

**Univerzita Karlova v Praze**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorský studijní program v biomedicině

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



**MUDr. Katarína Mitrová**

**Nové regulační hormony mateřského mléka**

**New regulatory hormones of human breast milk**

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: Doc. MUDr. Jiří Bronský, Ph.D.

Praha, 2014

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi v průběhu práce poskytovali cenné rady a připomínky, zejména Doc. MUDr. Jiřímu Bronskému, Ph.D. za jeho odborné vedení a motivaci v průběhu celého dosavadního studia, a také všem, kteří se podíleli na laboratorní části práce, zejména Ing. Michalu Karpíškovi, Ph.D. za cenné rady z oblasti problematiky regulačních peptidů a četné konzultace v oblasti laboratorní metodiky. Dále pak lékařům i sestřám Novorozeneckého oddělení Gynekologicko-porodnické kliniky UK 2. LF a FN Motol a lékařům a laboratorním pracovníkům Laboratoře autoimunitních onemocnění Pediatrické kliniky UK 2. LF a FN Motol za pomoc při sběru a skladování vzorků a trpělivou práci a komunikaci s matkami. Také děkuji všem ostatním spoluautorům předkládaných prací a to zejména MUDr. Marianne Durilové za pomoc při zpracování dat i publikační činnosti. Na závěr bych chtěla vyjádřit poděkování svojí rodině a všem přátelům, kteří mne podporovali v průběhu studia.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	6
1.1	Složení mateřského mléka .....	6
1.2	Fyziologie laktace – mechanismy syntézy a sekrece MM .....	12
1.3	Účinky mateřského mléka na zdraví kojených dětí .....	16
1.4	Regulační hormony přítomné v MM .....	19
1.4.1	Adiponektin .....	19
1.4.2	Leptin .....	24
1.4.3	Ghrelín .....	29
1.4.4	Rezistin .....	30
1.4.5	Obestatin .....	31
1.4.6	Inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1) .....	32
1.4.7	Vazebné proteiny mastných kyselin (FABP) .....	33
1.5	Adipofilin .....	34
2	HYPOTÉZY .....	36
3	CÍLE PRÁCE .....	37
4	METODIKA .....	38
4.1	Sledovaná skupina .....	38
4.2	Sběr vzorků .....	39
4.3	Laboratorní analýza .....	39
4.3.1	Stanovení adiponektinu .....	40
4.3.2	Stanovení leptinu .....	41
4.3.3	Stanovení AFABP .....	41
4.3.4	Stanovení adipofilinu .....	42
4.4	Statistická analýza .....	43
5	VÝSLEDKY .....	44
5.1	Detekce a dynamika hladin vybraných regulačních hormonů MM .....	44
5.2	Korelace hladin RH s antropometrickými parametry dětí a jejich matek .....	48
5.3	Detekce a dynamika hladin adipofilinu v MM .....	50
6	DISKUSE .....	53
7	ZÁVĚR .....	65
8	SOUHRN .....	66
9	SUMMARY .....	67
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	68
11	SEZNAM PUBLIKACÍ .....	79

## SEZNAM ZKRATEK

ACTH	adrenokortikotropní hormon
AFABP	adipocytární vazebné proteiny mastných kyselin
AGRP	agouti gen-related protein
AMPK	AMP aktivovaná proteinová kináza
AMP	adenosinmonofosfát
BMI	body mass index
CART	amfetaminem regulovaný transkript
CNS	centrální nervový systém
CRP	C-reaktivní protein
DM	diabetes mellitus
EGF	epiteliální růstový faktor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESPGHAN	Evropská společnost pro dětskou gastroenterologii, hepatologii a výživu
FABP	vazebné proteiny mastných kyselin
GIT	gastrointestinální trakt
GPCR	receptory G-proteinů
HOMA	homeostatický model
HRP	křenová peroxidáza
IgA	Imunoglobulin A
IGF	inzulinu podobný růstový faktor
IL	interleukin
STAT	signální transduktor a aktivátor transkripce
KM	kravské mléko
LC-PUFA	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem
LEPR	leptinový receptor
MK	mastné kyseliny
MM	mateřské mléko
NPY	neuropeptid Y
PI-3	fosfatidylinozitol 3-kináza
POMC	proopiomelanokortin

PPAR	receptor aktivovaný peroxizomovým proliferátorem
p38 MAPK	p38 - mitogenem aktivovaná proteinkináza
RH	regulační hormony
RIA	radioimunoanalýza
STH	somatotropní hormon
TGF	transformující růstový faktor
TLR	Toll-like receptor
TMB	tetrametylbenzidin
TNF	tumor nekrotizující faktor
TSH	tyreotropní hormon
VIP	vazoaktivní peptid
WHO	Světová zdravotnická organizace

# 1 ÚVOD

Mateřské mléko (MM) je jedinečnou biologickou tekutinou, která svým složením ideálně odpovídá fyziologickým potřebám novorozence a kojence v průběhu jeho vývoje. Právě díky svému složení a jeho biologickým vlastnostem je pro člověka nenahraditelné. Složení MM se v průběhu laktace mění tak, aby přesně odpovídalo aktuálním potřebám dítěte v dané periodě jeho vývoje. Ke změně jeho složení dochází jak v průběhu prvních dnů po porodu (kolostrum, přechodné mléko, konečné zralé mléko), tak i během dne a v průběhu jednoho kojení. Stejně tak se liší MM matek, které porodily v termínu a těch, které porodily předčasně. Složení MM je pak ovlivněno i počtem porodů matky, množstvím produkovaného MM, frekvencí kojení, stravou a výživou matky a v neposlední řadě také jejím zdravotním stavem. Je nesporné, že MM je nejlepším zdrojem výživy kojence v průběhu prvních čtyř až šesti měsíců života.

## 1.1 Složení mateřského mléka

Mateřské mléko je izosmolární a jeho energetická hodnota (67 kcal/100 ml) v průběhu laktace stoupá. Obsah **proteinů** v kolostru (2,3 g/dl) pozvolna klesá, po prvním měsíci činí přibližně 1,8 g/dl. Zajišťuje tak 8-10 % celkové kalorické hodnoty. Dostatečný příjem bílkovin je nevyhnutný pro dosažení optimálního růstu kojence. Na rozdíl od kravského mléka obsahuje MM vyšší podíl lépe stravitelných proteinů syrovátky (70 % vs. 18 %) a méně kaseinu (30 % vs. 82 %). Hlavním proteinem MM je laktalbumin, který je zodpovědný za snadnou stravitelnost mléka a jeho krátký tranzitní čas gastrointestinálním traktem (GIT). Ve stopovém množství může být v MM přítomen i hlavní protein kravského mléka - beta-laktoglobulin, který je pro kojence potenciálně alergizující. K dalším významným proteinům MM patří sekreční imunoglobulin A (IgA), laktoferin a lysozym, které plní v MM obranné funkce. Jejich obsah je nejvyšší v kolostru a může představovat až 25 % všech bílkovin MM. Laktoferin vyvazuje železo a tím inhibuje růst střevních patogenů, lysozym má proteolytické účinky na grampozitivní bakterie a některé viry. Dále do této skupiny patří protein vázající kyselinu listovou, interferon gama, antienterotoxin, inhibitory proteáz, nukleotidy, cytokiny apod. Některé z těchto faktorů tvoří pasivní obranu sliznice trávicího traktu a do jisté míry i horních dýchacích cest a zabraňují adhezenci některých

invazivních patogenů na sliznici kojeného dítěte. V roce 2010 se podařilo italské skupině vědců provést funkční analýzu proteinů mateřského mléka a prokázat, že biologická funkce více než 100 popsaných proteinů se neomezuje pouze na zabezpečování příjmu energie a antimikrobiální účinky, ale i na jejich aktivní účast při stimulaci růstu tkání novorozence a správného vývoje imunitního systému (D'Alessandro, A. et al. 2010). Asi 20% dusíku MM se nachází v nukleotidech, volných aminokyselinách a močovině. Nukleotidy jsou důležité pro buněčné funkce (energetický metabolismus, produkce nukleových kyselin, druhé posly v signálních drahách, koenzymy) a jsou zvláště důležité v situacích se zvýšenou metabolickou aktivitou (onemocnění, růst atd.). Mnoho faktorů s antibakteriální i antivirovou aktivitou je termolabilních. Na tento fakt je důležité myslet při manipulaci s MM a jeho skladování.

Nejvýznamnějšími **sacharidy** MM jsou laktóza a oligosacharidy. Obsah laktózy v MM pozvolna stoupá. Laktóza usnadňuje resorpci některých minerálů (vápníku a železa) z GIT a podporuje růst *Lactobacillus bifidus*, čímž vytváří ve střevě kyselé prostředí a brání tak růstu koliformních a putrifonních bakterií. Metabolizuje se na glukózu a galaktózu. Významnou prebiotickou funkci v MM plní hojně zastoupené oligosacharidy, které brání adhezii koliformních bakterií na střevní epitel, čímž selektivně podporují růst zdraví prospěšných bakterií ve střevě kojeného dítěte.

Nositeli největší energetické hodnoty MM (až 50 %) jsou **lipidy**. Obsah lipidů v MM je velice variabilní, stoupá v průběhu laktace, mění se v průběhu dne, dokonce i v průběhu krmení (tzv. zadní mléko má vyšší obsah lipidů než mléko přední). Jedná se o nejvariabilnější složku MM. Tuková složka MM je z 98 % tvořena kapénkami triacylglycerolů. MM mléko je bohaté na mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (kyselina linolová, linolenová, arachidonová a dokosaheptaenová). Polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (LC-PUFA) jsou nezbytné pro správný vývoj centrálního nervového systému (CNS), jeho myelinizaci a také pro vývoj sítnice (Koletzko, B. et al. 2008). Jejich obsah je závislý na stravě matky. Za standardních podmínek ale kojení plně zajišťuje denní potřebu LC-PUFA pro kojence. Za štěpení tuků MM je odpovědná lipáza MM, a to zejména v období nedostatečné funkce endogenní pankreatické lipázy kojence. MM má relativně vysoký obsah cholesterolu. Předpokládá se, že v časném postnatálním období dochází k pozitivnímu ovlivnění metabolických drah, které cholesterol využívají, což by mohlo hrát roli v prevenci rozvoje

aterosklerózy později v dospělosti (Agostoni, C. et al. 2009). Základní složení MM je prezentováno v tabulce 1.

Složka	Obsah	Podíl kalorické hodnoty
Sacharidy	6,8 - 7,2 g / 100 ml	40 %
Lipidy	3,8 – 4,5 g / 100 ml	50%
Proteiny	0,9 – 1,3 g / 100 ml	10 %

**Tabulka 1:** Základní složení mateřského mléka.

Obsah **vitaminů** v MM je závislý na výživě matky, obvykle je však pro zralého novorozence zcela adekvátní. Z vitaminů rozpustných v tucích (A, D, E, K) je v MM nedostatečný obsah vitamínu D a to bez ohledu na deficit tohoto vitamínu u matky. U kojeného dítěte je proto na místě jeho suplementace, a to v dávce 400-500 IU denně během celého prvního roku a během zimních měsíců ve druhém roce věku života. Obsah vitamínu K v MM člověka je obvykle nízký (van Hasselt, P.M. et al. 2008). Nicméně odborné společnosti v současné době suplementaci nepovažují na nutnou (v případě, že byl vitamin K podán ihned po porodu parenterálně, s cílem prevence krvácivé nemoci novorozenců). Pokud byl vitamin K podán perorálně, je u výlučně kojených dětí na místě jeho suplementace v dávce 1 mg týdně (1gtt) do 12. týdne věku. U žen-veganek je vzhledem k častému deficitu vitamínu B12 komisi pro výživu ESPGHAN doporučována u jejich kojených dětí suplementace (Agostoni, C. et al. 2009).

Koncentrace **minerálů a stopových prvků** v MM jsou obvykle dostatečné, pokud kojící matka sama netrpí závažným deficitem. Jejich celkově nižší obsah v MM oproti kravskému mléku odpovídá snížené schopnosti ledvin kojence vyloučit tyto minerály močí. Hladina železa, zinku a mědi v průběhu laktace klesá, ale v období prvních šesti měsíců je obvykle postačující. Koncentrace vápníku a fosforu v MM jsou relativně konstatní. Jsou sice nižší než v náhradní kojenecké mléčné výživě, naproti tomu ale lépe biologicky dostupné (poměr kalcium:fosfor = 2:1, laktoferin, zinek a měď zvyšující dostupnost železa apod.). Rozdíly ve složení zralého MM, kravského mléka, pokračovacího kojeneckého mléka a batolecího mléka jsou shrnuty v tabulce 2. Suplementace železa a jódu je doporučena u dětí, jejichž



matky samy trpí nedostatkem. Suplementace železa je také doporučována zejména pro děti nedonošené, děti s nízkou porodní hmotností a děti s prokázaným deficitem železa. Doporučení pro suplementaci fluoridem nejsou standardizovaná, závisí na koncentraci fluoru v pitné vodě, v dalším jídle, tekutinách a zubní pastě. Nicméně je prokázáno, že dostatečná dávka fluoridu v kojeneckém a batolecím věku významně omezuje kazivost chrupu v pozdějších letech (Bronsky, J. 2010).

<b>Položka: v 1 litru</b>	<b>Jednotky</b>	<b>MM</b>	<b>KM</b>	<b>PKM</b>	<b>BM</b>
energie	kcal	680	680	700	700
osmolalita	mosmol	286	298	-	-
bílkovina	g	9-13	33	14	16
kasein	g	2,5	26	7	7
syrovátka	g	7	6,7	7	7
tuk	g	38-45	38	31	30
kys. linolová	% váhy	5,5-17,2	2,5	4,1	4,1
kys. linolenová	% váhy	0,2-1,1	1,6	0,76	0,73
sacharidy	g	65-72	47	89	86
oligosacharidy	g	10-12	1	67	72
minerály	g	2,1	7	2,6	3,0
vápník	mg	280	1200	670	980
sodík	mg	180	480	240	280
železo	mg	0,3	0,46	10	13
fluoridy	ug	6	45	30	0
jód	ug	variabilně	variabilně	140	140
vitamín D	IU	22	24	600	720
vitamín K	ug	2,1	4,9	52	53
kyselina listová	ug	85	50	170	140
vitamín B12	ug	1	4	1,8	1,5
vitamín C	mg	40	17	100	160

**Tabulka 2.** Srovnání složení zralého mateřského mléka, kravského mléka, pokračovací kojenecké a batolecí mléčné výživy. Upraveno dle zdroje: (Nevoral, J. et al. 2003)

Legenda: MM = zralé mateřské mléko; KM = kravské mléko; PKM = pokračovací kojenecká mléčná výživa (Nutrilon 2); BM = batolecí mléčná výživa (Nutrilon 3).

MM je tedy významným zdrojem makronutrientů (proteiny, sacharidy, lipidy) a mikronutrientů (minerály, vitaminy, stopové prvky), které se podílejí na růstu a vývoji dítěte. MM však obsahuje i celou řadu biologicky aktivních látek jako jsou **hormony** (prolaktin, oxytocin, adrenokortikotropní hormon (ACTH), tyreotropní hormon (TSH), růstový hormon (STH), tyroxin, kortizol a inzulin), **růstové faktory** (epiteliální růstový faktor (EGF), růstový faktor podobný inzulinu (IGF-I), růstový faktor pro hepatocyty), **neuropeptidy** (neurotenzin, substance P, somatostatin a vazoaktivní peptid (VIP)), **cytokiny** a další. Stejně tak je MM zdrojem řady bioaktivních faktorů (laktoferin, nukleotidy, oligosacharidy), které stimulují vývoj imunitního systému kojence a mají protizánětlivé účinky. Imunologické a ochranné složky MM jsou shrnuty v tabulce 3.

<b>Rozpustné faktory</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Složky specifické imunity: sIgA, IgA, IgG, IgM, IgE, IgD, volná sekreční komponenta, anti-idiotypové protilátky</li> <li>• Cytokiny, Chemokiny a receptory: IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, IFN-<math>\gamma</math>, TNF-<math>\alpha</math>, G-CSF, M-CSF, GM-CSF, GRO-<math>\alpha</math>, MCP-1, TGF-<math>\beta</math>1 a 2, sCD14, TLR, sFas, sFasL</li> <li>• Antigeny histokompatibilního komplexu</li> <li>• Složky nespecifické imunity: komplement, chemotaktické faktory, properdin, interferon, <math>\alpha</math>-fetoprotein, protistafylokokové faktory, lektin vážící manózu, <math>\beta</math>-defensin-1, antiadhezivní molekuly (oligosacharidy, muciny, laktadherin, glykolipidy a glykosaminoglykany, kasein), tukové kapénky, hormony a růstové faktory (prolaktin, kortizol, insulin, tyroxin, prostaglandiny, EGF, VEGF, NGF, TGF, erythropoetin), antivirové faktory (mastné kyseliny a monoglyceridy), faktor inhibující migraci (MIF), <math>\alpha</math>-laktalbumin.</li> <li>• Proteiny s funkcí nosičů: laktoferin, transferin, protein vážící vitamin B12, protein vážící steroidy</li> <li>• Enzymy: lysozym, lipoproteinlipáza, leukocytární enzymy, anti-proteázy, acetylhydroláza PAF</li> <li>• Jiné: nukleotidy, nosiči, LCPUFA</li> <li>• Prebiotika, Bifidus faktor, Oligosacharidy</li> </ul>
<b>Buňky</b>
<p>Celkový počet: kolostrum <math>1-3 \times 10^6</math>/ml; zralé mléko <math>\sim 1 \times 10^5</math>/ml            Typy: makrofágy <math>\sim 60\%</math>, neutrofilů <math>\sim 25\%</math>, lymfocyty <math>\sim 10\%</math>, epiteliální buňky</p>

**Tabulka 3.** Imunologické a ochranné složky mateřského mléka (Chirico, G. and Gasparoni, A. 2009).

Některé složky MM podporují růst a motilitu GIT, snižují riziko nekrotizující enterokolitidy i gastrointestinálních infekcí. Mezi tyto faktory patří hormony (kortizol, somatomedin-C, růstové faktory podobné inzulinu, inzulin, hormony štítné žlázy), růstové faktory (epidermální růstový faktor - EGF), mediátory GIT (neurotenzin, motilin), volné aminokyseliny (taurin, glutamin), protizánětlivé faktory (IL-10, polynenasycené mastné kyseliny), enzymy (acetylhydroláza faktoru aktivujícího destičky), imunoglobuliny IgA a IgG. U kojených dětí dochází navíc ke kolonizaci GIT již zmiňovanými příznivými bakteriemi rodu bifidobakterií a laktobacilů. MM stimuluje tvorbu intestinálních hormonů a ovlivňuje motilitu zažívacího traktu. Projímavý účinek kolostra pak snižuje enterohepatální oběh bilirubinu.

## 1.2 Fyziologie laktace – mechanismy syntézy a sekrece MM

V epiteliální buňce mléčné žlázy jsou v době kojení synchronizovány čtyři sekreční procesy: *exocytóza, syntéza a sekrece lipidů, transmembránová sekrece iontů a vody a transcytóza* extraalveolárních proteinů jako jsou imunoglobuliny, hormony a albumin z intersticiálního prostoru. Pátá cesta, tzv. *paracelulární dráha*, umožňuje přímý přesun složek mezi mlékem a intersticiálním prostorem. Tato cesta je možná v mléčné žláze pouze během gravidity a umožňuje přenos molekul přinejmenším stejně velkých, jako jsou intaktní imunoglobuliny. V době kojení tomu tak již není, čímž je zajištěna těsná bariéra mezi mlékem a intersticiálním prostorem. K otevření této cesty pak dochází v přítomnosti mastitidy a také během involuce mléčné žlázy (Neville, M.C. 1995).

### *Exocytóza*

Většina složek vodné frakce mléka je vylučována exocytózou (cesta I, obr. 1). Proteiny syntetizované na ribozomech jsou přesunuty do lumen hrubého endoplazmatického retikula, kde jsou jejich signální sekvence odštěpeny a vznikají proteinové molekuly. Vzniklé „surové“ proteiny jsou následně přeneseny do Golgiho aparátu, kde jsou dále zpracovávány navazováním nebílkovinných složek (sacharidových, fosfátových či jiných) a zabaleny do sekrečních vezikul. Kromě tvorby proteinů mateřského mléka, v Golgiho aparátu buněk kojící prsní žlázy dochází také k syntéze laktózy z prekurzoru UDP - galaktózy a glukózy, které zde vstupují z cytoplazmy. Vzhledem k tomu, že membrána Golgiho aparátu je nepropustná pro laktózu, je cukr osmoticky aktivní a voda je nasávána do terminálních vezikul Golgiho aparátu. Tzv. „oteklý vzhled“ výstupní (trans) strany Golgiho aparátu a vznikající sekreční vezikuly jsou specifické charakteristiky buněk kojící mléčné žlázy. Tvorba micel kaseinu začíná na vstupní (cis) straně Golgiho aparátu s kondenzací kaseinových molekul, přidání kalcia (pravděpodobně v sekrečních vezikulách) pak vede k maturaci kaseinových micel do částic s dostatečnou denzitou, viditelnou v elektronovém mikroskopu. Sekreční vezikuly jsou považovány za zdroj většiny složek vodní frakce mléka, a to včetně citrátu, nukleotidů, vápníku, fosfátu a pravděpodobně také monovalentních iontů a glukózy. Nicméně, apikální membrána alveolárních buněk mléčné žlázy má transportní

systemy pro monovalentní ionty a glukózu a koncentrace těchto látek může být přímo ovlivněna membránovým transportem.

Sekreční vezikuly se přesouvají na plazmatickou membránu, kde dochází exocytózou k uvolnění jejich obsahu do mléka. Jakmile po porodu začne sekrece, je exocytóza kontinuální a sekreční produkty již nejsou uloženy v epiteliálních buňkách.

#### *Syntéza a sekrece lipidů*

Triacylglyceroly syntetizované v hladkém endoplazmatickém retikulu alveolárních buněk mléčné žlázy z prekurzorů mastných kyselin (MK) a glycerolu splývají do velkých kapének, které se přesouvají k apikální membráně buňky (cesta II, obr. 1). Lipidové kapénky zabalené v apikální plazmatické membráně se nakonec oddělí z buňky jako tzv. mléčná tuková kulička (milk fat globule). Náhodné zahrnutí části cytoplazmy spolu s membránou kapénky umožňuje jakékoliv látky obsažené v cytoplazmě vstoupit do mléka. Membrána obklopující kuličku mléčného tuku má dvě funkce: je hlavním zdrojem fosfolipidů a cholesterolu pro kojence a brání splývání tukových kuliček do velkých tukových kapek, které by mohly být obtížné vylučované.

#### *Transport přes apikální membránu*

Transport apikální membránou je omezen pouze na nevelké množství malých molekul (cesta III, obr. 1). Tímto mechanismem přímo prostupují do mateřského mléka monovalentní ionty, voda a některé monosacharidy. Na možný přestup látek apikální membránou je třeba myslet zejména při výběru vhodné farmakoterapie kojící matky.

