

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

GHRELIN ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΟΥΡΛΑΣ Γ. ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΙΑΤΡΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
Αναπαραγωγή και ενεργειακό περιβάλλον.....	8
Η σχέση μεταξύ της περιφέρειας και του εγκεφάλου:	
Μεταβολικά κυκλώματα στον υποθάλαμο.....	10
ΓΚΡΕΛΙΝΗ	
Γενικά.....	13
Κεντρικές και περιφερικές δράσεις της γκρελίνης.....	17
Συστηματικές δράσεις της γκρελίνης πάνω στον αναπαραγωγικό άξονα.....	18
Δεδομένα από πειραματόζωα.....	19
Δεδομένα στον άνθρωπο.....	23
Το σύστημα της γκρελίνης στις γονάδες.....	26
Δεδομένα από πειραματόζωα.....	27
Δεδομένα στον άνθρωπο.....	29
Η γκρελίνη στην ανάπτυξη του εμβρύου και την εμφύτευση.....	31
Δεδομένα από πειραματόζωα.....	31
Δεδομένα στον άνθρωπο.....	33
Γκρελίνη και έναρξη της ήβης.....	34
Γκρελίνη και PCOS.....	36
Συμπεράσματα.....	38
Ο λιπώδης ιστός ως ενδοκρινές όργανο.....	39
Εκκριτικά προϊόντα του λιπώδους ιστού.....	40

Παχυσαρκία και γονιμότητα.....44

ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗ

Γενικά.....45

Βιολογία.....46

Αντιπυονεκτίνη και το μεταβολικό σύνδρομο.....48

Αντιπυονεκτίνη και PCOS.....49

Αντιπυονεκτίνη και κύηση.....50

Αντιπυονεκτίνη και στεροειδή του φύλου.....53

Επιδράσεις της αντιπυονεκτίνης στην αναπαραγωγή και τη γονιμότητα.....55

ΡΕΖΙΣΤΙΝΗ

Γενικά.....59

Βιολογία.....59

Λειτουργία.....60

Ρεζιστίνη και αναπαραγωγικό σύστημα.....63

Ρεζιστίνη και PCOS.....66

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοποί του παρόντος ερευνητικού πρωτοκόλλου.....70

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....70

Γκρελίνη, αντιπυονεκτίνη, ρεζιστίνη και φυσιολογικός κύκλος

Υλικό και μέθοδος.....74

Μετρήσεις.....75

Ανάλυση δεδομένων.....77

Αποτελέσματα.....77

Γκρελίνη, αντιπυονεκτίνη, ρεζιστίνη και διεγερμένος κύκλος

Υλικό και μέθοδος.....89

Μετρήσεις.....89

Ανάλυση δεδομένων.....91

Αποτελέσματα.....	91
Συζήτηση.....	100
Συμπεράσματα.....	106
Summary.....	109
Βιβλιογραφία.....	112

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Έχουν υπάρξει δεδομένα που υποδηλώνουν ότι οι διάφορες αντιποκίνες, δηλαδή οι ορμόνες που εκκρίνονται από το λιπώδη ιστό, και η γκρελίνη, μία ορμόνη που εκκρίνεται κυρίως από το στόμαχο, θα μπορούσαν να έχουν σημαντικές επιδράσεις στην αναπαραγωγή. Ενεργώντας μέσω του εγκεφάλου, οι ορμόνες αυτές μπορούν να χρησιμεύσουν ως σύνδεσμοι μεταξύ λιπώδη ιστού και του αναπαραγωγικού συστήματος και να παρέχουν και να ρυθμίζουν τις ενεργειακές ανάγκες για την αναπαραγωγή και την εγκυμοσύνη.

Ωστόσο, τα υπάρχοντα, μέχρι σήμερα, δεδομένα σχετικά με τις παραπάνω ορμονικές δράσεις της γκρελίνης και των αντιποκινών αντιπνεκτίνης και ρεζιστίνης είναι περιορισμένα και χρήζουν περαιτέρω έρευνας.

Μετα από λεπτομερή και τεκμηριωμένη μελέτη της βιβλιογραφίας, καταλήξαμε στην ανάπτυξη ενός πρωτοκόλλου, με σκοπό να διερευνήσουμε το ρόλο των παραπάνω ορμονών στην αναπαραγωγή. Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε εξ'ολοκλήρου στην Πανεπιστημιακή Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ιωάννη Μεσσήνη για την αναζήτηση του

θέματος μου, για την πρωτοτυπία των ιδεών του, αλλά και για την συμπαράσταση και την ακούραστη καθοδήγηση του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ένα ακόμα ευχαριστώ στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ.Αθανάσιο Καλλιτσάρη, για τη συμβολή του,ως επιβλέποντα στην τριμελή Επιτροπή, στη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας

Ευχαριστώ επίσης τον Επίκουρο Καθηγητή κ.Κωνσταντίνο Νταφόπουλο για τη βοήθειά του στη συγγραφή της εργασίας αυτής, αλλά και για τα ερεθίσματα και τις γνώσεις που μου έδωσε καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής.

Τέλος, ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, και ιδιαίτερα τους γονείς μου, που όλα αυτά τα χρόνια στέκονται δίπλα μου υλικά και ψυχικά, που μου συμπαραστέκονται σε όλες τις στιγμές της ζωής μου.

Ειλικρινά τους ευχαριστώ.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αναπαραγωγή και ενεργειακό περιβάλλον

Το αναπαραγωγικό σύστημα των θηλαστικών είναι εξαιρετικά ευαίσθητο στην πρόσληψη της ενέργειας (τροφής) από το εξωτερικό περιβάλλον. Απότομες αλλαγές στην ενεργειακή κατάσταση των ζώων μπορεί να έχουν επίδραση στη ρύθμιση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυση-γονάδες(HPG). Καταστολή της κατά ώσεων έκκρισης της ωχρινοτρόπου ορμόνης (Luteinizing Hormone, LH) έχει διαπιστωθεί μετά από νηστεία ή απαγόρευση τροφής σε δεκάδες είδη συμπεριλαμβανομένου ποντίκια, αρουραίους, πρόβατα, πιθήκους και ανθρώπους (Cameron et al, 1991). Επιπρόσθετα με αυτές τις επιδράσεις στο αναπαραγωγικό ορμονικό προφίλ κατά την ενήλικη ζωή, ο περιορισμός της τροφής μπορεί να καθυστερήσει την έναρξη της ήβης και άμεσα να επιδράσει την αναπαραγωγική συμπεριφορά του ατόμου. Η κατά ώσεις έκκριση της LH σε νηστικά ζώα μπορεί να επανέλθει στο κανονικό μετά από ώρες έως και λεπτά από την επανασίτισή τους. Η επαγόμενη από τη νηστεία καταστολή της LH θεωρείται πρόσφατα ως επακόλουθο της μειωμένης έκκρισης της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) από τον κοιλιακό πρόσθιο εγκέφαλο, και συγκεκριμένα από τον υποθάλαμο, μια και τα νηστικά ζώα παρουσιάζουν ώσεις παρόμοιες σε ποσότητα και μέγεθος με τα θρεμμένα ζώα, μετά από εξωγενή χορήγηση GnRH (Aloi et al, 1997).

Από την άλλη πλευρά υπάρχει εξίσου συσχέτιση μεταξύ πρόσληψης τροφής / ενεργειακής δαπάνης και αναπαραγωγής σε ζώα και ανθρώπους. Πράγματι η παχυσαρκία σε ζώα και ανθρώπους συνοδεύεται από ποικίλες βλάβες του

αναπαραγωγικού συστήματος. Η διάγνωση της νευρικής ανορεξίας περιλαμβάνει επίσης την απουσία εμμήνου ρύσεως (Stewart et al, 1992). Από βιοχημικής και μοριακής απόψεως, αυτές οι παρατηρήσεις προέκυψαν από ένα εξαιρετικά πολύπλοκο σενάριο, με πτυχές που εξακολουθούν να παραμένουν άγνωστες. Η έρευνα τα τελευταία χρόνια οδήγησε στην αναγνώριση κάποιων ουσιών που λαμβάνουν μέρος σε ποικίλη έκταση και με ποικίλους ρόλους στην ρύθμιση της πρόσληψης τροφής /ενεργειακού μεταβολισμού και την αναπαραγωγή. Τα πιο αξιοσημείωτα παραδείγματα περιλαμβάνουν ορεξιγενή μόρια, όπως τα ενδογενή οπιοειδή, το νευροπεπτίδιο Υ(NPY), γαλανίνη, προ-οπιο-μελανοκορτίνη(POMK), agouti-related peptide (AgRP) κ.α, και ανορεξιγενή σήματα όπως εκλυτική ορμόνη της φλοιοτρόπου ορμόνης (CRH), νευροτενσίνη, μελανοκορτίνη, κ.α (Kalra et al, 1999).

Τα περισσότερα, αν όχι όλα, από αυτά τα νευροπεπτίδια έχουν προέλευση και δρουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), κυρίως σε περιοχές του υποθαλάμου, για την ρύθμιση της πρόσληψης της τροφής και του ενεργειακού ισοζυγίου. Κάποιες φορές φαίνεται να ελέγχουν νευροενδοκρινείς δράσεις του αναπαραγωγικού άξονα (Kalra et al, 1996). Η ανακάλυψη της λεπτίνης οδήγησε για πρώτη φορά, στην αναγνώριση ενός σηματοδοτικού μονοπατιού για όλες αυτές τις λειτουργίες, ξεκινώντας περιφερικά από τον λιπώδη ιστό και μεταφέροντας την πληροφορία σε κεντρικές δομές, όπως ο υποθάλαμος .

Η σχέση μεταξύ της περιφέρειας και του εγκεφάλου: Μεταβολικά κυκλώματα στον υποθάλαμο.

Προς το παρόν είναι αποδεκτό ότι η όρεξη ρυθμίζεται από μια αλληλεπίδραση ορμονικών και νευρικών μηχανισμών, γεγονός που συζητήθηκε εκτενώς σε διάφορες πρόσφατες δημοσιεύσεις (Korner and Leibel., 2003). Εν συντομία, ο τοξοειδής πυρήνας του υποθαλάμου φιλοξενεί δύο αντιτιθέμενες ομάδες-κυκλώματα νευρώνων, δηλαδή, ένα κύκλωμα που διεγείρει την όρεξη και ένα κύκλωμα που καταστέλλει την όρεξη. Τα δύο κυκλώματα αποστέλουν μηνύματα κυρίως προς τον παρακοιλιακό πυρήνα (PVN) , αλλά και σε άλλους πυρήνες του υποθαλάμου, οι οποίοι στη συνέχεια διαμορφώνουν άμεσα τη συμπεριφορά σίτισης. Τα δύο αυτά κυκλώματα επηρεάζονται από περιφερειακά ορμονικά σήματα που είναι σε θέση να διασχίζουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, όπως η λεπτίνη, η ινσουλίνη, η γκρελίνη και το πεπτίδιο YY3-36 (Σχήμα 1).

Το κύκλωμα που διεγείρει την όρεξη παράγει δύο νευροδιαβιβαστές, δηλαδή, το νευροπεπτίδιο Y (NPY) και agouti-related peptide (AgRP) , οι οποίοι προωθούν την όρεξη. Το NPY στέλνει άμεσα μηνύματα στον παρακοιλιακό πυρήνα (PVN) για να προωθήσει τη διατροφική συμπεριφορά, ενώ το AgRP δρά έμμεσα με το κλειδίωμα του υποδοχέα τύπου 4 της μελανοκορτίνης, έναν υποδοχέα ο οποίος έχει ανασταλτική επίδραση στην όρεξη στο επίπεδο του PVN.

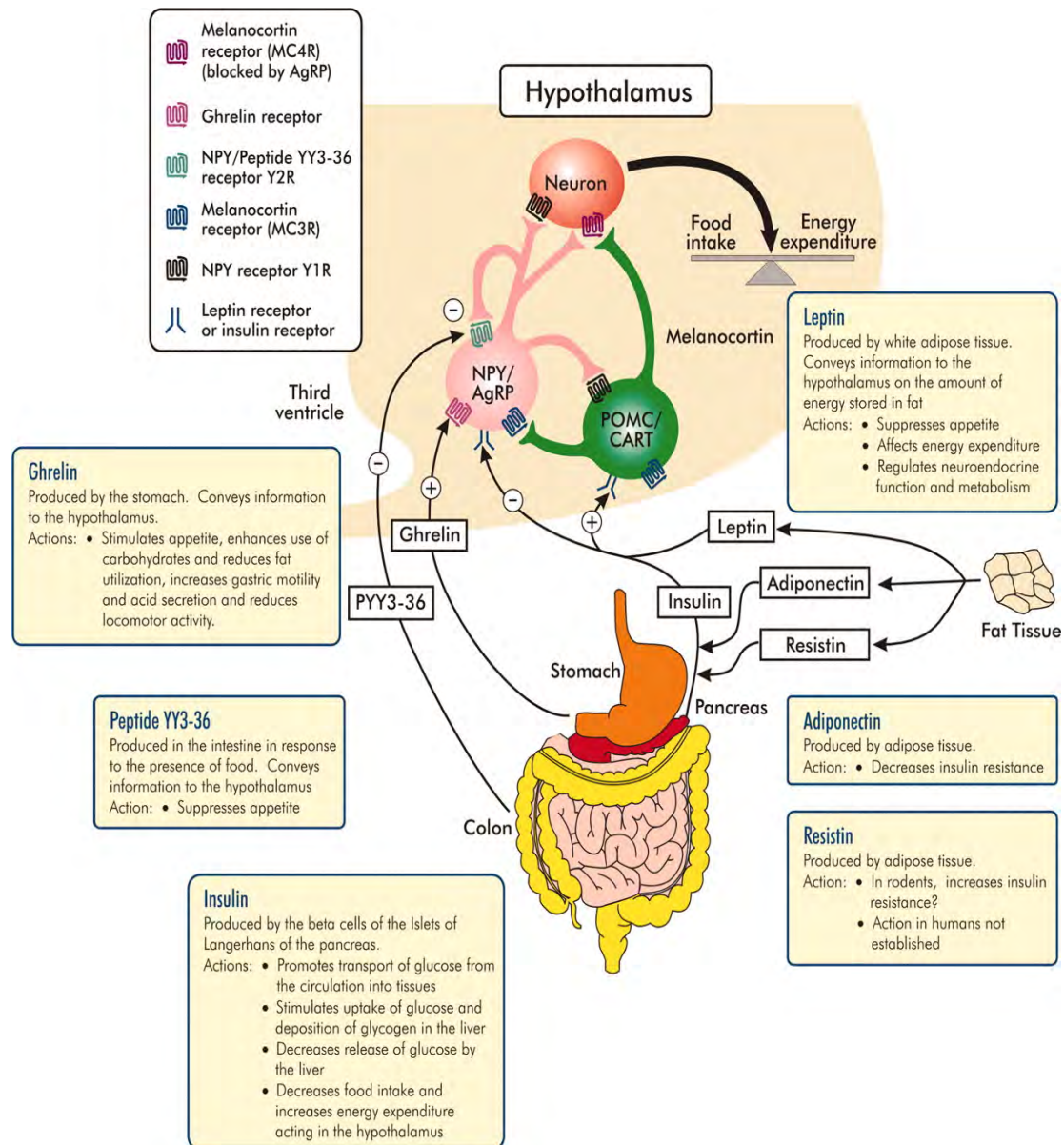
Το ανασταλτικό κύκλωμα της όρεξη περιλαμβάνει τη χρήση μεταφραφικών μορίων της κοκαΐνης και των αμφεταμινών και κυρίως τη προπιομελανοκορτίνη, η οποία παράγει την α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH). Η τελευταία αυτή ορμόνη δραστηριοποιείται κυρίως μέσω του υποδοχέα μελανοκορτίνης 4 (και σε μικρότερο βαθμό, μέσω του τύπου 3 υποδοχέα) και αναστέλλει την όρεξη (Korner and Leibel., 2003).

Η λεπτίνη, όσο και ινσουλίνη, ενεργοποιεί το ανασταλτικό κύκλωμα της όρεξης μέσω της προς τα άνω ρύθμισης της α -MSH, αναστέλλοντας τους διεγερτικούς νευρώνες της όρεξης, και με την κατάργηση της έκφρασης του NPY και AgRP mRNA του υποθαλάμου, ενώ η γκρελίνη έχει σε μεγάλο βαθμό το αντίθετο αποτέλεσμα.

Σε μελέτες σε ζώα, το πεπτιδίο YY3-36 που εκκρίνεται από τον εντερικό σωλήνα μετά την κατάποση τροφής, αναστέλλει τους νευρώνες του υποθαλάμου που εκφράζουν NPY και AgRP, και έτσι ελευθερώνει παρακείμενους νευρώνες που εκφράζουν προπιομελανοκορτίνη και τη μείωση της πρόσληψης τροφής.

Υποδοχείς γκρελίνης και λεπτίνης έχουν επίσης επίσης περιγραφεί σε εγκεφαλικούς πυρήνες του στελέχους, και η άμεση έγχυση λεπτίνης στο ραχιαίο παρασυμπαθητικό πλέγμα μειώνει την πρόσληψη τροφής και το σωματικό βάρος σε αρουραίους (Grill et al., 2002). Έτσι, αν και έχει αποδειχθεί ότι ο υποθάλαμος είναι κεντρικής σημασίας για τον έλεγχο του ενεργειακού ισοζυγίου, συσσωρεύονται στοιχεία που δείχνουν ότι νευρωνικά

κυκλώματα που προέρχονται από το ουραίο στέλεχος του εγκεφάλου συμμετέχουν επίσης (Zigman et al., 2003), και σε αυτόν τον τομέα βρίσκεται το επίκεντρο της έρευνας αυτή τη στιγμή.



Σχήμα 1. Η σύνδεση μεταξύ περιφέρειας και εγκεφάλου: ενδοκρινικές και νευρικές αλληλεπιδράσεις στην ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης και της όρεξης (Gale et al., 2004).

ΓΚΡΕΛΙΝΗ

Γενικά

Πρόσφατα έχει ανακαλυφθεί ένα πεπτίδιο 28 αμινοξέων , η γκρελίνη (Kojima et al.,1999) το οποίο κυρίως παράγεται από το στομάχο καθώς τα επίπεδα του στην κυκλοφορία μειώνονται κατά 80% μετά από γαστρεκτομία (Ariyasu et al.,2001).

Το λειτουργικό πεπτίδιο της γκρελίνης προκύπτει από μια πρόδρομη μορφή, την prepro-γκρελίνη, που αποτελείται από 117 αμινοξέα. Στον άνθρωπο και τον αρουραίο, η ώριμη γκρελίνη συνίσταται από 28 αμινοξέα. Οι βιολογικές δράσεις της γκρελίνης καθοδηγούνται κυρίως από την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα επιφάνειας που ονομάζεται GHS-R(Growth Hormone Secretagogue-Receptor). Ο υποδοχέας αυτός ανήκει στην μεγάλη οικογένεια των G πρωτεϊνών, και αποτελείται από επτά διαμεμβρανικές περιοχές. Εκφράζεται έντονα σε κεντρικούς νευροενδοκρινικούς ιστούς όπως είναι η υπόφυση και ο υποθάλαμος. Δύο υπομορφές προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing) από το μονό γονίδιο οι: GHS-R1a και GHS-R2b.

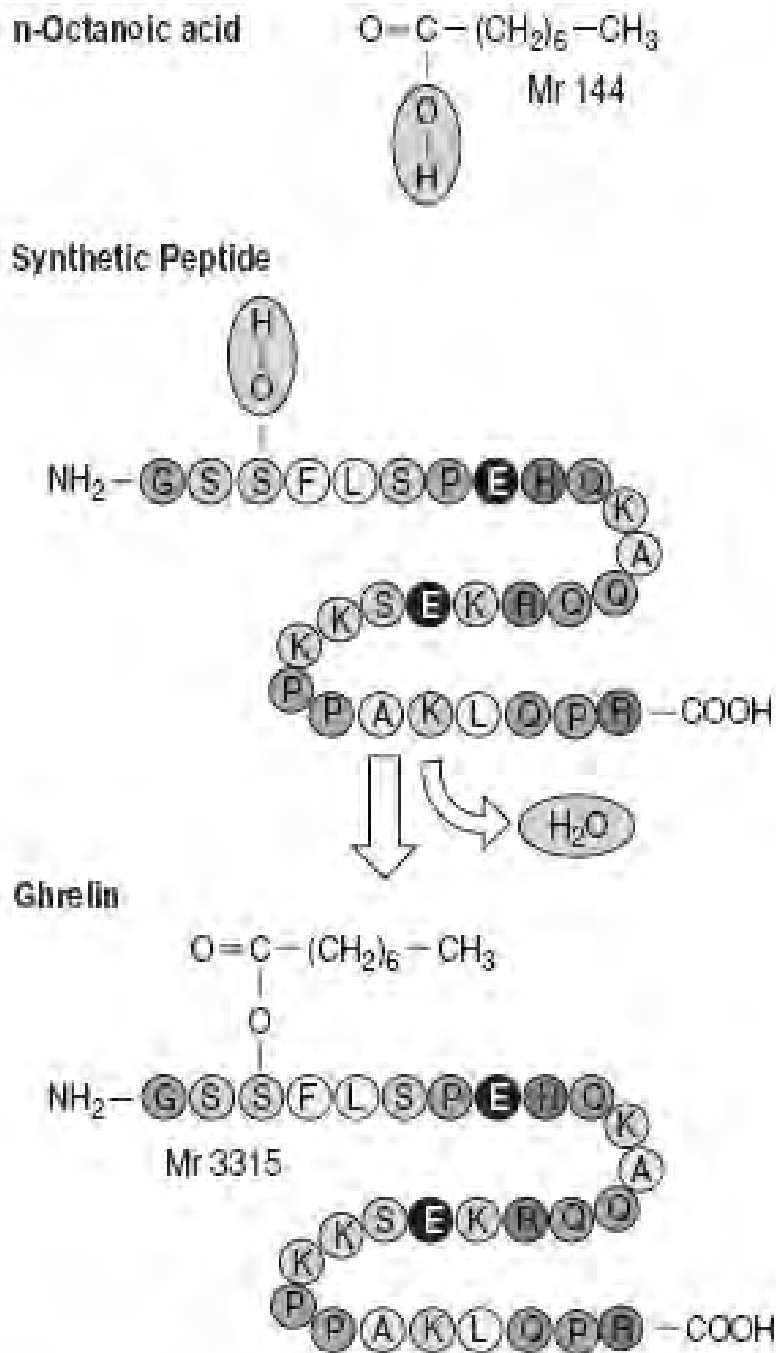
Η γκρελίνη παράγεται κυρίως από τα επενδυματικά P/D1 κύτταρα του θόλου του στομάχου και τα έψιλον ανθρώπινα κύτταρα του παγκρέατος και διεγείρει την πείνα (Inui et al., 2004). Τα επίπεδα της γκρελίνης αυξάνουν πριν από τα γεύματα και μειώνονται μετά . Θεωρείται το αντίστοιχο της ορμόνη λεπτίνης, που παράγεται από το λιπώδη ιστό, που προκαλεί κορεσμό όταν είναι παρούσα σε υψηλά επίπεδα. Η λεπτίνη και η γκρελίνη εμπλέκονται με αντίθετους ρόλους στην ομοίωση του βάρους του σώματος: η λεπτίνη ως

παράγοντας κορεσμού που σηματοδοτεί για την ενεργειακή αφθονία, και η γκρελίνη, ως ορεξιγόνο παράγοντας που σηματοδοτεί για την ενεργειακή ανεπάρκεια (Zigman and Elmquist, 2003).

Η γκρελίνη επίσης, παράγεται στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου όπου διεγείρει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης από την αδενουπόφυση (Mondal et al., 2005). Υποδοχείς για γκρελίνη εκφράζονται από νευρώνες στον τοξοειδή πυρήνα και τον κεντρικό κοιλιακό πυρήνα (ventromedial) του υποθαλάμου. Η γκρελίνη αποτελεί τον κύριο ενδογενή προσδέτη (ligand) των υποδοχέων GHS-R και ρυθμιστικό παράγοντα της έκκρισης της GH και του ενεργειακού ισοζυγίου με ορεξιγόνο και λιπογενετική δραστηριότητα. Η γκρελίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ως νευροτροφίνη, ιδιαίτερα στο ιππόκαμπο, και είναι απαραίτητη για την προσαρμογή στις γνωστικές μεταβαλλόμενες συνθήκες καθώς και τη διαδικασία της μάθησης.

Η γκρελίνη κυκλοφορεί στο αίμα τόσο σε ενεργή (ακυλιωμένη) όσο και σε ανενεργή (μη-ακυλιωμένη) μορφή (Σχήμα 2). Η ακυλίωση της σερίνης-3 (Ser3) με ένα λιπαρό οξύ, κυρίως ν-οκτανοϊκό οξύ (acylated ghrelin, ενεργή μορφή) είναι υποχρεωτική για τη δέσμευση της γκρελίνης με τους GHS-R υποδοχείς (Van der Lely et al., 2004). Ωστόσο, φαίνεται ότι η μη-ακυλιωμένη γκρελίνη μπορεί να μην είναι μια ανενεργή μορφή της ορμόνης, διότι μπορεί να έχει καρδιαγγειακές, λιπογεννητικές και (αντι) πολλαπλασιαστικές επιδράσεις (Van der Lely et al., 2004; Ghigo E et al., 2005) .

Η μη-ακυλιωμένη μορφή της γκρελίνη (des-acyl) βρίσκεται σε σημαντικά επίπεδα στο στομάχι και στο πλάσμα. Η πλειοψηφία μάλιστα της κυκλοφορούσας γκρελίνης στο αίμα βρίσκεται στην μη-ακυλιωμένη μορφή. Η γκρελίνη στην οποία έχει προστεθεί οκτανοϊκό οξύ (octanoylated γκρελίνη) συνιστά περίπου το 1.8% του συνολικού ποσού της κυκλοφορούσας γκρελίνης και είναι η κύρια δραστική μορφή της ανθρώπινης γκρελίνης, ενώ η des-acyl μορφή είναι ανενεργής στην απελευθέρωση της GH (Kojima and Kangawa 2005).



Kojima, M., et al. Trends in Endocrinology & Metabolism 12, 118-122 (2001)

Σχήμα 2. Η δομή της γκρελίνης (Kojima et al., 2001).

Μεταξύ των ποικίλων επιδράσεων της γκρελίνης συμπεριλαμβάνονται η διέγερση της έκκρισης από τα λακτοτρόφα και κορτικοτρόφα κύτταρα ενώ έχουν υπάρξει ενδείξεις για συμμετοχή της στη λειτουργία του αναπαραγωγικού άξονα οι οποίες και θα παρουσιαστούν στη συνέχεια.

Κεντρικές και περιφερικές δράσεις της γκρελίνης

Η γκρελίνη κυρίως αναγνωρίζεται στο στομάχι (Guallilo et al, 2003), όπου είναι μακράν η μεγαλύτερη πηγή κυκλοφορούσας γκρελίνης, υπολογίζεται σχεδόν τα δύο τρίτα από τα επίπεδα στο πλάσμα. Επιπλέον, η γκρελίνη εκφράζεται και σε άλλους ιστούς συμπεριλαμβανομένου του λεπτού, του παγκρέατος, των λεμφοκυττάρων, του πλακούντα, των νεφρών, των πνευμόνων, της υπόφυσης και του εγκεφάλου (Guallilo et al, 2003). Η γκρελίνη έχει λειτουργικές δράσεις στο νευροενδοκρινικό σύστημα του εντέρου όπως είναι η ρύθμιση του λακτοτροπικού, του κορτικοτροπικού και του γοναδοτροπικού άξονα (Arvat et al, 2001). Πρόσφατα, μετά την κλωνοποίηση της η γκρελίνη αναγνωρίστηκε ως ορεξιγόνο σήμα που δρα στον υποθάλαμο μέσω ρύθμισης της πρόσληψης της τροφής ελέγχοντας νευροπεπτίδια, όπως το νευροπεπτίδιο Υ (NPY), την Agouti-Related protein (AgRP) και την ορεξίνη (Nakazato et al 2001). Επιπρόσθετα, με τις κεντρικές δράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, υπάρχουν ενδείξεις ότι η γκρελίνη εμπλέκεται στη ρύθμιση αντίστροφων περιφερικών δράσεων. Αυτές περιλαμβάνουν τη ρύθμιση της γαστρικής περίστασης και της εκκρίσεως του γαστρικού οξέος, διάφορες επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα, ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης και της έκκρισης της παγκρεατικής ινσουλίνης

καθώς και της διέγερσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως τον καρκίνο του προστάτη (De Ambrogi et al, 2003, Guallilo et al 2003). Άλλοτε έχει αντίθετο ρόλο, όπως όταν εμποδίζει την ενσωμάτωση της θυμιδίνης και τον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών στον καρκίνο του μαστού (Cassoni et al, 2001). Φαίνεται, λοιπόν, πως η γκρελίνη είναι ένας ρυθμιστής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και άλλοτε ρυθμίζει αρνητικά την κυτταρική βιωσιμότητα και άλλοτε ενθαρρύνει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό

Συστηματικές δράσεις της γκρελίνης πάνω στον αναπαραγωγικό άξονα

Αρχικές αναφορές απέτυχαν να διαπιστώσουν τυχόν επιδράσεις της γκρελίνης πάνω στα επίπεδα των κυκλοφορούντων γοναδοτροπινών. Ωστόσο, οι λεπτομερείς ορμονικές αναλύσεις, σε μια σειρά από είδη, τα τελευταία 6 χρόνια τελικά απέδειξαν ότι η γκρελίνη ρυθμίζει την έκκριση των γοναδοτροπινών στα θηλαστικά. Τα αρχικά αρνητικά αποτελέσματα πιθανότατα αντανακλούν περιορισμούς των πειραματικών σχεδιασμών και υποδειγμάτων, τα οποία κατευθύνονταν προς την αναγνώριση της εκκριτικής ικανότητας της γκρελίνης, ως προς την αυξητική ορμόνη και δεν είχαν σχεδιαστεί για την ανίχνευση μεταβολών των επιπέδων των γοναδοτροπινών. Είναι σημαντικό ότι τα διαθέσιμα στοιχεία δείχνουν ότι η συστηματική ή ενδοεγκεφαλική χορήγηση της γκρελίνης προκαλεί σημαντική ανασταλτική επίδραση στην LH και, σε μικρότερο βαθμό, στην έκκριση της FSH. Το φαινόμενο αυτό είναι συμβατό με το προτεινόμενο ρόλο της γκρελίνης ως

το σήμα της ενεργειακής ανεπάρκειας, (Zigman and Elmquist 2003) αφού καταστάσεις αρνητικού ενεργειακού ισοζυγίου συχνά συνδέονται με κατασταλμένα επίπεδα γοναδοτροπινών (Fernández-Fernández *et al.*,2006). Οι παρατηρήσεις σε πειραματόζωα και ανθρώπους που οδήγησαν στα παραπάνω συμπεράσματα παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Δεδομένα από πειραματόζωα

Η χορήγηση γκρελίνης στις κοιλίες του εγκεφάλου ωθηκεκτομηθέντων αρουραίων που τους χορηγούνταν μικρή δόση 17-β οιστραδιόλης προκαλεί την ταχεία καταστολή της κατά ώσεις έκκρισης της LH (Futura *et al.*, 2001). Η γκρελίνη αναστέλλει την έκκριση της LH *in vivo* σε προέφηβους άρρενες αρουραίους και γοναδεκτομηθέντα άρρενα και θήλεα ενώ η FSH δεν μεταβάλλεται. *In vitro* η γκρελίνη διεγείρει την έκκριση και των δύο γοναδοτροφινών και μειώνει την απάντηση της FSH στη GnRH (Fernandez-Fernandez *et al.*,2004).

Λαμβάνοντας υπόψη, το κεντρικό της ρόλο στο ορμονικό έλεγχο της αναπαραγωγής (Tena-Sempere & Huhtaniemi 2003), οι επιπτώσεις της γκρελίνης πάνω στην έκκριση των γοναδοτροπινών και της PRL έχουν διερευνηθεί σε περιορισμένο αριθμό μοντέλων και είδη των ζώων.

