



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ - ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ - ΠΑΙΔΙΟΥ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΓΟΝΑΔΙΚΩΝ
ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΕΠΤΙΝΗΣ
ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΩΘΗΚΕΚΤΟΜΙΑ
ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΗΣ ΟΙΣΤΡΑΔΙΟΛΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΠΡΟΓΕΣΤΕΡΟΝΗΣ
ΣΤΗΝ ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΙΝΗΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΚΑΡΥΩΤΗΣ
ΙΑΤΡΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

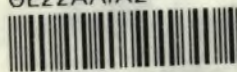
ΛΑΡΙΣΑ 2003

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7819/1
Ημερ. Εισ.: 26-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
612.405
ΚΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083833

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Ιωάννης Ε. Μεσσήνης, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιωάννης Ε. Μεσσήνης, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Νικόλαος Βαμβακόπουλος, Καθηγητής Βιολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Ευτυχία Ασπροδίνη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ιωάννης Ε. Μεσσήνης, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γεώργιος Αντωνακόπουλος, Καθηγητής Ανατομίας, Ιστολογίας,
Εμβρυολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Νικόλαος Βαμβακόπουλος, Καθηγητής Βιολογίας Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Αντώνιος Καραβέλης, Καθηγητής Νευροχειρουργικής, Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας

Ευτυχία Ασπροδίνη, Επίκουρος Καθηγήτρια Φαρμακολογίας,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Βασιλική Μικράκη, Επίκουρος Καθηγήτρια Παιδιατρικής,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αθανάσιος Καλλιτσάρης, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-
Γυναικολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



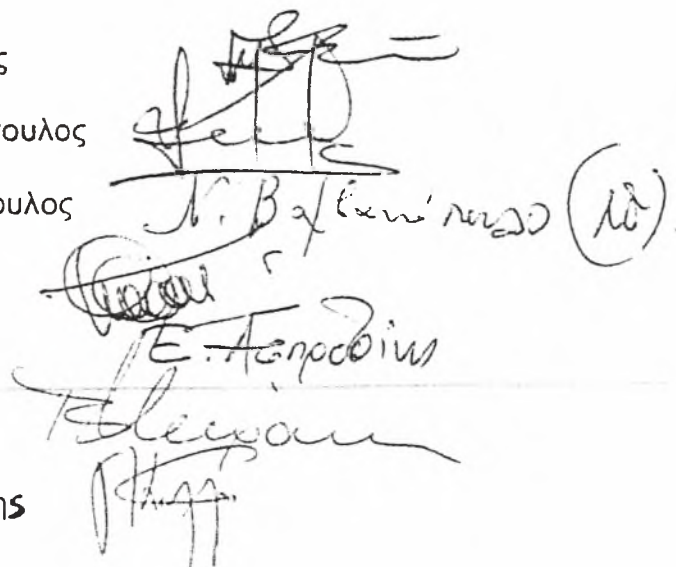
Λάρισα 10/7/2003
Αρ.Πρωτ. 78

Προς
τη Γενική Συνέλευση
Ειδικής Σύγκλησης
του Ιατρικού Τμήματος
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η επταμελής Επιτροπή αποτελούμενη από τους κ.κ. 1) Ιωάννη Ε. Μεσσήνη, επιβλέποντα, 2) Γεώργιο Αντωνακόπουλο, 3) Νικόλαο Βαμβακόπουλο, 4) Αντώνιο Καραβέλη, 5) Ευτυχία Ασπροδίνη, 6) Βασιλική Μικράκη και 7) Αθανάσιο Καλλιτσάρη για την κρίση της διδακτορικής διατριβής του κ. Ιωάννη Καρυώτη, με θέμα «Διερεύνηση της σχέσης μεταξύ γοναδικών στεροειδών και της λεπτίνης σε φυσιολογικές γυναίκες μετά από ωθηκεκτομία καθώς και του ρόλου της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στην έκκριση της λεπτίνης» αποφάσισε στις 9/7/2003 την αποδοχή της διατριβής με βαθμό ΑΡΙΣΤΑ και εισηγείται στη Γενική Συνέλευση να καλέσει τον υποψήφιο να δώσει τον νενομισμένο όρκο.

Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1) Ιωάννης Ε. Μεσσήνης
- 2) Γεώργιος Αντωνακόπουλος
- 3) Νικόλαος Βαμβακόπουλος
- 4) Αντώνιος Καραβέλης
- 5) Ευτυχία Ασπροδίνη
- 6) Βασιλική Μικράκη
- 7) Αθανάσιος Καλλιτσάρης



Κ. Βαμβακόπουλος (ιδ)

Ε. Ασπροδίνης

**Αφιερώνεται
στην ιερή μνήμη της μητέρας μου**

Στον πατέρα μου

Στη γυναίκα μου

Στο παιδί μου

**Στον Καθηγητή
Ιωάννη Ε. Μεσσίνη**

ΣΥΝΟΠΤΙΚΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΟΝΟΜΑ	Ιωάννης
ΕΠΩΝΥΜΟ	Καρνώτης
ΟΝΟΜΑ ΠΑΤΕΡΑ	Ευάγγελος
ΟΝΟΜΑ ΜΗΤΕΡΑΣ	Ευαγγελία
ΤΟΠΟΣ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	Λάρισα
ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ	24-11-1965
ΥΠΗΚΟΟΤΗΤΑ	Ελληνική
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ	Έγγαμος, πατέρας ενός παιδιού
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ ΚΑΤΟΙΚΙΑΣ	Ευριπίδου 11, 41336 Λάρισα
ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ	Αγγλικά
ΣΤΑΔΙΟΔΡΟΜΙΑ	
1983	Απολυτήριο Λυκείου από το 2 ^ο Λύκειο Λάρισα
1984	Εισαγωγή στην Ιατρική Σχολή Παν/μίου Θεσσαλονίκης
1990	Πτυχίο Ιατρικής Σχολής Παν/μίου Θεσσαλονίκης
1991-1992	Εκπλήρωση στρατιωτικής θητείας
1992-1994	Εκπλήρωση υπηρεσίας υπαίθρου στο Κέντρο Υγείας Αγίας, Λάρισα
1994-1995	Ειδικευόμενος Ιατρός στη Χειρουργική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισα
1995-1996	Υπεράριθμος Ιατρός στη Νευροχειρουργική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισα
1996-1998	Ειδικευόμενος Ιατρός στη Μαιευτική – Γυναικολογική του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισα
1999	Υπεράριθμος Ιατρός στη Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισα και στο Κέντρο Υγείας Φαρσάλων
2000-σήμερα	Ειδικευόμενος Ιατρός στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, Κρήτη

Παρακολούθηση Μετεκπαιδευτικών Σεμιναρίων

1. 26^ο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης της Εταιρείας Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης σε συνεργασία με τη Θεραπευτική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών και υπο την αιγίδα του Υπουργείου Υγείας Πρόνοιας & Κοινωνικών Ασφαλίσεων, Αθήνα, 21/2 έως και 4/3/1994.
2. Επιστημονικό πρόγραμμα “Συνεχούς Χειρουργικής Μετεκπαιδύσεως” της Χειρουργικής Εταιρείας Βορείου Ελλάδας, Ακαδημαϊκό έτος 1994-1995.
3. 7ο Πανελλήνιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας, Λάρισα 25-26 Ιανουαρίου 1997.
4. 8^ο Πανελλήνιο Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας, Αθήνα 25-26 Ιανουαρίου 1998.
5. 4th International Congress “ The young Woman at the rise of the 21st Century: Gynecological and Reproductive Issues in Health and Disease” Athens, 18-21 November 1998.

