

Małgorzata Janas-Kozik

Stężenie oreksyn A i B (OXA i OXB) oraz greliny (GRE) w osoczu chorych z jadłowstrętem psychicznym – doniesienie wstępne

Concentrations of orexins A and B (OXA and OXB) and ghrelin (GRE) in anorexia nervosa patients' plasma – introductory report

Katedra i Klinika Psychiatrii i Psychoterapii ŚAM w Katowicach
Oddział Psychiatrii Wieku Rozwojowego – Centrum Pediatrii w Sosnowcu
Correspondence to: Centrum Pediatrii im. Jana Pawła II, Oddział Psychiatrii Wieku Rozwojowego, ul. G. Zapolskiej 3, 41-219 Sosnowiec, tel./faks: 0 (prefix) 32 266 50 52, e-mail: kozik@psychiatria.pl
Source of financing: Department own sources

Streszczenie

Wstęp: W powstawaniu jadłowstrętu psychicznego (*anorexia nervosa*, AN) rozpatruje się udział peptydów oreksygeniczných, do których należą m.in. oreksyny A i B, grelina, galanina, neuropeptyd Y oraz peptydów anoreksygeniczných reprezentowanych przez leptynę, proopiomelanokortynę (POMC) czy transkrypt regulowany przez kokainę i amfetaminę (CART). **Cel pracy:** Celem pracy było zbadanie zależności pomiędzy stężeniami peptydów oreksygeniczných: oreksyn A i B (OXA i OXB) oraz greliny (GRE) w osoczu a wskaźnikiem masy ciała (BMI) u chorych z AN. **Materiał i metoda:** Badaniem objęto 25 dziewcząt z jadłowstrętem psychicznym. Grupę odniesienia stanowiło 20 zdrowych dziewcząt. U wszystkich oznaczano jednorazowo w osoczu stężenie OXA, OXB, GRE i glukozy. Krew pobierano na czczo w godzinach rannych, po zachowaniu 8-godzinnej postu. Stężenie OXA i OXB mierzono przy użyciu komercyjnych zestawów radioimmunologicznych firmy Phoenix Pharmaceuticals, Mountain View, Kalifornia. Stężenie GRE całkowitej oznaczono przy użyciu komercyjnych zestawów radioimmunologicznych firmy Linci Research, INC. Zastosowano procedurę zalecaną przez firmę Phoenix. **Wyniki:** U chorych z AN spośród trzech analizowanych peptydów oreksygeniczných: OXA, OXB i GRE, jedynie dwa z nich – OXA i GRE zmieniły istotnie swoje stężenie w osoczu w ostrej fazie choroby. Stężenie OXA w osoczu chorych z AN było statystycznie istotnie niższe, a stężenie GRE – statystycznie istotnie wyższe niż w grupie odniesienia. Jednocześnie wykazano statystycznie istotną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem OXA a wartością BMI i statystycznie istotną ujemną korelację pomiędzy stężeniem GRE a BMI. **Wnioski:** U chorych z jadłowstrętem psychicznym (głównie z jego postacią restrykcyjną) OXA i GRE istotnie zmieniają swoje stężenie w osoczu w ostrej fazie choroby.

Słowa kluczowe: jadłowstręt psychiczny, peptydy oreksygeniczne, oreksyna A, oreksyna B, grelina

Summary

Introduction: Analysis of the occurrence of anorexia nervosa involves the possible contribution of orexigenic peptides, including orexins A and B, ghrelin, galanin, neuropeptide Y and anorexigenic peptides which are represented by leptin, proopiomelanocortin (POMC), or transcript regulated by cocaine and amphetamine (CART). **Aim:** The study was aimed at examining the correlation between the concentrations of orexigenic peptides:

orexins A and B (OXA and OXB) and ghrelin (GRE) in plasma and the body mass index (BMI) in AN patients. **Material and method:** The study involved 25 girls with anorexia nervosa. The reference group consisted of 20 healthy girls. In all of them the plasma concentration of OXA, OXB, GRE and glucose was determined once. The blood was drawn on empty stomach, in the morning after 8-hours fasting. The concentration of OXA and OXB was measured using commercial radioimmunological sets made by Phoenix Pharmaceuticals, Mountain View, California. The concentration of total GRE was determined using commercial radioimmunological sets made by Linci Research, INC. The procedure was applied pursuant to the procedure recommended by Phoenix. **Results:** In AN patients, of three analysed orexigenic peptides OXA, OXB and GRE only two – OXA and GRE significantly changed their plasma concentration in acute phase of the disease. OXA concentration in AN patients' plasma was statistically significantly lower, whereas GRE concentration – statistically significantly higher, as compared to the reference group. At the same time a statistically significantly positive correlation was found between OXA concentration and BMI value and statistically significantly negative correlation between the concentration of GRE and BMI. **Conclusions:** In patients with anorexia nervosa (mainly its restrictive form) OXA and GRE significantly change their plasma concentration in acute phase of the disease.

Key words: anorexia nervosa, orexigenic peptides, orexin A, orexin B, ghrelin

WSTĘP

Jadłowstręt psychiczny (*anorexia nervosa*, AN) należy do grupy zaburzeń odżywiania się. Wśród biologicznych czynników biorących udział w jego powstawaniu rozpatrywany jest udział peptydów oreksygenicznnych i anoreksygenicznnych. Lata 90. ubiegłego stulecia zaowocowały odkryciem kolejnych – oreksyn i greliny⁽¹⁻¹⁰⁾.

Oreksyny A i B (OXA i OXB), zwane inaczej hypokretynami, swoją nazwę zawdzięczają greckiemu słowu *orexis* – „apetyt”. Zostały odkryte w 1998 r. Ich prekursorem jest polipeptyd preprooreksyna. OXA zbudowana jest z 33 aminokwasów, jej dwa łańcuchy połączone są pomostami Cys6-Cys12 i Cys7-Cys14. OXB składa się z 28 aminokwasów, bez pomostów pomiędzy łańcuchami^(6,11). OXA odgrywa kluczową rolę w aktywacji receptora OXR-1, ale może również łączyć się z receptorem OXR-2 w odróżnieniu od OXB, która aktywuje jedynie receptor OXR-2⁽¹¹⁾. OXA i OXB kontrolują stan czuwania-sen, spożywanie pokarmu (OXA 100x silniej niż OXB) i masę ciała, układ neuroendokryny, aktywność ruchową i seksualną⁽¹²⁾. Zakres działania oreksyn, ich budowę oraz rolę, jaką pełnią w organizmie, poznano głównie dzięki badaniom prowadzonym na modelu zwierzęcym^(3,8,11-15). Wiadomo, iż produkcja OXA i OXB jest zwiększona w stanie głodu. Neurony produkujące oreksyny mają obustronne i gęste połączenia z innymi jądrami podwzgórza regulującymi zachowanie związane z jedzeniem. Aktywność neuronów produkujących OXA jest obniżona w odpowiedzi na hiperglykemię i hipoleptynemię. Kontrolując stan czuwania i snu, stymulują czuwanie w odpowiedzi na wewnętrzną homeostazę energetyczną w celu szukania pożywienia. OXA powoduje znamienne obniżenie wydzielania prolaktyny, hormonu wzrostu i wzrost stężenia kortyzolu. Hamuje również pulsacyjne uwalnianie hormonu luteotropowego (LH)^(6,8,12,15,16).

Grelina (GRE) jest białkiem zidentyfikowanym i wyizolowanym z żołądka szczura w 1999 r.⁽¹⁷⁾. Nazwa jej ma

INTRODUCTION

Anorexia nervosa (AN) belongs to a group of eating disorders. Among biological agents which contribute to its development, orexigenic and anorexigenic peptides are considered. In the 90s of the last century, additional peptides were discovered: orexins and ghrelin⁽¹⁻¹⁰⁾.

Orexins A and B (OXA and OXB), otherwise called hypocretins, taking its name from the Greek word *orexis* meaning “appetite”, were discovered in 1998. Their precursor is preproorexin polypeptide. OXA consists of 33 aminoacids, its two chains are connected by bridges Cys6-Cys12 and Cys7-Cys14. OXB consists of 28 aminoacids, without bridges between the chains^(6,11). OXA plays the key role in activation of receptor OXR-1, but may also bind with receptor OXR-2, unlike OXB which activates only receptor OXR-2⁽¹¹⁾. OXA and OXB control the sleep-wake status, food consumption (OXA 100 times stronger than OXB) and body mass, neuroendocrine system, motor and sexual activity⁽¹²⁾. The range of the effects of orexins, their structure and role they play in the organism have become known mainly owing to the tests carried out on an animal model^(3,8,11-15). Admittedly, the production of OXA and OXB is increased during hunger. Neurons producing orexins have bilateral dense bonds with other hypothalamic nuclei regulating the eating-related disorders. The activity of neurons producing OXA is lowered in response to hyperglycaemia and hypoleptinemia. Controlling the status of wakefulness and sleep they stimulate wakefulness in response to internal energy homeostasis to search for food. OXA causes a significant decrease in the secretion of prolactin, growth hormone and increase in the concentration of cortisol. It also inhibits the throbbing release of luteotropic hormone (LH)^(6,8,12,15,16).

