatonin and aging: prospects for human treatment. *J Physiol Pharmacol* 2011; 62(1): 13-19.
33. Butenandt A, Guenther H, Turba F. On the primary metabolic action of testosterone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1960; 322:28-37.
34. Cardinali DP, Furio AM, Brusco LI. Clinical aspects of melatonin intervention in Alzheimer's disease progression. *Curr Neuropharmacol* 2010; 8(3):218-227.
35. Cason AM, Aston-Jones G. Attenuation of saccharin-seeking in rats by orexin/hypocretin receptor 1 antagonist. *Psychopharmacology* 2013; 228(3): 499-507.
36. Castañeda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschöp MH. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31(1):44-60.
37. Chabas D, Foulon C, Gonzalez J, Nasr M, Lyon-Caen O, Willer JC, Derenne JP, Arnulf I. Eating disorder and metabolism in narcoleptic patients. *Sleep* 2007; 30(10): 1267-1273.
38. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 1999; 98: 437-451.

39. Chen CT, Hwang LL, Chang JK, Dun NJ. Pressor effects of orexins injected intracisternally and to rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: 692–697.
40. Chen J, Xia Ch, Wang J, Jiang M, Zhang H, Zhang Ch, Zhu M, Shen L, Zhu D. The Effect of Orexin-A on Cardiac Dysfunction Mediated by NADPH Oxidase-Derived Superoxide Anion in Ventrolateral Medulla. *Plos One* 2013; 8(7): e69840.
41. Choi DL, Davis JF, Fitzgerald ME, Benoit SC. The role of orexin-A in food motivation, reward-based feeding behavior and food-induced neuronal activation in rats. *Neuroscience* 2010; 167: 11-20.
42. Clark CA, Gardiner J, McBurney MI, Anderson S, Weatherspoon LJ, Henry DN, Hord NG. Effects of breakfast meal composition on second meal metabolic responses in adults with Type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60(9):1122-1129.
43. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, and Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50: 1714-1719.
44. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, and Nakazato M. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 2000; 141: 4255-4261.
45. Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Niiijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123(4):1120-1128.
46. Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280(3):904-907.

47. De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson DE. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1998; 95: 322-327.
48. Dickmeis T. Glucocorticoids and the circadian clock. *J Endocrinol* 2009; 200(1):3-22.
49. Digby JE, Chen J, Tang JY, Lehnert H, Matthews RN, Randeve HS. Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects of orexin-A and orexin-B. *J Endocrinol* 2006; 191(1): 129-136.
50. Dubocovich ML, Cardinal DP, Delagrande P. Melatonin receptors. *IUPHAR Media London* 2000; 270-277.
51. Dunlap JC, Loros JJ. The neurospora circadian system. *J Biol Rhythms* 2004; 19(5):414-424.
52. Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR. The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol* 1999; 160: 7–12.
53. Ehrstrom M, Gustafsson T, Finn A, Kirchgessner AL, Gryback P, Jacobsson H, Hellstrom PM, Naslund E. Inhibitory effect of exogenous orexin A on gastric emptying, plasma leptin, and the distribution of orexin and orexin receptors in the gut and pancreas in man. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2370–2377.
54. Ekmekcioglu C. Melatonin receptors in humans: biological role and clinical relevance. *Biomed Pharmacother* 2006; 60(3):97-108.
55. Fourtillan JB, Brisson AM, Gobin P, Ingrand I, Decourt JP, Girault J. Bioavailability of melatonin in humans after day-time administration of D(7) melatonin. *Biopharm Drug Dispos* 2000; 21(1):15-22.
56. Engelstoft MS, Park WM, Sakata I, Kristensen LV, Husted AS, Osborne-Lawrence S, Piper PK, Walker AK, Pedersen MH, Nøhr MK, Pan J, Sinz CJ, Carrington PE, Akiyama TE, Jones RM, Tang C, Ahmed K, Offermanns S, Egerod KL, Zigman JM, Schwartz TW. Seven transmembrane G protein-coupled receptor repertoire of gastric ghrelin cells. *Mol Metab* 2013; 2(4):376-392.

