

## Jadłowstręt psychiczny w aspekcie mikromacierzy oligonukleotydom – badania własne

### Anorexia nervosa with regard to oligonucleotide microarray technique – own data

Małgorzata Janas-Kozik<sup>1,2</sup>, Irena Krupka-Matuszczyk<sup>1,2</sup>,  
Małgorzata Stachowicz<sup>3</sup>, Urszula Mazurek<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Klinika Psychiatrii i Psychoterapii ŚAM w Katowicach  
Kierownik: **brak kierownika**

<sup>2</sup> Oddział Psychiatrii i Psychoterapii Wieku Rozwojowego – Centrum Pediatrii w Sosnowcu  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. I. Krupka-Matuszczyk

<sup>3</sup> Katedra Biologii Molekularnej w Sosnowcu  
Kierownik: dr hab. n. med. U. Mazurek

#### Summary

**Aim.** The aim of the study was to discover the transcript expression profile of selected genes coding receptors of leptin and orexin A and B by using the oligonucleotide microarray technique (Affymetrix, HG-U133A) in patients who suffered from anorexia nervosa (AN).

**Method.** The peripheral blood of mononuclear cells (PBMC) of four AN patients complying with the ICD-10 and the AN diagnostic criteria DSM IV [14, 15] were analysed. Two patients suffered from the restricting type of AN (AN-R) and two suffered from the binge-eating/purging type of AN (AN-BP). Four patients were our reference group and they did not suffer from eating disorders.

The material used in the assay was the total RNA which was isolated from the PBMC of patients. The total RNA was used to investigate the transcript expression profile of selected genes by using the oligonucleotide microarray technique (Affymetrix, HG-U133A). For six and for eight oligonucleotide microarrays, the accumulation analysis method was used (clustering, Cluster v 3.0) to analyse the results.

**Results.** Hierarchical clustering resulted in separate clusters for patients who suffered from AN-R, AN-BP and patients from the reference group.

**Conclusions.** Taking into consideration the hierarchical clustering for six and for eight oligonucleotide microarray performing different transcript expression profile of selected genes coding orexigenic peptides (OXA and OXB) and anorexigenic peptides (LEP) we suggest that the oligonucleotide microarray method differentiates two type of anorexia nervosa: the restricting type of AN (AN-R) and the binge-eating/purging type (AN-BP).

*Słowa klucze:* jadłowstręt psychiczny, mikromacierz oligonukleotydoma

*Key words:* anorexia nervosa, oligonucleotide microarray

## Wstęp

Technika mikromacierzy oligonukleotydowych dotychczas wykorzystywana była głównie do badania profilu ekspresji genów na poziomie transkryptu w komórkach zmienionych nowotworowo. Metoda ta może być również stosowana do badania profilu ekspresji wyselekcjonowanej puli genów charakterystycznych dla danego typu komórki lub tkanki. Mikromacierze DNA, zwane również czujnikami DNA, zawierają uporządkowaną liczbę sond w postaci jednoniciowego DNA (mikromacierze cDNA) lub oligonukleotydów (mikromacierze oligonukleotydowe) umieszczonych w określonym porządku na nylonowych membranach albo szklanych lub nylonowych płytkach. Za pomocą mikromacierzy cDNA można badać ekspresję genów, dysponując odpowiednimi klonami DNA namnożonymi przez odwrotną transkrypcję i reakcję łańcuchową polimerazy z mRNA izolowanego z komórek [1]. Natomiast mikromacierze oligonukleotydowe (DNA chip) zostały wprowadzone przez firmę Affymetrix produkującą macierze oligonukleotydowe metodą fotolitografii. Dzięki mikromacierzom możliwe jest badanie ekspresji wielu tysięcy genów jednocześnie. Technika mikromacierzy DNA pozwala przede wszystkim na otrzymanie nieporównywalnej z innymi metodami ilości informacji na temat ekspresji genów na poziomie transkryptu. Przedmiotem analizy staje się tutaj obecność transkryptów genów w badanym materiale. Dane uzyskane techniką mikromacierzy informują o ekspresji genów w badanych komórkach – możemy dokonać oceny, czy transkrypcja danego genu przebiegała intensywnie, a więc czy był on aktywny czy też doszło do zahamowania jego ekspresji. Jednym z peptydów anoreksygenicznym jest leptyna (LEP), produkowana głównie przez tkankę tłuszczową. LEP odgrywa ważną rolę w regulacji wydatkowania energii, apetytu, wagi ciała [2]. Odkrycie LEP dostarczyło brakującego ogniwa łączącego funkcjonalnie magazyn energii, jakim jest tkanka tłuszczowa, z ośrodkami w podwzgórzu regulującymi jej ilość dostarczaną do organizmu. Leptyna, oprócz udziału w homeostazie organizmu, wykazuje również współdziałanie z układem autonomicznym [3]. W ludzkim organizmie występuje w dwóch postaciach odgrywających odrębną funkcję: w postaci wolnej i związanej z białkami osocza [4]. Leptyna wolno krążąca w organizmie kontroluje zawartość tkanki tłuszczowej, podczas gdy związana z rozpuszczalną formą receptora – wydatkowanie energii [5].