Ghrelin (GRE) is a protein identified and isolated from the rat's stomach in 1999⁽¹⁷⁾. Its name has its roots in the

korzenie w protoindoeuropejskim słowie *grow*, co znaczy „rosnąć”. Zbudowana jest z 28 aminokwasów. Swoją biologiczną aktywność zawdzięcza łańcuchowi grup oktanylowych kowalencyjnie połączonych z Ser 3^(18,19). GRE w największych ilościach produkowana jest w komórkach okładzinowych dna żołądka, ale produkując ją komórki znaleziono również na krzywiznie mniejszej żołądka, w jelitach, jądrach, płucach, sercu, przysadce i w podwzgórze. Tam również zidentyfikowano dla niej receptory^(18,20). GRE jest stymulatorem łaknienia. Ma miejsce przedposiłkowy wzrost jej stężenia w osoczu o 78% w stosunku do wartości średnich, a jego obniżenie obserwuje się w ciągu pierwszej godziny jedzenia. GRE wydzielana jest w rytmie dobowym. Kontroluje ona motorykę przewodu pokarmowego, wydzielanie kwasu solnego w żołądku, funkcje endo- i egzogenną trzustki^(18,21). Będąc endogennym ligandem dla receptora hormonu wzrostu, kontroluje jego wydzielanie⁽¹⁹⁾. GRE powoduje wzrost sekrecji kortyzolu, prolaktyny, aldosteronu, hormonu adrenokortykotropowego. Zależność między GRE a insuliną nie jest całkiem jasna, pomiędzy nimi ma miejsce ujemne sprzężenie zwrotne^(18,19). AN określana jest jako choroba psychobiologiczna, patologiczny rezultat interakcji czynników psychologicznych i podatności genetycznej⁽²²⁾. Obecnie zaburzenia odżywiania się uważane są za kategorię zespołową, a nie jednostkę nosologiczną. Szacuje się, że AN dotyczy 0,5-0,8% adolescentów i do 1% kobiet, u których występuje ona dziesięciokrotnie częściej niż u mężczyzn. Obserwacje kliniczne wskazują na narastającą liczbę osób dotkniętych tym zaburzeniem. Kontekst rodzinny w powstawaniu AN jest znany i dobrze udokumentowany, podobnie jak terapia rodzin. Neurofizjologia dotycząca funkcji ośrodków mózgowych w kontroli głodu i sytości jest w zasadzie również ustalona. Sprawą otwartą i cały czas weryfikowaną pozostaje nadal rola odkrywanych neuropeptydów w mechanizmie powstawania AN, podobnie jak rola czynnika genetycznego w tym zaburzeniu.

CEL PRACY

Celem pracy było zbadanie zależności pomiędzy stężeniami oreksyn A i B (OXA i OXB) oraz greliny (GRE) w osoczu a wskaźnikami masy ciała (*body mass index*, BMI) u chorych z jądłowstrętem psychicznym.

MATERIAŁ I METODA

PACJENCI

Badaniem objęto 25 chorych z AN. Rozpoznanie stawiano na podstawie klasyfikacji ICD-10 i DSM-IV. Kryterium dodatkowym włączenia chorej do grupy badanej był BMI ≥ 16 kg/m². Wszystkie pacjentki były hospitalizowane w Oddziale Psychiatrii Wieku Rozwojowego, nie przyjmowały żadnych leków i pozostawały na

protoindoeuropejskim słowie *grow*. It consists of 28 aminoacids. Its bioactivity is due to the chain of octanile groups covalently bound with Ser 3^(18,19).

GRE in highest amounts is produced in parietal cells, but the cells which produce it were also found on the lesser curvature of the stomach, in intestines, nuclei, lungs, heart, pituitary gland and hypothalamus. It was there that receptors for it were identified^(18,20). GRE is a stimulator of appetite. Its concentration in plasma increases before meals by 78%, as compared to average values, and its decrease is observed within the first hour after eating. GRE is secreted in diurnal rhythm. It controls the alimentary tract motor activity, secretion of hydrochloric acid in the stomach, endo- and exogenous functions of the pancreas^(18,21). As an endogenous ligand for the growth hormone receptor it controls its secretion⁽¹⁹⁾. GRE causes an increase in the secretion of cortisol, prolactin, aldosterone, adrenocorticotrophic hormone. The correlation between GRE and insulin is not quite clear as yet, the negative feedback occurring between them^(18,19). AN is defined as a psychobiological disease, a pathological result of the interaction of psychological factors and genetic susceptibility⁽²²⁾. Nowadays the eating disorders are considered to be a group category, and not a nosological unit. It is estimated that AN refers to 0.5-0.8% adolescents and to 1% of women in whom its prevalence is by ten times higher than in men. Clinical observations indicate an increasing number of those affected by this disorder. The family context in the development of AN is well known and documented, as is the family therapy. The neurophysiology relating to the cerebral centres functions in the control of hunger and satiety is also actually established. What still remains an open and continually verified issue is the role of discovered neuropeptides in the AN development mechanism, similarly as the role of the genetic factor in this disorder.

OBJECTIVE

The objective of the study was to check the correlation between the plasma concentrations of orexins A and B (OXA and OXB) as well as ghrelin (GRE) with the body mass index (BMI) in anorexia nervosa patients.

MATERIAL AND METHODS

PATIENTS

The study involved 25 AN patients. The diagnosis was based on classification according to ICD-10 and DSM-IV. An additional criterion of including a patient into the examined group was BMI ≥ 16 kg/m². All patients were hospitalised on the Ward of Developmental Age Psychiatry, they were not given any drugs and were on a normocaloric diet. The reference group consisted of 20 healthy girls aged 18-19 years – on a normocaloric

diecie normokalorycznej. Grupę odniesienia stanowiło 20 zdrowych dziewcząt w wieku 18-19 lat na normokalorycznej diecie. Dziewczęta były rekrutowane spośród uczennic klas IV szkoły średniej, nie zażywały żadnych leków i nie chorowały na choroby przewlekłe, a ostatnią infekcję przeżyły co najmniej miesiąc wcześniej. Średni wiek pacjentek w grupie badanej wynosił 17,6 lata (SEM=0,53), natomiast w grupie odniesienia – 18,6 lata (SEM=0,07). Były to grupy jednorodnie pod względem wieku – $p=0,0727$ (test t-Studenta). Średnia wartość BMI w grupie badanej wynosiła $15,03 \text{ kg/m}^2$ (SEM=0,27), a w grupie odniesienia – $21,41 \text{ kg/m}^2$ (SEM=0,46). Stwierdzono bardzo dużą różnicę statystycznie istotną w średniej wartości BMI pomiędzy grupami badaną i odniesienia ($p<0,001$ – test t-Studenta). Podziału chorych dokonano, biorąc pod uwagę kliniczne postacie jadłowstrętu psychicznego i jego dwa podtypy: restrykcyjny (*restricting type*) i bulimiczno-wydalający (*binge eating/purging type*). W podgrupie z postacią restrykcyjną, B1, znalazło się 20 chorych, natomiast w podgrupie bulimiczno-wydalającej, B2 – 5 pacjentek. Średni wiek chorych w podgrupie B1 wynosił 17,1 lata (SEM=0,55), średni czas trwania choroby – 13,9 miesiąca (SEM=1,64), średnia wartość BMI=14,71 (SEM=0,27), średnie stężenie glukozy w osoczu – 74,3 mg/dl (mediana=76,7; SEM=2,7). Średni wiek chorych w podgrupie B2 wynosił 19,4 lata (SEM=1,21), średni czas trwania choroby – 22,4 miesiąca (SEM=5,04), średnia wartość BMI=16,35 kg/m^2 (SEM=0,53) i średnia wartość stężenia glukozy w osoczu – 69,3 mg/dl (mediana=65; SEM=4,71). Dokonano również podziału chorych z AN na dwie podgrupy, biorąc pod uwagę wartość BMI. Podgrupa C1 obejmowała te pacjentki, których wartość BMI była $\geq 15 \text{ kg/m}^2$ i liczyła 12 dziewcząt, a podgrupa C2 te pacjentki, których BMI był $< 15 \text{ kg/m}^2$ i w jej skład wchodziło 13 chorych. Średni wiek chorych w podgrupie C1 wynosił 17,8 lata (SEM=0,672), średni czas trwania choroby 17 miesięcy (SEM=2,81) i średnia wartość stężenia glukozy w osoczu – 69,7 mg/dl (mediana=71,6; SEM=3,36). Średni wiek dziewcząt w podgrupie C2 wynosił 17,3 lata (SEM=0,820), czas trwania choroby 14,3 miesiąca (SEM=2,17) i średnie stężenie glukozy w osoczu 76,63 mg/dl (mediana=76; SEM=3,09). Dokonano również podziału grupy badanej na dwie podgrupy w zależności od wartości stężenia glukozy w osoczu chorych na D1, w której stężenie glukozy było prawidłowe ($\geq 70 \text{ mg/dl}$) i D2, gdzie stężenie glukozy kształtowało się $< 70 \text{ mg/dl}$.