57. Fahrenkrug J, Hannibal J, Georg B. Diurnal rhythmicity of the canonical clock genes *Per1*, *Per2* and *Bmal1* in the rat adrenal gland is unaltered after hypophysectomy. *J Neuroendocrinol* 2008; 20(3):323-329.
58. Filicori M, Santoro N, Merriam GR, Crowley WF Jr. Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62(6):1136-1144.
59. Follenius M, Brandenberger G, Hietter B. Diurnal cortisol peaks and their relationships to meals. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 55(4):757-761.
60. Fries E, Dettenborn L, Kirschbaum C. The cortisol awakening response (CAR): facts and future directions. *Int J Psychophysiol* 2009; 72(1):67-73.
61. Fukumoto K, Nakahara K, Katayama T, Miyazatao M, Kangawa K, Murakami N. Synergistic action of gastrin and ghrelin on gastric acid secretion in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 374 (1):60-63.
62. Funato H, Tsai AL, Willie JT, Kisanuki Y, Williams SC, Sakurai T. Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity. *Cell Metab* 2009; 9: 64-76.
63. Furudono Y, Ando C, Yamamoto C, Kobashi M, Yamamoto T. Involvement of specific orexigenic neuropeptides in sweetener-induced overconsumption in rats. *Behav Brain Res* 2006; 175(2): 241-248.
64. Godson C, Reppert SM. The *Mel1a* melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinol* 1997; 138: 397-404.
65. Grabauskas G, Moises HC. Gastrointestinal-projecting neurones in the dorsal motor nucleus of the vagus exhibit direct and viscerotopically organized sensitivity to orexin. *J Physiol.* 2003; 549: 37–56.
66. Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 48(1):23-29.
67. Hakansson M, de Lecea L, Sutcliffe JG, Yanagisawa M, Meister B. Leptin receptor- and STAT3-immunoreactivities in hypocretin/orexin neurones of the lateral hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 1999; 11: 653-663.

68. Hall JE, Sullivan JP, Richardson GS. Brief wake episodes modulate sleep-inhibited luteinizing hormone secretion in the early follicular phase. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(4):2050-2055.
69. Hankins MW, Peirson SN, Foster RG. Melanopsin: an exciting photopigment. *Trends Neurosci* 2008; 31(1):27-36.
70. Hastings MH, Herzog ED. Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. *J Biol Rhythms* 2004; 19(5):400-413.
71. Hattori A, Migita H, Iigo M, Itoh M, Yamamoto K, Ohtani-Kaneko R, Hara M, Suzuki T, Reiter RJ. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 35(3):627-634.
72. Haynes AC, Chapman H, Moore GB, Cawthorne MA, Tadayyon M. Anorectic, thermogenic, anti-obesity activity of a selective orexin-1 in ob/ob mice. *Regul Pept* 2002; 104: 153-159.
73. Hennebert O, Pernelle C, Ferroud C, Morfin R. 7alpha- and 7beta-hydroxy-epiandrosterone as substrates and inhibitors for the human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 105(1-5): 159-165.
74. Herrmann C, Göke R, Richter G, Fehm. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion*. 56(2):117-126, 1995.
75. Hill M, Pařízek A, Cibula D, Kancheva R, Jirásek JE, Jirkovská M, Velíková M, Kubátová J, Klímková M, Pašková A, Žižka Z, Kancheva L, Kazihnitková H, Zamrazilová L, Stárka L. Steroid metabolome in fetal and maternal body fluids in human late pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 122: 114-132.
76. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, and Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 909-913.
77. Howard AD. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 48(1):23-29.

78. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Pares PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996;273(5277):974-977.
79. Howland BE. The influence of feed restriction and subsequent re-feeding on gonadotrophin secretion and serum testosterone levels in male rats. *J Reprod Fertil* 1975; 44(3):429-436.
80. Huether G. Melatonin synthesis in the gastrointestinal tract and the impact of nutritional factors on circulating melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 719: 146-158.
81. Illnerová H, Vaněček J. Pineal rhythm in N-acetyltransferase activity in rats under different artificial photoperiods and in natural daylight in the course of a year. *Neuroendocrinology* 1980; 31(5):321-326.
82. Inutsuka A, Inui A, Tabuchi S, Tsunematsu T, Lazarus M, Yamanaka A. Concurrent and robust regulation of feeding behaviors and metabolism by orexin neurons. *Neuropharmacology* 2014; 85: 451-460.
83. Ishida A, Mutoh T, Ueyama T, Bando H, Masubuchi S, Nakahara D, Tsujimoto G, Okamura H. Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metab* 2005; 2(5):297-307.
84. Ischii Y, Blundell JE, Halford JC, Upton N, Porter R, Johns A. Satiety enhancement by selective orexin-1 receptor antagonist SB-334867: influence of test context and profile comparison with CCK-8S. *Behav. Brain Res* 2005; 160: 11-24.
85. Jacob S, Poeggeler B, Weishaupt JH, Sirén AL, Hardeland R, Bähr M, Ehrenreich H. Melatonin as a candidate compound for neuroprotection in amyotrophic lateral sclerosis: High tolerability of daily oral melatonin administration in ALS patients. *J Pineal Res* 2002; 33: 186-187.
86. Kapen S, Boyar R, Hellman L, Weitzman ED. The relationship of

luteinizing hormone secretion to sleep in women during the early follicular phase: effects of sleep reversal and a prolonged three-hour sleep-wake schedule. *J Clin Endocrinol Metab* 1976; 42(6):1031-1340.