Η ενδοκοιλιακή χορήγηση της γκρελίνης (3 nmol / αρουραίος) προκάλεσε σημαντική αναστολή της κυκλική έκκρισης LH σε θηλυκούς αρουραίους καθ' όλη του κύκλου , καθώς και σε θηλυκούς γοναδοκτεμηθέντες (Fernandez-Fernandez *et al.* . 2006). Ομοίως, η έκκριση GnRH από θραύσματα

υποθαλάμου σε γοναδοκτεμηθέντες θηλυκούς αρουραίους αναστέλλεται σημαντικά από τη γκρελίνη (Fernandez-Fernandez et al. 2006).

Παρομοίως, η συστηματική χορήγηση της γκρελίνης σε αρσενικά ποντίκια είχε ως αποτέλεσμα την μειωμένη συχνότητα παλμών GnRH in vitro (Lebrethon et al., 2007). Το αν η δράση αυτή επηρεάζει άμεσα ή έμμεσα τους νευρώνες που εκφράζουν GnRH δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, παρά το γεγονός ότι η ανασταλτική επίδραση της γκρελίνης στην έκκριση της LH σε πιθήκους καταστέλεται από έναν μη-ειδικό ανταγωνιστή της CRH, γεγονός που υποδηλώνει ένα έμμεσο τρόπο δράσης (Fernandez-Fernandez et al. 2006). Ωστόσο, η επικρατούσα άποψη, ως αναφορά την κεντρική δράση της γκρελίνης, ενισχύεται από τη παρατήρηση ότι η γκρελίνη είναι σε θέση να αναστέλλει τουλάχιστον μέρος της διεγερτικής επίπτωσης στο ΚΝΣ ως προς την έκκριση των γοναδοτροπινών, της ναλοξόνης (άνθρωπος) και των kisspeptins (αρουραίος) (Lanfranco et al., 2008; Martini et al. 2006).

Αντίθετα, η γκρελίνη αύξησε με δόσοεξαρτόμενο τρόπο την βασική έκκριση της FSH και της LH από την υπόφυση ιστών in vitro (Fernandez-Fernandez et al. 2006). Αντίθετα, η GnRH προκαλούμενη έκκριση LH in vitro ήταν επίμονα κατεσταλμένη από τη γκρελίνη ανεξάρτητα από το στάδιο του κύκλου, ενώ η έκκριση της FSH ήταν κατεσταλμένη από τη γκρελίνη μόνο στην περιωοθυλακιορρηκτική φάση του κύκλου (estrus).

Επιπλέον, κυκλικές διακυμάνσεις των επιπέδων του mRNA GHS-R 1α, δηλ. του λειτουργικού υποδοχέα της γκρελίνης, παρατηρήθηκαν στην υπόφυση, σε διαφορες φάσεις του κύκλου (Fernandez-Fernandez et al. 2006).

Συνοπτικά, τα στοιχεία αυτά καταδεικνύουν ένα πολύπλοκο τρόπο δράσης της γκρελίνης πάνω στον γοναδοτροπικό άξονα, με κυρίαρχες τις ανασταλτικές επιδράσεις σε κεντρικό επίπεδο (υποθαλάμο), και την GnRH προκαλούμενη έκκριση γοναδοτροπινών, αλλά άμεση διεγερτική δράση στην βασική έκκριση της FSH και της LH.

Σε αυτό το πλαίσιο, τα πορίσματα μιας πρόσφατης έρευνας, δείχνουν ότι η καθημερινή ένεση γκρελίνης ή UAG (unacylated ghrelin) καθ'όλη την διάρκεια της εφηβείας στα αρσενικά ποντίκια μείωσε τις συγκεντρώσεις της LH (Martini et al. 2006). Ωστόσο, σε αντίθεση με τη γκρελίνη, η UAG παρέλειψε να τροποποιήσει την έκκριση GH.

Τέλος, η έγχυση γκρελίνης μέτρια, αλλά σημαντικά, μείωσε τη διάρκεια της εκκριτικής απάντησης της LH στον ισχυρό εκκριτικό παράγοντα των γοναδοτροπινών kissreptin-1, (Martini et al. 2006). Η πρόσφατη αναγνώριση της kissreptin (Kiss1) και του υποδοχέα της, της G-πρωτεΐνης (GPR) 54 (Kiss1r) ως βασικής συνιστώσας του αναπαραγωγικού (HPG) άξονα που ελέγχει την έκκριση γοναδοτροφινών εγείρει την πιθανότητα ότι οι kissreptin-Kiss1r μπορούν να παίξουν έναν κρίσιμο ρόλο στην μεταγωγή της, από την γκρελίνη, καταστολής της LH. Πολύ πρόσφατα, φάνηκε η ικανότητα της γκρελίνης να ρυθμίζει προς τα κάτω (down-regulate) την έκφραση της Kiss1 στην μέση προοπτική περιοχή του υποθαλάμου σε θηλυκούς αρουραίους, κάνοντας έτσι πολύ πιθανή την υπόθεση να αποτελεί έναν από τους βασικούς παράγοντες της καταστολής της LH από την γκρελίνη (Forbes et al., 2009).

Συνολικά, τα στοιχεία αυτά περαιτέρω τεκμηριώσει την ανασταλτική επίδραση της γκρελίνης για την έκκριση της LH σε μια ευρεία σειρά από πειραματικές

συνθήκες. Επιπλέον, αυτά τα στοιχεία δείχνουν την ικανότητα της UAG, που αρχικά είχε θεωρηθεί αδρανής μορφή του μορίου, να μιμνήται τη δράση της ακυλιωμένης γκρελίνης στην απελευθέρωση LH . Οι παρατηρήσεις αυτές ενισχύουν την άποψη ότι η γκρελίνη, θεωρούμενη ως σήμα για την ενεργειακή ανεπάρκεια, μπορεί να λειτουργήσει ως αρνητικός τροποποιητής της ανδρικής εφηβείας και της έκκρισης της LH, ένα αποτέλεσμα που θα μπορούσε να πραγματοποιείται, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω ανεξάρτητου μηχανισμού ενός υποδοχέα GH εκκρινικού τύπου 1a. Οι μηχανισμοί για ένα τέτοιο αποτέλεσμα θα μπορούσε να συνεπάγεται την αναστολή της έκκρισης LH στην υποθαλαμο-υποφυσιακή μονάδα ή και άμεσες επιπτώσεις στην αναστολή έκκρισης τεστοστερόνης από τους όρχεις.

Εκτός από την κεντρική υποθαλάμια επίδραση, υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία ότι η γκρελίνη μπορεί επίσης να λειτουργήσει απευθείας στο επίπεδο της υπόφυσης και να διαφοροποιεί την γοναδοτροπική έκκριση, τουλάχιστον σε αρουραίους (Fernández-Fernández *et al*, 2007) . Ωστόσο, η ενέργεια της γκρελίνης σε αυτό το επίπεδο φαίνεται να είναι διπλή. Έτσι, παρόλο που η γκρελίνη είναι υπεύθυνη για τη μερική καταστολή που προκαλείται στην έκκριση της από την GnRH-προκαλούμενη LH από την υπόφυση σε επίμους, άμεσα διεγερτικά αποτελέσματα της γκρελίνης στην έκκριση LH και FSH έχουν επίσης περιγραφεί υπό διαφορετικές φυσιολογικές συνθήκες (π.χ. σε διαφορετικές φάσεις του ωθητικού κύκλου και κατά την εφηβεία) . (Fernández-Fernández *et al*. 2004; Fernández-Fernández *et al*, 2007).

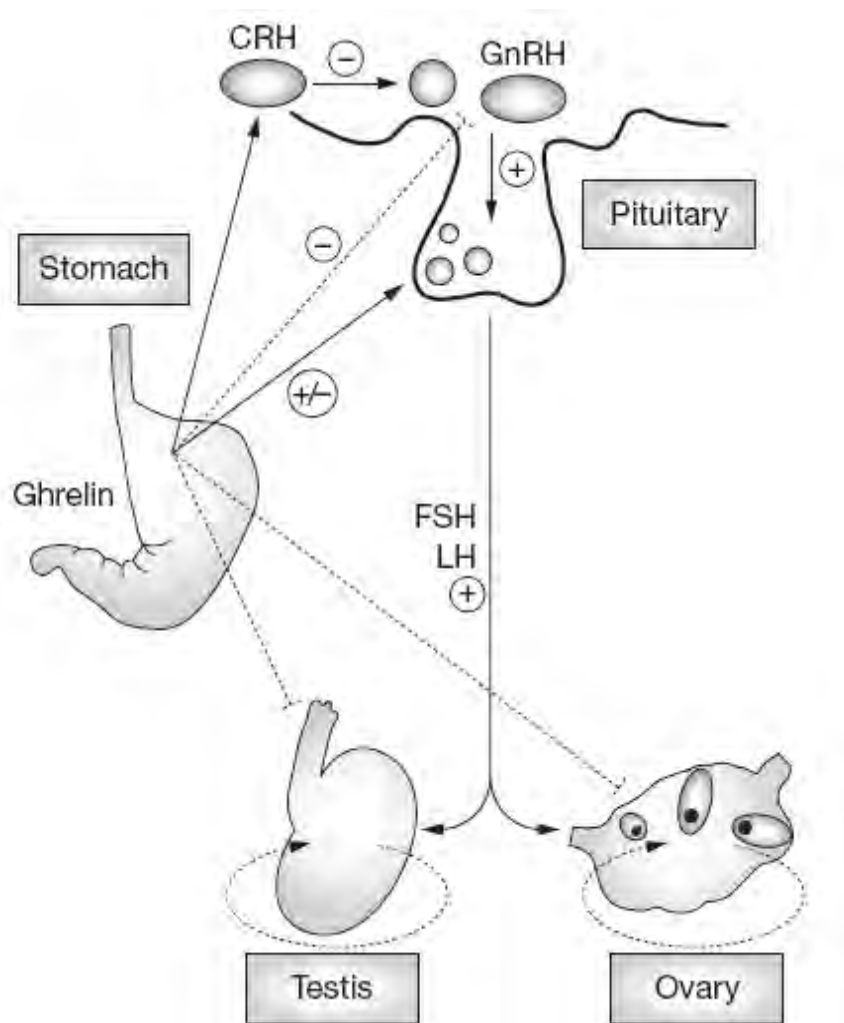
Οι παραπάνω διαφοροποιήσεις μπορεί να αντανakλούν ένα διαφορετικό τρόπο δράσης ανάμεσα στην συστηματικά χορηγούμενη και την τοπικά παραγόμενη γκρελίνη.

Είναι ενδιαφέρον, ότι η άμεση διεγερτική δράση της γκρελίνης για απελευθέρωση LH έχει περιγραφεί σε μη-θηλαστικά είδη (Uthiappan and Peter ., 2004) αλλά σε αισθητά χαμηλότερα αποτελεσματικές δόσεις (picomolar έναντι micromolar συγκεντρώσεις σε αρουραίους). Το αν η παρατήρηση αυτή αντανakλά μια διαφοροποίηση ως προς τη φύση ή ιεραρχική ως προς την περιοχή δράσης (υπόφυση έναντι υποθάλαμο) της γκρελίνης στον έλεγχο του άξονα χρήζει περαιτέρω εξέτασης. Από την άποψη αυτή, είναι αξιοσημείωτο ότι άλλες εξέχουσες βιολογικές δράσεις της γκρελίνης δεν παρατηρούνται πλήρως σε όλα τα είδη. Για παράδειγμα, η γκρελίνη έχει αναφερθεί να αναστέλλει, και όχι να διεγείρει την πρόσληψη τροφής σε κοτόπουλα (Kaiya *et al*, 2008).

Δεδομένα στον άνθρωπο

Στον άνθρωπο, έχει διαπιστωθεί η έκφραση υποδοχέων GHS-R (GH secretagogues) στις υποθαλαμικές περιοχές παραγωγής της GnRH, στην υπόφυση με έντονη έκφραση και σε πλήθος ιστών της περιφέρειας (πιο ευρεία είναι η κατανομή των υποδοχέων 1b και όχι των 1a) (Gnanaravan *et al.*, 2002) (Σχήμα 3). Ωστόσο, σε παλιότερες έρευνες η εφ'άπαξ i.v χορήγηση γκρελίνης (5 έως 10 µg/kg) σε υγιείς άνδρες δεν έχει καμία επίδραση στα επίπεδα των γοναδοτροφινών στην κυκλοφορία σε διαδοχικές μετρήσεις τους μέχρι 3 ώρες (Takaya *et al.*, 2000; Nagaya *et al.*, 2001). Πρόσφατα, όμως, δύο ανεξάρτητες ομάδες ερευνητών κατέδειξαν ότι η χορήγηση γκρελίνης αναστέλλει την αυτόματη παλμική έκκριση της LH σε υγιείς άνδρες (Kluge *et*

al., 2007;Lafranco et al., 2008). Αντίθετα, οι επιδράσεις της γκρελίνης στην FSH είναι λιγότερο σημαντικές.



Σχήμα 3. Πλειοτροπικές δράσεις της γκρελίνης στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-γονάδων. Η συστηματική γκρελίνη είναι κυρίως που παράγεται από το στομάχι και είναι το μόνο γνωστό ορεξιγόνο που κυκλοφορεί και συμμετέχει στην ενεργειακή ομοιόσταση. Η γκρελίνη δρα στο επίπεδο του υποθαλάμου και του ΚΝΣ και καταστέλλει την έκκριση της LH, είτε άμεσα αλλά και έμμεσα (π.χ. μέσω διαφοροποίησης της CRH) μέσω αναστολής της απελευθέρωσης της GnRH από τον υποθάλαμο. Επίσης, αναστέλλει την από την GnRH προκαλούμενη έκκριση LH από την υπόφυση, αλλά ενισχύει άμεσα τη βασική απελευθέρωση LH και FSH από αυτό το σημείο. Αμφότεροι, η γκρελίνη και οι συγγενείς υποδοχείς της (GHSR1a) εκφράζονται στους όρχεις, όπου η γκρελίνη ρυθμίζει τη στεροειδογένεση, τη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων Sertoli και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Leydig. Γκρελίνη και GHSR1a επίσης εκφράζονται στις ωθήκες, όπου η γκρελίνη έχει αναφερθεί ότι ρυθμίζει τη στεροειδογένεση, τη λειτουργία του ωχρού σωματίου, και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Tena-Sempere., 2008).

Τα επίπεδα της γκρελίνης έχουν βρεθεί να είναι αυξημένα σε γυναίκες με αμηνόρροια λόγω ψυχογενούς ανορεξίας (Tolle et al., 2003; Tanaka et al., 2003) και να μειώνονται κατά την αύξηση του σωματικού βάρους (Otto et al., 2001). Αυξημένα επίπεδα γκρελίνης έχουν επίσης βρεθεί σε αθλήτριες με αμηνόρροια αλλά όχι σε αθλήτριες με σοβαρές διαταραχές της εμμήνου ρήσεως, πιθανολογώντας ένα σημαντικό ρόλο του πεπτιδίου στην πλήρη καταστολή της αναπαραγωγικής λειτουργίας σε καταστάσεις χρόνιας ενεργειακής ανεπάρκειας (De Souza et al., 2004).

Ας σημειωθεί ότι, και τα ανδρογόνα έχει αποδειχτεί ότι δρουν ως ανεξάρτητοι ρυθμιστές των επιπέδων της γκρελίνης στον άνθρωπο, και στις γυναίκες και στους άνδρες (Pagotto et al. 2002, 2003, Gambineri et al. 2003).

Επιπρόσθετα, η γκρελίνη εμπλέκεται στον έλεγχο της έκκρισης της προλακτίνης, και οι διεγερτικές της επιδράσεις στα επίπεδα της προλακτίνης στον ορό έχουν προσδιοριστεί σε ενήλικες ανθρώπους (Arvat et al, 2001). Στα ποντίκια, ωστόσο, η γκρελίνη έχει πρόσφατα δημοσιευτεί πως εμποδίζει της έκκριση της προλακτίνης σε άρρενα και θήλεα σε προεφηβικό στάδιο, δρώντας κυρίως στον υποθάλαμο (Tena- Sempere et al, 2004). Ποιοι είναι οι λόγοι αυτής της ανακολουθίας μεταξύ των ειδών ανθρώπου και ποντικού, παραμένει άλυτη, αλλά μια δελεαστική πιθανότητα είναι ότι, οι ανασταλτικές δράσεις της γκρελίνης επάνω στην έκκριση της προλακτίνης περιορίζονται στην περίοδο της (προ)εφηβικής ωρίμανσης, καθώς χρόνια χορήγηση

γκρελίνης σε ώριμα ποντίκια επαυξάνουν τα επίπεδα της προλακτίνης στον ορό (Pinilla, Tena-Stempere, αδημοσίευτη παρατήρηση).

Στον άνθρωπο, όμως, αν και διεγερτικές απαντήσεις όσον αφορά την έκκριση PRL έχουν επανειλημμένα αναφερθεί μετά από οξεία χορήγηση του πεπτιδίου, ειδικές επιπτώσεις της γκρελίνης στην έκκριση LH δεν έχουν αποδειχθεί (Van der Lely et al. 2004). Σε μια πρόσφατη έρευνα, η γκρελίνη είχε κατασταλτική δράση στην έκκριση της LH σε νέους άνδρες καθυστερώντας το επόμενο παλμικό κύμα της και ελαττώνοντας την ένταση του (Kluge et al., 2007).

Το σύστημα της γκρελίνης στις γονάδες

Αν και μια πληθώρα στοιχείων έχουν πλέον αποδείξει την ικανότητα της γκρελίνης να ρυθμίζει την έκκριση των γοναδοτροπινών σε μια ποικιλία ειδών, τα πρώτα δεδομένα που να υποδηλώνουν τη συμμετοχή της γκρελίνης στο έλεγχο της λειτουργίας των γονάδων προήλθαν από πειραματικές μελέτες που εξέτασαν στην έκφραση της γκρελίνης στις γονάδες και διερεύνησαν τις άμεσες επιδράσεις της στις γονάδες.

Εν ολίγοις, αδιάσειστα στοιχεία δείχνουν ότι τόσο οι ωθήκες όσο και όρχεις είναι πιθανοί στόχοι για τις δράσεις της γκρελίνης, τόσο συστηματικής όσο και τοπικής προέλευσης. Επιπλέον, ενδέχεται η γκρελίνη να ελέγχει μια σειρά βασικών λειτουργιών των γονάδων, από τη στεροειδογένεση έως τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Τα στοιχεία για την έκφραση και τις άμεσες

υποτιθέμενες δράσεις της γκρελίνης στις ανθρώπινες γονάδες παραμένουν περιορισμένα, και παρουσιάζονται παρακάτω.

Δεδομένα από πειραματόζωα

Η σταθερή έκφραση του γονιδίου της γκρελίνης έχει περιγραφεί στην ωθήκη του αρουραίου κατά την διάρκεια του οιστρογονικού κύκλου (Camínos et al, 2003). Τα επίπεδα του mRNA ποικίλλουν ανάλογα με το στάδιο του κύκλου, με χαμηλότερα επίπεδα στην προοιστρογονική φάση και ύψιστες τιμές στην εκκριτική φάση του κύκλου. Η ανοσοδραστικότητα της γκρελίνης εδράζεται επικρατέστερα στο εκκριτικό τμήμα της ωθήκης, ανιχνευόμενη κυρίως στα κύτταρα του ωχρού σωματίου που παράγουν στεροειδείς ορμόνες του τρέχοντος κύκλου, αλλά και σε όλα τα μεταγενέστερα ωχρά σωματίδια που πρόκειται να εκφυλισθούν (Gaytan et al, 2003) .

Καταστέλλοντας την προωθητική αιχμή των γοναδοτροπινών και την ωρρηξία με ισχυρούς GnRH ανταγωνιστές, διακόπτεται η κυκλική μεταβολή της ωθηκικής έκφρασης του mRNA της γκρελίνης. Η έκφραση του mRNA της γκρελίνης ανιχνεύθηκε, επίσης και στην ωθήκη του αρουραίου κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Υψηλότερα επίπεδα ανιχνεύθηκαν στα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης, συγκρινόμενα με τη χαμηλότερη έκφραση της προς το τέλος της εγκυμοσύνης (Camínos et al, 2003). Αυτά τα ευρήματα που δείχνουν την έκφραση της γκρελίνης κατά τη διάρκεια του οιστρογονικού κύκλου και την κύηση, αποδεικνύουν τη ρύθμιση της ωθηκικής λειτουργίας από τη γκρελίνη.

Έκφραση ανοσοαντίδρασης των GHSR1a mRNA και GHSR1a υποδοχέα έχει αναφερθεί σε όρχεις αρουραίων (Barreiro et al., 2003) καθώς επίσης και στις γονάδες άλλων θηλαστικών (Zhang et al., 2008) και μη (Sirotkin et al., 2006; Manning et al., 2008).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η γκρελίνη ασκεί άμεση επίδραση στη γοναδική λειτουργία σε άρρενα τρωκτικά και εκφράζεται μαζί με τον υποδοχέα της σε κύτταρα Leydig όρχεων αρουραίων με ανασταλτική in vitro δράση στην από την LH προκαλούμενη έκκριση της τεστοστερόνης, ενώ η κατανομή του υποδοχέα GHSR1a είναι ευρύτερη με έκφραση στα κύτταρα Leydig, Sertoli και germ cells (Tena-Sempere et al., 2002; Barreiro et al., 2002). Η χορήγηση hCG διεγείρει την έκφραση mRNA γκρελίνης από τα κύτταρα Leydig όρχεων αρουραίων (Barreiro et al., 2002).

Πειραματικές (σε επίμυες) μελέτες έδειξαν ότι η έκφραση της γκρελίνης των όρχεων είναι υπό τον έλεγχο της LH της υπόφυσης ενώ η έκφραση των GHSR1a υποδοχέων ρυθμίζεται κυρίως από τη γκρελίνη και την FSH της υπόφυσης (Barreiro et al., 2003). Σε όρχεις αρουραίων, η γκρελίνη είναι σε θέση να αναστέλλει την έκφραση των πρωτεϊνών των κυττάρων Sertoli, όπως τον stem cell παράγοντα, που παίζει ρόλο στη σπερματογένεση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Leydig (Barreiro et al., 2004).

Όσον αφορά στην επίδραση των στεροειδών του φύλου στη γκρελίνη έχει βρεθεί ότι η ορχεκτομία ή η ωθηκεκτομία δεν έχουν καμία επίδραση στα επίπεδα του mRNA της γκρελίνης στο στόμαχο αρουραίων (Gualillo et al., 2001). Ωστόσο, μια πιο πρόσφατη μελέτη (Matsubara et al., 2004) έδειξε σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων του στομάχου που παράγουν

γκρελίνη, του mRNA της και των συγκεντρώσεων της στο πλάσμα μετά ωθηκεκτομία σε θήλεα ποντίκια και αυτές οι απαντήσεις αναστρέφονταν με τη χορήγηση 17-β οιστραδιόλης, καθώς επίσης και τα κύτταρα που παράγουν γκρελίνη βρέθηκε να εκφάζουν ER-α, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή των οιστρογόνων στη ρύθμιση της έκκρισης της γκρελίνης.

Δεδομένα στον άνθρωπο

Στην ανθρώπινη ωθήκη, μεταξύ πλήθους περιφερικών ιστών, έχει διαπιστωθεί η έκφραση mRNA γκρελίνης (Gnanapavan et al., 2002) και η ανίχνευση του πεπτιδίου κατά τον φυσιολογικό γεννητικό κύκλο έχει εντοπιστεί στα κύτταρα της πύλης και μετά τον σχηματισμό του ωχρού σωματίου στα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, ενώ ο υποδοχέας της, ο οποίος ανιχνεύτηκε στα ωάρια, τα σωματικά ωοθυλακικά κύτταρα, τα ωχρινικά κύτταρα, τα κύτταρα της θήκης και τα κύτταρα της πύλης, εκφράζονταν στο ωοθυλάκιο (κοκκώδη και κύτταρα της θήκης) παράλληλα με την ωοθηλακική ανάπτυξη (Gaytan et al., 2003). Σε συνδυασμό με τον προτεινόμενο ρόλο της γκρελίνης μέσω της δράσης της στον υποδοχέα της (1a) ως τροποποιητής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξης των όγκων (Jeffery et al., 2002) θα μπορούσε να πιθανολογηθεί η συμμετοχή της στη ρύθμιση της ωοθυλακικής ανάπτυξης μέσω ενδοκρινικών, παρακρινικών ή αυτοκρινικών μηχανισμών.

Για το σκοπό αυτό, η έκφραση του GHS-R1A αναλύθηκε με ανοσοϊστοχημεία σε μια ομάδα της κανονικών, μεταπλαστικών και νεοπλασματικών ιστών (Gaytan et al. 2005). Ενιαίος GHS-R1A ανοσοεντοπισμός εντοπίστηκε σε όλη

την επιφάνεια του ωοθηκικού επιθηλίου. Ομοίως, τα κυτταρα του σαλπινγικού επιθηλίου έδειξαν ισχυρή GHS-R1A έκφραση. Αντίθετα, το ενδομήτριο και ο ενδοτράχηλος, ήταν αρνητικά για GHS-R1A . Λειτουργικές κύστες από το επιφανειακό επιθήλιο εξέφρασαν GHS-R1A. Ομοίως, καλοήθεις όγκοι των οποίων το επιθήλιο μοιάζει με ορρώδες επιθήλιο σάλπιγγας ήταν επίσης θετικοί, ενώ τα ορρώδης κυσταδενοκαρκινώματα έδειξαν GHS-R1A έκφραση μόνο σε διαφοροποιημένα δείγματα.

Αντίθετα, άλλα νεοπλάσματα, όπως βλεννώδη κυσταδενώματα και κυσταδενοκαρκινώματα, ενδομητροειδείς όγκοι και Brenner όγκοι, δεν εξέφρασαν GHS-R1A. Αυτή η μορφή έκφρασης είναι σύμφωνη με το ρόλο που προτείνονται για τη γκρελίνη ως αυτοκρινικός / παρακρινικός έλεγχος του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και του καρκίνου. Μένει να αποδειχθεί αν το επιφανειακό επιθήλιο των ωοθηκών και οι σχετικοί όγκοι είναι πιθανοί στόχοι για συστηματική ή τοπικά παραγόμενη γκρελίνη επειδή εκφράζουν το λειτουργικό τύπο 1a GHS-R.

Λαμβάνοντας υπόψη το σημαντικό ρόλο επιφανειακού επιθηλίου των ωοθηκών σε βασικές φυσιολογικές εκδηλώσεις (όπως η ωορρηξία) και τη νεοπλαστική μετατροπή των ωοθηκών, η δράση της γκρελίνης σε αυτά τα φαινόμενα χρήζει περαιτέρω έρευνας.

Η γκρελίνη μειώνει την έκκριση της προγεστερόνης και οιστραδιόλης από καλλιέργεια ανθρώπινων κοκκωδών-ωχριντοποιημένων κυττάρων, μέσω ενός μηχανισμού που εξαρτάται από τον GHSR1a (Viani I *et al.*, 2008). Η έκκριση

προγεστερόνης από τα ωχρινικά ανθρώπινα κύτταρα *in vitro* εμποδίζεται από τη γκρελίνη ενώ φαίνεται ότι διαταράσσεται η λειτουργία του ωχρού σωματίου μέσω έκκρισης ωχρινολυτικών παραγόντων (Tropea et al., 2007).

Η γκρελίνη στην ανάπτυξη του εμβρύου και την εμφύτευση

Η έκφραση του mRNA της γκρελίνης στο ανθρώπινο ενδομήτριο έχει βρεθεί να αυξάνει από την ωοθυλακική φάση στην ωχρινική και ακόμα περισσότερο στο φθαρτοποιημένο ενδομήτριο και το mRNA του υποδοχέα της εκφράζεται τόσο κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου όσο και στον φθαρτό, υποδηλώνοντας έναν παρακρινικό/αυτοκρινικό ρόλο του πεπτιδίου κατά την διαδικασία της εμφύτευσης (Tanaka et al., 2003). Είναι αξιοσημείωτο ότι τα επίπεδα της γκρελίνης στο ενδομήτριο υγρό αυξάνονται δραματικά κατά τη διάρκεια της νηστείας στα ποντίκια.

Δεδομένα από πειραματόζωα

Σε έμβρυα ποντικών (στάδιο μοριδίου) έχει βρεθεί mRNA της γκρελίνης και του υποδοχέα της, και η γκρελίνη εκκρίνεται από το αναπαραγωγικό σύστημα. Τα επίπεδα της ήταν αυξημένα με τη νηστεία και μέσω δράσης στον υποδοχέα της εμπόδιζαν την ανάπτυξη των εμβρύων (Kawamura et al., 2003).

Γενικά, είναι δελεαστικό να προταθεί πως η γκρελίνη μπορεί να ενεργεί ως σήμα για την ενεργειακή ανεπάρκεια, κατά την διάρκεια των πρώτων σταδίων της εγκυμοσύνης, δρώντας ως ανασταλτικός παράγοντας στην πρόωρη ανάπτυξη του εμβρύου, προκειμένου να αποφευχθεί η υπέρμετρη διαρροή ενέργειας, που συνδέεται με την εγκυμοσύνη και τη γαλουχία σε καταστάσεις υποσιτισμού (Kawamura et al, 2003).

Η γκρελίνη έχει επίσης ανιχνευθεί στον πλακούντα, στον άνθρωπο και τον αρουραίο (Gualillo et al, 2001), καθώς και στην ανθρώπινη εμβρυϊκή κυκλοφορία (Cortelazzi et al, 2003). Ο ρόλος της εμβρυϊκής και πλακουντιακής γκρελίνης στη ρύθμιση της ανάπτυξης της εγκυμοσύνης και του μεταβολισμού παραμένει να διασαφηνιστεί

Υπάρχουν ενδείξεις από έρευνες *in vitro* σε ποντίκια ότι οι υποδοχείς της γκρελίνης εκφράζονται στην βλαστοκύστη καθώς επίσης ότι η γκρελίνη εμποδίζει, με δόσοεξαρτώμενο τρόπο την ανάπτυξη και την εμφύτευση των εμβρύων, ελαττώνοντας τον αριθμό κυττάρων της βλαστοκύστης (Kawamura et al., 2003). Η γκρελίνη μειώνει τον συνολικό αριθμό κυττάρων της βλαστοκύστης, ως αποτέλεσμα της μείωσης και των δυο, της έσω θήκης και της τροφοβλάστης (Kawamura et al, 2003). Οι ανασταλτικές επιδράσεις της γκρελίνης αναιρούνται από έναν ανταγωνιστή του GHS-R (D-Lys-3 GHRP-6). Η θεραπεία με τον ανταγωνιστή του GHS-R έδειξε μικρή επίδραση στην ανάπτυξη του εμβρύου.

Αυτές οι παρατηρήσεις δείχνουν ότι η γκρελίνη που εκκρίνεται από την αναπαραγωγική οδό, μπορεί να έχει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη των πρώιμων σταδίων του εμβρύου μέσω του GHS-R. Θα μπορούσε να προλεχθεί λοιπόν, πως η γκρελίνη μπορεί να εμποδίσει την εμφύτευση του εμβρύου σε καταστάσεις κακής σιπίσεως, προκειμένου να αποφευχθεί η δαπάνη υπέρμετρων μεταβολικών απαιτήσεων, που επιβάλλει η εγκυμοσύνη.

Δεδομένα στον άνθρωπο

Αφ'ετέρου, σε γυναίκες με ψυχογενή ανορεξία η 6μηνη χορήγηση αντισυλληπτικού (35μg αιθινυλοιστραδιόλης και 0,4mg νορεθιδρόνης) προκαλεί την αύξηση των επιπέδων της γκρελίνης (τα οποία ήταν ήδη αύξημένα σε σύγκριση με φυσιολογικές γυναίκες) και έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η θετική επίδραση των ενδογενών στεροειδών στη γκρελίνη και επομένως και στην όρεξη θα μπορούσε να υποβοηθά την γονιμότητα, τη λήψη θρεπτικών ουσιών και την ανάπτυξη κατά την κύηση (Grinspoon et al., 2004).

Η γκρελίνη έχει ανιχνευθεί στην κυκλοφορία του ανθρώπινου εμβρύου (Cortelazzi et al., 2003). Είναι, επίσης παρούσα στο ενδομήτριο, με υποτιθεμένο ρόλο να δρά ως παρακρινικός / αυτοκρινικός ρυθμιστικός παράγοντας στην φθαρτοποίηση των ενδομητρικών στρωματικών κυττάρων ενώ φαίνεται να παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ του ενδομητρίου και

του εμβρύου κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης (Tanaka *et al.*, 2003).

Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστό εάν η γκρελίνη αυξάνει μετά από χορήγηση οιστρογόνων σε φυσιολογικές γυναίκες, πριν την ωθηλακιορρηξία στο φυσιολογικό γεννητικό κύκλο και δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς οι μεταβολές των επιπέδων της κατά την κύηση. Υπάρχουν δεδομένα για την έκφραση του γονιδίου της και του υποδοχέα της στον ανθρώπινο πλακούντα (Gualilo *et al.* , 2001b; Tanaka *et al.* ,2003). Τα επίπεδα της στην κυκλοφορία φυσιολογικών εγκύων είναι μειωμένα στο τρίτο τρίμηνο σε σύγκριση με μη έγκυες, σχετίζονται αρνητικά με την αρτηριακή πίεση, και στην υπέρτασική νόσο της κύησης έχουν βρεθεί να είναι αυξημένα (Makino *et al.*,2002).

Πρόσφατα φάνηκε, ότι τα επίπεδα της μητρικής γκρελίνης σε πρώιμη ηλικία κύησης δεν φαίνεται να αποτελούν δείκτη προγνωστικής αξίας για την έκβαση της εγκυμοσύνης κατά τη διαδικασία της εξωσωματική γονιμοποίησης (Vidal *et al.*, 2008).

Τέλος, κάτι που προκαλεί ενδιαφέρον, και χρήζει περαιτέρω έρευνας, είναι τα αυξημένα επίπεδα γκρελίνης, στην περιτοναϊκή κοιλότητα , σε γυναίκες με ενδομητρίωση, κατάσταση που σχετίζεται με την υπογονιμότητα (Dziunycz *et al.*, 2008).

Γκρελίνη και έναρξη της ήβης

Η δυνητική συσχέτιση της γκρελίνης με την ανθρώπινη εφηβεία δεν έχει αξιολογηθεί άμεσα, αλλά ορμονικές αναλύσεις έδειξαν μια προοδευτική μείωση των κυκλοφορούντων επιπέδων της γκρελίνης με την πρόοδο της εφηβείας (Soriano-Guillén *et al.*, 2004).

Κατ' αρχήν, η μείωση αυτή θα μπορούσε να είναι συμβατή με μια δεσπόζουσα ανασταλτική επίδραση της γκρελίνης στην εκδήλωση της εφηβείας: η μείωση των επιπέδων της γκρελίνης στο πλάσμα κατά τη διάρκεια της εφηβείας, όπως φαίνεται υπό ευνοϊκές συνθήκες, θα μπορούσε να παίζει έναν ευωδοτικό ρόλο στην εφηβική ωρίμανση.

Αλλωστε, διαδοχικές ενέσεις γκρελίνης σε άρρενες αρουραίους, σε δύο διαφορετικά δοσολογικά σχήματα, κατά τη διάρκεια της εφηβικής μετάβασης μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα LH και τεστοστερόνης του ορού, και εν μέρει καθυστέρησαν το διαχωρισμό βάλανου-ακροποσθίας (ένα εξωτερικό δείκτης έναρξης της εφηβείας) (Fernández-Fernández *et al*, 2005).

Αντιθέτως, πειραματικά δεδομένα σε αρουραίους δείχνουν ότι η ήβη στα θήλεα είναι λιγότερο ευαίσθητη στις επιδράσεις της γκρελίνης παρόλο που υψηλές δόσεις γκρελίνης, όπως 1 nmol γκρελίνης (ή UAG) δύο φορές την ημέρα για 7 μέρες, αρκεί για να καθυστερήσει η διάνοιξη του κόλπου σε θηλυκούς αρουραίους (M Tena-Sempere, unpublished data).

Γκρελίνη και PCOS

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) είναι μια πολύπλοκη ενδοκρινική νόσος που επηρεάζει το 5-10% όλων των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας. Το PCOS εκδηλώνεται ως δυσλειτουργία του κύκλου και στείρωση, μαζί με βιοχημικά και κλινικά στοιχεία υπερανδρογονισμού. (Moran *et al.*, 2004). Οι ασθενείς με PCOS επίσης συχνά παρουσιάζουν μεταβολικές μεταβολές, συμπεριλαμβανομένης της κοιλιακής παχυσαρκίας και αντίσταση στην ινσουλίνη.

Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τη σχέση της κυκλοφορούσας γκρελίνης αναφορικά με τις συγκεντρώσεις της στα ορμονικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά σε γυναίκες με PCOS. Σε μερικές μελέτες, τα επίπεδα της γκρελίνης στη νηστεία βρέθηκαν μειωμένα σε γυναίκες με PCOS συγκριτικά με εκείνες που ήταν μάρτυρες (Schofl *et al.*, 2002). Μια αρνητική συσχέτιση ανιχνεύθηκε ανάμεσα στην κυκλοφορούσα γκρελίνη και στα επίπεδα των ανδρογόνων στο ανθρώπινο πλάσμα. Παράλληλα, με τη μείωση των κυκλοφορούντων ανδρογόνων υπό θεραπεία με αντιανδρογόνα (φλουταμίδα), τα επίπεδα της γκρελίνης αυξήθηκαν αξιοσημείωτα στην ομάδα της φλουταμίδης, ενώ τα επίπεδα της γκρελίνης παρέμειναν ίδια στην ομάδα που πήρε placebo (Cambineri *et al.*, 2003).

Δεδομένης της συσχέτισης του PCOS με την παχυσαρκία διάφορες μελέτες έχουν διερευνήσει τα επίπεδα της γκρελίνης στην κυκλοφορία σε γυναίκες με PCOS. Σε σύγκριση με φυσιολογικές γυναίκες αυτά έχουν βρεθεί να είναι μειωμένα σε PCOS γυναίκες με αντίσταση στην ινσουλίνη ανεξάρτητα από το

BMI (Scholf et al., 2002) και σε παχύσαρκες PCOS γυναίκες συγκριτικά με παχύσαρκες υγιείς (Pagotto et al., 2002) και να συσχετίζονται αρνητικά με την αντίσταση στην ινσουλίνη (Scholf et al., 2002; Pagotto et al., 2002).

Η αρνητική συσχέτιση μεταξύ γκρελίνης και ανδροστενδιόνης τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε γυναίκες με PCOS (Pagotto et al., 2002) δεν διαπιστώθηκε σε όλες τις σχετικές μελέτες (Scholf et al., 2002; Origo et al., 2003). Ωστόσο οι Origo και συν. (2003) στη μελέτη τους δεν βρήκαν διαφορές στα κυκλοφορούντα επίπεδα της γκρελίνης μεταξύ PCOS και φυσιολογικών γυναικών και καμία συσχέτιση με την αντίσταση στην ινσουλίνη και τα ανδρογόνα.

Το αν αυτές οι αλλαγές είναι η αιτία ή η συνέπεια των μεταβολικών και ενδοκρινικών μεταβολών του PCOS παραμένει να διασαφηνιστεί. Ετσι, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι η πληθώρα των ανδρογόνων στο PCOS έχει σαν άμεσο αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων της γκρελίνης, το οποίο με τη σειρά του έχει σχετιστεί με μια τροποποίηση της πείνας και του κορεσμού που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στην αυξημένη συχνότητα παχυσαρκίας σε αυτές τις ασθενείς. Επίσης, η μείωση της γκρελίνης (ως κεντρικό ανασταλτικό μήνυμα για τον γοναδοτροπικό άξονα) θα μπορούσε να παίζει ένα δυσλειτουργικό ρόλο στην έκκριση των γοναδοτροπινών και την υπερδιέγερση των ωοθηκών που παρατηρείται σε αυτό το σύνδρομο.

Τέλος, οι αρχικές ενδείξεις δείχνουν ότι ωοθηκική έκφραση γκρελίνης ενδέχεται να είναι τροποποιημένη σε ασθενείς με PCOS, ένα φαινόμενο το οποίο έχει φυσιοπαθολογικό ενδιαφέρον και αξίζει να ερευνηθεί

Πρόσφατα, δεν φάνηκε συσχέτιση μεταξύ κάποιων μεταλλάξεων του γονιδίου της γκρελίνης (Leu72Met και Arg51Gln) και του PCOS (Wang et al., 2009).

Συμπεράσματα

Η γκρελίνη έχει πλέον αναδειχθεί ως ένας πλειοτροπικός νευροενδοκρινικός ρυθμιστής που εμπλέκεται στον έλεγχο ενός ευρέος φάσματος βιολογικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένου της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης και της ενεργειακής ισορροπίας. Επιπλέον, αυξάνονται οι ενδείξεις ότι η γκρελίνη μπορεί να λαμβάνει μέρος στη ρύθμιση διαφορετικών παραμέτρων στην αναπαραγωγική λειτουργία. Η συστηματική παραγόμενη από το έντερο ορμόνη, με πιθανές δράσεις σε διαφορετικά επίπεδα στον άξονα υποθάλαμος-υπόφυση- γονάδες, και η τοπικά παραγόμενη γκρελίνη, που μπορεί να εκτελεί πρόσθετους αυτοκρινείς/παρακρινείς ρόλους στον έλεγχο της λειτουργίας των γονάδων. Συνολικά, έχει προταθεί ότι η γκρελίνη μπορεί να συνεργάζεται με άλλα ρυθμιστικά σήματα, που θα αναλυθούν στη συνέχεια, όπως οι παραγόμενες από το λιπώδη ιστό ορμόνες λεπτίνη (δεν αναλύεται εκτενώς), αντιπυονεκτίνη και ρεζιστίνη σε έναν ολοκληρωμένο έλεγχο της ενεργειακής ισορροπίας και της αναπαραγωγής.

Ο λιπώδης ιστός ως ενδοκρινές όργανο

Η εδραιωμένη άποψη για την παθητική λειτουργία του λιπώδους ιστού έχει αναθεωρηθεί ριζικά από το 1994 και μετέπειτα. Η ανακάλυψη της λεπτίνης, μιας παραγόμενης από το λιπώδη ιστό ουσίας με μεγάλο εύρος δράσεων, απέδειξε ότι ο λιπώδης ιστός είναι ικανός να εκπέμπει σήματα που ρυθμίζουν την πρόσληψη τροφής και το ενεργειακό ισοζύγιο. Έκτοτε, έχει διαπιστωθεί ότι τα κύτταρα του λιπώδους ιστού παράγουν και εκκρίνουν πολυάριθμα μόρια στο περιβάλλον τους, με σκοπό τη ρύθμιση φυσιολογικών λειτουργιών. Παρόλο που η ποσότητα των εκκρινόμενων ουσιών από κάθε κύτταρο είναι πολύ μικρή, και με δεδομένο ότι ο λιπώδης ιστός συνολικά αποτελεί το μεγαλύτερο όργανο του ανθρώπινου σώματος, η ολική ποσότητα των ουσιών είναι ικανή να επηρεάσει σημαντικές λειτουργίες. Επιπλέον, η πυκνή αιμάτωση του λιπώδους ιστού επιτρέπει στις ουσίες που παράγονται να δρουν τόσο με αυτοκρινή και παρακρινή όσο και με ενδοκρινή τρόπο.

Οι εκκρινόμενοι από το λιπώδη ιστό – ειδικά το λευκό – παράγοντες ασκούν δράση σε ποικίλα βιολογικά συστήματα, όπως στην ενεργειακή ομοιόσταση (μεταβολισμός λιπιδίων, ευαισθησία στην ινσουλίνη, ρύθμιση της όρεξης, θερμογένεση), στο ανοσοποιητικό σύστημα, στην αναπαραγωγική λειτουργία, στην αιμόσταση, στην αρτηριακή πίεση και στην αγγειογένεση. Ο λιπώδης ιστός, πλέον, λόγω της σημαντικής εκκριτικής λειτουργίας και του ορμονικού ελέγχου πολλών λειτουργιών, θεωρείται ως ένας μεγάλος ενδοκρινής αδένας

– μάλιστα συχνά αναφέρεται και ως «λιπώδες όργανο» (Hauner et al., 2004; Ronti et al., 2006; Sethi et al., 2007) (Σχήμα 4).

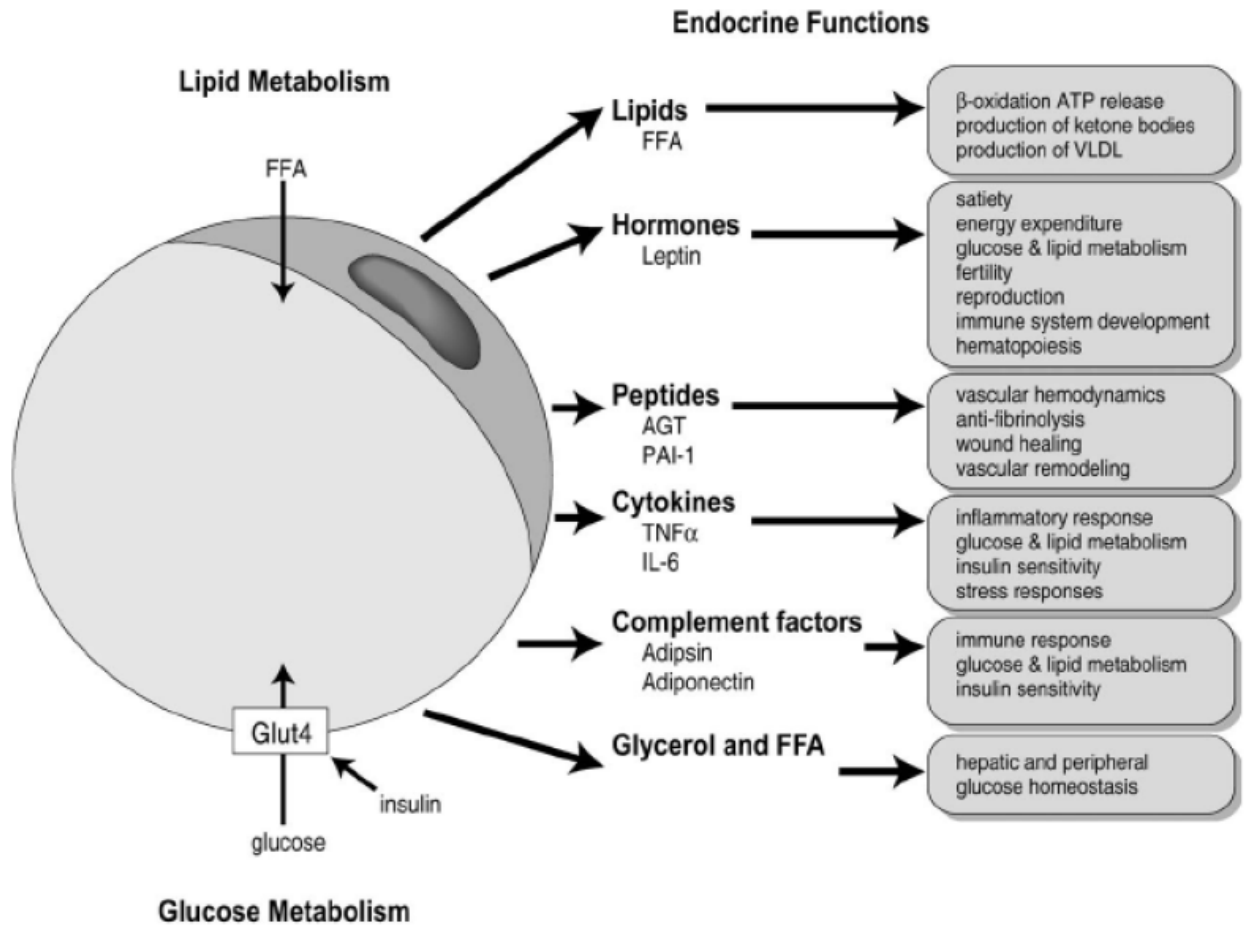
Σημαντική για τη ρύθμιση της λειτουργίας του λιπώδους ιστού είναι η παρουσία κυττάρων του στρώματος του λιπώδους ιστού εκτός από αυτή των λιποκυττάρων. Αυτά περιλαμβάνουν περικύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (περιλαμβανομένων των προλιποκυττάρων). Πολλά από τα κύτταρα του στρώματος και κυρίως τα μακροφάγα, τα προλιποκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα συμβάλλουν στην παραγωγή ορισμένων από τα εκκριτικά προϊόντα του λιπώδους ιστού (Hauner et al., 2004; Sethi et al., 2007).

Εκκριτικά προϊόντα του λιπώδους ιστού

Η αναγνώριση πολυάριθμων εκκριτικών προϊόντων του λιπώδους ιστού καθιστά σαφή την ύπαρξη ενός άρτιου δικτύου επικοινωνίας του λιπώδους ιστού με άλλους ιστούς και όργανα, όπως οι σκελετικοί μύες, ο φλοιός των επινεφριδίων, ο εγκέφαλος και το συμπαθητικό νευρικό σύστημα, με σκοπό τη ρύθμιση πληθώρας βιολογικών λειτουργιών. Η ετερογένεια των προϊόντων που εκκρίνει ο λιπώδης ιστός είναι αξιοσημείωτη. Τα λιποκύτταρα, εκτός από πεπτιδία και πρωτεΐνες, εκκρίνουν προσταγλανδίνες, στεροειδείς ορμόνες και πιθανόν και άλλα μη πρωτεϊνικά, χαμηλού μοριακού βάρους μόρια που συμμετέχουν στις πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ λιποκυττάρων και άλλων οργάνων.

Τα πλέον ενδιαφέροντα εκκρινόμενα προϊόντα του λιπώδους ιστού από φυσιολογική άποψη είναι οι *λιποκίνες*. Με τον όρο αυτό περιγράφονται όλα τα πρωτεϊνικής φύσης μόρια που συντίθενται και εκκρίνονται από τα λιποκύτταρα (Trayhurn et al., 2004). Είναι αξιοσημείωτη η δομική και λειτουργική ετερογένεια, ακόμα και μεταξύ των λιποκινών.

Έτσι, οι λιποκίνες περιλαμβάνουν κλασικές κυτταροκίνες (όπως ο TNF-α και η IL-6), χημειοκίνες (όπως η MCP-1), πρωτεΐνες της εναλλακτικής οδού του συμπληρώματος (όπως η adipsin), πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αγγειακή αιμόσταση (όπως ο PAI-1), τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης (όπως το αγγειοτενσινογόνο), την ομοιόσταση της γλυκόζης (όπως η RBP και η αντιπονεκτίνη και ρεζιστίνη), τη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής (όπως η λεπτίνη), την αγγειογένεση (όπως ο VEGF), αλλά και νεότερα μόρια (όπως η visfatin και η apelin) (Ronti et al., 2006; Trayhurn et al., 2006) (Σχήμα 5).



Σχήμα 4. Οι σημαντικότερες λειτουργίες του λευκού λιποκυττάρου

Λιποκίνη	Μεταβολικές δράσεις	Αγγειακές δράσεις	Ανοσολογικές δράσεις	Μεταβολή στην παχυσαρκία
TNF-α	<ul style="list-style-type: none"> Απελευθέρωση FFAs από τα λιποκύτταρα Ινσουλινοαντίσταση Ελάττωση σύνθεσης adiponectin 	<ul style="list-style-type: none"> Επαγωγή ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας Ελάττωση της επαγόμενης από το NO αγγειοδιαστολής 	<ul style="list-style-type: none"> Ενεργοποίηση NF-κB Αύξηση έκφρασης μορίων προσκόλλησης 	<ul style="list-style-type: none"> Αύξηση
IL-6	<ul style="list-style-type: none"> Αναστολή γλυκονογένεσης Αύξηση ηπατικής de novo σύνθεσης FFAs και χοληστερόλης Ινσουλινοαντίσταση 	<ul style="list-style-type: none"> Αύξηση επιπέδων ινωδογόνου 	<ul style="list-style-type: none"> Αύξηση παραγωγής πρωτεϊνών οξείας φάσης 	<ul style="list-style-type: none"> Αύξηση
PAI1		<ul style="list-style-type: none"> Ελάττωση ινωδόλυσης 		<ul style="list-style-type: none"> Αύξηση (σπλαχνική παχυσαρκία)
Leptin	<ul style="list-style-type: none"> Σήμα κορεσμού Αναστολή λιπογένεσης Διέγερση λιπόλυσης Βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη 	<ul style="list-style-type: none"> Αγγειοδιαστολή (NO) Αγγειοσυσπασση (ΣΝΣ) Αύξηση επιπλοκών αρτηριακής υπέρτασης (χρόνια υπερλεπτιναμία) 	<ul style="list-style-type: none"> Αύξηση παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών Ρύθμιση επίκτητης ανοσίας 	<ul style="list-style-type: none"> Αύξηση
Resistin	<ul style="list-style-type: none"> Ινσουλινοαντίσταση (πειραματόζωα) Ελάττωση πρόσληψης και μεταβολισμού λιπαρών οξέων στους σκελετικούς μύες 	<ul style="list-style-type: none"> Απελευθέρωση ET-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα 	<ul style="list-style-type: none"> Αυξημένη έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών και μορίων προσκόλλησης 	<ul style="list-style-type: none"> Αύξηση
Adiponectin	<ul style="list-style-type: none"> Αύξηση ευαισθησίας στην ινσουλίνη Ελάττωση τριγλυκεριδίων στους σκελετικούς μύες 	<ul style="list-style-type: none"> Προφύλαξη από το σχηματισμό neo-intima Ελάττωση πολλαπλασιασμού και μετανάστευσης των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων Ελάττωση μετατροπής μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα 	<ul style="list-style-type: none"> Ελάττωση έκφρασης μορίων προσκόλλησης Αναστολή ενεργοποίησης NF-κB Ανταγωνισμός δράσης TNF-α Ελάττωση προσκόλλησης μακροφάγων στο ενδοθήλιο 	<ul style="list-style-type: none"> Ελάττωση
Visfatin	<ul style="list-style-type: none"> Ινσουλινομιμητική δράση 		<ul style="list-style-type: none"> Αύξηση της visfatin στη PA 	<ul style="list-style-type: none"> Αύξηση
Apelin	<ul style="list-style-type: none"> Πιθανό σήμα κορεσμού Ελάττωση της επαγόμενης από τη γλυκόζη έκκρισης ινσουλίνης 	<ul style="list-style-type: none"> Αγγειοδιασταλτική δράση (NO) Αγγειοσυσπαστική δράση (AMK) 		<ul style="list-style-type: none"> Αύξηση

Σχήμα 5. Οι δράσεις των κυριότερων λιποκινών

Παχυσαρκία και γονιμότητα

Παρά το γεγονός ότι η μάζα του λιπώδους ιστού είναι ζωτικής σημασίας και είναι απαραίτητη για την φυσιολογική ανάπτυξη της αναπαραγωγικής λειτουργίας του θήλεος, η παχυσαρκία έχει δείξει ότι προκαλεί διαταραχές της εμμήνου ρύσεως και υπογονιμότητα. Η υπερβολική παχυσαρκία και η άνιση κατανομή του λίπους είναι σημαντικοί παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα. Παχύσαρκες γυναίκες, ιδίως αυτές με κεντρικού τύπου παχυσαρκία, παρουσιάζουν ισουλινοαντοχή και υπερινσουλιναίμια, υπερανδρογοναιμία, αυξημένη περιφερική αρωματοποίηση των ανδρογόνων έναντι των οιστρογόνων, μειωμένη αυξητική ορμόνη (GH) και τον παράγοντα που μοιάζει την ινσουλίνη (insulin like growth factor binding proteins-IGFBPs), αυξημένα επίπεδα λεπτίνης και άλλες μεταβολές στην νευρορύθμιση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες. Αυτά έχουν παρατηρηθεί ως μερικοί από τους συνδετικούς κρίκους στην ακολουθία των γεγονότων της διαταραγμένης λειτουργίας των ωοθηκών. Μια σημαντική αναλογία στο στείρο ή στον υπογόνιμο γυναικείο πληθυσμό είναι παχύσαρκες ή υπέρβαρες (Norman and Clark., 1998;Crosignani et al., 2002) συνοδευόμενες από μια πληθώρα επιπλοκών στο αναπαραγωγικό σύστημα, συμπεριλαμβανομένου τη δυσλειτουργία της εμμήνου ρύσεως και την ανωθηλακιορρηξία (Lake et al., 1997) και τις αποβολές (Wang et al., 2002). Η ανάπτυξη της παχυσαρκίας και της ισουλινοαντοχής κοινώς συμβαδίζουν με την ανάπτυξη των προβλημάτων γονιμότητας, και αυτός ο συνδετικός κρίκος ανάμεσα στη μεταβολική κατάσταση και την υπογονιμότητα θα διευκρινισθεί παρακάτω.

ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗ

γενικά

Η αντιπονεκτίνη αποτελείται από 244 αμινοξέα και το γονίδιο της (apM1) αρχικά θεωρήθηκε ότι εκφράζεται αποκλειστικά στο WAT (Saito et al., 1999). Πιο πρόσφατα έχει διαπιστωθεί η έκφραση του και στον καφεοειδή λιπώδη ιστό (BAT)(Viengchareun et al., 2002).

Η αντιπονεκτίνη κυκλοφορεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα του ανθρώπου (σε επίπεδα $\mu\text{g/ml}$) και αντιπροσωπεύει περίπου το 0,01% της συνολικής πρωτεΐνης του πλάσματος (Arita et al., 1999). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η αντιπονεκτίνη έχει αντιαθηρωγενετικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και σε αντίθεση με τις άλλες adipocytokines τα επίπεδα της στην κυκλοφορία έχουν βρεθεί να μειώνονται και όχι να αυξάνουν στην παχυσαρκία, το ΣΔ τύπου II και την καρδιαγγειακή νόσο. Η αντιπονεκτίνη μειώνει την υπεργλυκαιμία όχι με διέγερση της έκκρισης ινσουλίνης αλλά με αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη (μέσω αύξησης της οξειδωσης των λιπιδίων, άμεσης βελτίωσης της αγωγής του σήματος της ινσουλίνης τόσο στον υποδοχέα της όσο και μετά τον υποδοχέα, καταστολή της γλυκονεογένεσης και καταστολή του σήματος του TNF- α στο λιπώδη ιστό (Beltowski et al., 2003).

Σε ανθρώπους με αντίσταση στην ινσουλίνη, η χορήγηση ευαισθητοποιητών της ινσουλίνης αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης του ορού (Maeda et al., 2001).

Βιολογία

Η αντιπονεκτίνη είναι λιποκίνη που εμφανίζει δομική ομολογία με μια οικογένεια πρωτεϊνών η οποία χαρακτηρίζεται από μια αμινοτελική περιοχή ομοιάζουσα με το κολλαγόνο και μια σφαιρική καρβοξυτελική περιοχή ομοιάζουσα με τον παράγοντα C1q του συμπληρώματος. Απαντά τόσο σε μορφή πλήρους μήκους, όσο και ως κλάσμα πρωτεολυτικής διάσπασης, που αποτελείται από τη σφαιρική καρβοξυτελική περιοχή και είναι γνωστό ως σφαιρική (globular) αντιπονεκτίνη. Η λιποκίνη στη μορφή πλήρους μήκους απαντά ως τριμερές [χαμηλού μοριακού βάρους (LMW) αντιπονεκτίνη], ως εξαμερές αποτελούμενο από δύο τριμερή συνδεδεμένα με δισουλφιδικό δεσμό [μεσαίου μοριακού βάρους (MMW) αντιπονεκτίνη] και ως υψηλού μοριακού βάρους (HMW) 12- έως 18-μερές. Παρόλο που η σύνθεσή της γίνεται κυρίως από τα λιποκύτταρα, η αντιπονεκτίνη έχει βρεθεί πως επιπλέον εκφράζεται σε σκελετικά μυϊκά κύτταρα, μυοκαρδιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα . Η συγκέντρωσή της στον ορό του ανθρώπου είναι αρκετά υψηλή (5-10 mg/ml) συγκρινόμενη με αυτή της λεπτίνης, η οποία κυκλοφορεί σε επίπεδα της τάξης ng/ml. Οι συγκεντρώσεις της αντιπονεκτίνης στην κυκλοφορία συσχετίζονται αρνητικά με το σωματικό λίπος στα θηλαστικά (Tortorello et al., 2007).

Τα επίπεδά της αντιπονεκτίνης είναι σημαντικά ελαττωμένα σε άτομα με σπλαχνική παχυσαρκία (Matsuzawa et al., 2006), καθώς και σε καταστάσεις

ινσουλινοαντίστασης όπως η μη αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος, η αθηροσκλήρωση και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2. Στις συγκεκριμένες περιπτώσεις, τα επίπεδα της λιποκίνης είναι αντιστρόφως ανάλογα της ινσουλινοαντίστασης (Pineiro et al., 2005; Waki et al., 2005; Arita et al., 1999).

Περαιτέρω, οι γυναίκες παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα κυκλοφορίας σε σχέση με τους άνδρες, και η απώλεια βάρους και στους δύο χαρακτηρίζεται από αυξήσεις στην αντιπυονεκτίνη στο πλάσμα (Berg et al., 2002).

Ενώ οι συγκεντρώσεις της λεπτίνης στην κυκλοφορία παρουσιάζουν ημερήσιες διακυμάνσεις, και μετά το γεύμα ανυψώσεις, η αντιπυονεκτίνη δεν παρουσιάζει ημερήσια σημαντική απόκλιση, (Yang et al., 2002) προτείνοντας ότι η έκκριση της δεν είναι άμεσα ρυθμιζόμενη.

In vivo και in vitro έρευνες έχουν δείξει ότι αντιπυονεκτίνη ασκεί ένα ευρύ φάσμα επιδράσεων σε ιστούς-στόχους, με καλύτερα μελετημένες την ευαισθητοποίηση στην ινσουλίνη, (Kadowaki et al., 2005) καθώς και οι αντιαθηρωγενετικές και αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις (Tilg et al., 2006).

Τρεις υποδοχείς έχουν βρεθεί με βάση την ικανότητά τους να δεσμεύουν την αντιπυονεκτίνη, AdipoR1 και AdipoR2, με κύρια έκφραση στους σκελετικούς μύες, το ήπαρ (Yamauchi et al., 2003) και τα παγκρεατικά β κύτταρα, καθώς και ο υποδοχέας της T-cadherin που εκφράζεται σε πολλά είδη κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών και των λείων μυικών κυττάρων – εμφανίζει και λειτουργία υποδοχέα για τις μεσαίου και μεγάλου μοριακού βάρους μορφές αντιπυονεκτίνη, αλλά όχι για τη σφαιρική ή την τριμερή (χαμηλού μοριακού βάρους) μορφή της (Kadowaki et al., 2006). Η

αντιπυονεκτίνη με τη μορφή πλήρους μήκους συνδέεται με τους AdipoR2, ενώ η σφαιρική μορφή πιστεύεται ότι συνδέεται εκλεκτικά με τους AdipoR1 (Kadowaki et al., 2006).

Αντιπυονεκτίνη και το μεταβολικό σύνδρομο

Η κατάσταση που είναι γνωστή ως μεταβολικό σύνδρομο έχει συσχετιστεί με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο και βασίζεται σε ένα σύμπλεγμα συμπτωμάτων τα οποία περιλαμβάνουν την παχυσαρκία, υπερινσουλαιμία, αντίσταση στην ινσουλίνη, αθηρωγένεση, δυσλιπιδαιμία και αυξημένη αρτηριακή πίεση (Johnson et al., 2006). Κάθε ένα από αυτά τα συμπτώματα, συσχετίζεται με την υποαντιπυονεκτιναιμία, καθώς αυτή η αντιπυοκίνη είναι ελαττωμένη στην κοιλιακή παχυσαρκία και σε συνθήκες που συνυπάρχουν με χρόνια αντίσταση στην ινσουλίνη, αθηροσκλήρωση και αρτηριακή υπέρταση (Matsuzawa et al., 2006). Ενώ ο συσχετισμός δεν αποδεικνύει και την αιτιολογική συνάφεια, οι μελέτες σε ποντίκια που φέρουν μεταλλάξεις του γονιδίου της αντιπυονεκτίνης δείχνουν ότι η αποκόλληση του παρόντος γονιδίου της λιποκίνης, παρ' όλα αυτά, επηρεάζει την αντίσταση στην ινσουλίνη (Maeda et al., 2002). Εξάλειψη του μεταβολικού συνδρόμου σε αυτά τα ποντίκια μπορεί να επιτευχθεί με έκτοπη έκφραση της αντιπυονεκτίνης. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στο συμπέρασμα των Matsuzawa και συν. ότι η ανεπάρκεια αντιπυονεκτίνης, είτε οφείλεται σε συσσώρευση λίπους ή γενετική παραλλαγή, αποτελεί βασικό παράγοντα για

την ανάπτυξη του μεταβολικού συνδρόμου. Όπως θα συζητηθεί αναλυτικά στη συνέχεια, το μεταβολικό σύνδρομο και υποαντιπυονεκτιναιμία συνδέονται έντονα με την εμφάνιση του PCOS, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ανεπάρκεια αυτής της αντιπυοκίνης παίζει ρόλο σε αυτή τη διαταραχή των ωοθηκών.