MATERIAŁ

8 Materiał badany stanowiły próbki osocza uzyskane poprzez wirowanie krwi obwodowej badanych pacjentek. Próbkę krwi pobierano metodą próżniową do probówek Vacutaner zawierających antykoagulant EDTA (1 mg/ml krwi). Delikatnie je mieszano i przenoszono do prób-

diet. The girls were recruited from among the students of the fourth form of secondary school; they were not given any drugs and did not suffer from any chronic diseases, having passed the last infection at least one month before. The patients' average age in the examined group reached 17.6 years (SEM=0.53), whereas in the reference group – 18.6 years (SEM=0.07). These groups are homogeneous in respect of age – $p=0.0727$ (Student's t-test). The BMI average value in the examined group reached 15.03 kg/m^2 (SEM=0.27), whereas in the reference group – 21.41 kg/m^2 (SEM=0.46). A very high statistically significant difference was found in the BMI average value between the examined and reference groups ($p<0.001$ – Student's t-test). The patients were divided in view of the clinical forms of anorexia nervosa into two subtypes: restricting and binge eating/purging types. The restricting subgroup, B1, consisted of 20 patients, whereas the binge eating/purging subgroup – B2, consisted of 5 patients. The patients' average age in B1 subgroup was 17.1 years (SEM=0.55), the average duration of the disease – 13.9 months (SEM=1.64), the average value of BMI=14.71 (SEM=0.27), average concentration of glucose in plasma – 74.3 mg/dl (Median= 6.7; SEM=2.7). The average age of patients in B2 subgroup reached 19.4 years (SEM=1.21), average duration of the disease – 22.4 months (SEM=5.04), average value of BMI=16.35 kg/m^2 (SEM=0.53) and average value of glucose concentration in plasma – 69.3 mg/dl (Median=65; SEM=4.71). The AN patients were further divided into two subgroups in view of the BMI value. Subgroup C1 included those patients whose BMI value was $\geq 15 \text{ kg/m}^2$ and consisted of 12 girls, while subgroup C2 the patients whose BMI was $< 15 \text{ kg/m}^2$ and it consisted of 13 patients. The patients' average age in subgroup C1 was 17.8 years (SEM=0.672), with the average duration of the disease – 17 months (SEM=2.81) and average value of glucose concentration in plasma – 69.7 mg/dl (Median=71.6; SEM=3.36). The average age in subgroup C2 girls reached 17.3 years (SEM=0.820), duration of the disease – 14.3 months (SEM=2.17) and glucose concentration in plasma 76.63 mg/dl (Median=76; SEM=3.09). The examined group was also divided into two subgroups depending on glucose concentration in plasma of patients with D1, where glucose concentration was normal ($\geq 70 \text{ mg/dl}$) and D2, where glucose concentration was $< 70 \text{ mg/dl}$.

MATERIAL

The examined material consisted of plasma samples obtained by centrifuging the patients' peripheral blood. The blood samples were collected by the vacuum method into the Vacutaner test tubes containing anticoagulant EDTA (1 mg/ml blood). They were stirred gently and transferred into the centrifugation tubes containing aprotinine (0.6 TIU/ml blood) to inhibit the activity of pro-

wiek wirówkowych zawierających aprotyninę (0,6 TIU/ml krwi), aby zahamować aktywność proteinazy. Próbkę krwi wirowano przy 1600 g przez 15 minut w temperaturze 4°C, zbierano osocze krwi i zamrażano w 70°C. Stężenie wybranych peptydów (OXA, OXB, GRE) i glukozy oznaczano jednokrotnie po przyjęciu pacjentki do Oddziału w ostrym stanie choroby. Krew pobierano na czczo w godzinach rannych, po zachowaniu 8-godzinnego postu, z jednego uklucia przy okazji wykonywania rutynowych badań hematologicznych i biochemicznych. Na przeprowadzenie badania została wyrażona zgoda Terenowej Komisji Etyki Badań Naukowych przy Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. Zgodę na badanie wyraziły zarówno pacjentki i/lub rodzice bądź prawni opiekunowie, jak również dziewczęta z grupy odniesienia.

METODA

Stężenie OXA i OXB mierzono przy użyciu komercyjnych zestawów radioimmunologicznych firmy Phoenix Pharmaceuticals, Mountain View, Kalifornia. Zastosowano procedurę zgodną z instrukcją producenta zestawu. Próbkę osocza poddawano wstępnej ekstrakcji zgodnie z zaleceniami firmy Phoenix. Używano buforu A – 1% roztwór wodny kwasu trifluorooctowego oraz buforu B – 60% roztwór acetonitrylu w 1% roztworze kwasu trifluorooctowego. Do ekstrakcji używano kolumn chromatograficznych SEP-PAK C-18 firmy Waters Associates. Oznaczenia stężeń oreksyn wykonano przy użyciu automatycznego licznika gamma LKB WALLAC Clini Gamma 1272.

OXA wykazuje następujące reakcje krzyżowe: Orexin A (Human, Mouse, Rat) – 100%, Orexin A (16-33) (Human, Mouse, Rat) – 0%, Orexin B (Human) – 0%, Agouti-Related Protein (83-132)-Amide (Human) – 0%, Neuropeptide Y (Human, Rat) – 0%, Alpha – MSH0. Leptin (Human) – 0%, Hypocretin-1NH2 (Mouse) – 0%. Czułość oznaczeń = 0,001 ng/ml.

OXB wykazuje następujące reakcje krzyżowe: Orexin B (Human) – 100%, Orexin B (1-28) (Mouse, Rat) – 100%, Orexin B (3-28) (Mouse, Rat) – 100%, Orexin A (Human, Mouse, Rat) – 0%, Agouti-Related Protein (82-132-NH2) (Human) – 0%, Agouti-Related Protein (82-131) (Mouse) – 0%, Neuropeptide Y (Human, Rat) – 0%, Leptin (Human) – 0%, Alpha-MSH – 0%, MGOP-27 – 0%, NE I – 0%. Czułość oznaczeń = 0,001 ng/ml.

Stężenie GRE całkowitej oznaczono przy użyciu komercyjnych zestawów radioimmunologicznych firmy Linc Research, INC. Zastosowano procedurę zgodną z instrukcją producenta zestawu. Oznaczenia stężenia GRE całkowitej w osoczu wykonano przy użyciu automatycznego licznika gamma LKB WALLAC Clini Gamma 1272. GRE całkowita wykazuje następujące reakcje krzyżowe: Human Ghrelin – 100%, Rat Ghrelin – 100%, Canine Ghrelin – 100%, Ghrelin 14 – 28 1005, Des-Octonvlghrelin – 100%, Ghrelin 1-10 – nieoznaczalne,

teinase. The blood samples were centrifuged at 1600 g for 15 minutes at 4°C, the blood plasma was collected and frozen at – 70°C. The concentrations of selected peptides (OXA, OXB, GRE) and glucose were determined once, after the patient was admitted onto the Ward, in acute phase of the disease. The blood was collected on empty stomach, in the morning, after 8-hours fast, from one puncture, while performing routine haematological and biochemical studies.

The Regional Committee of Research Ethics at the Silesian University of Medicine in Katowice gave its consent for the studies. Besides, the patients and/or their parents or legal guardians, as well as the girls from the reference group gave their consents for the studies.

METHOD

The concentration of OXA and OXB was measured using commercial radioimmunological sets made by Phoenix Pharmaceuticals, Mountain View, California. The applied procedure complied with the instructions of the set's producer. Plasma samples were subjected to preliminary extraction pursuant to the procedure recommended by Phoenix. Applied was buffer A – 1% aqueous solution of trifluoroacetic acid and buffer B – 60% solution of acetonitrile in 1% solution of trifluoroacetic acid. Chromatographic columns SEP-PAK C-18 made by Waters Associates were used. The concentrations of orexins were determined using the automatic gamma counter LKB WALLAC Clini Gamma 1272.

OXA exhibits the following cross reactions: Orexin A (Human, Mouse, Rat) – 100%, Orexin A (16-33) (Human, Mouse, Rat) – 0%, Orexin B (Human) – 0%, Agouti-Related Protein (83-132)-Amide (Human) – 0%, Neuropeptide Y (Human, Rat) – 0%, Alpha – MSH0. Leptin (Human) – 0%, Hypocretin-1NH2 (Mouse) – 0%. Sensitivity of determinations = 0.001 ng/ml.

OXB exhibits the following cross reactions: Orexin B (Human) – 100%, Orexin B (1-28) (Mouse, Rat) – 100%, Orexin B (3-28) (Mouse, Rat) – 100%, Orexin A (Human, Mouse, Rat) – 0%, Agouti-Related Protein (82-132-NH2) (Human) – 0%, Agouti-Related Protein (82-131) (Mouse) – 0%, Neuropeptide Y (Human, Rat) – 0%, Leptin (Human) – 0%, Alpha-MSH – 0%, MGOP-27 – 0%, NE I – 0%. Sensitivity of determinations = 0.001 ng/ml. The total GRE concentration was determined using commercial radioimmunological sets made by Linc Research, INC. The procedure conforming to the set producer's instructions was used. The total GRE concentration in plasma was determined using the automatic gamma counter LKB WALLAC Clini Gamma 1272. The total GRE exhibits the following cross reactions: Human Ghrelin – 100%, Rat Ghrelin – 100%, Canine Ghrelin – 100%, Ghrelin 14 – 28 1005, Des-Octonvlghrelin – 100%, Ghrelin 1-10 – indeterminate, Motilin Related Peptide – indeterminate, Glucagon – indeterminate,

Motilin Related Peptide – nieoznaczalne, Glucagon – nieoznaczalne, GLP-1 (7-36) – nieoznaczalne, Human Leptin – nieoznaczalne, Human Insulin – nieoznaczalne. Czułość oznaczeń = 0,093 ng/ml.

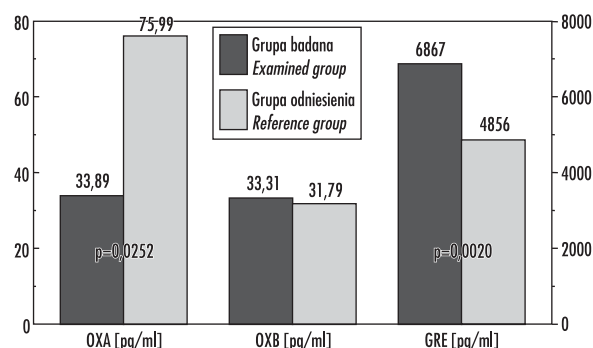
W obliczeniach statystycznych zastosowano: test t-Studenta, nieparametryczny test U-Manna-Whitneya, analizę regresji i korelacji Pearsona i korelację porządku rang Spearmana.

