

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta
Autoreferát disertační práce



MUDr. Beáta Rác

**JINÉ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ DENNÍ HLADINU
MELATONINU**

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

**OTHER FACTORS INFLUENCING DAYTIME
MELATONIN LEVELS**

MELATONIN AND OTHER HORMONES DURING A DAY AND AFTER DIFFERENT STIMULI

PRAHA, 2015

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný,
DrSc.

Školící pracoviště: Endokrinologický ústav

Školitel: Prof. MUDr. Karel Vondra, DrSc.

Školitel-konzultant: MUDr. Michaela Dušková, PhD.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah

I. Souhrn.....	4
II. Summary.....	5
III. Úvod.....	6
IV. Cíle projektu a hpotéza.....	7
Metodika.....	8
VI. Výsledky.....	10
VII. Diskuze.....	15
VIII. Závěry.....	16
VIII. Použitá literatura.....	18
IX. Seznam vlastních publikací.....	19

Poděkování:

Tato disertační práce by nevznikla bez podpory a pochopení mých spolupracovníků a vedení Endokrinologického ústavu v Praze. Ráda bych poděkovala panu profesorovi Karlu Vondrovi za profesionální vedení, mnoho cenných rad, ochotu a trpělivost, kterou mi věnoval.

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

Děkuji panu Ing. M. Hillovi, DrSc. za vedení při analýze a statistickém vyhodnocení dat, dále celému týmu Oddělení steroidů a proteofaktorů Endokrinologického ústavu za podporu a pomoc.

Předložená práce byla podporována granty NT 12340-5.

I. Souhrn

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

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

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

2) Monitorace po různých stimulech: Hladiny melatoninu se začaly zvyšovat od 20. minuty, maxima dosáhly v 40. minutě po i.v. aplikaci glukózy. OGTT vedl k opožděnému nárůstu hladiny melatoninu oproti i.v.GTT. Největšího zpomalení poklesu kortizolu bylo při i.v.GTT. Při snídani došlo v 40. minutě ke zvýšení hladiny kortizolu. V OGTT jsme našli plato v kortizolových hladinách.

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

II. Summary

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

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

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

2) Monitoring after different stimuli: Levels of melatonin increased 40 minutes after i.v. application of glucose. In oGTT this increase was slower. Cortisol has decreased after application of glucose. Breakfast increased cortisol levels. OGTT and i.v.GTT caused a plateau of cortisol. Conclusion: Even through the mistakes in the profile of the study, we proved connection of some of the hormones to food intake.

III. Úvod

1. Cirkadiánní rytmus

Cirkadiánní rytmy jsou důležité v adaptaci organismu ke změnám prostředí. Endogenní "biologické" hodiny (pacemaker) mají periodu zhruba 24 hodin a nacházejí se v suprachiasmatickém jádru hypotalamu (SCN). Signály do SCN jsou přivedeny cestou retinohypotalamického traktu z očí (Berson 2007). Světlo spouští procesy, které vedou ke změnám genové exprese a aktivity neuronů SCN (Antle a Silver, 2005).

Melatonin je produkován v epifyze v průběhu tmy. Hlavním extrapineálním zdrojem melatoninu a zároveň hlavním zdrojem v průběhu světla je žaživací ústrojí. Je známo, že příjem potravy, který je bohatý na tryptofan může vést ke zvýšení hladiny cirkulujícího melatoninu (Bubenik, 2002). Podobný účinek je přisuzován i periodickému příjmu potravy (Martin et al., 1998).

Ghrelín je hormonem orexigenním, jehož hladiny stoupají před a klesají po příjmu potravy.

Orexiny jsou nedávno objeveným hormonem (Sakurai et al., 1998), které kromě jejich zapojení do regulace spánku a usínání, mají významný vliv na příjem potravy a energetický metabolismus.

Vliv steroidů na příjem potravy je dobře znám. Naopak je málo studií, které zabývají s účinkem potravy na hladinu steroidů.

