

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA  
V NITRE**

**FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH  
ZDROJOV**

**2122637**

**VPLYV GENOTYPU LEPTÍNU NA NUTRIČNÝ STAV  
ORGANIZMU ČLOVEKA**

**2011**

**Bc. Milada Rakická**

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA  
V NITRE  
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH  
ZDROJOV**

**VPLYV GENOTYPU LEPTÍNU NA NUTRIČNÝ STAV ORGANIZMU  
ČLOVEKA**

**Diplomová práca**

Študijný program: 4188800 Výživa ľudí  
Študijný odbor: 6.1.12 Výživa  
Pracovisko: Katedra výživy zvierat  
Vedúci záverečnej práce: doc. Ing. Anna Trakovická, CSc.

**Nitra 2011**

**Bc. Milada Rakická**

## **ČESTNÉ VYHLÁSENIE**

Podpísaná Bc. Milada Rakická vyhlasujem, že som diplomovú prácu na tému „ Vplyv genotypu leptínu na nutričný stav organizmu človeka“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak hore uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Galante 18. apríla 2011

.....

## **POĎAKOVANIE**

Touto cestou vyslovujem poďakovanie vedúcej diplomovej práce, pani doc. Anne Trakovickej, CSc. za pomoc, odborné vedenie, cenné rady a pripomienky pri vypracovávaní diplomovej práce.

Taktiež by som chcela poďakovať Ing. Zuzane Lieskovskej, za pomoc pri vypracovávaní diplomovej práce.

## Abstrakt

Cieľom práce bolo sledovanie genetického polymorfizmu génu príjmu potravy, leptínu a jeho vplyvu na nutričný stav organizmu hodnoteného na základe nutričných parametrov cholesterolu, glukózy a BMI.

Sledovanie prebiehalo na náhodne vybranej skupine mužov a žien, ktorí spolu tvorili skupinu s celkovým počtom 24. Pre amplifikáciu špecifických fragmentov *LEP* boli použité oligonukleotidové primery *LEP* FOR: 5' ATG CGC TGT GGA CCC CTG TAT 3' a *LEP* REV: 5' TGG TGT CAT CCT GGA CCT TCC 3'. Na metódu PCR-RFLP sme použili reštrikčný enzým *HhaI*. Pomocou tejto metódy sme potvrdili polymorfizmus génu *LEP* (*HhaI*), pričom sme zistili 3 kombinácie genotypov: AA (242bp), AC (242, 181 a 61 bp) a CC (181 a 61 bp). V ďalšej časti práce sme hodnotili asociácie týchto troch genotypov na tri parametre súvisiace s výživou: cholesterol, glukózu a BMI. Vplyv jednotlivých genotypov sme vyhodnotili ukazovateľmi základnej štatistiky, ale taktiež aj pomocou štatistickej metódy t-testu. Na základe výsledkov získaných štatistickými metódami môžeme konštatovať, že najvyššiu tendenciu k zvyšovaniu sledovaných parametrov vykazoval homozygotný genotyp CC avšak aj u genotypu AA sa vyskytujú pomerne vysoké hodnoty. Naopak najnižšie hodnoty preukazoval heterozygotný genotyp AC. Teda z hľadiska udržania si normálnych hodnôt pre dané parametre sa javí najvýhodnejšie práve heterozygotný typ genotypu. Vyhodnotenie t-testu nám prinieslo nasledovné závery, a to, že genotyp CC u ktorého sa potvrdila pozitívna štatistická preukaznosť (-0,61) má významný vplyv na hladinu glukózy v krvi, u ostatných sledovaných parametrov sa pozitívna štatistická preukaznosť nepotvrdila. Pozitívna štatistická preukaznosť v závislosti od pohlavia sa potvrdila pre parameter glukóza v skupine mužov (0,63), v ďalších sledovaných parametroch významná štatistická preukaznosť v závislosti od pohlavia potvrdená nebola. Poslednou časťou analýzy bolo preskúmanie vzťahov medzi nami zvolenými parametrami pomocou korelačnej analýzy. Silná pozitívna korelácia sa preukázala najmä medzi parametrami glukóza a BMI (0,5950) taktiež pomerne významná korelácia bola preukázaná aj medzi parametrami cholesterol a BMI, tzn. že narastajúca hladina glukózy, resp. cholesterolu v krvi má kladnú súvislosť so zvýšenou hodnotou BMI.

**Kľúčové slová:** leptín, polymorfizmus, BMI, glukóza, cholesterol

## Abstract

The objective of the diploma thesis is observation of food intake gene genetic polymorphism – leptin and his influence on nutritional status in human organism. The evaluation of this effect was based on nutritional parameters cholesterol, glucose and BMI.

The research was made on group consisting of randomly chosen men and women, together numbered 24. To amplify specific *LEP* fragments were used oligonucleotid primers *LEP* FOR: 5' ATG CGC TGT GGA CCC CTG TAT 3 and *LEP* REV: 5' TGG TGT CAT CCT GGA CCT TCC 3'. For PCR-RFLP method a restrictive enzyme *HhaI* was used. Via this method we were able to verify gene *LEP* (*HhaI*) polymorphism, while three genotype combinations were found: AA (242bp), AC (242, 181 a 61 bp) a CC (181 a 61 bp). Furthermore, we evaluated associations of these genotypes on three parameters related to alimentation: cholesterol, glucose and BMI. The influence of individual genotypes was evaluated by basic statistics indicator and what is more, specific statistical method t-test was applied. Based on results gained from statistical research and calculations it can be stated, that the highest tendency to increase analyzed parameters showed homozygote genotype CC, but also at genotype AA were discovered high values. On the other hand, the lowest values indicated heterozygote genotype AC. Therefore this genotype seems to be the most useful to maintain standard values for the chosen parameters. The t-test evaluation showed genotype CC, by which a positive statistical cogency (-0,61) was verified, has important influence on glucose levels in blood; positive statistical cogency in the other parameters was not verified. A positive statistical cogency according to gender was confirmed for the parameter glucose in the men group (0,63), in other parameters high statistical cogency connected with gender was not discovered. The last part of the analysis was the relationships study between chosen parameters via correlation analysis. The calculations revealed high positive correlation intensively between parameters glucose and BMI (0,5950). Significant positive correlation was also verified between parameters cholesterol and BMI. These two results indicate, that increasing glucose and cholesterol levels in blood have positive coherency with rising BMI value.

**Key words:** leptin, polymorphism, obesity, BMI, glucose, cholesterol

# Obsah

Zoznam ilustrácií a zoznam tabuliek.....	8
Zoznam skratiek.....	9
Úvod.....	10
1 Súčasný stav riešenej problematiky.....	11
1.1 Nutričný stav organizmu človeka.....	11
1.2 Ľudský genóm.....	12
1.3 Leptín.....	13
1.3.1 Štruktúra leptínu.....	13
1.3.2 Účinok leptínu.....	13
1.3.3 Produkcia a transport leptínu.....	14
1.3.4 Receptory leptínu.....	16
1.3.5 Vplyv leptínu na vznik obezity.....	17
1.3.6 Degradácia leptínu.....	19
1.4 Ghrelín.....	20
1.4.1 Štruktúra ghrelínu.....	20
1.4.2 Účinok ghrelínu.....	20
1.4.3 Produkcia ghrelínu.....	21
1.4.4 Receptory ghrelínu.....	22
1.4.5 Vplyv ghrelínu na vznik obezity.....	23
1.5 Obezita.....	24
1.5.1 Definícia.....	24
1.5.2 Klasifikácia obezity.....	24
1.5.3 Typy obezity.....	25
1.5.4 Etiopatogenéza obezity.....	25
1.5.5 Komplikácie obezity.....	26
1.5.6 Liečba obezity.....	27
1.6 Metódy identifikácie génov príjmu potravy.....	29
1.6.1 Polymerázová reťazová reakcia.....	29
1.6.2 Využitie PCR.....	30
1.6.3 Bodové (génové) mutácie.....	32
2 Cieľ práce.....	33
3 Materiál a metodika práce.....	34

3.1	Biologický materiál .....	34
3.2	Izolácia DNA .....	34
3.2.1	Izolácia DNA z krvných škvŕn .....	36
3.2.2	Izolácia DNA z periférnej krvi .....	37
3.3	Meranie koncentrácie a čistoty DNA .....	38
3.4	Polymerázová reťazová reakcia (PCR) .....	38
3.5	Reštrikčná analýza PCR produktov (PCR – RFLP).....	39
3.6	Elektroforéza.....	39
3.7	Matematicko-štatistická analýza .....	40
4	Výsledky .....	42
4.1	Meranie koncentrácie a čistoty DNA .....	42
4.2	PCR - RFLP .....	44
4.3	Základná charakteristika súboru .....	44
4.4	Leptín a jeho vzťah k hodnoteným parametrom.....	47
4.5	Štatistická preukaznosť rozdielov sledovaných parametrov .....	49
4.5.1	Štatistická preukaznosť rozdielov sledovaných parametrov v závislosti od pohlavia.....	49
4.5.2	Štatistická preukaznosť rozdielov v závislosti od genotypu .....	50
4.6	Korelačná analýza .....	51
4.6.1	Korelačná analýza v skupine mužov.....	51
4.6.2	Korelačná analýza v skupine žien.....	52
4.6.3	Korelačná analýza pre celý sledovaný súbor.....	53
5	Diskusia.....	54
6	Návrh na využitie poznatkov .....	57
7	Záver .....	58
8	Zoznam použitej literatúry .....	59
	Prílohy .....	68



## Zoznam ilustrácií a zoznam tabuliek

<b>Obrázok č. 1</b> Karyotyp človeka .....	12
<b>Obrázok č. 2</b> Lineárny vzťah medzi koncentráciou plazmatického leptínu a tukovou hmotou.....	15
<b>Obrázok č. 3</b> Dráhy ktorými leptín a ghrelín môžu ovplyvňovať energetickú bilanciu u ľudí .....	18
<b>Obrázok č. 4</b> Štruktúra ghrelínu.....	20
<b>Obrázok č. 5</b> Komplexný manažment obezity.....	28
<b>Obrázok č. 6</b> Schéma postupu pri realizácii PCR-RFLP .....	30
<b>Obrázok č. 7</b> Overenie prítomnosti DNA po izolácii na 1 % agarózovom gély .....	42
<b>Obrázok č. 8</b> Schématické zobrazenie štiepných fragmentov LEP génu 242 bp pomocou reštrikčného enzýmu HhaI .....	44
<b>Tabuľka č. 1</b> Faktory ovplyvňujúce hladinu cirkulujúceho leptínu .....	14
<b>Tabuľka č. 2</b> Účinky ghrelínu .....	21
<b>Tabuľka č. 3</b> Regulátory ovplyvňujúce hladiny cirkulujúceho ghrelínu .....	22
<b>Tabuľka č. 4</b> Hodnotenie podľa BMI .....	24
<b>Tabuľka č. 5</b> Riziko zdravotných komplikácií súvisiacich s obezitou .....	27
<b>Tabuľka č. 6</b> Zloženie pozorovanej skupiny .....	34
<b>Tabuľka č. 7</b> Zloženie PCR zmesi na 1 vzorku (objem 25 µl).....	39
<b>Tabuľka č. 8</b> Priebeh štiepenia reštrikčným enzýmom.....	39
<b>Tabuľka č. 9</b> Kategorizácia korelačného koeficientu .....	41
<b>Tabuľka č. 10</b> Koncentrácia a čistota DNA .....	43
<b>Tabuľka č. 11</b> Genotypy $LEP^{HhaI}$ sledovaného súboru.....	45
<b>Tabuľka č. 12</b> Sledované nutričné parametre v hodnotenej skupine .....	45
<b>Tabuľka č. 13</b> Sledované nutričné parametre v skupine mužov .....	46
<b>Tabuľka č. 14</b> Sledované nutričné parametre v skupine žien.....	47
<b>Tabuľka č. 15</b> Vplyv genotypu na sledované nutričné parametre .....	48
<b>Tabuľka č. 16</b> Štatistická preukaznosť rozdielov v závislosti od pohlavia.....	49
<b>Tabuľka č. 17</b> Štatistická preukaznosť rozdielov v závislosti od genotypu.....	50
<b>Tabuľka č. 18</b> Korelácie pre mužov (n=9) .....	51
<b>Tabuľka č. 19</b> Korelácie pre ženy (n=15) .....	52
<b>Tabuľka č. 20</b> Korelácie pre celý súbor (n=24).....	53

## **Zoznam skratiek**

**DNA** deoxyribonukleová kyselina

**rRNA** ribozomálna ribonukleová kyselina

**mRNA** mediátorová ribonukleová kyselina

**BMI** Body Mass Index

**LEP** leptín

**GHR** ghrelín

**CHOL** cholesterol

**GLU** glukóza

**ng** nanogram

**ml** mililiter

**kg** kilogram

**CNS** centrálna nervová sústava

**AMK** aminokyseliny

**DM** diabetes mellitus

**WHR** waist hip ratio

**kJ** kilo joul

**PCR** polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction)

**PCR-RFLP** Polymerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorphism

**μl** mikroliter

**NH<sub>4</sub>Cl** chlorid amónny

**EDTA** etylén-diamino-tetraoctová kyselina

**NaOH** hydroxid sodný

**MgCl<sub>2</sub>** chlorid horečnatý

**HhaI** enzým izolovaný z *Haemophilus haemolyticus*

**TAE** Tris-Acetate-EDTA

**TBE** Tris-Borate-EDTA

## Úvod

Obezita predstavuje v súčasnosti celosvetový problém, pričom jej výskyt sa neustále zvyšuje. V dnešnej dobe trpí týmto metabolickým ochorením viac ako 40 % populácie, nevynímajúc deti. Obezita to nie je len estetický problém, ale aj závažný ekonomický a v neposlednom rade zdravotný problém. Toto ochorenie prináša mnoho zdravotných komplikácií. Aj preto sa touto témou zaoberá veľké množstvo odborníkov a na výskum súvisiaci s jej prevenciou a liečbou sa vynakladá čoraz viac finančných prostriedkov. Obezita patrí medzi multifaktoriálne ochorenia, pričom genetika sa podieľa na jej vzniku až 40 %. Preto je nesmierne dôležité skúmať práve rôzne genetické vplyvy a ich dopad na jej rozvoj.

Medzi hlavné gény príjmu potravy patria okrem iných aj leptín a ghrelín. Oba tieto gény prostredníctvom svojich receptor zabezpečujú kontrolu príjmu potravy a telesnej hmotnosti. Leptín je gén o veľkosti 16 kDa a je lokalizovaný na chromozóme 7q31.3. Pri poruche vnímania leptínu v mozgových centrách dochádza k nekontrolovateľnému príjmu potravy, čo má za následok vznik obezity. Ghrelín je 28 aminokysleidinový peptid, ktorý je lokalizovaný na chromozóme 3, na lokuse 3p25-26. Produkuje sa ako reakcia na hlad a podporuje apetít. Porucha vnímania ghrelínu a jeho dlhodobé nízke hladiny sú rizikovým faktorom pre vznik diabetes mellitus II. typu a hypertenzie. Spoločne sa teda tieto gény podieľajú na vzniku metabolického syndrómu, ktorý predstavuje závažné poškodenie zdravotného stavu človeka. Sledovanie týchto génov a určenie významnosti ich vplyvu na rozvoj už spomínaných ochorení by mohlo v budúcnosti prispieť k zlepšeniu ich prevencie, aj liečby. Práve preto sa cieľom našej práce využitím PCR-metódy a jej modifikácií stalo hodnotenie vplyvu jedného z týchto génov, a to leptínu, na nutričné parametre cholesterol, glukózu a BMI, ktoré významne súvisia s viacerými metabolickými ochoreniami.

# 1 Súčasný stav riešenej problematiky

## 1.1 Nutričný stav organizmu človeka

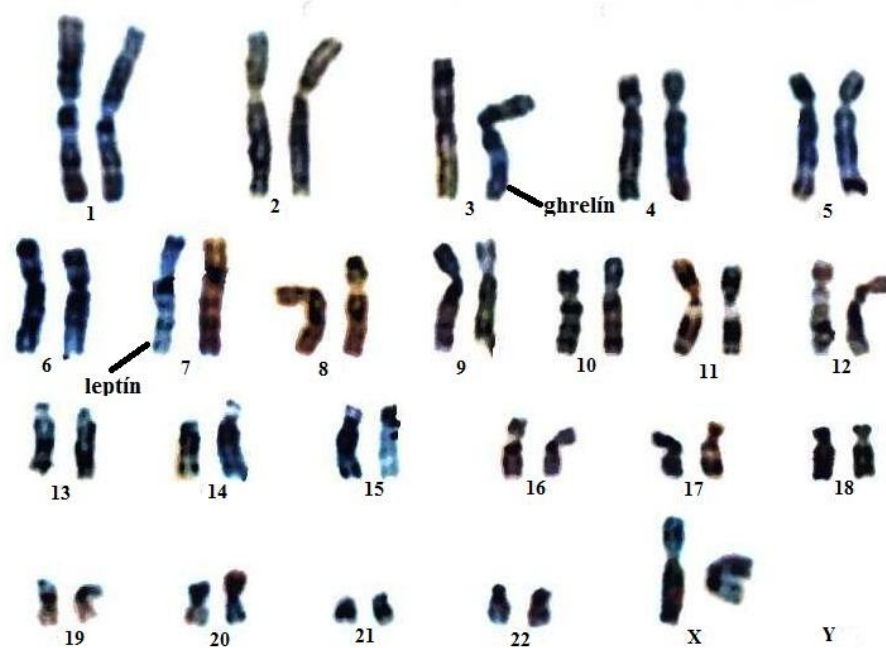
Nutričný stav je komplexný morfológický a fyziologický stav konkrétneho jedinca, ktorý je podmienený jeho genetickou výbavou, množstvom a kvalitou prijatej potravy a fyziologickou aktivitou (Kaput, 2006). Organizmus človeka potrebuje na vykonávanie každodenných úloh dostatočný príjem základných živín, ako sú bielkoviny, tuky, sacharidy, vitamíny, minerálne látky a voda. Ak je ich príjem zabezpečený v dostatočnom množstve naše telo môže vykonávať všetky životne dôležité funkcie bez narušenia. Problém nastáva vtedy, ak sa ich príjem naruší, či už neadekvátnym znížením alebo naopak zvýšením. Oba extrémny môžu prinášať mnoho zdravotných komplikácií a viesť až k úplnej deštrukcii organizmu. Preto je nesmierne dôležité sledovať nutričný stav organizmu človeka a skúmať všetky vplyvy, ktoré by mohli prispieť k jeho narušeniu.