#### *Transcytóza intersticiálních molekul*

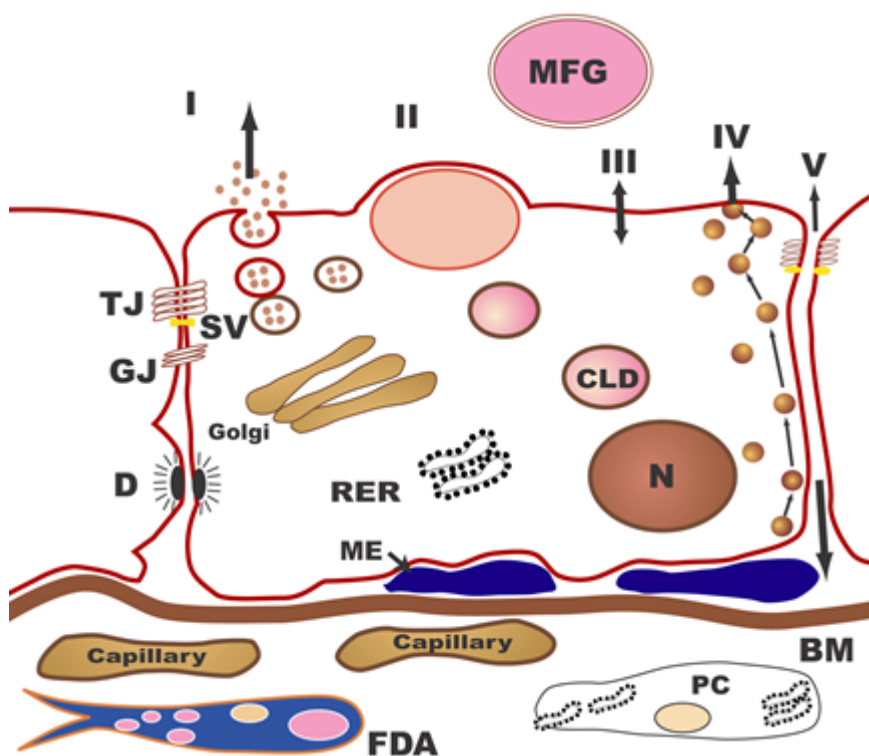
Intaktní proteiny mohou přestupovat přes epitel prsní žlázy z intersticiální tekutiny buď transcytózou nebo prostřednictvím tzv. paracelulární dráhy. V průběhu kojení je však k dispozici pouze transcytotická cesta (cesta IV, obr. 1). Nejlépe prostudovanými molekulami, které prostupují do mléka prostřednictvím transcytózy jsou imunoglobuliny. Imunoglobulin A je syntetizován plazmatickými buňkami v intersticiálních prostorech mléčné žlázy nebo také jinde v těle. Na vnitřní straně epiteliální buňky se IgA váže na transportní Fc receptor (tzv. poly-Ig receptor). Komplex tohoto receptoru s IgA je pak endocytován a transportním váčkem přenesen na druhou stranu buňky (luminální stranu). Tam fúzuje s

membránou a část receptorové molekuly spolu s navázaným IgA se proteolyticky odštěpí. Část sekreční molekuly, která zůstává spojena s IgA, se nazývá sekreční komponenta a zajišťuje IgA rezistenci vůči střevním proteázám. Tímto způsobem se také IgA dostává do mateřského mléka a z něj do zažívacího traktu novorozence. Tam má důležitou ochrannou funkci v době, kdy jeho imunitní systém ještě IgA neprodukuje. Podobným způsobem prostupuje z plazmy do mateřského mléka řada proteinů, hormonů a růstových faktorů.

#### *Paracelulární cesta*

Paracelulární cesta (cesta V, obr. 1) umožňuje přestup látek mezi epitelovými buňkami. V průběhu kojení brání přestupu látek mezi alveolárními buňkami tzv. tight junctions, tj. těsné spoje mezi epiteliálními buňkami, kterými prostupuje voda a některé hydrofilní molekuly. Přestože některé buňky imunitního systému zjevně mohou do mléka prostupovat diapedézou, nenechávají po svém přechodu mezi těsnými spoji trvalé mezery. V průběhu gravidity, mastitidy a pak také během involuce mléčné žlázy se tight junctions stávají propustné a umožňují složkám z intersticiálního prostoru přestupovat volně do mléka. Stejně tak může v tomto období dojít k přestupu některých složek mateřského mléka do plazmy.

V současné době je hodně diskutovaná teorie tzv. enteromamárního oběhu (Kleinman, R.E. and Walker, W.A. 1979). Některé látky (sekreční protilátky, probiotické bakterie atd.) přítomné ve stěvě matky mohou prostupovat krevním oběhem do mléčné žlázy. Kojené dítě tak v MM přijímá sekreční protilátky proti mikroorganismům, které kolonizují sliznice matky i samotného dítěte (Brandtzaeg, P. 2010).



**Obrázek 1.** Cesty sekrece a syntézy mléka buňkami mléčné žlázy. I: Exocytóza mléčných proteinů, laktózy a dalších složek vodné fáze v sekrečních vezikulách Golgiho aparátu. II: Sekrece mléčných lipidů cestou tukové kapénky. III: Přímý přestup monovalentních iontů, vody a glukózy přes apikální membránu buňky. IV: Transcytóza složek intersticiálního prostoru. V: Paracelulární cesta některých složek plazmy a leukocytů. (McManaman, J.L. and Neville, M.C. 2003)

Legenda: SV = sekreční vezikuly; RER = drsné endoplasmatické retikulum; BM = bazální membrána; MFG = mléčná tuková kulička; CLD = cytoplasmatická tuková kapénka; N = jádro; PC = plasmatická buňka; FDA = adipocyt; TJ = tight junction; GJ = gap junction; D = desmozom; ME = myoepiteliální buňka.

### 1.3 Účinky mateřského mléka na zdraví kojených dětí

Řada epidemiologických studií prokázala, že kojení je asociováno se snížením morbidity kojených dětí a nižším rizikem vzniku **infekčních nemocí** (akutní střevní a respirační infekce, akutní a rekurentní otitidy a močové infekce). Tento efekt je přítomen v době kojení, ale může přetrvávat i po ukončení kojení, a to až do jednoho roku života (Schanler, R.J. 2013). Uplatňuje se zde zejména účinek sekrečního IgA, který váže mikroby na sliznici dítěte a brání aktivaci zánětlivé odpovědi, zatímco laktoferin ničí mikroby a tlumí zánětlivou reakci (Lawrence, R.M. and Pane, C.A. 2007).

V poslední době se stále častěji stávají předmětem zájmu pozitivní účinky kojení přetrvávající do pozdního dětského věku a dospělosti. Donedávna předpokládaný protektivní účinek kojení před vznikem **civilizačních onemocnění** (hypertenze, hypercholesterolemie, obezita, diabetes mellitus 2. typu (DM2)) a pozitivní vliv na intelektuální vývoj však dle posledního systematického přehledu WHO nebyl doposud jednoznačně prokázán (Horta, B.L. and Victora, C.G. 2013). Mechanismus této hypotetické ochrany není známý.

Některé práce poukazují na možný dlouhodobý ochranný vliv kojení před vznikem **imunologicky podmíněných onemocnění**, jako celiakie (Szajewska, H. et al. 2012), zánětlivá střevní onemocnění (Barclay, A.R. et al. 2009), diabetes mellitus 1. typu (Frederiksen, B. et al. 2013), alergická onemocnění (Kramer, M.S. 2011). Dosud publikované studie však přinesly rozporuplné výsledky, stejně tak jako se nepodařilo přesněji objasnit mechanismus tohoto ochranného vlivu. Vzhledem k tomu, že v patogenezi těchto onemocnění se uplatňuje porucha imunotolerance, nabízel by se zde mechanismus indukce tolerance vůči specifickému antigenu prostřednictvím MM. Je dobře známo, že v MM se objevují antigeny, které hrají významnou roli u imunologicky podmíněných onemocnění. Navíc spolu s antigenem přijímá kojeneček v MM i určité biologicky aktivní faktory, které jsou schopny toleranci indukovat, jako např. sekreční IgA, alfa-linolenová kyselina a cytokiny jako TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4, IL-8 (Verhasselt, V. 2010).



Vztah kojení a **alergických onemocnění** je neustále předmětem diskuzí, nicméně i v této oblasti jsou výsledky zatím kontroverzní (Duncan, J.M. and Sears, M.R. 2008). Podle některých autorů může výlučné kojení v prvních 4 měsících života snížit riziko alergie na bílkovinu kravského mléka v časném dětském věku, dlouhodobější efekt a vliv na další typy potravinových alergií je zatím nejasný (Fleischer, D.M. 2013). Výzkum v této oblasti je velice svízelný vzhledem ke komplexnosti složek MM a vzájemné interakci střevního i zevního prostředí a imunitního systému novorozence. Nezanedbatelné jsou i etické důvody znemožňující randomizaci dětí ke kojení a krmení náhradní kojeneckou mléčnou výživou. Nicméně kojení sehrává pravděpodobně velkou roli v tzv. nutričním programování v prvních dnech či měsících života (Cottrell, E.C. and Ozanne, S.E. 2008).

**Teorie programování** je založena na hypotéze, že faktory ovlivňující mladého jedince v kritickém období vývoje, určují rizika vzniku nemocí později v dospělosti. Za taková onemocnění jsou považována zejména tzv. civilizační onemocnění, jako je obezita, hypertenze, inzulinová rezistence, ateroskleróza, atd. Předpokládá se, že v případě nutričního programování lze tato rizika ovlivnit cílenou výživou v období těhotenství a časném postnatálním období (vliv specifických nutrientů – vitaminy, minerály, antioxidanty, regulační hormony).

V posledních letech bylo popsáno několik nových molekul, které mohou významným způsobem ovlivnit nutriční stav jedince a sehrávat určitou roli v rozvoji metabolického syndromu později v dospělosti. Jedná se zejména o tzv. **regulační hormony** (RH) příjmu potravy a glukózo-lipidového metabolismu (adiponektin, leptin, ghrelin, adipocitární vazebné proteiny mastných kyselin a další). Nejvýznamnější regulační hormony MM jsou shrnuty v tabulce 4.

Hormon	Objev	Hlavní funkce	Objev v MM	Metoda	Receptor	Objev receptoru ve střevě
Leptin	1994	Anorexigenní efekt	1997	RIA ELISA	Ob-R	U člověka
Adiponektin	1995	Zvýšení inzulinové senzitivity Zvýšení metabolismu mastných kyselin Protizánětlivý efekt Antiaterogenní efekt	2006	RIA ELISA	AdipoR1 AdipoR2	U myši, u člověka
Ghrelin	1999	Orexigenní efekt Stimulace sekrece STH Stimulace žaludeční sekrece a motility	2006	RIA	GHS-1a	U člověka
IGF-1	1950	Primární mediátor efektu STH Regulace postnatálního růstu	1984	RIA	IR IGF-IR IGF-IIR	U člověka
Rezistin	2001	Regulace inzulinové senzitivity	2008	ELISA	Neznámo	Neznámo
Obestatin	2005	Anorexigenní efekt	2008	RIA	GPR 39	U myši

**Tabulka 4:** Nové regulační hormony mateřského mléka (Bronsky, J. 2010).

## 1.4 Regulační hormony přítomné v MM

### 1.4.1 Adiponektin

Adiponektin (30 kDa) je predominantní sekretorický protein tukové tkáně, objevený v roce 1995 (Scherer, P.E. et al. 1995). Gen pro adiponektin je lokalizovaný na pozici 3q27, přičemž tento lokus je asociovaný také s predispozicí ke vzniku DM2 a metabolického syndromu (Filippi, E. et al. 2004). Tento protein, původně označovaný jako adipocyte complement-related protein, tvoří asi 0,01% celkové sérové bílkoviny a skládá se z 244 aminokyselinových zbytků. Jeho N-terminální doména je podobná kolagenu VII a C-terminální globulární doména je podobná C1q faktoru komplementu. V plazmě vytváří adiponektin oligomerické komplexy. Vyskytuje se jako trimer (nízkomolekulární forma, a to zejména jako cirkulující adiponektin), pak jako hexamér, sestávající ze dvou trimerů spojených disulfidickými vazbami (forma o střední molekulární hmotnosti) a také jako velký multimér, sestávající z 12-18 podjednotek (vysokomolekulární forma). Tento velký multimér je biologicky aktivní a je nejlepším prediktorem inzulínové rezistence. Vyskytuje se zejména intracelulárně (Liu, M. and Liu, F. 2014).

#### *Receptory pro adiponektin*

Doposud bylo identifikováno několik adiponektinových receptorů, z nichž nejdůležitější jsou dva - AdipoR1 a AdipoR2, které mají 7 transmembránových domén, ale jsou strukturálně, topologicky i funkčně odlišné od receptorů sdružených s G-proteinem (GPCR). Jejich N-terminální doména je intracelulární a C-terminální doména extracelulární (na rozdíl od GPCR). AdipoR1 se vyskytuje ubikvitně, ale nalézáme ho zejména na povrchu buněk kosterní svaloviny. Byl však také prokázán ve střevní sliznici (včetně kojenců), kde může být potenciálním cílovým receptorem pro adiponektin obsažený v mateřském mléce (Bronsky, J. et al. 2012). Jeho gen je umístěn na lokusu 1p36. AdipoR2 je predominantně exprimován v jaterní tkáni a jeho gen je lokalizován na pozici 12p13. Dalším známým typem receptoru je tzv. T-cadherin, který váže hexamerní a vysokomolekulární formy adiponektinu (Yamauchi, T. et al. 2014).

AdipoR1 a AdipoR2 zvyšují aktivitu ligandů AMPK (AMP-aktivovaná proteinkináza), PPAR- $\alpha$  (peroxizomovým proliferátorem aktivovaný receptor typu alfa) a p38 MAPK (mitogenem aktivovaná proteinkináza) (obr. 2). AdipoR1 vede aktivací AMPK ke zvýšení exprese genů kódujících hepatální glukoneogenetické enzymy a tím ke snížení endogenní produkce glukózy. AdipoR2 pak cestou PPAR-alfa vede ke zvýšení exprese genů odpovědných za zpětné vychytávání glukózy. Aktivace obou těchto receptorů vede ke zvýšení oxidace MK, snížení zásob triacylglycerolů a zlepšení inzulínové rezistence (Yamauchi, T. et al. 2014).

### *Účinky adiponektinu*

K hlavním funkcím adiponektinu v organismu patří zajištění homeostázy glukózy a lipidů (Mather, K.J. and Goldberg, R.B. 2014), a to tím, že potlačuje glukoneogenezi v játrech a zároveň zvyšuje utilizaci glukózy již zmiňovaným zvýšením oxidace mastných kyselin ve svalech a v játrech. Dále stimuluje vychytávání glukózy ve svalech, zvyšuje inzulínovou senzitivitu a stimuluje sekreci inzulínu. Snižuje tím tedy hladinu glukózy, triacylglycerolů a mastných kyselin. Jeho hladiny negativně korelují s body mass indexem (BMI), procentem tělesného tuku, koncentracemi inzulínu nalačno, hladinou triacylglycerolů v plazmě, inzulínovou rezistencí a výskytem metabolického syndromu. Naopak pozitivní korelace byla prokázána u hladin HDL cholesterolu a markerů inzulínové senzitivity (Savino, F. et al. 2013; Chapnik, N. et al. 2014; Mather, K.J. and Goldberg, R.B. 2014; Ye, E. et al. 2014).

Adiponektin se při lézi endotelu hromadí ve stěně cévy a inhibuje proliferaci a migraci hladkých svalových buněk a také přeměnu makrofágů na pěnové buňky. Cestou aktivace cAMP-proteinkinázy A snižuje hladiny adhezivních molekul, což má za následek zhoršení přichytávání cholesterolu a makrofágů na aterosklerotické léze (Fortuno, A. et al. 2003; Hui, X. et al. 2012; Mather, K.J. and Goldberg, R.B. 2014). Významně také ovlivňuje produkci endoteliální syntázy oxidu dusnatého (eNOS), jakožto důležitého faktoru angiogeneze a endoteliální funkce. Navíc potlačuje tvorbu volných kyslíkových radikálů vyvolanou vysokou hladinou glukózy v endoteliálních buňkách. Stimuluje sekreci protizánětlivých cytokinů (IL-1, IL-10) a zároveň snižuje sekreci prozánětlivých cytokinů (TNF-alfa, IL-6).

Výše uvedenými mechanizmy adiponektin chrání organismus před rozvojem aterogenních změn (Hui, X. et al. 2012; Amirzadegan, A. et al. 2013).

Produkce adiponektinu v bílé tukové tkáni vzrůstá během diferenciaci adipocytů. Hypertrofie adipocytů vyvolaná stravou s vysokým obsahem tuků způsobuje naopak snížení produkce a sekrece všech hormonů zvyšujících inzulínovou senzitivitu (včetně adiponektinu) a zvýšení hormonů přispívajících k inzulínové rezistenci (Kershaw, E.E. and Flier, J.S. 2004; Blaslov, K. et al. 2013; Mather, K.J. and Goldberg, R.B. 2014). Snížení syntézy a sekrece adiponektinu vede ke zvýšení kalorického příjmu, a to zejména v případě leptinové deficiencie nebo rezistence. Jeho produkce a sekrece je také stimulována IGF-1. Thiazolidindiony (antidiabetika zvyšující inzulínovou senzitivitu – agonisté receptoru aktivovaného peroxizomovým proliferátorem gamma, PPAR- $\gamma$ ) stimulují expresi adiponektinového genu a zvyšují hladiny adiponektinu u obézních myši a u obézních pacientů s inzulínovou rezistencí (Lihn, A.S. et al. 2005).

#### *Adiponektin v séru*

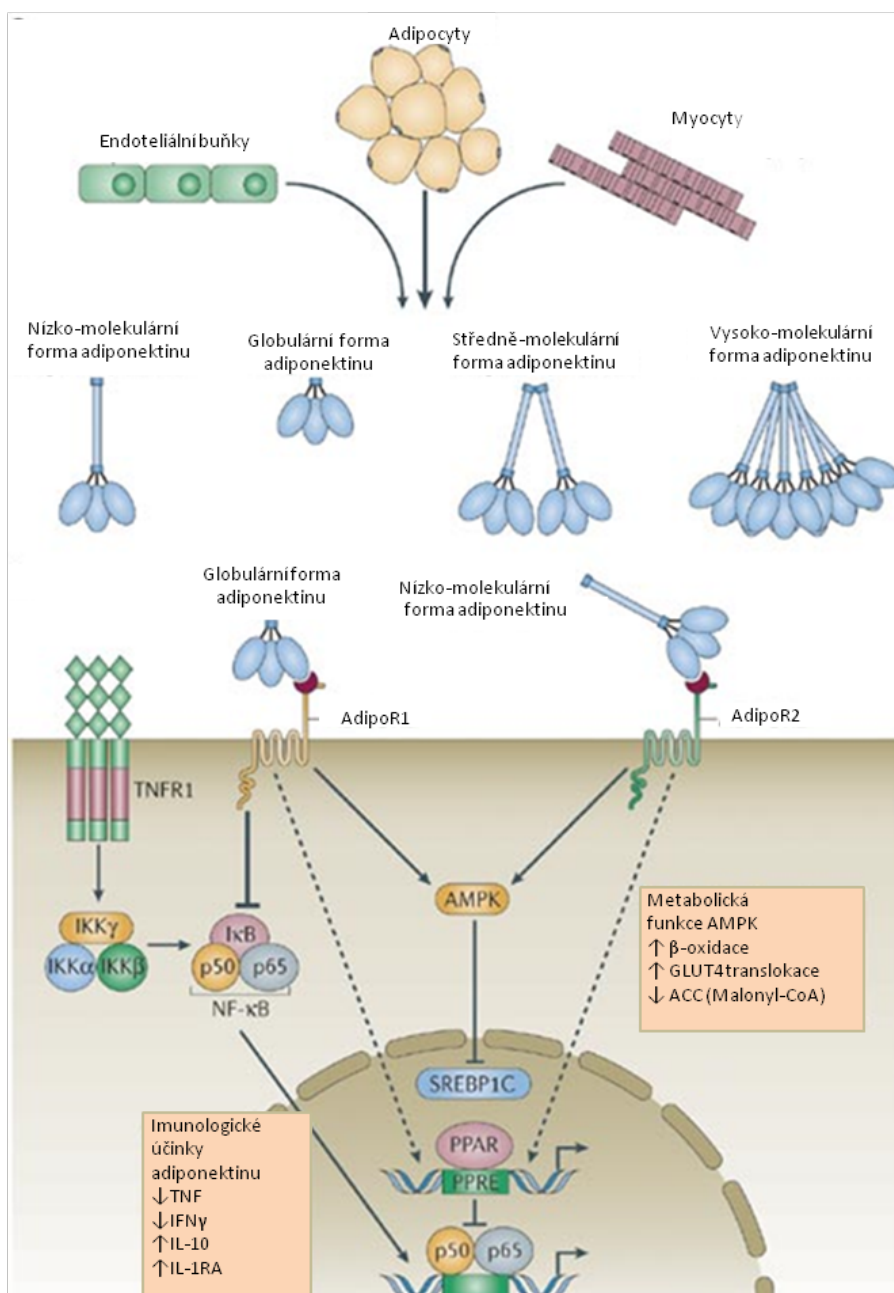
Sérové koncentrace adiponektinu jsou u obézních jedinců nízké, naproti tomu zvýšené hladiny nacházíme u konstitučně štíhlých jedinců. Abnormální příjem potravy může vést ke změnám hladin cirkulujícího adiponektinu. Samotné podání adiponektinu do žaludku myši cestou nazogastrické sondy vedlo s odstupem 2-6 hodin ke vzestupu cirkulujících hladin adiponektinu v séru (Newburg, D.S. et al. 2010). Ke zvýšení hladin adiponektinu u obézních pacientů (s diabetem i bez něj) vede i chirurgická léčba morbidní obezity žaludeční bandáží. Naproti tomu nižší sérové koncentrace adiponektinu nacházíme u pacientů s poruchou glukózové tolerance a DM2 (Jee, S.H. et al. 2013; Lindberg, S. et al. 2013; Kishida, K. et al. 2014). Silnou spojitost mezi hladinami adiponektinu a diabetem prokázala nedávno také skupina korejských autorů, která provedla velkou studii s následným sledováním pacientů po dobu šesti let (Jee, S.H. et al. 2013). Sérové hladiny adiponektinu se tak zdají být vhodným parametrem sledování inzulínové senzitivity u jedinců s metabolickým syndromem (Fu, Y. 2014). Aplikace adiponektinu, rekombinantního adiponektinu nebo léků stimulujících sekreci či působení adiponektinu může v budoucnu vést ke zlepšení inzulínové senzitivity a glukózové tolerance a k nápravě hyperglykémie spojené s obezitou. Vliv thiazolidindionů na sekreci adiponektinu může alespoň zčásti vysvětlit hypoglykemizující účinek těchto léků

u pacientů s DM2. Adiponektin je biomarkerem spojujícím jednotlivé složky metabolického syndromu a mohl by tak v klinické praxi najít široké využití (Fu, Y. 2014; Kishida, K. et al. 2014; Mather, K.J. and Goldberg, R.B. 2014). Vzhledem k výše uvedeným faktům se využití adiponektinu v predikci vzniku diabetu a zvýšeného kardiovaskulárního rizika jeví jako velice slibné a užitečné (Mather, K.J. and Goldberg, R.B. 2014).