Αντιπυονεκτίνη και PCOS

Το PCOS έχει χαρακτηριστεί ως μία φλεγμονώδης κατάσταση λόγω των υψηλών επιπέδων CRP και IL-6 (Morin-Parunnen et al., 2003; Kelly et al., 2001; Fenkci et al., 2003) και η χορήγηση EE+drosipirenone για 3 μήνες προκαλεί σημαντική μείωση στα επίπεδα αντιπυονεκτίνη εφήβων γυναικών και τάση για μείωση τους σε νέες γυναίκες με PCOS (Ibanez and De Zegher., 2004).

Ωστόσο δεν έχουν βρεθεί διαφορές στα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης στην κυκλοφορία μεταξύ PCOS με αντίσταση στην ινσουλίνη και φυσιολογικών γυναικών παρομοίου BMI (Orio et al., 2003; Panidis et al., 2003) υποδηλώνοντας ότι η αντιπυονεκτίνη πιθανότατα δεν εμπλέκεται στην παθογένεση του συνδρόμου. Στην μελέτη των Panidis και συν. (2003) στις γυναίκες με PCOS δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση της αντιπυονεκτίνης με τις γοναδοτροφίνες αλλά συσχετιζόνταν αρνητικά με τη Δ4-ανδροστενδιόνη.

Αποδεικτικά στοιχεία για τις επιπτώσεις της αντιπυονεκτίνης στην ανθρώπινη ωοθήκη, προέρχονται επίσης, από την παρατήρηση των μειωμένων επιπέδων αντιπυονεκτίνης σε γυναίκες με PCOS, ανεξάρτητα των αιτίων της

παχυσαρκίας (Carmina et al., 2005; Ardawi et al., 2005). Ο συσχετισμός είναι λιγότερο σαφής, καθώς το PCOS όπως και η παχυσαρκία μπορούν να προκαλέσουν υπερανδρογοναιμία, και η σύνθεση αντιπυονεκτίνης του λιπώδη ιστού μειώνεται από τα ανδρογόνα. (Seftel et al., 2005) Ωστόσο, γονιδιωματικού περιεχομένου μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι η υποαντιπυονεκτιναιμία είναι ένα από τα αίτια του PCOS (Haar et al., 2005).

Πράγματι, βραχυχρόνια θεραπεία με μεθορμίνη, μια διγουανίδη που αυξάνει την περιφερική ευαισθησία στην ινσουλίνη, βελτιώνει θεαματικά τόσο την αυτόματη όσο και την επικουρούμενη με κλομιφαίνη ωοθυλακιορρηξία σε PCOS ασθενείς (Nestler et al., 1998). Παρατεταμένες θεραπείες είχαν αποτέλεσμα την αποκατάσταση των καταμήνιων κύκλων, σε ορισμένες ανωοθυλακιορρηκτικές ασθενείς με PCOS και μείωσαν τα κυκλοφορούντα ανδρογόνα (Pasquali R et al., 2000).

Αντιπυονεκτίνη και κύηση

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα σχετικά με τις μεταβολές των επιπέδων της αντιπυονεκτίνης κατά τη φυσιολογική κύηση και σε μια μελέτη (Combs et al., 2003) σε ποντίκια βρέθηκε μείωση των επιπέδων της από το μέσο της κύησης μέχρι τον απογαλακτισμό. Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα οι συγκεντρώσεις της προλακτίνης και των πλακουντιακών prolactin-like ορμονών αυξάνουν στην κυκλοφορία υποδηλώνοντας την κατασταλτική τους επίδραση στην έκκριση της αντιπυονεκτίνης. Αφ'ετέρου έχει βρεθεί ότι από μόνη της η υπερπρολακτιναιμία μπορεί να σχετίζεται με την αντίσταση στην

ινσουλίνη η οποία μπορεί να αντιμετωπίζεται επιτυχώς με αγωνιστές ντοπαμίνης (Ben-Jonathan and Hnasko., 2001).

Η αντιπυονεκτίνη στην κυκλοφορία εγκύων με ΣΔ κύησης έχει βρεθεί να είναι μειωμένη σε σύγκριση με φυσιολογικές έγκυες (Ranheim et al., 2004) και αυτή η μείωση προηγείται και μπορεί να προβλέψει την εμφάνιση ΣΔ κύησης (Williams et al., 2004). Γυναίκες με ιστορικό ΣΔ κύησης εξακολουθούν να έχουν μειωμένα επίπεδα αντιπυονεκτίνης στην κυκλοφορία (Winzer et al., 2004). Τα επίπεδα της έχουν βρεθεί να μην μεταβάλλονται κατά τη φυσιολογική κύηση (τρίτο τρίμηνο) σε σύγκριση με τις τιμές τους μετά τον τοκετό αλλά έχουν βρεθεί παραδόξως αυξημένα σε προεκλαμπτικές κυήσεις σε σχέση με φυσιολογικές (Ramsay et al., 2003).

Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν, ότι η αντιπυονεκτίνη μπορεί επίσης να δραστηριοποιείται στους τομείς της μήτρας και του πλακούντα. Και οι δύο υποδοχείς AdipoR1 και R2 εκφράζονται ιδιαίτερα στο ενδομήτριο των γουρουινιών (Lord et al., 2005).

Στο ανθρώπινο ενδομήτριο, AdipoR1 και R2 είναι παρόντες στο επιθήλιο του ενδομητρίου και των αδένων, καθώς και σε στρωματικούς ινοβλάστες, μεταγραφικές πρωτεΐνες υπήρχαν σε αφθονία και για τους δύο υποδοχείς και ήταν υψηλότερες κατά τη διάρκεια της εκκριτικής φάσης του κύκλου (Takemura et al., 2006). Έρευνες στον πλακούντα έχουν αποδείξει ότι και οι δύο υποδοχείς είναι παρόντες στο ανθρώπινο και στον πλακούντα του ποντικίου (Caminos et al., 2005). Σε μελέτες του AdipoR2 κατά τη διάρκεια της κύησης, αναφέρθηκε ότι η ανθρώπινη

κυτταροτροφοβλάστη και συγκυτιοτροφοβλάστη, καθώς και το στρώμα του ενδομητρίου, εξέφρασε την παρούσα μορφή του υποδοχέα. Μελέτες έχουν περαιτέρω αποδείξει ότι η τροφοβλάστη και ο πλακούντας είναι τοπικές πηγές έκφρασης αντιπυονεκτίνης (Chen et al., 2006). In vitro μελέτες σε ιστούς ανθρώπινο τελειόμηνου πλακούντα δείχνουν ότι η αντιπυονεκτίνη μπορεί να εκκρίνεται (Lappas et al., 2005) και ότι ρυθμίζει προς τα άνω (upregulates) την απελευθέρωση πλακουντιακών κυτοκινών. Όλες αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ένα έντονα παρακρινικό ρόλο της αντιπυονεκτίνης στην πλακουντιακή λειτουργία.

Η τοπική ή η περιφερειακή αντιπυονεκτίνη μπορούν να επηρεάσουν το σχηματισμό του πλακούντα. Η προεκλαμψία είναι μία κατάσταση διαταραχής του πλακούντα, μη-προλαμβανόμενη, που χαρακτηρίζεται, κατά την τελευταία στάδια της κύησης, από υπέρταση και από μητρική πρωτεϊνουρία. Προκύπτει από ανεπαρκή σχηματισμό του πλακούντα κυρίως από την ανεπαρκή αγγειακή εισβολή που ακολουθεί την εμφύτευση του εμβρύου (Redman et al., 2005). Η παχυσαρκία αποτελεί παράγοντα κινδύνου, για την προεκλαμψία, όπως είναι και το μεταβολικό σύνδρομο (Ray et al., 2005). Υπάρχουν γονιδιωματικού τύπου αποδείξεις ότι η κατάσταση αυτή συνδέεται με ένα από τους ίδιους πολυμορφισμούς του γονιδίου της αντιπυονεκτίνης, SNP276, που συσχετίζεται με ωθητικές διαταραχές (Saarela et al., 2006). Οι λίγες μελέτες που αποδεικνύουν ότι το κυκλοφορούν προφίλ της ανθρώπινης αντιπυονεκτίνης ποικίλλει κατά τη διάρκεια της κύησης είναι αντιφατικές. Οι Fuglsang και συν.(2006) έδειξαν διακυμάνσεις, με μέγιστες τιμές στα μέσα της εγκυμοσύνης, ενώ οι Suwaki και συν. (2006) δεν ανέφεραν διαφορές κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης κύησης. Μελέτες σε αρουραίους

υποστηρίζουν την άποψη του τελευταίου, της μη ειδικής διακύμανσης της αντιπονεκτίνης κατά τη διάρκεια της κύησης (Caja et al., 2005). Υπάρχουν, ωστόσο, ισχυρές ενδείξεις για τη σύνδεση της υποαντιπονεκτιναιμίας κατά το πρώτο τρίμηνο με τη προεκλαμψία, σε σύγκριση με τα επίπεδα που βρέθηκαν σε φυσιολογικές εγκυμοσύνες (D'Anna et al., 2006). Η εικόνα αντιστρέφεται στο τέλος της εγκυμοσύνης, όπου η προεκλαμψία συνδέεται με υπεραντιπονεκτιναιμία (Caja et al., 2005).

Άλλες μελέτες αναφέρουν ότι υποαντιπονεκτιναιμία και προεκλαμψία σχετίζονται μόνο όταν η παχυσαρκία (Suwaki et al., 2006) και ο διαβήτης κύησης (Thyfault et al., 2005) είναι παρόντες ως παράγοντες κινδύνου.

Αντιπονεκτίνη και στεροειδή του φύλου

Η οιστραδιόλη του ορού συσχετίζεται αρνητικά με τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης σε υγιείς γυναίκες ανεξάρτητα από το BMI, την ηλικία και την κατάσταση προ- ή μετ-εμμηνόπαυσης και μετά την εμμηνόπαυση τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης αυξάνουν (Gavrila et al., 2003). Στην ίδια μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση των επιπέδων της αντιπονεκτίνης με την ημέρα του γεννητικού κύκλου αν και η ισχύς της μελέτης ήταν μειωμένη για αυτό τον έλεγχο. Ωστόσο στα διάφορα στάδια της εφηβείας η αντιπονεκτίνη δεν έδειξε σημαντικά συσχέτιση με την οιστραδιόλη παρά μόνο σε παχύσαρκα κορίτσια, ενώ σε αγόρια υπήρχε σημαντική αρνητική συσχέτιση της με την τεστοστερόνη (Bottner et al., 2004). Ένα πολύ σημαντικό εύρημα της μελέτης αυτής ήταν ότι η αντιπονεκτίνη ενώ μειώνεται με την πρόοδο της εφηβείας

(από το στάδιο Tanner 1 στο 5) στα αγόρια, αυτό δεν παρατηρήθηκε και στα κορίτσια υποδηλώνοντας το σημαντικό ρόλο των ανδρογόνων στη μείωση των επιπέδων της αντιπυονεκτίνης στον ορό.

Υψηλότερα επίπεδα αντιπυονεκτίνης έχουν βρεθεί σε γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες (Cnop et al., 2003; Yannakoulia et al., 2003) οδηγώντας στην υπόθεση ότι η έκκριση της αντιπυονεκτίνης ρυθμίζεται από τα στεροειδή των γονάδων.

Ωστόσο, προηγούμενες αναφορές, χρησιμοποιώντας διαφορετικά μοντέλα μελέτης, για να διερευνήσουν την επίδραση των οιστρογόνων στην έκκριση της αντιπυονεκτίνης, είναι αντιφατικές.

Τα μέχρι τώρα δεδομένα για τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου περιορίζονται σε δύο έρευνες, που έδειξαν είτε καμία μεταβολή (Kleiblova et al., 2006) είτε χαμηλότερα επίπεδα αντιπυονεκτίνης μετά την ωοθυλακιορρηξία (Galván et al., 2007).

Στα ποντίκια, η έκφραση του mRNA της αντιπυονεκτίνης στο περιγοναδικό λίπος καθώς και τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης στο πλάσμα δεν άλλαξαν καθ'όλη τη διάρκεια του κύκλου (Gui et al., 2004).

Ωστόσο, η μείωση του mRNA της αντιπυονεκτίνης στο περιγοναδικό λίπος μετά ωοθηκεκτομή ,και μια αύξηση του mRNA της αντιπυονεκτίνης μετά τη θεραπεία με E2, χωρίς σημαντική μεταβολή στο πλάσμα της αντιπυονεκτίνης υποδηλώνουν ότι ο μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης, της έκκρισης, και

κάθαρσης της αντιπυονεκτίνης από την κυκλοφορία είναι σύνθετος και παρέχει πολλούς τρόπους δυνατής ρύθμισης από τις ορμόνες του φύλου (Gui et al., 2004).

Επιδράσεις της αντιπυονεκτίνης στην αναπαραγωγή και τη γονιμότητα

Οι Lord et al., το 2005 χρησιμοποιώντας το μοντέλο χοίρου, πρώτοι κατέδειξαν ότι οι ωοθήκες των θηλαστικών και, ιδίως, το ωοθυλάκιο των ωοθηκών εκφράζει τόσο AdipoR1 όσο και AdipoR2. Η διαπίστωση αυτή επιβεβαιώθηκε σε αρουραίους αλλά και στις ανθρώπινες ωοθήκες (Campos et al., 2008). Θεραπεία στους αρουραίους με γοναδοτροπίνες με σκοπό να ωθήσουν την ανάπτυξη ωοθυλακίων και την ωοθυλακιορρηξία αύξησε την έκφραση AdipoR1 αλλά όχι και των R2 (Chabrolle et al., 2007). Η αντιπυονεκτίνη δεν φαίνεται να ρυθμίζει τον υποδοχέα της στα κοκκώδη κύτταρα των ωοθηκών (Ledoux et al., 2006). Οι ισομορφές της αντιπυονεκτίνης (τριμερής,εξαμερής και μεγάλου μοριακού βάρους) είναι παρούσες στο ωοθυλακικό υγρό σε γουρούνια (Ledoux et al., 2006) αλλά και σε ανθρώπους (Bersinger et al., 2006) σε συγκεντρώσεις που ισοδυναμούν με εκείνες που βρέθηκαν στον ορό.

Πρόσφατες μελέτες σε αρουραίους (Chabrolle et al., 2007) και κοτόπουλα (Chabrolle et al., 2007) αναφέρουν τοπική παραγωγή αντιπυονεκτίνης στα κύτταρα της θήκης, στα κοκκώδη και στα ωχρινικά κύτταρα των ωοθηκών. In vitro μελέτες έχουν δείξει ότι η ανασυνδυασμένη αντιπυονεκτίνη ,σε παρόμοια με τα φυσιολογικά επίπεδα, μπορεί να προκαλέσει έκφραση του γονιδίου της

και στεροειδογένεση , σε ωοθήκες θηλαστικών, ανεξάρτητα από την προέλευσή της (θηλαστικά ή βακτηριακή). Θεραπεία χοίρειων κοκκωδών κυττάρων *in vitro* με ανασυνδυασμένη αντιπυονεκτίνη επάγει την έκφραση ενός συμπλέγματος των πρωτεϊνών που συνδέονται με τη διαδικασία της ωορρηξίας, συμπεριλαμβανομένων της κυκλοοξυγενάσης- 2, προσταγλανδίνη E2 και του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF) (Ledoux et al., 2006)

Στην ωοθήκη του ποντικίου, η σύνθεση των στεροειδών ορμονών, οιστρογόνων και προγεστερόνης ρυθμίζεται προς τα άνω (upregulated) από την αντιπυονεκτίνη (Chabrolle et al., 2007).

Και στις δύο μελέτες, οι απαντήσεις στην αντιπυονεκτίνη ήταν συνεργικές με τις γοναδοτροπίνες , και οι Ledoux και συν. απέδειξαν περαιτέρω μια αλληλεπίδραση με ινσουλίνη. Ομοίως, σε ποντίκια, η αντιπυονεκτίνη είχε συνεργική δράση με τον αυξητικός παράγοντα της ινσουλίνης-1 (IGF-1) να προκαλέσει στεροειδογενετική έκφραση γονιδίων και στεροειδογένεση (Chabrolle et al., 2007). Έτσι, ενώ είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η αντιπυονεκτίνη μπορεί να προκαλέσει άμεσα έκφραση γονιδίων στις ωοθήκες, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ αντιπυονεκτίνης και ινσουλίνης ή IGF-1 είναι σύμφωνη με το ρόλο της αντιπυονεκτίνης σε άλλους ιστούς, που είναι, η ευαισθητοποίηση στην ινσουλίνη.

Τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης μειώνουν την παραγωγή προγεστερόνης και οιστραδιόλης από τα πρωτογενή κοκκώδη κύτταρα του ποντικού. Ωστόσο, ο μηχανισμός που οδηγεί σε μείωση της παραγωγής ωοθηκικών στεροειδών φαίνεται να είναι διαφορετικός. Επιπλέον, υποδοχείς της αντιπυονεκτίνης στα κύτταρα των ωοθηκών δεν ρυθμίζονται από την γλυκόζη (Chabrolle et al., 2008).

Σε καλλιέργεια κυττάρων της θήκης, η LH αύξησε ενώ ο IGF-I μείωσε την ποσότητα του ADIPOR2 mRNA. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι οι ανασταλτικές επιδράσεις της αντιπυονεκτίνης στην στεροειδογένεση είναι κυρίως εντοπισμένες στα κύτταρα της θήκης και ότι η απάντησή τους στην αντιπυονεκτίνη (δηλαδή, ADIPOR2) μπορεί να ρυθμιστεί από την LH και τον IGF-I (Iagaly et al., 2008).

Οι υποδοχείς αντιπυονεκτίνης AdipoR1 και AdipoR2, αλλά όχι η αντιπυονεκτίνη, είναι παρόντες σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα. Η αντιπυονεκτίνη αυξάνει την από τον IGF-1 προκαλούμενη έκκριση προγεστερόνης και οιστραδιόλης από τα πρωτογενή ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα (Chabrolle et al., 2008).

Προς στήριξη του ρόλου της αντιπυονεκτίνης στην ανθρώπινη ωοθυλακιογένεση και ωορρηξία, η κυκλοφορούσα αντιπυονεκτίνη συσχετίστηκε θετικά με τον αριθμό των ωαρίων που ανακτήθηκε από γυναίκες σε θεραπεία με FSH για τους σκοπούς της εξωσωματικής γονιμοποίησης (Liu et al., 2006). Αποδεικτικά στοιχεία για τις επιπτώσεις της αντιπυονεκτίνης στην ανθρώπινη ωοθήκη προέρχονται, επίσης, από την παρατήρηση των μειωμένων επιπέδων αντιπυονεκτίνης σε γυναίκες με PCOS, ανεξάρτητα της παχυσαρκίας (Escobar-Morreale et al., 2005; Carmina E et al., 2005). Η

συσχέτιση είναι λιγότερο σαφής διότι η παχυσαρκία , όπως και το PCOS προκαλούν υπερανδρογοναιμία (Pasquali et al., 2006) και η σύνθεση της αντιπυονεκτίνης στο λιπώδη ιστό μειώνεται από τα ανδρογόνα (Seftel et al., 2005). Ωστόσο, γονιδιωματικές (genomic) μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι η υποαντιπυονεκτιναιμία είναι ένα από τα αίτια του PCOS.

Πρόσφατα, το σύστημα της αντιπυονεκτίνης (αντιπυονεκτίνη, AdipoR1 and AdipoR2) περιγράφηκε στον υποθάλαμο του ποντικίου και του ανθρώπου (Kos et al., 2007) αλλά και στην υπόφυση (Rodriguez-Pacheco et al., 2007). Στα ποντίκια, μάλιστα, στα κύτταρα της υπόφυσης, η ανασυνδυασμένη αντιπυονεκτίνη ρυθμίζει την έκφραση του υποδοχέα της GnRH (Rodriguez-Pacheco et al., 2007). Επιπλέον, στα LβT2 γοναδοτρόπα κύτταρα ποντικών και στα υποφυσιακά κύτταρα αρουραίων , η ανασυνδυασμένη αντιπυονεκτίνη εμποδίζει την έκκριση της LH (Rodriguez-Pacheco et al., 2007; lu et al., 2008).

Συμπερασματικά, όλα τα παραπάνω μαζί με τη πρόσφατη ολοκληρωμένη ανάδειξη της έκφρασης, ρύθμισης και λειτουργικού ρόλου της αντιπυονεκτίνης στον όρχι αρουραίου (Camino et al., 2008), τεκμηριώνουν τον πολύπλοκο ρόλο της αντιπυονεκτίνης, στην ρύθμιση του αναπαραγωγικού άξονα, όπου μπορεί να λειτουργεί ως διαμεσολαβητής μεταξύ μεταβολισμού και γοναδικής λειτουργίας.

ΡΕΖΙΣΤΙΝΗ

Γενικά

Η ρεζιστίνη, ένα πεπτιδίο 114 αμινοξέων, είναι μέλος μιας πρόσφατα αποκλυφθείσας οικογένειας πρωτεϊνών που ονομάζονται RELM (resistin-like molecules) ή FIZZ (found in inflammatory zone). Η FIZZ3 (ρεζιστίνη) εκφράζεται κυρίως στο WATT και λιγότερο στον BAT.

Το όνομα της, resist+in[sulin], προέρχεται από την υπόθεση ότι μεσολαβεί στην εκδήλωση της αντίστασης στην ινσουλίνη και αποτελεί ένα συνδετικό κρίκο μεταξύ της παχυσαρκίας και του ΣΔ (Steppan and Lazar, 2002) αν και μερικές μελέτες δεν συγκλίνουν με αυτή την υπόθεση.

Στον άνθρωπο έχει πιθανολογηθεί ο ρόλος της στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης και στις χρόνιες φλεγμονώδεις αντιδράσεις οι οποίες σχετίζονται με την παχυσαρκία (Bettowski, 2003).

Βιολογία

Η ρεζιστίνη (γνωστή και ως FIZZ3) είναι μια πρωτεΐνη 114 αμινοξέων. Κατά την ανακάλυψή της αποδείχθηκε ότι προκαλεί ινσουλινοαντίσταση σε ποντίκια. Ανήκει σε μια οικογένεια πρωτεϊνών πλούσιων σε κυστεΐνη, γνωστών και ως resistin-like molecules (RELMs), που εμπλέκονται στη ρύθμιση φλεγμονωδών διεργασιών. Κυκλοφορεί σε δύο μορφές, συχνότερα ως εξαμερές μεγάλου μοριακού βάρους και λιγότερο συχνά στην περισσότερο δραστική, χαμηλού μοριακού βάρους, μορφή. Το mRNA που κωδικοποιεί τη ρεζιστίνη εντοπίζεται σε πολλούς ιστούς, όπως ο λιπώδης ιστός, ο

υποθάλαμος, τα επινεφρίδια, ο σπλήνας, οι σκελετικοί μύες, το πάγκρεας και ο πεπτικός σωλήνας. Η σύνθεσή της στα ποντίκια περιορίζεται στο λιπώδη ιστό, ενώ στον άνθρωπο λιποκύτταρα, μυϊκά κύτταρα, παγκρεατικά κύτταρα και μονοπύρηννα κύτταρα, όπως τα μακροφάγα, σχετίζονται με σύνθεση της πρωτεΐνης. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της ρεζιστίνης παρατηρήθηκε ότι είναι υψηλότερα σε μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs – peripheral blood mononuclear cells) σε σχέση με τα λιποκύτταρα. Βέβαια δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ποιός τύπος κυττάρων είναι κυρίως υπεύθυνος για την παραγωγή και τα υψηλά επίπεδα της κυκλοφορούσας πρωτεΐνης στον άνθρωπο. Η ανθρώπινη ρεζιστίνη εμφανίζει 55% ταυτοσημία ως προς την αντίστοιχη του ποντικού, γεγονός που φανερώνει ότι δεν έχει συντηρηθεί ιδιαίτερα κατά την εξελικτική πορεία των ειδών (Steppan et al., 2001; Holcomb et al., 2000; Kusminski et al., 2005).

Λειτουργία

Η φυσιολογική λειτουργία της ρεζιστίνης στον άνθρωπο δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Αρχικά αναγνωρίστηκε στα ποντίκια ως παράγοντας συσχέτισης της παχυσαρκίας με το σακχαρώδη διαβήτη, καθώς κυκλοφορούσε σε υψηλά επίπεδα σε ζωικά μοντέλα παχυσαρκίας και ινσουλινοαντίστασης, ενώ ελαττωνόταν από τις θειαζολιδινεδιόνες (TZDs). Πρόσφατες μελέτες σε πειραματόζωα καταδεικνύουν ως πιθανότερο στόχο της δράσης της ρεζιστίνης το ήπαρ, όπου προκαλεί ηπατική αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης, με δευτερεύουσα τη δράση στην περιφέρεια, στους σκελετικούς μύες και στο λιπώδη ιστό. Είναι γνωστό ότι η δράση της στον άνθρωπο

αφορά κυρίως στην ανοσία, τη φλεγμονή και την ινσουλινοαντίσταση (McTernan et al., 2006).

Η ρεζιστίνη επάγει την έκφραση των TNFα και IL-6 σε ανθρώπινα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος, ενώ προκαλεί αρθρίτιδα ενιόμενη σε αρθρώσεις πειραματοζώων. Οι φλεγμονώδεις ιδιότητες της ρεζιστίνης μεσολαβούνται από τον NF-κΒ, ενώ αναστολέας του συγκεκριμένου παράγοντα εμποδίζει τις φλεγμονώδεις διεργασίες που προκαλεί η λιποκίνη.

Επίσης, έχει αποδειχθεί πως η ρεζιστίνη συσσωρεύεται στις φλεγμαίνουσες αρθρώσεις ασθενών με ρευματοειδή αρθρίτιδα και τα επίπεδά της συσχετίζονται με δείκτες φλεγμονής. Στον άνθρωπο, όπως προαναφέρθηκε, επάγει τη σύνθεση φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως ο TNFα, η IL-1, η IL-6 και η IL-12 σε πολλούς τύπους κυτάρων, μέσω ενός μονοπατιού εξαρτώμενου από τον NF-κΒ . Επιπλέον, η φλεγμονώδης δράση της ρεζιστίνης επιβεβαιώνεται από την προκαλούμενη επαγωγή της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης VCAM1 και ICAM1 και της χημειοκίνης CCL2 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία επίσης διεγείρει να απελευθερώσουν ενδοθηλίνη-1 (Bokarewa et al., 2005; Verma et al., 2003).

Σε ζωικά μοντέλα η ρεζιστίνη εμπλέκεται στην παθογένεια της ινσουλινοαντίστασης και του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 που σχετίζονται με την παχυσαρκία. Στον άνθρωπο αντίστοιχος ρόλος διερευνάται, αλλά δεν έχει επιβεβαιωθεί πλήρως. Η υπερπαραγωγή ρεζιστίνης από το λιπώδη ιστό ευθύνεται για τα αυξημένα επίπεδα της ουσίας στον ορό, αλλά δεν έχει

διευκρινιστεί ποια είναι η κύρια κυτταρική προέλευση της ρεζιστίνης, καθώς παράγεται τόσο από λιποκύτταρα, όσο και από προλιποκύτταρα και μακροφάγα. Οι περισσότερες μελέτες αναφέρουν τα μακροφάγα ως κύρια πηγή της κυκλοφορούσας ρεζιστίνης στον άνθρωπο. Στην παχυσαρκία, άλλωστε, παρατηρείται αυξημένη διήθηση μακροφάγων στο λιπώδη ιστό. Επίσης, έχει βρεθεί ότι μακροφάγα που διηθούν αθηροσκληρωτικά ανευρύσματα εκκρίνουν ρεζιστίνη.

Η ρεζιστίνη και η αντιπυονεκτίνη παρουσιάζουν αντίθετη δράση σε ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Η ρεζιστίνη επάγει την έκφραση των VCAM1, ICAM1 και pentraxin-3, ενώ η αντιπυονεκτίνη ελαττώνει την έκφρασή τους.

Επιπλέον, αυξημένα επίπεδα ρεζιστίνης σε χρόνια νεφρική νόσο σχετίζονται με επηρεασμένη νεφρική λειτουργία και φλεγμονή, αλλά όχι με ινσουλινοαντίσταση. Επομένως, στον άνθρωπο η ρεζιστίνη εμφανίζει πολλά χαρακτηριστικά φλεγμονώδους κυτταροκίνης και θα μπορούσε να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε φλεγμονώδεις νόσους, σχετιζόμενες ή μη με ινσουλινοαντίσταση (Jung et al., 2006; Axelsson et al., 2006).

Πρόσφατες μελέτες παρέχουν επιπλέον πληροφορίες σχετικά με τις μεταβολικές δράσεις της ρεζιστίνης. Συγκεκριμένα, η ρεζιστίνη ελαττώνει την πρόσληψη και μεταβολισμό των λιπαρών οξέων στους σκελετικούς μύες, στοχεύοντας ειδικά στην κινάση AMPK (AMP-activated protein kinase). Επομένως, είναι πιθανό η λιποκίνη να επάγει την ινσουλινοαντίσταση είτε

δρώντας άμεσα στα ηπατοκύτταρα είτε τροποποιώντας την ικανότητα των σκελετικών μυών για συνεισφορά στην ομοίωση των λιπαρών οξέων. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι, όταν υπερεκφράζεται η ρεζιστίνη με τη βοήθεια ιικού φορέα σε πειραματόζωα, επάγει δυσλιπιδαιμία και ινσουλινοαντίσταση, αυξάνοντας την έκκριση λιποπρωτεϊνών και παραβιάζοντας την υπογλυκαιμική δράση της ινσουλίνης. (Palanivel et al., 2005, Steppan et al., 2005, Sato et al., 2005).

Ρεζιστίνη και αναπαραγωγικό σύστημα

Το mRNA της ρεζιστίνης εκφράζεται στον υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα ποντικών με εξελικτική έκφραση πριν την εφηβεία (ελάχιστη έκφραση μετά τη γέννηση, απότομη αύξηση μεταξύ ηλικίας 14-25 ημερών και μείωση στη συνέχεια)(Morash et al., 2002) και έχει βρεθεί ευρεία κατανομή έκφρασης του στους ιστούς αρουραίων (Nogueiras et al., 2003a).

Στον άνθρωπο η ρεζιστίνη έχει βρεθεί να εκφράζεται στο WAT παχύσαρκων αλλά όχι λεπτών ατόμων (Savage et al., 2001) και σε καλλιεργημένα προλιποκύτταρα αλλά ελάχιστα σε ώριμα λιποκύτταρα (Janke et al., 2002), στα μονοκύτταρα (Savage et al., 2001) και στον πλακούντα (Yura et al., 2003). Όπως η λεπτίνη, (Messinis et al., 2000, 2001) η ρεζιστίνη ρυθμίζεται από τις γοναδικές ορμόνες. Έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα της ρεζιστίνης είναι υψηλότερα (χωρίς επιβεβαίωση της στατιστικής σημαντικότητας) στο λιπώδη ιστό των θήλεων σε συγκριση με τα άρρενα ποντίκια (Steppan et al., 2001) αλλά το αντίθετο έχει βρεθεί σε αρουραίους (Nogueiras et al., 2003b).

Μέχρι σήμερα υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα για τη δυνατότητα παραγωγής και δράσης της ρεζιστίνης στον αναπαραγωγικό άξονα. Στα κύτταρα Leydig και Sertoli όρχεων αρουραίων έχει βρεθεί να εκφράζεται η ρεζιστίνη και με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο να αυξάνει τη βασική και από την χοριακή γοναδοτροφίνη παραγωγή της τεστοστερόνης *in vitro*. Η χορήγηση λεπτίνης προκάλεσε σημαντική μείωση των επιπέδων του mRNA της ρεζιστίνης των όρχεων, ενισχύοντας την πιθανότητα η ρεζιστίνη να λειτουργεί ως ενδοκρινικός μεσολαβητής μεταξύ ενεργειακής ομοιόστασης και αναπαραγωγής (Nogueiras et al., 2004).