Na posúdenie nutričného stavu podľa Zazulu (2009) sa v klinickej praxi využívajú klinické vyšetrenia:

1. Klinické vyšetrenie a anamnéza – v klinickom zhodnotení je našim cieľom definovať aktuálny nutričný a metabolický stav človeka.
2. Antropometrické vyšetrenie- antropometrické metódy sa používajú na meranie dlhodobého nutričného stavu. Najčastejšie používanými ukazovateľmi sú hmotnosť, BMI, hrúbka kožnej riasy, meranie obvodu svalstva paže a bioimpedancia.
3. Biochemické vyšetrenie – laboratórne vyšetrenia krvi; podávajú informáciu o celkovom metabolizme, funkčnosti pečene, obličiek, množstve cukrov, tukov a bielkovín vo vzorkách.
4. Hematologické vyšetrenie – medzi základné hematologické ukazovatele patrí pokles absolútneho počtu bielych krviniek a anémia spôsobená nedostatkom vitamínu B12 a kyseliny listovej.
5. Imunologické vyšetrenie - pokles imunity je pri malnutriácii častým javom. Kým protilátkový deficit imunity sa pozoruje až pri ťažkých formách malnutriácie, deficit bunkovej imunity je úplne bežným nálezom pri chronickej proteín-energetickej podvýžive.
6. Meranie energetického výdaja - pokojový energetický výdaj sa meria po 30 minútach pokoja, počas dňa, v teplotne neutrálnom prostredí.

## 1.2 Ľudský genóm

Genóm je spoločný názov pre všetky molekuly DNA nachádzajúce sa v jednotlivých druhoch. Ľudský genóm sa skladá z 22 párov autozómov a 2 pohlavných chromozómov X a Y (Scherer, 2008).



Obrázok č. 1 Karyotyp človeka

Zdroj: URL1

### Mitochondriálny genóm

Okrem jadra sa DNA nachádza aj v mitochondriách. Svojou organizáciou predstavuje DNA prokaryotického typu, čo súvisí s evolúciou týchto bunkových organel. Mitochondriálna DNA človeka je dvojvláknová, kruhová, špiralizovaná bez asociácie so štruktúrnymi proteínmi a je prítomná vo viacerých kópiách. Mitochondriálny genóm človeka je veľmi krátky a má znaky prokaryotického chromozómu. Jeho vonkajší reťazec je dlhší (ťažký) a vnútorný je kratší (ľahký).

Výnimočný je tým, že obsahuje úsek, v ktorom sú 3 reťazce DNA (tzv. D-loop). Tvorí ho iba 37 génov: 2 gény pre rRNA, 22 pre tRNA a 13 štruktúrnych génov kódujúcich proteíny. Všetky mitochondrie humánnych buniek sú maternálneho pôvodu (z vajíčka), a teda aj znaky a ochorenia podmienené mitochondriálnymi génmi majú tzv. maternálny typ dedičnosti (Kaput et al., 2006).

## 1.3 Leptín

### 1.3.1 Štruktúra leptínu

V roku 1994 bola dokázaná schopnosť *ob* génu u myši kódovať sekréciu proteínu o veľkosti 16 kDa. Proteín bol nazvaný leptín. U *ob/ob* myši tento gén obsahuje mutácie, čo sa odráža v nedostatku leptínu a zjavnej obezite (Ruiz-Cortez et al., 2000). *Ob/ob* myši okrem obezity preukazovali aj príznaky spojené s hyperinzulinémiou, inzulínovou rezistenciou, intoleranciou na chlad a neplodnosť (Ahren et al., 1997a).

Leptín bol izolovaný v roku 1994 skupinou vedcov. Je to bielkovinový hormón, ktorý je zložený zo 167 aminokyselín, účinkuje ako cytokiníny a má molekulovú hmotnosť 16 kDa (Delavaud et al., 2000). Lokalizovaný je na chromozóme 7q31.3. (Malik et al., 1996). Ľudský leptín je tvorený tromi exónmi a 2 intrónmi, leptínová DNA je kódovaná viac než 15 000 párami báz (Masuzaki et al., 1997).

### 1.3.2 Účinok leptínu

Leptín "tuk rozpúšťajúci" hormón je proteínový hormón s dôležitými funkciami v regulácii telesnej hmotnosti, príjme potravy a metabolizmu. (Duggal et al., 2000). Okrem regulácie telesnej hmotnosti leptín taktiež ovplyvňuje krvotvorbu, reprodukciu, angiogénu a imunitné procesy (Malik et al., 1996).

Leptín podáva signál o metabolickom stave tukových buniek do mozgu. Strata tuku má za následok zníženie hladiny leptínu, zatiaľ čo vzostup hmotnosti signifikantne zvyšuje koncentráciu leptínu (Fehman et al., 1997)

Leptín uvoľnený z adipocytov vstupuje do krvného riečiska, kde má úlohu v kontrole telesnej hmotnosti, potláča chuť do jedla. Zohráva úlohu v termoregulácii, reprodukcii, homeostáze, osteogéneze a imunite. Nedostatok leptínu môže mať za následok obezitu, cukrovku, zníženie reprodukcie u ľudí (Zhang et al., 2005).

Leptín má nezanedbateľný účinok na vznik obezity, tomuto účinku sa budem venovať v časti 1.2.5.

Keďže leptín zohráva úlohu pri vzniku obezity, ovplyvňuje aj priebeh kardiovaskulárnych ochorení. Novšie pozorovania naznačujú, že srdcovo-cievne účinky leptínu môžu vysvetliť súvislosť medzi nadmerným množstvom tuku a kardiovaskulárnymi chorobami (Rahmouni et al., 2004).

Taktiež bolo zistené, že nedostatok leptínu je bezprostrednou príčinou imunodeficiencie, ktorá vzniká ako jeden z dôsledkov hladovania. Dochádza

k negatívne ovplyvňovaniu T lymfocytov pri ich odpovedi na antigénny podnet (Lord et al, 1998).

### 1.3.3 Produkcia a transport leptínu

Expresia leptínového génu je tkanivovo špecifická: jej hlavným miestom je biele tukové tkanivo. Ďalším miestom s preukázanou expresiou leptínu je placenta (Masuzaki et al., 1997). Žalúdok patrí taktiež medzi miesta, z ktorých môžeme získať leptínovú mRNA (Bado et al., 1998).

**Tabuľka č. 1** Faktory ovplyvňujúce hladinu cirkulujúceho leptínu (spracované podľa Klok et al., 2006)

Faktory	Efekt na cirkulujúci leptín
Energetické zásoby	↑ s narastajúcim BMI a percentom telesného tuku
Príjem potravy	↑
Pohlavie	Vyššie u žien v porovnaní s mužmi
Vek	↓ S narastajúcim vekom
Cvičenie	↓
Vychytávanie glukózy	↑

Vysvetlivky:    ↑ zvýšenie  
                  ↓ zníženie

Sekrécia leptínu u ľudí prebieha pulzujúcim spôsobom. Koncentrácia leptínu je vyššia medzi polnocou a skorým ránom a nižšia medzi poľudním a odpoľudním. Tento denný rytmus závisí aj od času príjmu potravy (Pan et al., 2001).

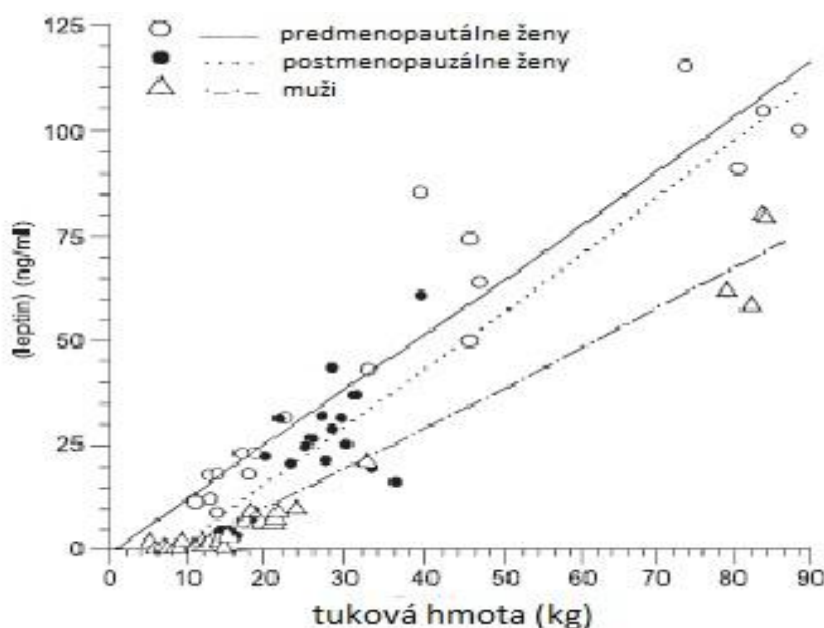
K vedľajším faktorom ovplyvňujúcich tento denný rytmus sekrécie leptínu patrí obezita, diéta a endokrinné faktory (Marie et al., 2001).

Koncentrácia cirkulujúceho leptínu je úzko spätá so zásobami telesného tuku (Considine et al., 1996a), nárast tučnosti spôsobuje nárast produkcie leptínu, a tak inhibuje príjem potravy a naopak (Farooqi et al., 2007). Obsah leptínu sa u obéznych jedincov zvyšuje až štvornásobne, čím sa potvrdzujú výsledky rôznych výskumov, že hypertrofia adipocytov vedie k zvýšenej produkcii leptínu jednotlivými bunkami, približne dvojnásobne (Lonnqvist et al., 1995).

Sekrécia žalúdočného leptínu je stimulovaná inzulínom, hormónom uvoľňovaným do krvného riečiska krátko po jedle (Sobhani et al., 2002). Je však možné, že žalúdočný leptín pôsobí skôr ako lokálny stimul, napríklad tým, že zohráva úlohu pri trávení potravy a absorpcii v črevách (Pico et al., 2003).

Viacerými štúdiami bolo potvrdené, že sérová koncentrácia leptínu je u žien až niekoľkonásobne vyššia oproti mužom odpovedajúcim veku a BMI. Jedným z možných faktorov je rozdielna distribúcia tukového tkaniva v organizme u žien, s vyšším podielom metabolicky aktívnejšieho (a teda leptín viac produkujúceho) podkožného tuku. Ďalším dôvodom je jednoznačne preukázaný inhibičný účinok androgénov a naopak stimulačný účinok estrogénov na expresiu leptínovej mRNA (Hainer et al., 1997).

Lineárny vzťah medzi koncentráciou plazmatického leptínu (ng/ml) a tukovou hmotou (kg, meranou hydrodenzitometriou) u mužov (vek 19-41 rokov) a predmenopauzálnych žien (vek 19-45 rokov) a postmenopauzálnych žien (vek 49 – 87 rokov) zobrazuje obrázok č. 2.



**Obrázok č. 2** Lineárny vzťah medzi koncentráciou plazmatického leptínu a tukovou hmotou (spracované podľa Rosenbaum et al., 1996)

#### Transport leptínu do mozgu

Aby mohol leptín pôsobiť na CNS musí sa najprv transportovať do mozgovej dutiny. Transport sa obyčajne uskutočňuje prostredníctvom špecifických mechanizmov. Izoforma Ob-Ra receptora je vo veľkom množstve prítomná vo vláknach krvno-mozgovej bariéry, a tak by mohla slúžiť na transport leptínu do mozgovej dutiny. Vysoká afinita prenášačov



leptínu do hypotalamu hrá kľúčovú úlohu v regulácii prívodu leptínu do CNS. Táto vysoká afinita transportných systémov sprostredkuje vstup leptínu do hypotalamu cez mozgovú bariéru v iných oblastiach CNS (Zlokovic et al., 2000).

#### 1.3.4 Receptory leptínu

Identifikácia leptínových receptorov sa datuje do roku 1995, kedy ho pomocou PCR metódy identifikovali Tartaglia et al. (1995). Leptínové receptory boli vyklonované a identifikované v choredálnom plexe a hypotalame v oblasti spojenej s reguláciou chuti, príjmu potravy a telesnej hmotnosti (Schwartz et al., 1996). Receptor je lokalizovaný na chromozóme 1 (1p31) a pozostáva z 18 exónov a 17 intrónov (Meier et al., 2004).

Leptínový receptor je samostatný membránový proteín, pri ktorom pozorujeme podobnosť s 1 triedou cytokinínových receptorov (Lee et al., 1996).

Všetky doteraz popísané izoformy receptorov pre leptín majú zhodnú extracelulárnu časť tvorenú 816-timi AMK. Delenie izoforiem leptínových receptorov:

- Izoforma s dlhou intracelulárnou doménou (OB-R<sub>1</sub>), tzv. dlhá izoforma
- Izoformy s krátkou intracelulárnou doménou (OB-R<sub>S</sub>), tzv. krátke izoformy
- Cirkulujúci leptínový receptor

U ľudí je najviac leptínových receptorov zistených v srdci, pečeni, tenkom čreve, prostate, ováriách a taktiež v hypotalame. Hypotalamus je jediný orgán v ktorom prevládajú dlhé izoformy nad krátkymi (Hainer et al., 1997).

Pôsobenie leptínu je v organizme regulované prostredníctvom dlhej formy receptoru OB-R<sub>b</sub>. Krátka forma receptoru OB-R<sub>a</sub>, napomáha transportu leptínu cez krvnú bariéru v mozgu (Zhang et al., 1994).

Po tom, čo je leptín vypudený tukovým tkanivom do krvného obehu, prechádza krvno-mozgovou bariérou a viaže sa na jeho receptory v hypotalame, ktorým podáva informácie o stave zásob telesnej energie. Väzbou na jeho receptory ovplyvňuje aktivitu rôznych hypotalamických neurónov a prejav orexigénnych a anorexigénnych neuropeptidov. Orexigénne peptidy, ktorých hladiny sú ovplyvňované leptínom, zahŕňajú neuropeptid Y (NPY), melanín-koncentrujúci hormón, AgRP, galanín a orexín. Schopnosť ghrelínu regulovať hypotalamické neuróny sa považuje za jeden z najdôležitejších mechanizmov, ktorým môže leptín kontrolovať príjem potravy a telesnú hmotnosť (Sahu et al., 2003).

Medzi anorexigénne peptidy, ktorých expresia sa zdá byť ovplyvňovaná leptínom zaraďujeme pro-opiomelanokortín (POMC), neurotensín a kortikotropín – uvoľňujúci hormón (CRH) (Klok et al., 2006).

### 1.3.5 Vplyv leptínu na vznik obezity

Leptín má vplyv na rôzne biologické mechanizmy, zahŕňajúc reprodukciu (ovplyvňuje začiatok puberty), imunitné a zápalové reakcie, hematopoézu, angiogénu, formovanie kostí a hojenie rán (Takeda et al., 2002).

Ešte pred niekoľkými rokmi bol leptín považovaný iba za látku, ktorá hrá úlohu v dlhodobej regulácii energetickej rovnováhy. Nedávne údaje však naznačujú, že leptín zohráva úlohu aj v krátkodobej regulácii príjmu potravy a telesnej hmotnosti (Klok et al., 2006).

Vzťah leptínu k obezite bol preukázaný, keď výskumníci zistili, že myši s chybným vnímaním leptínu v ich mozgu jedli s voľnosťou. Keď terapiou zlepšili senzitivitu na leptín, u myší došlo k zníženiu hmotnosti a stali sa fyzicky aktívnejšími. Práve preto, regulácia leptínu môže byť dôležitou časťou liečby epidémie obezity.

Leptín reguluje telesnú hmotnosť prostredníctvom hypotalamových centier tak, že kontroluje chovanie sa organizmu pri prijímaní potravy, pocit hladu a nasýtenia, telesnú teplotu a výdaj energie (Adam et al., 2000).

Leptín pomáha regulovať metabolizmus tým, že u zdravého jedinca vyvoláva potrebu získať viac tuku, ak je jeho hladina príliš nízka a naopak, znižuje ju pri nadbytku tuku. Väčšina obéznych jedincov nemá vrodenu poruchu metabolizmu leptínu, ale naopak, majú získanú vysokú hladinu leptínu a taktiež aj rezistencie na leptín (Dulloo et al., 2004).