Adiponektin byl identifikován také v pupečnickové krvi, kde jsou jeho hladiny přímo spojeny s porodní hmotností vzhledem ke gestačnímu věku, negativně spojeny s hmotnostním přírůstkem v prvních 6 měsících života a jsou také prediktivním faktorem přírůstku tukové tkáně v prvních 3 letech života dítěte (Mantzoros, C.S. et al. 2009). Je známo, že sérové hladiny adiponektinu negativně korelují s množstvím tělesného tuku u dětí mezi 5. a 10. rokem života. Naopak u donošených dětí v prvních dnech života korelují sérové a plazmatické hladiny adiponektinu pozitivně s porodní hmotností a délkou, množstvím tukové tkáně novorozence a cirkulujícími hladinami leptinu (Ozarda, Y. et al. 2012). U nedonošených dětí jsou sérové hladiny adiponektinu nižší než u donošených, korelují pozitivně s tělesnou hmotností a s věkem se zvyšují. Tato situace je pravděpodobně projevem poporodní metabolické adaptace nedonošeného dítěte (Siahanidou, T. et al. 2007).

#### *Adiponektin v MM*

V mateřském mléce byl adiponektin poprvé popsán v roce 2006, a to současně naším výzkumným týmem (Bronsky, J. et al. 2006) a týmem Dr. Martin (Martin, L.J. et al. 2006). Vzhledem k biologickým vlastnostem adiponektinu, jeho přítomnosti v MM a přítomnosti AdipoR1 ve sliznici tenkého střeva u myší (Zhou 2005) a AdipoR1 a R2 ve sliznici kolon u lidí, je možné, že se adiponektin v MM podílí na programování některých fyziologických funkcí kojence. Koncentrace adiponektinu v MM se průběhu laktace mění (Martin, L.J. et al. 2006; Weyermann, M. et al. 2006; Dundar, N.O. et al. 2010; Newburg, D.S. et al. 2010; Bronsky, J. et al. 2011). Weyermann a spol. popsali vyšší hladiny adiponektinu v MM matek, jejichž děti měly nadváhu ve 2 letech věku a byly kojeny alespoň 6 měsíců (Weyermann, M. et al. 2007). Náš výzkumný tým publikoval změny koncentrací adiponektinu v MM v průběhu 12 měsíců laktace (Bronsky, J. et al. 2011).



**Obrázek 2.** Adiponektin: zdroje, struktura a vlivy na ostatní cytokiny (Tilg, H. and Moschen, A.R. 2006).

Legenda: AdipoR1, AdipoR2 – receptory pro adiponektin, AMPK – AMP aktivovaná proteinová kináza, SREBP1C - protein vázající se na sterol-regulující element, PPAR - receptor aktivovaný peroxizomovým proliferátorem, PPRE – PPAR responzivní element, NF- $\kappa$ B - nukleární faktor  $\kappa$ B (heterodimer p50/p65), IKK- inhibitor  $\kappa$ B kinázy  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , TNF – tumor nekrotizující faktor TNFR – receptor pro TNF, IFN – interferon, IL-10 – interleukin 10, IL-1RA – antagonist receptoru pro IL-1, ACC – acetyl koenzym A.

## 1.4.2 Leptin

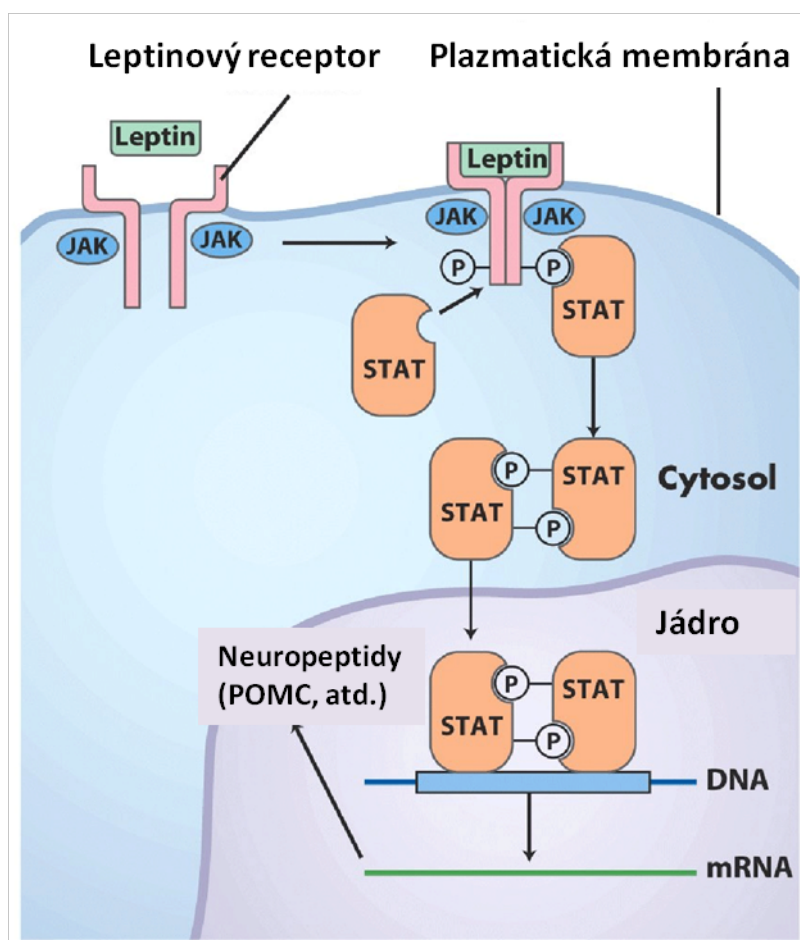
Leptin (16 kDa) je protein produkovaný buňkami tukové tkáně. Byl prvním objeveným adipokinem v roce 1994, a to týmem Zhang a spol. (Zhang, Y. et al. 1994), i když už v roce 1950 byla popsána genová mutace v leptinovém genu (*ob* gen) u myši, která vedla k rozvoji morbidní obezity a diabetu již v časném věku. Je zatím jedním z nejlépe probádaných adipokinů. Je tvořen 167 aminokyselinami a jeho terciární strukturu tvoří čtyři anti-parallelní alfa-helixy, které jsou spojeny dvěma dlouhými a jedním krátkým spojem. Gen pro leptin je lokalizován na sedmém chromozomu, v pozici 7q31.3. Leptin je tvořen nejen v bílé, ale také v hnědé tukové tkáni, nacházíme jej také v placentě, oocytech, buňkách preovulačního folikulu, epitelu prsní žlázy, žaludeční sliznici, hypotalamu, hypofýze a také v kosterních svalech. Leptin zprostředkovává své účinky prostřednictvím specifického receptoru, a to jak v mozku, tak i v periferních tkáních.

### *Receptory pro leptin*

Leptin má v organismu řadu receptorů. Gen pro leptinový receptor (LEPR) se nachází na pozici 1p31 a má 17 exonů. V organismu existuje 6 izoform receptoru pro leptin (LEPR a-f). Avšak pouze typ B obsahuje intracelulární strukturu potřebnou pro aktivaci buněčných signálů. Chybějící funkční gen pro leptinový receptor je pak odpovědný za vznik obezity a metabolického syndromu. Tato izoforma se nachází v hypotalamu, kde zprostředkovává efekt leptinu na energetickou homeostázu a nalézáme jí také v endometriu. Ostatní izoformy se podílejí na transportu leptinu v organismu. Rozdíly v těchto izoformách jsou dané délkou intracelulární (cytoplazmatické) domény, extracelulární domény obou typů receptorů jsou shodné. Dlouhá forma leptinového receptoru má v intracelulární doméně 302 aminokyselinových zbytků a vyskytuje se v hypotalamu, zatímco krátká forma jich má jenom 32-40 a vyskytuje se především v buňkách chorioideálního plexu. Předpokládá se, že se účastní regulace transportu leptinu ze séra přes hematoencefalickou bariéru (Munzberg, H. 2010). Krátká forma leptinového receptoru byla nalezena v různých orgánech, mimo jiné také v ledvinách, plicích a cévách. Mutace v genu pro leptinový receptor vede také ke vzniku obezity. Další formou leptinového receptoru je rozpustná forma LEPR<sub>e</sub>, která má jenom 14 exonů a která obsahuje nonintracelulární motivy nebo transmembránové domény.



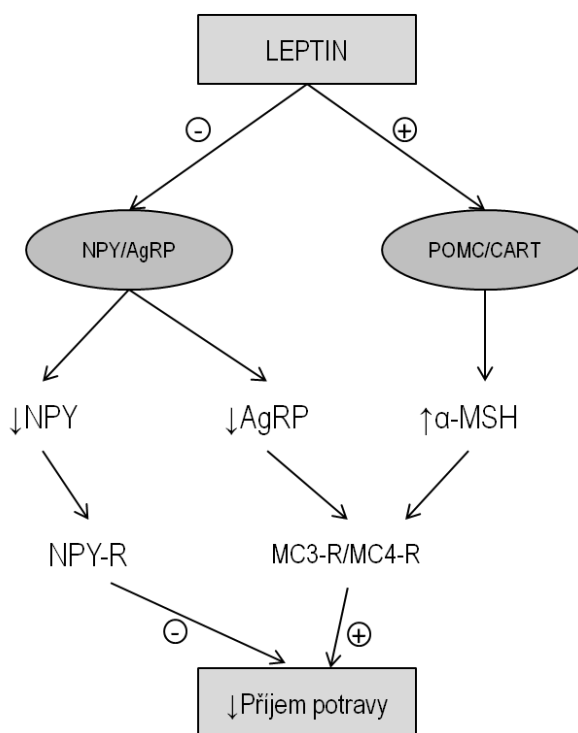
Leptinový receptor je jednoduchým membránovým receptorem patřícím do rodiny cytokinových receptorů, který iniciuje transkripci genů aktivací cytosolických STAT proteinů. STAT proteiny se váží k fosfotyrozinovým zbytkům v cytoplazmatické doméně aktivovaného receptoru, kde jsou fosforylovány. Aktivované STAT proteiny dimerizují a přesouvají se do jádra, kde se váží k DNA a aktivují transkripci (obr. 3). Leptin aktivuje v hypothalamu proteiny STAT 3,5,6 u normálních myší, ale ne u db/db myší, které postrádají funkční izoformu leptinového receptoru. Hypotalamus je cílovým místem pro leptin, který neaktivuje STAT proteiny v žádné jiné tkáni.



**Obrázek 3.** Signální dráha leptinu cestou aktivace Jak/STAT proteinů (Bourque, D.D. 2006)

### Účinky leptinu

Leptin plní řadu funkcí, jeho hlavním úkolem je však adaptace organismu na hladovění. Podílí se na udržování energetické homeostázy a to zejména tím, že omezuje příjem potravy a zvyšuje energetický výdej, informuje o množství tukových zásob, přímo snižuje koncentraci intracelulárních lipidů, stimuluje oxidaci mastných kyselin, zvyšuje vychytávání glukózy a jaterní glukoneogenezi. V nucleus arcuatus hypotalamu stimuluje leptin sekreci anorexigenních peptidů jako proopiomelanokortin (POMC) a kokainem a amfetaminem regulovaný transkript (CART) a zároveň inhibuje sekreci orexigenních peptidů jako je neuropeptid Y a agouti gen-related protein (AGRP) (obr. 4).



**Obrázek 4:** Interakce leptinu s NPY/AGRP a POMC/CART (Rahmouni, K. and W, G.H. 2002).

Legenda: NPY = neuropeptid Y, AGRP= agouti gen related protein, POMC = proopiomelanokortin, CART = kokainem a amfetaminem regulovaný transkript,  $\alpha$ MSH = hormon stimulující  $\alpha$ -melanokortin, MC3/4-R = receptor pro melanokortin (MC3/4-R).

Jelikož je leptin esenciální molekulou pro vyžívání pohlavní osy, sehrává roli i v regulaci nástupu puberty. Podílí se také na regulaci kardiovaskulárních (aktivace sympatiku, zvyšování krevního tlaku, indukce angiogeneze) a imunitních funkcí a také na řízení ontogeneze. Nepřímo ovlivňuje kostní metabolismus, velikost tohoto vlivu závisí na nutričním stavu organismu a nástupu menarché. Nízké koncentrace leptinu, nevyhovující nutriční stav a pozdní menarché jsou rizikovým faktorem pozdějšího rozvoje osteoporózy. U novorozence se leptin pravděpodobně podílí na rozvoji hypotalamických drah regulace energetické rovnováhy a příjmu potravy. Předpokládá se, že se leptin podílí na regulaci růstu plodu. Jeho přítomnost byla prokázána v pupečnickové krvi a koreluje s množstvím tukové tkáně dítěte v době porodu (Tsai, P.J. et al. 2004). U hypotrofických novorozenců tak nacházíme nižší hladiny leptinu než u těch s normální porodní hmotností, u hypertrofických novorozenců jsou pak hladiny leptinu vyšší. Koncentrace leptinu v pupečnickové krvi také negativně koreluje s hmotnostním přírůstkem v prvních 6 měsících života a BMI ve 3 letech (Mantzoros, C.S. et al. 2009).

#### *Leptin v séru*

Plazmatické hladiny leptinu významně korelují s množstvím tukové tkáně v organismu jak u dospělých, tak u dětí. Byla také popsána korelace plazmatických hladin s hladinami v mozkomíšním moku. Vykazují cirkadiánní rytmy, přičemž nejvyšší hodnoty leptinu nacházíme kolem půlnoci a v časných ranních hodinách. Obecně nacházíme vyšší hodnoty u žen než u mužů, a to bez ohledu na tělesnou hmotnost, objem tuku či věk. U jedinců s mentální anorexií se nachází leptin jen ve velmi malém množství. Naproti tomu u pacientů s obezitou bývají hladiny leptinu vysoké. U myši s deficitem leptinu vedlo podání rekombinantního leptinu do CNS ke snížení příjmu potravy i tělesné hmotnosti, při periferním podání je zapotřebí vyšších dávek. U pacientů s prostou obezitou však k tomuto efektu nedochází a lze u nich předpokládat leptinovou rezistenci (Bjorbaek, C. 2009). U obézních jedinců totiž chronicky zvýšené hladiny leptinu dále snižují transport leptinu do CNS a zhoršují citlivost leptinových receptorů. Dlouhá forma leptinového receptoru je exprimována na hypotalamických neuronech, které produkují NPY, který má orexigenní účinky. Podání leptinu tak inhibuje tvorbu NPY a ovlivňuje i melanokortinový systém (cestou aktivace POMC). Také neurony produkující orexiny jsou tedy spolu s leptinem zapojeny

do hypotalamických regulačních drah příjmu potravy (de Lecea, L. et al. 1998; Funahashi, H. et al. 2000).

### *Leptin v MM*

V MM člověka byl leptin objeven v roce 1997 týmem Casabiell a spol. (Casabiell, X. et al. 1997). Je tvořen a secernován epiteliálními buňkami prsní žlázy ve formě tukových mikropének (Smith-Kirwin, S.M. et al. 1998). Receptory pro leptin byly nalezeny ve sliznici žaludku i tenkého střeva na myším modelu i u člověka (Barrenetxe, J. et al. 2002). Je možné, že leptin přechází z MM do krve kojence a může se podílet na krátkodobé regulaci příjmu potravy. Perorální podání leptinu totiž vedlo u novorozenečných myši ke zvýšení hladin leptinu v séru (Sanchez, J. et al. 2005). Myši, kterým byl podáván leptin měly významně nižší hmotnost a nižší množství tělesného tuku v dospělosti a také vyšší inzulinovou senzitivitu. Navíc tyto myši méně preferovaly stravu bohatou na tuk (Sanchez, J. et al. 2008). Zdá se tedy, že suplementace fyziologickou dávkou leptinu v průběhu kojení je více chránilo před vznikem obezity a metabolického syndromu. Koncentrace leptinu v MM pozitivně korelují se sérovými hladinami leptinu, BMI a množstvím tělesného tuku u matky (Ilcol, Y.O. et al. 2006) a také s plazmatickými hladinami leptinu u dítěte (Ucar, B. et al. 2000). Kojené děti mají v prvních měsících života vyšší sérové hladiny leptinu než děti živené náhradní kojeneckou mléčnou výživou. Sérové hladiny leptinu u kojených dětí také korelují s BMI matky (Savino, F. et al. 2006).

### 1.4.3 Ghrelin

Ghrelin (4kDa) byl objeven v roce 1999 a je považován za komplementární prvek k leptinu (Shintani, M. et al. 2001). Je kódován genem pro ghrelin a obestatin (GHRL gen). Skládá se z 28 aminokyselinových zbytků a jeho přítomnost byla prokázána v enteroendokrinních buňkách žaludeční sliznice, ve sliznici tenkého a tlustého střeva, pankreatu i CNS. Stimuluje sekreci STH, prolaktinu a ACTH. Aktivuje neurony produkující orexigenní peptidy NPY a AGRP, a tím stimuluje příjem potravy, ovlivňuje žaludeční motilitu a sekreci a má vliv i na pankreatické funkce (Bronsky, J. 2010). Jeho sekrece se tak zvyšuje při hladovění, kachexii a mentální anorexii. Bývá také označován jako hormon navozující pocit hladu, jeho koncentrace stoupají před jídlem a prudce klesají po jídle. Jeho hladiny negativně korelují s množstvím tělesného tuku, BMI i s plazmatickou hladinou leptinu, glukózy a inzulinu (Bacha, F. and Arslanian, S.A. 2005). U myši vedlo podání ghrelu ke vzestupu tělesné hmotnosti a množství tukové tkáně a to zvýšením příjmu potravy a současným snížením energetického výdeje (Tschop, M. et al. 2000).

#### *Ghrelin v MM*

Přítomnost ghrelu byla prokázána i v MM, je tvořen buňkami mléčné žlázy, částečně se však do MM dostává i z plazmy (Aydin, S. et al. 2006). Sérové koncentrace ghrelu bývají nižší než koncentrace v MM (Savino, F. et al. 2012). Koncentrace ghrelu v MM stoupají během laktace a korelují se sérovými hladinami u kojenců (Ilcol, Y.O. and Hizli, B. 2007; Savino, F. et al. 2012). V MM byl navíc nalezen tzv. aktivní ghrelin, tj. acylovaná forma ghrelu s plnou biologickou účinností (Ilcol, Y.O. and Hizli, B. 2007). Cirkulující hladiny ghrelu korelují s věkem, hmotností a tělesnou délkou kojenců v průběhu časného kojeneckého období. U dětí krmených náhradní kojeneckou mléčnou výživou byly v průběhu prvních šesti měsíců nalezeny vyšší sérové hladiny ghrelu než u dětí kojených. Zdá se, že právě ghrelinem přítomným v MM je regulován příjem potravy a následně i tělesné složení dítěte v pozdějším věku (Savino, F. et al. 2012; Savino, F. et al. 2013).

#### 1.4.4 Rezistin

Rezistin (12kDa) je dalším z řady adipocytokinů, je tvořen 108 aminokyselinami a byl objeven v roce 2001 (Steppan, C.M. et al. 2001). Gen kódující rezistin je lokalizován na 19. chromozomu. Jeho receptor nebyl sice dosud objeven, nicméně recentní práce naznačují, že rezistin interaguje s endotoxinovým receptorem Toll-like receptor-4 (TLR-4) a decorinem (Daquinag, A.C. et al. 2011; Benomar, Y. et al. 2013). Jedná se o adipocytokin, který sehrává významnou roli při vzniku obezitou navozené inzulinové rezistence u myší. U člověka je však jeho vliv na vznik inzulinové rezistence menší (homologie pouze 64 procent). Jeho účinky lze obecně shrnout jako účinky opačné inzulinu. Je produkován tukovou tkání, ale také v žaludku, střevě, nadledvinách, varlatech a ve svalech. Jeho vysoké koncentrace nacházíme u obézních pacientů a jedinců s DM (Geyikli, I. et al. 2013). U obézních jedinců jsou cirkulující hladiny rezistinu v krvi zvýšené, při redukci tělesné hmotnosti klesají (Cabrera de Leon, A. et al. 2014). Rezistin také snižuje příjem potravy působením na hypothalamická centra (Tovar, S. et al. 2005). Naopak hladovění vede ke snížení jeho koncentrací. Rezistin má také prozánětlivý efekt, který je zprostředkovaný cestou zvýšení exprese TNF-alfa a IL-6.

##### *Rezistin v MM*

V roce 2008 byl rezistin objeven v MM (Iicol, Y.O. et al. 2008). Zároveň bylo zjištěno, že jeho koncentrace v MM klesají v průběhu laktace a pozitivně korelují s hladinami CRP i hladinami dalších hormonů jako jsou například estradiol, progesteron, prolaktin, tyroxin, trijodthyronin, kortizol. Stejně tak korelují hladiny rezistinu s hladinami leptinu. Sérové koncentrace rezistinu u dětí pak korelují s jeho koncentracemi v MM (Savino, F. et al. 2012). Dosud však není známo, jakou roli hraje rezistin ve vývoji plodu či kojence.

### 1.4.5 Obestatin

Obestatin (2,5 kDa) je peptid, který snižuje příjem potravy přes receptor GRP39 (Zhang, J.V. et al. 2005). Je tvořen 23 aminokyselinovými zbytky a je odvozený od ghrelinového prekurzoru preproghrelinu. Vyskytuje a tvoří se v žaludku, tenkém střevě a slinných žlázách (Ozbay, Y. et al. 2008). Tento peptid zpomaluje vyprazdňování žaludku a střevní motilitu a tím také snižuje příjem potravy i tělesnou hmotnost. Vzhledem k jeho účinkům a faktu, že zvýšené hladiny tohoto proteinu v plazmě nacházíme u jedinců s mentální anorexií, by mohl být obestatin u těchto pacientů markerem změn nutričního stavu. Obestatin by také mohl být v budoucnu díky svému anorektickému účinku využíván k léčbě obezity.

#### *Obestatin v MM*

Přítomnost obestatinu v MM byla poprvé prokázána v roce 2008 (Aydin, S. et al. 2008). Současně byly nalezeny 2x vyšší koncentrace obestatinu v MM ve srovnání s jeho koncentrací v séru. Sérové koncentrace obestatinu pozitivně korelují s jeho hladinami v MM (Savino, F. et al. 2012).