Receptor leptyny (Ob-R) jest jednym z receptorów rodziny cytokin klasy I. Zidentyfikowano kilka izoform Ob-R, które powstają w wyniku alternatywnego składowania transkryptu [6]. Są to Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd i Ob-Re [7]. Istnieje związek między mutacją w kodującym leptynę genie u myszy oraz u ludzi a występowaniem otyłości. Oreksyny inaczej nazywane hypokretynami są oreksygenicznymi peptydami. Oreksyny A i B (OXA i OXB) zidentyfikowali w mózgu szczura w 1998 r. niezależni badacze – de Lecea i wsp. [8] oraz Sakurai i wsp. [9]. Powstają one przez rozpad wspólnego prekursora – polipeptydu preprooreksyny [10, 11]. Swoją nazwę zawdzięczają greckiemu słowu orexis = apetyt. Głównym miejscem produkcji oreksyn są dwa jądra podwzgórza: jądro okołosklepieniowe (nucleus perifornical = PFN) i jądro grzbietowo-przyśrodkowe (nucleus dorsomedial = DMN). Produkcja oreksyn w tych jądrach ma miejsce nie tylko u płazów, gryzoni, bydła, ale również u ludzi. Z tych jąder włókna oreksynowe mają połączenia z innymi rejonami mózgu: opuszkami węchowymi, korą

mózgu, wzgórzem, podwzgórzem, pniem mózgu i wszystkimi poziomami rdzenia kręgowego. Sakurai i wsp. [9] zidentyfikowali receptory dla oreksyn – odpowiednio receptor OX-R1 i receptor OX-R2, które kodowane są przez dwa odrębne geny [za: 12]. W badaniach, przeprowadzonych głównie na modelu zwierzęcym, stwierdzono, że OXA zwiększa łaknienie [13, 14, 15, 16] i bierze udział w utrzymaniu homeostazy organizmu [13, 14, 15, 16]. OXA zwiększa łaknienie 100 razy silniej niż OXB. Wynika to z faktu, iż OXA działa poprzez receptor OX-R1, stymulując działanie peptydów oreksygeniczných w podwzgórzu [10]. OXA wydaje się odgrywać większą rolę w organizmie, dlatego jest lepiej poznanym peptydem niż OXB łącznie z jej działaniem na poziomie molekularnym.

W utrzymaniu homeostazy organizmu działają mechanizmy obwodowe i ośrodkowe. Peptydy oreksygeniczne, tj. OXA, OXB, i anoreksygeniczny – LEP zaangażowane są w utrzymanie homeostazy ustroju głównie na drodze kontroli łaknienia.

### Material

Materiałem badanym był RNA wyizolowany z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMK) (Total RNA Prep Plus kit, A&A Biotechnology) [17] chorych cierpiących na jadłowstręt psychiczny. Analizie poddano PBMK 4 pacjentek cierpiących na jadłowstręt psychiczny spełniających kryteria klasyfikacji wg ICD-10 i DSM-IV [18, 19]. Dwie z nich cierpiały na postać restrykcyjną AN (AN-R), a dwie na postać bulimiczno-wydalającą AN (AN-BW). Grupę kontrolną stanowiły 4 pacjentki nie chorujące na zaburzenia odżywiania się. Na przeprowadzenie badania została wyrażona zgoda Komisji Bioetycznej przy Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. Zgodę na badanie wyraziły zarówno pacjentki i/lub ich rodzice, bądź prawni opiekunowie, jak i dziewczęta z grupy kontrolnej, w formie pisemnej.