WYNIKI

Średnia wartość stężenia OXA w osoczu w grupie badanej wynosiła 33,89 pg/ml (mediana=31,6; SEM=4,61), natomiast w grupie odniesienia – 75,99 pg/ml (mediana=44,4; SEM=22,48). W oparciu o nieparametryczny test U-Manna-Whitneya stwierdzono niejednorodność grup pod względem tego parametru, $p=0,0252$. Średnie stężenie OXA w osoczu dziewcząt z AN było statystycznie istotnie niższe w porównaniu z grupą odniesienia. U badanych dziewcząt wykazano statystycznie istotną dodatnią korelację pomiędzy stężeniem OXA w osoczu a BMI ($R=0,3694$; $p=0,0125$, korelacja Pearsona), co oznacza, że im niższy BMI, tym również niższe stężenie OXA w osoczu.

Średnia wartość stężenia OXB w osoczu w grupie badanej wynosiła 33,31 pg/ml (mediana=24,2; SEM=7,63), zaś w grupie odniesienia – 31,79 pg/ml (mediana=22,75; SEM=5,39). W oparciu o nieparametryczny test U-Manna-Whitneya stwierdzono jednorodność grup pod względem stężenia OXB w osoczu, $p=0,4931$. Nie wykazano statystycznie istotnej korelacji pomiędzy stężeniem OXB w osoczu a BMI u badanych dziewcząt ($p=0,8876$; współczynnik korelacji Spearmana, $R=0,1207$).

Średnia wartość stężenia GRE całkowitej w osoczu w grupie badanej wynosiła 6867 pg/ml (SEM=517,41), a w grupie odniesienia – 4856 pg/ml (SEM=317,83). Stwierdzono statystycznie istotną różnicę w stężeniu GRE całkowitej w osoczu między grupami badaną i odniesienia



Rys. 1. Wartości stężeń OXA, OXB i GRE w osoczu w grupach badanej i odniesienia

Fig. 1. Values of OXA, OXB and GRE concentrations in the plasma of the examined group and reference group

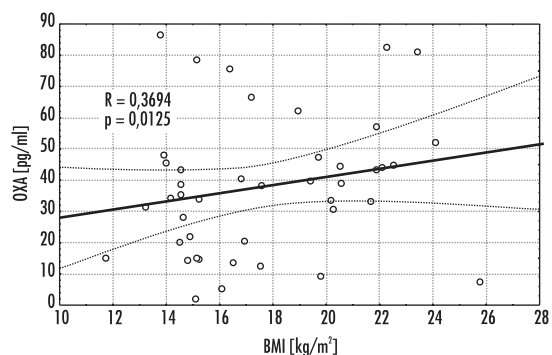
GLP-1 (7-36) – indeterminable, Human Leptin – indeterminable, Human Insulin – indeterminable. Sensitivity of determinations = 0,093 ng/ml.

The statistical calculations included: Student's t-test, nonparametric U-Mann-Whitney test, analysis of regression and correlation of Pearson and Spearman rank correlation.

RESULTS

The average value of OXA concentration in plasma of the examined group reached 33.89 pg/ml (Median=31.6; SEM=4.61), whereas in the reference group – 75.99 pg/ml (Median=44.4; SEM=22.48). Basing on the nonparametric U-Mann-Whitney test the groups were found to be heterogenous in respect of this parameter, $p=0.0252$. The average concentration of OXA in the plasma of AN girls was statistically significantly lower, as compared to the reference group. The examined girls exhibited a statistically significant positive correlation between OXA concentration in plasma and BMI ($R=0.3694$; $p=0.0125$, correlation Pearson), which means that the lower the BMI, the lower the concentration of OXA in plasma. The average value of OXB concentration in plasma of the examined group reached 33.31 pg/ml (Median=24.2; SEM=7.63), whereas in the reference group – 31.79 pg/ml (Median=22.75; SEM=5.39). Basing on the nonparametric U-Mann-Whitney test, the homogeneity of groups was found in view of OXB concentration in plasma, $p=0.4931$. No statistically significant correlation was found between OXB concentration in plasma and BMI in examined girls ($p=0.8876$; Spearman correlation coefficient – $R=0.1207$).

The average value of the total GRE concentration in plasma in the examined group reached 6867 pg/ml (SEM=517.41), whereas in the reference group – 4856 pg/ml (SEM=317.83). A statistically significant difference in



Rys. 2. Korelacja pomiędzy stężeniem OXA w osoczu i BMI w grupach badanej i odniesienia

Fig. 2. The correlation between the plasma concentration of OXA and BMI in the examined group and reference group

nia ($p=0,002$, test t-Studenta). Średnie stężenie GRE całkowitej w osoczu chorych dziewcząt było statystycznie istotnie wyższe niż w grupie odniesienia. U badanych dziewcząt wykazano statystycznie istotną ujemną korelację pomiędzy stężeniem GRE całkowitej w osoczu a BMI ($p=0,0015$; $R= -0,4597$, korelacja Pearsona).

Rysunek 1 obrazuje wartości stężeń OXA, OXB i GRE całkowitej w grupach badanej i odniesienia. Rysunki 2 i 3 przedstawiają korelację Pearsona pomiędzy stężeniami OXA i GRE całkowitej w osoczu a wartością BMI w obu grupach.

U pacjentek w podgrupie B1 (z postacią restrykcyjną AN) średnie stężenie OXA w osoczu wynosiło 33,30 pg/ml (mediana=32,85; SEM=4,6), OXB – 34,69 pg/ml (mediana=22,75; SEM=9,41), GRE całkowitej – 7185 pg/ml (SEM=572,4) i średnia wartość stężenia glukozy w osoczu – 74,3 mg/dl (mediana=76,7; SEM=2,7).

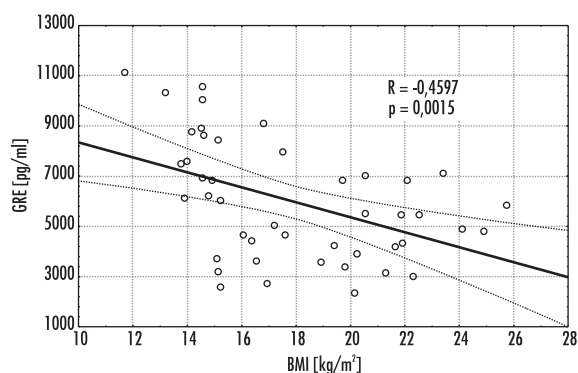
U chorych z podgrupy B2 (postać bulimiczno-wydalająca) średnie stężenie OXA w osoczu wynosiło 36,26 pg/ml (mediana=20,8; SEM=15,3), OXB – 27,82 pg/ml (mediana=29; SEM=7,45), GRE całkowitej – 5597 pg/ml (SEM=1141,6) i średnia wartość stężenia glukozy w osoczu – 69,3 mg/dl (mediana=65; SEM=4,71). Rysunek 4 obrazuje wartości wybranych parametrów i ich wzajemne zależności w podgrupie B1 i B2. Porównując podgrupy chorych B1 i B2, wykazano statystycznie istotną różnicę pomiędzy nimi pod względem czasu trwania choroby ($p=0,0486$, test U-Manna-Whitneya). Pacjentki z podgrupy B2 chorowały prawie dwukrotnie dłużej na AN niż pacjentki w podgrupie B1. Dziewczęta z podgrupy B1 miały statystycznie istotnie niższe wartości BMI niż pacjentki w podgrupie B2 ($p=0,0132$, test U-Manna-Whitneya). Porównując podgrupę B1 z grupą odniesienia, stwierdzono, że były one niejednorodne pod względem wieku ($p=0,0127$, test t-Studenta), wartości BMI ($p<0,001$, test U-Manna-Whitneya), stężenia OXA ($p<0,0231$, test U-Manna-Whitneya) oraz stężenia GRE

total GRE in plasma was found between the examined and reference groups ($p=0.002$, Student's t-test). The average concentration of total GRE in the plasma of diseased girls was statistically significantly higher, as compared to the reference group. The examined girls exhibited a statistically significant negative correlation between the total GRE concentration in plasma and BMI ($p=0.0015$; $R= -0.4597$, Pearson correlation).

Figure 1 presents the values of the concentrations of OXA, OXB and total GRE in the examined group and reference group. Figures 2 and 3 present the Pearson correlation between the concentrations of OXA and total GRE in plasma and the BMI value in both groups.

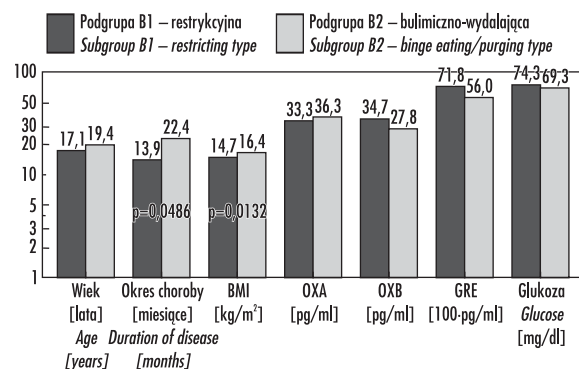
In the patients of subgroup B1 (with restricting type of AN) the average concentration of OXA in plasma reached 33.30 pg/ml (Median=32.85; SEM=4.6), OXB – 34.69 pg/ml (Median=22.75; SEM=9.41), total GRE – 7185 pg/ml (SEM=572.4) and average value of glucose concentration in plasma – 74.3 mg/dl (Median=76.7; SEM=2.7).