87. Karasek M. Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp Gerontol* 2004; 39(11-12):1723-1729.

88. Karasek M, Winczyk K. Melatonin in humans. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57(5): 19-39.

89. Kasimay O, Cakir B, Devseren E, Yegen BC. Exogenous melatonin delays gastric emptying rate in rats: role of CCK2 and 5-HT3 receptors. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56(4):543-553.

90. Kennaway DJ, Stamp GE, Goble FC. Development of melatonin production in infants and the impact of prematurity. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75(2):367-369.

91. Khoshdel A, Kheiri S, Nasiri J, Tehran HA, Heidarian E. The effect of Ramadan fasting on serum leptin, neuropeptide Y and insulin in pregnant women. *Med J Islam Repub Iran* 2014; 28:92.

92. Klingman KM, Marsh EE, Klerman EB, Anderson EJ, Hall JE. Absence of circadian rhythms of gonadotropin secretion in women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 May;96(5):1456-1461.

93. Kojima M, Hosoda H, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa H. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999; 402(6762):656-660.

94. Kopin IJ, Pare CM, Axelrod J, Weissbach H. The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem* 1961; 236:3072-3075.

95. Korczynski W, Ceregrzyn M, Kato I, Wolinski J, Zabielski R. The effect of orexins on intestinal motility in vitro in fed and fasted rats. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 43–54.

96. Kršek M, Rosická M, Haluzík M, Papežová H, Křížová J, Justová V, Lacinová Z, Jarkovská Z. Změny sérových koncentrací ghrelinu a jejich vztah k IGF-I, jeho vazebným proteinům a leptinu u pacientek s mentální anorexií. *Vnitř Lek* 2002; 48: 948-952.

97. Kunii K, Yamanaka A, Nambu T, Matsuzaki I, Goto K, Sakurai T. Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res* 1999; 842(1): 256-261.
98. Lai KC, Cheng CH, Leung PS. The ghrelin system in acinar cells: localization, expression, and regulation in the exocrine pancreas. *Pancreas* 2007; 35(3):1-8.
99. Lane EA, Moss HB. Pharmacokinetics of melatonin in man: first pass hepatic metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61(6):1214-1216.
100. Larsson KP, Peltonen HM, Bart G, Louhiyuri LM, Penttonen A, Antikainen M, Kukkonen JP, Akerman KE. Orexin-A-induced Ca²⁺ entry: evidence for involvement of TRPC channels and protein kinase C regulation. *J Biol Chem* 2005; 280: 1771–1781.
101. Lavie P. Melatonin: role in gating nocturnal rise in sleep propensity. *J Biol Rhythms* 1997; 12: 657-665.
102. Lawson CC, Whelan EA, Lividoti Hibert EN, Spiegelman D, Schernhammer ES, Rich-Edwards JW. Rotating shift work and menstrual cycle characteristics. *Epidemiology* 2011; 22(3):305-312.
103. Lee MG, Hassani OK, Jones BE: Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. *J Neurosci* 2005, 25: 6716–6720.
104. Lecocq FR, Mebane D, Madson LL. The acute effect of hydrocortisone on hepatic glucose output and peripheral glucose utilization. *J Clin Invest* 1964; 43:237-246.
105. Lerner AB, Case LD, Lee TH, Mori V. Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587.
106. Levine S, Lupien S, Lyons MJ, Hauger R, Xian H, Franz CE, Kremen WS. Genetic and environmental effects on diurnal dehydroepiandrosterone sulfate concentrations in middle-aged men. *Psychoneuroendocrinology* 2011; 36(10): 1441–1452.
107. Lightman SL, Wiles CC, Atkinson HC, Henley DE, Russell GM, Leendertz JA, McKenna MA, Spiga F, Wood SA, Conway-Campbell BL. The significance of

- glucocorticoid pulsatility. *Eur J Pharmacol* 2008; 583(2-3):255-262.
108. Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 1999; 98: 365-376.
109. Liu XH, Morris R, Spiller D, White M, Williams G. Orexin-A preferentially excites glucose-sensitive neurons in the lateral hypothalamus of rats in vitro. *Diabetes* 2001; 50: 2431–2437.
110. Luboshitzky R, Herer P, Levi M, Shen-Orr Z, Lavie P. Relationship between rapid eye movement sleep and testosterone secretion in normal men. *J Androl* 1999; 20(6):731-737.
111. Luboshitzky R, Zabari Z, Shen-Orr Z, Herer P, Lavie P. Disruption of the nocturnal testosterone rhythm by sleep fragmentation in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(3):1134-1139.
112. Lucchelli A, Santagostino-Barbone MG, Tonini M. Investigation into the contractile response of melatonin in the guinea-pig isolated proximal colon: the role of 5-HT₄ and melatonin receptors. *Br J Pharmacol* 1997; 121(8):1775-1781.
113. Ma J, Svetnik V, Snyder E, Lines C, Roth T, Herring WJ. Electroencephalographic power spectral density profile of the orexin receptor antagonist suvorexant in patients with primary insomnia and healthy subjects. *Sleep* 2014; 37(10): 1609-1619.
114. Makovey J, Naganathan V, Seibel M, Sambrook P. Gender differences in plasma ghrelin and its relations to body composition and bone - an opposite-sex twin study. *Clin Endocrinol* 2007; 66(4):530-537.
115. Margheri M, Pacini N, Tani A, Nosi D, Squecco R, Dama A., Masala E, Francini F, Zecchi-Orlandini S, Formigli L. Combined effects of melatonin and all-trans retinoic acid and somatostatin on breast cancer cell proliferation and death: Molecular basis for the anticancer effect of these molecules. *Eur J Pharmacol* 2012; 681: 34–43.
116. Martin MT, Azpiroz F, Malagelada JR. Melatonin and the gastrointestinal tract. *Therapie* 1998; 53(5):453-458.