IV. Cíle projektu a hypotéza

Hypotéza

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

Cíle práce

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

-Stanovit hladiny melatoninu u dobře definovaného souboru žen v průběhu 16 hodin sledování, najít a popsat vztah melatoninu s příjmem standardní potravy v průběhu dne

-Stanovit hladiny orexinu, ghrelinu, kortizolu i dalších vybraných steroidních hormonů v průběhu celého sledování, najít a popsat jejich vztah k příjmu potravy

b) Změny hladiny melatoninu a dalších hormonů hormonů po vybraných stimulech

-Stanovit změny hladiny melatoninu v závislosti na aplikaci různých stimulů u dobře definovaného souboru žen a sledovat změny hladin vybraných steroidních hormonů ve vztahu k příjmu potravy

V. Metodika

Soubory a provedené testy

1) sledování v průběhu 16 hodin: u osmi zdravých premenopauzálních nekuřaček (věk 29.48 ± 2.99 let, BMI 21.3 ± 1.3), bez medikace nebo orální kontracepce, monitorovat v průběhu 16 hodin hladiny melatoninu a dalších vybraných hormonů v průběhu folikulární fáze menstruačního cyklu. V průběhu testů probankdy jedly standardní stravu v daných časových intervalech. Odběry jsme prováděli nalačno (v 6:00) a dále jednu a dvě hodiny po jídle. Poslední odběr byl ve 21.30 večer.

2) sledování po různých stimulech: u osmi žen, které se zúčastnily předchozí studie (čili charakteristika skupiny je identická), jsme monitorovali průběh hladin melatoninu a dalších vybraných hormonů v průběhu folikulární fáze ve čtyřech konsekvenčních cyklech s provedením oGTT (orální glukózový test), i.v.GTT (intravenózní glukózový toleranční test), standardní snídani, aplikace psyllia (nekalorická vláknina). Studie trvala 2 hodiny. Odběry jsme provedli nalačno (7.30), dále v minutách 20, 40, 60, 90, 120.

Analytické metody

1) sledování v průběhu 16 hodin: Melatonin byl stanoven použitím komerčního RIA kitu (Laborator Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, Germany). C-peptid byl stanoven metodou ECLIA (Modular E 170 analyzátor, Roche). Glykémie byla stanovena enzymatickou

referenční metodou s hexokinázou (Cobas Integra 400 plus analyzátor, Roche). Ghrelin byl stanoven komerčně dostupným RIA kitem (Linco Research, Inc., St. Charles, Missouri, USA). Orexin-A byl stanoven komerčně dostupným RIA kitem (Phoenix Pharmaceutical, Inc.). Kortizol byl stanoven konvenční metodou RIA od firmy Immunotech (France). SHBG byl stanoven metodou IRMA od firmy Immunotech (France). LH a FSH byly stanoveny metodou IRMA (Immunotech, France). Analýza steroidů byla provedena metodou GC/MS.

Změny hladin hormonů byly hodnoceny modelem ANOVA s opakováním s faktory subjekt a čas.

2) sledování po různých stimulech: Melatonin byl stanoven použitím komerčního RIA kitu (Laborator Diagnostika Nord GmbH & Co. KG, Germany). C-peptid byl stanoven metodou ECLIA (Modular E 170 analyzátor, Roche). Glykémie byla stanovena enzymatickou referenční metodou s hexokinázou (Cobas Integra 400 plus analyzátor, Roche). Analýza steroidů byla provedena metodou GC/MS.

Změny hladin hormonů byly hodnoceny modelem ANOVA s opakováním s faktory subjekt a čas.

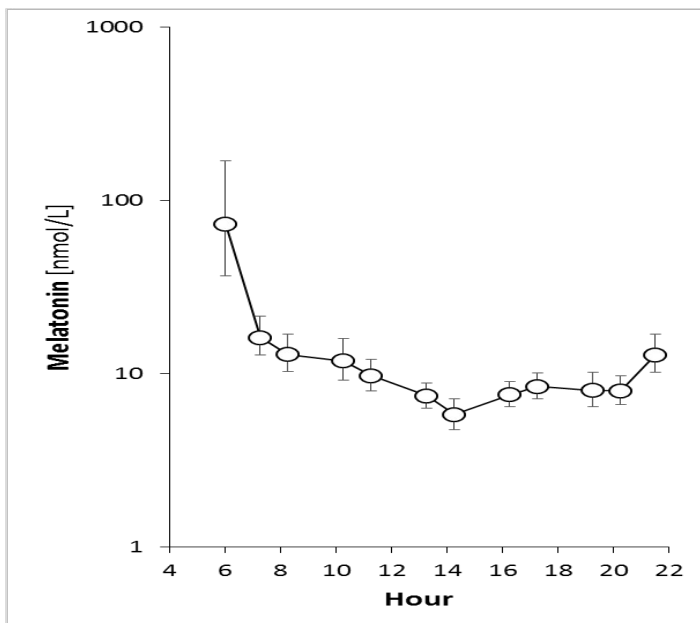
Před testy probandky seznámily s protokolem studie a podepsaly informovaný souhlas. Studie byla schválena Etickou komisí Endokrinologického ústavu v Praze.