Έχει βρεθεί αύξηση της έκφρασης της ρεζιστίνης από τον ανθρώπινο πλακούντα κατά το δεύτερο ήμισυ της κύησης και με την συνδυασμένη παράλληλη μείωση της έκφρασης του γονιδίου της λεπτίνης αυξάνει η αντίσταση στην ινσουλίνη και η μεταγευματική υπεργλυκαιμία με θετική επίδραση στην ταχεία αύξηση του εμβρύου (Yura et al., 2003). Πρόσφατα, φάνηκε ότι φυσιολογικές έγκυες γυναίκες έχουν υψηλότερα επίπεδα ρεζιστίνης σε σχέση με φυσιολογικές μη-έγκυες γυναίκες, και οι συγκεντρώσεις της αντιποκίνης αυτής αυξάνονται με την πρόοδο της εγκυμοσύνης (Nien et al., 2007).

Τα μέχρι τώρα δεδομένα σε ζώα είναι αντικρουόμενα. Στα ποντίκια τα επίπεδα του mRNA της ρεζιστίνης αυξήθηκαν ,στο περιγonaδικό λίπος, κατά τη διάρκεια του diestrus αλλά στο πλάσμα δεν διαπιστώθηκαν διαφορές καθ'όλη τη διάρκεια του κύκλου (Gui et al., 2004)

Στην ίδια έρευνα , η χορήγηση οιστρογόνων ελάττωσε την έκφραση ρεζιστίνης σε ωοθηκεκτομηθέντες ποντικούς, υποδηλώνοντας ότι οι αλλαγές στα

επίπεδα E2 σε όλη τη διάρκεια του κύκλου ενδέχεται να είναι υπεύθυνες, τουλάχιστον εν μέρει, για τη διακύμανση των επιπέδων του mRNA της ρεζιστίνης στο περιγωναδικό λιπώδη ιστό . Επιπλέον, σε ωθηκεκτομηθέντες ποντικούς, τα οιστρογόνα μείωσαν τα επίπεδα του mRNA της ρεζιστίνης στο πλάσμα και το λιπώδη ιστό (D'Eon et al ., 2005).

Ωστόσο, οι Nogueiras et al. (2003), με χρήση της Northern blot προσέγγισης μόνο, διαπίστωσαν ότι η ωθηκεκτομή δεν άλλαξε την έκφραση mRNA της ρεζιστίνης σε αρουραίους. Σε μια άλλη μελέτη, σε ωθηκεκτομηθέντες αρουραίους, τα οιστρογόνα βρέθηκε να ρυθμίζουν προς τα κάτω (down-regulate) την έκφραση του mRNA της ρεζιστίνης στον λιπώδη ιστό με ένα συγκεκριμένο τρόπο, τόσο in vitro και in vivo, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα οιστρογόνα μπορεί να είναι ένας βασικός αρνητικός ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης της ρεζιστίνης (Huang et al ., 2005). Αντιθέτως, σε in vitro πειράματα με 3T3-L1 adipocytes, η 17β-E2 ρύθμιζε προς τα άνω (up-regulate) μέσω των α- υποδοχέων των οιστρογόνων την έκφραση του mRNA της ρεζιστίνης κατά ένα δόσο-και χρόνο- εξαρτώμενο τρόπο (Chen et al., 2006).

Μια πρόσφατη μελέτη (Chu et al., 2006) διαπίστωσε υψηλότερα επίπεδα ρεζιστίνης σε παχύσαρκες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με το μεταβολικό σύνδρομο, σε σύγκριση με προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, αλλά αυτό δεν επιβεβαιώθηκε από άλλους ερευνητές (Hong et al., 2007) που διαπίστωσαν ότι, ανεξάρτητα από το BMI, τα επίπεδα της ρεζιστίνης ήταν

παρόμοια μεταξύ προεμμηνοπαυσιακών και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, που είτε ήταν υγιείς ή είχαν το μεταβολικό σύνδρομο.

Η έκφραση του mRNA της ρεζιστίνης εντοπίστηκε στην υπόφυση και τον υποθάλαμο ενώ έχει διεγερτικές επιδράσεις στην παραγωγή της τεστοστερόνης σε καλλιεργημένα κύτταρα της θήκης (Munir et al, 2005) ενώ αναφορικά με την έκφραση της ρεζιστίνης στην ωοθήκη, το ωοκύτταρο ή το έμβρυο σε διάφορα είδη δεν υπάρχουν αναφορές.

Ρεζιστίνη και PCOS

Όσον αφορά τη συσχέτιση της ρεζιστίνης με το PCOS τα δεδομένα είναι συγκεχυμένα. Τα επίπεδα της ρεζιστίνης στον ορό γυναικών με PCOS και BMI >25kg/m² βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα σε σύγκριση με εκείνα των γυναικών με PCOS και BMI <25kg/m² και των μαρτύρων (Panidis et al., 2004). Εντούτοις, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της ρεζιστίνης ορού ανάμεσα στις λεπτόσωμες γυναίκες με PCOS και στις μάρτυρες. Επιπλέον, αν και βρέθηκε σημαντική θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της ρεζιστίνης και στον λόγο γλυκόζης/ινσουλίνη ο οποίος αποτελεί έναν ικανοποιητικό δείκτη της αντίστασης στην ινσουλίνη, η σχέση αυτή δεν ήταν ανεξάρτητη από τον δείκτη μάζας σώματος, τη μόνη παράμετρο που βρέθηκε να σχετίζεται θετικά και ανεξάρτητα με τα επίπεδα της ρεζιστίνης στον ορό. Τέλος, δεν διαπιστώθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της ρεζιστίνης και των ανδρογόνων ή των

γοναδοτροπινών στο πλάσμα των γυναικών με PCOS. Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι η ρεζιστίνη πιθανότατα δεν παίζει ενεργό ρόλο στην αντίσταση στην ινσουλίνη και την παθογένεια του PCOS. Επιπλέον, τα αποτελέσματα μελετών, όσον αφορά στους πολυμορφισμούς του γονιδίου της ρεζιστίνης και τη σχέση τους με την παχυσαρκία και την αντίσταση στην ινσουλίνη σε γυναίκες με PCOS, ήταν αρνητικά (Urbanek et al., 2003).

Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι στο PCOS τα επίπεδα της ρεζιστίνης στην κυκλοφορία δεν διαφέρουν από αυτά των φυσιολογικών γυναικών (Seow et al., 2004; Panidis et al., 2004) αλλά η υπερέκφραση του γονιδίου της ρεζιστίνης στο σπλαχνικό λιπώδη ιστό μπορεί να αποτελεί ένα τοπικό παράγοντα παθογένεσης του συνδρόμου (Seow et al., 2004).

Πιο πρόσφατη όμως έρευνα έδειξε 40% αύξηση των συγκεντρώσεων της ρεζιστίνης σε γυναίκες με PCOS σε σχέση με γυναίκες control (Munir et al., 2005). Στην ίδια έρευνα, για πρώτη φορά, αποδείχτηκε από in vitro δεδομένα ότι η ρεζιστίνη μπορεί να αυξήσει την παραγωγή ανδρογόνων από άμεση τόνωση των κυττάρων της θήκης των ωοθηκών. Αν και δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων της ρεζιστίνης και του BMI στις γυναίκες control, η συσχέτιση ήταν έντονη στις γυναίκες με PCOS οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι πιθανώς υπάρχει κάποιος ορμονικός ή μεταβολικός παράγοντας που επηρεάζει την έκκριση της ρεζιστίνης. Επιπλέον, υπήρξε μια θετική συσχέτιση ανάμεσα στην ρεζιστίνη του ορού και τη συγκέντρωση της τεστοστερόνης στις γυναίκες με PCOS. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν ότι η ρεζιστίνη μόνη της δεν είχε καμία επίδραση στην δραστηριότητα της 17 α -hydroxylase, αλλά υπήρχε αυξημένη έκφραση 17 α -hydroxylase με την παρουσία forskolin και

ινσουλίνης. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν την υπόθεση ότι η κυκλοφορούσα ρεζιστίνη συνεργάζεται με την ινσουλίνη για να αυξήσουν την παραγωγή ανδρογόνων. Έτσι, οι αλληλεπιδράση μεταξύ ρεζιστίνης και ινσουλίνης μπορεί να αποτελεί παράγοντα για τον καθορισμό του αν η ινσουλίνο-ανθεκτικές γυναίκες αναπτύσσουν PCOS ή όχι.

Παρολ'αυτα στοιχεία από άλλες έρευνες δείχνουν ότι η ρεζιστίνη είναι απίθανο να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την τοπική στεροειδογένεση, την ανάπτυξη και την ωρίμανση των ωαρίων κατά την διάρκεια διεγερμένων κύκλων IVF σε γυναίκες με PCOS (Lu et al., 2005; Seow et al., 2005).

Ως γνωστό μία άλλη λιποκίνη με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ενεργειακού ισοζυγίου, η λεπτίνη, εμπλέκεται στην αναπαραγωγική λειτουργία και τα επίπεδα της στην κυκλοφορία παρουσιάζουν μεταβολές κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου (Messinis et al., 1998; Cella et al., 2000). Θα ήταν επίσης ενδιαφέρον να διερευνηθεί η υπόθεση ότι και η αντιπυονεκτίνη και η ρεζιστίνη μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου και κατ'επέκταση σε διεγερμένους κύκλους επηρεάζοντας έτσι τη γονιμότητα.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοποί του παρόντος ερευνητικού πρωτοκόλλου που αποτελείται από 2 φάσεις είναι:

A) η μελέτη των μεταβολών των επιπέδων της γκρελίνης, αντιπυονεκτίνης και ρεζιστίνης κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γυναικείου γεννητικού κύκλου ώστε να διερευνηθεί εάν διαδραματίζουν φυσιολογικό ενδοκρινικό ρόλο.

B) η μελέτη των επιπέδων της γκρελίνης στο πλάσμα, και αντιπυονεκτίνης και ρεζιστίνης στον ορό, σε διεγερμένους κύκλους.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

A) Οκτώ υγιείς γυναίκες με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο (διάρκεια κύκλου 26-32 ημέρες).

Κριτήρια επιλογής:

- i. Μη κατανάλωση φαρμάκων, αλκοόλ. Μη καπνίστριες.
- ii. Ηλικία έως 35 ετών.
- iii. Απουσία νόσου.

- iv. Απουσία αντίστασης στην ινσουλίνη (πηλίκιο γλυκόζης/ινσουλίνη (G/I), $HOMA-R = \text{ινσουλίνη νηστείας } (\mu IU/ml) \times \text{γλυκόζη } (mmol/liter) / 22.5$. Αντίσταση στην ινσουλίνη = $G/I < 6$, $HOMA-R > 2.7$.
- v. Μη λήψη ορμονικών σκευασμάτων τουλάχιστον για 3 μήνες, συμπεριλαμβανομένων των OCs.
- vi. Απουσία λοιμώξεων τον προηγούμενο μήνα.
- vii. Απόδειξη ωθηλακιορρηξίας με υπερηχογραφική παρακολούθηση και μέτρηση της προγεστερόνης ($> 30 \text{ nmol/l}$) πριν την έναρξη της μελέτης.
- viii. Απουσία του συνδρόμου των πολυκυστικών ωθηκών (κλινική συμπτωματολογία αραιομηνόρροιας και υπερανδρογονισμού, υπερηχογραφική εικόνα πολυκυστικών ωθηκών).

Σε κάθε γυναίκα μετά από ολονύκτια νηστεία λαμβάνονταν πρωινές αιμοληψίες (09:00) τουλάχιστον 2 ώρες μετά την έγερση από την ημέρα 2 του κύκλου μέχρι την επόμενη έμμηνο ρύση.

Τα δείγματα συλλέγονταν σε σωληνάρια με EDTA και φυγοκεντρούνταν άμεσα (1500g για 15 min στους 4°C). Το πλάσμα και ο ορός διατηρούνταν στους -20°C μέχρι τη μέτρηση των ορμονών στο εργαστήριο.

B) Είκοσι γυναίκες, με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο (διάρκεια κύκλου 26-32 ημέρες) που υποβάλλονταν σε θεραπεία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής λόγω σαλπιγγικού παράγοντα και/ή ανδρικής υπογονιμότητας. Οι γυναίκες αυτές υποβλήθηκαν σε βραχύ πρωτόκολλο με GnRH αγωνιστή.

Κριτήρια επιλογής

- i. Μη κατανάλωση φαρμάκων, αλκοόλ. Μη καπνίστριες.
- ii. Ηλικία έως 35 ετών
- iii. Απουσία νόσου
- iv. Απουσία αντίστασης στην ινσουλίνη (πηλίκo γλυκόζης/ινσουλίνη (G/I), $HOMA-R = \text{ινσουλίνη νηστείας } (\mu\text{IU/ml}) \times \text{γλυκόζη } (\text{mmol/liter}) / 22.5$. Αντίσταση στην ινσουλίνη = $G/I < 6$, $HOMA-R > 2.7$).
- v. Μη λήψη ορμονικών σκευασμάτων τουλάχιστον για 3 μήνες, συμπεριλαμβανομένων των OCs.
- vi. Απουσία λοιμώξεων τον προηγούμενο μήνα.
- vii. Απόδειξη ωθηλακιορρηξίας με υπερηχογραφική παρακολούθηση και μέτρηση της προγεστερόνης ($>30 \text{ nmol/l}$) πριν την έναρξη της μελέτης.
- viii. Όχι σύνδρομο πολυκυστικών ωθηκών (κλινική συμπτωματολογία αραιομηνόρροιας και υπερανδρογονισμού, υπερηχογραφική εικόνα πολυκυστικών ωθηκών).

Σε κάθε γυναίκα μετά από ολονύκτια νηστεία λαμβάνονταν πρωινές αιμοληψίες, τουλάχιστον 2 ώρες μετά την έγερση κατά τις παρακάτω ημέρες:

ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ 1. Ημέρα 2 του κύκλου-έναρξη χορήγησης GnRH αγωνιστή και γοναδοτροφινών (ημέρα 1 της διέγερσης).

ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ 2. Ημέρα 5 της διέγερσης (ημέρα 6 του κύκλου).

ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ 3. Ημέρα χορήγησης της HCG.

ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ 4. Ημέρα της ωοληψίας.

ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ 5. Ημέρα της εμβρυομεταφοράς

ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ 6. Ημέρα +7 μετά την εμβρυομεταφορά.

ΑΙΜΟΛΗΨΙΑ 7. Ημέρα +12 μετά την εμβρυομεταφορά

Γκρελίνη, αντιπυονεκτίνη, ρεζιστίνη και φυσιολογικός κύκλος

Υλικό και μέθοδος

Δέκα γυναίκες, με φυσιολογική διάρκεια καταμήνιου κύκλου από 26 έως 30 ημέρες, προσφέρθηκαν εθελοντικά για τη μελέτη και έδωσαν γραπτή συγκατάθεση. Τελικά, στην ανάλυση των αποτελεσμάτων, συμπεριελήφθησαν οκτώ γυναίκες αφού οι δύο δεν πληρούσαν κάποια από τα κριτήρια που είχαν τεθεί εξ'αρχής και αποκλείστηκαν (μία από τις γυναίκες δεν εμφάνισε την κανονική αιχμή της LH ενώ η άλλη δεν συμμορφώθηκε πλήρως με το ωράριο των αιμοληψιών). Παρολ'αυτά, τα αποτελέσματα των μετρήσεων τους είναι στη διάθεση μας και από τον έλεγχο τους φάνηκε ότι δεν θα επηρέαζαν τα τελικά αποτελέσματα.

Η μελέτη έλαβε την έγκριση του Επιστημονικού Συμβουλίου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και όλες οι γυναίκες που συμμετείχαν στη μελέτη είχαν δώσει έγγραφη συγκατάθεση. Η ηλικία των γυναικών κυμάνθηκε μεταξύ 24 και 34 χρόνια ($29,5 \pm 1,4$ χρόνια [μέση \pm SEM]) και ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) μεταξύ 18,8 και 33 kg / m² [μέση \pm SEM]). Όλες οι γυναίκες ήταν υγιείς και δεν χρησιμοποίησαν ποτέ οποιοδήποτε τύπου ορμονική αντισύλληψη ή τυχόν άλλες ιατρικές θεραπείες τουλάχιστον για τους τελευταίους 6 μήνες πριν την εισαγωγή τους στη μελέτη. Δείγματα

αίματος λαμβάνονταν από όλες τις γυναίκες κάθε πρωί (8:00 – 8:30 π.μ.), μετά από ολονύκτια νηστεία, από τη δεύτερη έως και τη τελευταία ημέρα ενός εμμηνορρησιακού κύκλου. Ξεκινώντας για ημέρα 8 του κύκλου, πραγματοποιήθηκαν συχνά υπερηχογραφήματα των ωοθηκών για την παρακολούθηση της ανάπτυξης του ωοθυλακίου και την εντόπιση της ημέρας της ωορρηξίας. Όλα τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν στα 1000 g για 15 λεπτά, και τα πλάσματα και οι οροί αποθηκεύθηκαν στους -20 C μέχρι να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός των αποτελεσμάτων. Ακυλιωμένη και μη-ακυλιωμένη γκρελίνη, ρεζιστίνη, αντιπρονεκτίνη, FSH, LH, E2, και P, μετρήθηκαν σε όλα τα δείγματα αίματος.

Μετρήσεις

Η μέτρηση της ακυλιωμένης γκρελίνης στο πλάσμα έγινε με χρήση μίας ανοσολογικής μεθόδου (double-antibody sandwich enzyme immunoassay) (Human Acylated Ghrelin ELISA; BioVendor Laboratory Medicine, Inc., Modrice, Czech Republic). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pg/ml.

Η μη-ακυλιωμένη γκρελίνη μετρήθηκε στο πλάσμα με τη χρήση μίας ανοσολογικής μεθόδου (double-antibody sandwich enzyme immunoassay) (Human Unacylated Ghrelin ELISA; BioVendor Laboratory Medicine). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε pg/ml.

Η μέτρηση της ρεζιστίνης στον ορό έγινε με χρήση μίας ανοσολογικής μεθόδου (biotin-labeled antibody-based sandwich enzyme immunoassay) (Human Resistin ELISA; BioVendor Laboratory Medicine). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng/ml.

Η μέτρηση της αντιπνονεκτίνης ορού έγινε με χρήση μίας ανοσολογικής μεθόδου (competitive enzymelinked immunosorbent assay) (Human Adiponectin ELISA; BioVendor Laboratory Medicine). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε µg/ml.

Η FSH, LH, και E2 μετρήθηκαν στον ορό με χρήση ανοσολογικών μεθόδων χημειοφωταύγειας (chemiluminescent microparticle immunoassays) (Architect FSH, Architect LH, and Architect Estradiol, respectively; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IU/l για την FSH και την LH και ως pg/ml για την E2. Η προγεστερόνη μετρήθηκε στον ορό με χρήση μίας ανοσολογικής μεθόδου (microparticle enzyme immunoassay) (AxSYM Progesterone; Abbott Laboratories). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε ng/ml.

Τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης για ακυλιωμένη γκρελίνη, μη-ακυλιωμένη γκρελίνη, αντιπνονεκτίνη, ρεζιστίνη, FSH, LH, E2, και P ήταν 4.0 pg/ml, 0,6 pg/ml, 0,21 mg / ml, 0,1 ng / ml, 0,05 IU / L, 0,07 IU / L, 17,9 pg / ml, και 0,2 ng / mL, αντίστοιχα.

Οι ενδο- και δια-μεθοδολογικοί συντελεστές μεταβλητότητας (interassay και intra-assay coefficients of variation) ήταν 3,4% και 2,9%, 4% και 3,9%, 6, 4% και 7.3%, 2.8% και 5.1%, 3.1% και 3.4%, 2.0% και 3.4%, 4.5% και 6.0%, και 6.0% and 6.7%, αντίστοιχα.

Ανάλυση δεδομένων

Οι τιμές των ορμονών παρουσίασαν κανονική κατανομή (one-sample Kolmogorov- Smirnov test), ενώ η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (ANOVA), ακολουθούμενη εκ των υστέρων από έλεγχο Bonferroni, Pearsons αντιστοιχία, μερική αντιστοιχία για τον έλεγχο και τις επιπτώσεις της μία ή περισσότερων μεταβλητών. Ο έλεγχος διενεργήθηκε μόνο για τις μεταβλητές που επίσης ήταν σε συσχέτιση σε μία τουλάχιστον εκ των δύο αυτών μεταβλητών. Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος± SEM. Το στατιστικό πακέτο λογισμικού που χρησιμοποιήθηκε ήταν το NCSS 2001 NCSS 2001 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT).

Αποτελέσματα

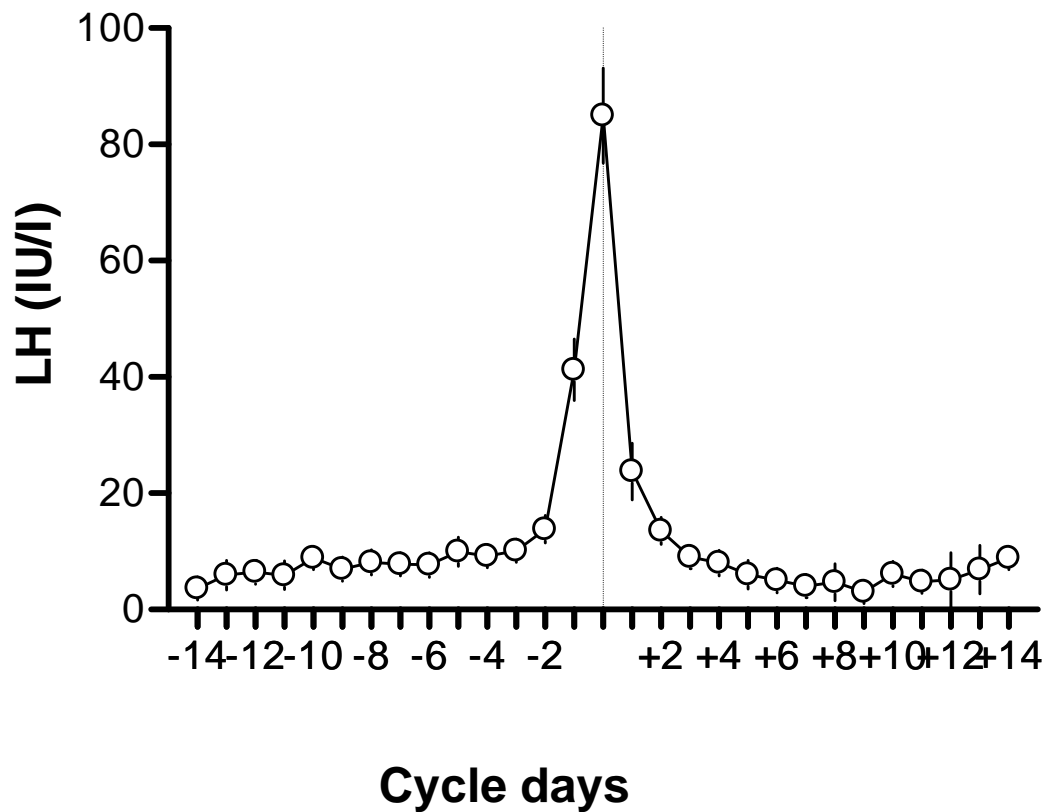
Η διάρκεια του κύκλου κατά την μελέτη κυμάνθηκε μεταξύ 26 και 31 ημέρες (27.8 ± 0.6 ημέρες), ενώ όλες οι γυναίκες εμφάνισαν ένα ενδογενές κύμα LH.

Η ημέρα κατά την οποία συνέβη η αιχμή της LH κυμαινόταν μεταξύ 12 και 18 ημερών ($14,7 \pm 0.7$ ημέρες), και όλες οι ορμόνες κανονικοποιήθηκαν με την κορυφαία τιμή της LH.

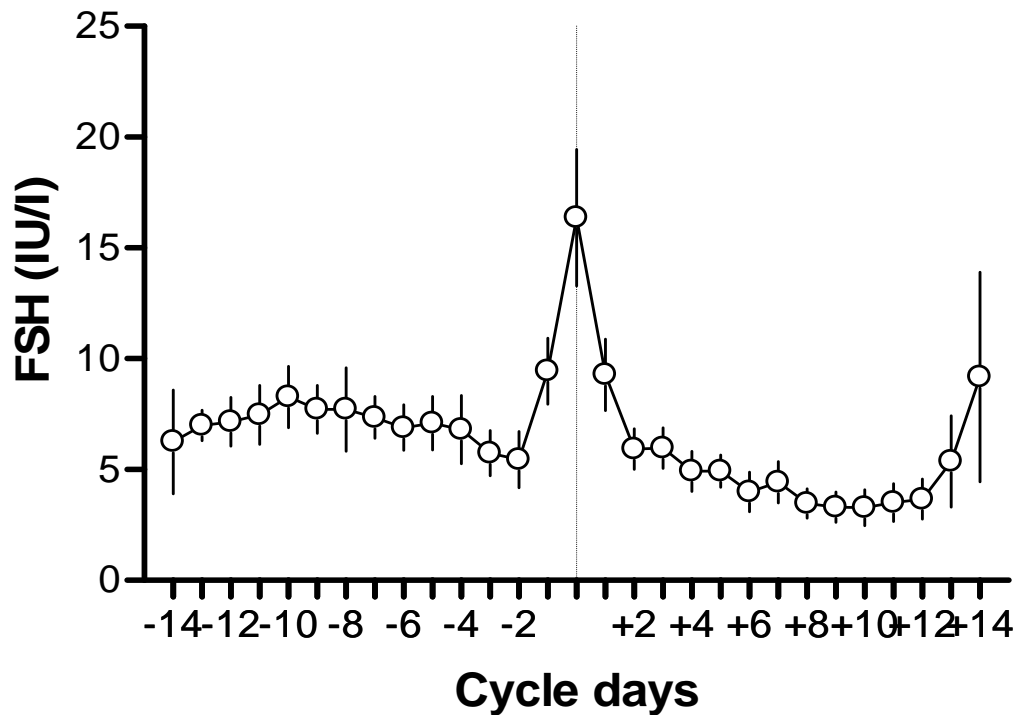
Στον ορό, οι συγκεντρώσεις της FSH, LH, E2, και P έδειξαν την τυπική κανονική κατανομή του εμμηνορρυσιακού κύκλου (Σχήματα 6-9).

Παρά το ότι παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στις συγκεντρώσεις των γοναδοτροπινών και των ωθητικών στεροειδών ($P < 0.001$), οι τιμές της ακυλιωμένης και μη-ακυλιωμένης γκρελίνης στο πλάσμα δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά στη διάρκεια του κύκλου (Σχήματα 10-11). Οι τιμές της ακυλιωμένης γκρελίνης στο πλάσμα κυμάνθηκαν γύρω στα 100 pg / ml και εκείνες της μη-ακυλιωμένης γκρελίνης κοντά στα 250 pg / mL. Η αναλογία των συγκεντρώσεων της ακυλιωμένης και μη-ακυλιωμένης γκρελίνης δεν διέφεραν σημαντικά κατά τη διάρκεια του κύκλου, και, λόγω των υψηλότερων τιμών της ακυλιωμένης μορφής, η μέση τιμή του δείκτη κυμάνθηκε μεταξύ 0,30 και 0,59 (Σχήμα 14).

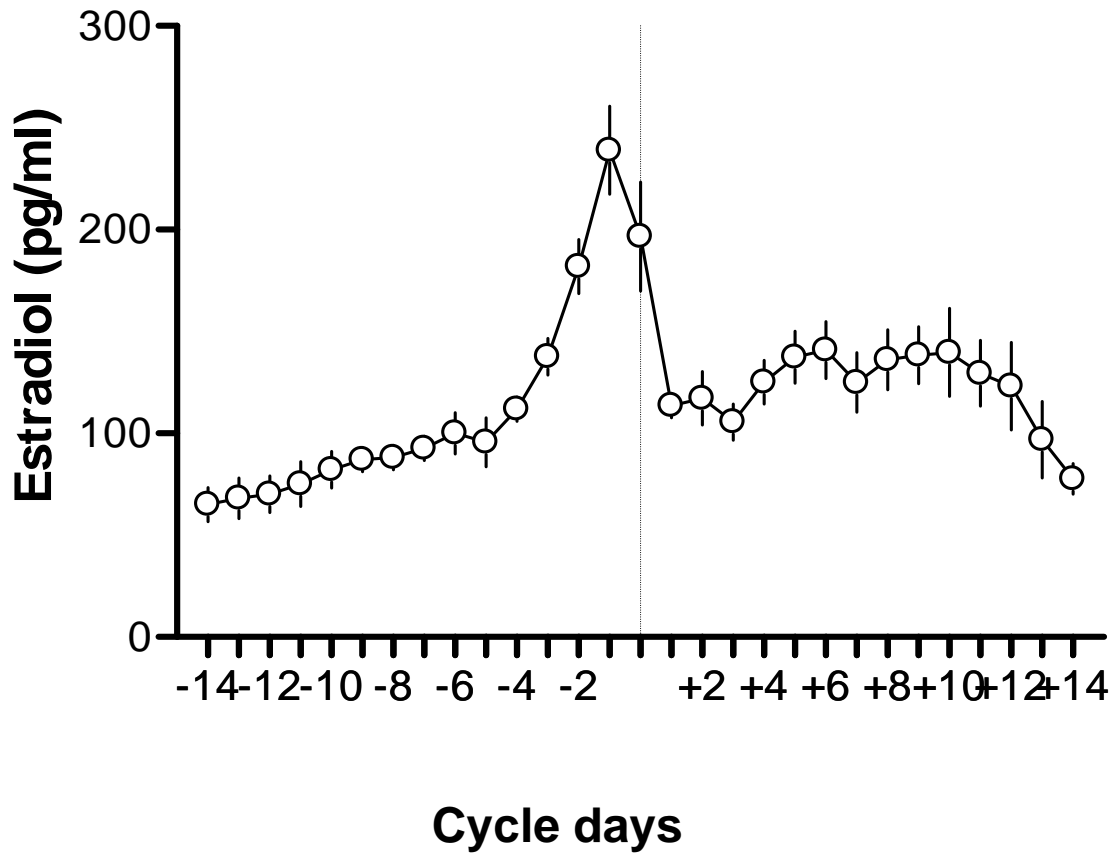
Ομοίως, οι συγκεντρώσεις της ρεζιστίνης και αντιπυονεκτίνης παρέμειναν σταθερές σε όλη τη διάρκεια του εμμηνορυσιακού κύκλου με τις τιμές της ρεζιστίνης να κυμαίνονται περίπου σε 3,5 ng / ml και εκείνες της αντιπυονεκτίνης περίπου σε 12 mg / ml (Σχήματα 12-13). Ούτε τα επίπεδα της ρεζιστίνης αλλά ούτε και της αντιπυονεκτίνης συσχετίστηκαν με τα επίπεδα της E2 ή της P για κάθε ημέρα του κύκλου. Τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης αλλά όχι της ρεζιστίνης ή της γκρελίνης συσχετίστηκαν έντονα και αρνητικά σε σχέση με το BMI για κάθε ημέρα του κύκλου (συντελεστές συσχέτισης που κυμάνθηκαν μεταξύ -0.709 και -0.883 , $P < .05$). Οι συγκεντρώσεις της ακυλιωμένης και μη-ακυλιωμένης γκρελίνης συσχετίστηκαν θετικά με τις συγκεντρώσεις της E2 μόνο σποραδικά. Δεν βρέθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ ακυλιωμένης γκρελίνης, μη-ακυλιωμένης γκρελίνης, ρεζιστίνης, αντιπυονεκτίνης και τα επίπεδα ορού της LH, FSH, E2, and P .