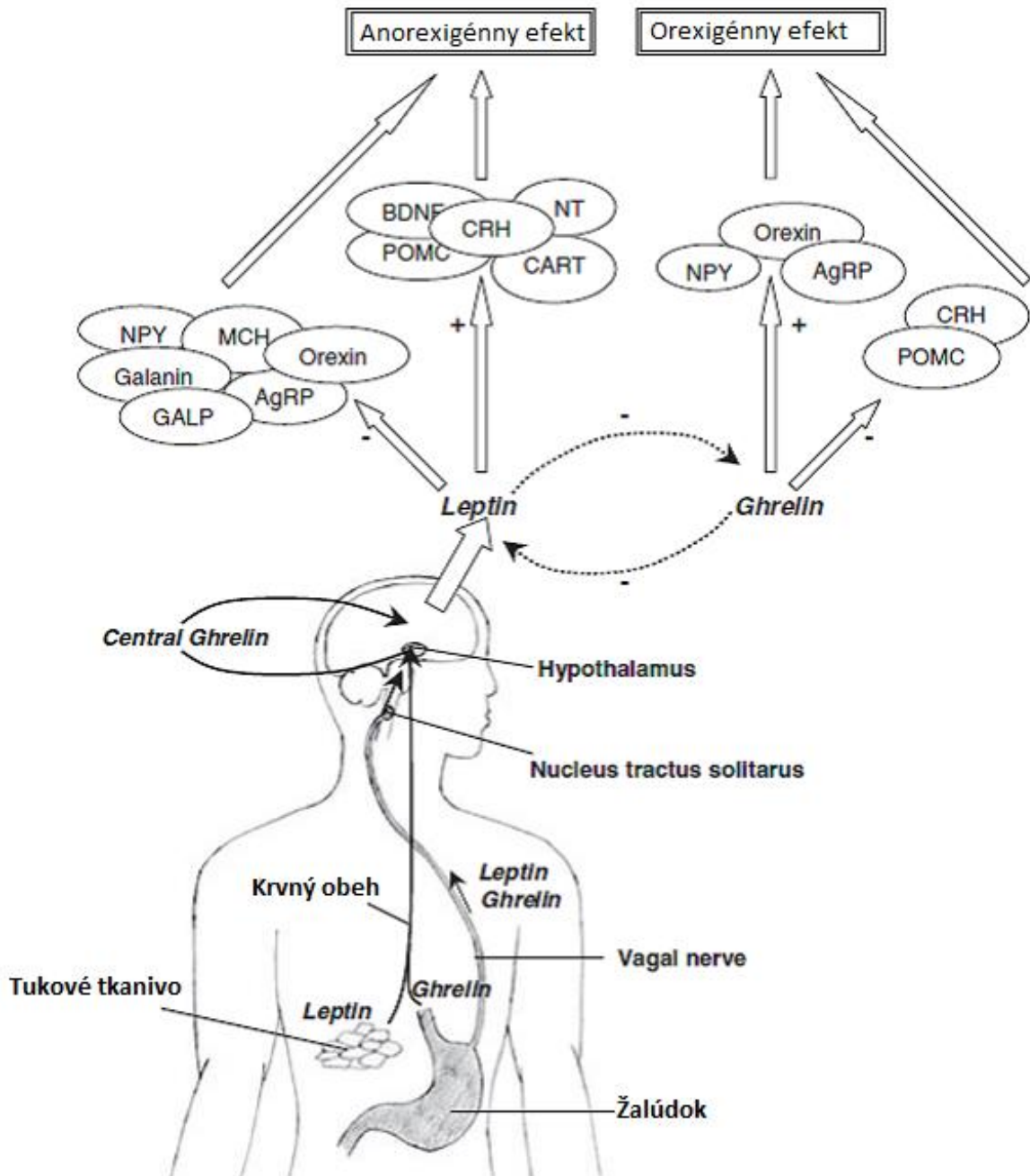
Do súčasnosti bolo vykonaných mnoho štúdií zaoberajúcich sa vplyvom leptínu na vznik obezity. Všetky z nich potvrdili, že expresia leptínovej mRNA je u obéznych jedincov oproti štíhlym zvýšená. Možným dôvodom tohto faktu je jednak preukázaná vyššia citlivosť adipocytov obéznych jedincov ku stimulačnému vplyvu glukokortikoidov na syntézu leptínu, jednak veľmi pravdepodobne i znížený sympatický tonus.

Mutácia leptínového génu môže podľa viacerých vedcov viesť k tvorbe biologicky neaktívneho leptínu alebo priamo k poruche syntézy na úrovni translácie alebo transkripcie. Avšak vplyv mutácií leptínového génu na vznik obezity je veľmi malý (Haluzík, 2002).

Redukcia telesnej hmotnosti spôsobená leptínom má najmenej dva dôležité účinky:

- Zníženie hladu a spotreby potravy, čo spôsobuje hlavne inhibícia syntézy neuropeptidu Y (NPY). NPY je veľmi dôležitý stimulátor pri prijímaní potravy.
- Zvýšený výdaj energie, ako i zvýšená spotreba kyslíka, vyššia telesná teplota a úbytok tukového tkaniva.

Mechanizmy, ktoré leptín uplatňuje pri svojich účinkoch na metabolizmus sú z veľkej časti neznáme, avšak je známe, že pôsobením leptínu sa stráca tukové tkanivo (Considine et al., 1996b).



**Obrázok č. 3** Dráhy ktorými leptín a ghrelín môžu ovplyvňovať energetickú bilanciu u ľudí (spracované podľa Klok et al., 2006)

### **1.3.6 Degradácia leptínu**

Pre degradáciu a biologický polčas leptínu je rozhodujúce, či sa nachádza v krvnom obehu vo forme voľnej, či vo väzbe na väzbové proteíny. Jedným z prvých potvrdení voľnej a viazanej formy leptínu v cirkulácii bola práca Sinha et al. (1996). Bolo zistené, že zatiaľ čo u štíhlych subjektov je väčšina leptínu v cirkulácii (60 až 98 %) prítomná vo väzbe na proteíny, u obéznych je to iba 5 až 15 %.

## 1.4 Ghrelín

### 1.4.1 Štruktúra ghrelínu

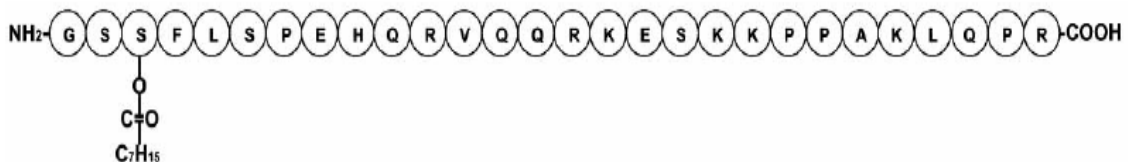
Ghrelín bol získaný z myšieho žalúdka štyrmi krokmi chromatografie:

- gélová filtrácia
- dva iónovo – výmenné HPLC kroky
- záverečná reverzná fáza HPLC (RP-HPLC).

Počas druhej iónovej výmeny bol vyčistený práve ghrelín (Hosoda et al., 2000). Názov ghrelín vychádza zo slova "ghre", čo znamená "rast", vzhľadom na jeho schopnosť stimulovať uvoľňovanie rastového hormónu (Kojima, 1999).

Ghrelín je 28 aminokyselinový peptid, ktorý je prirodzeným ligandom pre rastový hormón. Na základe jeho štruktúry ho zaraďujeme do rodiny motililínových receptorov (Korbonits et al., 2004). Gén ghrelínu je lokalizovaný na chromozóme 3, na lokuse 3p25-26. Tento gén sa skladá o zo 4 exónov a 4 intrónov (Wajnrajch, 2000). Je to jediný periférny orexigénny faktor jasne stanovený u ľudí (Cummings, 2002).

Ľudský a potkaní ghrelín sa líšia od seba len v dvoch aminokyselinových zvyškoch (Kojima et al., 1999).



**Obrázok č. 4** Štruktúra ghrelínu

Zdroj: Cordido, 2009

### 1.4.2 Účinok ghrelínu

Ghrelín, žalúdočný hormón, reguluje príjem potravy a energetický metabolizmus prostredníctvom centrálného mechanizmu (Kojima et al., 1999). Jeho funkciou je dávať signály mozgu o potrebe príjmu potravy. Teda úroveň jeho sekrécie sa zvyšuje pred jedlom a klesá po príjme jedla. Práve touto stimuláciou chuti do jedla, a s tým súvisiacou zvyšujúcou sa hmotnosťou, zohráva úlohu pri vzniku obezity (Lakar et al., 2009).

Efekty ghrelínu na energetickú bilanciu sú vo veľkej miere sprostredkované cez hypotalamus. Korbonits et al. (2004) predložili tri rôzne cesty, ktorými ghrelín ovplyvňuje chuť do jedla:

1. po uvoľnení zo žalúdka do krvného riečiska, ghrelín prechádza cez krvno-mozgovú bariéru a viaže sa na jeho receptory v hypotalame,
2. ghrelín sa môže dostať do mozgu prostredníctvom vágových nervov a nucleus solitarii,
3. ghrelín je produkovaný lokálne v hypotalame, kde môže mať priamy vplyv na rôzne hypotalamické jadrá.

Ghrelín nesúvisí len so stimuláciou v mozgu, ktorá vedie k zvýšenému apetítu, ale taktiež podporuje aj ukládanie tukov vo viscerálnych tukových tkanivách, lokalizovaných v abdominálnej časti, ktoré sú považované za najviac škodlivé. Zvýšenie tukových zásob práve v tejto oblasti sa dáva do súvisu so zvýšeným rizikom vzniku diabetes mellitus II. typu, zvýšením krvného tlaku, zvýšenou hladinou triglyceridov, hypercholesterolémiou a teda vzniku metabolického syndrómu (Oihane, 2009).

Ghrelín stimuluje sekréciu žalúdočnej kyseliny a motilitu žalúdka. Centrálne a periférne podanie ghrelínu zvieratám zvyšuje príjem potravy a vedie k nárastu telesnej hmotnosti a zníženiu obsahu tuku, čo naznačuje, že tento peptid má významný vplyv na apetít a energetickú rovnováhu (Asakawa et al., 2003).

**Tabuľka č. 2** Účinky ghrelínu (spracované podľa Kojima et al., 2005)

Stimulácia sekrécie rastového hormónu
Stimulácia príjmu potravy
Stimulácia zvyšovania hmotnosti
Stimulácia prolaktínu a sekrécie kortikotropínu
Stimulácia gastrointestinálnej motility
Stimulácia sekrécie žalúdočnej šťavy
Zvýšenie výkonnosti srdca
Zníženie tlaku krvi
Regulácia inzulín-glukózovej rovnováhy
Regulácia zápalu
Regulácia bunkovej proliferácie

### 1.4.3 Produkcia ghrelínu

Ghrelín je produkovaný predovšetkým v zažívacom ústrojenstve, ako reakcia na hlad a hladovanie a cirkuluje v krvi (Kojima et al., 2005). Až 90 % ghrelínu sa produkuje v žalúdku a dvanástniku (Liddle, 2009).

Sekrécia ghrelínu a expresia mRNA stúpajú s poklesom telesnej hmotnosti, obmedzením kalorického príjmu a inzulínom indukovanej hypoglykémie (Lee et al., 2002).

U mnohých druhov, vrátane ľudí, hladina ghrelínu narastá v období hladovania a klesá ako reakcia na príjem potravy (Sugino et al., 2002). Predpokladáme, že tento regulačný mechanizmus sekrécie ghrelínu je sprostredkovaný cez cholinergné aferencie z gastrointestinálneho traktu (Date et al., 2000).

Nízka koncentrácia ghrelínu môže byť rizikovým faktorom vzniku DM II. typu a hypertenzie (Poykko et al., 2003).

Sekrécia ghrelínu žalúdkom do značnej miery závisí na stave výživy. Hladina ghrelínu poukazuje na preprandiálne zvýšenie a postprandiálne zníženie (Tschöp et al., 2001).

**Tabuľka č. 3** Regulátory ovplyvňujúce hladiny cirkulujúceho ghrelínu (spracované podľa Klok et al., 2006)

	Efekt na cirkulujúci ghrelín
Príjem potravy	↓
Vek	↓ s narastajúcim vekom
Pohlavie	Vyššie u žien v porovnaní s mužmi
BMI	↓ s narastajúcim BMI
GH	↓
Glukóza	↓
Inzulín	↓

#### 1.4.4 Receptory ghrelínu

Ghrelínové receptory sú široko rozložené uprostred oboch, centrálnych aj periférnych tkanív, vrátane hypofýzy, hypotalamu, pankreasu, žalúdka a čriev (Date et al., 2000).

Boli izolované dva odlišné receptory ghrelínu: GHS-R1a a GHS-R1b (Gnanapavan et al., 2002).

GHS-R1a je jednoreťazcový receptor so siedmymi transmembránovými doménami o celkovej dĺžke 366 AMK, spojený s G-proteínom. Je tvorený dvoma exónmi a jedným intrónom (Klok et al., 2006). GHS-R1b pozostáva z 289 AMK s piatimi transmembránovými doménami a je pravdepodobne nefunkčný. Oba tieto receptory

sprostredkujú endokrinné a neendokrinné účinky ghrelínu. Neendokrinné, ako sú napríklad kardiovaskulárne účinky, účinky modulácie bunkovej proliferácie, sú sprostredkované rôznymi subtypmi GHS-R1a, ktoré sú uložené v centrálnom i periférnom tkanive (Howard et al., 1996).

Receptory pre ghrelín sú najviac homologické k receptoru pre motilín, ľudské formy zdieľajú 52 % identických aminokyselín (Smith, 2001)

#### **1.4.5 Vplyv ghrelínu na vznik obezity**

Je známe, že chuť k jedlu je riadená mozgom, stravovacie návyky sú regulované zložitými mechanizmami v CNS, najmä v hypotalame (Druce et al., 2003). Odstránenie laterálnej časti hypotalamu spôsobuje hypofágiu (zníženie príjmu potravy), vedúcu k smrti v dôsledku ťažkej straty hmotnosti. Na druhej strane, odstránenie ventromediálnej časti hypotalamu spôsobuje hyperfágiu (zvýšený príjem potravy), čo vedie k nárastu telesnej hmotnosti a ťažkej obezite. Teda príjem potravy je regulovaný rovnovážnou stimuláciou v hypotalame (Ukkola, 2004).

Ghrelín je silný stimulant chuti do jedla. Výskumami bolo dokázané, že ak sa ghrelín vstrekuje do mozgových komôr potkanov, ich príjem potravy je silne stimulovaný. Dlhotrvajúce intracerebroventrikulárne injekcie ghrelínu zvyšujú príjem potravy a znižujú energetický výdaj, čo vedie k nárastu hmotnosti. Takýto účinok má nielen priame vstrekovanie ghrelínu do mozgových komôr, ale aj intravenózne podkožné injekcie (Nakazato et al., 2001).

U chudších ľudí dochádza k vyššej produkcii ghrelínu počas nočných hodín, pričom u ľudí s obezitou sa tento stav nevyskytuje. Ľudia, ktorí trpia poruchami spánku nadmerne aktivizujú produkciu ghrelínu, čím sa zvyšuje túžba po jedle. Nedostatok spánku súčasne znižuje produkciu leptínu, ktorý v tele potláča chuť do jedla. Z toho vyplýva, že pri nedostatku spánku sa hormóny v tele správajú neobvykle a človek pociťuje hlad aj napriek tomu, že v skutočnosti potravu nepotrebuje (Vercillo, 2009).

Greenman et al. (2004) zistili, že hladina ghrelínu výrazne klesá po prijme glukózy alebo jedál s vysokým obsahom tuku. U bielkovín sa tento vplyv nepreukázal. Kalorický príjem potravín je ďalším faktorom regulujúcim postprandiálnu hladinu ghrelínu. Zvýšenie kalorickej hodnoty potravín u jedincov s normálnou hmotnosťou prinieslo postupné zníženie hladiny ghrelínu (Patterson, 2005). Postprandiálne potlačenie hladiny ghrelínu je menej výrazné u obéznych jedincov, čo môže prispievať k patogenéze obezity (Cummings, 2001).



## 1.5 Obezita

Obezita je závažný zdravotný problém a značná časť obéznych ľudí umiera na ochorenia vyvolané komplikáciami spôsobenými nadváhou. Obezita je základným rizikovým faktorom kardiovaskulárnych ochorení, metabolického syndrómu, niektorých typov nádorových ochorení a je zhoršujúcim faktorom pre rozvoj ochorenia diabetes mellitus 2. typu (Adámková, 2009).

### 1.5.1 Definícia

Patologické navýšenie telesného tuku na celkovom telesnom zložení.(Muntau, 2009). Obezita je uloženie nadmerného množstva tuku v organizme. Podiel tuku v organizme je normálne u žien do 30 % a u mužov do 20 %. (Svačina, 2008)

Obezita je definovaná nadmerným uložením tuku v organizme. Ide o najčastejšie chronické metabolické ochorenie na svete, ktoré postihuje tak deti, ako aj dospelých. Ide o multifaktoriálne podmienenú metabolickú chorobu s individuálne geneticky podmienenou náchylnosťou k hromadeniu tukových zásob pri pozitívnej energetickej bilancii (Krahulec, 2009).

### 1.5.2 Klasifikácia obezity

Najčastejšie používaným meradlom na posúdenie obezity je hodnotenie podľa BMI (body mass index). BMI vyjadruje hmotnosť v kilogramoch .

**Tabuľka č. 4** Hodnotenie podľa BMI

BMI (kg.m <sup>-2</sup> )	Klasifikácia
Pod 17	Extrémna chudosť
17 – 19,9	Chudosť
20 – 24,9	Normálna hmotnosť
25 – 29,9	Nadhmotnosť
30 – 39,9	Obezita
40 a viac	Extrémna obezita

Zdroj:Béder, 2005

Hodnota BMI je genetickými faktormi určovaná z 25 až 40 % (Hainer et al., 1997).

Iným typom je meranie podľa obvodu pásu. Ak je obvod vyšší ako 80 cm u žien a 94 u mužov, je to signálom, že sa tuk hromadí v rizikovej oblasti. Ak číslo presiahne hodnotu 88 cm u žien a 102 cm u mužov, je potrebné začať ihneď so zmenou životného štýlu (Kunová, 2004).

### 1.5.3 Typy obezity

1. Typ androidný, mužský – centrálné ukladanie tuku – ramená, brucho - (typ jablko), charakterizovaný zvýšeným pomerom- pás : boky. Tento typ je spájaný s vyššou hladinou tukov v krvi - hyperlipidémiou, častejším výskytom infarktu, mozgovej príhody, cukrovky a vyššou úmrtnosťou.

2. Typ gynoidný, ženský – periférne ukladanie tuku – prsia, bedrá, stehná - (typ hruška), charakterizovaný nízkym pomerom – pás : boky (Béderová, 2011).

Na identifikáciu osôb s kumuláciou tzv. viscerálneho tuku v oblasti brucha slúži pomer obvodu pásu a obvodu bokov (WHR = waist/hip ratio). Pás sa meria v najužšej časti, boky v najširšej časti. Za vysokú sa považuje hodnota WHR u mužov  $\geq 1$ , u žien  $\geq 0,85$  (Krahulec, 2009).

### 1.5.4 Etiopatogenéza obezity

Obezita je typickým multifaktoriálnym ochorením, na jej vzniku sa podieľa mnoho rozličných faktorov vonkajšieho prostredia a taktiež aj genetická predispozícia (Hainer et al., 1997).