VI. Výsledky

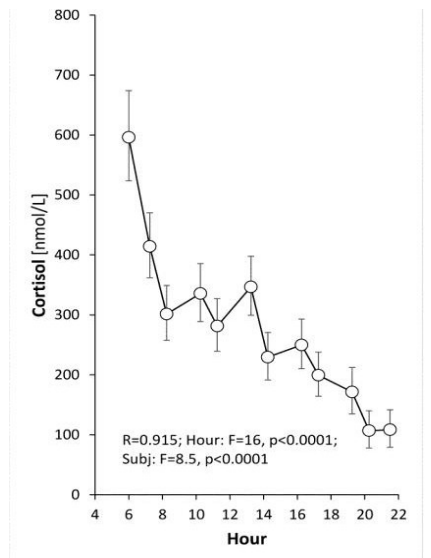
1) Sledování v průběhu 16 hodin:

Hladiny C-peptidu a glykémie se signifikantně zvýšily po velkých jídelch. Hladiny ghrelinu klesaly jídelch. Orexiny nevykazovaly souvislost s příjmem potravy.

Hladiny melatoninu po ranním poklesu hladiny signifikantně klesly dvě hodiny po obědě.

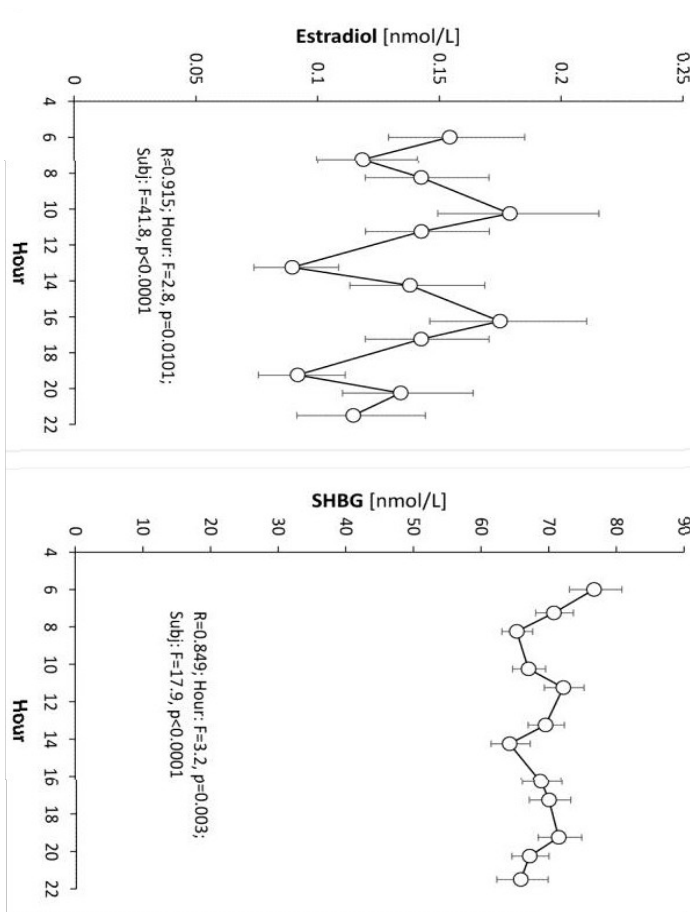


Hladiny kortizolu fyziologicky klesaly po celý den, navíc dvě hodiny po obědě dojde k dalšímu přídatnému poklesu.