117. Marzullo P, Caumo A, Savia G, Verti B, Walker GE, Maestrini S, Tagliaferri A, Di Blasio AM, Liuzzi A. Predictors of postabsorptive ghrelin secretion after intake of different macronutrients. *Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(10):4124-4130.
118. Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, and Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 905-908.
119. Matsuki T, Nomiya M, Takahira H, Hirashima N, Kunita S, Takahashi A, Yagami K, Kilduff TS, Bettler B, Yanagisawa M, Sakurai T. Selective loss of GABA(B) receptors in orexin producing-neurons results in disrupted sleep/wakefulness architecture. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(11): 4459-4464.
120. Maywood ES, O'Neill JS, Reddy AB, Chesham JE, Prosser HM, Kyriacou CP, Godinho SI, Nolan PM, Hastings MH. Genetic and molecular analysis of the central and peripheral circadian clockwork of mice. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2007; 72:85-94.
121. Mazzucchelli C, Pannacci M, Nonno R, Lucini V, Fraschini F, Stankov BM. The melatonin receptor in the human brain: cloning experiments and distribution studies. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 39(1-2):117-126.
122. Meloun M, Hill M, Militký J, Kupka AK. Transformation in the PC-aided biochemical data analysis. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 553–559.
123. Meloun M, Militký J, Hill M, Brereton RG. Crucial problems in regression modelling and their solutions. *Analyst* 2002; 127: 433–450.
124. Meloun M, Hill M, Militký J, Vrbíková J, Stanická S, Škrha J. New methodology of influential point detection in regression model building for the prediction of metabolic clearance rate of glucose. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 311–322.
125. Messina G, Dalia C, Tafuri D, Monda V, Palmieri F, Dato A, Russo A, De Blasio S, Messian A, De Luca V, Chieffi S, Monnda M. Orexin-A controls sympathetic activity and eating behavior. *Front. in Phys* 2014; 997(5): 1-7.

126. Mignot E. Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology* 1998; 5(Suppl 1): 16-22.
127. Mortola JF, Laughlin GA, Yen SS. A circadian rhythm of serum follicle-stimulating hormone in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75(3):861-864.
128. Münch M, Linhart F, Borisuit A, Jaeggi SM, Scartezzini JL. Effects of prior light exposure on early evening performance, subjective sleepiness, and hormonal secretion. *Behav Neurosci* 2012; 126(1):196-203.
129. Nakahara T, Kojima S, Tanaka M, Yasuhara D, Harada T, Sagiya K, Muranaga T, Nagai N, Nakazato M, Nozoe S, Naruo T, Inui A. Incomplete restoration of the secretion of ghrelin and PYY compared to insulin after food ingestion following weight gain in anorexia nervosa. *J Psychiatr Res* 2007; 41(10):814-820.
130. Nakamura T, Uramura K, Nambu Y, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res* 2000; 873(1): 181-187.
131. Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409(6817):194-198.
132. Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 2000; 355(9197): 39-40.
133. Neaves, W. B., Johnson, L., Porter, J. C., Parker, C. R. Jr., Petty, C. S. Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 1984; 59(4), 756–763.
134. Nosjean O, Ferro M, Coge F. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *Biol Chem* 2000; 275: 31311-31317.
135. Oster H, Damerow S, Kiessling S, Jakubcakova V, Abraham D, Tian J, Hoffmann MW, Eichele G. The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metab* 2006; 4(2):163-173.
136. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Poegeller B, Hardeland