Dane badanych przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Charakterystyka pacjentek uczestniczących w badaniu

Inicjały pacjentek	Wiek	Waga przy przyjęciu na oddział	Diagnoza
Charakterystyka pacjentek cierpiących na AN			
N.P.	17,5	42	AN-BW
N.M.	24	39	AN-R
T.S.	23	39	AN-R
H.P.	21	43	
Charakterystyka pacjentek z grupy kontrolnej			
A.S.	19	60	Schizofrenia paranoidalna
B.K.	14	59	Zaburzenia adaptacyjne
K.W.	20	61	Upośledzenie umysłowe w stopniu lekkim
M.P.	16	46	Zaburzenia adaptacyjne

## Metoda

W prezentowanym badaniu uwzględniono gen kodujący dwie izoformy receptora leptyny (Ob-Ra i Ob-Rb) oraz geny kodujące receptory oreksyn: oreksyny A (OXA) i oreksyny B (OXB). Tabela 2 przedstawia opis poszczególnych transkryptów badanych techniką mikromacierzy oligonukleotydowych HGU-133A. Dane pochodzą z bazy Affymetrix [20].

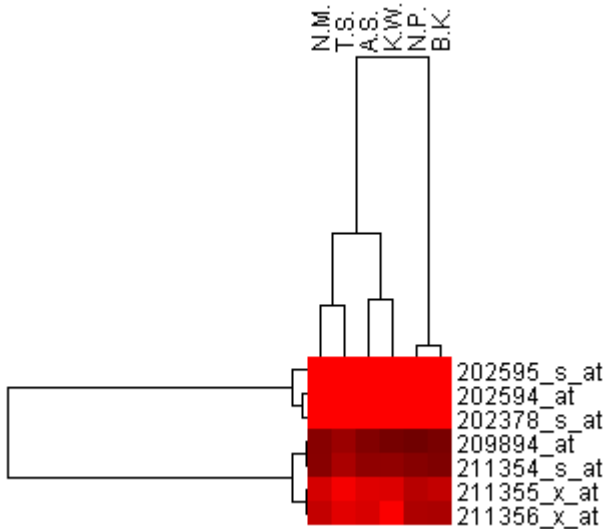
Tabela 2. Charakterystyka poszczególnych transkryptów wziętych do analizy

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol
202378_s_at	LEPROT	leptin receptor overlapping transcript
202594_at	LEPROTL1	leptin receptor overlapping transcript-like 1
202595_s_at	LEPROTL1	leptin receptor overlapping transcript-like 1
207255_at	LEPR	leptin receptor
209894_at	LEPR	leptin receptor
211354_s_at	LEPR	leptin receptor
211355_x_at	LEPR	leptin receptor
211356_x_at	LEPR	leptin receptor
207642_at	HCRT	hypocretin (orexin) neuropeptide precursor
207619_at	HCRTR1	hypocretin (orexin) receptor 1
207393_at	HCRTR2	hypocretin (orexin) receptor 2