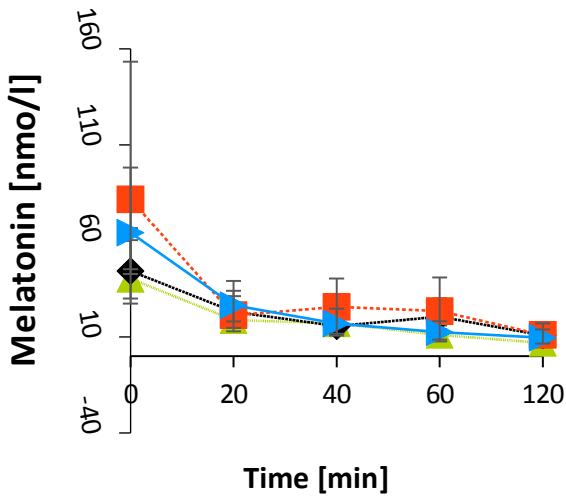
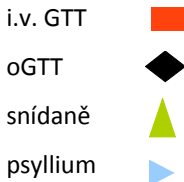
Z dalších sledovaných steroidních hormonů DHEA, DHEAS, androstendiol a 7alfa-hydroxyDHEA klesaly 2 hodiny po obědě a večeri. Navíc došlo ke zvýšení DHEA pozdě dopoledne (mezi 10-12 hodinou). Podobný jev byl sledován u testosteronu v odpoledních hodinách (kolem 14 hodin).

Nalezli jsme zatím nepopsané signifikantní změny hladiny estradiolu SHBG po jídlech.



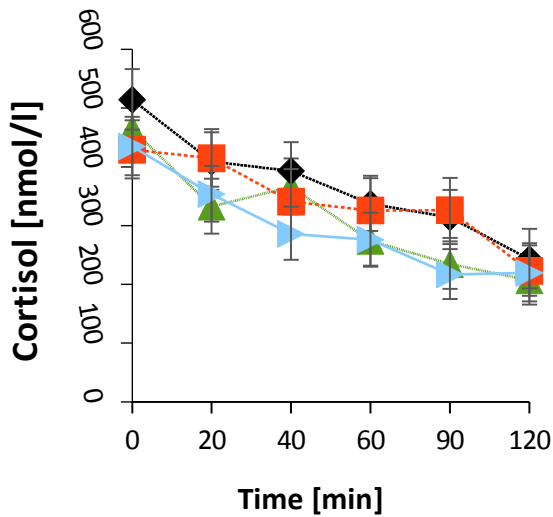
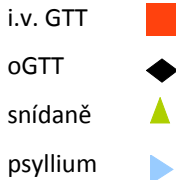
2: Monitorace po různých stimulech:

Hladiny glykémie a C-peptidu měly očekávaný průběh. Hladiny melatoninu po fyziologickém ranním poklesu se začaly zvyšovat od 20. minuty, maxima dosáhly v 40. minutě po i.v. aplikaci glukózy a tato změna přetrvávala až do 60. minuty, kdy došlo opět k poklesu. OGTT vedl k opožděnému nárůstu hladiny melatoninu oproti i.v.GTT.



Hladiny testosteronu nevykazovaly závislost na jednotlivých stimulech. Po počátečním poklesu jsme pozorovali určité zvýšení hladiny DHEA u všech stimulů.

U kortizolu došlo k poklesu hladin a to byl nejvíce vyjádřen při i.v.GTT. Při snídani došlo v 40. minutě ke zvýšení hladiny kortizolu. Test oGTT a i.v.GTT vedly k dosažení platu v kortizolových hladinách.



VII. Diskuze

1) Sledování v průběhu 16 hodin: Signifikantním pokles hladiny melatoninu jsme zaznamenali 2 hodiny po obědě. Můžeme předpokládat, že kvůli velkému odstupu odběrů jsme nezachytili zvýšení, která by eventuálně byla způsobena jídlem. Pravděpodobně tedy vliv potravy na melatoninové hladiny je skryt v jeho fyziologickém cirkadiánním průběhu. Podobně u kortizolu vliv jídla byl kryt převážně v nychtemerálním průběhu profilu (Weitzman et al., 1971). Nalezli jsme zatím nepopsané změny v hladinách estradiolu a SHBG.

2) sledování po různých stimulech: Hladiny melatoninu klesaly po prvním odběru nalačno, což odpovídá fyziologickému chování tohoto hormonu. 40 minut po intravenózní aplikaci glukózy došlo ke zvýšení hladiny melatoninu. Při OGTT zvýšení melatoninu byl opožděn. Příčinou toho je pravděpodobně pozdější nástup hyperglykémie. Kortizol klesl v souvislosti s jednotlivými stimuly. Při snídani došlo v 40. minutě ke zvýšení hladiny kortizolu. V mechanismu může hrát roli i parenterální versus perorální aplikace studovaných stimulů. Na postprandiálním zvýšení kortizolu při perorálním nutričním stimulu se předpokládá podíl signálů z GIT (inkretiny) (Herrmann et al., 1995). Dále při oGTT a i.v.GTT lze vidět plato v kortizolových hladinách. to odpovídá k výsledkům jiné studie, kde oGTT vedl k otupení charakteru poklesu kortizolu (Reynolds et al., 2001).