- R. Melatonin, nature's most versatile biological signal? *FBBS J* 2006; 273: 2813-2838.
137. Parise EM, Lilly N, Kay K, Dossat AM, Seth R, Overton JM. Evidence for the role of hindbrain orexin-1 receptors in the control of meal size. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 2011; 301: 1692-1699.
138. Pentney PT, Bubenik GA. Melatonin reduces the severity of dextran-induced colitis in mice. *J Pineal Res* 1995; 19(1):31-39.
139. Perez-Leighton C, Boland K, Teske JA, Billington C, Kotz CM. Behavioral responses to orexin, orexin receptor gene expression, and spontaneous physical activity contribute to individual sensitivity to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 303(7): 865–874.
140. Petit, Lacroix I, Coppet P, Strosberg AD, Jockers R. Differential signaling of human Mel1a and Mel1b melatonin receptors through the cyclic guanosin 3'-5'-monophosphate pathway. *Biochem Pharmacol* 1999; 58: 633-639.
141. Peuhkuri K, Sihvola N, Korpela R. Dietary factors and fluctuating levels of melatonin. *Food Nutr Res* 2012; 56.
142. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 1998; 18: 9996–10015.
143. Pintor J, Martin L, Pelaez T, Hoyle CH, Peral A. Involvement of melatonin MT(3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur J Pharmacol.* 2001; 416(3):251-254.
144. Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nešimalová S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M, Kucherlapati M, Fan J, Maki R, Lammers GJ, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S, Mignot E. A mutation in early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 2000; 6: 991-997.
145. Prom-Wormley EC, York TP, Jacobson KC, Eaves LJ, Mendoza SP, Hellhammer D, Maninger N, Levine S, Lupien S, Lyons MJ, Hauger R, Xian H, Franz CE, Kremen WS. Genetic and environmental effects on diurnal

- dehydroepiandrosterone sulfate concentrations in middle-aged men. *Psychoneuroendocrinology* 2011; 36(10): 1441–1452.
146. Quastel MR, Rahamimoff R. Effect of melatonin on spontaneous contractions and response to 5-hydroxytryptamine of rat isolated duodenum. *Br J Pharmacol Chemother* 1965; 24:455-461.
147. Reiter RJ. Melatonin: clinical relevance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2003; 17(2):273-285.
148. Reiter RJ, Garcia JJ, Pie J. Oxidative toxicity in models of neurodegeneration: response to melatonin. *Restor Neurol Neurosci* 1998; 12: 135-142.
149. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt Sa, Gusella JF. Molecular characterization of second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8734-8738.
150. Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:647-676.
151. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418(6901): 935-941.
152. Reynolds RM, Walker BR, Syddall HE, Whorwood CB, Wood PJ, Phillips DI. Elevated plasma cortisol in glucose-intolerant men: differences in responses to glucose and habituation to venepuncture. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(3):1149-1153.
153. Riemann D, Klein T, Rodenbeck A. Nocturnal melatonin and cortisol secretion in primary insomnia. *Psychiatry Res* 2002; 13: 17-27.
154. Roecker AJ, Reger TS, Mattern MC, Mercer SP, Bergman JM, Schreier JD, Cube RV, Cox CD, Li D, Lemaire W, Bruno JG, Harrell CM, Garson SL, Gottern AL, Fox S, Stevens J, Tannanbaum PL, Prueksaritanont T, Cabalu TD, Cui D, Stellabott J, Hartman GD, Young SD, Winrow CJ, Renger JJ, Coleman PJ. Discovery of MK-3697: A selective orexin 2 receptor antagonist (2-SORA) for the treatment of insomnia. *Bioorg Med Chem Lett* 2014; 24(20): 4884-4890.
155. Rossmanith WG, Lauritzen C. The luteinizing hormone pulsatile

secretion: diurnal excursions in normally cycling and postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol* 1991; 5(4):249-265.

156. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H. Orexin and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G-protein coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573-585.

157. Sakurai T. Role of orexin/hypocretin in regulation of sleep/wakefulness and energy homeostasis. *Sleep Med Rev* 2005; 9(4): 231-241.

158. Samson WK, Gosnell B, Chang JK, Resch ZT, Murphy TC. Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain Res* 1999; 831: 248–253.
Sánchez-Barceló EJ, Mediavilla MD, Reiter RJ. Clinical uses of melatonin in pediatrics. *Int J Pediatr* 2011: 892624.

159. Saper CB, Lu J, Chou TC, Gooley J. The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci* 2005; 28(3):152-157.

160. Scheer FA, Van Montfrans GA, van Someren EJ, Mairuhu G, Buijs RM. Hypertension. Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension 2004; 43(2):192-197.

161. Schmid SM, Hallschmid M, Jauch-Chara K, Born J, Schultes B. A single night of sleep deprivation increases ghrelin levels and feelings of hunger in normal-weight healthy men. *J Sleep Res* 2008; 17(3):331-334.

162. Sedláčková B, Dušátková L, Zamrazilová H, Matucha P, Bičíková M, Stárka L. 7-oxygenated derivatives of dehydroepiandrosterone and obesity. *Prague Med Rep* 2012; 113(2): 147–155.

163. Sedláčková D, Dostálová I, Hainer V, Beranová L, Kvasničková H, Hill M, Haluzík M, Nedvídková J. Simultaneous decrease of plasma obestatin and ghrelin levels after a high-carbohydrate breakfast in healthy women. *Physiol Res* 2008; 57 Suppl 1:29-37.