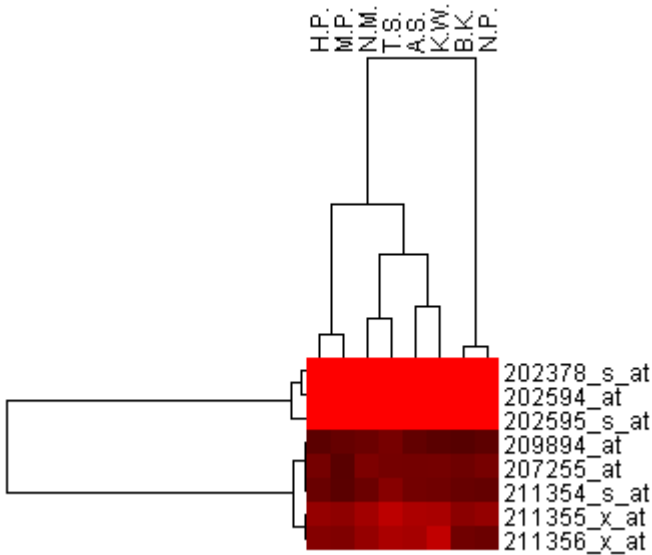
W celu zbadania profilu ekspresji transkryptów dla wybranych genów kodujących peptydy anoreksygeniczne (LEP) i oreksygeniczne (OXA i OXB) u chorych cierpiących na jadłowstręt psychiczny, pobrano od każdej chorej jednorazowo 20 ml krwi pełnej metodą próżniową (vacutainer tubes). Z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) wyizolowano RNA (Total RNA Prep Plus kit, A&A Biotechnology) [17]. Materiał oczyszczano za pomocą RNeasy Total RNA Mini Kit (Qiagen) i trawiono DNazą I. Otrzymany RNA wykorzystano do syntezy dwuniciowego cDNA (Gibco BRL SuperScript Choice system) stanowiącego następnie matrycę do syntezy biotynylowanego cRNA. Wyznakowany cRNA oczyszczono na kolumnach RNeasy Mini Kit (Qiagen), poddano fragmentacji i hybrydyzowano z mikromacierzą testową (Test 3), a następnie z mikromacierzą Human Genome Arrays U133A (Affymetrix). Zhybrydyzowany z mikromacierzą cRNA poddano następnie znakowaniu kompleksem streptawidyna-fikoerytryna. Intensywność fluorescencji analizowano, używając skanera GeneArray Scanner G2500A. Otrzymane wyniki znormalizowano, stosując program RMAExpress, a następnie poddano klasteryzacji hierarchicznej, wykorzystując program Cluster v 3.0., który pozwala na łączenie genów o podobnym profilu ekspresji i tworzeniu z nich grup, tzw. klastrów.

## Wyniki

Wyniki klasteryzacji hierarchicznej dla sześciu mikromacierzy oligonukleotydowych – profil ekspresji transkryptów dla genu kodującego receptor leptyny (LEP) – obrazuje rys.1.



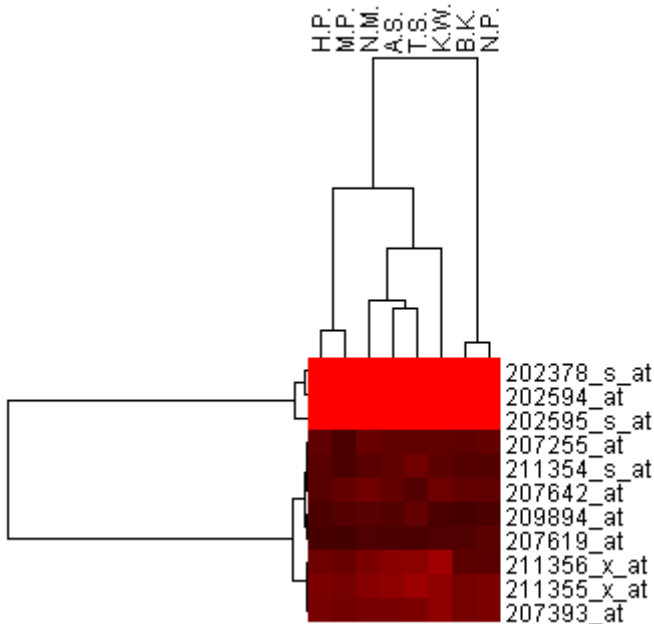
Rys. 1. Wynik klasteryzacji hierarchicznej dla sześciu mikromacierzy oligonukleotydowych – profil ekspresji transkryptów dla genu kodującego receptor leptyny



Rys. 2. Wynik klasteryzacji dla ośmiu mikromacierzy oligonukleotydowych – profil ekspresji transkryptów dla genu kodującego receptor leptyny

Wynik klasteryzacji dla ośmiu mikromacierzy oligonukleotydujących – profil ekspresji transkryptów dla genu kodującego receptor leptyny – przedstawia rys. 2.