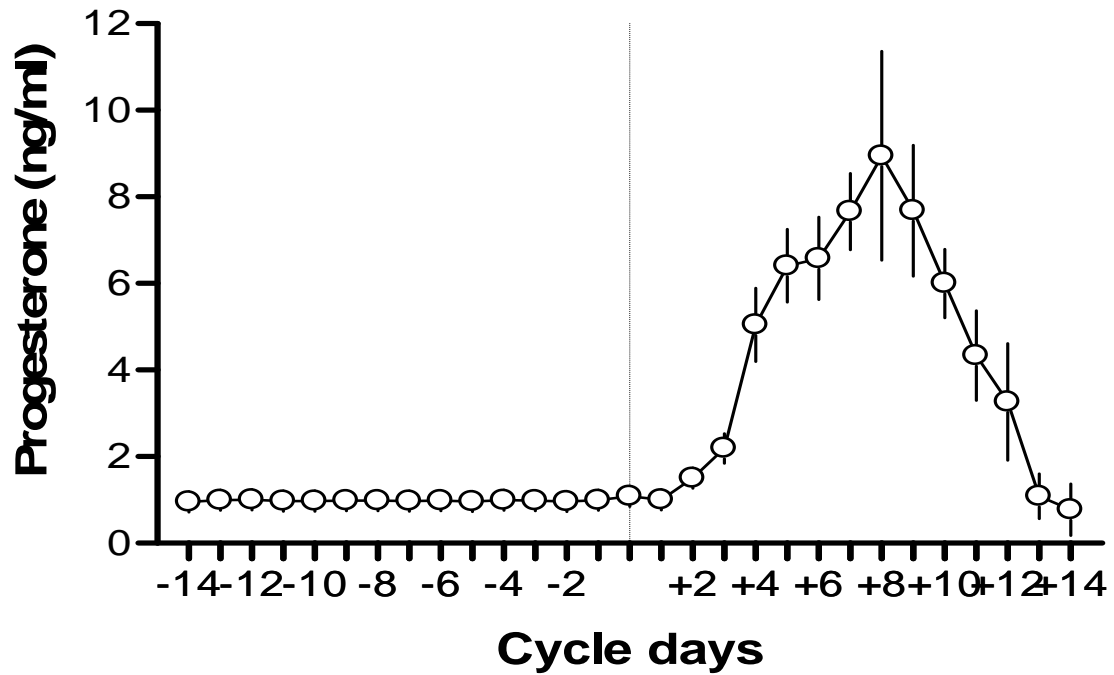
Σχήμα 6. Τα επίπεδα της LH στον ορό (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Οι τιμές της LH παρουσιάζονται αναφορικά με την κορυφαία τιμή (αιχμή-peak) της LH στο μεσοκύκλιο κύμα της. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει την αιχμή της LH.



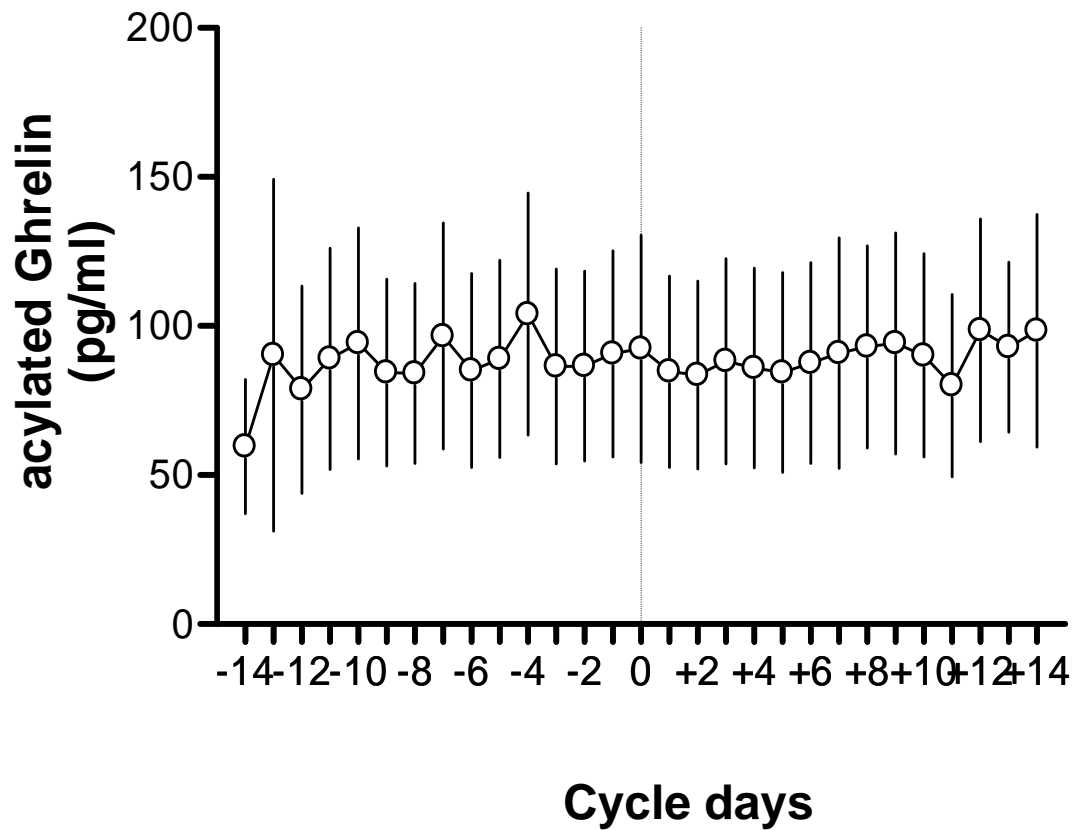
Σχήμα 7. Τα επίπεδα της FSH στον ορό (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Οι τιμές της FSH παρουσιάζονται αναφορικά με την κορυφαία τιμή (αιχμή-peak) της LH στο μεσοκύκλιο κύμα της. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει την αιχμή της LH.



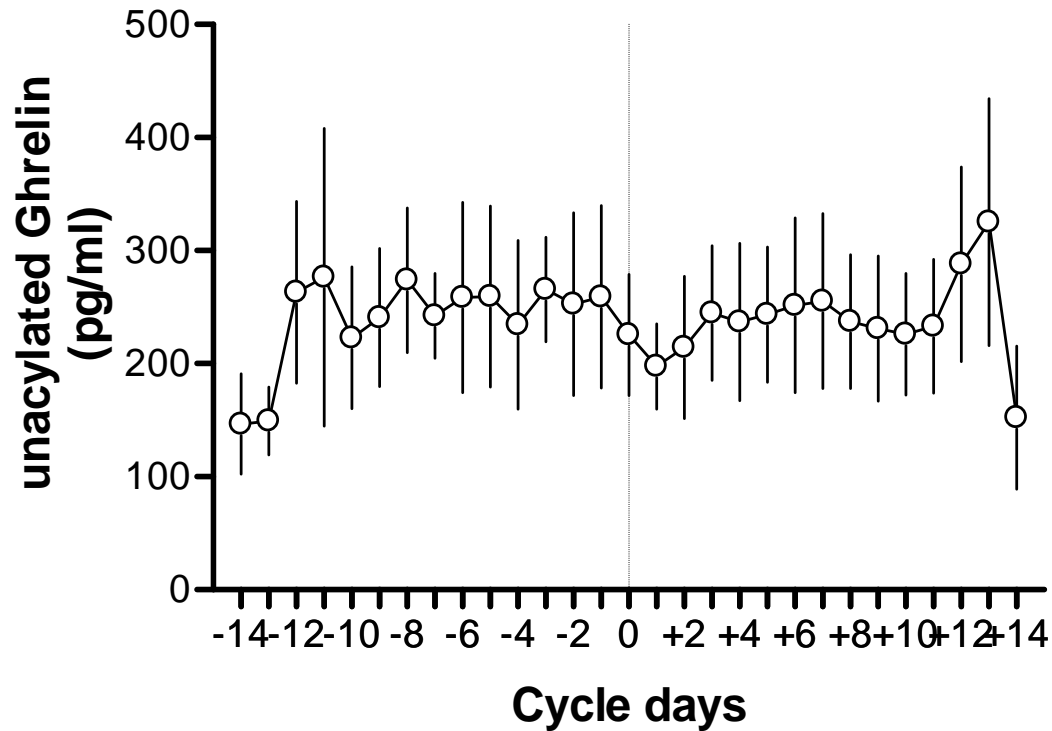
Σχήμα 8. Τα επίπεδα της οιστραδιόλης στον ορό (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Οι τιμές της οιστραδιόλης παρουσιάζονται αναφορικά με την κορυφαία τιμή (αιχμή-peak) της LH στο μεσοκύκλιο κύμα της. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει την αιχμή της LH.



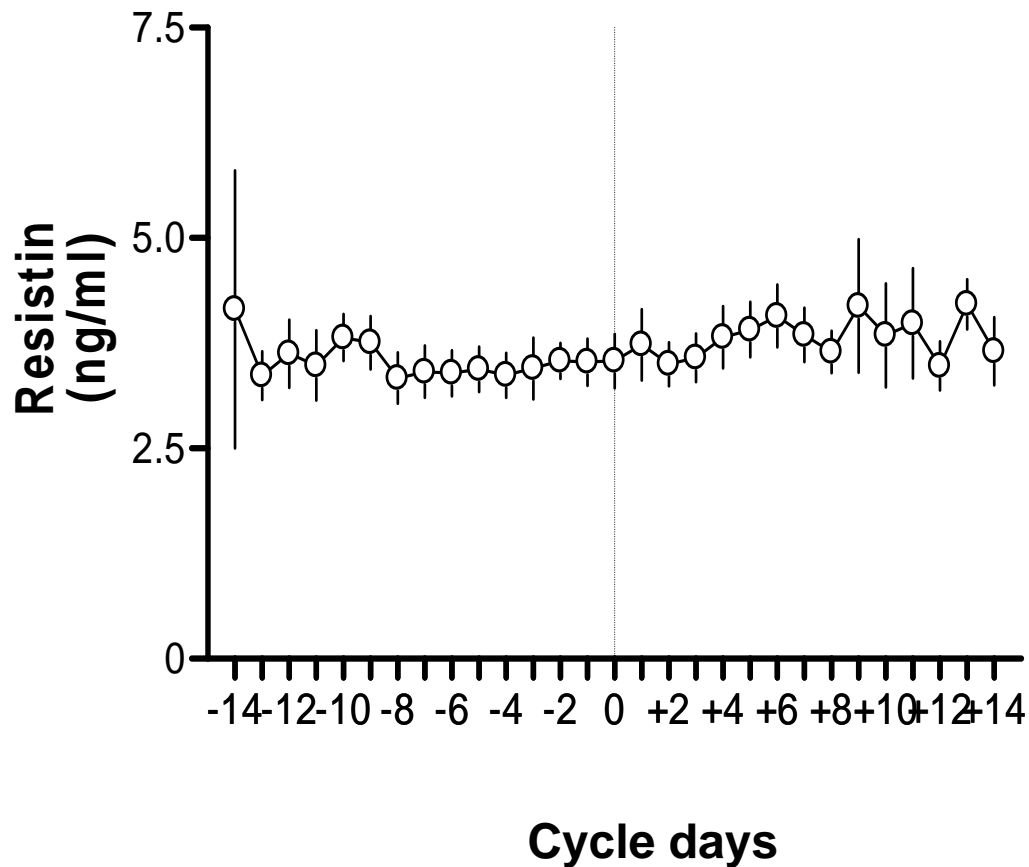
Σχήμα 9. Τα επίπεδα της προγεστερόνης στον ορό (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Οι τιμές της προγεστερόνης παρουσιάζονται αναφορικά με την κορυφαία τιμή (αιχμή-peak) της LH στο μεσοκύκλιο κύμα της. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει την αιχμή της LH.



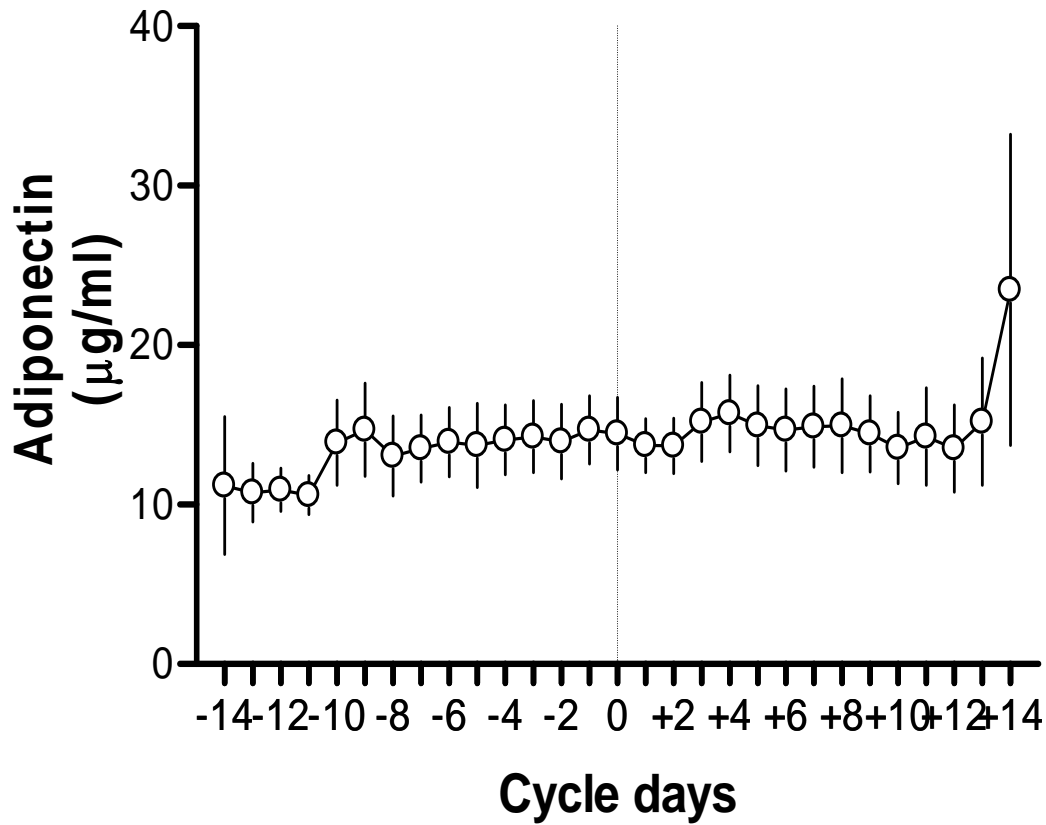
Σχήμα 10. Τα επίπεδα της ακυλιωμένης γκρελίνης στο πλάσμα (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Οι τιμές της ακυλιωμένης γκρελίνης παρουσιάζονται αναφορικά με την κορυφαία τιμή (αιχμή-peak) της LH στο μεσοκύκλιο κύμα της. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει την αιχμή της LH.



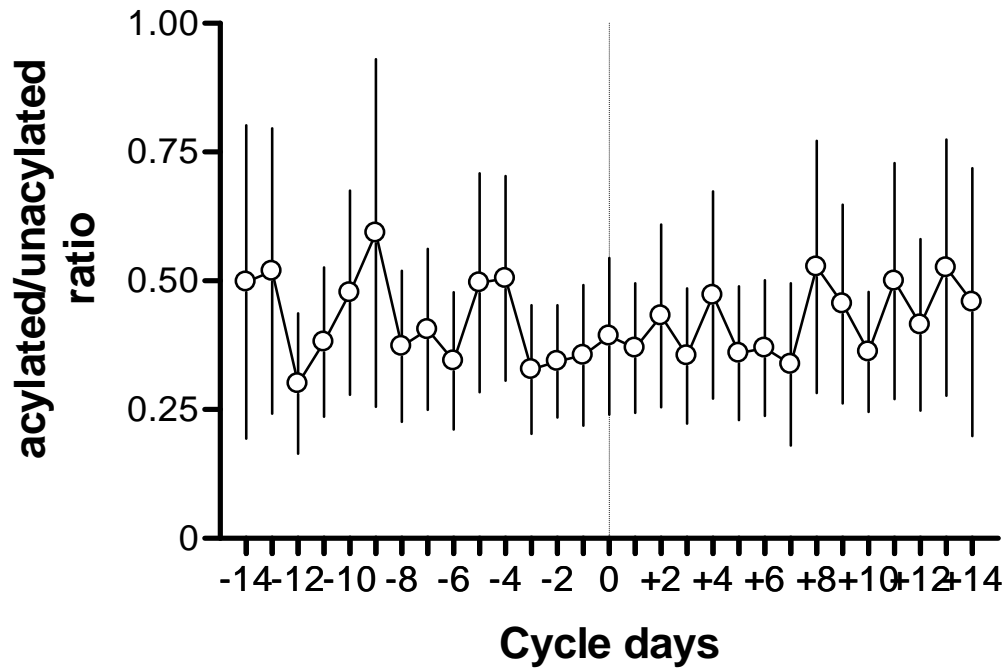
Σχήμα 11. Τα επίπεδα της μη-ακυλιωμένης γκρελίνης στο πλάσμα (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Οι τιμές της μη-ακυλιωμένης γκρελίνης παρουσιάζονται αναφορικά με την κορυφαία τιμή (αιχμή-peak) της LH στο μεσοκύκλιο κύμα της. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει την αιχμή της LH.



Σχήμα 12. Τα επίπεδα της ρεζιστίνης στον ορό (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Οι τιμές της ρεζιστίνης παρουσιάζονται αναφορικά με την κορυφαία τιμή (αιχμή-peak) της LH στο μεσοκύκλιο κύμα της. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει την αιχμή της LH.



Σχήμα 13. Τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης στον ορό (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Οι τιμές της αντιπονεκτίνης παρουσιάζονται αναφορικά με την κορυφαία τιμή (αιχμή-peak) της LH στο μεσοκύκλιο κύμα της. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει την αιχμή της LH.



Σχήμα 14. Η διακύμανση του λόγου ακυλιωμένης/μη-ακυλιωμένης γρελίνης στον φυσιολογικό κύκλο κανονικοποιήθηκε με την κορυφαία τιμή της LH. Η διακεκομμένη γραμμή αντιπροσωπεύει την αιχμή της LH.

Γκρελίνη, αντιπυονεκτίνη, ρεζιστίνη και διεγερμένος κύκλος

Εισαγωγή

Αντικρουόμενες στοιχεία έχουν αναφερθεί σχετικά με το ρόλο των εξωγενών και ενδογενών ωοθηκικών στεροειδών για την έκκριση της γκρελίνης, αντιπυονεκτίνης και ρεζιστίνης. Στην προηγούμενη έρευνα δείξαμε ότι τα επίπεδα αυτών των τριών πεπτιδικών ορμονών παραμένουν σταθερά κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού εμμηνορρησιακού κύκλου. Ο στόχος της παρούσας φάσης της μελέτης ήταν να διερευνήσει τις αλλαγές των επιπέδων της γκρελίνης, αντιπυονεκτίνης και ρεζιστίνης στην κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της διέγερσης των ωοθηκών με την FSH για την πολλαπλή ωοθυλακική ανάπτυξη.

Υλικό και μέθοδος

Είκοσι υγιείς γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο, ηλικίας $31,2 \pm 0,8$ ετών, με ΔΜΣ $24,5 \pm 1,9$ kg / m² διεγέρθηκαν σε ένα μοναδικό κύκλο με ανασυνδυασμένη FSH σε βραχύ πρωτόκολλο με GnRH αγωνιστή για IVF / ICSI λόγω ανδρικής στειρότητας. Σε όλες τις γυναίκες είχε δοθεί υποστήριξη ωχρινικής φάσης με κολπική προγεστερόνη. Δείγματα αίματος ελήφθησαν το πρωί, μετά από ολονύκτια νηστεία, την ημέρα 2 του κύκλου, πριν από την έναρξη των ενέσεων FSH και GnRH αγωνιστή, την ημέρα 6 του κύκλου καθώς και κατά την ημέρα χορήγησης της HCG, ωοληψία (OR), εμβρυομεταφορά (ET, δύο

ημέρες μετά την ωοληψία) καθώς και 7 και 12 ημέρες από την ΕΤ. . Όλα τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν στα 1000 g για 15 λεπτά, και τα πλάσματα και οι οροί αποθηκεύθηκαν στους -20 C μέχρι να γίνει ο ποσοτικός προσδιορισμός των αποτελεσμάτων. Τα επίπεδα πλάσματος ολικής γκρελίνης καθώς και η αντιπυονεκτίνη, ρεζιστίνη, FSH, LH, E2, και προγεστερόνη ορού μετρήθηκαν σε όλα τα δείγματα αίματος

Μετρήσεις

Η ολική γκρελίνη μετρήθηκε στο πλάσμα με τη χρήση ραδιοανοσοβιολογικής μεθόδου (KIPMR90, BioSource Europe S.A, Nivelles, Belgium). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως pg/ml.

Η αντιπυονεκτίνη και η ρεζιστίνη στον ορό του αίματος μετρήθηκαν με την χρήση ραδιοανοσοβιολογικής μεθόδου (BioSource Europe S.A, Nivelles, Belgium). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μg/ml και ng/ml αντίστοιχα.

Η μέτρηση των FSH και LH στον ορό του αίματος έγινε με τη χρήση ανοσοραδιομετρικών μεθόδων (FSH-IRMA και LH-IRMA αντίστοιχα, Biosource Europe S.A, Nivelles, Belgium). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mIU/ml.

Η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη μετρήθηκαν στον ορό με τη χρήση ραδιοανοσοβιολογικών μεθόδων (E2-RIA-CT και PROG-RIA-CT αντίστοιχα, BioSource Europe S.A). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως pg/ml και ng/ml αντίστοιχα.

Τα κατώτερα όρια μέτρησης (ευαισθησία της μεθόδου) για τις γκρελίνη, αντιπρονεκτίνη, ρεζιστίνη, FSH, LH, οιστραδιόλη και προγεστερόνη ήταν 40 pg/ml, 0.8 μg/ml, 0.2 ng/ml, 0.1 mIU/ml, 0.2 mIU/ml, 2 pg/ml και 0.05 ng/ml αντίστοιχα.

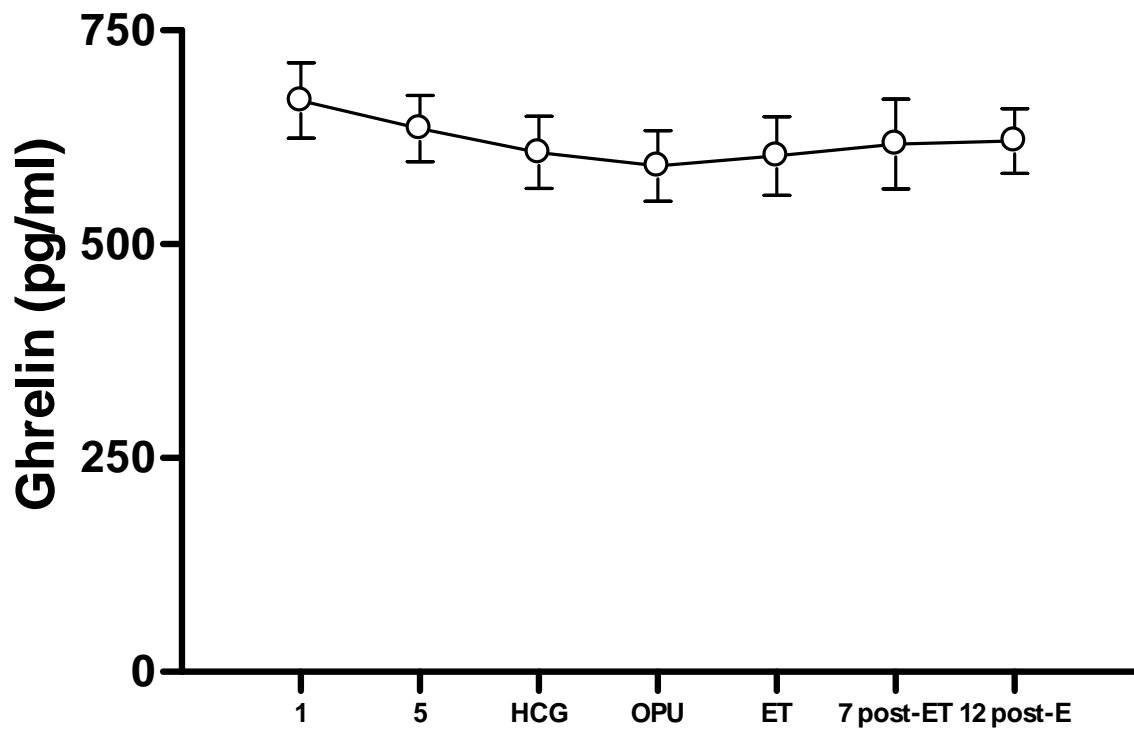
Ανάλυση δεδομένων

Στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με επανειλημμένες μετρήσεις one-way analysis of variance (ANOVA) ακολουθούμενη από Bonferroni post hoc test. Όλες οι τιμές εκφράζονται ως μέσο όρος \pm SEM. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πακέτο NCSS 2001.

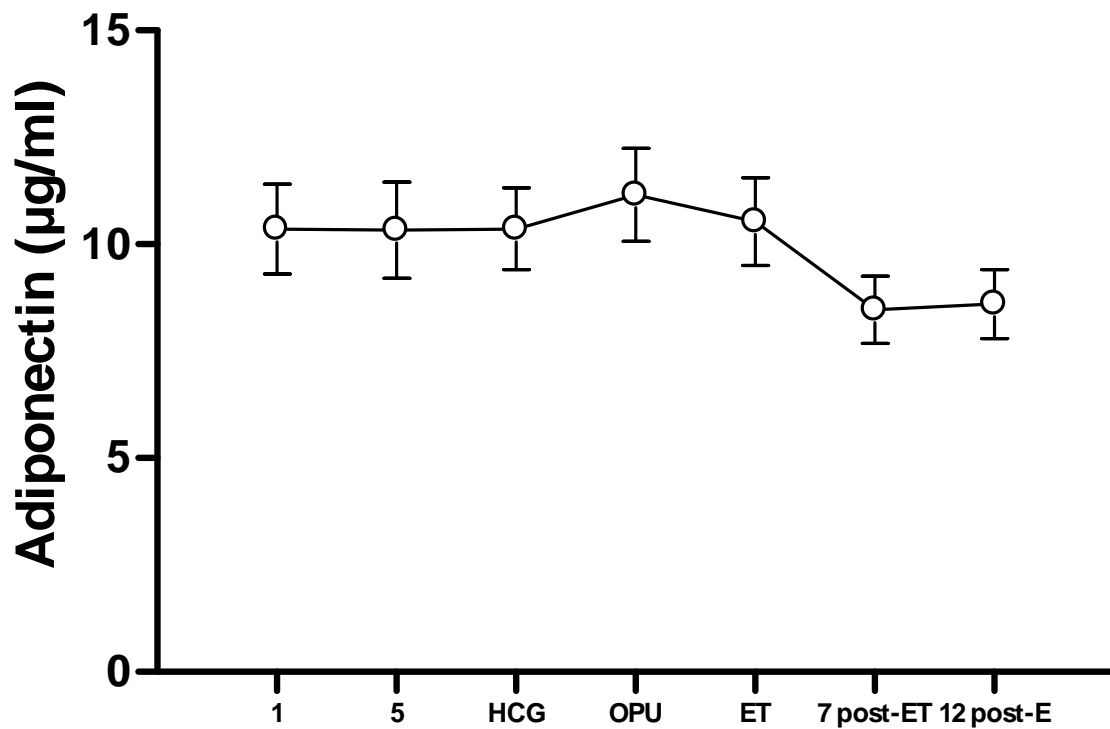
Αποτελέσματα

Η συγκέντρωση ορού της E2 αυξήθηκε σταδιακά κατά τη διάρκεια της διέγερσης με FSH, με κορύφωσή της την ημέρα της ένεσης της HCG ($2973,9 \pm 464$ pg / ml) και στη συνέχεια μειώθηκε σταδιακά ($p < 0,001$) (Σχήμα 20). Τα επίπεδα προγεστερόνης στον ορό ήταν χαμηλά κατά τη διάρκεια της διέγερσης με FSH, αλλά άρχισαν να αυξάνονται από την ημέρα της OR, και κορυφώθηκαν την ημέρα της ET ($47,4 \pm 4,7$ ng / ml) ($p < 0,001$). Τα επίπεδα προγεστερόνης μειώθηκαν σημαντικά κατά τις ημέρες 7 και 12 μετά την ET. (Σχήμα 21). Μετά την ένεση HCG, τα επίπεδα LH και FSH στον ορό καταστάλθηκαν κατά την ωχρινική φάση σε σύγκριση με τη φάση της διέγερσης, ανακάμπτοντας από την καταστολή την ημέρα 12 μετά την ET ($p < 0,001$) (Σχήματα 18-19). Η συνολική γκρελίνη πλάσματος ήταν $667,9 \pm 44$ pg / ml πριν από τη διέγερση με FSH και παρέμεινε αμετάβλητη καθ' όλη τη

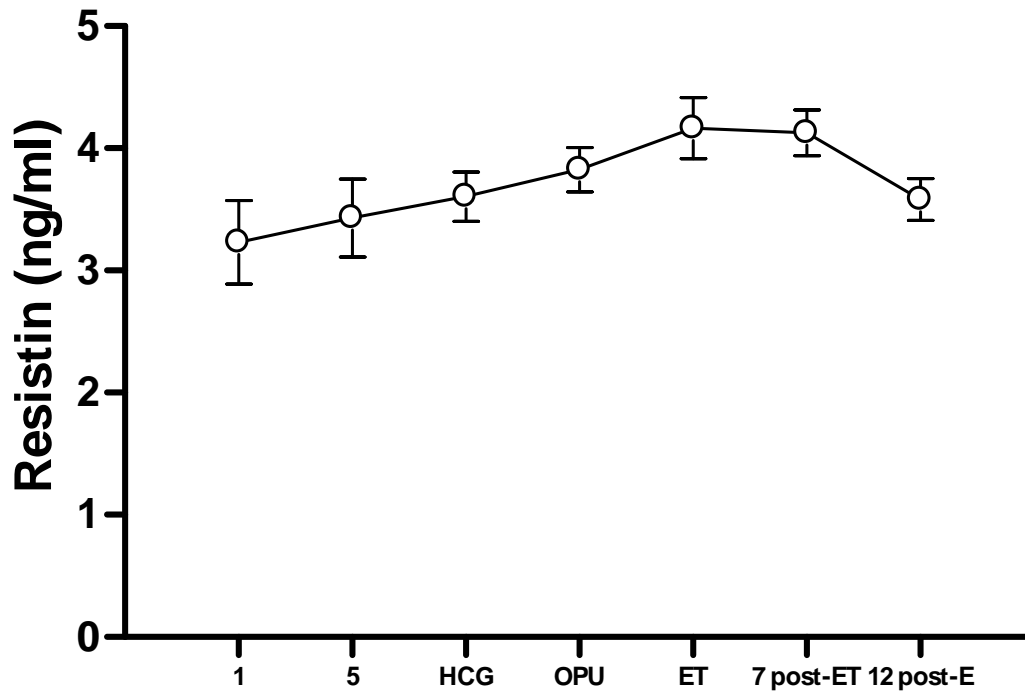
διάρκεια της μελέτης (Σχήμα 15). Στον ορό τα επίπεδα αντιπυονεκτίνης ήταν $10,3 \pm 1,0 \mu\text{g} / \text{ml}$ πριν από τη διέγερση με FSH, και παρέμειναν σταθερά κατά την περίοδο της διέγερσης μέχρι την ημέρα της ET και μειώθηκαν σημαντικά τις ημέρες 7 και 12 ($8,6 \pm 0,8 \mu\text{g} / \text{ml}$) μετά την ET ($p < 0,001$) (Σχήμα 16). Τα επίπεδα ρεζιστίνης ορού ήταν $3,2 \pm 0,3 \text{ ng} / \text{ml}$ πριν από τη χορήγηση της FSH αυξήθηκαν σταδιακά μέχρι την ημέρα της ET ($4,2 \pm 0,2 \text{ ng} / \text{ml}$) ($p < 0,05$), παρέμειναν αμετάβλητα μέχρι την ημέρα 7 μετά την ET και μειώθηκαν σημαντικά την ημέρα 12 μετά την ET ($3,6 \pm 0,2 \text{ ng} / \text{ml}$, $p < 0,05$) (Σχήμα 17).