164. Selmaoui B, Touitou Y. Reproducibility of the circadian rhythms of serum cortisol and melatonin in healthy subjects: a study of three different 24-h cycles over six weeks. *Life Sci* 2003; 73(26):3339-3349.

165. Seim I, Collet C, Herington AC, Chopin LK. Revised genomic structure of

- the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts. *BMC Genomics* 2007; 8:298.
166. Sherman H, Gutman R, Chapnik N, Meylan J, le Coutre J, Froy O. Caffeine alters circadian rhythms and expression of disease and metabolic markers. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43(5):829-838.
167. Shiraishi T, Oomura Y, Sasaki K,Wayner MJ. Effects of leptin and orexin-A on food intake and feeding related hypothalamic neurons. *Physiol.Behav* 2000; 71: 251–261.
168. Sierksma A, Sarkola T, Eriksson CJ, van der Gaag MS, Grobbee DE, Hendriks HF. Effect of moderate alcohol consumption on plasma dehydroepiandrosterone sulfate, testosterone, and estradiol levels in middle-aged men and postmenopausal women: a diet-controlled intervention study. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28(5):780-785.
169. Silver R, LeSauter J, Tresco PA, Lehman MN. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature* 1996; 382(6594):810-13.
170. Šimůnková K, Kršek M. Ultradiánní rytmus glukokortikoidů: Nové diagnostické a léčebné možnosti poruch osy hypotalamus – hypofýza – nadledviny? Přehled poznatků vyplývajících ze studií skupiny profesora Lightmana. *DMEV* 2014; 17(2): 76-84.
171. Slaugenhaupt SA, Roca AL, Liebert CB, Altherr MR, Gusella JF, Reppert SM. Mapping of the gene for the Mel 1a melatonin receptor to human chromosome 4 (MTNR1A) and mouse chromosome 8 (Mtnr1a). *Genomics* 1995; 27: 355-357.
172. Soules MR, Steiner RA, Cohen NL, Bremner WJ, Clifton DK. Nocturnal slowing of pulsatile luteinizing hormone secretion in women during the follicular phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61(1):43-49.
173. Spanagel R, Rosenwasser AM, Schumann G, Sarkar DK. Alcohol consumption and the body's biological clock. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29(8):1550-1557.

174. Spratt DI, O'Dea LS, Schoenfeld D, Butler J, Rao PN, Crowley WF Jr. Neuroendocrine-gonadal axis in men: frequent sampling of LH, FSH, and testosterone. *Am J Physiol* 1988; 254:658-666.
175. Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Behav Brain Funct* 2006; 2:15.
176. Stanley S, Pinto S, Segal J, Pérez CA, Viale A, DeFalco J, Cai X, Heisler LK, Fiedman JM. Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(15): 7024-7029.
177. Stárka L, Dusková M, Rácz B, Simůnková K, Hill M, Kancheva R. Melatonin negatively correlates with C-peptide after food intake. *Physiol Res* 2008; 57 Suppl 1:187-192.
178. Suzuki K, Jayasena CN, Bloom SR. Obesity and appetite control. *Exp. Diabetes Res* 2012; 824305.
179. Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(12):4908-4911.
180. Takai T, Takaya T, Nakano M, Akutsu H, Nakagawa A, Aimoto S, Nagai K, Ikegami T. Orexin-A is composed of a highly conserved C-terminal and a specific, hydrophilic N-terminal region, revealing the structural basis of specific recognition by the orexin-1 receptor. *J Pept Sci* 2006; 12: 443–454.
181. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Korkmaz A, Ma S, Rosales-Corral S, Reiter RJ. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *J Exp Bot* 2012;63(2):577-97.
182. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Hanes MA, Farley NJ. High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci.* 1999 Oct 29;65(23):2523-9.
183. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a neverending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007; 42: 28–42.

143. Tanaka M, Naruo T, Muranaga T, Yasuhara D, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S. Increased fasting plasma ghrelin levels in patients with bulimia nervosa. *Eur J Endocrinol* 2002; 146(6):1-3.
185. Tschop M, Wawarta R, Riepl RL, Friedrich S, Bidlingmaier M, Landgraf R, and Folwaczny C. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J Endocrinol Invest* 2001; 24: 19-21.
186. van Coevorden A, Mockel J, Laurent E, Kerkhofs M, L'Hermite-Balériaux M, Decoster C, Nève P, Van Cauter E. Neuroendocrine rhythms and sleep in aging men. *Am J Physiol* 1991; 260:651-661.
176. Vaneček J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* 1998; 78(3):687-721.
188. Venner A, Karnani MM, Gonzalez JA, Jensen LT, Fugger L, Burdakov D. Orexin neurons as conditional glucosensors: paradoxical regulation of sugarsensing by intracellular fuels. *J. Physiol* 2011; 589: 5701–5708.
189. Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M. Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J Histochem Cytochem* 2002; 50(8):1013-1021.
190. Wake DJ, Homer NZ, Andrew R, Walker BR. Acute in vivo regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity by insulin and intralipid infusions in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(11):4682-4688.
191. Walker JJ, Spiga F, Waite E, Zhao Z, Kershaw Y, Terry JR, Lightman SL. The origin of glucocorticoid hormone oscillations. *PLoS Biol* 2012; 10(6):e1001341.
192. Weinhold SL, Seek-Hirschner M, Nowak A, Hallschmidt M, Groeder R, Baier PC. The effect of intranasal orexin-A (hypocretin-1) on sleep, wakefulness and attention in narcolepsy with cataplexy. *Behav Brain Res* 2014; 262: 8-13.
193. Weiss EP, Villareal DT, Fontana L, Han DH, Holloszy JO. Dehydroepiandrosterone (DHEA) replacement decreases insulin resistance