VIII. Závěry

1) šestnácti hodinové sledování

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

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

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

4) Kortizol udržel klesající tendenci po celý den, navíc signifikantní pokles hladiny byl sledován 2 hodiny po obědě

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

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

2) Sledování po různých stimulech

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

2) Došlo ke zpomalení fyziologického poklesu kortizolu po aplikaci jednotlivých stimulů a to byl

nejvíce vyjádřen v průběhu i.v.GTT. U snídaně došlo ke zvýšení hladiny kortizolu v 40. minutě

3) Hladiny DHEA klesaly na začátku testu, poté ale lze pozorovat jejich zvýšení

Shrnutí závěrů

Přes určité nedostatky v profilu studie související hlavně s načasováním odběrů, jsme našli u některých hormonů změny hladiny v souvislosti s jídlem. Po prvé jsme popsali změny hladiny SHBG a estradiolu v souvislosti s příjmem potravy. Hypotézu, že hladiny melatoninu v průběhu dne lze ovlivnit přes příjem potravy jsme nemohli jednoznačně prokázat, díky dlouhým intervalům odběrů v průběhu prvního studia, ale signifikantné změny jsme pozorovali v souvislosti s některými stimuly.

IX. Použitá literatura

- 1.** Antle MC, Silver R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends Neurosci* 2005; 28(3):145-151.
- 2.** Berson DM. Phototransduction in ganglion-cell photoreceptors. *Pflugers Arch* 2007; 454(5):849-855.
- 3.** Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function and clinical relevance. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 2336-2348.3
- 4.** Herrmann C, Göke R, Richter G, Fehm. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion*. 56(2):117-126, 1995.
- 5.** Martin MT, Azpiroz F, Malagelada JR. Melatonin and the gastrointestinal tract. *Therapie* 1998; 53(5):453-458.
- 6.** Reynolds RM, Walker BR, Syddall HE, Whorwood CB, Wood PJ, Phillips DI. Elevated plasma cortisol in glucose-intolerant men: differences in responses to glucose and habituation to venepuncture. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(3):1149-1153.
- 7.** Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H. Orexin and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G-protein coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573-585.
- 8.** Weitzman ED, Fukushima D, Nogeire C, Roffwarg H, Gallagher TF, Hellman L. Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 33(1):14-22.

X. Seznam vlastních publikací

a) impaktované se vztahem k tématu

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

-Stárka L, Dušková M, Rácz B, Šimůnková K, Hill M., Kancheva R: Melatonin negatively correlates with c-peptide after food intake., Physiol res, 2008, 57, S1, 187-92. **IF= 2,093**

b) neimpaktované se vztahem k tématu

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

c) impaktované bez vztahu k tématu

-Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Velíková M, Kubátová J, Kancheva L, Kazihnitková H, Hruškovičová H, Pospíšilová H, Rácz B, Salátová M, Cirmanová V, Králíková E, Stárka L, Pařízek A: Chronic cigarette smoking alters circulating sex hormones and neuroactive steroids in premenopausal women. Phys Res, 2012 Mar6;61(1):97-111. **IF= 1,646**

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

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

d) neimpaktované bez vztahu k tématu

-Rácz B, Vondra K, Stárka L: Apelin, DMEV 2007; 1; 26-29.

-Dušková M, Šimůnková K, Hill M, Velíková M, Kubátová J, Hruškovičová H, Pospíšilová H, Rácz B, Cirmanová V, Králíková E, Stárka L: Cigarette Smoking and Progesterone and Androgen Metabolites in Premenopausal Women, Horm Mol Biol Clin Invest 2011; 6(3):259-264.

-Jandíková H, Dušková M, Šimůnková K, Rácz B, Hill M, Pospíšilová H, Kmeťová A, Králíková E, Vondra K, Stárka L. How smoking cessation influence hormonal levels in postmenopausal women? Prague Med Rep. 2014;115(1-2):60-6.