Na vzniku obezity sa môžu podieľať viaceré činitele:

Výživa – prevažnú väčšinu prípadov obezity predstavuje nutrične podmienená obezita. Súčasný spôsob výživy charakterizuje nadmerný príjem tuku, zvýšená konzumácia sladkostí a sladených alebo alkoholických nápojov.

Fyzická aktivita – v súčasnom spôsobe života prevažujú sedavé činnosti, ktoré v kombinácii s nedostatkom pohybu alebo športových aktivít vo voľnom čase, vedú k zníženiu výdaju energie, čím sa podporuje vznik obezity.

Genetické faktory – ak je jeden z rodičov obézny, zvyšuje sa riziko výskytu obezity u potomstva na 40 %, ak na obezitu trpia obaja rodičia, pravdepodobnosť narastá až na 80 % (Béder, 2005).

U veľkej väčšiny prípadov ľudskej obezity sa genetické predpoklady na jej vzniku podieľajú polygénne, t.j. obezita je daná spoločným pôsobením rady genetických faktorov. Existuje však aj niekoľko prípadov monogénneho typu obezity (Hainer et al., 1997)

Psychologické faktory – stresové situácie, frustrácie, depresie, osamelosť môžu u niektorých osôb viesť k zvýšenému príjmu potravy. Niektoré stravovacie návyky v rodine môžu tiež podporovať vznik obezity.

Endokrinné faktory - poruchy funkcie žliaz s vnútorným vylučovaním môžu spôsobiť poruchu regulácie príjmu potravy, navodiť pokles energetickej spotreby v organizme a nadmerné ukladanie tuku (Béder, 2005).

### **1.5.5 Komplikácie obezity**

Nadhmotnosť a obezita ovplyvňujú telesné i duševné zdravie a hrajú významnú úlohu v rozvoji najzávažnejších chronických neinfekčných chorôb, medzi ktoré zaradujeme:

- kardiovaskulárne ochorenia – ischemická choroba srdca, hypertenzia, cieвне mozgové príhody, varikózna choroba žíl, tromboembolická choroba,
- metabolické ochorenia – inzulínová rezistencia, porucha glukózovej tolerancie, diabetes mellitus 2. typu, dyslipidémia, hyperurikémia,
- onkologické ochorenia – rakovina hrubého čreva, rakovina prsníka, maternice, vaječníkov, rakovina žľáz a žlčových ciest, pankreasu, pečene,
- gynekologické ochorenia – poruchy menštruačného cyklu, neplodnosť, komplikácie v gravidite a pri pôrode, gynekologické zápaly,
- choroby kĺbov, kostrového a svalového systému – degeneratívne ochorenia kĺbov a chrbtice
- kožné ochorenia – ekzémy, mykózy, celulitída

a v neposlednom rade psychosociálne poruchy – nízke sebavedomie, poruchy motivácie, depresia, úzkosť, bulímia, anorexia (Olvecká, 2009).

**Tabuľka č. 5** Riziko zdravotných komplikácií súvisiacich s obezitou

Vysoké riziko	Stredné riziko	Mierne riziko
cukrovka II. typu	ischemická choroba srdca	Zhubné nádory (prsník, maternica, hrubé črevo)
choroby žlčových ciest	vysoký krvný tlak	hormonálne poruchy
zvýšená hladina cholesterolu v krvi	choroby pohybového ústrojenstva	poruchy plodnosti, potraty
dušnosť	dna	bolesti brucha
nespavosť		komplikácie v gravidite

Zdroj: Béder, 2005

### **1.5.6 Liečba obezity**

#### Dietoterapia

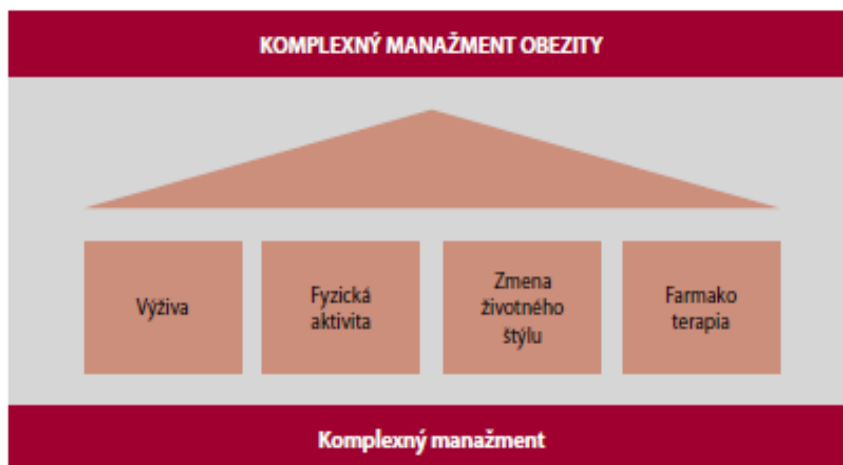
Najčastejšie používanou je nutrične plnohodnotná vyvážená pestrá strava so zníženým obsahom tuku a energie. Obsah energie je znížený o 2500 KJ v závislosti od príjmu a výdaja energie. Celkový denný príjem je rozdelený do 4 až 5-tich jedál.

#### Zmena životného štýlu

Tento pilier liečby obezity patrí do rúk psychológa. Najčastejšie sa uplatňuje skupinová kognitívne behaviorálna liečba, ktorá má za cieľ eliminovať nevhodné stravovacie a pohybové návyky a naučiť obézneho pacienta nahradiť nevhodné myšlienky a sebaobviňovanie pozitívnym prístupom k novému životnému štýlu. Napriek nesporným výhodám skupinovej liečby rovnaké výsledky možno dosiahnuť aj individuálnym prístupom.

#### Farmakoterapia

Farmakoterapia je indikovaná ako súčasť komplexnej liečby u všetkých pacientov s BMI nad 30 aj u pacientov s nadváhou s BMI > 27 ak majú aspoň dva rizikové faktory obezity. Lieky môžu zasahovať do príjmu a výdaja energie ovplyvňovaním termogenézy, pocitu sýtosti alebo interferenciou so vstrebávaním tukov. V súčasnosti dostupné lieky možno rozdeliť podľa toho, či účinkujú prostredníctvom centrálného nervového systému (CNS) alebo nie (Majerčák, 2008).



**Obrázok č. 5** Komplexný manažment obezity

Zdroj: Kamenský, 2010

## 1.6 Metódy identifikácie génov príjmu potravy

### 1.6.1 Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázová reťazová reakcia patrí k najprogressívnejším molekulárno-biologickým metódam so širokým spektrom využitia v rôznych oblastiach biologického výskumu, ktorá umožnila rozvoj takých vedných disciplín ako humánna a veterinárna medicína, genetika človeka, rastlín a mikroorganizmov a pod.

Polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction, PCR) je metóda na zmoženie (amplifikáciu) definovaného úseku DNA v podmienkach *in vitro*. Pomocou PCR je možné vytvoriť milióny kópií úseku DNA v priebehu niekoľkých hodín (Štefanovičová a kol., 1998).

Analyzovaná DNA môže pochádzať z rôznych zdrojov: z jedného ľudského vlasu, kvapky zaschnutej krvi, z mozgu múmie alebo 40 tisíc starého mamuta zmrznutého v ľadovci (Bauerová a kol., 2004).

Princíp PCR spočíva v cyklickom opakovaní troch krokov.

1. Denaturácia – oddelenie obidvoch komplementárnych reťazcov daného úseku DNA zohriatím na 94 ° C.
2. Hybridizácia – naviazanie dvoch komplementárnych primerov po jdenom na 3'-koniec obidvoch reťazcov rozmnožovaného úseku, získaných denaturáciou pri teplote 50 ° C (teplota závisí od druhu a dĺžky primerov).
3. Syntéza chýbajúceho komplementárneho úseku DNA – prebieha pri optimálnej teplote 72 ° C, a to vždy v smere k protiláhlému primeru, ktorý je uložený na druhom vlákne. Po skončení syntézy je vytvorená kompletná kópia pôvodného dvojvláknového úseku DNA ohraničeného primermi (Sršeň, 2005)

Zahriatím jednovláknovej DNA na > 90 ° C sa táto rozpletie (denaturuje) na dve jednovlákná a umožní primerom naviazať sa (hybridizovať) na komplementárne miesta jednovláknovej DNA. Tento krok prebieha pri teplote 45 – 70 ° C, v závislosti na viacerých faktoroch. Použité primery definujú, ktorý úsek DNA sa bude amplifikovať (Štefanovičová a kol., 1998).

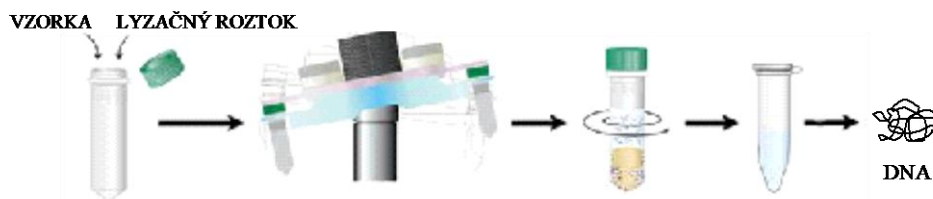
Polymerázová reťazová reakcia sa uskutočňuje vtedy, ak sú v reakčnom prostredí prítomné nasledovné zložky: termostabilná DNA polymeráza, tlmivý roztok, deoxyribonukleozidtrifosfáty (dNTP-dATP, dGTP, dCTP, dTTP), primery a templátová DNA (Bauerová a kol., 2004).

## PCR-RFLP

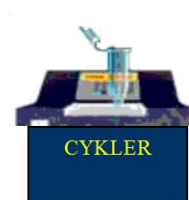
### 1. ODBER VZORIEK



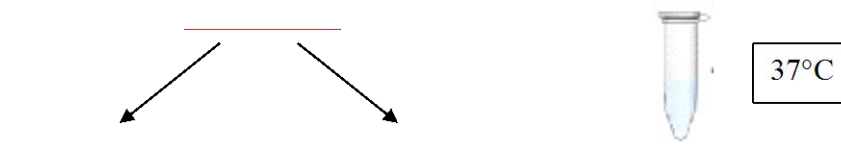
### 2. IZOLÁCIA DNA



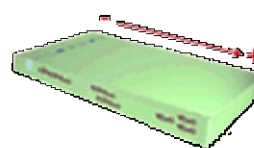
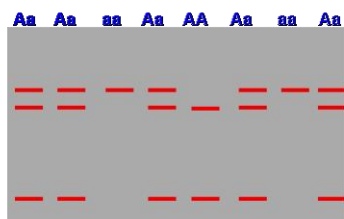
### 3. PCR



### 4. RESTRIKČNÁ ANALÝZA



### 5. ELEKTROFORÉZA A VYHODNOTENIE



**Obrázok č. 6** Schéma postupu pri realizácii PCR-RFLP

Zdroj: Štefanovičová, 1998

#### 1.6.2 Využitie PCR

1. Genetický výskum a klinická genetika - v tejto oblasti sa PCR využíva predovšetkým pri diagnostike geneticky podmienených chorôb. V súčasnosti existuje okolo 5000 monogénových chorôb spôsobených mutáciou v jednom gène. Stačí teda zámena

jedného nukleotidu na vznik abnormality, ktorá vyvoláva vážne ochorenie (Štefanovičová, 1998).

Patrí sem: Mapovanie génov

Detekcia mutácií

Identifikácia génov

Vytváranie nových sond

Prenatálna a postnatálna diagnostika klinickogenetických jednotiek

Včasná predsymptomatická diagnostika

Určovanie pohlavia

Skríning heterozygotov v rodinách a v geneticky zaťažených populáciách

(Sršeň, 2005).

2. Klinické disciplíny - PCR umožňuje včasnú detekciu niektorých ochorení spôsobených vírusmi, ktoré sú ešte v latentnom stave (nevytvárajú vírusové častice) a v prípade sporných a nejasných sérologických analýz. Taktiež umožňuje detekciu patogénnych baktérií v prípadoch nízkej citlivosti štandardných kultivačných metód, resp. obtiažnej kultivácie (Štefanovičová, 1998).

Patrí sem: Detekcia patogénnych činiteľov

Sledovanie vývoja rezistencie patogénov na lieky

Onkológia

Monitorovanie terapie malígnych procesov

Detekcia vnímavosti na dedičné choroby a malígne procesy

Sprešňovanie HLA-kompatibility pri transplantáciách

Rekombinantné liečivá a vakcíny

Analýzy bezchybnosti krvi, plazmy a identifikácia osôb (Sršeň, 2005).

3. Súdne lekárstvo – kriminalistika a identifikácia osôb - analyzuje sa DNA z biologických stôp (krv, spermie, sliny) páchatel'ov trestných činov, pričom sa aplikuje metóda *DNA fingerprintingu* (odtlačku DNA).
4. Sporná paternita a identifikácia príbuzných
  - analýza podobnosti u matky dieťaťa a u domnelého otca je jedna z prvých metód používaná v paternitných expertízach. Patrí sem veľký počet antroposkopických a antropometrických znakov.
  - analýza polymorfizmov v oblasti erytrocytových krvných skupín, sérových proteínov a izoenzymových variantov znamenala už určitý pokrok.



- HLA-systém. V súčasnosti je známych viac ako 80 antigénov HLA-A, HLA-B a HLA-C. Ich vyšetrenie má už vysokú vylučovaciu výpoveď pre sporného otca (približne 96 %).
  - Priame vyšetovanie genotypu u účastníkov spornej paternity má najvyššiu vylučovaciu schopnosť a predstavuje prakticky konečný dokazovací stupeň, ktorý bude možné v budúcnosti vylepšiť len z metodického hľadiska (Sršeň, 2005).
5. Historická antropológia, archeológia a vývojová biológia - predmetom skúmania tejto disciplíny je DNA izolovaná zo zvyškov tiel dávnych ľudských populácií, ktorá poskytuje možnosť ďalšieho štúdia genetickej diverzity a evolúcie človeka, skúmania príbuzenských vzťahov, ako aj možnosti genetickej identifikácie jedincov, determinácie pohlavia, či detekcie chorôb u vymretých populácií (Štefanovičová, 1998).

### **1.6.3 Bodové (génové) mutácie**

Princíp hodnotenia nutričného stavu a prípadne porúch metabolizmu je založený na vyjadrení mutácií génov príjmu potravy, regulácie či výdaja energie. Mutácia je zmena poradia nukleotidov v molekule DNA. (Kúbek, 2000). Vhodnou metódou na ich identifikáciu bolo využitie PCR metódy a jej modifikácie.

## 2 Cieľ práce

Cieľom diplomovej práce bolo:

- charakterizovať genetický polymorfizmus génov leptín a ghrelín regulujúcich príjem potravy
- na vybranej populácii mužov a žien identifikovať genetický polymorfizmus leptínu
- analyzovať vplyv polymorfizmu génu leptín na nutričné parametre výživy, a to cholesterol, glukózu a BMI.

### 3 Materiál a metodika práce

#### 3.1 Biologický materiál

Pre vykonanie analýzy génu *LEP* bol použitý biologický materiál získaný z krvi humánných vzoriek. Krv sme odobrali skupine 24 náhodne vybraných ľudí zmiešaného pohlavia, pričom dobrovoľníkom sme neurčili žiadne obmedzenia pred samotným odberom. Odber humánných vzoriek prebiehal v spolupráci s Katedrou výživy ľudí.

**Tabuľka č. 6** Zloženie pozorovanej skupiny

Pohlavie	Počet	Percentá
Muži	9	37,5 %
Ženy	15	62,5 %

Po odobratí bola vzorka spracovaná nasledovnými krokmi:

#### 3.2 Izolácia DNA

Pred samotnou PCR metódou sme si museli izolovať ľudskú DNA z krvi. DNA bola izolovaná z periférnej krvi pomocou izolačného setu NucleoSpin Blood. Použitá bola tiež klasická vysolovacia metóda a tiež izolácia DNA z krvných škvŕn. Izolácia genómovej DNA z krvi prebiehala v niekoľkých krokoch.

Lýza buniek

1. Pripravili sme si potrebné množstvo 2 ml eppendorfiiek s 1x RBC roztokom (1500  $\mu$ l/vzorku).
2. Krv sme premiešali pipetou a napipetovali 300  $\mu$ l celkovej krvi do 2 ml eppendorfky s 1000  $\mu$ l 1x RBC roztokom. Inkubovali sme vzorku 1-3 minúty pri laboratórnej teplote a premiešali 3 x obracanim hore dnom.
3. Eppendorfky sme centrifugovali pri 13 000 otáčkach 2 min. Odstránili sme supernatant, ale nechali 10-20  $\mu$ l roztoku na peletoch bielych krviniek.
4. Vzorky sme vortexovali 10-20 sekúnd. Po vortexovaní by pelet bielych krviniek nemal byť viditeľný!
5. Pridali sme 600  $\mu$ l lyzačného roztoku a pipetovaním hore a dole 3-5 krát sme lyzovali bunky.

### Percipitácia (zrážanie) proteínov

1. Vzorky sme ochladili na laboratórnu teplotu.
2. K lyzovaným vzorkám sme pridali 200 µl roztoku na percipitáciu proteínov.
3. Vortexovali sme pri najvyššej rýchlosti 20 sekúnd, aby sa roztok na percipitáciu proteínov dôkladne premiešal s bunkovým lyzátom.
4. Vzorky sme centrifugovali pri maximálnych otáčkach (13 000) pri teplote 20 – 25 °C 20 minút. Percipitované proteíny vytvorili pevný tmavohnedý pelet na dne eppendorfky.

### Percipitácia DNA

1. Supernatant obsahujúci DNA sme odliali do čistej 1,5 ml eppendorfky obsahujúcej 600 µl 100 % izopropanolu.
2. Vzorky sme premiešali obrátením 50 –krát.
3. Centrifugovali sme ich pri 13 000 otáčkach 5 min. DNA bolo viditeľné ako malý biely pelet.
4. Dôkladne sme odpipetovali supernatant. Pridali sme 600 µl 70 % etanolu a premyli pelet DNA obrátením uzatvorenej eppendorfky niekoľkokrát hore-dole.
5. Eppendorfky sme centrifugovali pri 13 00 otáčkach rpm 5 minút. Potom sme veľmi dôkladne odpipetovali etanol. Museli sme dávať pozor na pelet, ktorý plával, aby sme ho neodpipetovali.
6. Vzorky sme dali vysušiť do termostatu pri teplote 37 °C 10-15 minút, alebo dlhšie, podľa potreby v závislosti od veľkosti peletu.