The patients in subgroup B2 (binge-eating/purging type) the average concentration of OXA in plasma reached 36.26 pg/ml (Median=20.8; SEM=15.3), OXB – 27.82 pg/ml (Median=29; SEM=7.45), total GRE – 5597 pg/ml (SEM=1141.6) and average value of glucose concentration in plasma – 69.3 mg/dl (Median=65; SEM=4.71). Figure 4 presents the values of selected parameters and their correlations in subgroups B1 and B2. Comparing the subgroups of patients B1 and B2 a statistically significant difference was found between them in respect of the duration of the disease ($p=0.0486$, U-Mann-Whitney test). The subgroup B2 patients were affected by AN almost twice as long as those in subgroup B1. The girls from subgroup B1 had statistically significantly lower BMI values than the patients in subgroup B2 ($p=0.0132$, U-Mann-Whitney test). A compar-



Rys. 3. Korelacja pomiędzy stężeniem GRE w osoczu i BMI w grupach badanej i odniesienia

Fig. 3. The correlation between the plasma concentration of GRE and BMI in the examined group and reference group



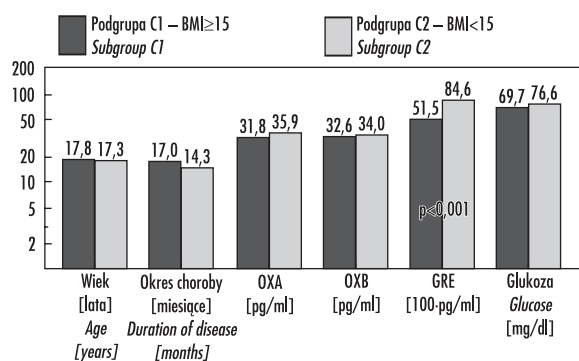
Rys. 4. Wartości wybranych parametrów w osoczu chorych z AN z postaciami choroby: restrykcyjną (podgrupa B1) i bulimiczno-wydalającą (podgrupa B2)

Fig. 4. Values of selected parameters in the plasma of AN patients – with restricting type (subgroup B1) and binge eating/purging type (subgroup B2)

całkowitej ($p=0,0010$, test t-Studenta). Dziewczeta chorujące na postać restrykcyjną AN były młodsze w porównaniu ze zdrowymi, ich stężenie OXA w osoczu było statystycznie istotnie niższe, a GRE – statystycznie istotnie wyższe od wartości tych parametrów w osoczu dziewcząt z grupy odniesienia. Natomiast w przypadku porównania podgrupy B2 z grupą odniesienia stwierdzono jedynie niejednorodność grup pod względem BMI ($p<0,001$, test U-Manna-Whitneya). Dziewczeta z postacią bulimiczno-wydalającą AN miały statystycznie istotnie niższy BMI niż te w grupie odniesienia.

Średnie stężenie OXA w osoczu w podgrupie C1 ($BMI \geq 15 \text{ kg/m}^2$) wynosiło $31,77 \text{ pg/ml}$ (mediana= $18,1$; SEM= $7,97$), OXB – $32,55 \text{ pg/ml}$ (mediana= $26,6$; SEM= $10,51$), GRE całkowitej – $5145,33 \text{ pg/ml}$ (SEM= $657,3$). W podgrupie C2 ($BMI < 15 \text{ kg/m}^2$) średnie stężenie OXA w osoczu wynosiło $35,85 \text{ pg/ml}$ (mediana= $34,4$; SEM= $5,24$), OXB – $34,02 \text{ pg/ml}$ (mediana= $21,3$; SEM= $11,43$), GRE całkowitej – $8457,08 \text{ pg/ml}$ (SEM= $474,7$). Porównując podgrupę C1 z podgrupą C2 wykazano statystycznie istotną różnicę w stężeniu GRE całkowitej ($p<0,001$, test t-Studenta). W podgrupie C2 ($BMI < 15 \text{ kg/m}^2$) średnia wartość GRE całkowitej była o ponad 1/3 wyższa niż w podgrupie C1 ($BMI \geq 15 \text{ kg/m}^2$). Wzajemne zależności wybranych parametrów przedstawia rysunek 5. Porównując podgrupy C1 i C2 z grupą odniesienia stwierdzono bardzo dużą różnicę statystycznie istotną w stężeniu GRE całkowitej pomiędzy podgrupą C2 ($BMI < 15 \text{ kg/m}^2$) a grupą odniesienia. Średnie stężenie GRE całkowitej w podgrupie C2 było prawie dwukrotnie wyższe niż w grupie odniesienia ($p<0,001$, test t-Studenta).

Dokonując podziału grupy badanej na dwie podgrupy w zależności od wartości stężenia glukozy w osoczu na D1 (stężenie glukozy $\geq 70 \text{ mg/dl}$) i D2 (stężenie glukozy $< 70 \text{ mg/dl}$) i następnie porównując je między sobą, nie uzyskano statystycznie istotnych różnic w zakresie porów-

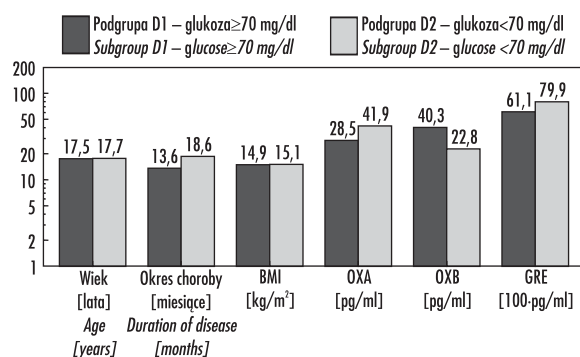


Rys. 5. Wartości wybranych parametrów w osoczu chorych z AN w podgrupach C1 ($BMI \geq 15$) i C2 ($BMI < 15$)

Fig. 5. Values of selected parameters in the plasma of AN patients in subgroups: C1 ($BMI \geq 15$) and C2 ($BMI < 15$)

ison of subgroup B1 with the reference group revealed that these groups were heterogenous in view of age ($p=0,0127$, Student's t-test), BMI values ($p<0,001$, U-Mann-Whitney test), OXA concentrations ($p<0,0231$, test U-Mann-Whitney) as well as total GRE concentrations ($p=0,0010$, Student's t-test). The girls with restricting type of AN were younger than the healthy subjects, their OXA concentration in plasma was statistically lower, whereas GRE – statistically higher than the value of these parameters in plasma of the reference group girls. On the other hand in case of a comparison of subgroup B2 with the reference group only heterogeneity of groups relating to BMI ($p<0,001$, U-Mann-Whitney test) was confirmed. In the girls with AN of the binge eating/purging type the BMI was statistically significantly lower than in those from the reference group.

The average concentration of OXA in plasma of subgroup C1 ($BMI \geq 15 \text{ kg/m}^2$) reached $31,77 \text{ pg/ml}$ (Median= $18,1$; SEM= $7,97$), OXB – $32,55 \text{ pg/ml}$ (Median= $26,6$; SEM= $10,51$), total GRE – $5145,33 \text{ pg/ml}$ (SEM= $657,3$). In subgroup C2 ($BMI < 15 \text{ kg/m}^2$) the average concentration of OXA in plasma amounted to $35,85 \text{ pg/ml}$ (Median= $34,4$; SEM= $5,24$), OXB – $34,02 \text{ pg/ml}$ (Median= $21,3$; SEM= $11,43$), total GRE – $8457,08 \text{ pg/ml}$ (SEM= $474,7$). A comparison of subgroup C1 with subgroup C2 exhibited a statistically significant difference in total GRE concentration ($p<0,001$, Student's t-test). In subgroup C2 ($BMI < 15 \text{ kg/m}^2$) the average value of total GRE was by over 1/3 higher than in subgroup C1 ($BMI \geq 15 \text{ kg/m}^2$). The correlations between the selected parameters are presented in Figure 5. A comparison of subgroups C1 and C2 with the reference group indicated a very significant difference in total GRE concentration between subgroup C2 ($BMI < 15 \text{ kg/m}^2$) and reference group. The average concentration of total GRE



Rys. 6. Wartości wybranych parametrów w osoczu chorych z AN w podgrupach: D1 (stężenie glukozy $\geq 70 \text{ mg/dl}$) i D2 (stężenie glukozy $< 70 \text{ mg/dl}$)

Fig. 6. Values of selected parameters in the plasma of AN patients in subgroups: D1 (glucose concentration $\geq 70 \text{ mg/dl}$) and D2 (concentration of glucose $< 70 \text{ mg/dl}$)

nywalnych parametrów pomiędzy podgrupami C1 i C2. Niemniej jednak stwierdzono, że w podgrupie D2 średnie stężenie GRE całkowitej w osoczu było o około 1/4 wyższe (7996,8 pg/ml) niż u pacjentek z prawidłowym stężeniem glukozy w osoczu, D1, (6114,5 pg/ml). Rysunek 6 obrazuje średnie stężenia wybranych parametrów.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Oreksyny A i B to peptydy stymulujące łaknienie i syntetyzowane w wysoce specjalistycznych neuronach podwzgórza bocznego i tylnego w OUN. Jest to obszar mózgu odpowiedzialny za zachowanie związane z jedzeniem. Znane są doniesienia, iż OXA już w okresie płodowym wpływa na dojrzewanie i wzrost przewodów pokarmowego⁽⁹⁾. W literaturze przedmiotu są prace informujące o roli oreksyn w mechanizmie głodu i sytości lub homeostazy ustrojowej głównie na modelu zwierzęcym^(1-4,6,7,9,13-15). Arihara i wsp. (2001) po raz pierwszy wykazali obecność OXA w osoczu u ludzi i oznaczyli stężenie tego peptydu u 17 zdrowych japońskich ochotników. Stężenie OXA było oznaczane metodą RIA w godzinach rannych i nocnych. U 9 kobiet (na 17 badanych) nie było znamiennej różnicy w stężeniu OXA oznaczonej rano i w nocy. Stężenie OXA w osoczu wynosiło $1,94 \pm 0,24$ pmol/l⁽²³⁾. U 20 zdrowych polskich ochotniczek średnie stężenie OXA w osoczu oznaczonej jednokrotnie rano na czczo wynosiło 75,99 pg/ml.