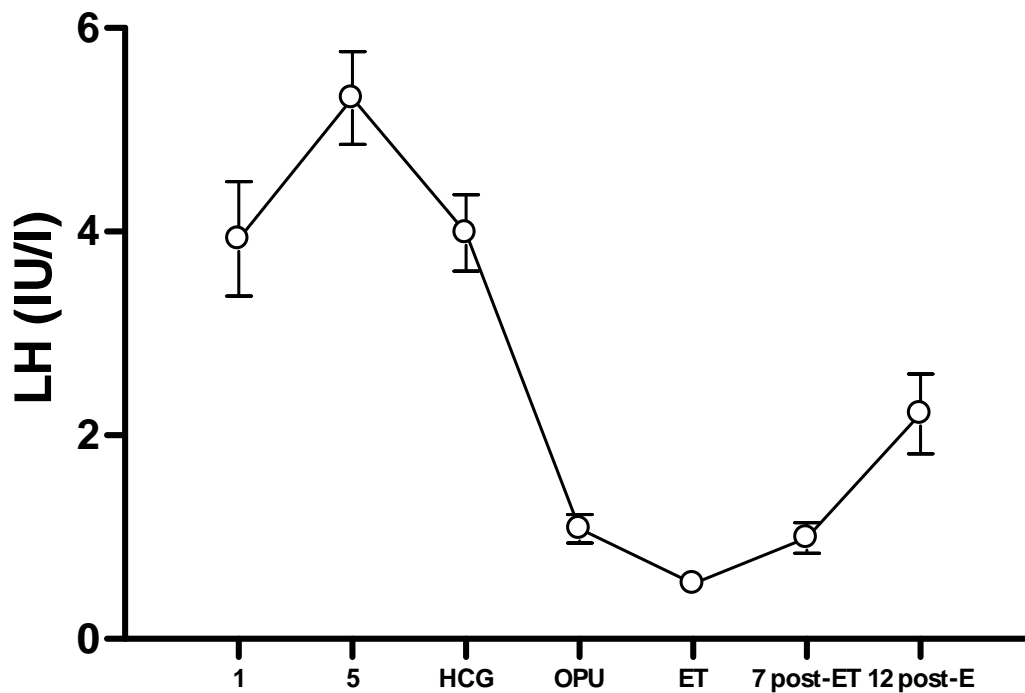
Σχήμα 15. Τα επίπεδα της γκρελίνης στο πλάσμα (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια της ωθηκικής διέγερσης με γοναδοτροπίνες και την ωχινική φάση μετά τη χορήγηση της HCG (1=1^η ημέρα διέγερσης, 5=5^η ημέρα διέγερσης, HCG=ημέρα χορήγησης της HCG, OPU=ωοληψία, ET=εμβρυομεταφορά, 7 post-ET=7^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά, 12 post-ET=12^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά).



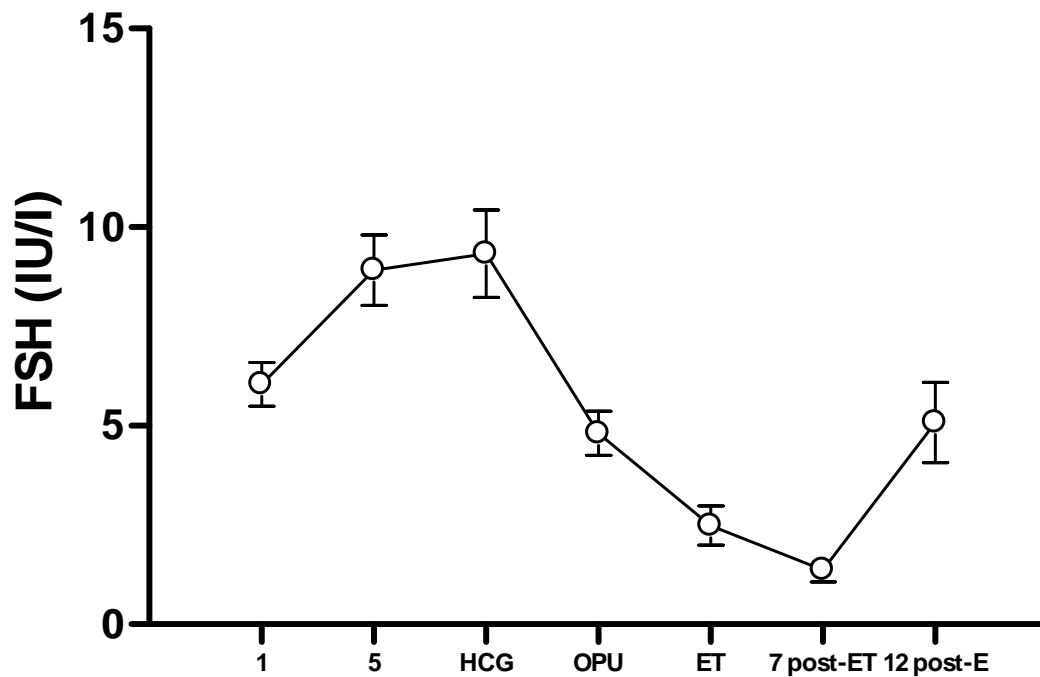
Σχήμα 16. Τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης στον ορό (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια της ωθηκικής διέγερσης με γοναδοτροπίνες και την ωχινική φάση μετά τη χορήγηση της HCG (1=1^η ημέρα διέγερσης, 5=5^η ημέρα διέγερσης, HCG=ημέρα χορήγησης της HCG, OPU=ωοληψία, ET=εμβρυομεταφορά, 7 post-ET=7^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά, 12 post-ET=12^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά).



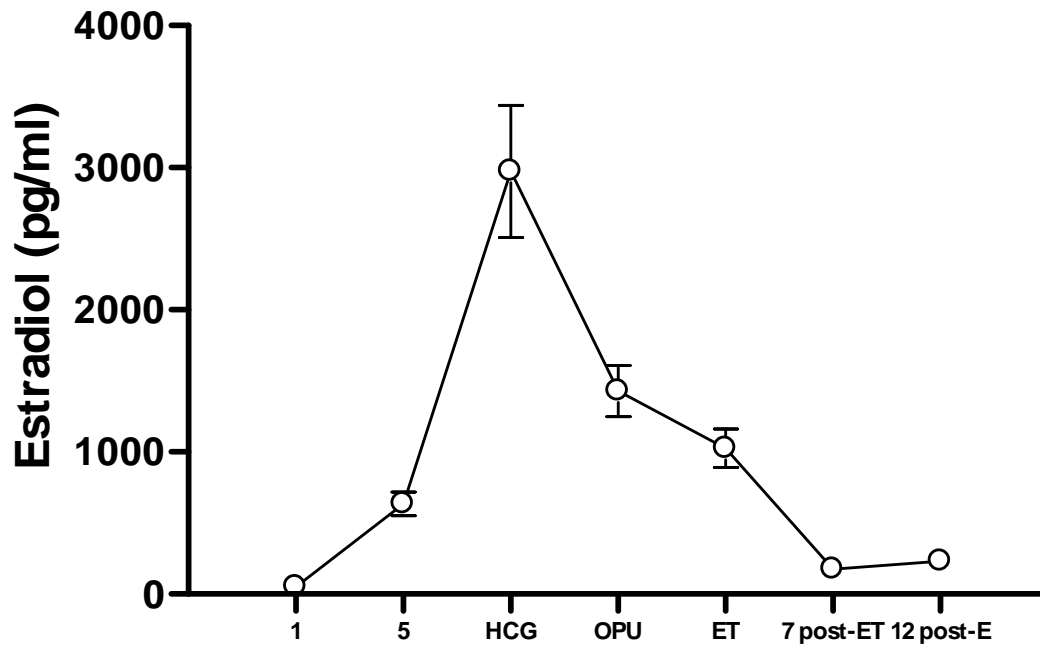
Σχήμα 17. Τα επίπεδα της ρεζιστίνης στον ορό (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια της ωθητικής διέγερσης με γοναδοτροπίνες και την ωχινική φάση μετά τη χορήγηση της HCG (1=1^η ημέρα διέγερσης, 5=5^η ημέρα διέγερσης, HCG=ημέρα χορήγησης της HCG, OPU=ωοληψία, ET=εμβρυομεταφορά, 7 post-ET=7^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά, 12 post-ET=12^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά).



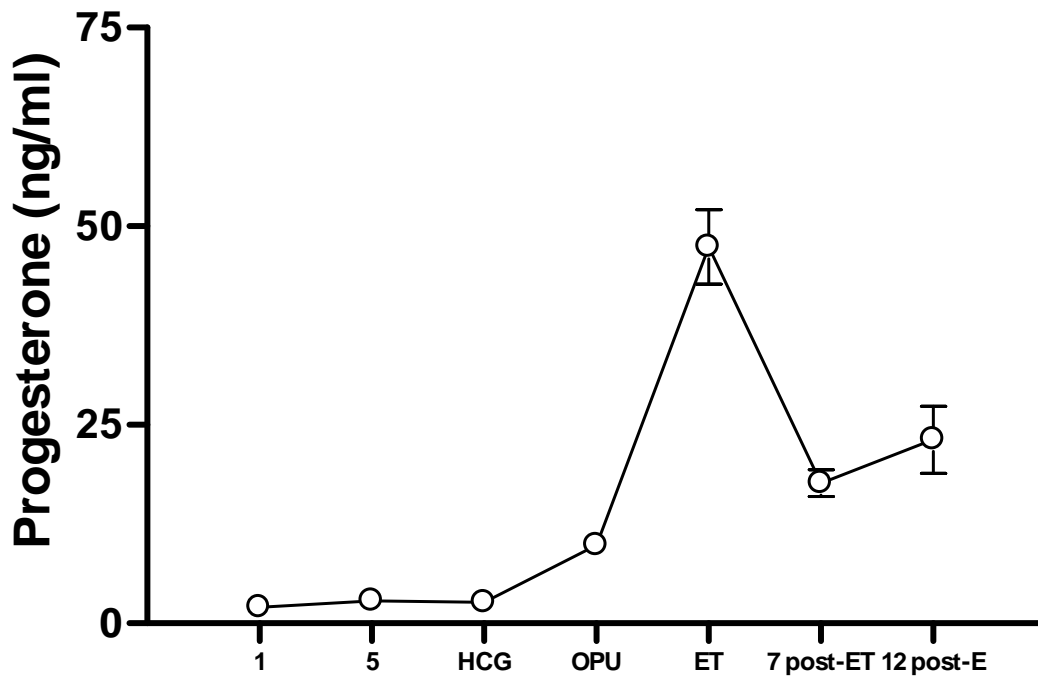
Σχήμα 18. Τα επίπεδα της LH στον ορό (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια της ωθηκικής διέγερσης με γοναδοτροπίνες και την ωχρινική φάση μετά τη χορήγηση της HCG (1=1^η ημέρα διέγερσης, 5=5^η ημέρα διέγερσης, HCG=ημέρα χορήγησης της HCG, OPU=ωοληψία, ET=εμβρυομεταφορά, 7 post-ET=7^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά, 12 post-ET=12^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά).



Σχήμα 19. Τα επίπεδα της FSH στον ορό (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια της ωθηκικής διέγερσης με γοναδοτροπίνες και την ωχινική φάση μετά τη χορήγηση της HCG (1=1^η ημέρα διέγερσης, 5=5^η ημέρα διέγερσης, HCG=ημέρα χορήγησης της HCG, OPU=ωοληψία, ET=εμβρυομεταφορά, 7 post-ET=7^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά, 12 post-ET=12^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά).



Σχήμα 20. Τα επίπεδα της οιστραδιόλης στον ορό (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια της ωθηκικής διέγερσης με γοναδοτροπίνες και την ωχρινική φάση μετά τη χορήγηση της HCG (1=1^η ημέρα διέγερσης, 5=5^η ημέρα διέγερσης, HCG=ημέρα χορήγησης της HCG, OPU=ωοληψία, ET=εμβρυομεταφορά, 7 post-ET=7^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά, 12 post-ET=12^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά).



Σχήμα 21. Τα επίπεδα της προγεστερόνης στον ορό (μέσος όρος \pm SEM) κατά τη διάρκεια της ωθηκικής διέγερσης με γοναδοτροπίνες και την ωχινική φάση μετά τη χορήγηση της HCG (1=1^η ημέρα διέγερσης, 5=5^η ημέρα διέγερσης, HCG=ημέρα χορήγησης της HCG, OPU=ωοληψία, ET=εμβρυομεταφορά, 7 post-ET=7^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά, 12 post-ET=12^η ημέρα μετά την εμβρυομεταφορά).

Συζήτηση

Στοιχεία στη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση των ενδογενών στεροειδών στα επίπεδα γκρελίνης του ορού δεν υπάρχουν. Η εργασία μας ήταν η πρώτη που εξέτασε τη διακύμανση της γκρελίνης σε φυσικούς αλλά και σε διεγερμένους κύκλους καταλήγοντας ότι δεν υπάρχει σημαντική διακύμανση. Τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα και με μια άλλη έρευνα της ομάδας μας όπου στέρηση των ενδογενών οιστρογόνων, μετά από αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομή, δεν επηρέασε τα επίπεδα της γκρελίνης (Daforoulos et al., 2010).

Τα στοιχεία στη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση της θεραπείας με οιστρογόνα στα επίπεδα γκρελίνης του ορού είναι αντικρουόμενα. Σε μία μελέτη, εξωγενών οιστρογόνων, που χορηγήθηκαν ως από του στόματος αντισυλληπτικά, αυξήθηκαν τα επίπεδα γκρελίνης σε περιπτώσεις με νευρική ανορεξία. Ομοίως, από του στόματος χορηγούμενα οιστρογόνα, με τη μορφή της θεραπείας υποκατάστασης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που είχαν υποστεί υστερεκτομή είχαν αποτέλεσμα να αυξηθούν τα επίπεδα πλάσματος της γκρελίνης, ενδεχομένως δρώντας άμεσα στα κυτάρρα που παράγουν την γκρελίνη στο στομάχι (Kellokoski et al., 2005). Επιπλέον, η θεραπεία των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών με 17β διαδερμικής E2-σε δόση των 50 mg / d σε συνεχή αγωγή για τουλάχιστον 24 μήνες και nomegestrol με μια δόση των 5 mg / ημέρα για 12 ημέρες / μήνα σε ένα διαδοχικό σχήμα οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα γκρελίνης σε σχέση

με αυτά μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών που δεν έλαβαν θεραπεία (Di Carlo et al., 2007).

Ωστόσο, σε κορίτσια με βραχύ ανάστημα, εξωγενής χορήγηση οιστρογόνων από το στόμα για 2 ημέρες με αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα E2 ορού, δεν είχε καμία επίπτωση στην επίπεδα γκρελίνης του ορού (Lebenthal et al., 2007) ενώ, μια άλλη πρόσφατη μελέτη έχει δείξει σημαντικές μειώσεις στα επίπεδα γκρελίνης τόσο σε από του στόματος όσο και με διαδερμική θεραπεία οιστρογόνων για 3 μήνες σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με το μεταβολικό σύνδρομο (Chu et al., 2006).

Πρόσφατα όμως φάνηκε πειραματικά, ότι η bolus χορήγηση γκρελίνης σε γυναίκες δεν επηρεάζει την βασική, αλλά και μετά τη χορήγηση GnRH, έκκριση της LH και FSH αλλά και της προγεστερόνης (Messini et al, 2009).

Τα μέχρι τώρα δεδομένα για τα επίπεδα της αντιπνεκτίνης κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου περιορίζονται σε δύο έρευνες, που έδειξαν είτε καμία μεταβολή (Kleiblova et al., 2006) είτε χαμηλότερα επίπεδα αντιπνεκτίνης μετά την ωοθυλακιορρηξία (Galván et al., 2007).

Στον άνθρωπο, μια φυσιολογική κατάσταση της εξάντλησης των ενδογενών οιστρογόνων είναι η εμμηνόπαυση, και πολλές προηγούμενες μελέτες (Gavrila et al., 2003; Jurimae et al., 2007; Tamakoshi et al., 2007), αλλά όχι όλες (Nishizawa et al., 2002; Chalvatzas et al., 2009) έχουν δείξει σημαντικά

υψηλότερα επίπεδα αντιπυονεκτίνης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σύγκριση με προεμμηνοπαυσιακές.

Επειδή τα δεδομένα στη βιβλιογραφία σχετικά με την αντιστοιχία μεταξύ των επιπέδων E2 και αντιπυονεκτίνης είναι επίσης αντικρουόμενα , είναι πιθανό ότι άλλοι παράγοντες εκτός από την E2, όπως η ηλικία (Jurimae et al., 2007), καθώς και μεταβολές της αναλογίας ανδρογόνων -οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση (Laughlin et al., 2006), μπορεί να συμβάλει σε αυτή τη διαφορά.

Όσον αφορά την επίδραση της χορήγησης εξωγενών οιστρογόνων στα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης σε γυναίκες, αντιφατικά στοιχεία έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα. Τα στεροειδή έχουν αναφερθεί να έχουν καμία επίδραση (Sumino et al., 2006), αύξηση (Chu et al., 2006), ή μείωση των επιπέδων της αντιπυονεκτίνης στο πλάσμα (Im et al., 2006). Πρόσφατα, η χορήγηση από του στόματος θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης, με οιστρογόνα, σε μετεμμηνοπαυσιακές υστεροκτομηθήσες γυναίκες, φάνηκε ότι μπορεί να ελαττώσει τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης (Kunnari et al., 2008).

Η παχυσαρκία έχει σημαντικές επιπτώσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα και ευθύνεται για διαταραχές του κύκλου καθώς και υπογονομότητα (Norman et al., 1998). Έχει, μέχρι τώρα ,φανεί μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της αντιπυονεκτίνης στο πλάσμα και της συστηματικής ευαισθησίας στην ινσουλίνη (Berg et al., 2002). Τα παραπάνω ευρήματα συνηγορούν υπέρ

του να σχετίζονται τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης με την υπογονιμότητα και τη θεραπεία της.

Δεν υπάρχουν ακόμα επαρκή δεδομένα σε διεγερμένους κύκλους. Από μια έρευνα φάνηκε ότι τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης ελαττώνονται κατά τη χορήγηση των γοναδοτροπινών, σαν αποτέλεσμα της αρνητικής επίδρασης που ασκούν τα αυξημένα οιστρογόνα. Αντίθετα, αύξηση παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση της hCG (Liu et al., 2006). Τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν από την έρευνά μας, ενώ άλλοι ερευνητές συσχέτισαν θετικά τα υψηλότερα επίπεδα αντιπυονεκτίνης στον ορό, κατά τη φάση της διέγερσης, αλλά όχι και στο ωοθυλακικό υγρό, με ένα επιτυχημένο αποτέλεσμα IVF (Bersinger et al., 2006).

Πρόσφατα, αποδείχτηκε για πρώτη φορά *in vivo* η ευεργετική δράση των γοναδοτροπινών στην έκκριση αντιπυονεκτίνης από την ανθρώπινη ωοθήκη. Η προσθήκη ανασυνδυασμένης LH, στην όψιμη ωοθυλακική φάση, κατά την διέγερση των ωοθηκών, προκάλεσε αύξηση της αντιπυονεκτίνης στο ωοθυλακικό υγρό (Gutman et al., 2009). Επίσης, πρόσφατα αποδείχτηκε ότι η αντιπυονεκτίνη αυξάνει, μέσω του IGF-1, την έκκριση οιστραδιόλης και προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα (Chabrolle et al., 2009).

Στη μελέτη μας, τα επίπεδα αντιπυονεκτίνης παρέμειναν σταθερά κατά τη διέγερση των ωοθηκών με μείωση κατά την ωχρινική φάση. Αυτό επιβεβαιώθηκε εν μέρει από μια πιο πρόσφατη έρευνα όπου δεν βρέθηκε συσχέτιση, μεταξύ της αντιπυονεκτίνης και των ισομορφών της, με την οιστραδιόλη και την FSH, κατά την φάση διέγερσης σε ICSI (Bersinger et al., 2010).

Η ρεζιστίνη δεν είχε μελετηθεί μέχρι τώρα, στον φυσιολογικό γεννητικό κύκλο. Μελέτες σε γυναίκες, για την επίδραση των εξωγενών οιστρογόνων στα επίπεδα της ρεζιστίνης έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η χορήγηση από του στόματος θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης, με οιστρογόνα, σε μετεμμηνοπαυσιακές υστεροεκτομηθής γυναίκες, φάνηκε ότι δεν μεταβάλλει τα επίπεδα της ρεζιστίνης (Kunnari et al., 2008).

Σε μια μελέτη, θεραπεία με από του στόματος αντισυλληπτικά για 6 μήνες δεν είχε καμία επίδραση σχετικά με τα επίπεδα της ρεζιστίνης του ορού (Rechberger et al., 2004), ενώ σε μια άλλη μελέτη τα από του στόματος αλλά όχι και τα διαδερμικά οιστρογόνα, χορηγούμενα για 3 μήνες σε παχύσαρκες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με το μεταβολικό σύνδρομο, προκάλεσαν αύξηση στα επίπεδα ορού της ρεζιστίνης (Chu et al., 2006). Σε μια πρόσφατη έρευνα, οι τιμές ορού της ρεζιστίνης δεν επηρεάστηκαν ούτε κατά την εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων σε προεμμηνοπαυσιακές και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες όσο και μετά από ωθηεκτομή σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Chalvatzas et al., 2009).

Παλαιότερη έρευνα ανέφερε, ότι δεν υπήρχε συσχέτιση των επιπέδων ρεζιστίνης και οιστραδιόλης στον ορό, σε διεγερμένους κύκλους (Lu et al., 2005). Πρόσφατα, παρατηρήθηκε μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων ορού της ρεζιστίνης και του αριθμού των ωαρίων που ανακτήθηκαν κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Ωστόσο, το φαινόμενο

αυτό ήταν παρόν μόνο στις μη PCOS γυναίκες. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι τα επίπεδα της ρεζιστίνης ορού θα μπορούσαν να είναι μια καλή ένδειξη της ανταπόκρισης των ωοθηκών σε υπογόνιμες γυναίκες που δεν έχουν PCOS κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης (Chen et al., 2007). Στην έρευνά μας τα επίπεδα ρεζιστίνης ορού αυξήθηκαν κατά την περίοδο διέγερσης και μέχρι την εμβρυομεταφορά.

Πιθανολογούμε ότι τα υπερφυσιολογικά επίπεδα των οιστρογόνων τροποποιούν την έκκριση της ρεζιστίνης από τον λιπώδη ιστό. Βραχυπρόθεσμη χορήγηση οιστρογόνων σε μεγάλες δόσεις έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ανοχή στη γλυκόζη, που προκύπτουν από την καταστολή της έκκρισης ινσουλίνης της πρώτης φάσης και αυξημένης αντίστασης στην ινσουλίνη (Godsland et al., 2005). Η ελεγχόμενη υπερδιέγερση των ωοθηκών είναι μια πολλή σημαντική διαδικασία κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η χρήση των γοναδοτροπινών και της χοριακής γοναδοτροπίνης εκθέτουν τις ασθενείς σε σχετικά υψηλά επίπεδα ορμονών, που μπορούν να πυροδοτήσουν πλήθος βιολογικών απαντήσεων. Η hCG διεγείρει την ωοθήκη και ενεργοποιεί φλεγμονώδεις διαδικασίες καθώς και το σύστημα ρενίνης-αλδοστερόνης και το συμπαθητικό νευρικό σύστημα (Manau et al., 2002; Orvieto et al., 2004). Μέσα στο φάσμα όλων αυτών των αντιδράσεων πιθανώς εντάσσεται και η αύξηση στην ρεζιστίνη που παρατηρήσαμε.

Συμπεράσματα

Αυτή η έρευνα, ήταν η πρώτη που, στην πρώτη της φάση, εξέτασε την ακυλιωμένη και μη-ακυλιωμένη γκρελίνη καθ'όλη τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Μετρήσαμε αυτές τις δύο μορφές, και όχι την ολική γκρελίνη, για να διαφοροποιήσουμε την κατανομή τους στην κυκλοφορία. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν, ότι τα επίπεδα και των δύο μορφών της γκρελίνης παρέμειναν ανεπηρέαστα κατά τη διάρκεια όλου του κύκλου. Μόνο σποραδικές στατιστικές συσχετίσεις βρέθηκαν μεταξύ ακυλιωμένης και μη-ακυλιωμένης γκρελίνης και επιπέδων των οιστρογόνων, φανερώνοντας ότι το μέγεθος των φυσιολογικών αλλαγών των στεροειδών, κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου, δεν έχει καμία μεγάλη επίδραση στην έκκριση της γκρελίνης από το στόμαχο.

Επιπλέον, η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι τα επίπεδα γκρελίνης στο πλάσμα δεν μεταβάλλονται σημαντικά κατά τη διάρκεια διέγερσης των ωοθηκών με γοναδοτροπίνες και πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης για εξωσωματική γονιμοποίηση / ICSI.

Τα επίπεδα της ρεζιστίνης δεν είχαν ποτέ ερευνηθεί καθ'όλη τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν ότι οι τιμές της ρεζιστίνης παρέμειναν ανεπηρέαστες κατά τη διάρκεια του κύκλου, υποδηλώνοντας ότι οι φυσιολογικές αλλαγές των ορμονών του φύλου δεν έχουν καμία επίδραση στην έκκριση ρεζιστίνης από τα λιποκύτταρα.

Αντιθέτως, τα επίπεδα ρεζιστίνης ορού αυξήθηκαν κατά την περίοδο διέγερσης με γοναδοτροπίνες, γεγονός που υποδηλώνει μια πιθανή συμμετοχή της ορμόνης αυτής στην διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης, που πρέπει όμως να επιβεβαιωθεί και από άλλες έρευνες.

Επιπλέον, τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, δείχνουν ότι σε γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο, τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης παραμένουν σταθερά καθ'όλη τη διάρκεια του κύκλου. Το κατά πόσο οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις των στεροειδών του φύλου κατά τη διάρκεια του κύκλου έχουν κάποια επίδραση στις διάφορες ισομορφές της αντιπυονεκτίνης στο αίμα, χρήζει περαιτέρω έρευνας.

Αντιθέτως, τα επίπεδα αντιπυονεκτίνης ενώ παρέμειναν σταθερά κατά τη διαδικασία υπερδιέγερσης των ωοθηκών μείωθηκαν κατά την ωχρινική φάση. Πιθανολογείται μια αρνητική επίδραση της προγεστερόνης, η οποία χορηγήθηκε σε σχετικά υψηλές δόσεις για την υποστήριξη της κύησης, παρατήρηση που χρειάζεται να επιβεβαιωθεί και με άλλες έρευνες.

Συμπερασματικά, δείξαμε ότι τα επίπεδα των ανωτέρω ορμονών παραμένουν σταθερά κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου. Θεωρούμε ότι η έκκριση των ουσιών αυτών δεν ρυθμίζεται φυσιολογικά από τα ωοθηκικά στεροειδή. Αντιθέτως προτείνεται, ότι η δυναμική των ωοθηκικών στεροειδών σε διεγερμένους κύκλους ελέγχει με διαφορετικό τρόπο την έκκριση ρεζιστίνης

και αντιπυονεκτίνης. Παρολ'αυτά, και με βάση προηγούμενα δεδομένα σε πειραματόζωα, αλλαγές στην έκφραση γονιδίων στον λιπώδη ιστό και το στομάχο, κάτω από την επίδραση των στεροειδών του φύλου, δεν μπορούν να αποκλειστούν.

SUMMARY

Blood ghrelin, resistin and adiponectin concentrations during the normal menstrual cycle and in superovulated cycles

Introduction: Conflicting data have been reported about the role of exogenous and endogenous ovarian steroids on the secretion of ghrelin, resistin, and adiponectin . The objective of the present study was to investigate changes of ghrelin, resistin, and adiponectin levels in the circulation during a) the normal menstrual cycle and b) in ovarian stimulation with FSH for multiple follicular development.

Material & methods: a) Eight healthy normally cycling women were observed during a whole menstrual cycle. Daily blood samples were taken every morning, after overnight fasting, from day 2 of the cycle until the next menstrual period. Plasma acylated and unacylated ghrelin, and serum resistin, adiponectin, FSH, LH, E2, and P levels were measured in all blood samples.

b) Twenty healthy normally cycling women, aged 31.2 ± 0.8 years with BMI 24.5 ± 1.9 kg/m², were stimulated in a single cycle with recombinant FSH in a GnRH agonist short protocol for IVF/ICSI due to male infertility. Luteal phase support with vaginal progesterone was given to all women. Blood samples were taken in the morning, after overnight fasting, on cycle day 2 before the commencement of FSH and GnRH agonist injections, on cycle days 5 and 7

and on the days of HCG injection, oocyte retrieval (OR), embryo transfer (ET, two days after the OR) as well as 7 and 12 days following ET. Plasma total ghrelin and serum adiponectin, resistin, FSH, LH, E2, and progesterone levels were measured in all blood samples.

Results: a) In all women serum FSH, LH, E2, and P levels, normalized to the midcycle peak LH value, showed the typical changes of the normal menstrual cycle. Acylated and unacylated ghrelin, resistin, and adiponectin levels did not change significantly during the whole menstrual cycle.

b) Plasma total ghrelin was 667.9 ± 44 pg/ml before the stimulation with FSH and remained unchanged during the whole study period. Serum adiponectin levels were 10.3 ± 1.0 μ g/ml before the stimulation with FSH, remaining stable during the stimulation period until the day of ET and decreasing significantly on days 7 and 12 (8.6 ± 0.8 μ g/ml) post-ET ($p < 0.001$). Serum resistin levels were 3.2 ± 0.3 ng/ml before the FSH administration increasing gradually until the day of ET (4.2 ± 0.2 ng/ml) ($p < 0.05$), remaining unchanged on day 7 post-ET and decreasing significantly on day 12 post-ET (3.6 ± 0.2 ng/ml, $p < 0.05$).

Conclusions: The present study shows for the first time that plasma ghrelin and serum resistin and adiponectin levels do not change significantly during the normal menstrual cycle. It is suggested that ovarian steroid dynamics during the cycle have no effect on the secretion of these substances.

It is also shown for the first time that plasma ghrelin levels did not change significantly during ovarian stimulation for IVF/ICSI-ET. Serum resistin levels increased during the stimulation period while adiponectin levels remained stable decreasing during the luteal phase. It is suggested that ovarian steroid

dynamics in superovulated cycles control differentially resistin and adiponectin secretion.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aloi JA, Bergendahl M, Iranmanesh A, Veldhuis JD (1997) Pulsatile intravenous gonadotropin-releasing hormone administration averts fasting-induced hypogonadotropism and hypoandrogenemia in healthy, normal weight men. *J Clin Endocrinol Metab.* 82, 1543–8.

Ardawi MS, Rouzi AA (2005) Plasma adiponectin and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 83, 1708–16.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* 257, 79–83.

Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T (2001) Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 4753–8.

Arvat, E., Maccario M, di Vito L, Broglio F, Benso A, Gottero C, Papotti M, Muccioli G, Dieguez C, Casanueva F.F, Deghenghi R, Camanni F, Ghigo E, (2001). Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and Ghreleasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1169–74.

Axelsson J, Bergsten A, Qureshi AR, Heimbürger O, Bárány P, Lönnqvist F, Lindholm B, Nordfors L, Alvestrand A, Stenvinkel P (2006) Elevated resistin levels in chronic kidney disease are associated with decreased glomerular filtration rate and inflammation, but not with insulin resistance. *Kidney Int.* 69, 596-604

Barreiro ML, Suominen JS, Gaytan F, Pinilla L, Chopin LK, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E, Toppari J & Tena-Sempere M (2003) Developmental, stage-specific, and hormonally regulated expression of growth hormone secretagogue receptor messenger RNA in rat testis. *Biol Reprod.* 68, 1631-40

Barreiro ML, Gaytan F, Castellano JM, Suominen JS, Roa J, Gaytan M, Aguilar E, Dieguez C, Toppari J & Tena-Sempere M (2004) Ghrelin inhibits the proliferative activity of immature Leydig cells *in vivo* and regulates stem cell factor messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Endocrinology* 145, 4825–34

Barreiro ML, Gaytan F, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C & Tena-Sempere M (2002) Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biology of Reproduction* 67, 1768–76.

Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor (2001) *Endocr Rev* 22, 724-63.

Berg AH, Combs TP, Scherer PE (2002) ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13, 84–89.

Bersinger NA, Wunder DM (2010) Adiponectin isoform distribution in serum and in follicular fluid of women undergoing treatment by ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 89, 782-8.

Bersinger NA, Birkhäuser MH, Wunder DM (2006) Adiponectin as a marker of success in intracytoplasmic sperm injection/embryo transfer cycles. *Gynecol Endocrinol* 22, 479-83.

Bełtowski J (2003) Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 9, RA55-61.

Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A (2005) Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol.* 174, 5789-95.