### Rozpustenie DNA

1. Na rozpustenie DNA sme pridali potrebné množstvo 30 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,5, aby sme mohli zriediť pre prípad potreby.
2. Vzorky DNA sme rozpúšťali inkubáciou po dobu 30 minút až 1 hodiny pri 65 °C, alebo cez noc pri laboratórnej teplote. Vzorky sme periodicky premiešavali pobrnkaním skúmaviek na uľahčenie rozpúšťania DNA.
3. DNA sme skladovali pri teplote 4 °C. Pre dlhodobé skladovanie sa DNA uskladňuje pri teplote -20 alebo -80 °C.

### Použité roztoky

Roztok na lýzu červených krviniek – 5x RBC roztok

Zloženie:	250 ml
0.77M NH <sub>4</sub> CL	10,1968g
0.046M KHCO	1,1514g
0.01M EDTA pH 8.0	5 ml 0,5M EDTA
Sterilizované filtráciou.	

#### Lyzačný roztok

Zloženie:	100 ml
50mM Tris-HCL pH 8,0	5 ml 1M Tris-HCL pH 8,0
100mM EDTA pH 8,0	20ml 0.5M EDTA pH 8,0
100mM NaCl	2ml 5M NaCl
1% SDS	10ml 10% SDS
H <sub>2</sub> O MiliQ	do 100ml

#### Roztok na percipitáciu proteínov:

Zloženie:	
10M octan amónny	

#### Roztok na rozpúšťanie DNA:

Zloženie:	
10mM Tris- HCl ph 8,5	

#### Roztok pre elektroforézu:

Zloženie:	
50 x TAE	
Pre elektroforézu sme použili 1 x TAE.	
Alternatívny roztok:	
10 x TBE	

### 3.2.1 Izolácia DNA z krvných škvŕn

Izoláciu DNA sme uskutočnili z krvnej škvŕny nanesej na FTA papier podľa metódy Smith et al. (2004).

### *Postup izolácie:*

1. Z krvavej škvvrny lokalizovanej na FTA papier sme vystrihli krúžok s priemerom 1-3 mm a vložili sme ho do 1,5 ml ependorfky.
2. Do ependorfky sme pridali 500µl 10 mM NaOH a dvakrát sme to premývali 15 minút
3. Po premytí sme premývali v 500µl TE: voda (1:5), ktorá obsahovala 1mg/ml BSA
4. Následne sme odpipetovali premývací roztok TE a ependorfku s krúžkom papiera sme nechali vysušiť pre teplotu 37°C po dobu 15 minút
5. Získaný krúžok papiera s naviazanou DNA sme následne použili do PCR reakcie.

### **3.2.2 Izolácia DNA z periférnej krvi**

Izolovanú DNA z periférnej krvi sme získali pomocou setu NucleoSpin Blood od firmy Macherey-Nagel.

#### **Príprava setu na použitie:**

- po prvom otvorení setu sme rozpustili Proteinase K: do fľaštičky sme pridali 1,35 ml roztoku Proteinase Buffer. Po použití sme vložili do chladničky.
- pridali sme 28 ml 96% etanolu ku 7 ml Bufferu B5.
- preliali sme Buffer B1 ku reagentu B2 a dobre zamiešali, tým vznikol Buffer 83.
- ak je precipitát v roztokoch B3 alebo B1, rozpustíme ho inkubáciou pri 70°C.

#### **Postup izolácie DNA:**

- pred začiatkom izolácie sme nastavili vodný termostat na 70°C, zohriali buffer BE na 70°C
- do 1,5 ml mikroskúmavky sme pridali 200ul krvi a 25ul proteínázy K.
- pridali sme 200ul lýzovacieho pufru B3 a vortexovali 10-20sek.
- vzorku sme inkubovali 10-15 min. pri 70°C. Vzorka počas inkubácie zhnedla.
- ku vzorke sme pridali 210 ul 96% etanolu a zvortexovali.
- vzorku sme preniesli do separačnej kolónky vloženej do 2ml - centrifugačnej skúmavky
- centrifugovali sme 1 min. 11 000g, kolónku sme vybrali, centrifugačnú skúmavku zahodili.
- kolónku sme vložili do novej 2ml skúmavky a pridali 500ul pufru BW

- centrifugovali sme 1 min., 11 000 g, prefiltrovanú tekutinu sme z centrifugačnej skúmavky vyliali, do kolónky sme pridali 600ul pufu B5
- centrifugovali sme 1 min., 11 000 g, obsah centrifugačnej skúmavky sme vyliali
- prázdnu kolónku sme centrifugovali v centrifugačnej skúmavke 1 min 11000 g.
- predhriali sme BE buffer na 70°C
- kolónku sme vložili do 1,5ml skúmavky a pridali 100ul bufferu BE (70°C). Pufor sme naliali priamo na silikátovú membránu.
- Inkubovali sme 1 min. pri laboratórnej teplote.
- Centrifugovali sme 1 min. 11000g. Kolónku sme odstránili, skúmavku s roztokom DNA sme si označili, a takto označenú ju môžeme uschovávať pri teplote 4 - 8°C, pre archiváciu pri -20 C.

### 3.3 Meranie koncentrácie a čistoty DNA

Koncentráciu a čistotu DNA sme merali pomocou spektrofotometra. Maximum absorpcie pri DNA je pri vlnovej dĺžke 260 nm. Pomer absorpcie pri 260 nm a 280 nm sa používa na určenie čistoty vzorky. Ak je pomer absorpcie pri týchto vlnových dĺžkach v rozmedzí 1,8 – 2,0, tak je naša vzorka čistá. Hodnoty menšie ako 1,8 dokazujú prítomnosť nečistôt alebo bielkovín. V takomto prípade je potrebná úprava Master mixu

### 3.4 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

PCR reakcia prebiehala v objeme 25µl. Použili sme komerčný PCR Master Mix (Fermentas), 4x MgCl<sub>2</sub>.

Oligonukleotidové primery pre amplifikáciu *LEP/HhaI* génu boli prevzaté z práce *Stratil et al. (1997)*:

*LEP* FOR: 5' ATG CGC TGT GGA CCC CTG TAT 3'

*LEP* REV: 5' TGG TGT CAT CCT GGA CCT TCC 3'

Optimalizácia teplotného a časového profilu PCR pre jednotlivé gény:

#### LEP

1. 94°C – 3 minúty
2. 94°C – 45 sekúnd

3. 60°C - 45 sekúnd      30 cyklov
4. 72°C – 60 sekúnd
5. 72°C - 5 minút

**Tabuľka č. 7** Zloženie PCR zmesi na 1 vzorku (objem 25 µl)

Zložka	Množstvo
Superčistá voda	17,1 µl
Tag buffer with KCl	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,7 µl
D NTP Mix	0,5 µl
Primer FOR	1 µl
Primer REV	1 µl
Tag polymeráza	0,2 µl
<b>DNA</b>	<b>1 µl</b>

### 3.5 Reštrikčná analýza PCR produktov (PCR – RFLP)

Pre reštrikčnú analýzu sme vybrali špecifické enzýmy štiepiace PCR produkty so známou sekvenciou. PCR produkty *LEP* génu sa štiepia endonukleázou *HhaI*.

**Tabuľka č. 8** Priebeh štiepenia reštrikčným enzýmom

Gén	Názov	RE miesto	Teplota štiepenia	Doba inkubácie
<b>LEP</b>	<i>HhaI</i> a ďalšie	GCG↓C	37°C	16 hodín

V prípade použitia ďalších reštrikčných endonukleáz, budú vyhľadané ďalšie štiepne miesta a bude nutná optimalizácia teplotných profilov ako aj doba inkubácie.

### 3.6 Elektroforéza

Identifikácia a analýza produktov po izolácii, amplifikácii a štiepení sa uskutočňuje elektroforetickou separáciou. Horizontálna gélová elektroforéza prebieha v TBE tlmiacom roztoku. Koncentrácia agarózy sa volí podľa očakávanej veľkosti fragmentov. Elektroforéza prebieha pri elektrickom napätí 80-120 V po dobu 30 - 90 minút. Gél môže obsahovať interkalačné činidlo etídium bromid. Po skončení elektroforézy sa naštiepené PCR produkty detekujú pod UV transiluminátorom.



### 3.7 Matematicko-štatistická analýza

Na vyhodnotenie získaných údajov sme použili nasledovné matematicko-štatistické metódy:

$$1. \text{ Výpočet frekvencií alel - } p_A = \frac{2 \cdot AA + AC}{2n}$$
$$q_C = \frac{2 \cdot CC + AC}{2n},$$
$$p(A) + q(C) = 1$$

kde:  $p_A$  = frekvencia alely A

$q_C$  = frekvencia alely C

AA = počet jedincov s genotypom AA

AC = počet jedincov s genotypom AC

CC = počet jedincov s genotypom CC

n = počet jedincov spolu

#### 2. Parametre nutričného stavu

$$\text{BMI} = \frac{\text{hmotnosť (kg)}}{\text{výška}^2 (\text{m}^2)}$$

Glukóza a cholesterol boli vyjadrené priemernými hodnotami, kde sa použili tieto vzorce

Aritmetický priemer - je podiel súčtu hodnôt a ich počtu.

Vypočíta sa podľa vzorca

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}, \text{ resp. } \bar{x} = \frac{f_1 x_1 + f_2 x_2 + \dots + f_n x_n}{f_1 + f_2 + \dots + f_n}$$

Smerodajná odchýlka -

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

Variačný koeficient -  $v = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$  [100 %]

Štatistickú významnosť rozdielov podľa genotypov sme otestovali využitím t-testu

Medzi sledovanými parametrami boli vypočítané korelačné koeficienty. Korelačná analýza sa používa na analýzu závislostí (vzťahov) medzi kvantitatívnymi štatistickými

znakmi (opakom je meranie asociácií). Úlohou korelačnej analýzy je nájsť vhodnú regresnú funkciu (funkčný predpis) a zmerať silu (tesnosť) tejto závislosti.

**Tabuľka č. 9** Kategorizácia korelačného koeficientu

Korelácia	Negatívna	Pozitívna
Slabá	-0.29 $\Leftrightarrow$ -0.10	0.10 $\Leftrightarrow$ 0.29
Mierna	-0.49 $\Leftrightarrow$ -0.30	0.30 $\Leftrightarrow$ 0.49
Silná	-0.70 $\Leftrightarrow$ -0.50	0.50 $\Leftrightarrow$ 0.70
Veľmi silná (perfektná)	-1.00 $\Leftrightarrow$ -0.70	0.70 $\Leftrightarrow$ 1.00

Zdroj: Kováč, 2008

## 4 Výsledky

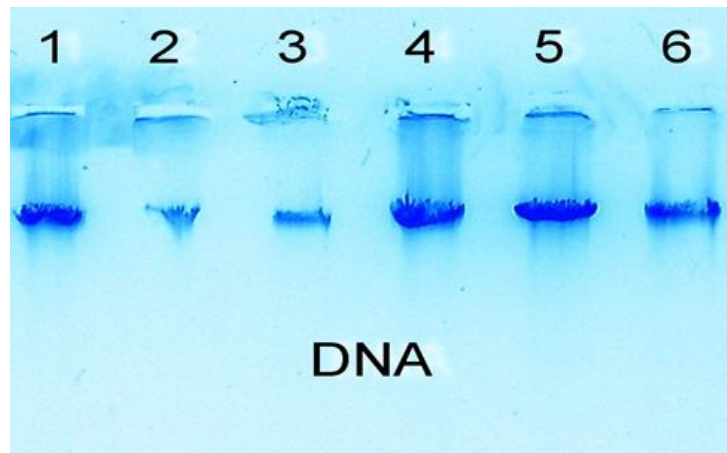
V praktickej časti práce sme sa zamerali na hodnotenie génu leptín a jeho vplyvu na zvolené nutričné parametre:

- cholesterol,
- glukózu
- BMI.

Súčasťou výskumu bolo taktiež zistenie vplyvu pohlavia na tieto parametre a rovnako aj definovanie vzájomných vzťahov medzi týmito tromi zvolenými parametrami. Výskum prebiehal na vzorke 24 náhodne vybraných ľudí zmiešaného pohlavia, s počtom žien 15 a mužov 9.

### 4.1 Meranie koncentrácie a čistoty DNA

Po izolácii DNA sme overovali čistotu DNA pomocou prístroja spektrofotometer. Aj z fotodokumentácie je zrejmé, že výtázky DNA boli výborné vo vzorkách 1,4,5 a 6. Naopak vo vzorkách 2 a 3 bolo potrebné ošetriť Master mix.



**Obrázok č. 7** Overenie prítomnosti DNA po izolácii na 1 % agarózovom gély

V tabuľke môžeme vidieť, že nie všetky získané vzorky vykazujú požadovanú čistotu. V takomto prípade je potrebná úprava Master mixu. Farebne sú zvýraznené vzorky, pri ktorých bolo potrebné vykonať túto úpravu.

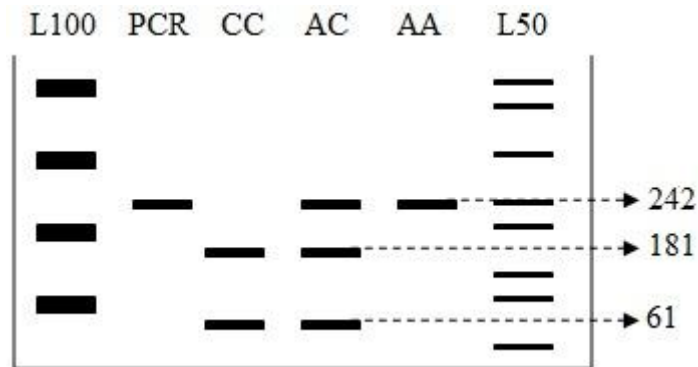
**Tabuľka č. 10** Koncentrácia a čistota DNA

číslo vzorky	koncentrácia	A260/A280	A260/A230
1	196,0	1,854	1,177
2	117,0	1,553	0,601
3	20,5	1,783	0,281
4	61,0	1,743	0,521
5	10,1	2,222	0,476
6	17,5	1,842	0,193
7	106,0	1,782	1,525
8	47,5	1,827	0,660
9	98,5	1,841	0,842
10	117,0	1,864	0,850
11	141,0	1,831	0,954
12	64,0	1,753	0,895
13	183,0	1,710	1,402
14	257,0	1,633	1,417
15	192,0	1,820	1,460
16	62,0	1,722	0,821
17	167,0	1,856	1,128
18	248,0	1,716	1,170
19	11,5	2,556	0,128
20	247,0	1,436	0,843
22	212,0	1,305	0,793
22	32,5	1,413	0,289
23	75,0	1,829	0,811
24	54,0	1,742	0,915

PCR metóda bola uskutočnená použitím priemerov FOR a REV v celkovom objeme 25  $\mu$ l s počtom cyklov 30.

## 4.2 PCR - RFLP

PCR produkt bol štiepený reštrikčným enzýmom *HhaI* a vizualizovaný na 2 % agarózovom géli. Boli zistené 3 genotypy CC (182 bp+61 bp), AC (242 bp+181 bp+61 bp) a AA (242 bp). Túto skutočnosť zobrazuje obr. 8.



**Obrázok č. 8** Schématické zobrazenie štiepných fragmentov *LEP* génu 242 bp pomocou reštrikčného enzýmu *HhaI*

Na schematickom zobrazení štiepných fragmentov *LEP* génu je znázornených 6 dráh. V prvej dráhe sa nachádza L100 ladder (markér) s dĺžkou 100 bp, v druhej dráhe PCR produkt o dĺžke 242 bp, v tretej dráhe homozygot CC s dĺžkou 181bp+61 bp, vo štvrtej dráhe heterozygot AC s dĺžkou 242bp+181bp+61bp, v piatej dráhe homozygot AA s dĺžkou 242 bp a v poslednej šiestej dráhe je to DNA ladder L50 s dĺžkou 50 bp.

## 4.3 Základná charakteristika súboru

Po genotypizácii sme zistili alelické frekvencie génu leptín v pozorovanej populácii. Sledovaná populácia je zostavená náhodným výberom jej členov, napriek tomu frekvencie alel vykazujú približne rovnocenné výsledky. Najčastejším genotypom u žien bol homozygotný genotyp AA. U mužov bol najčastejší heterozygotný genotyp AC, celkovo v pozorovanej populácii prevládal taktiež tento typ genotypu. Výsledky zhrňuje tab. 11.

**Tabuľka č. 11** Genotypy *LEP<sup>HhaI</sup>* sledovaného súboru

Sledovaná skupina	Počet	Genotyp			Alely	
		AA	AC	CC	A	C
ženy (15)	n	7	5	3	0,63	0,37
	%	46,7	33,3	20		
muži (9)	n	2	6	1	0,56	0,44
	%	22,2	66,7	11,1		
Spolu (24)	n	9	11	4	0,60	0,40
	%	37,5	45,8	16,7		

**Tabuľka č. 12** Sledované nutričné parametre v hodnotenej skupine

Parameter	n	Priemer $\bar{x}$	Smerodajná odchýlka $\sigma$	Variačný koeficient v %	min	max
CHOL mmol/l	24	5,35	1,05	19,66	3,46	7,18
GLU mmol/l	24	4,91	0,71	14,40	3,52	6,48
BMI kg/m <sup>2</sup>	24	25,19	2,63	10,45	18,60	29,80

Pomocou základnej štatistiky sme zhodnotili sledovaný súbor populácie, pričom zistené hodnoty porovnáme s výživovými odporúčaniami. Priemerná hladina celkového cholesterolu má hodnotu 5,35 mmol/l, čo predstavuje zvýšené riziko pre celkový zdravotný stav. Odporúčaná hladina celkového cholesterolu je 3,9 až 5,2 mmol/l. U niektorých jedincov namerané hodnoty predstavujú vysoké riziko ohrozenia zdravia, nakoľko sa pohybujú nad hodnotami 6,2 mmol/l a viac. Hodnoty pre glukózu vykazujú mierne zvýšenie u jedincov mužského pohlavia, avšak priemerná hodnota 4,91 mmol/l sa nachádza v rámci normy, ktorá predstavuje hladinu cukru v krvi do 6,00 mmol/l. Zvýšená hladina cukru v krvi mohla byť spôsobená aj bezprostrednou konzumáciou jedla pred meraním. Hodnota BMI vykazuje najmenšiu variabilitu (danú skutočnosť indikuje najnižšia hodnota variačného koeficientu), to znamená, že v danom štatistickom súbore sú

medzi hodnotami menšie rozdiely a teda aritmetický priemer má vyššiu vypovedaciu schopnosť.