Ξενόγλωσσες Δημοσιεύσεις

1. I.E. Messinis, S.D. Millingos, E. Alexandris, **I. Kariotis**, G.Kollios and K. Seferiadis. Leptin concentrations in normal women following bilateral ovariectomy. *Hum Reprod* 1999, 14 (4): 913-918.
2. I.E.Messinis, **I.Kariotis**, S.D.Millingos, G.Kollios and K. Seferiadis. Treatment of normal women with oestradiol plus progesterone prevents the decrease of leptin concentrations induced by ovariectomy. *Hum Reprod* 2000, 15 (11): 2383-2387.
3. Delakas D, **Karvotis I**, Loumbakis P, Daskalopoulos G, Kazanis J, Cranidis A. Ureteral drainage by double - J – catheters during pregnancy. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2000; 27(3-4): 200-202.
4. Delakas D, Lianos E, **Karvotis I**, Cranidis A. Finasteride: a long-term follow-up in the treatment of recurrent hematuria associated with benign prostatic hyperplasia. *Urol Int* 2001; 67(1): 69-72.
5. Delakas D, **Karvotis I**, Loumbakis P, Daskalopoulos G, Charoulakis N, Cranidis A. Long-term results after percutaneous minimally invasive procedure treatment of symptomatic simple renal cysts. *Int Urol Nephrol* 2001; 32(3): 321-326.
6. Delakas D, Daskalopoulos G, **Karvotis I**, Metaxari M, Cranidis A. Giant ureteral stone in association with primary megaureter presenting as an acute abdomen. *Eur J Radiol.* 2002; 41(2): 170-172.
7. Delakas D, **Karvotis I**, Daskalopoulos G, Terhorst B, Lymberopoulos S, Cranidis A. Nephron-sparing surgery for localized renal cell carcinoma with a normal contralateral kidney: a European three-center experience. *Urology* 2002; 60(6): 998-1002.
8. Delakas D, **Karvotis I**, Daskalopoulos G, Lianos E, Mavromanolakis E. Independent predictors of failure of shock wave lithotripsy for ureteral stones employing a second-generation lithotripter. *J Endourology* 2003; 17(4): 201-205.

Ελληνικές Δημοσιεύσεις

1. Συγκριτική μελέτη της προεγχειρητικής προστατικής βιοψίας σε σχέση με την πλήρη ιστολογική εικόνα σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ριζική προστατεκτομή για καρκίνο του προστάτη. Θ.Τριανταφύλλου, Δ. Δελακάς, **I.Καρυώτης**, Π.Τσέμπισσεφ, Α.Κρανίδης. *Ελληνική Ουρολογία* 2001;13(3):157-163.
2. Σύγχρονη αντιμετώπιση του προβλήματος της αποφρακτικής αζωοσπερμίας. **I.Καρυώτης**, Δ. Δελακάς. *Ελληνική Ουρολογία* 2001;13(3):221-226.
3. Οξυτενή κονδυλώματα πέους και ουρήθρας σε αγόρι τριών ετών. Ν. Χόνδρος, **I.Καρυώτης**, Π. Τσέμπισσεφ, Α. Κρανίδης. *Ελληνική Ουρολογία* 2001;13(3):261-264.
4. L-carnitine στην αντιμετώπιση της ιδιοπαθούς ασθenoσπερμίας. Διπλή – τυφλή τυχαιοποιημένη μελέτη. **I.Καρυώτης**, Ε. Μαυρωμανωλάκης, Ι. Χαιρέτης, Θ.Τριανταφύλλου, Π. Τσέμπισσεφ Δ. Δελακάς. *Ελληνική Ουρολογία* 2002;14(3):214-220.
5. Κιρσοκήλη και υπογονιμότητα. **I.Καρυώτης**, Δ. Δελακάς. *Ελληνική Ουρολογία* 2002;14(3):182-186.