Wyniki klasteryzacji hierarchicznej dla ośmiu mikromacierzy oligonukleotydujących – profil ekspresji transkryptów dla genów kodujących receptor leptyny i receptory oreksyn – zobrazowano na rys. 3.



Rys. 3. Wyniki klasteryzacji hierarchicznej dla ośmiu mikromacierzy oligonukleotydujących – profil ekspresji transkryptów dla genów kodujących receptor leptyny i receptory oreksyn

### Omówienie wyników

W przeprowadzonych badaniach zastosowano technikę mikromacierzy oligonukleotydujących (HG-U 133A, Affymetrix) w analizie profilu ekspresji transkryptów genów, których produkty odpowiedzialne są za homeostazę organizmu poprzez kontrolę głodu i sytości. W badaniach brały udział pacjentki cierpiące zarówno na postać restrykcyjną AN (AN-R), jak i postać bulimiczno-wydalającą (AN-BW). Technika mikromacierzy oligonukleotydujących (HG-U133A, Affymetrix) została użyta w celu zbadania profilu ekspresji transkryptów genów kodujących receptory dla leptyny i oreksyn. W początkowych badaniach uwzględniono dwie izoformy receptora leptyny (Ob-Ra i Ob-Rb), dla których sekwencje referencyjne zostały zlokalizowane w bazie National Center for Biotechnology Information (NCBI) [21]. Sekwencje te zostały użyte przez firmę Affymetrix do zaprojektowania sond dla poszczególnych genów na mikromacierzy HG-U133A (Affymetrix), na której znalazło się 7 transkryptów dla genu kodującego receptor LEP. Klasteryzacja hierarchiczna grupuje transkrypty genów o podobnym profilu ekspresji. Wszystkie transkrypty tworzą tzw. „hierarchiczne

drzewko”, w którym transkrypty o podobnym profilu ekspresji zlokalizowane są blisko siebie. Długość „ramion” drzewka ukazuje podobieństwo pomiędzy profilami ekspresji transkryptów badanych genów – im krótsze ramiona, tym większe podobieństwo między badanymi elementami.

Początkowo w badaniach uwzględniono trzy pacjentki cierpiące na AN (2 na AN-R i 1 na AN-BW) i trzy dziewczynki stanowiące grupę kontrolną, dla których zostały wykonane mikromacierze oligonukleotydowe. Zbadano profil ekspresji 7 transkryptów dla genu kodującego receptor leptyny. W wyniku wykonania klasteryzacji hierarchicznej otrzymano trzy grupy stanowiące odrębne klastry (rys. 1). Pacjentki stanowiące I klastery (N.M. i T.S.) cierpiały na AN-R. W II klastrze znajdowały się pacjentki będące grupą kontrolną dla chorych (A.S. i K.W.), które nie cierpiały na zaburzenia odżywiania się. III klastery stanowiły pacjentka z AN-BW (N.P.) i pacjentka z grupy kontrolnej (B.K.), u której nie stwierdzono zaburzeń odżywiania się. Na podstawie otrzymanych wyników można było sądzić, że profil ekspresji transkryptów dla genu kodującego receptor LEP różnicuje dwa typy AN: AN-R i AN-BW [22]. Niemniej jednak zrodziło się pytanie, dlaczego pacjentka B.K., u której nie stwierdzono zaburzeń odżywiania się, znajduje się w jednym klastrze z pacjentką N.P. chorującą na AN-BW? Wynik klasteryzacji hierarchicznej pozwalał przypuszczać, że profil ekspresji transkryptów dla genu kodującego receptor LEP dla obu pacjentek jest podobny. Pacjentka B.K. po kilku miesiącach od zakończenia terapii została po raz drugi przyjęta na Oddział Psychiatrii i Psychoterapii Wieku Rozwojowego Centrum Pediatrii w Sosnowcu z rozpoznaniem postaci bulimiczno-wydalającej jadłowstrętu psychicznego (AN-BW).