## 1.4.6 Inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1)

IGF-1 (7,65 kDa) je bazický peptid, který se skládá ze 70 aminokyselinových zbytků. Tento protein je odpovědný za zprostředkování účinku růstového hormonu. Jak již samotný název napovídá, má IGF-1 podobné účinky jako inzulin. Tyto dva proteiny se však liší biologickým poločasem v krvi. Inzulin má poločas 4 minuty a jeho sekrece je pulzatilní, zatímco poločas IGF-1 je díky jeho vazbě na plazmatické vazebné proteiny (IGFBP 1-6) delší a činí přibližně 15 hodin. Je tedy zřejmé, že sekrece inzulinu reaguje na akutní metabolické situace, zatímco IGF-1 ovlivňuje metabolické procesy spíše z dlouhodobého hlediska. Účinek IGF-1 v jednotlivých tkáních je zprostředkován jeho vazbou na několik typů receptorů. K nejdůležitějším patří inzulinový receptor (IR), pak IGF-IR, IGF-IIR, ale také atypické receptory podobné IR a hybridní receptor IG-IGF-IR. Nejvíce cirkulujícího IGF-1 je tvořeno játry. Hladinu IGF-1 může ovlivňovat hned několik faktorů, a to zejména STH, nutriční stav a řada cytokinů. Nízké hladiny IGF-1 nalézáme typicky u stavů dlouhodobého hladovění a u jedinců s malnutricí (pacientky s mentální anorexií, děti s cystickou fibrózou). K potlačení sekrece IGF-1 vede i řada cytokinů, pravděpodobně se zde nejvíce uplatňuje interleukin 6. S tím pak souvisí nízká hladina IGF-1 při septických stavech, systémových onemocněních, polytraumatech, složitých operačních zákrocích a také malignitách. Z hormonů ovlivňuje sekreci IGF-1 zejména inzulin, kortizol, hormony štítné žlázy a pohlavní hormony (Duan, C. et al. 2010).

### *IGF-1 v MM*

Přítomnost IGF-1 v MM byla prokázána v roce 1984 týmem Baxter a spol. (Baxter, R.C. et al. 1984). Hladiny IGF-1 jsou nejvyšší v kolostru a postupně v průběhu prvních dnů laktace klesají. IGF-1 byl detekován i v pupečnickové krvi, kde jeho hladiny korelují s porodní hmotností novorozence. U dětí s intrauterinní růstovou retardací jsou hladiny IGF-1 vyšší než je tomu u dětí eutrofických (Savino, F. et al. 2009). U zdravých dětí pak v průběhu prvních pěti měsíců (kdy dochází k utváření hormonální osy IGF-1) korelují hladiny IGF-1 pozitivně s věkem, Z-skóre tělesné hmotnosti, BMI a tloušťkou kožní řady nad tricepsem.



### 1.4.7 Vazebné proteiny mastných kyselin (FABP)

FABP (13-14 kDa) patří do skupiny vazebných proteinů mastných kyselin a dalších lipofilních látek jako jsou eikosanoidy a retinoidy. Tato skupina proteinů bývá označována také jako tzv. intracelulární lipid-vazebné proteiny (intracellular lipid binding proteins, iLBPs). Předpokládá se, že tyto proteiny usnadňují přenos mastných kyselin mezi extra- a intracelulárními membránami a transport některých lipofilních molekul přes buněčnou membránu ke konkrétnímu intracelulárnímu receptoru (např. PPAR). Úloha jednotlivých FABP se liší dle místa exprese. Mimo jiné ovlivňují také buněčný růst a diferenciaci. FABP jsou nejvíce zastoupené v tkáních s vysokou metabolickou aktivitou MK, přičemž exprese FABP se zvyšuje s rostoucí intracelulární koncentrací MK. FABP po vazbě s MK mohou vstoupit do buněčného jádra a ovlivnit buněčný cyklus (Schroeder, F. et al. 2008). Adipocytární FABP (AFABP) je predominantním proteinem cytosolu zralých adipocytů. V posledních letech je označován za důležitý regulátor inzulínové senzitivity a glukózo-lipidového metabolismu a je považován za biomarker obezity a metabolického syndromu. AFABP však není pouze cytosolickým proteinem, adipocyty je secernován i do krve. Jeho signifikantně vyšší plazmatické hladiny nalézáme u obézních pacientů. Tyto hladiny pozitivně korelují s obvodem pasu, hodnotou krevního tlaku, markery lipidového metabolismu, hladinou inzulínu a indexem inzulínové rezistence (HOMA). V případě deficitu AFABP mají adipocyty sníženou schopnost lipolýzy a uvolňují méně MK. Tím chrání organismus před vznikem hyperinzulinémie, hyperglykémie a inzulínové rezistence. U myši vedlo vyřazení genu pro AFABP ke snížení rizika rozvoje aterosklerózy. AFABP je přítomen také v makrofázích, kde reguluje produkci prozánětlivých cytokinů a akumulaci esterů cholesterolu.

#### *FABP v MM*

FABP byly izolovány nejdříve v bovinní mléčné žláze (Whetstone, H.D. et al. 1986), později pak také v mléčné žláze myši (Bansal, M.P. and Medina, D. 1993). Nejvyšší exprese FABP v mléčné žláze byla zaznamenána v průběhu laktace. Přítomnost FABP v MM u člověka byla poprvé popsána naším výzkumným týmem v roce 2006 (Bronsky, J. et al. 2006).

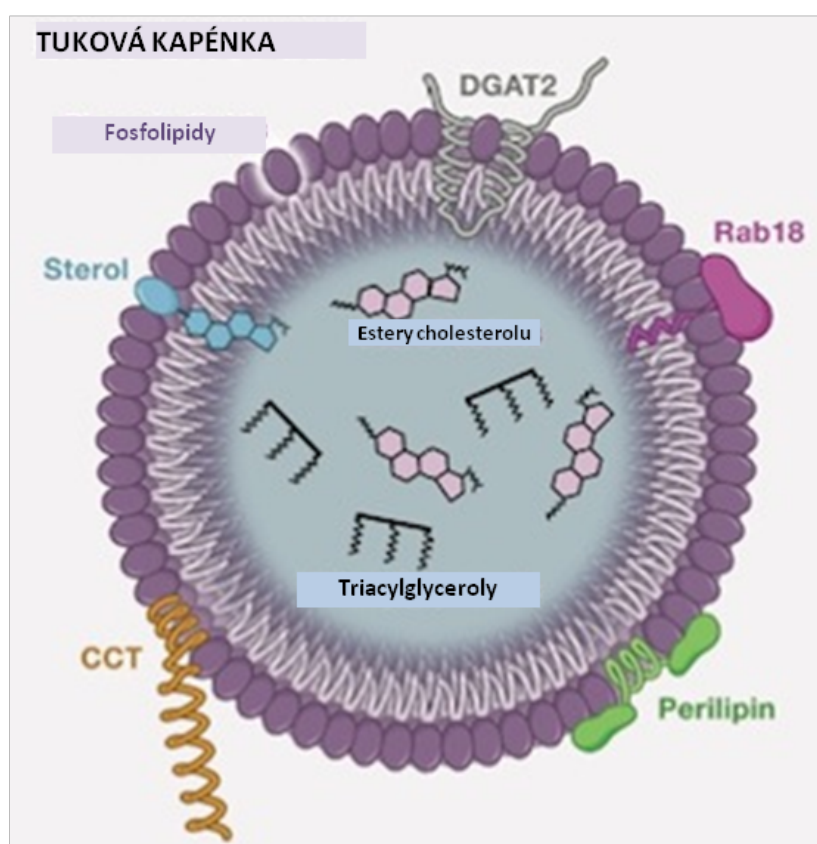
## 1.5 Adipofilin

Adipofilin (52kDa) je protein patřící do rodiny tzv. PAT proteinů (perilipin, adipofilin, TIP47), které se podílejí na akumulaci lipidů v eukaryotických buňkách. Adipofilin byl poprvé objeven v roce 1992 (Jiang, H.P. and Serrero, G. 1992) jako RNA transkript, přičemž exprese adipofilinové RNA se významně zvyšuje v průběhu diferenciaci adipocytů. Adipofilin je svojí strukturou podobný perilipinu, což vedlo k jeho objevení na povrchu tukových kapének produkovaných mléčnou žlázou člověka, krávy a krysy (Heid, H.W. et al. 1996). Tukové kapénky jsou hlavními zásobními organelami neutrálních tuků v buňkách (obr. 4). Jsou to ve skutečnosti vezikuly vyplněné triacylglyceroly a estery cholesterolu, pokryté membránou, vznikající v endoplazmatickém retikulu. PAT proteiny se účastní obalování tukové kapénky a hrají klíčovou roli v regulaci a sekreci cytoplasmatických tukových kapének.

Adipofilin je predominantním proteinem tukových kapének v MM. Je exprimován v mnoha tkáních organismu, které akumulují lipidy či cholesterol (Heid, H.W. et al. 1998). Imunoreaktivita vůči adipofilinu byla popsána také v buňkách kůry nadledvin, v Sertoliho buňkách a v hepatocytech jedinců s jaterní steatózou. Adipofilin by mohl najít využití v diagnostice časných stadií akumulace tuku v jaterní biopsii nebo při detekci lipogenní diferenciaci v tumorech měkkých tkání.

U lidí vedou pokusy o zlepšení inzulínové senzitivity (např. hubnutí u obézních jedinců nebo léčba diabetiků 2. typu léky zvyšujícími inzulínovou senzitivitu) ke zvýšení hladin adipofilinu v kosterním svalstvu (Phillips, S.A. et al. 2005). U myší predisponovaných k rozvoji aterosklerózy (ApoE -/-) vede deficit adipofilinu v makrofázích (pěnových buňkách ve stěně cév) ke snížení akumulace lipidů (Paul, A. et al. 2008) a ke zmenšení rozsahu aterosklerotických plátů i přesto, že plazmatické hladiny cholesterolu a triacylglycerolů zůstávají nezměněny. Adipofilin je také ve zvýšené míře exprimován u jedinců se symptomatickou aterosklerózou karotid (Nuotio, K. et al. 2007). Adipofilin pravděpodobně hraje důležitou roli v ukládání cholesterolu ve formě jeho esterů do pěnových buněk. Zvýšená exprese adipofilinu zvyšuje průnik mastných kyselin do buňky a jejich akumulaci a brání

jejich efluxu z makrofágů, což může hrát roli v procesu aterogeneze. Leptin přímo v makrofázích aktivuje tvorbu lipidových kapének bohatých na adipofilin a zvyšuje také produkci eikosanoidů, což může hrát roli v patofyziologických mechanismech spojených s obezitou, diabetem, kardiovaskulárními chorobami a tumory. Podle některých autorů je adipofilin také vhodným markerem akumulace lipidů v lidských monocytech.



**Obrázek 5.** Tuková kapénka (Krahmer, N. et al. 2009).

Legenda: Jádro tukové kapénky tvořené triacylglyceroly a estery cholesterolu obalené membránou fosfolipidů. Řada proteinů interaguje s povrchem tukové kapénky, patří k nim také perilipin (a další PAT proteiny), protein Rab 18, DGAT2 - diacylglycerol-acyltransferáza 2 a další.

## **2 HYPOTÉZY**

1. Regulační hormony (RH) energetického a glukózo-lipidového metabolismu jsou přítomné v mateřském mléce (MM).
2. Hladiny RH v MM se v průběhu laktace mění.
3. Hladiny RH spojených s energetickým metabolismem souvisí s antropometrickými parametry kojených dětí a jejich matek.
4. Adipofilin je jako protein tukové kapénky přítomen v MM, kde se jeho koncentrace mění v čase v závislosti na změnách obsahu lipidů v MM.

### **3 CÍLE PRÁCE**

1. Stanovit přítomnost vybraných regulačních hormonů (RH) v mateřském mléce (MM).
2. Posoudit dynamiku koncentrací vybraných RH v MM v průběhu 12 měsíců laktace.
3. Analyzovat souvislost hladin vybraných RH v MM s antropometrickými parametry kojených dětí a jejich matek.
4. Stanovit hladiny adipofilinu v MM pomocí metody ELISA a vyhodnotit dynamiku koncentrací adipofilinu v MM.

## 4 METODIKA

### 4.1 Sledovaná skupina

Studie se účastnily kojící matky, které porodily zdravé novorozence na Gynekologicko-porodnickém oddělení Fakultní nemocnice v Motole v období od podzimu 2006 do léta 2008. Do sledované skupiny byly zařazeny pouze matky s nekomplikovaným vaginálním porodem, které porodily v plánovaném termínu. Jakékoliv komplikace u matky nebo dítěte v průběhu porodu či v perinatálním období byly důvodem k vyřazení ze studie. Do hodnocení byly vybrány pouze vzorky MM od matek, které kojily své děti po dobu alespoň šesti měsíců. Celkově bylo do závěrečného hodnocení zařazeno 327 vzorků MM získaných od 72 kojících matek. Třicet matek porodilo chlapce, 42 matek porodilo dívku. Od všech matek byly získány vzorky mléka 48 hodin po zahájení laktace (D0), pak v prvním měsíci (M1), ve třetím měsíci (M3), v šestém měsíci (M6) a třicet devět vzorků bylo získáno ve dvanáctém měsíci (M12) věku dítěte. Zároveň byly z dotazníku a zdravotních záznamů získány i doplňující informace týkající se matky (BMI před těhotenstvím) a dítěte (porodní hmotnost a porodní délka novorozence, pohlaví, gestační věk, tělesná hmotnost v M1, M3, M6 a M12).

Do studie byli zařazeni pouze novorozenci narození z fyziologické gravidity. Všichni novorozenci byli donošení, průměrná porodní hmotnost byla  $3472 \pm 42$  (střední chyba průměru, SEM) g, průměrná porodní délka  $50,2 \pm 0,3$  cm a průměrný BMI matek před těhotenstvím byl  $21,9 \pm 0,4$  kg/m<sup>2</sup>. Žádná z matek v průběhu gravidity nekouřila a nepožívala nadměrné množství alkoholu. Detailní informace týkající se příležitostného užívání alkoholu nebo přesných stravovacích návyků v průběhu gravidity a laktace nebyly k dispozici. Průměrná tělesná hmotnost kojenců v M1 byla  $4045 \pm 53$  g, v M3  $5911 \pm 86$  g, v M6  $7621 \pm 110$  g a v M12  $9590 \pm 125$  g.

Studie byla povolena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Motole a všechny účastnice studie podepsaly informovaný souhlas.

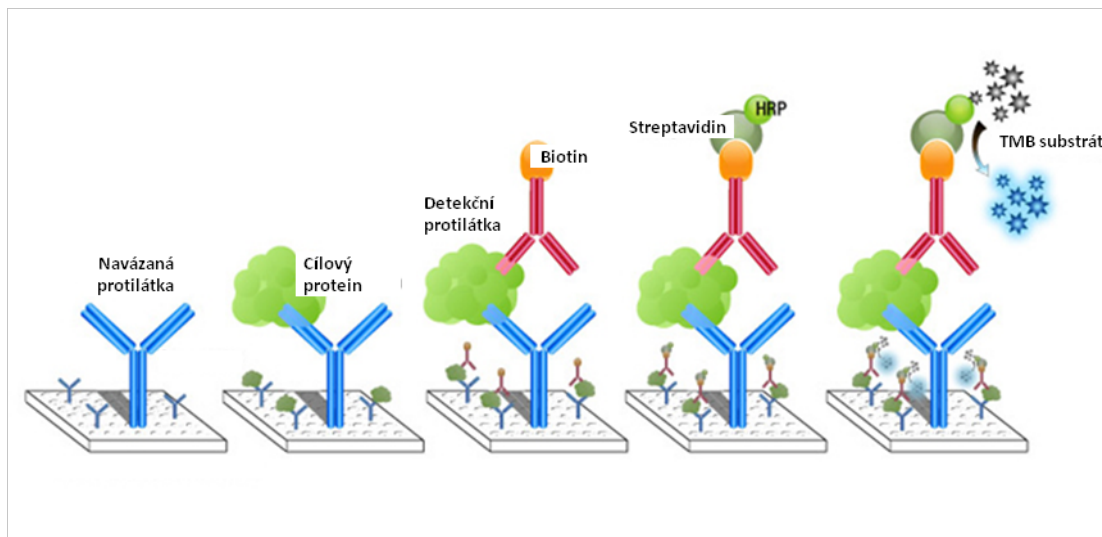
## 4.2 Sběr vzorků

Vzorky MM byly získány manuální expresí nebo za pomoci odsávačky. Do sterilních zkumavek (obsahujících EDTA a proteázový inhibitor) bylo odebráno pokaždé 5 ml mateřského mléka. Vzorky byly odebrané vždy po 7:00 hod. na konci prvního ranního kojení, ze stejného prsu, z jakého bylo kojeno dítě. Ihned po odběru byly vzorky zmrazeny na -20 °C. Kolostrum bylo získáno 48 hodin po zahájení laktace (označeno jako den 0, D0). Další vzorky mléka byly získané v M1, M3, M6 a M12.

## 4.3 Laboratorní analýza

Vzorky MM byly zmrazené uloženy až do zahájení analýzy. Hladiny adiponektinu, leptinu a AFABP byly vyšetřovány v odstředěném mléce. Před analýzou byly vzorky přes noc rozmrazené na 4-6 °C a centrifugovány při 2500g po dobu 20 minut při 4 °C za účelem odstranění tukové vrstvy mléka. Hladiny adiponektinu, leptinu a AFABP byly stanoveny za pomoci komerčně vyráběných ELISA kitů (BioVendor Laboratory Medicine a.s.).

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) je analytická metoda umožňující kvantitativní stanovení vybraného proteinu v séru nebo jiné tělní tekutině. Tato metoda má řadu variant, všechny jsou ale založené na vysoce specifické interakci antigenu s protilátkou. Pro detekci proteinu se využívá tzv. sendvičová ELISA metoda (obr. 6). Na mikrotitrační destičce jsou navázané specifické protilátky proti vybranému proteinu. Po nanesení zkoumaného vzorku (sérum, supernatant) se protein váže na tyto protilátky s vysokou afinitou. V dalším kroku je přidána detekční protilátka, která se váže na jiný epitop primární imobilizované protilátky a rozpoznává navázaný protein. Na detekční protilátce může být kovalentně navázán enzym (např. peroxidáza) anebo může být sama rozpoznávána sekundární protilátkou, která je vázaná na enzym biokonjugací. Mezi každým krokem je destička promyta roztokem, který odplaví proteiny a protilátky, jež nejsou specificky navázané. Po posledním promytí je přidán enzymatický substrát, který po reakci s enzymem vytvoří barevný signál, jež lze detekovat na spektrofotometru a jehož intenzita je přímo úměrná množství detekovaného proteinu.



**Obrázek 6.** Sendvičová metoda ELISA (Epitomics 2013)

### 4.3.1 Stanovení adiponektinu

Pro stanovení adiponektinu v mateřském mléce byla vybrána diagnostická souprava založená na principu sendvičové ELISA metody, která využívá specifickou kozí polyklonální protilátku proti lidskému adiponektinu navázanou na povrch mikrotitrační destičky a nativní adiponektin izolovaný z lidského séra jako standard. K detekci byla použita stejná specifická protilátka, která je ale značená enzymem (křenová peroxidáza). Vzorky mateřského mléka byly naředěny 3x ředícím pufrům a vlastní měření adiponektinu pak bylo provedeno podle pokynů výrobce uvedených v příbalovém letáku. Měřicí rozsah testu byl 1,0 až 50,0  $\mu\text{g/l}$ . Ověření přesnosti a správnosti měření vzorků mateřského mléka jsme provedli s následujícími výsledky. Variační koeficient (CV) v rámci jedné série měření byl 3,8 % u vzorku s relativně nízkou koncentrací adiponektinu (11,8  $\mu\text{g/l}$ ), respektive 5,4 % u vzorku s vysokou koncentrací adiponektinu (22,2  $\mu\text{g/l}$ ). Odpovídající CV mezi jednotlivými sériemi měření pak byly 5,1 % resp. 7,6 %. Pro ověření správnosti měření byly použity dva vzorky MM s výchozí koncentrací adiponektinu 8,1 a 9,4  $\mu\text{g/l}$ , které byly obohaceny o různé množství adiponektinu za účelem zvýšení původní koncentrace adiponektinu o +2,0 a +5,0  $\mu\text{g/l}$ . Průměrná hodnota výtěžnosti byla 91,6 %. Při sériovém naředění vzorků (3x, 6x, 9x a 12x) byly testovány



vzorky plného MM s výchozí koncentrací adiponektinu 22,6 a 21,4 µg/l. Průměrná hodnota výtěžnosti pak činila 111,2 %.

Při uskladnění vzorků plného mateřského mléka dochází k oddělení tukové složky vzorku, proto jsme také provedli srovnání plného a odpovídajícího odstředěného mléka u 6 vzorků. V plném mateřském mléce jsme zjistili stejnou koncentraci adiponektinu jako v odstředěném mléce, navíc v odstředěném mléce nedocházelo k významné změně koncentrací ani při opakovaném zmražení a rozmražení vzorků.

### **4.3.2 Stanovení leptinu**

Koncentrace leptinu byly také měřeny výše popsanou ELISA metodou za pomoci komerčně vyráběného kitu (BioVendor Laboratory Medicine a.s.). Za účelem zlepšení dolního detekčního limitu jsme ale upravili protokol výrobce. Vzorky odstředěného mléka byly naředěny ředícím pufrům v poměru 1:1, rozmezí kalibrátorů bylo 0,2-10,0 µg/l a doba inkubace pak činila 2 hodiny. CV v rámci série měření byl 7,6 % u vzorků s nízkou koncentrací leptinu (0,43 µg/l) a 6,4 % u vzorků s vysokou koncentrací leptinu (1,03 µg/l). CV v rámci jednotlivých sérií měření pak činily 9,1 % a 8,4 %. Výrobce uváděný detekční limit byl 0,05 µg/l.

### **4.3.3 Stanovení AFABP**

V případě stanovení AFABP byla použita ELISA metoda využívající specifickou kozí polyklonální protilátku proti lidskému AFABP navázanou na povrch mikrotitrační destičky a rekombinantní AFABP jako standard. K detekci pak byla použita biotinem značená specifická králičí polyklonální protilátka a konjugát streptavidin-HRP. Vzorky odstředěného MM byly 5x ředěny ředícím pufrům a testovány v souladu s postupem doporučeným výrobcem. Výsledky testu se pohybovaly v rozmezí 0,5 až 20,0 µg/l, s CV 4,6 % v jedné sérii měření pro vzorky s nízkou koncentrací AFABP (4,5 µg/l) a 3,9 % pro vzorky s vysokou koncentrací AFABP (36,6 µg/l). CV mezi sériemi měření pak byly 6,6 % a 5,1 %. Výrobce uváděný detekční limit byl 0,1 µg/l. Tento test nevykazuje zkříženou reaktivitu s ostatními

lidskými typy FABP (epidermální, srdeční, intestinální, jaterní), leptinem, leptinovým receptorem, adiponektinem nebo rezistinem. K ověření správnosti měření byly použity dva vzorky odstředěného MM s výchozí koncentrací AFABP 8,4 a 6,5  $\mu\text{g/l}$ , které byly obohaceny různým množstvím AFABP za účelem zvýšení původní koncentrace AFABP o +2,0 a +5,0  $\mu\text{g/l}$ . Průměrná hodnota výtěžnosti byla 92,7 %. Při sériovém naředění vzorků (5x, 10x, 15x a 20x) byly testovány další vzorky MM s výchozími koncentracemi AFABP 11,1 a 15,1  $\mu\text{g/l}$ . Průměrná hodnota výtěžnosti pro ředěné vzorky pak činila 115,0 %.