W badaniu przeprowadzonym u 25 polskich dziewcząt chorujących na AN średnie stężenie OXA w osoczu wynosiło 33,89 pg/ml i wykazywało statystycznie istotną dodatnią korelację z BMI ($p=0,0125$, korelacja Pearsona). Niskie stężenie OXA w osoczu odpowiadało niskiej wartości BMI. Adam i wsp. (2002) oznaczyli stężenie OXA u ludzi otyłych i wykazali, że w tej grupie stężenie OXA koreluje ujemnie BMI. U ludzi otyłych (wysoki BMI) stężenie OXA w osoczu jest niskie. Na podstawie przeprowadzonych badań autorzy sugerują, że OXA bierze udział w regulacji energetycznej ustroju⁽²⁴⁾.

Po dokonaniu podziału badanych chorych na dwie podgrupy w zależności od wartości BMI na C1 – $n=12$ ($BMI \geq 15 \text{ kg/m}^2$) i C2 – $n=13$ ($BMI < 15 \text{ kg/m}^2$) nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w stężeniu OXA w osoczu pomiędzy nimi. Podobnie nie wykazano statystycznie istotnych różnic przy porównaniu stężeń OXA, biorąc jako kryterium podziału stężenie glukozy w osoczu ($> 70 \text{ mg/dl}$ i $< 70 \text{ mg/dl}$). W przeprowadzonym badaniu stężenie OXB w osoczu nie różniło się istotnie statystycznie w grupach badanej i odniesienia w podziale na podgrupy pod względem wartości BMI, stężenia glukozy i postaci AN.

Cai i wsp. (2002) sugerują, że neurony produkujące OXA są stymulowane przez obniżone stężenie glukozy i jednocześnie hamowane przez sygnały dochodzące z przewodów pokarmowych⁽²⁾. Inne eksperymentalne badania dowodzą występowania zależności pomiędzy neuronami

in subgroup C2 was almost twice higher than in the reference group ($p < 0.001$, Student's t-test).

The division of the examined group into two subgroups depending on the plasma concentration of glucose, i.e. into D1 (glucose concentration $\geq 70 \text{ mg/dl}$) or D2 (glucose concentration $< 70 \text{ mg/dl}$), and then the comparison of these two, did not indicate any statistically significant differences within the comparable parameters between subgroups C1 and C2. It was found out, however, that in subgroup D2 the average concentration of total GRE in plasma was by approx. 1/4 higher (7996.8 pg/ml), as compared to the patients with normal plasma concentration of glucose, D1 (6114.5 pg/ml). Figure 6 illustrates the average concentrations of selected parameters.

DISCUSSION OF RESULTS

Orexins A and B are appetite stimulating peptides, which are synthesized in highly specialistic neurons of lateral and posterior hypothalamus in the CNS. This is the brain area responsible for the eating-related behaviour. According to some reports, OXA as early as in the foetal period affects the maturation and growth of alimentary tract⁽⁹⁾. The relevant literature contains articles informing about the role of orexins in the mechanism of hunger and satiety or systemic homeostasis, mainly on the animal model^(1-4,6,7,9,13-15). Arihara et al. (2001) were the first to indicate the presence of OXA in human plasma and determined the concentration of this peptide in 17 healthy Japanese volunteers. The concentration of OXA was determined with RIA method in the morning and at night. In 9 women (of 17 examined) no statistically significant difference was found in the concentration of OXA determined in the morning and at night. The concentration of OXA in plasma amounted to 1.94 ± 0.24 pmol/l⁽²³⁾. In 20 Polish healthy volunteers the average concentration of OXA in plasma determined once in the morning, on empty stomach, amounted to 75.99 pg/ml.

In the study carried out in 25 Polish girls with AN the average concentration of OXA in plasma reached 33.89 pg/ml and exhibited a statistically significant positive correlation with BMI ($p=0.0125$, Pearson correlation). A low concentration of OXA in plasma corresponded to a low value of BMI. Adam et al. (2002) determined the concentration of OXA in obese subjects and indicated that in that examined group the concentration of OXA correlated negatively with BMI. In obese people (high BMI) the concentration of OXA in plasma is low. Basing on the performed studies the authors suggest that OXA participates in the organism's energy regulation⁽²⁴⁾.

Having divided the patients into two subgroups depending on the BMI value: subgroup C1 – $n=12$ ($BMI \geq 15 \text{ kg/m}^2$) and subgroup C2 – $n=13$ ($BMI < 15 \text{ kg/m}^2$), no statistically significant difference was indicated in OXA concentration in plasma between the patients subgroups C1 and C2. Similarly, no statistically significant

wytwarzającymi oreksyny a aktywnością neuronalną w komórkach nerwowych przewodu pokarmowego. Po wszechnie wiadomo, że komórki te odgrywają rolę w zachowaniu lub/i neuroendokrynnej odpowiedzi na hipoglikemię. Neurony produkujące OXA mogą zawiadywać pobieraniem pokarmu w sposób krótkotrwały, tzn. prawdopodobnie by rozpocząć pobieranie pokarmu w odpowiedzi na pobudzenie. Jednym ze stymulatorów tego działania jest spadek stężenia glukozy we krwi. OXA stymuluje łaknienie, czyli powoduje wzrost spożycia pokarmu poprzez działanie na neurony podwzgórza zależne od stężenia glukozy, a hipoglikemia nasila spożycie pokarmu^(2,13,14). Jednocześnie poczyniono obserwację, że OXA powoduje wzrost prędkości metabolizmu. Fakt ten sugeruje, że OXA raczej może mieć wpływ na kontrolę energetyczną w organizmie, a poprzez ten mechanizm również długoterminowo na regulację spożywania pokarmu. Ostatnio prowadzone badania wskazują, że OXA reguluje także stan czuwania-sen i być może okaże się, iż jest markerem biochemicznym narkolepsji⁽¹²⁾.

Rola OXB w organizmie nie jest do końca jasna. Przeprowadzone badania na modelu zwierzęcym przez Jones i wsp. (2001) sugerują, że OXB jest raczej odpowiedzialna za aktywność ruchową w miejscach dobrze znanych lub nowych⁽³⁾. OXB nie ma prawie zupełnie lub wcale wpływu na zachowania związane z jedzeniem. Odpowiedzialna jest natomiast wyłącznie za hipertermię organizmu, której nie towarzyszy brak łaknienia⁽⁹⁾. Powoduje zachowania zwierząt typu: iskanie się, obwąchiwanie, czyli zwiększa ich ruchliwość, która ma prowadzić do obniżenia temperatury. Zachowanie takie interpretowane jest także jako „adaptacyjne”, a nie związane z poszukiwaniem pokarmu. Wydaje się, iż OXB poza wpływem na temperaturę ciała nie ma istotnego znaczenia w regulacji równowagi energetycznej⁽³⁾. Trzytygodniowy okres głodzenia szczura powoduje wzrost aktywności jedynie neuronów produkujących OXA⁽⁴⁾. W dostępnej literaturze jest niewiele prac dotyczących roli oreksyn w jadłowstręciu psychicznym, a wyniki przedstawione w niniejszym doniesieniu dotyczą populacji dziewcząt chorujących na AN. W anoreksji psychicznej dochodzi do drastycznego zmniejszenia masy ciała. Pobranie krwi w celu oznaczenia wybranych parametrów w niniejszym badaniu miało miejsce w godzinach rannych na czczo, po 8-godzinym poście. Na tej podstawie należy sądzić, iż doszło do zablokowania ośrodka sytości i inhibitorów łaknienia, a uaktywnienia ośrodka głodu i aktywacji stymulatorów łaknienia. Równocześnie należy rozważyć koncepcję Inui (2001), że w AN ma miejsce „mieszany” sygnał głodu i sytości sprzyjający ambiwalentemu stosunkowi do jedzenia⁽²⁵⁾. Brak równowagi pomiędzy sygnałami oreksygenicznymi a anoreksygenicznymi może być odpowiedzialny za postać bulimiczną tego zaburzenia. Analizując stężenia OXA, OXB, GRE i glukozy u chorych z postacią restrykcyjną AN (podgrupa B1) i bulimiczno-wydalającą (podgrupa B2),

differences were found in the comparison of OXA concentrations when the division criterion was the plasma concentration of glucose (>70 mg/dl and <70 mg/dl). In the performed study the plasma concentration of OXB did not statistically significantly differ between the examined and reference groups in the division into subgroups in view of BMI, glucose concentration and AN type.