Wykonano dodatkowo dwie mikromacierze badając nadal profil ekspresji transkryptów dla genu kodującego różne izoformy receptora LEP dla kolejnych chorych: H.P. cierpiącej na AN-BW, i M.P., u której nie stwierdzono zaburzeń odżywiania się, z grupy kontrolnej. Analiza klasteryzacji hierarchicznej dla ośmiu mikromacierzy oligonukleotydowych wyodrębniła wtedy cztery odrębne klastry (rys.2). Klastery I grupowały pacjentki H.P. z AN-BW i M.P. z grupy kontrolnej. Pacjentki stanowiące II klastery to N.M. i T.S., obydwie cierpiące na AN-R. Klastery III to chore A.S. i K.W. stanowiące grupę kontrolną. W IV klastrze znalazły się pacjentki: B.K. (grupa kontrolna) i N.P. (z AN-BW). Klasteryzacja hierarchiczna dla ośmiu mikromacierzy, podobnie jak dla sześciu mikromacierzy oligonukleotydowych, zgrupowała więc w jednym klastrze pacjentki N.P. i B.K., co pozwoliło przypuszczać, że zmiany na poziomie molekularnym mogą wystąpić wcześniej niż kliniczne symptomy AN. Należy jednak pamiętać, że również inne czynniki, tj.: rodzinne, środowiskowe oraz osobowościowe, wpływają na obraz kliniczny choroby.

W kolejnym badaniu dokonano klasteryzacji hierarchicznej dla ośmiu mikromacierzy oligonukleotydowych (HG-U133A, Affymetrix), badając profil ekspresji transkryptów zarówno dla genu kodującego receptor LEP, jak i genów kodujących receptory OXA i OXB. Wyniki klasteryzacji hierarchicznej grupowały pacjentki następująco:

- klastery I – H.P. z AN-BW i M.P. z grupy kontrolnej
- klastery II – A.S. z grupy kontrolnej i T.S. z AN-R
- klastery III – B.K. kontrola (u której stwierdzono AN-BW) i N.P. z AN-BW.

Pacjentka N.M. z AN-R i K.W. z grupy kontrolnej łączą się z klastrem nr II.

Wykonana analiza ośmiu mikromacierzy oligonukleotydowych (HG-U133A, Affymetrix) dla genów kodujących wybrane receptory (receptor LEP oraz receptory dla OXA i OXB) wykazała, że pacjentki z AN-R i AN-BW grupują się w oddzielnych klastrach.

### Wnioski

Na podstawie wyników klasteryzacji hierarchicznej, przeprowadzonej dla sześciu i ośmiu mikromacierzy oligonukleotydowych, przedstawiających odmienne profile ekspresji genów kodujących wybrane białka oreksygeniczne (OXA i OXB) oraz anoreksygeniczne (LEP) na poziomie transkryptu, możemy przypuszczać, że metoda ta różnicuje na poziomie molekularnym dwa typy jadłowstrętu psychicznego: typ restrykcyjny AN (AN-R) i typ bulimiczno-wydalający AN (AN-BW).

### Психическая анорексия в аспекте олигонуклеотидового микроложа. Собственные исследования

#### Содержание

**Задание.** Задачей настоящей работы было исследование профиля экспрессии транскриптов некоторых генов, кодирующих рецепторы лептина, а также орексинов А и В методом микроложа олигонуклеотидов (Аффиметрикс, HG – 133А) у больных психической анорексией (ПА).

**Метод.** Анализу подвергнуты одноядерные клетки: риферической крови 4 пациенток с психической анорексией по критериям Международной классификации болезней IV пересмотра и ICD-10 (14, 15). Две из них страдали реструктивной анорексией, а две булемично-выделяющей формой ПА. Контрольную группу составляли 4 пациентки без симптомов ПА. Последовательным материалом была РНК, изолированная из периферической крови пациенток с ПА. Полученная РНК послужила для исследования профиля экспрессии некоторых генов на уровне транскрипта техникой микроложа олигонуклеотидов (Аффиметрикс, HG U 133А). Для анализа полученных результатов применен метод иерархической кластеризации (К люстер 3.0) для шести, а потом восьми микролож олигонуклеотидов.

**Результаты.** Метод иерархической кластеризации выделяет отдельные кластры для больных ПА и обоими типами болезни и пациенток контрольной группы.