V prípade, že je variačný koeficient štatistického súboru väčší ako 50%, aritmetický priemer ako zvolená štatistická metóda stráca vypovedaciu schopnosť. Nakoľko v skúmanom súbore variačné koeficienty štatistických znakov neprekračujú uvedenú hodnotu, môžeme považovať aritmetický priemer za relevantne zvolenú štatistickú metódu

**Tabuľka č.13** Sledované nutričné parametre v skupine mužov

Parameter	n	Priemer $\bar{x}$	Smerodajná odchýlka $\sigma$	Variačný koeficient v %	min	max
CHOL mmol/l	9	5,32	0,91	17,14	3,46	6,48
GLU mmol/l	9	5,30	0,63	11,87	4,63	6,48
BMI kg/m <sup>2</sup>	9	26,14	1,36	5,19	24,10	27,90

Na základe výsledkov, ktoré sme získali pomocou štatistickej analýzy, môžeme v závislosti od pohlavia skonštatovať, že v sledovanom súbore mužov sa priemerné hodnoty parametrov celkový cholesterol a glukóza pohybujú v rozmedzí odporúčaných hladín týchto parametrov. Priemerná hladina glukózy v krvi sa približuje k hraničným hodnotám, čo však môže byť ovplyvnené konzumáciou stravy bezprostredne pred nami vykonaným meraním. Jediným parametrom vykazujúcim zvýšenú hodnotu je BMI, nakoľko podľa odporúčaní sú hodnoty pre normálne BMI 20 – 24,9 kg/m<sup>2</sup>. Hodnota 26,14 kg/m<sup>2</sup>, nepredstavuje ešte obezitu, avšak už sa nachádza v kategórii nadváhy a tým predstavuje zvýšené riziko rozvoja obezity a s tým súvisiacich zdravotných problémov.

**Tabuľka č. 14** Sledované nutričné parametre v skupine žien

Parameter	n	Priemer $\bar{x}$	Smerodajná odchýlka $\sigma$	Variačný koeficient v %	min	max
CHOL mmol/l	15	5,37	1,16	21,58	3,50	7,18
GLU mmol/l	15	4,67	0,66	14,11	3,52	5,90
BMI kg/m <sup>2</sup>	15	24,61	3,06	12,45	18,60	29,80

Zistené priemerné hodnoty v parametri cholesterol prevyšujú odporúčania, pričom jednou z možných príčin zvýšenej hladiny cholesterolu môžu byť aj relatívne vysoké hodnoty BMI u niektorých žien nášho súboru. V skupine žien pozorujeme vyššie hodnoty pre cholesterol ako v skupine mužov. Priemerné hodnoty pre parameter glukóza sa v skupine žien rovnako, ako u mužov, pohybujú v rozmedzí odporúčaných hodnôt. Avšak na rozdiel od skupiny mužov, v skupine žien sa priemerné hodnoty nepribližujú k maximu odporúčaných hodnôt, teda môžeme predpokladať, že nami vybraná vzorka žien bude vykazovať nižšie hladiny glukózy nezávisle od príjmu jedla pred samotným meraním. Priemerná hodnota BMI v skupine žien spadá do hranice normálnych hodnôt, napriek tomu môžeme pozorovať pomerne veľké rozdiely medzi minimálnou a maximálnou hodnotou BMI. Zatiaľ čo hodnota 18,60 kg/m<sup>2</sup> spadá do intervalu od 17-19,90 kg/m<sup>2</sup>, ktorý charakterizujeme ako chudosť, maximálna hodnota u žien 29,80 kg/m<sup>2</sup> sa približuje už k hodnotám hraničiacim s hodnotami pre obezitu (30 – 39,9 kg/m<sup>2</sup>). Z celkového pozorovaného súboru vykazujú ženy vyššie hodnoty BMI ako muži.

#### 4.4 Leptín a jeho vzťah k hodnoteným parametrom

V nasledujúcej časti práce sa budeme venovať vplyvu troch genotypov: AA, AC a CC na nami stanovené tri parametre výživového stavu.



**Tabuľka č. 15** Vplyv genotypu na sledované nutričné parametre

Parameter	Genotyp	n	priemer $\bar{x}$	Smerodajná odchýlka $\sigma$	Variačný koeficient v %	min	max
CHOL mmol/l	AA	9	5,58	1,09	19,55	3,65	7,18
	AC	11	5,08	1,11	21,82	3,46	6,80
	CC	4	5,58	0,84	15,11	4,68	6,48
GLU mmol/l	AA	9	4,91	1,05	21,50	3,52	6,48
	AC	11	4,75	0,33	6,87	4,33	5,30
	CC	4	5,36	0,38	7,14	5,00	5,72
BMI kg/m <sup>2</sup>	AA	9	25,31	2,59	10,25	21,50	29,70
	AC	11	24,66	2,64	10,70	18,60	27,90
	CC	4	26,35	3,02	11,47	22,50	29,80

V sledovanom súbore sme hodnotili aj vzťahy medzi jednotlivými genotypmi a ich vplyvmi na skúmané parametre. V parametri cholesterol najvyššie hodnoty vykazujú homozygotné genotypy AA a CC. Priemerné hodnoty pri týchto genotypochoch prevyšujú odporúčanú hladinu cholesterolu, teda tieto genotypy sa javia ako negatívne ovplyvňujúce celkový cholesterol v krvi. U genotypu CC môžeme pozorovať najnižšiu hodnotu variačného koeficientu, na základe čoho sa dá povedať, že jedinci s týmto genotypom mali menšie rozdiely v nameraných hodnotách, ako jedinci s iným typom genotypu. Najnižšie namerané hodnoty sa vyskytujú u heterozygotného genotypu AC. V parametri glukóza boli najvyššie hodnoty namerané u genotypu CC. Avšak v tomto prípade nevykazuje tento genotyp najnižší variačný koeficient. Tak, ako aj u predchádzajúceho parametru, aj v tomto prípade sa najnižšie hodnoty vyskytujú pre genotyp AC. V poslednom parametri, BMI, rovnako ako v glukóze, sa najvyššie hodnoty vyskytujú opäť pri homozygotnom genotype CC. Avšak tu, na rozdiel od parametru cholesterol, kde genotyp CC vykazoval najnižší variačný koeficient, vykazuje naopak najvyššie hodnoty variačného koeficientu, čo značí, že minimálne a maximálne hodnoty jedincov tejto skupiny sa v parametri BMI líšili najviac práve v genotype CC. Do tretice sa nám potvrdilo, že heterozygotný genotyp AC vykazuje najnižšie hodnoty. Zo zistených výsledkov môžeme konštatovať, že vo všeobecnosti sa najvyššie hodnoty pre nami sledované parametre vyskytujú u homozygotného typu genotypu CC. Naopak najnižšie hodnoty pozorujeme

u heterozygotného typu genotypu AC. Strednú hodnotu predstavuje homozygotný genotyp AA, u ktorého však môžeme pozorovať výskyt maximálnych nameraných hodnôt takmer pre všetky skúmané parametre. Teda z hľadiska vplyvu na hodnoty meraných parametrov a ich dopadu na zdravie človeka sa javí ako najvhodnejší heterozygotný genotyp AC. Avšak tento jav je potrebné ďalej skúmať v rozsiahlejších štúdiách.

## 4.5 Štatistická preukaznosť rozdielov sledovaných parametrov

### 4.5.1 Štatistická preukaznosť rozdielov sledovaných parametrov v závislosti od pohlavia

Pomocou t-testu zistíme preukaznosť rozdielov, v tomto prípade konkrétne v závislosti od pohlavia.

**Tabuľka č. 16** Štatistická preukaznosť rozdielov v závislosti od pohlavia

Parameter	t-test	Stupne voľnosti	Diferencie preukaznosti
CHOL mmol/l muži/ženy	0,12	22	- 0,05 <sup>-</sup>
GLU mmol/l muži/ženy	2,33	22	0,63 <sup>+</sup>
BMI kg/m <sup>2</sup> muži/ženy	1,68	22	1,53 <sup>-</sup>

Po vyhodnotení t-testu sme zistili, že hodnoty celkového cholesterolu v nami sledovanej skupine nevykazujú žiadnu závislosť od pohlavia ( $p \geq 0,05$ ), tzn. že vyššie či nižšie hodnoty sa môžu vyskytovať rovnako v skupine mužov, ako aj v skupine žien. Podľa hodnoty diferencie preukaznosti, však môžeme konštatovať, že v nami sledovanej skupine sa vyššie hodnoty hladiny cholesterolu vyskytovali v skupine žien. Rovnako aj hodnota BMI nevykazuje závislosť od pohlavia ( $p \geq 0,05$ ). Pre tento parameter však boli vyššie hodnoty preukázané v skupine mužov. Jediným parametrom s pozitívnou závislosťou od pohlavia ( $p < 0,05$ ) je hladina glukózy v krvi. Pričom na základe predchádzajúcich výsledkov môžeme konštatovať, že predispozíciu k vyšším hladinám glukózy v krvi majú muži.

#### 4.5.2 Štatistická preukaznosť rozdielov v závislosti od genotypu

Pomocou t-testu sme hodnotili veľkosť vplyvu jednotlivých genotypov na hodnoty troch nutričných parametrov: cholesterolu, glukózy a BMI.

Tabuľka č. 17 Štatistická preukaznosť rozdielov v závislosti od genotypu

Znak		t-test	Stupne voľnosti	Diferencie preukaznosti
CHOL AA	CHOL AC	1,01	18	0,50
CHOL AA	CHOL CC	0,00	11	0,00
CHOL AC	CHOL CC	0,93	13	0,12
GLU AA	GLU AC	0,44	18	0,16
GLU AA	GLU CC	1,13	11	- 0,45
GLU AC	GLU CC	2,84	13	- 0,61 +
BMI AA	BMI AC	0,55	18	0,65
BMI AA	BMI CC	0,60	11	-1,04
BMI AC	BMI CC	0,99	13	- 1,69

Pomocou t-testu sme porovnávali štatistickú preukaznosť rozdielov v závislosti od typu genotypu. Pre parameter cholesterol nevykazuje ani jedna z kombinácií genotypov (AA:AC, AA:CC, AC:CC) pozitívnu štatistickú preukaznosť rozdielov ( $p \geq 0,05$ ). Porovnávanie genotypov AA:CC vykazuje nulovú závislosť. Teda vysoké, či nízke hladiny cholesterolu sa môžu vyskytovať s rovnakou pravdepodobnosťou u všetkých troch typov genotypu leptínu. Podľa hodnoty diferencie preukaznosti však z výsledkov v tabuľke vidíme, že najvyššie hodnoty cholesterolu vykazovali jedinci s homozygotným genotypom AA. Iné výsledky môžeme pozorovať pri parametri glukóza. V tomto prípade porovnávanie genotypov AA a AC, rovnako ako aj genotypov AA a CC nevykazuje štatistickú preukaznosť ( $p \geq 0,05$ ). Napriek tomu môžeme už na základe týchto výsledkov poukázať na fakt, že výrazne zvýšené hladiny glukózy sú preukazné pre genotyp CC, avšak ich preukaznosť nie je štatisticky významná. Pri porovnávaní genotypov AC a CC bola štatistická preukaznosť rozdielov potvrdená ( $p < 0,05$ ), tzn., že táto rozdielnosť je štatisticky významná. Tieto výsledky nám teda dokazujú, že mutácia genotypu CC výraznejšie zvyšuje konečnú koncentráciu glukózy v krvi. Parameter BMI, podobne ako aj cholesterol, nevykazuje významnú štatistickú preukaznosť rozdielov v závislosti od typu

genotypu ( $p \geq 0,05$ ). Aj pri tomto parametri však môžeme pozorovať výskyt najvyšších hodnôt pre homozygotný genotyp CC. V súlade so získanými výsledkami môžeme povedať, že z hľadiska ovplyvňovania skúmaných nutričných parametrov sa ako najvhodnejší pre udržanie si zdravia prospešných hodnôt javí heterozygotný genotyp AC, nakoľko u homozygotných typov AA a CC pozorujeme zvýšené hodnoty pre tieto nutričné parametre.

## 4.6 Korelačná analýza

V ďalšej časti výskumu sme sa zamerali na analýzu tesnosti lineárnej závislosti medzi zvolenými premennými/veličinami. Zo skúmanej skupiny troch premenných sa analyzovali vždy vzťahy medzi dvoma z nich. V praxi sa jednalo o:

- cholesterol
- glukózu
- BMI (Body Mass Index)

Do analyzovanej štatistickej skupiny bolo zahrnutých 24 jedincov, pričom výskum v oblasti korelácie medzi zvolenými štatistickými znakmi bol rozdelený do troch základných skupín; zahŕňal mužov, ženy a treťou skupinou boli sumárne výsledky za obe pohlavia.

### 4.6.1 Korelačná analýza v skupine mužov

**Tabuľka č. 18** Korelácie pre mužov (n=9)

Parameter	Hodnota
CHOL : GLU	0,4089 ++
CHOL : BMI	- 0,0808 -
GLU : BMI	0,5053 +++

Medzi hladinou cholesterolu a hladinou glukózy u mužov sme zaznamenali stredne silnú štatistickú závislosť, z čoho môžeme usúdiť, že v skúmanom štatistickom súbore – u mužov – sa so zvyšujúcou hladinou cholesterolu zvyšuje aj hladina glukózy. Táto závislosť platí pre nami skúmanú skupinu jednotlivcov. Porovnávanie parametrov hladiny cholesterolu a hodnoty BMI nám prinieslo v skupine mužov pozoruhodné zistenie. Pri týchto parametroch sa vyskytla slabá negatívna štatistická závislosť, čo by v praxi znamenalo, že s narastajúcou hladinou cholesterolu sa znižuje hodnota BMI. Tu však

nastáva značná rozporupnosť s mnohými výskumami, ktoré dokazujú, že u ľudí s hodnotami BMI nad rámec normy (18-24 kg/m<sup>2</sup>) sa vyskytujú aj zvýšené hladiny celkového cholesterolu. Z uvedených dôvodov je tento výsledok hodný ďalšej analýzy, resp. potvrdiť ho na ďalšej štatistickej skupine. Medzi glukózou a BMI sme zistili relatívne silne pozitívnu štatistickú závislosť, v praxi to znamená, že s narastajúcou hladinou glukózy sa zvyšuje aj hodnota BMI. Tento jav môžeme pozorovať najmä u ľudí trpiacich ochorením diabetes mellitus, keďže toto ochorenie je vo väčšine prípadov sprevádzané zvýšenou hmotnosťou.

#### 4.6.2 Korelačná analýza v skupine žien

Tabuľka č. 19 Korelácie pre ženy (n=15)

Parameter	Hodnota
CHOL : GLU	0,1405 +
CHOL : BMI	0,5462 +++
GLU : BMI	0,5863 +++

Dané vzťahy boli skúmané aj zvlášť v skupine žien. V tomto štatistickom súbore môžeme pozorovať slabú pozitívnu štatistickú závislosť medzi parametrami cholesterol a glukóza. Vzhľadom na skutočnosť, že intenzita tesnosti sa približuje k nule, závislosť medzi premennými je minimálna, resp. zo štatistického hľadiska obmedzená. Výskum ďalej preukázal silnú štatistickú závislosť medzi cholesterolom a BMI; tzn. v skupine žien s rastúcou hladinou cholesterolu v krvi existuje intenzívny predpoklad stúpajúcej hodnoty BMI. Táto skutočnosť potvrdzuje logickú a vžitú paradigmu súvisiacu s vyšším obsahom cholesterolu a nadmernou hmotnosťou jedinca (tzn. tento vzťah vykazuje priamu úmeru). Obdobný výsledok bol u žien potvrdený aj pri skúmaní intenzity tesnosti lineárnej závislosti medzi glukózou a BMI. V tomto prípade bola potvrdená silná pozitívna závislosť medzi skúmanými premennými. Bolo teda preukázané, že s rastúcou hladinou cukru v krvi dochádza k nárastu hodnoty BMI.

Pri porovnávaní dvoch štatistických súborov – mužov a žien, bolo preukázaných niekoľko štatistických odlišností (tie však môžu čiastočne súvisieť s obmedzeným rozsahom celkového štatistického súboru). V prvom rade, u žien bola deklarovaná slabá pozitívna korelácia medzi hladinami glukózy a cholesterolu, naproti tomu u mužov môžeme

závislosť medzi premennými hodnotiť ako strednú, pozitívnu závislosť. Tiež bol preukázaný štatistický nesúlad v prípade analýzy vzťahu medzi cholesterolom a BMI. Kým u mužov sa preukázala slabá negatívna závislosť (v praxi takmer žiadna), u žien sa potvrdila silná pozitívna závislosť, ktorá potvrdzuje logický predpoklad vzťahu medzi týmito veličinami. Relatívne zhodný výsledok bol dosiahnutý len v súvislosti s porovnávaním parametrov glukóza a BMI, v oboch skúmaných skupinách sa potvrdila silná pozitívna korelácia.