#### 4.3.4 Stanovení adipofilinu

Ke kvantitativnímu stanovení koncentrací adipofilinu v MM a sledování jejich dynamiky v průběhu laktace jsme vyvinuli a sestavili vysoce senzitivní (hs) ELISA metodu. Tato sendvičová ELISA metoda využívá specifické ovčí polyklonální protilátky proti lidskému adipofilinu (BioVendor Laboratory Medicine a.s.). V mikrotitrační destičce (Nunc, MaxiSorp) bylo vázáno 100  $\mu\text{g}$  protilátky/jamku o koncentraci 1  $\mu\text{g/l}$  v 0,1M hydrogenuhličitanovém pufru a inkubováno přes noc při teplotě 4°C. Destička byla poté jedenkrát promyta (Columbus washer, Tecan) pomocí TBS-Tw (0,05M Tris-HCl; 0,15M NaCl; pH 7,2; 0,05 % (w/v) Tween 20). Nespecifická vazebná místa byla zablokována roztokem TBS (Tris Buffered Saline, pH 7,2), 4 % sacharózy a 0,5 % hovězího sérového albuminu (v objemu 200  $\mu\text{g}$ /jamku) po dobu 30 minut při teplotě 25 °C. Po aspiraci blokování roztoku byly ředěné vzorky (ředěno 500x ředícím pufrům (TBS-Tw; (w/v) 3 % TRITON X-100; (w/v) 1 % CHAPS) nebo standardy pipetovány v duplikátech o objemu 100  $\mu\text{g}$ /jamku. Destička pak byla inkubována po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti 25 °C.

Po pětinasobném promytí desky promývacím roztokem (TBS, 0,05 % Tween 20, pH 7,2) bylo do všech jamek destičky přidáno 100  $\mu\text{g}$ /jamku biotinem značené ovčí polyklonální protilátky IgG (proces byl proveden soupravou od firmy Pierce) a destička byla opět inkubována po dobu 1 hodiny při teplotě 25°C. Po pěti následujících promytích bylo do všech jamek přidáno 100  $\mu\text{g}$  konjugátu streptavidin-HRP (Amdex) a destička byla inkubována po dobu 1 hodiny při teplotě 25°C. Po promytí destičky bylo do všech jamek dávkováno 100  $\mu\text{g}$ /jamku substrátu TMB (1,2mM tetrametylbendidin s obsahem 3mM peroxidu vodíku, KPL) a reakční směs byla inkubována po dobu dalších 10 minut při teplotě 25°C. Reakce byla zastavena

přídavkem 0,2M roztoku kyseliny sírové (100 µg/jamku) a vzniklé zbarvení bylo měřeno fotometricky při vlnové délce 450 nm (Biotek EL808).

Jako standard byl použit rekombinantní adipofilin poskytovaný společností BioVendor Laboratory Medicine a.s. Koncentrace proteinu rekombinantního adipofilinu byla stanovena pomocí metody s kyselinou bicinchoninovou (BCA metoda, Sigma-Aldrich) a jeho čistota byla potvrzena elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). V testu byly použity standardy v koncentracích 30, 15, 6, 3, 1,5, 0,6 a 0,3 µg/l ředícího pufru a 100 µg pipetováno přímo do jamek.

Za účelem ověření spolehlivosti měření jsme testovali správnost a přesnost metody. Správnost metody byla ověřena metodou standardního přídavku a byla zjišťována výtěžnost metody. Vzorky lidského MM od dvou subjektů (o koncentraci adipofilinu 0,8 a 1,2 mg/l) byly obohaceny o 1,0, 2,0 a 4,0 mg/l rekombinantního proteinu a následně analyzovány. Průměrná hodnota výtěžnosti byla 93%. Navíc byly v testu linearity testovány vzorky lidského séra od dalších dvou subjektů (o koncentraci adipofilinu 4,3 a 3,9 mg/l). Průměrná hodnota výtěžnosti činila 87%.

Detekční limit testu byl 0,05 mg/l. Přesnost metody byla vyjádřena jako variační koeficient v sérii i mezi sériemi měření. Hodnota variačního koeficientu (CV) byla ve všech případech menší než 10 %.

## **4.4            Statistická analýza**

K statistickému hodnocení byl použit statistický software Prism 5.0 (Graph Pas Software, Inc.). Hodnoty byly nejprve ověřeny testem normality distribuce. Vzhledem k nenormálnímu rozložení některých hodnot byly aplikovány neparametrické testy. Výsledky s normální distribucí hodnot jsou uváděny jako průměrná hodnota ± SEM, u nenormální distribuce jako medián. Ke zhodnocení rozdílů mezi skupinami byl použit Kruskal-Wallisův test a Dunnova metoda mnohonásobného porovnávání. Korelace jsou pak vyjádřeny jako Spearmanův korelační koeficient. Hodnoty P nižší než 0,05 byly považovány za statisticky signifikantní.

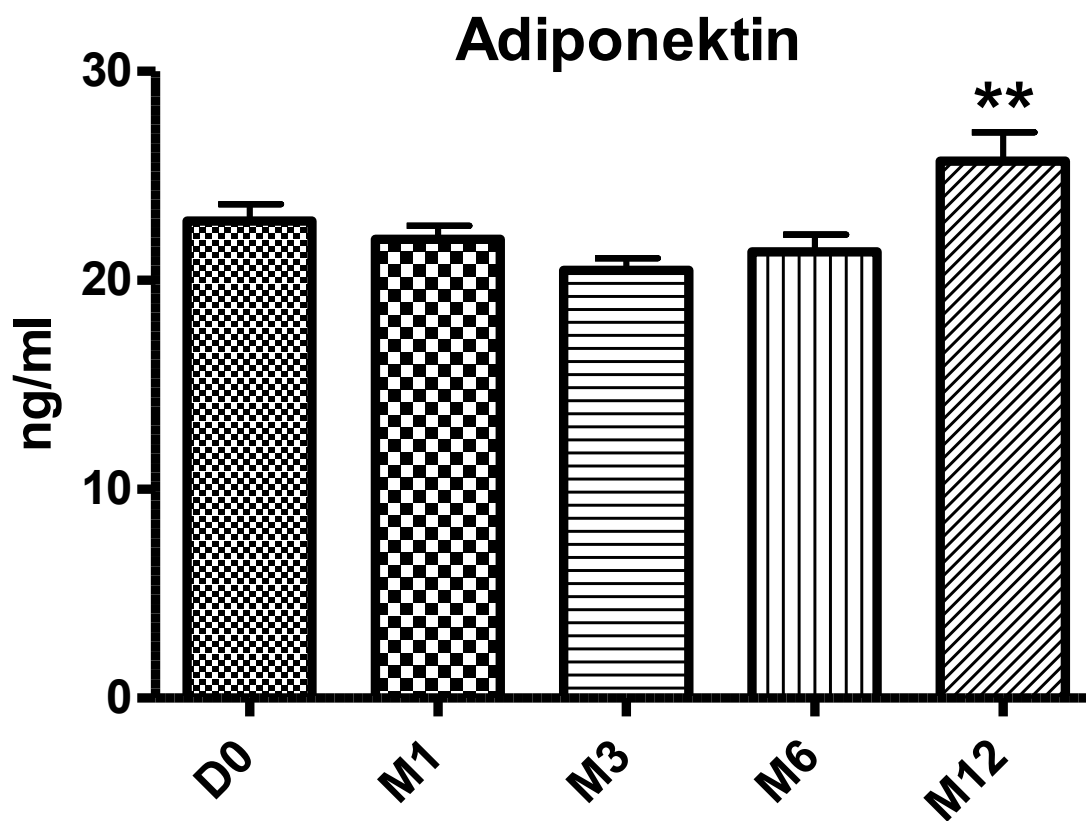
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Detekce a dynamika hladin vybraných regulačních hormonů MM

Hladiny **adiponektinu** v D0 byly  $22,8 \pm 0,8$  (průměr  $\pm$  SEM), v M1  $22,0 \pm 0,6$ , v M3  $20,5 \pm 0,6$ , v M6  $21,4 \pm 0,8$  a v M12  $25,7 \pm 1,4$  ng/ml (obr. 7). Žádný ze vzorků nebyl pod detekčním limitem ELISA metody. Zjistili jsme, že hladiny adiponektinu v M12 byly významně vyšší než hladiny v M3 a M6 (celk.  $p = 0,0026$ ).

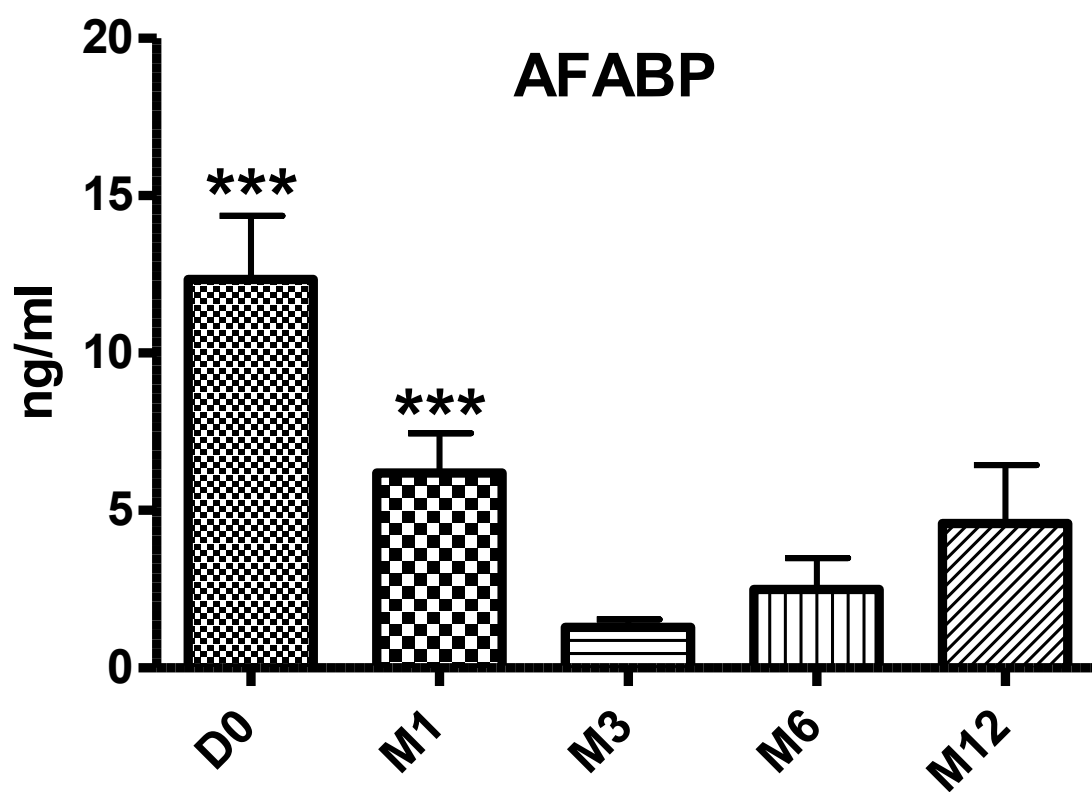
Hladiny **AFABP** nebyly normálně rozloženy. Hladiny AFABP v D0 byly 5,5, v M1 2,3, v M3 0,4, v M6 0,03 a M12 0,3 ng/ml (medián), průměrné hladiny pak byly v D0  $12,3 \pm 2,0$  (průměr  $\pm$  SEM), v M1  $6,2 \pm 1,3$ , v M3  $1,3 \pm 0,2$ , v M6  $2,5 \pm 1,0$  a v M12  $4,6 \pm 1,9$  ng/ml (obr. 8). Pod detekčním limitem bylo v D0 5 % vzorků, v M1 12 %, v M3 37 %, v M6 50 % a v M12 50 % vzorků. Hladiny AFABP v D0 a M1 byly signifikantně vyšší než v M3, M6 a M12 ( $p < 0,0001$ ).

Hladiny **leptinu** nebyly normálně distribuovány. Koncentrace leptinu v D0 byla 0,3, v M1 0,1, v M3 0,04, v M6 0,02 a v M12 0,05 ng/ml (medián). Průměrné hladiny byly v D0  $0,3 \pm 0,04$  (průměr  $\pm$  SEM), v M1  $0,2 \pm 0,03$ , v M3  $0,1 \pm 0,01$ , v M6  $0,1 \pm 0,02$  a M12  $0,2 \pm 0,04$  ng/ml (obr. 9). V D0 bylo 7 % vzorků pod detekčním limitem, v M1 to bylo 31 %, v M3 37 %, v M6 44% a v M12 41% vzorků. Hladiny leptinu v D0 byly signifikantně vyšší než hladiny v M1, M3, M6 a M12 ( $p < 0,0001$ ).



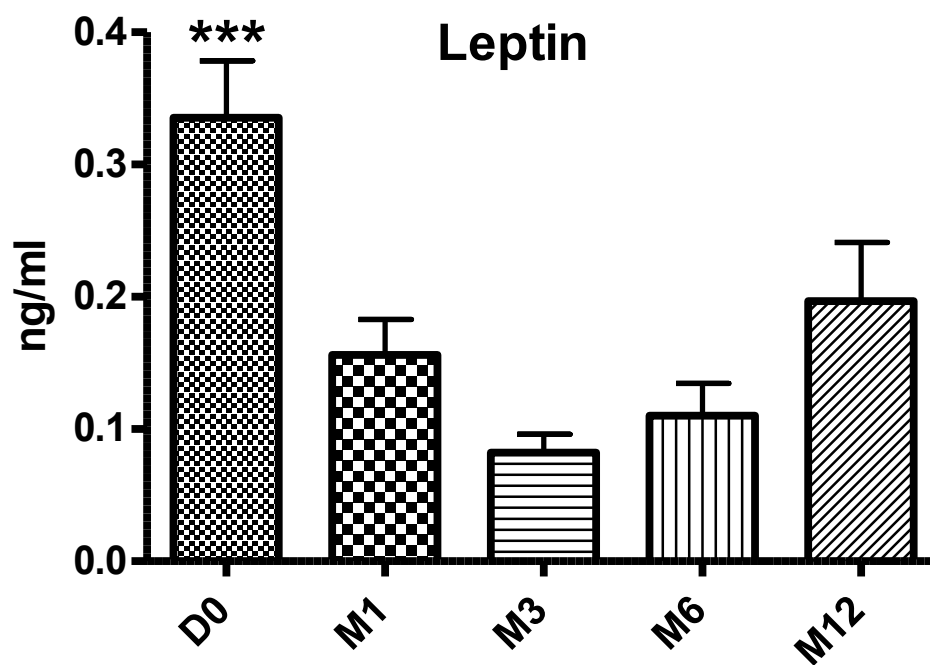
**Obrázek 7:** Hladiny adiponektinu v MM v průběhu laktace (průměr ± SEM).

Legenda: Den 0 (D0), 1. měsíc laktace (M1), 3. měsíc laktace (M3), 6. měsíc laktace (M6) a 12. měsíc laktace (M12).



**Obrázek 8:** Hladiny AFABP v MM v průběhu laktace (průměr ± SEM).

Legenda: Den 0 (D0), 1. měsíc laktace (M1), 3. měsíc laktace (M3), 6. měsíc laktace (M6) a 12. měsíc laktace (M12).



**Obrátek 9:** Hladiny leptinu v MM v průběhu laktace (průměr ± SEM).

Legenda: Den 0 (D0), 1. měsíc laktace (M1), 3. měsíc laktace (M3), 6. měsíc laktace (M6) a 12. měsíc laktace (M12).

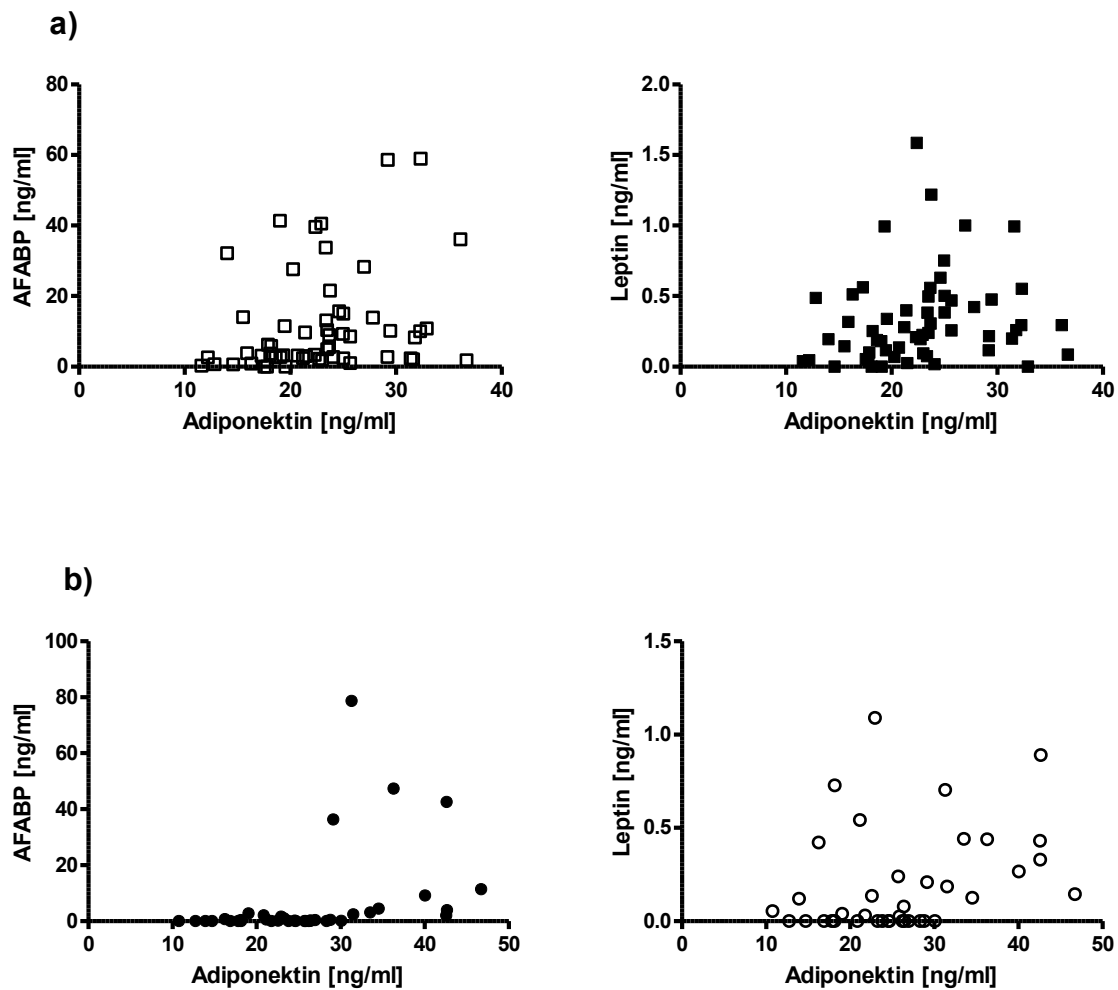
## 5.2 Korelace hladin RH s antropometrickými parametry dětí a jejich matek

V průběhu laktace nebyla nalezena žádná korelace mezi tělesnou hmotností kojenců a hladinami měřených proteinů kromě AFABP v M1 ( $r = -0,2738$ ,  $p = 0,0228$ ). Hladiny AFABP ( $r = -0,2644$ ,  $p = 0,0469$ ) a leptinu ( $r = -0,2666$ ,  $p = 0,0450$ ) korelovaly negativně s tělesnou délkou v D0.

Mezi hladinami leptinu v D0 a BMI matek před graviditou byla nalezena hraniční korelace, nicméně tato korelace nedosáhla statistické významnosti (Spearman  $r = 0,2268$ ,  $p = 0,0928$ ). Žádná další korelace měřených RH a BMI matek nebyla nalezena. Nebyla také nalezena žádná korelace mezi hmotnostním přírůstkem v průběhu prvního roku života a hladinou jakéhokoli RH v MM v kterémkoliv časovém bodě 12 měsíců laktace, s výjimkou hladin adiponektinu v M6 (Spearman  $r = 0,2774$ ,  $p = 0,0488$ ).

Nebyl také nalezen žádný rozdíl v koncentracích jakéhokoliv RH v MM mezi matkami, které porodily chlapce vs dívky v kterémkoliv časovém bodě 12 měsíců laktace. Naproti tomu byla nalezena pozitivní korelace mezi všemi třemi RH (adiponektin, AFABP a leptin) v D0, v M6 a M12, s výjimkou hladin adiponektinu vs leptinu v M6. Korelace mezi adiponektinem a AFABP/leptinem v D0 a M12 je znázorněna na obrázku 10 a, b.





**Obrázek 10:** Korelace hladin adiponektinu, leptinu a AFABP v D0 (a) a M12 (b).

D0: adiponektin vs AFABP (Spearman  $r = 0,3195$ ,  $p = 0,0154$ ); adiponektin vs leptin (Spearman  $r = 0,3038$ ,  $p = 0,0216$ ),

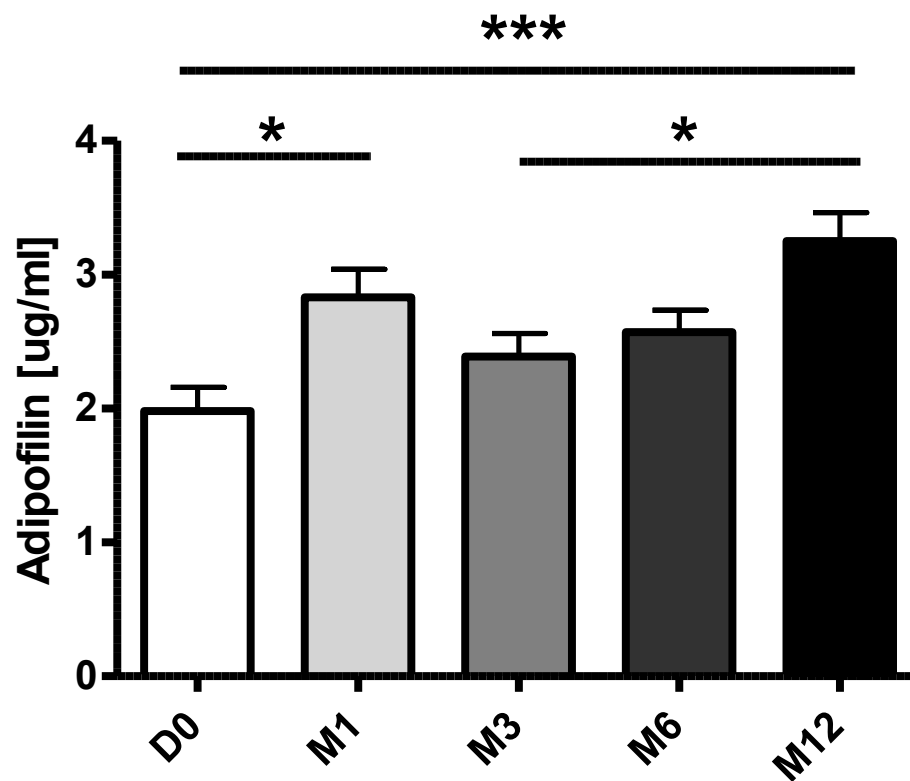
M12: adiponektin vs AFABP (Spearman  $r = 0,6598$ ,  $p < 0,0001$ ); adiponektin vs leptin (Spearman  $r = 0,3492$ ,  $p = 0,0294$ ),

### 5.3 Detekce a dynamika hladin adipofilinu v MM

Koncentrace adipofilinu v D0 byly  $1,98 \pm 0,12$  (průměr  $\pm$  SEM), v M1  $2,83 \pm 0,21$ , v M3  $2,39 \pm 0,17$ , v M6  $2,57 \pm 0,16$  a v M12  $3,25 \pm 0,21$   $\mu\text{g/ml}$  (obr. 11). Nalezli jsme signifikantně vyšší hladiny adipofilinu v M1 a M12 ve srovnání s D0 a signifikantně vyšší hladiny v M12 ve srovnání s M3 ( $p = 0,0001$ ).