**Выводы.** На основании результатов кластеризации, проведенной для шести-восьми микролож олигонуклеотидов, представляющих различные профили экспрессии генов, кодирующих избранные оксигенные белки (OXA и OXB), а также анорексигенные можно предположить, что этот метод различает два типа психической анорексии – рестриктивный и булемично-выделяющий – рвотный.

### Anorexia nervosa im Bezug auf Oligonukleotid - Mikroarray - eigene Studien

#### Zusammenfassung

**Ziel der Studie.** Das Ziel der Studie war die Untersuchung des Profils der Expression der Transkripte von gewählten Leptinrezeptoren kodierenden Genen und von Orexinen A und B mit der Methode des Oligonukleotid - Mikroarrays (Affymetrix, HG-U133A) bei Kranken, die an Anorexia nervosa leiden (AN).

**Material und Methode.** Analysiert wurden periphere mononukleare Blutzellen (PBMC) bei 4 Patientinnen, die an Anorexia nervosa leiden und die die Klassifizierung nach ICD-10 und DSM IV [14,15] erfüllten. Zwei von ihnen hatten einen restriktiven Subtyp der AN (AN-R), zwei einen bulimisch - ausscheidenden Typ der AN (AN-BA). Die Kontrollgruppe bildeten 4 Patientinnen, die



keine Essstörungen hatten. Das untersuchte Material war RNA, isoliert aus den PBMC dieser Kranken. Der erhaltene RNA diente zur Untersuchung des Profils der Expression der gewählten Genen auf dem Level des Transkripts mit der Technik des Oligonukleotid - Mikroarrays (Affymetrix, HG-U133A). Zur Analyse der erzielten Ergebnisse wurde die Methode der hierarchischen Klasterung (Cluster v.3.0) für sechs, dann für acht Oligonukleotid - Mikroarrays angewandt.

**Ergebnisse.** Die Methode der hierarchischen Klasterung sonderte getrennte Klaster für die Kranken mit der AN-R und AN-BA und die Patientinnen aus der Kontrollgruppe aus.

**Schlussfolgerungen.** Aufgrund der Ergebnisse der hierarchischen Klasterung, die für sechs und acht Oligonukleotid - Mikroarrays durchgeführt wurde, die differente Profile der Expression der Gene darstellt, die gewählte Orexine (OXA und OXB) und Anorexine (LEP) kodieren, können wir schlussfolgern, dass diese Methode zwei Subtypen der Anorexia nervosa unterscheidet: den restriktiven Subtyp der Anorexia nervosa (AN-R) und den bulimisch - ausscheidenden Subtyp (AN-BA).

### L'anorexie nerveuse à l'aspect de la puce à ADN des oligonucléotides – données propres des auteurs

#### Résumé

**Objectif.** Décrire le profile de l'expression des transcrits des gènes choisis codant les récepteurs de léptine et des orexines A et B avec la méthode de la puce à ADN des oligonucléotides (Affymetrix, HG-U133A) chez les patientes souffrant de l'anorexie nerveuse (AN).

**Méthode.** On analyse les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC – Peripheral blood of mononuclear cells) des 4 femmes souffrant de l'anorexie nerveuse, diagnostiquées d'après les critères d'ICD-10 et DSM-IV (2 souffrant de l'anorexie du type restrictif (AN-R), 2 souffrant de l'anorexie-boulimie (AN-BP). Le groupe de contrôle est formée par 4 femmes saines. On analyse le RNA isolé de PBMC des patientes pour décrire le profile de l'expression des gènes choisis avec la méthode de la puce à ADN des oligonucléotides (Affymetrix, HG-U133A). Les six et ensuite huit puces à ADN sont analysées avec la méthode de clustering hiérarchique (Cluster v 3.0).

**Résultats.** Cette méthode permet à séparer des clusters particuliers des patientes avec AN-R et avec AN-BP et du groupe de contrôle.

**Conclusions.** En basant sur ces résultats de la clustering hiérarchique des six et huit puces à ADN des oligonucléotides présentant des profiles différents des expressions des gènes codant les peptides orexigéniques (OXA et OXB) et anorexigéniques (LEP) on peut supposer que cette méthode peut différencier deux types de l'anorexie nerveuse : restrictive (AN-R) et boulimie (AN-BP).