Böttner A, Kratzsch J, Müller G, Kapellen TM, Blüher S, Keller E, Blüher M, Kiess W (2004) Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 89, 4053-61.

Caja S, Torrente M, Martínez I, Abelenda M, Puerta M (2005) Adiponectin values are unchanged during pregnancy in rats. *J Endocrinol Invest.* .28, 609-15.

Cameron JL, Nosbisch C (1991) Suppression of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion during short term food restriction in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 128, 1532–40.

Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytan F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, Casanueva FF, Aguilar E & Dieguez C (2003) Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 144, 1594–1602.

Caminos JE, Nogueiras R, Gaytán F, Pineda R, González CR, Barreiro ML, Castaño JP, Malagón MM, Pinilla L, Toppari J, Diéguez C, Tena-Sempere M (2008) Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis. *Endocrinology* 149, 3390-402.

Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, Garcia- Caballero T (2005) Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 4276–86.

Campos DB, Palin MF, Bordignon V, Murphy BD (2008) The 'beneficial' adipokines in reproduction and fertility. *Int J Obes (Lond)* 32, 223-31.

Carmina E, Orio F, Palomba S, Cascella T, Longo RA, Colao AM (2005) Evidence for altered adipocyte function in polycystic ovarysyndrome. *Eur J Endocrinol* 152, 389–394.

Cassoni P, Papotti M, Ghè C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, Deghenghi R, Reissmann T, Ghigo E, Muccioli G (2001) Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1738-45.

Cella F, Giordano G, Cordera R (2000) Serum leptin concentrations during the menstrual cycle in normal-weight women: effects of an oral triphasic estrogen-progestin medication. *Eur J Endocrinol.* 142, 174-8.

Chabrolle C, Tosca L, Crochet S, Tesseraud S, Dupont J (2007) Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: potential role in ovarian steroidogenesis. *Domest Anim Endocrinol.* 33, 480-7.

Chabrolle C, Tosca L, Dupont J (2007) Expression and regulation of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in the rat ovary. *Reproduction* 133, 719–731.

Chabrolle C, Tosca L, Ramé C, Lecomte P, Royère D, Dupont J (2009) Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 92, 1988-96.

Chabrolle C, Jeanpierre E, Tosca L, Ramé C, Dupont J (2008) Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 19, 6-11.

Chalvatzas N, Dafopoulos K, Kosmas G, Kallitsaris A, Pournaras S, Messinis IE (2009) Effect of ovarian hormones on serum adiponectin and resistin concentrations. *Fertil Steril.* 91, 1189-94.

Chen YH, Lee MJ, Chang HH, Hung PF, Kao YH (2006) 17 beta-estradiol stimulates resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes via the estrogen receptor, extracellularly regulated kinase, and CCAAT/enhancer binding

protein-alpha pathways. *Endocrinology* 147:4496–504.

Chen YC, Tsai EM, Chen HS, Liu YH, Lee CH, Chou FH, Chen IJ, Chen SY, Jong SB, Chan TF (2007) Serum resistin level is a predictor of ovarian response in in vitro fertilisation cycle. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 86, 963-7.

Chen J, Tan B, Karteris E, Zervou S, Digby J, Hillhouse EW (2006) Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia*49, 1292–1302.

Chu MC, Cospers P, Nakhuda GS, Lobo RA (2006) A comparison of oral and transdermal short-term estrogen therapy in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Fertil Steril.* 86, 1669–75.

Chu M, Cospers P, Orio F, Carmina E, Lobo R (2006) Insulin resistance in postmenopausal women with metabolic syndrome and the measurements of adiponectin, leptin, resistin, and ghrelin. *AmJ Obstet Gynecol* 194, 100–4.

Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ (2003) Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 46, 459–69.

Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE (2003) Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 52, 268-76.

Cortelazzi D, Cappiello V, Morpurgo PS, Ronzoni S, Nobile De Santis MS, Cetin I, Beck-Peccoz P & Spada A (2003) Circulating levels of ghrelin in human fetuses. *European Journal of Endocrinology* 149, 111–16

Crosignani PG, Vegetti W, Colombo M, Ragni G (2002) Resumption of fertility with diet in overweight women. *Reprod Biomed* 5, 60-4.

Dafopoulos K, Chalvatzas N, Kosmas G, Kallitsaris A, Pournaras S, Messinis IE (2010) The effect of estrogens on plasma ghrelin concentrations in women. *J Endocrinol Invest.* 33, 109-12.

D'Anna R, Baviera G, Corrado F, Giordano D, De Vivo A, Nicocia G, Di Benedetto A. (2006) Adiponectin and insulin resistance in early- and late-onset pre-eclampsia. *BJOG* 113, 1264-9.

D'Eon TM, Souza SC, Aronovitz M, Martin S, Obin MS, Fried SK, et al. Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways. *J Biol Chem* 2005;280:35983–91.

De Ambrogi M, Volpe S, Tamanini C (2003) Ghrelin: central and peripheral effects of a novel peptidil hormone. *Med Sci Monit.* 9, RA217-24.

De Souza MJ, Leidy HJ, O'Donnell E, Lasley B, Williams NI (2004) Fasting ghrelin levels in physically active women: relationship with menstrual disturbances and metabolic hormones *J Clin Endocrinol Metab.* 89, 3536-42.

Di Carlo C, Tommaselli GA, Gargano V, Sammartino A, Bifulco G, Tauchmanova L (2007) Effects of estrogen-progestin therapy on serum levels of RANKL, osteoprotegerin, osteocalcin, leptin, and ghrelin in postmenopausal women. *Menopause* 14, 1–7.

Dziunycz P, Milewski L, Radomski D, Barcz E, Kamiński P, Roszkowski PI, Malejczyk J (2008) Elevated ghrelin levels in the peritoneal fluid of patients with endometriosis: associations with vascular endothelial growth factor (VEGF) and inflammatory cytokines. *Fertil Steril.* 29, 1844-9.

Escobar-Morreale HF, Luque-Ramirez M, San Millan JL (2005) The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev.* 26, 251–282.

Fenkci V, Fenkci S, Yilmazer M, Serteser M (2003) Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertil Steril.* 80, 123-7.

Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Aguilar E & Pinilla L (2004) Ghrelin effects on gonadotropin secretion in male and female rats. *Neuroscience Letters* 362, 103–107.

Fernandez-Fernandez R, Navarro VM, Barreiro ML, Vigo EM, Tovar S, Sirotkin AV, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L & Tena-Sempere M (2005) Effects of chronic hyperghrelinemia on puberty onset and pregnancy outcome in the rat. *Endocrinology* 146, 3018–3025.

Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Navarro VM, Barreiro ML, Castellano JM, Aguilar E & Pinilla L (2006) Effects of Ghrelin upon Gonadotropin-Releasing Hormone and Gonadotropin Secretion in Adult Female Rats: *in vivo* and *in vitro* Studies. *Neuroendocrinology* 82, 245–255

Fernández-Fernández R, Tena-Sempere M, Roa J, Castellano JM, Navarro VM, Aguilar E, Pinilla L. (2007) Direct stimulatory effect of ghrelin on pituitary release of LH through a nitric oxide-dependent mechanism that is modulated by estrogen. *Reproduction* Jun.133, 1223-32.

Forbes S, Li XF, Kinsey-Jones J, O'Byrne K. (2009) Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. *Neurosci Lett.* 28, 143-7. .

Fuglsang J, Skjaerbaek C, Frystyk J, Flyvbjerg A, Ovesen P. (2006) A longitudinal study of serum adiponectin during normal pregnancy. *BJOG* 113, 110-3.

Furuta M, Funabashi T & Kimura F (2001) Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288, 780–785.

Gale SM, Castracane VD, Mantzoros CS (2004) Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *J Nutr.* 134, 295-8. R

Galván RE, Basurto L, Saucedo R, Campos S, Hernández M, Zárata A. (2007) Adiponectin concentrations during menstrual cycle. *Ginecol Obstet Mex.* 75, 435-8.

Gambineri A, Pagotto U, Tschöp M, Vicennati V, Manicardi E, Carcello A, Cacciari M, De lasio R, Pasquali R. (2003) Anti-androgen treatment increases circulating ghrelin levels in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest.* 26, 629-34.

Gavrila A, Chan JL, Yiannakouris N, Kontogianni M, Miller LC, Orlova C (2003) Serum adiponectin levels are inversely associated with overall and central fat distribution but are not directly regulated by acute fasting or leptin administration in humans: cross-sectional and interventional studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 4823–31.

Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C & Tena-Sempere M (2003) Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88, 879–887.

Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Paniagua R, Nistal M, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C & Tena-Sempere M (2004) Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89, 400–409.

Gaytan F, Morales C, Barreiro ML, Jeffery P, Chopin LK, Herington AC, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C & Tena-Sempere M (2005) Expression of growth hormone secretagogue receptor type 1a, the functional ghrelin receptor, in human ovarian surface epithelium, mullerian duct derivatives, and ovarian tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90, 1798–1804.

Ghigo E, Broglio F, Arvat E, Maccario M, Papotti M, Muccioli G (2005) Ghrelin: more than a natural GH secretagogue and/or an orexigenic factor. *Clin Endocrinol (Oxf)* 62, 1–17.

Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 87, 2988.

Grill, H. J., Schwartz, M. W., Kaplan, J. M., Foxhall, J. S., Breininger, J. & Baskin, D. G. (2002) Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology* 143, 239–246.

Grinspoon S, Miller KK, Herzog DB, Grieco KA, Klibanski A (2004) Effects of estrogen and recombinant human insulin-like growth factor-I on ghrelin secretion in severe undernutrition. *J Clin Endocrinol Metab.* 89, 3988–93.

Godsland I.F.(2005) Oestrogens and insulin secretion.*Diabetologia*

Gualillo O, Caminos JE, Kojima M, Kangawa K, Arvat E, Ghigo E (2001) Gender and gonadal influences on ghrelin mRNA levels in rat stomach. *Eur J Endocrinol.* 144, 687–90.

Gualillo O, Lago F, Gómez-Reino J, Casanueva FF, Dieguez C (2003) Ghrelin, a widespread hormone: insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action. *FEBS Lett.* 552, 105-9.

Gualillo O, Caminos J, Blanco M, García-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F (2001) Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology*.142, 788-94.

Gui Y, Silha JV, Murphy LJ. (2004) Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obes Res*. 12, 1481–91.

Gutman G, Barak V, Maslovitz S, Amit A, Lessing JB, Geva E. (2009) Recombinant luteinizing hormone induces increased production of ovarian follicular adiponectin in vivo: implications for enhanced insulin sensitivity. *Fertil Steril*. 91, 1837-41.

Haap M, Machicao F, Stefan N, Thamer C, Tschritter O, Schnuck F, Wallwiener D, Stumvoll M, Häring HU, Fritsche A. (2005) Genetic determinants of insulin action in polycystic ovary syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113, 275-81.

Hauner H (2004) The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav*. 83, 653-8

Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, Nelson C, Lowman HB, Wright BD, Skelton NJ, Frantz GD, Tumas DB, Peale FV Jr, Shelton DL, Hébert CC (2000) FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO* 19, 4046-55.

Hong SC, Yoo SW, Cho GJ, Kim T, Hur JY, Park YK, Lee KW, Kim SH. (2007) Correlation between estrogens and serum adipocytokines in premenopausal and postmenopausal women. *Menopause* 14, 835-40.

Huang SW, Seow KM, Ho LT, Chien Y, Chung DY, Chang CL, Lai YH, Hwang JL, Juan CC. (2005) Resistin mRNA levels are downregulated by estrogen in vivo and in vitro. *FEBS Lett.* 579, 449-54.

Ibáñez L, de Zegher F (2004) Ethinylestradiol-drospirenone, flutamide-metformin, or both for adolescents and women with hyperinsulinemic hyperandrogenism: opposite effects on adipocytokines and body adiposity. *J Clin Endocrinol Metab.* 89, 1592-7.

Im JA, Lee JW, Lee HR, Lee DC. (2006) Plasma adiponectin levels in postmenopausal women with or without long-term hormone therapy. *Maturitas* 54, 65–71.

Inui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A, Meguid MM, Fujimiya M (2004) Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB J.* 18, 439-56.

Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM (2002) Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res.* 10, 1-5.

Jeffery PL (2005) Expression of the ghrelin axis in the mouse: an exon 4-deleted mouse proghrelin variant encodes a novel C terminal peptide. *Endocrinology* 146, 432–440.

Johnson LW, Weinstock RS. (2006) The metabolic syndrome: concepts and controversy. *Mayo Clin Proc.* 81, 1615–20.

Jung HS, Park KH, Cho YM, Chung SS, Cho HJ, Cho SY, Kim SJ, Kim SY, Lee HK, Park KS (2006) Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 69, 76-85.

Jurimae J, Jurimae T. (2007) Plasma adiponectin concentration in healthy preand postmenopausal women: relationship with body composition, bone mineral, and metabolic variables. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 293, 42–7.

Kadowaki T, Yamauchi T. (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 26, 439–51.

Kaiya H et al. (2008) Ghrelin: a multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 149, 109–28.

Kalra SP, Kalra PS (1996) Nutritional infertility: the role of the interconnected hypothalamic neuropeptide Y-galanin-opioid network. *Front Neuroendocrinol.* 17, 371-401.

Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. (1999) Interacting appetiteregulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Rev.* 20, 68–100.

Kawamura K (2003) Ghrelin inhibits the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* 144, 2623–33.

Kellokoski E, Karjalainen AH, Ukkola O, Heikkinen J (2005) Estrogen replacement therapy increases plasma ghrelin levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 90, 2954–63.

Kelly CC, Lyall H, Petrie JR, Gould GW, Connell JM, Sattar N. (2001) Low grade chronic inflammation in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 2453-5.

Kleiblova P, Springer D, Haluzik M (2006) The influence of hormonal changes during menstrual cycle on serum adiponectin concentrations in healthy women. *Physiol Res.* 55, 661–6.

Kluge M et al. (2007) Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 92, 3202–05.

Kojima M, Kangawa K. Ghrelin (2005) structure and function. *Physiol Rev.* 85, 495-522.

Kojima M, Hosoda H, Kangawa K. (2001) Purification and distribution of ghrelin: the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Horm Res.* 56 , 93-7.

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656-60.

Korner, J. & Leibel, R. L (2003) To eat or not to eat—how the gut talks to the brain. *N. Engl. J. Med.* 349, 926–28.

Kunnari A, Santaniemi M, Jokela M, Karjalainen AH, Heikkinen J, Ukkola O, Kesäniemi YA (2008) Estrogen replacement therapy decreases plasma adiponectin but not resistin in postmenopausal women. *Metabolism* 57, 1509-15.

Kusminski CM, McTernan PG, Kumar S (2005) Role of resistin in obesity, insulin resistance and Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)* 109,243-56.

Lagaly DV, Aad PY, Grado-Ahuir JA, Hulsey LB, Spicer LJ (2008) Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Mol Cell Endocrinol.* 284, 38-45.

Lake JK, Power C, Cole TJ (1997) Women's reproductive health: the role of body mass index in early and adult life. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 21, 432-8.

Lanfranco F (2008) Acylated ghrelin inhibits spontaneous LH pulsatility and responsiveness to naloxone, but not that to GnRH, in young men: evidence for a central inhibitory action of ghrelin on the gonadal axis. *J Clin Endocrinol Metab.* 93, 3633–39.

Lappas M, Yee K, Permezel M, Rice GE (2005) Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *J Endocrinol.* 186, 457–65.

Lappas M, Permezel M, Rice GE (2005) Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor-kappaB, peroxisomal proliferator-activated receptor- gamma and extracellularly regulated kinase 1/2. *Endocrinology* 146, 3334–42.

Laughlin GA, Barrett-Connor E, May S (2006) Sex-specific association of the androgen to oestrogen ratio with adipocytokine levels in older adults: the Rancho Bernardo Study. *Clin Endocrinol.* 65, 506–13.

Lebenthal Y, Gat-Yablonski G, Shtaf B, Padoa A, Phillip M, Lazar L. (2006) Effect of sex hormone administration on circulating ghrelin levels in peripubertal children. *J Clin Endocrinol Metab.* 91, 328–31.

Lebrethon MC (2007) Effects of in vivo and in vitro administration of ghrelin, leptin and neuropeptide mediators on pulsatile gonadotrophin-releasing hormone secretion from male rat hypothalamus before and after puberty. *J Neuroendocrino.* 19, 181–188.

Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD (2006). Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology* 147, 5178–86.

Liu YH, Tsai EM, Chen YL, Chen HS, Chen YC, Wu LC, Lee CH, Jong SB, Chan TF (2006). Serum adiponectin levels increase after human chorionic gonadotropin treatment during in vitro fertilization. *Gynecol Obstet Invest.* 62, 61-5.

Lord E, Ledoux S, Murphy BD, Beaudry D, Palin MF (2005) Expression of adiponectin and its receptors in swine. *J Anim Sci.*83, 565-78.

Lu XE, Huang HF, Li MG, Zhu YM, Qiang YL, Dong MY (2005) Resistin levels of serum and follicular fluid in non-obese patients with polycystic ovary syndrome during IVF cycles. *J Zhejiang Univ Sci B.* 6, 897-902.

Lu JY, Huang KC, Chang LC, Huang YS, Chi YC, Su TC, Chen CL, Yang WS (2008) Adiponectin: a biomarker of obesity-induced insulin resistance in adipose tissue and beyond. *J Biomed Sci.* 15, 565-76.

Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H (2002) Diet-induced insulin resistance in micelacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med.* 8, 731–37.

Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I (2001) PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes.* 50, 2094-9.

Makino Y, Hosoda H, Shibata K, Makino I, Kojima M, Kangawa K, Kawarabayashi T (2002) Alteration of plasma ghrelin levels associated with the blood pressure in pregnancy. *Hypertension* 39, 781-4.

Manau D, Fábregues F, Arroyo V, Jiménez W, Vanrell JA, Balasch J (2002) Hemodynamic changes induced by urinary human chorionic gonadotropin and recombinant luteinizing hormone used for inducing final follicular maturation and luteinization. *Fertil Steril.* 78, 1261-7.

Manning AJ (2008) Ontogenetic and tissuespecific expression of preproghrelin in the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *J Endocrino.* 196, 181–192.

Martini AC, Fernandez-Fernandez R, Tovar S, Navarro VM, Vigo E, Vazquez MJ, Davies JS, Thompson NM, Aguilar E, Pinilla L, Wells T, Dieguez C & Tena-Sempere M (2006) Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing hormone secretion in male rats. *Endocrinology* 147, 2374–82.

Matsubara M, Sakata I, Wada R, Yamazaki M, Inoue K, Sakai T (2004) Estrogen modulates ghrelin expression in the female rat stomach. *Peptides*. 25, 289–97.

Matsuzawa Y (2006) The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett.* 580, 2917–21.

McTernan PG, Kusminski CM, Kumar S (2006) Resistin. *Curr Opin Lipidol* 17,170-5.

Messini CI, Dafopoulos K, Chalvatzas N, Georgoulas P, Messinis IE (2009) Effect of ghrelin on gonadotrophin secretion in women during the menstrual cycle. *Hum Reprod.* 24, 976-81.

Messinis IE, Milingos S, Zikopoulos K, Kollios G, Seferiadis K, Lolis D (1998) Leptin concentrations in the follicular phase of spontaneous cycles and cycles superovulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod.* 13, 1152-6.

Messinis IE, Papageorgiou I, Milingos S, Asproдини E, Kollios G, Seferiadis K (2001) Oestradiol plus progesterone treatment increases serum leptin concentrations in normal women. *Hum Reprod.* 16, 1827-32.

Messinis IE, Kariotis I, Milingos S, Kollios G, Seferiadis K (2000) Treatment of normal women with oestradiol plus progesterone prevents the decrease of leptin concentrations induced by ovariectomy. *Hum Reprod.* 15, 2383-7.

Moran LJ (2004) Ghrelin and measures of satiety are altered in polycystic ovary syndrome but not differentially affected by diet composition. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 3337-44.

Morash BA, Wilkinson D, Ur E, Wilkinson M (2002) Resistin expression and regulation in mouse pituitary. *FEBS Lett.* 526, 26-30.

Morin-Papunen L, Rautio K, Ruokonen A, Hedberg P, Puukka M, Tapanainen JS (2003) Metformin reduces serum C-reactive protein levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 4649-54.

Munir I, Yen HW, Baruth T, Tarkowski R, Azziz R, Magoffin DA, Jakimiuk AJ (2005) Resistin stimulation of 17alpha-hydroxylase activity in ovarian theca

cells in vitro: relevance to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 90, 4852-7.

Nagaya N, Miyatake K, Uematsu M, Oya H, Shimizu W, Hosoda H, Kojima M, Nakanishi N, Mori H, Kangawa K. (2001) Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 5854-9.

Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 194-8.

Nestler JE (1998) Inositolphosphoglycans (IPGs) as mediators of insulin's steroidogenic actions. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 9, 197-204.

Nien JK, Mazaki-Tovi S, Romero R, Kusanovic JP, Erez O, Gotsch F, Pineles BL, Friel LA, Espinoza J, Goncalves L, Santolaya J, Gomez R, Hong JS, Edwin S, Soto E, Richani K, Mazor M, Hassan SS (2007) Resistin: a hormone which induces insulin resistance is increased in normal pregnancy. *J Perinat Med.* 35, 513-21.

Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H (2002) Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 51, 2734–41.

Nogueiras R, Gallego R, Gualillo O, Caminos JE, Garcia-Caballero T, Casanueva FF (2003) Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Lett.* 548,21–7.

Norman RJ, Clark AM. (1998) Obesity and reproductive disorders: a review. *Reprod Fertil Dev.*10, 55-63.

Orio F Jr, Lucidi P, Palomba S, Tauchmanova L, Cascella T, Russo T, Zullo F, Colao A, Lombardi G, De Feo P (2003) Circulating ghrelin concentrations in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 942-5.

Orvieto R, Chen R, Ashkenazi J, Ben-Haroush A, Bar J, Fisch B (2004) C-reactive protein levels in patients undergoing controlled ovarian hyperstimulation for IVF cycle. *Hum Reprod.* 19, 357-9.

Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschöp M (2001) Weight gain decreases elevated

plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol.* 145, 669-73.

Pagotto U (2002) Plasma ghrelin, obesity, and the polycystic ovary syndrome: correlation with insulin resistance and androgen levels. *J Clin EndocrinolMetab.* 87, 5625–29.

Palanivel R, Sweeney G (2005) Regulation of fatty acid uptake and metabolism in L6 skeletal muscle cells by resistin. *FEBS Lett.* 579, 5049-54.

Panidis D, Koliakos G, Kourtis A, Farmakiotis D, Mouslech T, Rousso D (2004) Serum resistin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 81, 361–6.

Panidis D, Kourtis A, Kukuvtis A, Farmakiotis D, Xita N, Georgiou I (2004) Association of the T45G polymorphism in exon 2 of the adiponectin gene with polycystic ovary syndrome: role of Delta4-androstenedione. *Hum Reprod.* 19, 1728–1733.

Panidis D, Kourtis A, Farmakiotis D, Mouslech T, Rousso D, Koliakos G (2003) Serum adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 18, 1790-6.

Pasquali R, Gambineri A, Pagotto U (2006) The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG* 113, 1148–59.

Pasquali R, Gambineri A, Biscotti D, Vicennati V, Gagliardi L, Colitta D, Fiorini S, Cognigni GE, Filicori M, Morselli-Labate AM (2000) Effect of long-term treatment with metformin added to hypocaloric diet on body composition, fat distribution, and androgen and insulin levels in abdominally obese women with and without the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 2767-74.

Piñeiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, Diéguez C, Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F (2005) Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 579, 5163-9.

Ramsay JE, Jamieson N, Greer IA, Sattar N (2003) Paradoxical elevation in adiponectin concentrations in women with preeclampsia. *Hypertension* 42, 891-4.

Ranheim T, Haugen F, Staff AC, Braekke K, Harsem NK, Drevon CA (2004) Adiponectin is reduced in gestational diabetes mellitus in normal weight women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 83, 341-7.

Ray JG, Vermeulen MJ, Schull MJ, McDonald S, Redelmeier DA (2005) Metabolic syndrome and the risk of placental dysfunction. *J Obstet Gynaecol Can* Dec.27, 1095-101.

Rechberger T, Tomaszewski J, Pieprzowska-Białek A, Kulik-Rechberger B, Skorupski P (2004) Serum resistin levels in women taking combined oral contraceptives containing desogestrel or gestodene. *Contraception* 69, 477-80.

Redman CW, Sargent IL (2005) Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 308, 1592-4.

Rodriguez-Pacheco F, Martinez-Fuentes AJ, Tovar S, Pinilla L, Tena-Sempere M, Dieguez C, Castaño JP, Malagon MM (2007) Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology*. 148, 401-10.

Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E (2006): The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64, 355-65.

Saarela T, Hiltunen M, Helisalmi S, Heinonen S, Laakso M (2006) Adiponectin gene haplotype is associated with preeclampsia. *Genet Test*. 10, 35-9.

Saito K, Tobe T, Minoshima S, Asakawa S, Sumiya J, Yoda M, Nakano Y, Shimizu N, Tomita M (1999) Organization of the gene for gelatin-binding protein (GBP28). *Gene* 229, 67-73.

Sato N, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Imamura M, Sekiguchi N, Nakashima N, Nawata H (2005) Adenovirus-mediated high expression of resistin causes dyslipidemia in mice. *Endocrinology* 146, 273-9.

Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S (2001) Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*. 50, 2199-202.

Schöfl C (2002) Circulating ghrelin levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 4607–10.

Seftel AD (2005) Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Urol* 174, 1045–46.

Seow KM, Juan CC, Hsu YP, Ho LT, Wang YY, Hwang JL (2005) Serum and follicular resistin levels in women with polycystic ovarian syndrome during IVF-stimulated cycles. *Hum Reprod.* 20, 117-21.

Seow KM, Juan CC, Wu LY, Hsu YP, Yang WM, Tsai YL, Hwang JL, Ho LT (2004) Serum and adipocyte resistin in polycystic ovary syndrome with insulin resistance. *Hum Reprod.* 19, 48-53.

Sethi JK, Vidal-Puig AJ (2007) Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res.* 48, 1253-62.

Shibata K, Hosoda H, Kojima M, Kamgawa K, Makino Y, Makino I (2004) Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and lactation in the rat: possible involvement of the hypothalamus. *Peptides.* 25, 279–87.

Sirotkin AV (2006) Novel expression and functional role of ghrelin in chicken ovary. *Mol Cell Endocrinol.* 257, 15–25.

Soriano-Guillén L (2004) Ghrelin levels from fetal life through early adulthood: relationship with endocrine and metabolic and anthropometric measures. *J Pediatr.* 144, 30–35.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307–12.

Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD, Lazar MA (2001) A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 502-6.

Steppan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA (2005) Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Bio*. 25, 1569-75.

Stewart DE (1992) Reproductive function in eating disorders. *Ann Med*. 24, 287–91.

Stock SM, Sande EM, Bremme KA (1999) Leptin levels vary significantly during the menstrual cycle, pregnancy, and in vitro fertilization treatment: possible relation to estradiol. *Fertil Steril*. 72, 657– 62.

Sumino H, Takahashi T, Itoh T, Kusaka K, Yamakawa J, Ichikawa S (2004) Plasma adiponectin levels in post-menopausal women receiving hormone replacement therapy. *J Int Med Res*. 32, 639–45.

Suwaki N, Masuyama H, Nakatsukasa H, Masumoto A, Sumida Y, Takamoto N, Hiramatsu Y (2006) Hypoadiponectinemia and circulating angiogenic

factors in overweight patients complicated with pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 195, 1687-92.

Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2000) Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 4908-11.

Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T (2006) Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology* 147, 3203–10.

Tamakoshi K, Yatsuya H, Wada K, Matsushita K, Otsuka R, Yang PO (2007) The transition to menopause reinforces adiponectin production and its contribution to improvement of insulin-resistant state. *Clin Endocrinol(Oxf)* 66, 65–71.

Tanaka M, Naruo T, Yasuhara D, Tatebe Y, Nagai N, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S (2003) Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 28, 829-35.

Tanaka K, Minoura H, Isobe T, Yonaha H, Kawato H, Wang DF, Yoshida T, Kojima M, Kangawa K, Toyoda N (2003) Ghrelin is involved in the

decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 2335-40.

Tena-Sempere M (2007) Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. *Neuroendocrinology* 86, 229–41

Tena-Sempere M, Barreiro ML, González LC, Gaytán F, Zhang FP, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Diéguez C, Aguilar E (2002) Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143, 717-25.

Tena-Sempere M (2008) Ghrelin as a pleiotropic modulator of gonadal function and reproduction. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 4, 666-74.

Tena-Sempere M & Huhtaniemi I (2003) *Gonadotropins and gonadotropin receptors, Reproductive Medicine, Molecular, Cellular and Genetic Fundamentals*. New York, NY: Parthenon Publishing, 225–244.

Thyfault JP, Hedberg EM, Anchan RM, Thorne OP, Isler CM, Newton ER, Dohm GL, deVente JE (2005) Gestational diabetes is associated with depressed adiponectin levels. *J Soc Gynecol Investig.* 12, 41-5.

Tilg H, Moschen AR (2006) Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 6, 772–783.

Tolle V, Kadem M, Bluet-Pajot MT, Frere D, Foulon C, Bossu C, Dardennes R, Mounier C, Zizzari P, Lang F, Epelbaum J, Estour B (2003) Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 109-16.

Tortoriello DV, McMinn JE, Chua SC (2007) Increased expression of hypothalamic leptin receptor and adiponectin accompany resistance to dietary-induced obesity and infertility in female C57BL/6J mice. *Int J Obes.* 31, 395-402.

Trayhurn P, Wood IS (2004) Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 92, 347-55.

Trayhurn P, Bing C, Wood IS (2006) Adipose tissue and adipokines - energy regulation from the human perspective. *J Nutr.* 136, 1935-39.

Tropea A (2007) Ghrelin affects the release of luteolytic and luteotropic factors in human luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 92, 3239–45.

Unniappan S and Peter RE (2004) *In vitro* and *in vivo* effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 286, 1093–101.

Urbanek M, Du Y, Silander K, Collins FS, Steppan CM, Strauss JF 3rd, Dunaif A, Spielman RS, Legro RS (2003) Variation in resistin gene promoter not associated with polycystic ovary syndrome. *Diabetes.* 52, 214-7.

Van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E (2004) Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev.* 25, 426–57.

Viani I (2008) Ghrelin inhibits steroid biosynthesis by cultured granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 93, 1476–81.

Vidal C, Roa J, Pinilla L, Pellicer A, Tena-Sempere M (2008) Maternal serum ghrelin levels in early IVF pregnancies: lack of prognostic value for viable pregnancy and altered post-prandial responses. *Hum Reprod.* 23, 958-63.

Viengchareun S, Zennaro MC, Pascual-Le Tallec L, Lombes M (2002) Brown adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin. *FEBS Lett.* 532, 345-50.

Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, Mickle DA (2003) Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 108, 736-40.

Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Ito Y, Hada Y, Uchida S, Tsuchida A, Takekawa S, Kadowaki T (2005) Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology*. 146, 790-6.

Wang JX, Davies MJ, Norman RJ (2002) Obesity increases the risk of spontaneous abortion during infertility treatment. *Obes Res*. 10, 551-4.

Wang K, Wang L, Zhao Y, Shi Y, Wang L, Chen ZJ (2009) No association of the Arg51Gln and Leu72Met polymorphisms of the ghrelin gene and polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod*. 24, 485-90.

Winzer C, Wagner O, Festa A, Schneider B, Roden M, Bancher-Todesca D, Pacini G, Funahashi T, Kautzky-Willer A (2004) Plasma adiponectin, insulin sensitivity, and subclinical inflammation in women with prior gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* ;27, 1721-7.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762-9.

Yura S, Sagawa N, Itoh H, Kakui K, Nuamah MA, Korita D, Takemura M, Fujii S (2003) Resistin is expressed in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 1394-7.

Yannakoulia M, Yiannakouris N, Bluher S, Matalas AL, Zacas DK, Mantzoros CS (2003) Body fat mass and macronutrient intake in relation to circulating soluble leptin receptor, free leptin index, adiponectin, and resistin concentrations in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 1730–6.

Zhang W (2008) Expression of ghrelin in the porcine hypothalamo-pituitary-ovary axis during the estrous cycle. *Anim Reprod Sci.*

Zigman, J. M. & Elmquist, J. K (2003) Minireview: from anorexia to obesity-the yin and yang of body weight control. *Endocrinology* 144, 3749–56.