#### 4.6.3 Korelačná analýza pre celý sledovaný súbor

Tabuľka č. 20 Korelácie pre celý súbor (n=24)

Parameter	Hodnota
CHOL : GLU	0,1892 +
CHOL : BMI	0,407 ++
GLU : BMI	0,5950 +++

Poslednou časťou analýzy bolo preskúmanie výstupov bez zohľadnenia jednotlivých pohlaví, štatistický súbor sa skúmal ako celok. Vzťah medzi glukózou a BMI vykazoval silnú pozitívnu koreláciu (čo bolo spôsobené „synergickým“ efektom, nakoľko aj u mužov, aj u žien bol tento trend potvrdený). Taktiež korelácia medzi cholesterolom a BMI bola pozitívna, stredne silného charakteru. Pri sumarizácii týchto dvoch výsledkov môžeme dané hodnoty interpretovať v takom zmysle, že narastajúca hladina glukózy, resp. cholesterolu v krvi má kladnú súvislosť so zvýšenou hodnotou BMI. Tesnosť lineárnej závislosti medzi cholesterolom a glukózou bola pozitívna, avšak slabá. Výsledná hodnota za celý súbor bola však ovplyvnená väčším počtom žien zahrnutých do výskumu, tzn. výsledok dosiahnutý za skupinu žien mal väčšiu váhu, väčší vplyv na sumárny výsledok.

## 5 Diskusia

Zistené výsledky pre *Lep* gén korešpondujú s údajmi autora Ren et al. (2004), nakoľko taktiež uvádzajú výskyt alel *Lep*<sup>A</sup> (242 bp) a *Lep*<sup>C</sup> (181 a 61 bp). Zhoda nastala aj pri porovnávaní výskytu jednotlivých kombinácií genotypov, pričom v nami sledovanom súbore rovnako ako v štúdií Ren et al. sa najčastejšie vyskytoval genotyp AC.

Sledovanú skupinu tvorilo 9 mužov a 15 žien, pričom po zhodnotení výsledkov môžeme skonštatovať, že muži vykazovali zvýšené hodnoty v parametri glukóza a BMI. V nami sledovanej skupine sme u žien pozorovali v porovnaní s mužmi vyššie hladiny cholesterolu v krvi. Asociácia medzi ženským pohlavím a zvýšeným cholesterolom sa potvrdila aj v štúdií Isles et al. (1996). Vplyv ženského pohlavia na nutričné parametre bol preukázaný aj v prácach Jackson et al. (2006) a Bakari et al (2006), kde sa v oboch potvrdila asociácia medzi hodnotami BMI a ženským pohlavím.

Po zhodnotení vplyvu genotypu a porovnaní štatistickej preukaznosti jednotlivých typov genotypov na nami tri hodnotené parametre cholesterol, glukóza a BMI sme dospeli k nasledovným výsledkom. Kombinácia genotypu CC vykazuje vo všetkých troch parametroch najvyššie hodnoty, pričom pre parameter glukóza bola potvrdená pozitívna štatistická významnosť na jej zvyšujúce sa hladiny v porovnaní s genotypom AC. Taktiež sa pri tomto type genotypu preukázali najvyššie hodnoty aj pre ostatné merané parametre v porovnaní s genotypmi AA či AC, pri týchto parametroch však nebola významná štatistická preukaznosť dokázaná. Môžeme teda predpokladať, že práve táto kombinácia genotypu bude mať negatívny vplyv na zvyšujúce sa hodnoty týchto nutričných parametrov. Naopak, ako pozitívna kombinácia sa javí kombinácia AC, pri ktorej pozorujeme najnižšie hodnoty. V porovnaní so štúdiou Riestra et al. (2010), v ktorej sa vysoké hodnoty BMI vyskytovali u heterozygotného typu genotypu môžeme pozorovať rozdiel v zistených výsledkoch. Avšak v štúdií Vaškú et al. (2006) dospeli k podobným výsledkom v danom parametri, nakoľko aj tu sa potvrdili najvyššie hodnoty BMI v homozygotnom type GG pri ďalšej mutácii v géne *Lep* v pozícii 2548 G/A. V ďalšej štúdií zameranej na hodnotenie vplyvu leptínu na skúmané parametre došla autorka k niekoľkým záverom. Podobne ako v predchádzajúcich výskumoch sa potvrdila štatisticky pozitívna preukaznosť vplyvu leptínu na hodnoty BMI, naopak pozitívna preukaznosť leptínu na hladinu cholesterolu v krvi nebola v tejto štúdií potvrdená (Al-

Sulaimani, 2004). V práci Ahren et al. (1997b) autori uvádzajú, že hladina leptínu koreluje s hodnotou BMI a taktiež aj s hladinou glukózy ( $p < 0,001$ ). Zníženie hladiny leptínu korelovalo so znížením hladiny glukózy, ale nie s počiatočnou telesnou hmotnosťou alebo zmenami telesnej hmotnosti.

Zhodnotenie štatistickej preukaznosti diferencie v závislosti od pohlavia k meraným parametrom cholesterol a BMI sa nepotvrdilo. Ako však bolo spomenuté v práci Isles et al. (1996) u žien môžeme pozorovať vyššie hladiny cholesterolu ako u mužov. Jediným parametrom s pozitívnou štatistickou preukaznosťou bola glukóza. Ako ukazujú naše výsledky, mužské pohlavie sa vyznačuje predispozíciou k vyšším hladinám glukózy v krvi. Tieto výsledky sa zhodujú s výsledkami publikovanými v štúdiu Hameed et al. (2002), v ktorej autori taktiež potvrdili súvislosť medzi mužským pohlavím a vyššími hladinami glukózy v krvi. V štúdiu Shröder et al. (2003) bol u mužov preukázaný aj vzťah medzi príjmom sacharidov, tukov a nasýtených mastných kyselín k zvýšeným hodnotám BMI.

Vzájomnú asociáciu medzi tromi sledovanými parametrami sme overili použitím korelačnej analýzy. Silná pozitívna korelácia sa vyskytovala medzi parametrami glukóza a BMI. Pozitívnu koreláciu medzi týmito parametrami potvrdili taktiež Need et al. (2006), ktorý na skupine 753 žien sledovali vzťahy medzi nutričnými parametrami. Rovnako aj v štúdiu Vittal et al. (2010) bola dokázaná pozitívna korelácia medzi parametrami glukóza a BMI. Stredne silná pozitívna korelácia sa v nami sledovanom súbore potvrdila medzi parametrami cholesterol a BMI, čo korešponduje s výsledkami získanými projektom MONICA realizovaného pod záštitou WHO, kde bola potvrdená výrazná asociácia medzi týmito dvoma parametrami (Gostynski et al., 2004). Priama asociácia medzi cholesterolom a BMI bola preukázaná aj v štúdiu Shröder et al. (2003). Jedinými parametrami, pri ktorých nebola potvrdená významná štatistická závislosť sú cholesterol a glukóza. V tomto prípade môžeme rozdielne výsledky sledovať v štúdiu Zhang et al. (2008), kde bol na početnej populačnej skupine ( $n=19476$ ) zastúpenej jedincami z 8 európskych krajín dokázaný pozitívny vzťah medzi glukózou a cholesterolom pri oboch pohlaviach.

Odlišné výsledky sa preukázali v závislosti od pohlavia medzi parametrami cholesterol a BMI v skupine mužov, kde sa potvrdila slabá negatívna štatistická závislosť. Tieto zistenia sú v rozpore s výsledkami zistenými v už spomínanej štúdiu Shröder et al.



(2003), kde sa naopak dokázala výrazne priama asociácia medzi cholesterolom a BMI súvisiaca s mužským pohlavím.

## 6 Návrh na využitie poznatkov

Vzhľadom na predbežné zistenia, ktoré sme dosiahli prostredníctvom realizovaného výskumu, odporúčame nasledovné návrhy:

- využívať gén leptín pre hodnotenie nutričného stavu, nakoľko homozygotný typ genotypu, najmä kombinácia CC, asociuje so zvýšenými hodnotami troch nutričných parametrov, a to cholesterolu, glukózy a BMI. Táto skutočnosť bola štatisticky potvrdená,
- overovať vplyv leptínu pri substitučnej liečbe alebo individuálnej diéte,
- do experimentu včleniť aj skúmanie účinku ďalších dvoch génov *LEPR* a *GHR*, prípadne aj jeho receptora,
- zohľadňovať vplyv pohlavia pri hodnotení nutričného stavu a tvorbe diétného režimu, nakoľko po zhodnotení nášho výskumu sa potvrdilo, že pre každé pohlavie existuje tendencia k narastajúcim hodnotám nutričných parametrov,
- vplyv týchto génov overovať na širšej skupine respondentov s rôznym nutričným stavom.

## 7 Záver

V súlade s cieľmi práce sme metódou PCR-RFLP metódy sme potvrdili polymorfizmus kandidátskeho génu leptínu, pričom boli zistené 3 genotypy s nasledovnými bázovými frekvenciami: CC (181 bp+61 bp), AC (242 bp+181 bp+61 bp) a AA (242 bp). V sledovanej populácii 24 ľudí bol najčastejšie sa vyskytujúcim genotypom AC, ktorý bol určený u 11 jedincov. Toto určenie nám umožnilo sledovať vplyv jednotlivých genotypov na tri nutričné parametre cholesterol, glukózu a BMI. Pomocou základnej štatistiky sme zistili, že najvýznamnejší vplyv na nami zvolené nutričné parametre vykazoval genotyp CC, u ktorého sa vyskytovali najvyššie sledované hodnoty. Výrazný vplyv genotypu CC na hladinu glukózy v krvi bol potvrdený použitím t-testu, pričom bola dokázaná pozitívna štatistická závislosť (-0,61). Zo zistených výsledkov teda vyplýva, že homozygotný genotyp CC by mohol zohrávať dôležitú úlohu pri rozvoji metabolických ochorení, preto je potrebné jeho ďalšie sledovanie. Metódu t-testu sme využili aj pri hodnotení vplyvu pohlavia na nutričné parametre cholesterol, glukózu a BMI, na základe čoho sme zistili, že mužské pohlavie má výrazne preukazný vplyv na vyššie hladiny glukózy v krvi (0,63). Dôležité je taktiež zhodnotenie vzájomných vplyvov troch hodnotených parametrov, ktoré sme hodnotili použitím korelačnej analýzy. Silne pozitívna štatistická závislosť sa dokázala medzi parametrami glukóza a BMI (0,5863).

Poznanie vplyvu génu príjmu potravy leptínu na nutričný stav organizmu človeka je mimoriadne dôležité jednak z dôvodu intenzívneho poznania funkcionality ľudského organizmu, jednak umožňuje aplikáciu získaných poznatkov do bežného života s cieľom chrániť zdravie človeka. Porucha funkcionality tohto génu môže viesť k vzniku obezity, diabetes melitus II. typu, kardiovaskulárnych ochorení a poruchám imunity.

## 8 Zoznam použitej literatúry

1. ADAM, C. L. – FINDLAY, P. A. – MARIE, M. 2000. Effect of food deprivation on plasma leptin concentrations, leptin mRNA in adipose tissue and hypothalamic leptin receptor mRNA in sheep. In *Proceedings of the European association for animal production*, 2000, p. 479
2. ADÁMKOVÁ, V. 2009. *Obezita – príčiny, typy, rizika, prevence a liečba*. 1. vyd. Brno : Facta Medica, 2009. 122 s. ISBN 978-80-904260-5-4
3. AHREN, B. – LARSSON, H. – WILHEMSSON, C. et al. 1997a. Regulation of circulating leptin in humans. In *Endocrinology review*, 1997, p. 1-8
4. AHREN, B. – MANSSON, S. – GINGERICH, R.L. et al. 1997b. Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high fat diet, and fastin, In *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 273, 1997, no. 1, p. 113-120
5. AL-SULAIMANI, M. H. 2004. Leptin receptor gene polymorphism in obese individuals in the Saudi population [on-line] 2004 [cit. 2011-04-14]. Dostupné na internete: <[http://faculty.ksu.edu.sa/52876/Students\\_thesis/Leptin\\_gene\\_polymorphism\\_in\\_the\\_Saudi\\_population\\_By\\_Maha\\_Saleh\\_Al-Sulaimani.pdf](http://faculty.ksu.edu.sa/52876/Students_thesis/Leptin_gene_polymorphism_in_the_Saudi_population_By_Maha_Saleh_Al-Sulaimani.pdf)>
6. ASAKAWA, A. – INUI, A. – KAGA, T. et al. 2003. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. In *Gut*, vol. 52, 2003, p. 947-952
7. BADO, A. – LEVASSEUR, S. – ATTOUB, S. et al. 1998. The stomach is a source of leptin. In *Nature*, vol. 394, 1998, p. 790-793
8. BAKARI, A. G. – ONYEMELUKWE, G. O. – SANI, B. G. et al. 2006. Relationship between random blood sugar and body mass index in African population. In *Int J Diabetes & Metabolism*, vol. 14, 2006, p. 144-145
9. BAUEROVÁ, M. – TURČÁNI, M. – OMELKA, R. 2004. *Polymerázová reťazová reakcia*. Nitra : FPV UKF, 2004. 15 s.
10. BÉDER, I. 2005. *Výživa a diétetika*. 1. vyd. Bratislava: UK, 2005. 188 s. ISBN 80-223-2007-2
11. BÉDEROVÁ, A. 2011. Obezita a tuky [on-line] [cit. 2011-04-16]. Dostupné na internete: <<http://www.ruvzba.sk/poradne/Obezitatuky.pdf>>
12. CONSIDINE, R. V. – SINHA, M.K. – HIMAN, M.L. et al. 1996a. Serum immunoreactive – leptin concentrations in normal-weight and obese humans. In *The New England Journal of Medicine*, vol. 334, 1996, p. 292-295

13. CONSIDINE, R.V: - CONSIDINE, E.L. – WOLLIAMS, C.J. 1996b. Mutation screening and identification of a sequence variant in the human *Ob* gene coding region. In *Biochemical and Biophysical research communications*, vol. 3, 1996, p. 735-739
14. CORDIDO, F. – ISIDRO, M.L. – NEMIÑA, R. et al. 2009. Ghrelin and growth hormone secretagogues, physiological and pharmacological aspect. In *Current drug discovery Technologies*, vol. 6, 2009, p. 34-42
15. CUMMINGS, D:E. – PURNELL, J.Q. – FRAYO, R.S: et al, 2001. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. In *Diabetes*, vol. 50, 2001, p. 1714-1719
16. CUMMINGS, D.E. – WEIGLE, D.S. – FRAGO, R.S. et al. 2002. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. In *The New England Journal of Medicine*, vol. 346, 2002, p. 1623-1630
17. DATE, Y. – KOJIMA, M. – HOSODA, H. et al. 2000. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and human. In *Endocrinology*, vol. 141, 2000, p. 4255-4261
18. DELEVAUD, C. – BOCQUIER, F. – CHILLIARD, Y. et al. 2000. Plasma leptin determination in ruminants: effects on nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by specific RIA. In *Wheeler J Endocrinol.*, 2000, p. 519-526
19. DRUCE, M. – BLOOM, S.R. 2003. Central regulators of food intake. In *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, vol. 6, 2003, p. 361-367
20. DUGGAL, P.S. – KYLIE, H. – RYAN, N.K. et al. 2000. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. In *Endocrinology*, vol. 141, 2000, p. 1971-1976
21. DULLOO, A. G. – GUBLER, M. – MONTANI, J.P et al. 2004. Substrate cycling between de novo lipogenesis and lipid oxidation: a thermogenic mechanism against skeletal muscle lipotoxicity and glucolipotoxicity. In *J Obes Relat Metab Disord*, vol. 28, 2004, no. 4, p. 29-37
22. FAROOQI, I.S. – WANGENSTEIN, T. – COLLINS, S. et al. 2007. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. In *New England J Med*, vol. 356, 2007, p. 237-247

23. FEHMAN, H. C. – PEISER, C. – BODE, P. et al. 1997. Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion. In *Peptides*, vol. 18, 1997, p. 1267-1273
24. GOSTYNSKI, M. – GUTZWILLER, F. – KUULASMAA, K. et al. 2004. Analysis of the relationship between total cholesterol, age, body mass index among males and females in the WHO MONICA Project. In *International journal of obesity*, vol. 28, 2004, p. 1082-1090
25. GNANAPAVAN, S. – KOLA, B. – BUSTIN, S.A. et al. 2002. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. In *The Journal of clinical endocrinology & metabolism*, vol. 87, 2002, no. 6, p. 2988-2991
26. GREENMAN, Y. – GOLANI, N. – GILAD, S. et al. 2004. Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. In *Clinical Endocrinology*, vol. 60, 2004, p. 382-388
27. HAINER, V. – KUNEŠOVÁ, M. et al. 1997. *Obezita*. Praha : Galén, 1997. 126 s. ISBN 8085824671
28. HALUZÍK, M. 2002. *Poruchy výživy a leptin*. 1. vyd. Praha : Grada, 2002. 188 s. ISBN 80-7169-972-1
29. HAMEED, A. – MALIK, S. A. – SHARIF, A. et al. 2002. Diabetic complications: influence of age, sex, family history, duration, glycemic control and obesity. In *Journal of biological sciences*, vol. 2, 2002, no. 10, p. 710-714, ISSN 1608-4127
30. HOSODA, H. – KOJIMA, M. – MATSUO, H. et al. 2000. Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. In *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, 2000, p. 21995-22000
31. HOWARD, A.D. – FEIGHNER, S.D. – CULLY, D.F. et al. 1996. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. In *Science*, vol. 273, 1996, p. 974-977
32. ISLES, C.G. – HOLE, A.F. – LEVER, A.F. et al. 1996. Risk factors for coronary disease and stroke in men and women, 1995, In *Q J Med*, vol. 89, 1996, p. 343-350
33. JACKSON, A. S. – STANFORTH, P. R. – GAGNON, J. et al. 2006. The effect of sex, age and race on estimating percentage body fat from body mass index: The Heritage Family Study. In *International journal of obesity*, vol. 26, 2006, no. 6, p. 789-796