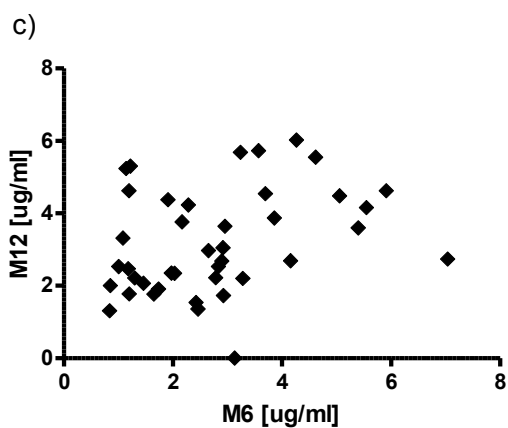
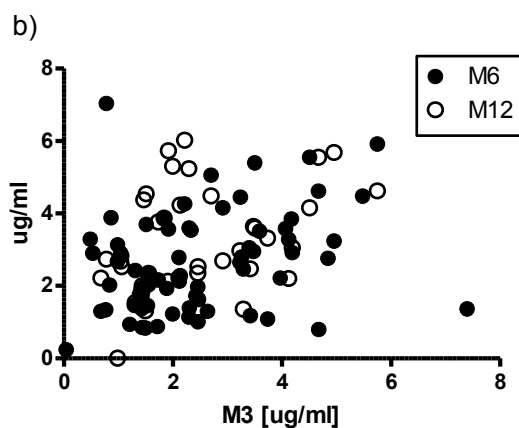
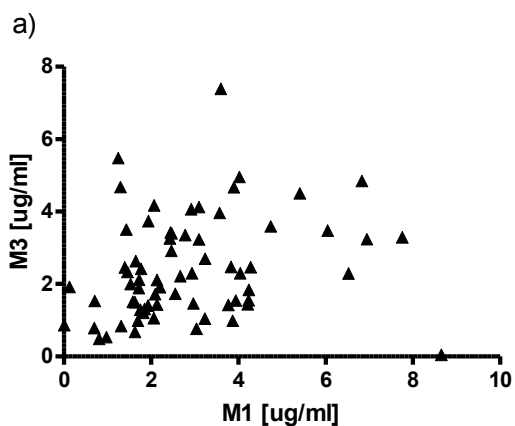
Od prvního měsíce po celou dobu laktace si hladiny adipofilinu zachovávaly intraindividuální trend: hladiny v M1 pozitivně korelovaly s hladinami v M3 (Spearman  $r = 0,3091$ ,  $p = 0,0103$ ). Navíc hladiny v M3 pozitivně korelovaly s hladinami v M6 (Spearman  $r = 0,2739$ ,  $p = 0,0227$ ) i hladinami v M12 (Spearman  $r = 0,4476$ ,  $p = 0,043$ ). Hladiny v M6 pak pozitivně korelovaly také s hladinami v M12 (Spearman  $r = 0,3699$ ,  $p = 0,0173$ ) (obr. 12 a, b, c).

Hladiny adipofilinu v M6 negativně korelovaly s porodní hmotností novorozenců (Spearman  $r = -0,3066$ ,  $p = 0,0083$ ) i s jejich porodní délkou (Spearman  $r = -0,36$ ,  $p = 0,0018$ ), nicméně žádná další korelace mezi hladinami adipofilinu a tělesnou hmotností dětí nebo jejich porodní délkou nebyla nalezena. Stejně tak nebyla nalezena spojitost mezi hladinami adipofilinu a BMI matek před graviditou. Navíc, hladiny adipofilinu nekorelovaly ani s přírůstkem hmotnosti kojenců v průběhu prvního roku života. Koncentrace adipofilinu v MM matek, které porodily chlapce, se nelišily od těch, které porodily dívky. Mezi hladinami adipofilinu a hladinami adiponektinu, AFABP či leptinu nebyla také nalezena žádná korelace.



**Obrázek 11:** Koncentrace adipofilinu v mateřském mléce v průběhu laktace (průměr ± SEM).

Legenda: Den 0 (D0), 1. měsíc laktace (M1), 3. měsíc laktace (M3), 6. měsíc laktace (M6) a 12. měsíc laktace (M12).



**Obrázek 12 a, b, c:** Korelace koncentrací adipofilinu v mateřském mléce v jednotlivých obdobích laktace. Legenda: M1=1 měsíc laktace, M3=3 měsíce laktace, M6=6 měsíců laktace, M12=12 měsíců laktace. M1 vs M3 (Spearman  $r = 0,3091$ ,  $p = 0,0103$ , obr. 12a); M3 vs M6 (Spearman  $r = 0,2739$ ,  $p = 0,0227$ , obr. 12b); M3 vs M12 (Spearman  $r = 0,4476$ ,  $p = 0,043$ , obr. 12b); M6 vs M12 (Spearman  $r = 0,3699$ ,  $p = 0,0173$ , obr. 12c).

## 6 DISKUSE

Výživa v raném období života může v krátkodobém i dlouhodobém horizontu ovlivnit programování metabolického vývoje a růstu. Jelikož mateřské mléko (MM) obsahuje regulační hormony (RH), které hrají roli v regulaci energetické rovnováhy a glukózové homeostázy (leptin, adiponektin, rezistin či ghrelin), lze předpokládat, že právě tyto hormony mohou ovlivnit programování regulace energetické rovnováhy v dětství i později v dospělosti.

### *Adiponektin, leptin a AFABP v MM*

Našemu týmu se podařilo prokázat přítomnost vybraných RH (adiponektin, leptin, AFABP) v MM. Navíc se nám jako dosud prvním podařilo prokázat dynamické intraindividuální změny jejich hladin v lidském MM v průběhu 12 měsíců laktace. Tyto hladiny jsme pak srovnávali navzájem mezi sebou a hodnotili jejich vztah k antropometrickým parametrům sledovaných dětí. Všechny analyzované hormony byly dobře detekovatelné v kolostru a hladiny adiponektinu byly dobře detekovatelné ve všech vzorcích MM v průběhu 12 měsíců laktace. Naproti tomu hladiny leptinu a AFABP od prvního měsíce značně kolísaly a v některých vzorcích zralého MM byly hladiny těchto hormonů pod detekčním limitem ELISA metody. Pokud ale byly do analýzy zahrnuty všechny detekovatelné hodnoty, vykazovaly všechny sledované proteiny v průběhu laktace sestupný trend hladin do M3 a vyšší hladiny v M6 a M12. Tento trend zatím nebyl v literatuře popsán. Předpokládáme, že na jeho vzniku se podílí zařazování příkrmů do stravy dítěte, čímž následně vznikají delší intervaly mezi jednotlivými kojeními. Ranní vzorky MM odebrané v M6/M12 jsou tedy pravděpodobně více koncentrované, než vzorky získané v M3, tj. v období výlučného kojení, a to včetně dávky v rámci nočního kojení. Jak již bylo zmíněno výše, složení MM se v průběhu vývoje kolostra ve zralé mléko mění. Obecně dobře známý pokles koncentrace dusíku v kolostru a MM v průběhu první periody laktace je způsoben zejména snížením koncentrace specifických mléčných proteinů. Pokles koncentrace specifických proteinů ve zralém MM je však do jisté míry vybalancován vzestupem produkce mléka v průběhu laktace (Lonnerdal, B. et al. 1976). Již v roce 1991 se podařilo prokázat, že období a frekvence kojení jsou signifikantně spojeny s koncentrací lipidů v MM a tím také s jeho energetickou hodnotou (Nommsen, L.A. et al. 1991).

Již v roce 2006 měřili Weyermann a spol. hladiny adiponektinu a leptinu v odstředěném mléce pomocí ELISA metody v šesti týdnech po porodu a u náhodně vybrané malé kohorty pak také v šestém měsíci laktace. Při srovnání vzorků z těchto dvou období se jim podařilo prokázat vyšší koncentrace obou hormonů ve vzorcích získaných v šestém měsíci po porodu (Weyermann, M. et al. 2006). Naproti tomu tým doktorky Martin prokázal negativní spojitost mezi hladinami adiponektinu a měsícem laktace (do 7 měsíců po porodu), kdy se jim podařilo prokázat, že hladina adiponektinu v sedmém měsíci je přibližně o 6,9 ng/ml nižší než v prvním týdnu po porodu. Jednalo se tedy o pokles koncentrace o 5,72 % za měsíc (Martin, L.J. et al. 2006). Naše práce potvrdila mírný, ale statisticky nevýznamný pokles koncentrace do 3. měsíce laktace. Naopak, dle našich výsledků byly hladiny adiponektinu v M12 signifikantně vyšší. Martin a spol. použili k analýze metodu RIA a použili také jiný způsob sběru vzorků (tj. odsátí MM z celého prsu za pomoci elektrické odsávačky). K analýze byly použity také vzorky mléka získané z anonymní banky MM, do studie pak byly zařazeny vzorky od matek, které darovaly alespoň 7 vzorků v průběhu 7 měsíců laktace. Navíc se studie účastnily ženy rozdílné rasy. Určitou roli zde mohla sehrát i denní doba odběru MM. Zatímco naše skupina použila k analýze vzorky získané při prvním ranním kojení, Martin a spol. odebírali vzorky v čase od 10:00 do 13:00 hod. Dosud, ale nebyly provedeny žádné studie, které by sledovaly diurnální variabilitu koncentrací RH v lidském MM. Častou limitací všech publikovaných studií je pak chybějící srovnávací měření adiponektinu v předním a zadním mléce. V minulosti již bylo provedeno srovnávací měření koncentrací leptinu v předním a zadním mléce, signifikantní rozdíl však opakovaně nebyl prokázán (Ucar, B. et al. 2000; Schueler, J. et al. 2013). Výzkumný tým doktorky Woo stanovoval koncentrace adiponektinu v MM metodou RIA ve vzorcích odstředěného mléka (Woo, J.G. et al. 2009; Woo, J.G. et al. 2012). RIA metodu ve své práci použili také Ozarda a spol., kterým se podařilo prokázat postupný vzestup koncentrací adiponektinu v MM v průběhu 180 dnů laktace a nalézt pozitivní korelaci mezi hladinami adiponektinu v MM a dnem laktace. Také potvrdili pozitivní korelaci mezi koncentracemi adiponektinu, leptinu a ghrelinu a negativní korelaci mezi hladinami adiponektinu a rezistinu v MM. Tato skupina stanovovala hladiny adiponektinu i v séru kojenců, které pak pozitivně korelovaly s koncentracemi adiponektinu v MM jejich matek (Ozarda, Y. et al. 2012). Podobné závěry přinesla i práce italských autorů, kteří našli pozitivní korelaci mezi hladinami adiponektinu v MM a hladinami v séru matek i kojených dětí. Koncentrace adiponektinu v MM negativně korelovaly s věkem kojence.

Sérové koncentrace pak, na rozdíl od těch v MM, korelovaly negativně s aktuální hmotností a délkou dětí (Savino, F. et al. 2012).

Naše nálezy dokladující několikrát vyšší hladiny adiponektinu než leptinu v MM jsou v souladu s publikovanými výsledky prací jiných autorů. Savino a spol. ve své práci z roku 2012 prokázali, že hladiny adiponektinu v MM jsou přibližně 20x vyšší než hladiny leptinu a obestatinu, hladiny ghrelinu pak dokonce 100x vyšší (Savino, F. et al. 2012; Savino, F. et al. 2012). Stejně tak absolutní hodnoty koncentrací adiponektinu a leptinu v MM korespondují s dosud publikovanými údaji (Martin, L.J. et al. 2006; Weyermann, M. et al. 2006). Pozitivní korelaci mezi koncentracemi adiponektinu a leptinu v MM v průběhu několika prvních měsíců laktace popsalo v minulosti několik prací (Martin, L.J. et al. 2006; Weyermann, M. et al. 2006). Náš tým tyto nálezy potvrdil a rozšířil je na dobu 12 měsíců laktace. Skupině tureckých autorů se navíc podařilo nalézt pozitivní korelaci mezi hladinami adiponektinu a ghrelinu v MM a negativní korelaci mezi hladinami adiponektinu a rezistinu v MM. Tento tým našel také korelaci mezi koncentracemi adiponektinu v MM (ale nikoli v séru) a dnem laktace v průběhu šesti měsíců sledování laktace (Ozarda, Y. et al. 2012).

#### *Korelace hladin adiponektinu s antropometrickými parametry*

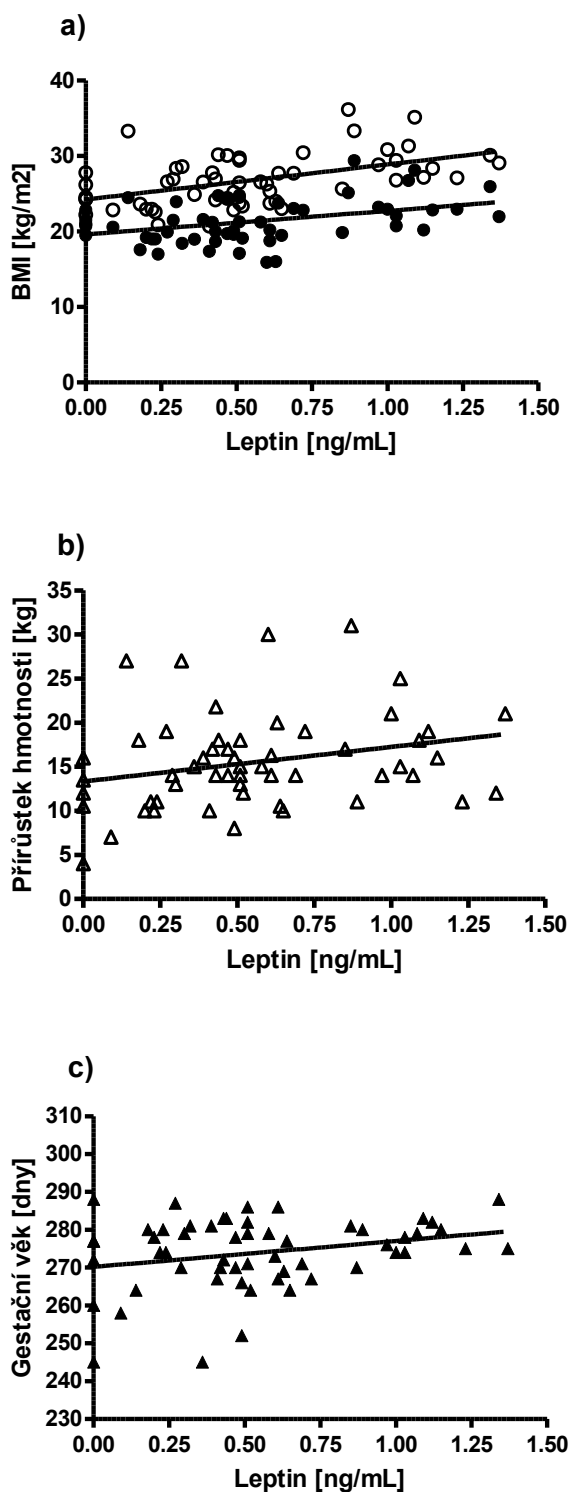
Studie zabývající se vztahem RH a antropometrickými parametry dětí přinesly dosud rozporuplné výsledky. V rámci této práce jsme v průběhu laktace nenalezli žádnou spojitost mezi hmotností dětí a hladinami měřených proteinů (adiponektin, leptin, AFABP) v MM, s výjimkou hladin AFABP v M1. Podobné výsledky publikovali i Weyermann a spol., kteří také nenalezli žádnou spojitost mezi koncentracemi adiponektinu v MM a porodní hmotností, s výjimkou kohorty dětí s porodní hmotností pod 3000 gramů, kdy byly v MM nalezeny signifikantně vyšší hladiny adiponektinu. U dětí malých na svůj gestační věk však byly hladiny adiponektinu naopak významně nižší. Jelikož ale do naší analýzy byly zahrnuty pouze zdravé, donošené děti s normální porodní hmotností, nebylo možné výše uvedené nálezy potvrdit. Hraniční pozitivní korelaci jsme našli mezi hmotnostním přírůstkem v průběhu prvního roku věku dítěte a koncentracemi adiponektinu v MM. Dle Weyermann a spol. byly vyšší hladiny adiponektinu v MM spojeny s vyšším přírůstkem hmotnosti ve dvou letech věku u dětí, které byly kojeny alespoň po dobu 6 měsíců (Weyermann, M. et al. 2007). Spojitostí hladin adiponektinu a antropometrických parametrů se zabývala také skupina amerických

autorů (Woo, J.G. et al. 2009; Woo, J.G. et al. 2012). Těm se podařilo prokázat spojitost vyšších hladin adiponektinu v MM s nižšími hodnotami Z-skóre hmotnosti k věku a Z-skóre hmotnosti k délce v průběhu prvních šesti měsíců života (Woo, J.G. et al. 2009). V návaznosti na tato zjištění, při následném sledování stejné skupiny dětí o několik let později prokázali, že děti, jejichž matky měly v MM vyšší hladiny adiponektinu, vykazovaly rychlejší nárůst hmotnosti v průběhu druhého roku života (Woo, J.G. et al. 2012).

#### *Korelace hladin leptinu s antropometrickými parametry*

Korelaci hladin leptinu v MM s jeho plazmatickými hladinami u matek i jejich dětí prokázala v minulosti řada prací (Ucar, B. et al. 2000; Uysal, F.K. et al. 2002; Ilcol, Y.O. et al. 2006). Některé práce pak také potvrdily korelaci hladin leptinu v MM s BMI matek, ale nikoliv kojených dětí (Uysal, F.K. et al. 2002; Ilcol, Y.O. et al. 2006). Prokázána byla již také korelace hladin leptinu v MM s množstvím tělesného tuku matky (Ilcol, Y.O. et al. 2006). Našemu vědeckému týmu se v roce 2006 podařilo prokázat že koncentrace leptinu v MM pozitivně korelovaly s hmotností i BMI matek před graviditou i v době porodu (obr. 13) (Bronsky, J. et al. 2006). Hladiny leptinu byly signifikantně nižší u matek, které porodily nedonošené novorozence ve srovnání s těmi, které porodily děti donošené a narozené v termínu. Tyto nálezy byly nedávno potvrzeny americkým týmem vědců, kteří našli pozitivní korelaci mezi koncentracemi leptinu v MM a BMI matek před graviditou (Fields, D.A. and Demerath, E.W. 2012). V naší současné práci byl naznačen významný trend k pozitivní korelaci mezi hladinami leptinu v MM v D0 a BMI matek před graviditou, nicméně tato korelace nedosáhla statistické významnosti (Speraman  $r = 0,2268$ ,  $p = 0,0928$ ). Tyto dva soubory ale nelze zcela srovnávat vzhledem k odlišným charakteristikám sledovaných skupin. Na uvedené skutečnosti se mohl navíc podílet i fakt, že údaje týkající se BMI matek před graviditou byly zjišťovány retrospektivně a tudíž jejich validitu nešlo přesně ověřit. Recentní studie dokladují, že sérové hladiny leptinu, na rozdíl od hladin v MM, pozitivně korelují s hmotností kojence a jeho BMI (Savino, F. et al. 2010).





**Obrázek 13.** Korelace mezi leptinem a (a) BMI matek před graviditou (tmavé body,  $r = 0,397$ ,  $p = 0,003$ ); BMI v době porodu (světlé body,  $r = 0,498$ ,  $p < 0,0001$ ); (b) hmotnostním přírůstkem během gravidity ( $r = 0,267$ ,  $p = 0,047$ ); a (c) gestačním věkem novorozence ( $r = 0,266$ ,  $p = 0,048$ ).

Lze předpokládat, že různorodost dosud publikovaných výsledků může být dána jak rozdílnou metodikou studie, tak nepochybně i řadou dalších faktorů. Například Ozarda a spol. ve své práci z roku 2012 kromě jiného prokázali, že hladiny adiponektinu v MM nepřímo korelovaly s hodnotami CRP, estradiolu, prolaktinu, kortizolu a trijodtyroninu (Ozarda, Y. et al. 2012). Je tedy zřejmé, že koncentrace jednotlivých RH mohou být ovlivněny i hormonálním a zánětlivým stavem matky. V daném případě byly do hodnocení zahrnuty i vzorky získané od matek, které rodily císařským řezem. V naší skupině se naopak jednalo pouze o porod vaginální. Vzhledem k možnému opožděnému nástupu laktace v případě operačně vedeného porodu a také vzhledem k potenciálním změnám v zánětlivém a hormonálním profilu matky nelze tyto dvě práce srovnávat.