#### Piśmiennictwo

1. Jarzab B, Gubała E, Lange D. *Mikromacierze DNA i profil ekspresji genów raka brodawkowego tarzycy.* Endokrynol. Pol. 2005; 3 (56): 294–301.
2. Bazela K. *Leptyna – przekaz sygnału i współdziałanie z cytokinami.* Post. Biol. Kom. 2001; 16 (28): 23–34.
3. Walczewska A. *Leptyna – nowy hormon.* Endokrynol. Pol. 2000; 51: 125–148.
4. Widjaja A, Kielstein JT, Horn R, Mühlen A, Kliem V, Brabant G. *Free serum leptin but not bo- und leptin concentrations are elevated in patients with end-stage renal disease.* Nephrol. Dial. Transplant. 2000; 15: 846–850.
5. Meier A, Gressner AM. *Endocrine regulation of energy metabolism: Review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin.* Clin. Chem. 2004; 50,9: 1511–1525.
6. Pankiewicz A, Świerczyński J. *Zaburzenia budowy i funkcji receptora leptyny – jedna z przyczyn otyłości?* Post. Biochem. 1999; 45 (3): 218–225.
7. Tsiotra PC, Pappa V, Raphis SA, Tsigos C. *Expression of the long and short leptin receptor isoforms in peripheral blood mononuclear cells: implications for leptin's actions.* Metabol. 2000; 49: 1537–1541.

8. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG. *The hypocretins: hypothalamus – specific peptides with neuroexcitatory activity*. Proc. Nat. Acad. Sc. USA 1998; 95: 322–327.
9. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzuki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Lui WS, Terrett JA, Elshonrbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. *Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein – coupled receptors that regulate feeding behavior*. Cell 1998; 92: 573–585.
10. Mieda M, Yanagisawa M. *Sleep, feeding and neuropeptides: roles of orexins and orexin receptors*. Curr. Opin. Neurobiol. 2002; 12: 339–345.
11. Willie JT, Chemelli RM, Sinton ChM, Yanagisawa M. *To eat or to sleep? Orexins in the regulation of feeding and wakefulness*. Ann. Rev. Neurosc. 2001; 24: 429–457.
12. 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. Neurosc. 2002; 15: 315–328.
13. Briski KP, Sylvester PW. *Hypothalamic orexin – A – immunopositive neurons express Fos in response to central glucopenia*. Neurorep. 2001; 12: 531–534.
14. Cai XJ, Liu XH, Evans M, Clapham JC, Wilson S, Arch JRS, Morris R, Williams G. *Orexins and feeding: special occasions or everyday occurrence?* Regul. Pept. 2002; 104: 1–9.
15. Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JRS, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams S. *Hypothalamic orexin expression. Modulation by blood glucose and feeding*. Diabet. 1999; 48: 2132–2137.
16. Liu XH, Morris R, Spiller D, White M, Williams G. *Orexin A preferentially excites glucose – sensitive neurons in the lateral hypothalamus of the rat in vitro*. Diabetes 2001; 50: 2431–2437.
17. Chomczynski P, Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Analyt. Biochem. 1987; 162: 156–159.
18. ICD-10. *Classification of mental and behavioral disorders. Research diagnostic criteria*. Kraków–Warszawa: Medical University Publishing House „Vesalius”. The Institute of Psychiatry and Neurology; 1998, s. 106.
19. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders*, 4th ed. (DSM-IV). American Psychiatric Association; 1994.
20. [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)
21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
22. Janas-Kozik M, Mazurek U, Krupka-Matuszczyk I, Stachowicz M, Głogowska-Ligus J, Wilczok T. *The transcript expression profile of the leptin receptor-coding gene assayed with the oligonucleotide microarray technique – could this be an anorexia nervosa marker?* Cell. Molec. Biol. Lett. 2006; 11: 67–74.

Adres: Małgorzata Janas-Kozik  
Oddział Psychiatrii i Psychoterapii Wieku Rozwojowego  
Centrum Pediatrii im. Jana Pawła II  
41-218 Sosnowiec, ul. G. Zapolskiej 3

Otrzymano: 18.09.2006  
Zrecenzowano: 25.01.2007  
Przyjęto do druku: 30.01.2007