34. KAMENSKÝ, G. – PELLA, D. 2010. *Zdravý životný štýl*. 1. vyd. Bratislava : Akadémia vzdelávania, 2010. 143 s. ISBN 978-80-8880-88-2
35. KAPUT, J. – RODRIGUES, R.L. 2006. *Nutritional genomics: Discovering the path to personalized nutrition*. 1. vyd. New Jersey : John Wiley & Sons, 2006. 504 p. ISBN 978-0-471-68319-3
36. KLOK, M.D. – JAKOBSDOTTIR, S. – DRENT, M.L. 2006. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. In *Obesity*, vol. 8, 2006, p. 21-34
37. KOVÁČ, P, 2008. *Americká hypotekárna kríza: diplomová práca*. Bratislava : UK, 2008. 92 s.
38. KOJIMA, M. – HOSODA, H. – DATE, Y. et al. 1999. Ghrelin is a growth-hormone releasing acylated peptide from stomach. In *Nature*, vol. 402, 1999, p. 656-660
39. KOJIMA, M. – KANGAWA, K. 2005. Ghrelin: structure and function. In *Physiol. Rev.*, vol. 85, 2005, p. 495-522
40. KORBONITS, M. – GOLDSTONE, A.P. – GUERGUIEV, M. et al. 2004. Ghrelin a hormone with multiple functions. In *Frontiers in neuroendocrinology*, vol. 25, 2004, p. 27-68
41. KRAHULEC, B. 2009. Program prevencie obezity na Slovensku. In KAMENSKÝ, G. a kol. *Kardiovaskulárne ochorenia – najväčšia hrozba*. Bratislava : Slovenská nadácia srdca, 2009, s. 91-94. 978-80-88880-86-8
42. KUNOVÁ, V. 2004. *Zdravá výživa*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2004. 136 s. ISBN 80-247-0736-5
43. KÚBEK, A. – TRAKOVICKÁ, A. – RAFAY, J. a kol. 2000. *Genetika*. 2. vyd. Nitra : SPU, 2000. 152 s. ISBN 80-7137-696-5
44. LAKAR, O. – FUNDAZIOA, E. 2009. Appetite increased by action of ghrelin hormone leading to accumulation of abdominal fat. [on-line] [cit. 2011-04-08]. Dostupné na internete: <<http://www.medicalnewstoday.com/articles/150962.php>>
45. LEE, G. H. – PROENCA, R. – MONTEZ, J. M. et al. 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. In *Nature*, vol. 382, 1996, p. 250-252
46. LIDDLE, R. 2009. Ghrelin. [on-line] [cit. 2011-04-08]. Dostupné na internete: <<http://www.uptodate.com/contents/ghrelin>>

47. LONNQVIST, F. – ARNER, P. – NORDFORST, L. 1995. Overexpression of the obese (*ob*) gene in adipose tissue of human obese subjects. In *Nature medicine*, vol. 1, 1995, p. 950-953
48. LORD, G.M. – MATARESE, G. – HOWARD, J.K. et al. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses, starvation – induced immunosuppression. In *Nature*, vol. 394, 1998, p. 897-901
49. MAJERČÁK, I. 2008. Liečba obezity. [on-line] [cit. 2011-04-13]. Dostupné na internete: <[http://wp.sos-obezita.sk/?page\\_id=22](http://wp.sos-obezita.sk/?page_id=22)>
50. MALIK, K.F. – Yong, W.S. 1996. Localisation of binding sites in the central nervous system for leptin (*ob* protein) in normal, obese (*ob/ob*), and diabetic (*db/db*) C57BL/6J mice. In *Endocrinology*, vol. 137, 1996, p. 1497-1500
51. MARIE, M. – FINDLAY, P.A. - THOMAS, I. et al. 2001. Daily patterns of plasma leptin in sheep: effects of photoperiod and food intake. In *Journal of endocrinology*, vol. 170, 2001, no. 1, p. 277-286
52. MASUZAKI, H. – OGAWA, Y. – SAGANA, N. et al. 1997. Nonadipose tissue production of leptin: Leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. In *Nature medicine*, vol. 3, 1997, p. 1029-1033
53. MEIER, U. – GRESSNER, A.M. 2004. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. In *Clinical chemistry*, vol. 50, 2004, no. 9, p. 1511-1525
54. MUNTAU, A.C. 2009. *Pediatric*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2009. 608 s. ISBN 978-80-247-2525-3
55. MYERS, M. G. 2004. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. In *Recent progress in hormone research*, vol. 59, 2004, p. 287-304
56. NAKAZATO, M. – MURAKAMI, N. – DATE, Y. et al. 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding, In *Nature*, vol. 409, 2001, p. 194-198
57. NEED, A. G. – O'LOUGHLIN, P. D. - HOROWITZ, M. et al. 2005. Relationship between fasting serum glucose, age, body mass index and serum 25 hydroxyvitamin D in postmenopausal women. In *Clinical endocrinology*, vol. 62, 2005, no. 6, p. 738-741
58. OIHANE, L. 2009. Action of ghrelin hormone increases appetite and favors accumulation of abdominal fat. [on-line]. [cit. 2011-04-17]. Dostupné na internete:



<<http://hplusmagazine.com/2009/05/20/action-ghrelin-hormone-increases-appetite-and-favors-accumulation-abdominal-fat/>>

59. OLVECKÁ, P. 2009. Národný program prevencie obezity. In *Bedeker zdravia*, roč. 5, 2009, č. 1, s. 38-39, ISSN 1337-2734
60. PAN, W.H. – KASTIN, A.J. 2001. Diurnal variation of leptin entry from blood to brain involving partial saturation of the transport system. In *Life Sciences*, vol. 68, 2001, p. 2705-2714
61. PATTERSON, M. – VINCENT, R.P. – HUNT, C. et al. 2005. Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal caloric content in normal-weight but not obese subjects, In *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, vol. 90, 2005, no. 2, p. 1068-1071
62. PICO, C. – OLIVER, P. – SANCHEZ, J. et al. 2003. Gastric leptin: a putative role in the short-term regulation of food intake. In *British journal of nutrition*, vol. 90, 2003, p. 735-741
63. POYKKO, S.M. – KELLOKOSKI, E. – HOIKKO, Y. 2003. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension and the prevalence of type 2 diabetes. In *Diabetes*, vol. 52, 2003, p. 546-553
64. RAHMOUNI, K. – HAYNES, W.G. 2004. Leptin and the cardiovascular system. In *The endocrine society*, vol. 59, 2004, p. 225-244
65. REN, W. – ZHANG, S. – WU, J. 2004. Polymorphism of the leptin gene promoter in pedigrees of type 2 diabetes mellitus in Chongqing, China, In *Chinese Medical Journal*, vol. 117, 2004, no. 4, p. 558-561
66. RIESTRA, P. – GARCIA-ANGUITA, A. – SCHOPPEN, S. et al. 2010. Influence of the leptin G-2548A polymorphism on leptin levels and anthropometric measurements in healthy Spanish adolescents. In *Ann Hum Genet*, vol. 74, 2010, no. 4, p. 335-339
67. ROSENBAUM, M. – NICHOLSON, M. – HIRSCH, J. et al. 1996. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentration of leptin. In *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, vol. 81, 1996, p. 3432-3427
68. RUIZ-CORTEZ, Z.T. – MEN, T. – PALEN, M.F. et al. 2000. Porcine leptin receptor: Molecular structure and expression in the ovary. In *Molecular reproduction and development*, vol. 56, 2000, no. 4, p. 465-474

69. SAHU, A. 2003. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. In *Front Neuroendocrino*, vol. 24, 2003, no. 4, p. 225-253
70. SCHERER, S. 2008. *A short guide to the human genome*. 1. vyd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008. 173 s. ISBN 978-0879691-4
71. SCHRÖDER, H. – MARRUGAT, J. – ELOSUA, R. et al. 2003. Relationship between body mass index, serum cholesterol, leisure-time physical activity, and diet in Mediterranean Southern-Europe population. In *Br J Nutr*, vol, 90, 2003, no. 2, p. 431-439
72. SCHWARTZ, M.W. – SEELEY, R.J. – CAMPFIELD, L.A. 1996. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. In *J Clin Invest*, vol. 98, 1996, no. 5, p. 1101-1106
73. SINHA, M.K. – OPINTANOV, A.I. – OHANNESION, J.P. et al. 1996. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. In *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 6, 1996, p. 1277-1282
74. SMITH, R.G. – LEONARD, R.- BAILEY, A.R. et al. 2001. Growth hormone secretagogue receptor family members and ligand, In *Endocrine*, vol. 14, 2001, no. 1, p. 9-14
75. SOBHANI, I. – BUYSE, M. – GOIOT, H. et al. 2002. Vagal stimulation rapidly increases leptin secretion in human stomach. In *Gastroenterology*, vol. 122, 2002, p. 259-263
76. SUGINO, T. – HASEGAWA, Y. – KIKKAWA, Y. et al. 2002. A transient ghrelin surge occurs before feeding in a scheduled meal-fed sheep. In *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 295, 2002, p. 255-260
77. SRŠEŇ, Š. – SRŠŇOVÁ, R. 2005. *Základy klinickej genetiky a jej molekulárna podstata*. 4. vyd. Martin : Osveta, 2005. 446 s. ISBN 80-8063-185-9
78. SVAČINA, Š. 2008. *Jak na obezitu a její komplikace*. 1. vyd. Praha : Grada Publishing, 2008. 144 s. ISBN 978-80-247-2395-2
79. ŠTEFANOVIČOVÁ, A. – KUČHTA, T. – SIEHEL, P. 1998. *Polymerázová reťazová reakcia a jej využitie pri mikrobiologickej analýze potravín*. 1. vyd. Bratislava: VÚP, 1998. 46 s.

80. TAKEDA, S. – ELEFTERION, F. – LEVASSER, R. et al. 2002. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. In *Cell*, vol. 111, 2002, p. 305-317
81. TARTAGLIA, L.A. – DEMBSKI, M. – WENG, X. 1995. Identification and expression cloning of leptin receptor, OB-R. In *Cell*, vol. 83, 1995, no. 7, p. 1263-1271
82. TSCHÖP, M. – WAWARTA, R. – RIEPL, R.I. 2001. Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. In *Journal of endocrinological investigation*, vol. 24, 2001, no. 6, p. 19-21
83. UKKOLA, O. 2004. Peripheral regulation of food intake: new insights. In *Journal of endocrinological investigation*, vol. 27, 2004, no. 1, p. 96-98
84. VAŠKŮ, J. A. B. – VAŠKŮ, A. – DOSTÁLOVÁ, Z. et al. 2006. Association of leptin genetic polymorphism -2548 G/A with gestational diabetes mellitus, In *Genes & Nutrition*, vol. 1, 2006, no. 2, p. 117-124
85. VERCILLO, K. 2009. Weight loss hormones: ghrelin and leptin. [on-line] [cit. 2011-04-08]. Dostupné na internete: <[http://hubpages.com/hub/Weight\\_Loss\\_Hormones\\_Ghrelin\\_and\\_Leptin](http://hubpages.com/hub/Weight_Loss_Hormones_Ghrelin_and_Leptin)>
86. VITTAL. B. G. – PRAVEEN, G. – DEEPAK, P. A: 2010. A study of body mass index in healthy individuals and its relationship with fasting blood sugar. In *Journal of clinical and diagnostic research*, vol. 4, 2010, p. 3421-3424
87. WAJNRAJCH, M. P. – TEN, I. S: - GERTNER, J. M. et al. 2000. Genomic organization of human ghrelin gene. In *Journal of Medical Genetics*, vol. 1, 2000, p. 231-233
88. ZAZULA, R. – WOHL, PETR – WOHL, PAVEL. 2009. Nutriční stav pacienta a možnosti jeho hodnocení. In *Interní medicína pro praxi*, roč. 11, 2009, č. 1, str. 45-47
89. ZHANG, Y. – PROENCA, R. – MAFFEI, M. et al. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. In *Nature*, vol. 372, 1994, p. 425-432
90. ZHANG, J.V. – REN, P.G. – AVSIAN-KRETCMER, O. et al. 2005. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. In *Science*, vol. 310, 2005, p. 996-999
91. ZHANG, L. – QIAO, Q. – TUOMILETHO, J. et al. 2008. Blood lipid levels in relation to glucose status in European men and women without a prior history of

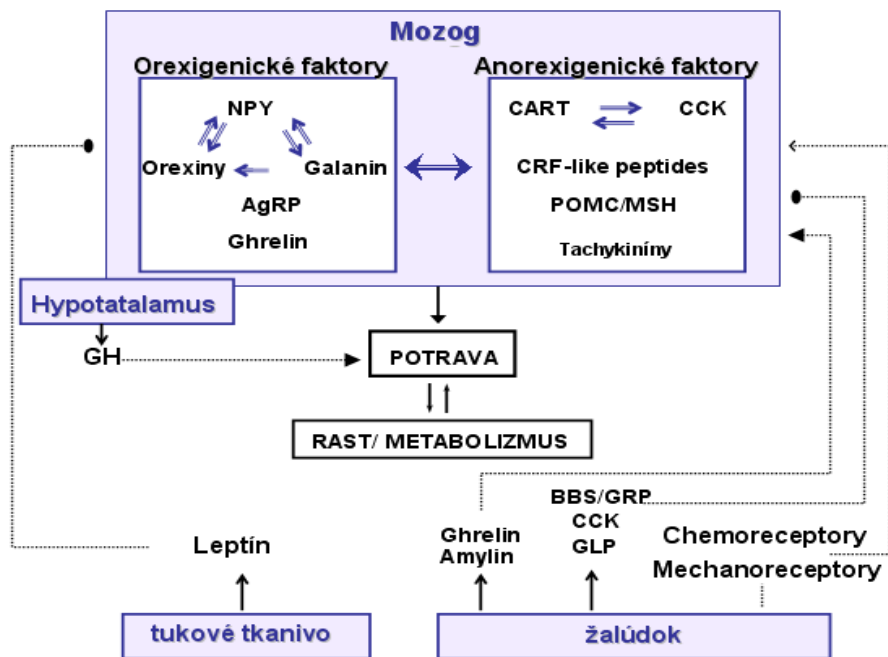
diabetes: the DECODE Study. In *Diabetes research and clinical practice*, vol. 82, 2008, no. 3, p. 364-377

92. ZLOKOVIC, B. V. – JOVANOVIC, S. – MIAO, W. et al. 2000. Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. In *Endocrinology*, vol. 14, 2000, no. 4, p. 1434-1441

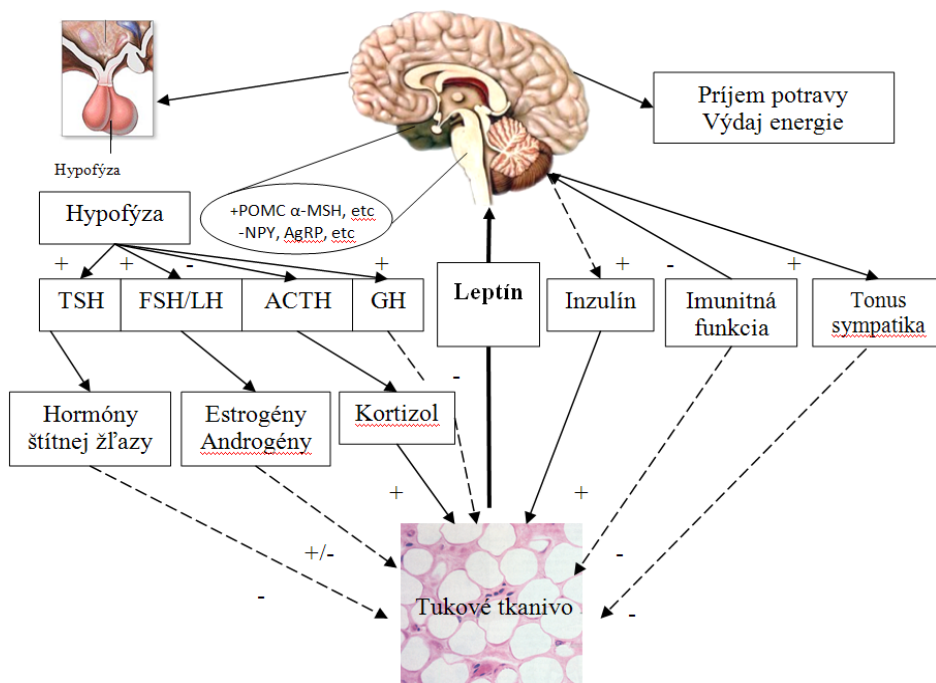
Internetové zdroje:

URL1:[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mapa\\_gen%C3%A9tico\\_o\\_cariograma.jpeg?uselang](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mapa_gen%C3%A9tico_o_cariograma.jpeg?uselang)

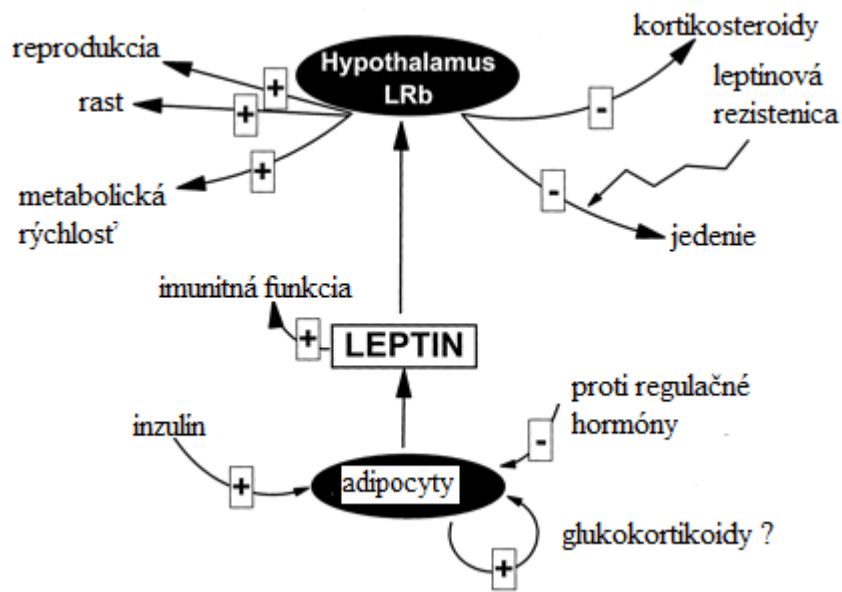
## **Prílohy**



Príloha č. 1 Signálne dráhy centrálnej regulácie príjmu potravy



Príloha č. 2 Význam tukového tkaniva v energetickej homeostáze a neuroendokrínnej regulácii



**Príloha č. 3 Regulácia energetického výdaja leptínom (spracované podľa Myers, 2004)**