Je diskutabilní, jestli přítomnost regulačních hormonů v MM může nějakým způsobem ovlivnit vývoj dítěte. Vliv leptinu a adiponektinu v MM na novorozence nebyl dosud zcela objasněn. V roce 2012 se našemu týmu jako prvnímu podařilo imunohistochemicky prokázat přítomnost adiponektinového receptoru AdipoR1 v lidském GIT, a to v enterocytech, kolonocytech, v lymfocytech submukózy a hladké svalovině střevní stěny (Bronsky, J. et al. 2012) ve všech věkových kategoriích včetně kojenců. Přítomností receptoru pro adiponektin ve střevní sliznici by bylo vysvětleno možné zprostředkování jeho biologického účinku u kojeného dítěte. Tyto nálezy podporují hypotézu, že adiponektin může u lidí působit na enterocyty a kolonocyty a ovlivňovat tak i jejich metabolismus a vývoj. Navíc by adiponektin jako důležitý protizánětlivý adipocytokin mohl sehrávat roli v imunomodulaci zánětlivé odpovědi, a to svým působením na střevní lymfocyty, které jsou také nositeli příslušného receptoru. Vzhledem k tomu, že lidské MM reguluje vývoj gastrointestinálního a imunitního systému novorozence (Walker, W.A. 2004), dalo by se předpokládat, že se adiponektin cestou receptoru AdipoR1 podílí na nutričním programování novorozenců a mohl by také ovlivňovat střevní imunomodulaci u jedinců s nespecifickými střevními záněty (Yamamoto, K. et al. 2005). Předběžné výsledky posledních studií naznačují, že v buňkách trofoblastu se adiponektin váže na AdipoR2 a aktivuje MAPK a PPAR-alfa, které inhibují signální dráhu inzulin/IGF-1. Tímto způsobem by mohl fetální adiponektin ovlivňovat rozvoj tukové tkáně a stimulovat růst plodu (Aye, I.L. et al. 2013). Biologický význam adiponektinu by mohla vysvětlovat také inverzní spojitost hladin adiponektinu v MM s množstvím tukové tkáně kojeného dítěte, což by naznačovalo možný vliv adiponektinu na snížení rizika obezity

u kojených dětí (Newburg, D.S. et al. 2010). Děti, které byly kojeny, vykazují oproti dětem krmeným náhradní kojeneckou výživou pomalejší růstové tempo v průběhu prvního roku života. Jedná se zejména o změnu v poměru hmotnosti k výšce v období mezi 3. a 12. měsícem života, které je následováno obdobím částečného růstu napříč percentilovými pásmy (tzv. catch-up růst) do 2 let věku (Dewey, K.G. et al. 1995; Nielsen, G.A. et al. 1998; Agostoni, C. et al. 1999; Kramer, M.S. et al. 2002). Přesto, že jsou mezi 3. - 6. měsícem věku hmotnostní přírůstky kojených dětí menší, procento tělesného tuku je u nich naopak větší. Tato zjištění vedla k vytvoření nových růstových standardů WHO pro kojené děti publikovaných v roce 2006 (de Onis, M. et al. 2006; WHO 2006). Tyto růstové rozdíly je důležité zohlednit zejména při hodnocení růstu a výživy kojených dětí v klinické praxi. Na spojitost vysoké růstové rychlosti v prvních měsících života a zvýšeného rizika civilizačních onemocnění v dospělosti upozornila již řada studií (Baird, J. et al. 2005; Monteiro, P.O. and Victora, C.G. 2005). Příliš rychlé přírůstky na hmotnosti u dětí s nízkou porodní hmotností mohou být později spojeny s rozvojem předčasné puberty, nadváhy či obezity (Neville, K.A. and Walker, J.L. 2005). Proto se pomalejší růstové tempo kojených dětí jeví z dlouhodobého hlediska jako výhodnější.

V roce 2009 bylo zjištěno, že v MM je predominantně přítomna biologicky aktivní vysokomolekulární forma adiponektinu, což by vysvětlovalo jeho fyziologický efekt u novorozence a možnost regulace váhového prospívání kojence (Woo, J.G. et al. 2009). Zdá se, že adiponektin by tak mohl být prediktivním faktorem hmotnostního přírůstku dítěte. Tento předpoklad potvrdili Woo a spol. ve své další práci, kde hodnotili dlouhodobý vliv adiponektinu v MM na hmotnostní přírůstky v průběhu druhého roku života. Zjistili, že vyšší hladiny adiponektinu v MM byly spojeny s akcelerací hmotnostních přírůstků v průběhu druhého roku věku. Prolongované kojení by tak mohlo představovat další přídatný zdroj adiponektinu, kromě jeho základní produkce vlastní tukovou tkání dítěte. V kontrastu s těmito nálezy však sérové hladiny adiponektinu v roce věku nebyly spojeny s mírou přibývání na váze ve druhém roce věku (Woo, J.G. et al. 2012). Zdá se tedy, že tato spojitost nesouvisí přímo s délkou kojení nebo dobou zahájení podávání příkrmů. Je možné, že hmotnostní přírůstky v období druhého roku věku nepředstavují patologii (tj. časnou obezitu), ale spíše pozitivní adaptační mechanismy (tj. catch-up růst). Předchozí studie zmiňují fakt, že hmotnostní přírůstky v prvních šesti měsících života odpovídají spíše zmnožení tukové tkáně,

zatímco přírůstky v pozdějším věku odpovídají růstu svalové hmoty. Opoždění catch-up růstu u kojenců vystavených vyšším koncentracím adiponektinu by pak mohlo být spojeno s menším přírůstkem tukové hmoty během prvních 6 měsíců a větším přírůstkem svalové hmoty v pozdějším kojeneckém věku. Zjednodušeně řečeno, tyto nálezy by mohly poukazovat na roli adiponektinu v catch-up růstu, navazujícím na pomalejší přibývání na váze v průběhu prvního roku života. Tyto hypotézy jsme však vzhledem ke krátké době následného sledování dětí v rámci naší studie nemohli potvrdit. Nicméně by nepochybně mohly být vhodným předmětem dalšího výzkumu.

Již v roce 1997 se podařilo prokázat transfer leptinu z MM do žaludku kojeneho dítěte (Casabiell, X. et al. 1997) a také přítomnost receptoru pro leptin v lidském GIT, který by zprostředkoval jeho biologický účinek v organizmu (Aparicio, T. et al. 2005). Perorální podání leptinu novorozeným krysám vedlo k poklesu příjmu potravy a nižší produkci leptinu v žaludku a subkutánní tukové tkáni (Sanchez, J. et al. 2005). Jelikož koncentrace leptinu ovlivňují hypothalamické neurony zapojené do regulace příjmu potravy, sehrává leptin pravděpodobně důležitou roli v programování kontroly příjmu potravy v průběhu časného postnatálního života. Leptin, který je přítomen v MM tak může z krátkodobého hlediska působit u kojence jako signál sytosti (Stocker, C.J. and Cawthorne, M.A. 2008; Palou, A. and Pico, C. 2009). Recentní studie italských autorů prokázala signifikantně vyšší sérové hladiny leptinu u kojenech dětí ve srovnání s dětmi krmenými náhradní mléčnou kojeneckou výživou, což by naznačovalo, že dalším zdrojem leptinu je jeho transfer od matky cestou MM (Savino, F. and Liguori, S.A. 2008; Savino, F. et al. 2010). Děti, které byly v kojeneckém věku krmeny náhradní mléčnou kojeneckou výživou, měly ve srovnání s dětmi, které byly kojeny, signifikantně vyšší BMI v pozdějším dětském věku (medián 8,8 let). Autorům se navíc podařilo stanovit hodnotu „cut-off“ (2,7 ng/ml), kdy koncentrace leptinu pod touto hodnotou byly spojeny s vyšším BMI v pozdějším dětském věku (Savino, F. et al. 2013). Uvedené skutečnosti tedy naznačují, že hladina leptinu v kojeneckém věku by mohla být potenciálním prediktorem rozvoje obezity v pozdějším věku. Jen nedávno publikované výsledky vyplývající ze studií GINIplus a LISApus, opět poukázaly na spojitost hladin leptinu a růstových parametrů (Flexeder, C. et al. 2014). Hladiny leptinu pozitivně korelovaly s BMI a hmotnostními přírůstky sledovaných dívek i chlapců. Naproti tomu mezi hladinami adiponektinu a růstovými parametry nebyla prokázána statisticky signifikantní asociace

### *Korelace hladin AFABP s antropometrickými parametry*

Jelikož korelace antropometrických parametrů s hladinami AFABP v MM nebyla dosud publikována, nebylo možné naše nálezy porovnat s výsledky jiných studií. Recentní práce zabývající se problematikou AFABP a jeho potenciální role u metabolického syndromu poukazují na možnou roli AFABP v predikci rozvoje inzulínové rezistence (Horakova, D. et al. 2011).

### *Adipofilin*

Kromě zmiňovaných RH MM by nutriční stav dítěte mohly ovlivňovat i některé další proteiny přítomné v MM, které se účastní metabolismu a transportu lipidů. Jednou z těchto molekul je i adipofilin, který je v MM mléce přítomen jako jeden z hlavních proteinů membrány tukové kapénky. Řada vědců se již snažila blíže objasnit jeho potenciální roli v MM. Experimentální studie na zvířatech prokázaly, že adipofilin je specificky lokalizován v sekrečních epiteliálních buňkách mléčné žlázy a jeho exprese je spojena s akumulací tukových kapének (tzv. lipid droplets) uvnitř cytoplazmy (Russell, T.D. et al. 2007). Navíc je adipofilin pravděpodobně zapojen do procesu sekrece cytoplasmatických tukových kapének cestou interakce s fosfolipidy apikální části buněčné membrány (Chong, B.M. et al. 2011; Chong, B.M. et al. 2011). Skandinávští vědci nedávno identifikovali exosomy v lidském kolostru a zralém MM, které vykazují jisté imunomodulační vlastnosti. Mezi jinými molekulami byl proteomickou analýzou těchto specifických vezikul identifikován také adipofilin (Admyre, C. et al. 2007). Ve většině těchto studií byly kuličky mléčného tuku (milk fat globule) izolované z tukové vrstvy MM, membrána tukové kuličky byla následně extrahována a frakcionovaná pomocí detergentních roztoků, rozpustné a nerozpustné frakce byly odděleny centrifugací a obalové proteiny (tzv. coat proteins) byly odděleny a pak detekovány rozličnými metodami (SDS-PAGE, sekvenční analýza, Western blot nebo spektrofotometrie).

V naší práci jsme za účelem kvantitativní detekce adipofilinu v MM vyvinuli a následně ověřili imunoanalytickou metodu, vysoce senzitivní ELISA metodu, která je časově méně náročná, v praxi běžně využívaná a ověřená pro detekci široké škály proteinů včetně cytokinů, růstových faktorů či hormonů v MM nebo jiném biologickém materiálu. Vzhledem k tomu, že tuk může s ELISA metodou interferovat, bylo by použití plného MM za tímto účelem značně limitované. Proto jsme se rozhodli stanovit tyto proteiny v odstředěném mléce. V průběhu přípravy vzorků bylo plné mléko centrifugováno a k další analýze byl použit již pouze supernatant. Jsme si vědomi limitace tohoto přístupu, vzhledem k tomu, že adipofilin je v MM přítomnem zejména jako součást membrány tukové kapénky. Nicméně, touto metodou jsme byli schopni detekovat hladiny kolem 2-3  $\mu\text{g/ml}$ . Adipofilin bylo možné v MM detekovat od začátku po celou dobu 12 měsíců laktace. Rostoucí trend hladin v prvním měsíci byl následován poklesem ve třetím měsíci a následným vzestupem až do 12 měsíce laktace.

Navíc hladiny v M3 korelovaly s hladinami v M6 a M12, což by znamenalo, že u některých matek jsou (ve srovnání s jinými matkami) hladiny adipofilinu obecně vyšší ve všech sledovaných bodech a jsou intraindividuálně vysoce konzervované v průběhu celé laktace. V současné době ale není známo, nakolik se liší koncentrace adipofilinu v tukové kapénce a v supernatantu, jelikož dosud nebyla provedena žádná srovnávací studie.

Kvantifikaci změn proteinů v membráně tukové kapénky v období časně laktace provedli v roce 2008 Reinhardt a Lippolis metodou shotgun (Reinhardt, T.A. and Lippolis, J.D. 2008). Zjistili, že v průběhu proměny kolostra na zralé MM byly hladiny proteinů spojených s transportem, syntézou a sekrecí lipidů (adipofilin, butyrophilin a xantin dehydrogenáza) sedmý den po porodu vyšší než v kolostru. Tyto nálezy korespondují s našimi výsledky. Podle nich dochází po porodu k časně změně transportu lipidů obsažených v MM vzhledem k vyššímu obsahu tuků v kolostru. Předpokládáme, že zvyšující se hladiny adipofilinu v MM v průběhu druhé poloviny kojeneckého období mohou být spojeny s nižší frekvencí a delšími intervaly mezi jednotlivými kojeními, což následně vede ke kumulaci adipofilinu v MM. Náš předpoklad, že hladiny adipofilinu v MM mohou být spojeny s BMI matek před graviditou se nepotvrdil. Hladiny adipofilinu v MM v šestém měsíci negativně korelovaly s porodní hmotností a délkou kojenců. Avšak, tato korelace se nezdá být klinicky významná, jelikož v žádném jiném časovém bodě nebyla nalezena žádná další korelace mezi hmotností nebo délkou kojence, stejně tak jako nebyla nalezena korelace mezi hladinami adipofilinu a hmotnostním přírůstkem v průběhu prvního roku života. Zajímavým zjištěním byl fakt, že hladiny adipofilinu nekorelovaly s hladinami regulačních hormonů (adiponektin, AFABP nebo leptin – vše detekováno ELISA metodou) v žádném časovém bodě v průběhu laktace. Vzhledem k těmto nálezům se zdá, že hladiny adipofilinu v lidském MM nejsou spojeny s nutričním stavem matek před graviditou, ale ani nutričním stavem jejich dětí.

Dosud publikovaná data poukazují na to, že exprese a syntéza adipofilinu je indukována vzestupem volných mastných kyselin s dlouhým řetězcem v séru (Dalen, K.T. et al. 2006). Údaje týkající se stravovacích návyků matek jsme však v rámci této práce neměli k dispozici, tudíž nebylo možné zhodnotit případný vliv výživy na hladiny adipofilinu v MM.

Úloha adipofilinu v různých orgánech a tkáních nebyla dosud zcela objasněna. Adipofilin je hlavním proteinem tukových kapének přítomných ve všech buňkách akumulujících lipidy, především v buňkách mléčné žlázy a tukových buňkách, kde je jedním z nejčasnějších markerů diferenciace adipocytů. Ačkoli jeho význam nemusí být tak signifikantní při udržení homeostázy tukové tkáně, je hlavním faktorem určujícím obsah triacylglycerolů v játrech (Chang, B.H. and Chan, L. 2007). Jeho negativní role v případě aterosklerózy je vysvětlována zvýšením obsahu esterů cholesterolu v pěnovitých buňkách (Paul, A. et al. 2008) a zesílením zánětlivé reakce cestou zvýšení exprese a sekrece prozánětlivých cytokinů jako TNF-alfa, MCP-1 a IL-6 v makrofázích (Chen, F.L. et al. 2010). Naopak adipofilin se podílí na udržování inzulínové senzitivity ve svalech, má tedy potenciální ochranný vliv před vznikem inzulínové rezistence (de Wilde, J. et al. 2010). Kramer a spol. upozornili na možnost využití adipofilinu jako pomocného diagnostického markeru identifikace specializovaných diferencovaných buněk obsahujících tukové kapénky a také pro nemoci spojené s akumulací tuku v buňkách, jako například světlobuněčný karcinom ledviny (Kramer, M.W. et al. 2010). Vzhledem k tomu, že inhibice lipogeneze vykazuje antineoplastický efekt, lze předpokládat, že se PAT proteiny v brzké době stanou cílem různých terapeutických strategií (Straub, B.K. et al. 2010). Navíc, adipofilin byl nalezen také v membránách lidského plodu (amniální epitelie, fibroblasty, choriové trofoblasty), jeho přítomnost v tukových kapénkách stoupá v průběhu gravidity a při porodu a je spojen s enzymy zapojenými do kaskády kyseliny arachidonové (Meadows, J.W. et al. 2005). Tukové kapénky v membránách plodu mohou být tedy místy produkce prostaglandinu E2 v době porodu. Recentní práce upozorňují zejména na roli adipofilinu jako senzitivního markeru sebaceózního karcinomu. Nicméně exprese adipofilinu byla prokázána také u dlaždicového karcinomu a řady dalších tumorů, což by naznačovalo, že akumulace tukových kapének je častým znakem neoplastických buněk (Boussahmain, C. et al. 2013).



## 7 ZÁVĚR

V rámci této práce se nám podařilo prokázat intraindividuální variabilitu hladin adiponektinu, leptinu a AFABP v mateřském mléce. Navíc jsme vyvinuli spolehlivou a dobře reprodukovatelnou metodu detekce adipofilinu v MM. Všechny sledované regulační hormony a také adipofilin byly detekovatelné v mateřském mléce po celou dobu 12 měsíců laktace, s mírným poklesem hladin RH do třetího měsíce a následným vzestupem do 12. měsíce laktace. Zatímco u RH se nám podařilo prokázat korelaci hladin adiponektinu, leptinu a AFABP, hladiny adipofilinu nekorelovaly ani s jedním ze sledovaných RH. V rámci naší práce nebyla nalezena žádná signifikantní korelace RH či adipofilinu s nutričním stavem dětí nebo jejich matek.

Předpokládáme, že zmiňované regulační hormony mohou sehrávat roli v nutričním programování kojených dětí, a to pravděpodobně po celou dobu trvání laktace. Naopak vliv adipofilinu na nutriční status je pravděpodobně minimální, může se však podílet na dalších procesech vývoje mladého organismu. K potvrzení a ověření těchto hypotéz budou nepochybně zapotřebí další prospektivní studie.

## 8 SOUHRN

Mateřské mléko je díky svému jedinečnému složení a biologickým vlastnostem pro člověka nenahraditelné. Je nesporné, že je nejlepším zdrojem výživy kojence v průběhu prvních čtyř až šesti měsíců života. Jednotlivé složky MM významným způsobem ovlivňují růst a vývoj dítěte a hrají významnou roli v regulaci postnatálního zrání a vývoje tkání a orgánových systémů. Výživa v tomto raném období života může ovlivnit programování metabolického vývoje a růstu. Jelikož MM obsahuje regulační hormony (RH), které hrají roli v regulaci energetické rovnováhy a glukózové homeostázy, lze předpokládat, že právě tyto hormony mohou ovlivnit regulaci energetické rovnováhy v dětství i později v dospělosti.

Cílem naší práce bylo zjistit, jestli se koncentrace vybraných RH (adiponektin, leptin, AFABP) v MM v průběhu laktace mění a nakolik tyto koncentrace souvisí s antropometrickými parametry kojených dětí a jejich matek.

Za tímto účelem jsme vyšetřovali vzorky MM získané manuální expesí nebo za pomoci odsávačky, 48 hodin po zahájení laktace a pak také v jejím průběhu, tj. s odstupem 1 měsíce (M1), 3 měsíců (M3), 6 měsíců (M6) a 12 měsíců (M12). K detekci RH v MM byla použita vysoce senzitivní metoda ELISA.

Všechny vyšetřované RH i adipofilin byly detekovatelné v MM po celou dobu 12 měsíců laktace, s mírným poklesem hladin RH do třetího měsíce a následným vzestupem do 12. měsíce laktace. Hladiny adiponektinu, leptinu a AFABP v průběhu laktace pozitivně korelovaly a hladiny AFABP v M1 negativně korelovaly s tělesnou hmotností kojenců. V případě ostatních RH jsme v průběhu laktace nenalezli žádnou jinou spojitost s antropometrickými parametry dětí nebo jejich matek.

V této práci se nám podařilo prokázat intraindividuální variabilitu hladin adiponektinu, leptinu a AFABP v MM. Navíc jsme vyvinuli spolehlivou a dobře reprodukovatelnou metodu detekce adipofilinu v MM. Zatímco u RH se nám podařilo prokázat korelaci hladin adiponektinu, leptinu a AFABP, hladiny adipofilinu nekorelovaly ani s jedním ze sledovaných RH. V rámci této práce jsme nenalezli žádnou signifikantní korelaci RH či adipofilinu s nutričním stavem dětí nebo jejich matek.

## 9 SUMMARY

Breast milk (BM) is essential for infants due to its unique composition and biological properties. It is obvious that BM is the best source of nutrition for the infant during the first 4 to 6 months of life. The components of BM significantly affect growth and child development and play an important role in regulation of postnatal development and maturation of tissues and organ systems. Nutrition in early infancy can affect programming of metabolic development and growth. Since BM contains regulatory hormones (RH) which play a role in regulation of energy balance and glucose homeostasis, it can be assumed that these hormones may affect regulation of energy balance in childhood and later in adulthood.

The aim of our study was to determine intraindividual changes of BM levels of selected RH (adiponectin, leptin, AFABP) in BM during twelve months of lactation and to detect adipophilin in human BM. Moreover, we analysed the association between levels of these proteins and anthropometric parameters of breastfed infants and their mothers.

BM samples were obtained from mothers who delivered full term infants. Only mothers with non-complicated vaginal delivery were included. BM samples were obtained by manual expression or with a breast pump 48 hours after the initiation of lactation (D0) and then also at 1 month (M1), 3 months (M3), 6 months (M6) and 12 months (M12) of lactation. RH and adipophilin were measured in BM by highly sensitive ELISA method.

All examined RH and adipophilin were detectable in BM throughout 12 months of lactation. We found positive correlation between levels of adiponectin, leptin and AFABP throughout lactation. AFABP levels in M1 correlated negatively with body weight of infants, but there was no correlation throughout lactation between body weight and other proteins. Concentrations of measured RH showed a decreasing trend in the 3rd month of lactation and subsequent increase till 12 months of lactation.

In our study, we demonstrated intra-individual variability in levels of adiponectin, leptin and AFABP in BM. In addition, we have developed a reliable and reproducible method for detection of adipophilin in BM. In our study no correlation was found between RH or adipophilin and nutritional status of breastfed infants or their mothers.

## 10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Admyre, C., et al. (2007). "Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk." *J Immunol* 179(3): 1969-1978.
2. Agostoni, C., et al. (2009). "Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 49(1): 112-125.
3. Agostoni, C., et al. (1999). "Growth patterns of breast fed and formula fed infants in the first 12 months of life: an Italian study." *Arch Dis Child* 81(5): 395-399.
4. Amirzadegan, A., et al. (2013). "Correlation between Plasma Adiponectin Levels and the Presence and Severity of Coronary Artery Disease." *J Tehran Heart Cent* 8(3): 140-145.
5. Aparicio, T., et al. (2005). "Leptin and Ob-Rb receptor isoform in the human digestive tract during fetal development." *J Clin Endocrinol Metab* 90(11): 6177-6184.
6. Aydin, S., et al. (2008). "Presence of obestatin in breast milk: relationship among obestatin, ghrelin, and leptin in lactating women." *Nutrition* 24(7-8): 689-693.
7. Aydin, S., et al. (2006). "Ghrelin is present in human colostrum, transitional and mature milk." *Peptides* 27(4): 878-882.
8. Aye, I.L., et al. (2013). "Review: Adiponectin--the missing link between maternal adiposity, placental transport and fetal growth?" *Placenta* 34 Suppl: S40-45.
9. Bacha, F. and Arslanian, S.A. (2005). "Ghrelin suppression in overweight children: a manifestation of insulin resistance?" *J Clin Endocrinol Metab* 90(5): 2725-2730.
10. Baird, J., et al. (2005). "Being big or growing fast: systematic review of size and growth in infancy and later obesity." *BMJ* 331(7522): 929.
11. Bansal, M.P. and Medina, D. (1993). "Expression of fatty acid-binding proteins in the developing mouse mammary gland." *Biochem Biophys Res Commun* 191(1): 61-69.
12. Barclay, A.R., et al. (2009). "Systematic Review: The Role of Breastfeeding in the Development of Pediatric Inflammatory Bowel Disease." *The Journal of Pediatrics* 155(3): 421-426.
13. Barrenetxe, J., et al. (2002). "Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes." *Gut* 50(6): 797-802.