Cai et al. (2002) suggest that neurons producing OXA are stimulated by the decreased concentration of glucose and simultaneously inhibited by the signals coming from alimentary tract⁽²⁾. Other experimental studies demonstrate a correlation between neurons which produce orexins and neuronal activity in the nervous cells of alimentary tract. Admittedly, these cells play a role in the behaviour or/and neuroendocrine response to hypoglycaemia. Neurons producing OXA may control food intake in a short-lasting manner, i.e. probably to start the food intake in response to stimulation. One of the stimulators of such action is a decrease in glucose concentration in blood. OXA stimulates appetite, i.e. causes an increase in the food intake by affecting hypothalamic neurons dependent on glucose concentration, while hypoglycaemia enhances the food consumption^(2,13,14). At the same time OXA was observed to have caused an increase in the rate of metabolism. This fact suggests that OXA may affect the energy control in the organism and owing to this mechanism also – in the long run – regulation of the food consumption. Recent studies indicate that OXA regulates also the wakefulness-sleep status and it may appear to be a biochemical marker of narcolepsy⁽¹²⁾.

The role of OXB in the organism is not quite clear as yet. The studies carried out on the animal model by Jones et al. (2001) suggest that OXB is rather responsible for the motor activity in well known or new places⁽³⁾. OXB does not at all affect or very little affects the eating-related behaviours. On the other hand it is completely responsible for the organism's hyperthermia which is not accompanied by the lack of appetite⁽⁹⁾. It causes such behaviours in animals as grooming or sniffing each other, thus it increases their mobility which is supposed to decrease the temperature; such behaviour is interpreted as “adaptational” and is not connected with searching for food. It seems that OXB apart from affecting the body temperature does not play any significant role in regulation of energy balance⁽³⁾. The three-week period of the rat's starvation increases only the activity of neurons which produce OXA⁽⁴⁾. Available literature contains few articles on the role of orexins in anorexia nervosa, and the results presented in this article refer to the population of AN girls. In mental anorexia the body mass is drastically reduced. The blood for determining the selected parameters was drawn in the morning, on empty stomach, after 8 hrs fast. Basing on this, we can surmise that the satiety centre and appetite inhibitors were blocked, simultaneously the hunger centre and appetite stimulators were activated. At the same time the concept of

nie wykazano różnic statystycznie istotnych w zakresie tych parametrów pomiędzy podgrupami. Należy jednak zaznaczyć, iż podgrupę B1 reprezentowało 20 dziewcząt, a B2 jedynie 5 chorych. Niskie średnie stężenie OXA u chorych z AN obserwowane w niniejszym badaniu być może podyktowane jest faktem, iż pacjentki te miały za wysokie stężenie glukozy w osoczu na czczo, aby mogła być zwiększona produkcja OXA. Jednocześnie widać (rys. 6), że przy niskim stężeniu glukozy w osoczu obserwuje się wyższe stężenie OXA, pomimo braku statystycznie istotnej różnicy w porównaniu stężenia glukozy i stężenia OXA. Otrzymane wyniki są zgodne z hipotezami innych autorów, że stężenie OXA rośnie wraz z narastającą hipoglikemią^(13,14,24), ale zagadnienie to wymaga jeszcze wyjaśnienia.

U chorych na AN średnie stężenie GRE całkowitej w osoczu wynosiło 6867 pg/ml i stwierdzono statystycznie istotną ujemną korelację pomiędzy stężeniem GRE a wartością BMI. Im niższa wartość BMI, tym wyższe stężenie GRE w osoczu. Wynik ten jest zgodny z doniesieniami innych autorów⁽²⁶⁻²⁸⁾.

Grelina to endogenny ligand dla hormonu wzrostu (GH), który działa poprzez receptor GH-R. Peptyd ten, pomimo iż powstaje na obwodzie (produkowany jest przez komórki okładzinowe żołądka), działa również w OUN. Jego działanie obwodowe polega na hamowaniu uwalniania gastryny w okresie głodu (przy pustym żołądku). Pośrednie ośrodkowe działanie GRE to stymulacja sekrecji GH w przysadce mózgowej, stymulacja spożycia pokarmu w mechanizmie działania zależnym od rodzaju spożytego pokarmu⁽⁵⁾. W badaniach na zwierzętach nie wykryto GRE u płodów szczurzych. Jej aktywność pojawia się dopiero od 7. dnia, a największe stężenie osiąga w 22. dobie po urodzeniu. W związku z tym faktem rodzi się hipoteza, iż GRE jest peptydem odpowiedzialnym za rozwój organizmu poprzez wzrost spożycia pokarmu, a tym samym również wzrost BMI. To zadanie GRE spełnia przez stymulację sekrecji hormonu wzrostu, insuliny i gastryny, zatem ma ona wpływ na metabolizm^(5,27,28). Rodzaj spożytego pokarmu nie jest bez wpływu na stężenie GRE w osoczu – dieta ubogobiałkowa powoduje wzrost sekrecji tego peptydu, a wysokotłuszczowa skutkuje jej obniżeniem. Równocześnie wiadomo, że codzienne regularne podawanie GRE przyczynia się do wzrostu masy ciała w mechanizmie redukcji, czyli zmniejszenia spalania tłuszczu. U pacjentów z AN obserwuje się wzrost podstawowego poziomu GH. Wiadomo, że głodzenie stymuluje uwalnianie GRE, a ona stymuluje uwalnianie GH. Nie jest zupełnie jasne, czy niedożywienie, czy wręcz głodzenie, aktywuje ten system⁽²⁶⁾.

W niniejszym doniesieniu w prezentowanym badaniu zostały wzięte pod uwagę jedynie trzy peptydy oreksygeniczne – OXA, OXB i GRE. Należą one do grupy peptydów stymulujących łaknienie i stoją na straży homeostazy organizmu. Każdy z tych peptydów swoje zadanie realizuje w nieco odmienny sposób. Wydzielanie OXA

Inui should be considered (2001), according to which in AN a “mixed” signal of hunger and satiety occurs, which supports the ambivalent attitude to eating⁽²⁵⁾. The lack of the balance between orexigenic and anorexigenic signals may be responsible for the binge eating type of this disorder. Analysis of the concentrations of OXA, OXB, GRE and glucose in patients with restricting type of AN (subgroup B1) and binge eating/purging type (subgroup B2), did not exhibit any statistically significant differences within these parameters between the subgroups. Yet it should be taken into account that subgroup B1 was represented by 20 girls, whereas B2 only by 5 patients. The low average concentration of OXA in AN patients observed in this study could result from the fact that these patients exhibited too high a plasma concentration of glucose on empty stomach, therefore OXA production could not be increased. At the same time it can be seen (fig. 6) that with low plasma concentration of glucose the concentration of OXA is higher, despite the lack of a statistically significant difference in the comparison of the concentrations of glucose and OXA. The obtained results are consistent with the other authors’ hypotheses according to which the concentration of OXA increases with increasing hypoglycaemia^(13,14,24), but this issue needs some further clarification.

In AN patients the total GRE concentration in plasma amounted to 6867 pg/ml and a statistically significant negative correlation was found between GRE concentration and BMI value. The lower the BMI value, the higher the concentration of GRE in plasma. This result is consistent with the other authors’ results⁽²⁶⁻²⁸⁾.

Ghrelin is an endogenous ligand for the growth hormone (GH) which acts through receptor GH-R. Although this peptide occurs on circumference (it is produced by the parietal cells) it is also functioning in the CNS. Its peripheral effects consist in inhibition of gastrin release during hunger (with empty stomach). Indirect peripheral effects of GRE consist in GH secretion stimulation in the pituitary gland, the food intake stimulation in the mechanism of action dependent on the type of the consumed food⁽⁵⁾. In studies on animals GRE was not found in rats’ foetuses. Its activity occurs no sooner than on the 7th day, whereas the highest concentration is reached on the 22nd day after birth. This gives rise to the hypothesis that GRE is a peptide responsible for the organism’s development through an increased intake of food, and thus also the BMI increase. GRE fulfils this task through stimulation of the secretion of the growth hormone, insulin and gastrin, thus it affects the metabolism^(5,27,28). The type of the consumed food affects the plasma concentration of GRE – a low protein diet causes an increase in the secretion of this peptide, whereas the high fat diet causes its reduction. At the same time we know that regular everyday administering of GRE causes an increase in the body mass in the mechanism of reduction, i.e. decrease of fat metabolism. In AN patients an increase of the basic level

ma ścisły związek ze stężeniem glukozy w ustroju. OXA pełni funkcję stymulatora łaknienia bezpośrednio po okresie głodzenia. Równocześnie peptyd ten, wywołując krótkotrwale hipotermię, zwiększa pobieranie pokarmu, natomiast długoterminowo prowadzi do hipertermii. Należy sobie zatem zadać pytanie, czy pobieranie pokarmu i termoregulacja są zjawiskami współistniejącymi czy raczej składową integrującego układu regulacyjnego, którego działanie może być częścią fizjologicznych odpowiedzi mających na celu zmiany adaptacyjne organizmu. Model taki może integrować zarówno procesy anaboliczne i gromadzenie zapasów energetycznych (kierunek wzmagający pobieranie pokarmu i osłabiający nasilenie metabolizmu, a w konsekwencji zmniejszający temperaturę i przez to utratę ciepła), jak i kataboliczne, np. spadek zawartości substancji energetycznych (stan sytości z wysokim współczynnikiem metabolicznym i temperaturą ciała).

OXB reguluje gospodarkę energetyczną organizmu najprawdopodobniej przez kontrolę termoregulacji. Obniża hipertermię organizmu poprzez wpływ na motorykę (zwiększa ruchliwość i swoiste zachowania u zwierząt). Nie ma bezpośredniego wpływu na stymulację łaknienia^(3,9).