and lowers inflammatory cytokines in aging humans. *Aging* (Albany NY) 2011; 3(5):533-542.

194. Wiedmer P, Nogueiras R, Broglio F, D'Alessio D, Tschöp MH. Ghrelin, obesity and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007; 3(10): 705-712.

195. Weitzman ED, Fukushima D, Nogeire C, Roffwarg H, Gallagher TF, Hellman L. Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 33(1):14-22.

196. Williams RH, Jensen LT, Verkhatsky A, Fugger L, Burdakov D. Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(25):10685-10690.

197. Winczyk K, Pawlikowski M, Guerrero JM, Karasek M. Possible involvement of the nuclear RZR/ROR-alpha receptor in the antitumor action of melatonin on murine Colon 38 cancer. *Tumour Biol* 2002; 23(5):298-302.

198. Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, Yellon SM, Wilkinson CW, Matsumoto AM, Rasmussen DD. Daily melatonin administration to middle-aged male rats suppresses body weight, intraabdominal adiposity, and plasma leptin and insulin independent of food intake and total body fat. *Endocrinology* 2000; 141(2):487-97.

199. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(12):5992.

200. Yabuki A, Taharaguchi S, Ichii O, Kojima M, Nishi Y, Mifune H, Kamimura R, Matsumoto M, Suzuki S. Immunohistochemical localization of ghrelin in rodent kidneys. *Histochem Cell Biol* 2006; 126(2):231-238.

201. Yakabi K, Ro S, Onouhi T, Tanaka T, Ohno S, Miura S, Johno Y, Takayama K. Histamine mediates the stimulatory action of ghrelin on acid secretion in rat stomach. *Dig Dis Sci* 2006; 51(8):1313-1321.

202. Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai M. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 2003; 38: 701-713.

203. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 2008; 132(3):387-396.
204. Yi CX, Serlie MJ, Ackermans MT, Foppen E, Buijs RM, Sauerwein HP, Fliers E, Kalsbeek A. A major role for perifornical orexin neurons in the control of glucose metabolism in rats. *Diabetes* 2009; 58(9): 1998-2005.
205. Zhang S, Blache D, Vercoe PE, Adam CL, Blackberry MA, Findlay PA, Eidne KA, Martin GB. Expression of orexin receptors in the brain and peripheral tissues of the male sheep. *Regul Pept* 2005; 124: 81-87.
206. Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A, Yada T, Shibahara M, Abe Y, Sakurai T, Goto K. Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussin toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussin toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J Pharmacol Sci* 2003; 92(3): 259-266.
207. Zylka MJ, Shearman LP, Weaver DR, Reppert SM. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* 1998; 20(6):1103-1110.

XII. Vlastní práce

a) impaktované se vztahem k tématu

- Rácz B, Dušková M, Vondra K, Šrámková M, Stárka L. Daily profiles of steroid hormones and their metabolites related to food intake. Phys Res 2015; přijat k publikaci. **IF=1.487**

- Stárka L, Dušková M, Rácz B, Šimůnková K, Hill M., Kancheva R: Melatonin negatively correlates with c-peptide after food intake., Physiol Res 2008; 57(1): 187-192. **IF= 2,093**

b) neimpaktované se vztahem k tématu

- Stárka L, Rácz B, Šrámková M, Hill M, Dušková M. Daily profiles of dehydroepiandrosterone and its hydroxylated metabolites with respect to food intake. Prague Med Rep 2015; 116(1):40-48.

c) impaktované bez vztahu k tématu

- Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Velíková M, Kubátová J, Kancheva L, Kazihnitková H, Hruškovičová H, Pospíšilová H, Rácz B, Salátová M, Cirmanová V, Králíková E, Stárka L, Pařízek A: Chronic cigarette smoking alters circulating sex hormones and neuroactive steroids in premenopausal women. Phys Res 2012; 61(1):97-111. **IF= 1,646**