14. Baxter, R.C., et al. (1984). "Immunoreactive somatomedin-C/insulin-like growth factor I and its binding protein in human milk." *J Clin Endocrinol Metab* 58(6): 955-959.
15. Benomar, Y., et al. (2013). "Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4." *Diabetes* 62(1): 102-114.
16. Bjorbaek, C. (2009). "Central leptin receptor action and resistance in obesity." *J Investig Med* 57(7): 789-794.
17. Blaslov, K., et al. (2013). "Relationship between Adiponectin Level, Insulin Sensitivity, and Metabolic Syndrome in Type 1 Diabetic Patients." *Int J Endocrinol* 2013: 535906.
18. Bourque, D.D. (2006, May 11, 2006). "Listening to Leptin: Understanding the Basic Components of Leptin Research." 2014, from <http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462bh2008/462bhonorsprojects/462bhonors2006/warzeckas/background.htm>.
19. Boussahmain, C., et al. (2013). "Perilipin and adipophilin expression in sebaceous carcinoma and mimics." *Hum Pathol* 44(9): 1811-1816.
20. Brandtzaeg, P. (2010). "The mucosal immune system and its integration with the mammary glands." *J Pediatr* 156(2 Suppl): S8-15.
21. Bronsky, J., et al. (2006). "Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, and epidermal fatty acid binding protein: proteins newly identified in human breast milk." *Clin Chem* 52(9): 1763-1770.
22. Bronsky, J., et al. (2011). "Adiponectin, AFABP, and leptin in human breast milk during 12 months of lactation." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 52(4): 474-477.
23. Bronsky, J., et al. (2012). "Immunoexpression of type-1 adiponectin receptor in the human intestine." *Cesk Patol* 48(3): 165-166.
24. Bronsky, J. (2010). "Nové regulační hormony mateřského mléka a nutriční programování." *Habilitační práce v oboru Pediatrie*. Praha: 2. LF UK a FNM, Pediatrická klinika. 2010. 65 s.
25. Cabrera de Leon, A., et al. (2014). "Relationships between Serum Resistin and Fat Intake, Serum Lipid Concentrations and Adiposity in the General Population." *J Atheroscler Thromb*.

26. Casabiell, X., et al. (1997). "Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake." *J Clin Endocrinol Metab* 82(12): 4270-4273.
27. Cottrell, E.C. and Ozanne, S.E. (2008). "Early life programming of obesity and metabolic disease." *Physiol Behav* 94(1): 17-28.
28. D'Alessandro, A., et al. (2010). "Human milk proteins: an interactomics and updated functional overview." *J Proteome Res* 9(7): 3339-3373.
29. Dalen, K.T., et al. (2006). "PPARalpha activators and fasting induce the expression of adipose differentiation-related protein in liver." *J Lipid Res* 47(5): 931-943.
30. Daquinag, A.C., et al. (2011). "An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells." *Cell Stem Cell* 9(1): 74-86.
31. de Lecea, L., et al. (1998). "The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(1): 322-327.
32. de Onis, M., et al. (2006). "Comparison of the World Health Organization (WHO) Child Growth Standards and the National Center for Health Statistics/WHO international growth reference: implications for child health programmes." *Public Health Nutr* 9(7): 942-947.
33. de Wilde, J., et al. (2010). "Adipophilin protein expression in muscle--a possible protective role against insulin resistance." *FEBS J* 277(3): 761-773.
34. Dewey, K.G., et al. (1995). "Growth of breast-fed infants deviates from current reference data: a pooled analysis of US, Canadian, and European data sets. World Health Organization Working Group on Infant Growth." *Pediatrics* 96(3 Pt 1): 495-503.
35. Duan, C., et al. (2010). "Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation." *Gen Comp Endocrinol* 167(3): 344-351.
36. Duncan, J.M. and Sears, M.R. (2008). "Breastfeeding and allergies: time for a change in paradigm?" *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8(5): 398-405.
37. Dundar, N.O., et al. (2010). "Ghrelin and adiponectin levels in colostrum, cord blood and maternal serum." *Pediatr Int* 52(4): 622-625.
38. Epitomics. (2013). 2014, from <http://www.epitomics.com/>.

39. Fields, D.A. and Demerath, E.W. (2012). "Relationship of insulin, glucose, leptin, IL-6 and TNF-alpha in human breast milk with infant growth and body composition." *Pediatr Obes* 7(4): 304-312.
40. Filippi, E., et al. (2004). "Association of the human adiponectin gene and insulin resistance." *Eur J Hum Genet* 12(3): 199-205.
41. Fleischer, D.M. (2013). The impact of breastfeeding on the development of allergic disease. Waltham, MA, UpToDate.
42. Flexeder, C., et al. (2014). "Is a child's growth pattern early in life related to serum adipokines at the age of 10 years?" *Eur J Clin Nutr* 68(1): 25-31.
43. Fortuno, A., et al. (2003). "Adipose tissue as an endocrine organ: role of leptin and adiponectin in the pathogenesis of cardiovascular diseases." *J Physiol Biochem* 59(1): 51-60.
44. Frederiksen, B., et al. (2013). "Infant exposures and development of type 1 diabetes mellitus: The diabetes autoimmunity study in the young (daisy)." *JAMA Pediatrics* 167(9): 808-815.
45. Fu, Y. (2014). "Adiponectin signaling and metabolic syndrome." *Prog Mol Biol Transl Sci* 121: 293-319.
46. Funahashi, H., et al. (2000). "Morphological evidence for neural interactions between leptin and orexin in the hypothalamus." *Regul Pept* 92(1-3): 31-35.
47. Geyikli, I., et al. (2013). "Increased resistin serum concentrations in patients with type 1 diabetes mellitus." *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 5(3): 189-193.
48. Heid, H.W., et al. (1998). "Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases." *Cell Tissue Res* 294(2): 309-321.
49. Heid, H.W., et al. (1996). "Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane." *Biochem J* 320 ( Pt 3): 1025-1030.
50. Horakova, D., et al. (2011). "Adipocyte fatty acid binding protein and C-reactive protein levels as indicators of insulin resistance development." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 155(4): 355-359.
51. Horta, B.L. and Victora, C.G. (2013). Long-term effects of breastfeeding: a systematic review. Geneva, WHO Press.

52. Hui, X., et al. (2012). "Adiponectin and cardiovascular health: an update." *Br J Pharmacol* 165(3): 574-590.
53. Chang, B.H. and Chan, L. (2007). "Regulation of Triglyceride Metabolism. III. Emerging role of lipid droplet protein ADFP in health and disease." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292(6): G1465-1468.
54. Chapnik, N., et al. (2014). "AMPK-derived peptides reduce blood glucose but lead to fat retention in the liver of obese mice." *J Endocrinol*.
55. Chen, F.L., et al. (2010). "Adipophilin affects the expression of TNF-alpha, MCP-1, and IL-6 in THP-1 macrophages." *Mol Cell Biochem* 337(1-2): 193-199.
56. Chirico, G. and Gasparoni, A. (2009). Immunologic components of human milk.
57. Chong, B.M., et al. (2011). "Determinants of adipophilin function in milk lipid formation and secretion." *Trends Endocrinol Metab* 22(6): 211-217.
58. Chong, B.M., et al. (2011). "The adipophilin C terminus is a self-folding membrane-binding domain that is important for milk lipid secretion." *J Biol Chem* 286(26): 23254-23265.
59. Ilcol, Y.O. and Hizli, B. (2007). "Active and total ghrelin concentrations increase in breast milk during lactation." *Acta Paediatr* 96(11): 1632-1639.
60. Ilcol, Y.O., et al. (2008). "Resistin is present in human breast milk and it correlates with maternal hormonal status and serum level of C-reactive protein." *Clin Chem Lab Med* 46(1): 118-124.
61. Ilcol, Y.O., et al. (2006). "Leptin concentration in breast milk and its relationship to duration of lactation and hormonal status." *Int Breastfeed J* 1: 21.
62. Jee, S.H., et al. (2013). "Serum adiponectin and type 2 diabetes: a 6-year follow-up cohort study." *Diabetes Metab J* 37(4): 252-261.
63. Jiang, H.P. and Serrero, G. (1992). "Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(17): 7856-7860.
64. Kershaw, E.E. and Flier, J.S. (2004). "Adipose tissue as an endocrine organ." *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2548-2556.
65. Kishida, K., et al. (2014). "Adiponectin as a routine clinical biomarker." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 28(1): 119-130.



66. Kleinman, R.E. and Walker, W.A. (1979). "The enteromammary immune system: an important new concept in breast milk host defense." *Dig Dis Sci* 24(11): 876-882.
67. Koletzko, B., et al. (2008). "The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations." *J Perinat Med* 36(1): 5-14.
68. Krahmer, N., et al. (2009). "SnapShot: Lipid Droplets." *Cell* 139(5): 1024-1024.e1021.
69. Kramer, M.S. (2011). "Breastfeeding and allergy: the evidence." *Ann Nutr Metab* 59 Suppl 1: 20-26.
70. Kramer, M.S., et al. (2002). "Breastfeeding and infant growth: biology or bias?" *Pediatrics* 110(2 Pt 1): 343-347.
71. Kramer, M.W., et al. (2010). "Can aquaporin-1 and adipophilin in urine distinguish between malignant and nonmalignant renal lesions?" *Mayo Clin Proc* 85(8): 768; author reply 768-769.
72. Lawrence, R.M. and Pane, C.A. (2007). "Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases." *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 37(1): 7-36.
73. Lihn, A.S., et al. (2005). "Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity." *Obes Rev* 6(1): 13-21.
74. Lindberg, S., et al. (2013). "Adiponectin, type 2 diabetes and cardiovascular risk." *Eur J Prev Cardiol*.
75. Liu, M. and Liu, F. (2014). "Regulation of adiponectin multimerization, signaling and function." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 28(1): 25-31.
76. Lonnerdal, B., et al. (1976). "A longitudinal study of the protein, nitrogen, and lactose contents of human milk from Swedish well-nourished mothers." *Am J Clin Nutr* 29(10): 1127-1133.
77. Mantzoros, C.S., et al. (2009). "Cord blood leptin and adiponectin as predictors of adiposity in children at 3 years of age: a prospective cohort study." *Pediatrics* 123(2): 682-689.
78. Martin, L.J., et al. (2006). "Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors." *Am J Clin Nutr* 83(5): 1106-1111.

79. Mather, K.J. and Goldberg, R.B. (2014). "Clinical use of adiponectin as a marker of metabolic dysregulation." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 28(1): 107-117.
80. McManaman, J.L. and Neville, M.C. (2003). "Mammary physiology and milk secretion." *Advanced Drug Delivery Reviews* 55(5): 629-641.
81. Meadows, J.W., et al. (2005). "Expression and localization of adipophilin and perilipin in human fetal membranes: association with lipid bodies and enzymes involved in prostaglandin synthesis." *J Clin Endocrinol Metab* 90(4): 2344-2350.
82. Monteiro, P.O. and Victora, C.G. (2005). "Rapid growth in infancy and childhood and obesity in later life--a systematic review." *Obes Rev* 6(2): 143-154.
83. Munzberg, H. (2010). "Leptin-signaling pathways and leptin resistance." *Forum Nutr* 63: 123-132.
84. Neville, K.A. and Walker, J.L. (2005). "Precocious pubarche is associated with SGA, prematurity, weight gain, and obesity." *Arch Dis Child* 90(3): 258-261.
85. Neville, M.C. (1995). C - Sampling and Storage of Human Milk. In *Handbook of Milk Composition*. R. G. Jensen. San Diego, Academic Press: 63-79.
86. Nevoral, J., et al. (2003). *Výživa v dětském věku*. Praha, H&H.
87. Newburg, D.S., et al. (2010). "Characteristics and potential functions of human milk adiponectin." *J Pediatr* 156(2 Suppl): S41-46.
88. Nielsen, G.A., et al. (1998). "Influence of breastfeeding and complementary food on growth between 5 and 10 months." *Acta Paediatr* 87(9): 911-917.
89. Nommsen, L.A., et al. (1991). "Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study." *Am J Clin Nutr* 53(2): 457-465.
90. Nuotio, K., et al. (2007). "Adipophilin expression is increased in symptomatic carotid atherosclerosis: correlation with red blood cells and cholesterol crystals." *Stroke* 38(6): 1791-1798.
91. Ozarda, Y., et al. (2012). "The concentration of adiponectin in breast milk is related to maternal hormonal and inflammatory status during 6 months of lactation." *Clin Chem Lab Med* 50(5): 911-917.
92. Ozbay, Y., et al. (2008). "Obestatin is present in saliva: alterations in obestatin and ghrelin levels of saliva and serum in ischemic heart disease." *BMB Rep* 41(1): 55-61.

93. Palou, A. and Pico, C. (2009). "Leptin intake during lactation prevents obesity and affects food intake and food preferences in later life." *Appetite* 52(1): 249-252.
94. Paul, A., et al. (2008). "Deficiency of adipose differentiation-related protein impairs foam cell formation and protects against atherosclerosis." *Circ Res* 102(12): 1492-1501.
95. Phillips, S.A., et al. (2005). "Adipocyte differentiation-related protein in human skeletal muscle: relationship to insulin sensitivity." *Obes Res* 13(8): 1321-1329.
96. Rahmouni, K. and W, G.H. (2002). "Leptin and the central neural mechanisms of obesity hypertension." *Drugs Today (Barc)* 38(12): 807-817.
97. Reinhardt, T.A. and Lippolis, J.D. (2008). "Developmental changes in the milk fat globule membrane proteome during the transition from colostrum to milk." *J Dairy Sci* 91(6): 2307-2318.
98. Russell, T.D., et al. (2007). "Cytoplasmic lipid droplet accumulation in developing mammary epithelial cells: roles of adipophilin and lipid metabolism." *J Lipid Res* 48(7): 1463-1475.
99. Sanchez, J., et al. (2005). "Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding." *Endocrinology* 146(6): 2575-2582.
100. Sanchez, J., et al. (2008). "Oral supplementation with physiological doses of leptin during lactation in rats improves insulin sensitivity and affects food preferences later in life." *Endocrinology* 149(2): 733-740.
101. Savino, F., et al. (2013). "Advances on human milk hormones and protection against obesity." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 59(1): 89-98.
102. Savino, F., et al. (2012). "Ghrelin and obestatin in infants, lactating mothers and breast milk." *Horm Res Paediatr* 78(5-6): 297-303. Savino, F. and Liguori, S.A. (2008). "Update on breast milk hormones: leptin, ghrelin and adiponectin." *Clin Nutr* 27(1): 42-47.
103. Savino, F., et al. (2013). "High serum leptin levels in infancy can potentially predict obesity in childhood, especially in formula-fed infants." *Acta Paediatr* 102(10): e455-459.
104. Savino, F., et al. (2009). "Breast milk hormones and their protective effect on obesity." *Int J Pediatr Endocrinol* 2009: 327505.

105. Savino, F., et al. (2006). "Maternal BMI and serum leptin concentration of infants in the first year of life." *Acta Paediatr* 95(4): 414-418.
106. Savino, F., et al. (2010). "Evaluation of leptin in breast milk, lactating mothers and their infants." *Eur J Clin Nutr* 64(9): 972-977.
107. Savino, F., et al. (2012). "Adiponectin in breast milk: relation to serum adiponectin concentration in lactating mothers and their infants." *Acta Paediatr* 101(10): 1058-1062.
108. Savino, F., et al. (2012). "Ghrelin and feeding behaviour in preterm infants." *Early Hum Dev* 88 Suppl 1: S51-55.
109. Savino, F., et al. (2012). "Resistin and leptin in breast milk and infants in early life." *Early Hum Dev* 88(10): 779-782.
110. Shintani, M., et al. (2001). "Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway." *Diabetes* 50(2): 227-232.
111. Schanler, R.J. (2013). Infant benefits of breastfeeding. In *UpToDate*. D. S. Basow. Waltham, MA, UpToDate.
112. Scherer, P.E., et al. (1995). "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes." *J Biol Chem* 270(45): 26746-26749.
113. Schroeder, F., et al. (2008). "Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription." *Lipids* 43(1): 1-17.
114. Schueler, J., et al. (2013). "Presence and dynamics of leptin, GLP-1, and PYY in human breast milk at early postpartum." *Obesity (Silver Spring)* 21(7): 1451-1458.
115. Siahianidou, T., et al. (2007). "Circulating levels of adiponectin in preterm infants." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 92(4): F286-290.
116. Smith-Kirwin, S.M., et al. (1998). "Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk." *J Clin Endocrinol Metab* 83(5): 1810-1813.
117. Steppan, C.M., et al. (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." *Nature* 409(6818): 307-312.
118. Stocker, C.J. and Cawthorne, M.A. (2008). "The influence of leptin on early life programming of obesity." *Trends Biotechnol* 26(10): 545-551.
119. Straub, B.K., et al. (2010). "Lipid droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in neoplastic steatogenesis." *Mod Pathol* 23(3): 480-492.

120. Szajewska, H., et al. (2012). "Systematic review: early infant feeding and the prevention of coeliac disease." *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 36(7): 607-618.
121. Tilg, H. and Moschen, A.R. (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." *Nat Rev Immunol* 6(10): 772-783.
122. Tovar, S., et al. (2005). "Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats." *Eur J Endocrinol* 153(3): R1-5.
123. Tsai, P.J., et al. (2004). "Cord plasma concentrations of adiponectin and leptin in healthy term neonates: positive correlation with birthweight and neonatal adiposity." *Clin Endocrinol (Oxf)* 61(1): 88-93.
124. Tschöp, M., et al. (2000). "Ghrelin induces adiposity in rodents." *Nature* 407(6806): 908-913.
125. Ucar, B., et al. (2000). "Breast milk leptin concentrations in initial and terminal milk samples: relationships to maternal and infant plasma leptin concentrations, adiposity, serum glucose, insulin, lipid and lipoprotein levels." *J Pediatr Endocrinol Metab* 13(2): 149-156.
126. Uysal, F.K., et al. (2002). "Breast milk leptin: its relationship to maternal and infant adiposity." *Clin Nutr* 21(2): 157-160.
127. van Hasselt, P.M., et al. (2008). "Prevention of vitamin K deficiency bleeding in breastfed infants: lessons from the Dutch and Danish biliary atresia registries." *Pediatrics* 121(4): e857-863.
128. Verhasselt, V. (2010). "Neonatal tolerance under breastfeeding influence." *Curr Opin Immunol* 22(5): 623-630.
129. Walker, W.A. (2004). "The dynamic effects of breastfeeding on intestinal development and host defense." *Adv Exp Med Biol* 554: 155-170.
130. Weyermann, M., et al. (2006). "Adiponectin and leptin in maternal serum, cord blood, and breast milk." *Clin Chem* 52(11): 2095-2102.
131. Weyermann, M., et al. (2007). "Adipokines in human milk and risk of overweight in early childhood: a prospective cohort study." *Epidemiology* 18(6): 722-729.
132. Whetstone, H.D., et al. (1986). "Identification and characterization of a fatty acid binding protein in bovine mammary gland." *Comp Biochem Physiol B* 85(3): 687-692.

133. WHO (2006). "WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age." *Acta Paediatr Suppl* 450: 76-85.
134. Woo, J.G., et al. (2009). "Human milk adiponectin is associated with infant growth in two independent cohorts." *Breastfeed Med* 4(2): 101-109.
135. Woo, J.G., et al. (2012). "Human milk adiponectin affects infant weight trajectory during the second year of life." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 54(4): 532-539.
136. Yamamoto, K., et al. (2005). "Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease." *Gut* 54(6): 789-796.
137. Yamauchi, T., et al. (2014). "Adiponectin receptors: a review of their structure, function and how they work." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 28(1): 15-23.
138. Ye, E., et al. (2014). "Adiponectin and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene polymorphisms and gene-gene interactions with type 2 diabetes." *Life Sci* 98(1): 55-59.
139. Zhang, J.V., et al. (2005). "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake." *Science* 310(5750): 996-999.
140. Zhang, Y., et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* 372(6505): 425-432.

## 11 SEZNAM PUBLIKACÍ

### A1) Publikace v časopisech s definovaným impakt faktorem:

**Mitrova K**, Karpisek M, Durilova M, Dragusin LG, Nevoral J, Bronsky J: Development of high sensitive ELISA method for detection of adipophilin levels in human kolostrum and breast milk. J Clin Lab Anal. 2014 Feb 27. doi: 10.1002/jcla.21675. (IF 1,356)

Bronsky J, **Mitrova K**, Karpisek M, Mazoch K, Durilova M, Fisarkova B, Stechova K, Prusa R, Nevoral J: Adiponectin, AFABP, and leptin in human breast milk during 12 months of lactation. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2011 Apr;52(4):474-477. (IF 2,196)

### A2) Publikace v recenzovaných časopisech:

**Mitrová K**, Bronský J: Vědecké důkazy o prospěšnosti výživy mateřským mlékem. ČS pediatrie. Čes-slov Pediat 2014;69(1):49–56.

Bronský J, **Mitrová K**: Regulační hormony a nové složky mateřského mléka. Klin. Biochem. Metab. 2013;21(42), No.1,31–38.

Bronský J, Nevoral J, **Mitrová K**, Zamečnick J: Immunoexpression of type-1 adiponectin receptor in human intestine. Cesk Patol. 2012;48(3):165-166.

### A3) Spoluautorství kapitoly v zahraniční monografii:

Bronsky J, **Mitrova K**: Adiponectin, adipocyte fatty acid-binding protein (AFABP), and leptin in human breast milk and impact in the infant. In: Dietary and Nutritional Aspects of Human Breast Milk. Editor: Professor Victor R Preedy, Kings College London. V tisku.

B) Publikace bez vztahu k tématu dizertace:

Bortlik M, Duricova D, Machkova N, Kozeluhova J, Kohout P, Hrdlicka L, Durilova M, **Mitrova K**, Hradsky O, Bronsky J, Malickova K, Lukas M. Impact of Anti-Tumor Necrosis Factor Alpha Antibodies Administered to Pregnant Women With Inflammatory Bowel Disease on Long-term Outcome of Exposed Children. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Mar;20(3):495-501. **(IF 5,119)**

Hradsky O, Ohem J, Zarubova K, **Mitrova K**, Durilova M, Kotalova R, Nevoral J, Zemanova I, Dryak P, Bronsky J. Disease Activity Is an Important Factor for Indeterminate Interferon- $\gamma$  Release Assay Results in Children With Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014 Mar;58(3):320-4. **(IF 2,196)**

**Mitrova K**, Bortlik M. Terapie idiopatických střevních zánětů u dětí. *Remedia* 2013; 23(5): 2-7.

**Mitrova K**. Zánětlivá střevní onemocnění u dětí. *Pediatr. praxi* 2012; 13(6): 388–390.