GRE jest potężnym stymulatorem łaknienia, działa głównie w żołądku i w okresie głodu hamuje uwalnianie gastryny, jak również pobudza sekrecję GH.

Można zadać sobie pytanie: dlaczego w prezentowanym badaniu stężenie GRE u chorych na AN istotnie wzrasta, a OXA istotnie maleje w osoczu w porównaniu z grupą odniesienia?

Jedną z hipotez może być ta, która sugeruje, że GRE jako silny stymulator łaknienia, biorąc udział w mechanizmie związanym z adipocytami w ostrym niedożywieniu bądź głodzeniu, stoi na straży redukcji ich ilości, działa również w mechanizmie wzajemnej zależności glukoza-insulina na zasadzie sprzężenia zwrotnego z leptyną. OXA działa głównie w mechanizmie stężenia glukozy w organizmie. Jak zauważono powyżej, być może chore objęte badaniem miały za wysokie stężenie glukozy w osoczu, aby zablokować wydzielanie insuliny. Wzajemna integracja czynników oreksy- i anoreksygeniczných w AN nadal pozostaje w sferze spekulacji i hipotez. Prezentowane jednorazowo wykonane stężenie wybranych peptydów oreksygeniczných w AN mogą przyczynić się do zrozumienia wzajemnych zależności czynników biologicznych biorących udział w powstawaniu AN. Temat ten pozostaje jednak nadal otwarty i wymaga dalszych badań.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki w prezentowanym doniesieniu sugerują następujące wnioski:

1. U chorych z jadłowstrętem psychicznym (głównie z jego postacią restrykcyjną) spośród trzech analizowa-

of GH is observed. Hunger is known to stimulate the release of GRE, which in turn stimulates the release of GH. We do not quite know as yet whether or not the hunger activates this system^(2,6).

This study involves only three orexigenic peptides: OXA, OXB and GRE. They belong to the group of appetite stimulating peptides and thus control the organism's homeostasis. Each of these peptides accomplishes its task in a bit different way. The secretion of OXA is strictly correlated with glucose concentration in the organism. OXA acts as a stimulator of appetite immediately after starvation. At the same time this peptide, inducing a short-term hypothermia, increases the food intake, while in the long run it causes hyperthermia. Therefore the question should be asked whether the food intake and thermoregulation are concomitant phenomena or rather a part of an integrating regulatory system whose effects may be a part of physiological responses aimed at adaptational changes in the organism. Such model may integrate both anabolic processes and storage of energy reserves (the trend which enhances the food intake and decreases the metabolism, and consequently decreases the temperature and thus is also responsible for the loss of heat) and catabolic processes – e.g. a decrease in the content of energy substances (satiety status with a high metabolic coefficient and body temperature).

OXB regulates the organism's energy balance most probably mainly by the control of thermoregulation. It decreases the organism's hyperthermia by affecting its motor activity (it increases the animals' mobility and specific behaviours). It does not directly affect the appetite stimulation^(3,9).

GRE is a very strong stimulator of appetite, it acts mainly in the stomach and inhibits, during hunger, the release of gastrin, and stimulates GH secretion.

We could ask the question: why in the presented study the GRE concentration in AN patients significantly increases, while OXA significantly decreases in plasma, as compared to the reference group?

One of the hypotheses may be the one, which suggests, that GRE as a strong stimulator of appetite, acting in the mechanism connected with adipocytes in acute malnutrition or starvation controls the reduction of their amount, and acts in the mechanism of glucose-insulin interaction through a feedback with leptin. OXA acts mainly in the mechanism of glucose concentration in the organism. As I have written above, perhaps the patients involved into the study exhibited too high plasma concentration of glucose to be able to inhibit the insulin secretion. The integration of orexi- and anorexigenic factors in AN still remains in the sphere of speculations and hypotheses. The presented singly determined concentration of selected orexigenic peptides in AN may contribute to the comprehension of biological interactions contributing to AN occurrence. However, this is still an open subject, requiring further research.

nych peptydów oreksygeniczných: OXA, OXB i GRE – jedynie dwa z nich: OXA i GRE istotnie zmieniają swoje stężenie w osoczu w ostrej fazie choroby.

2. Stężenie OXA w osoczu jest statystycznie istotnie niższe, a stężenie GRE całkowitej jest statystycznie istotnie wyższe w porównaniu z grupą odniesienia.

PISMIENICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. Beuckmann-Carsten T., Yanagisawa M.: Orexins: from neuropeptides to energy homeostasis and sleep/wake regulation. *J. Mol. Med.* 2002; 80: 329-342.
2. Cai X.J., Liu X.H., Evans M. i wsp.: Orexins and feeding: special occasions or everyday occurrence? *Regul. Pept.* 2002; 104: 1-9.
3. Jones D.N., Gartlon J., Parker F. i wsp.: Effects of centrally administered orexin-B and orexin-A: a role for orexin-1 receptors in orexin-B-induced hyperactivity. *Psychopharmacology* 2001; 153: 210-218.
4. Kurose T., Ueta Y., Yamamoto Y. i wsp.: Effects of restricted feeding on the activity of hypothalamic orexin (OX)-A containing neurons an OX2 receptor mRNA level in the paraventricular nucleus of rats. *Regul. Pept.* 2002; 104: 145-151.
5. Lee H.M., Wang G., Englander E.W. i wsp.: Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine and dietary manipulations. *Endocrinology* 2002; 143: 185-190.
6. Mieda M., Yanagisawa M.: Sleep, feeding and neuropeptides: roles of orexins and orexin receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2002; 12: 339-345.
7. de Miguel M.J., Burrell M.A.: Immunocytochemical detection of orexin A in endocrine cells of the developing mouse gut. *J. Histochem. Cytochem.* 2002; 50: 63-69.
8. Świtońska M.M., Kaczmarek P., Malendowicz L.K., Nowak K.W.: Orexins and adipoinular axis function in the rat. *Regul. Pept.* 2002; 104: 69-73.
9. Szekely M., Petervari E., Balasko M. i wsp.: Effects of orexins on energy balance and thermoregulation. *Regul. Pept.* 2002; 104: 47-53.
10. Wren A.M., Small C.J., Abbott C.R. i wsp.: Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 2001; 50: 2540-2547.
11. Backberg M., Hervieu G., Wilson S., Meister B.: Orexin receptor-1 (OX-R1) immunoreactivity in chemically identified neurons of the hypothalamus: focus on orexin targets involved in control of food and water intake. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 15: 315-328.
12. Willie J.K., Chemelli R.M., Sinton Ch.M., Yanagisawa M.: To eat or to sleep? Orexins in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001; 24: 429-458.
13. Liu X.H., Morris R., Spiller D. i wsp.: Orexin A preferentially excites glucose-sensitive neurons in the lateral hypothalamus of the rat in vitro. *Diabetes* 2001; 50: 2431-2437.
14. Briski K.P., Sylvester P.W.: Hypothalamic orexin-A-immunopositive neurons express Fos in response to central glucopenia. *Neuroreport.* 2001; 12: 531-534.
15. Orlando G., Brunetti L., Di Nisio C. i wsp.: Effects of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide,

CONCLUSIONS

The results obtained in the described study imply the following conclusions:

1. In patients affected by anorexia nervosa (mainly its restricting type), of the three analysed orexigenic peptides, i.e. OXA, OXB, and GRE, only two – OXA and GRE, significantly change their plasma concentration in acute phase of the disease.
2. The plasma concentration of OXA is statistically significantly lower, whereas the total GRE concentration is statistically significantly higher, as compared to the reference group.

- leptin and orexins on hypothalamic serotonin release. *Eur. J. Pharmacol.* 2001; 430: 269-272.
16. Blanco M., Lopez M., Garcia-Caballero T. i wsp.: Cellular localization of orexin receptors in human pituitary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86: 1616-1619.
17. Kojima M., Hosoda H., Date Y. i wsp.: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; 402: 656-660.
18. Murray Ch.D., Kamm M.A., Bloom S.R., Emmanuel A.V.: Ghrelin for the gastroenterologist: history and potential. *Gastroenterology* 2003; 125: 1492-1502.
19. Lazarczyk M.A., Lazarczyk M., Grzela T.: Ghrelin: a recently discovered gut-brain peptide (review). *Int. J. Mol. Med.* 2003; 12: 279-287.
20. Date Y., Ueta Y., Yamashita H. i wsp.: Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 748-753.
21. Broglio F., Arvat E., Benso A. i wsp.: Ghrelin a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86: 5083-5086.
22. Starzomska M.: Z historii psychiatrii: *anorexia nervosa* jako optymalne zachowanie w socjokulturowym kontekście. *Pschiatr. Pol.* 2001; 35: 669-679.
23. Arihara Z., Takahashi K., Murakami O. i wsp.: Immunoreactive orexin-A in human plasma. *Peptides* 2001; 22: 139-142.
24. Adam J.A., Menheere P.P., van Dielen F.M. i wsp.: Decreased plasma orexin-A levels in obese individuals. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2002; 26: 274-276.
25. Inui A.: Eating behavior in anorexia nervosa – an excess of both orexigenic and anorexigenic signalling? *Mol. Psychiatry* 2001; 6: 620-624.
26. Ariyasu H., Takaya K., Tagami T. i wsp.: Stomach is a major source of circulating ghrelin and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001; 86: 4753-4758.
27. Cummings D.E., Purnell J.O., Frayo R.S. i wsp.: A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 2001; 50: 1714-1719.
28. Otto B., Cuntz U., Fruehauf E. i wsp.: Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur. J. Endocrinol.* 2001; 145: 5-9.