- Hruškovičová H, Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Pospíšilová M, Rácz B, Králíková K, Vondra K, Stárka L: Effects of Smoking Cessation on Hormonal Levels in Men, Physiol Res 2013;62(1):67-73. **IF=1,555**

- Jandíková H, Dušková M, Šimůnková K, Rácz B, Hill M, Králíková E, Vondra K, Stárka L: The steroid spectrum during and after quitting smoking in men . Phys Res 2015; přijat k publikaci. **IF=1.487**

d) neimpaktované bez vztahu k tématu

- Rácz B, Vondra K, Stárka L: Apelin, DMEV 2007; 1: 26-29.
- Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Velíková M, Kubátová J, Hruškovičová H, Pospíšilová H, Rácz B, Cirmanová V, Králíková E, Stárka L: Cigarette Smoking and Progesterone and Androgen Metabolites in Premenopausal Women, Horm Mol Biol Clin Invest 2011; 6(3):259-264.
- Jandíková H, Dušková M, Šimůnková K, Rácz B, Hill M, Pospíšilová H, Kmeťová A, Králíková E, Vondra K, Stárka L. How smoking cessation influence hormonal levels in postmenopausal women? Prague Med Rep 2014; 115(1-2):60-66.

e) abstrakta se vztahem k tématu

Autor posterového sdělení:

- Rácz B, Vondra K, Dušková M, Šimůnková K, Nedvídková J, Hill M, Stárka L. Monitorace hladiny melatoninu ve vztahu k příjmu potravy v průběhu dne. Endokrinologické dny s mezinárodní účastí. Štrbské Pleso, Slovenská republika, 2008.
- Rácz B, Vondra K, Dušková M, Šimůnková K, Nedvídková J, Hill M, Stárka L. Food as one of factors influencing daytime melatonin levels. Central European Congress on Obesity: from nutrition to metabolic syndrome. Karlovy Vary, 2008.
- Rácz B, Vondra K, Dušková M, Vondra K, Šimůnková K, Nedvídková J, Sedlačková d, Hill M, Stárka L. Fluctuation of orexin, ghrelin and melatonin levels during daytime. European Congress of Endocrinology. Berlin, 2008.

- Rácz B, Vondra K, Dušková M, Šimůnková K, Nedvídková J, Hill M, Stárka. Variation of daytime melatonin levels. European Congress of Endocrinology. Istanbul, 2009.

Spoluautor posterového sdělení:

Jandíková H, Rácz B, Dušková M, Hill M, Vondra K, Stárka L. Changes of ghrelin and melatonin based on food intake. 7th International Conference on Advanced Technologies & Treatments for Diabetes. Vídeň

Dušková M, Rácz B, Šrámková M, Hill M, Stárka L. Influence of food on daily profiles of steroids. European Congress of Endocrinology. Dublin, 2015.

Šrámková M, Dušková M, Rácz B, Hill M, Stárka L. DHEA and its metabolites - daily profile. European Congress of Endocrinology. Dublin, 2015.

Spoluautor ústního sdělení:

Dušková M, Rácz B, Hill M, Stárka L. Vliv příjmu potravy na denní profil steroidů. Imunoanalýza, Lubochňa, 2015.

f) abstrakta bez vztahu k tématu

Autor ústního sdělení:

Rácz B, Vondra K, Stárka L. Apelin. Špindlerův Mlýn, 2008.

XIII. Seznam příloh

I. Rácz B, Dušková M, Vondra K, Šrámková M, Stárka L. Daily profiles of steroid hormones and their metabolites related to food intake. Phys Res 2015; přijat k publikaci.

II. Stárka L, Dušková M, Rácz B, Šimůnková K, Hill M., Kancheva R: Melatonin negatively correlates with c-peptide after food intake., Physiol Res 2008; 57(1): 187-192.

III. Stárka L, Rácz B, Šrámková M, Hill M, Dušková M. Daily profiles of dehydroepiandrosterone and its hydroxylated metabolites with respect to food intake. Prague Med Rep 2015; 116(1):40-48.

**Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta
Kateřinská 32, Praha 2**

Prohlášení zájemce o nahlédnutí

do závěrečné práce absolventa studijního programu

uskutečňovaného na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Praze

Jsem si vědom/a, že závěrečná práce je autorským dílem a že informace získané nahlédnutím do zpřístupněné závěrečné práce nemohou být použity k výdělečným účelům ani nemohou být vydávány za studijní, vědeckou nebo jinou tvůrčí činnost jiné osoby než autora.

Byl/a jsem seznámena se skutečností, že si mohu pořizovat výpisy, opisy nebo kopie závěrečné práce, jsem však povinen/a s nimi nakládat jako s autorským dílem a zachovávat pravidla uvedená v předchozím odstavci.

Příjmení, jméno (hůlkovým písmem)	Číslo dokladu totožnosti vypůjčitele (např. OP, cestovní pas)	Signatura závěrečné práce	Datum	Podpis