Ανακοινώσεις επιστημονικών εργασιών σε Διεθνή Συνέδρια

1. Parameters Influencing the Success of Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy in Ureteral Lithiasis. D. Delakas, G. Daskalopoulos, T. Triantafyllou, E. Mavromanolakis, **I. Karvotis**, M. Metaxari, A. Cranidis. *Griechisch-Deutsche Gesellschaft für Urologie, Χαλκιδική 6-9 Ιουλίου 2001*
2. A 36-Months, Noncomparative Study to Assess the Long-Term Safety and Efficacy of Sildenafil in Patients with Erectile Dysfunction. E. Mavromanolakis, **I. Kariotis**, S. Maraki, G. Daskalopoulos, A. Cranidis. *Griechisch-Deutsche Gesellschaft für Urologie, Χαλκιδική 6-9 Ιουλίου 2001*
3. Long-Term Conservative Treatment for Peyronie's Disease: Comparative Study. E. Mavromanolakis, I. Karyotis, G. Daskalopoulos, D. Delakas, A. Cranidis. *Griechisch-Deutsche Gesellschaft für Urologie, Χαλκιδική 6-9 Ιουλίου 2001*.
4. Prostatic and adipose tissue fatty acids in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia patients. G. Daskalopoulos, **I. Karvotis**, G. Mamalakis, D. Delakas, N. Kalogeropoulos, A. Kafatos, A. Cranidis †. *Griechisch-Deutsche Gesellschaft für Urologie, Dresden, 4.-7.7.2002*
5. Nephron sparing surgery for localized renal cell carcinoma with an opposite contralateral kidney. G. Daskalopoulos, **I. Karvotis**, D. Delakas, M. Mavromanolakis, B. Terhorst, S. Lymberopoulos †, A. Cranidis †. *Griechisch-Deutsche Gesellschaft für Urologie, Dresden, 4.-7.7.2002*
6. Management of serious complications of indwelling ureteral stents G. Daskalopoulos, **I. Karvotis**, M. Metaxari, P. Anezinis, N. Hondros, D. Delakas. *Griechisch-Deutsche Gesellschaft für Urologie, Dresden, 4.-7.7.2002*
7. Electrothermal bipolar coagulation in radical prostatectomies and radical cystectomies. G. Daskalopoulos, **I. Karvotis**, Nomikos M, Delakas D. *XVIIIth Congress of the European Association of Urology Madrid, Spain, March 12 - 15, 2002*.

8. Independent predictors of failure of shock wave lithotripsy for ureteral stones employing a second-generation lithotripter. G. Daskalopoulos, **I. Karvotis**, Nomikos M, Delakas. *XVIIIth Congress of the European Association of Urology* Madrid, Spain, March 12 - 15, 2002.
9. Use of contrast agent material for the management of radiolucent ureteral stones. G. Daskalopoulos, **I. Karvotis**, Nomikos M, Delakas. *XVIIIth Congress of the European Association of Urology* Madrid, Spain, March 12 - 15, 2002.
10. Spontaneous perinephric hemorrhage: A 10-years experience in our institution. Xeretis I, **Karvotis I**, Daskalopoulos G, Delakas D. *Griechisch-Deutsche Gesellschaft für Urologie, Πόδος 3-6 Ιουλίου, 2003*
11. Management of ureteral injuries after gynecological operations. Xeretis I, Triantafyllou Th, **Karvotis I**, Daskalopoulos G, Delakas D. *Griechisch-Deutsche Gesellschaft für Urologie, Πόδος 3-6 Ιουλίου, 2003*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ιστορική ανασκόπηση	3
2. Γονίδιο – πρωτεϊνική δομή – υποδοχείς λεπτίνης	5
3. Σύνθεση – έκκριση της λεπτίνης	6
4. ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΛΕΠΤΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ	
4.1 Κεντρική δράση	7
4.2 Περιφερική δράση	12
5. Δράση σε άλλα όργανα και συστήματα	13
6. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΤΗΣ ΛΕΠΤΙΝΗΣ	14
6.1 Λιπώδης ιστός	
6.2 Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα	
6.3 Φυλετικός Διμορφισμός της Λεπτίνης	
6.4 Ινσουλίνη –Μεταβολισμός Γλυκόζης	
6.5 Ορμόνες Επινεφριδίων	
6.6 Θυροειδικές Ορμόνες	
6.7 Αυξητική ορμόνη	
7. ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ	
7.1 Λεπτίνη και άξονας υποθάλαμος –υπόφυση – γονάδες	22
7.2 Λεπτίνη και εφηβεία	28
7.3 Λεπτίνη και κήση	30
7.4 Λεπτίνη και φυσιολογικός κύκλος	34
7.5 Λεπτίνη και ωοθηκικά στεροειδή	36

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΠΑΡΧΟΥΣΑ ΓΝΩΣΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	44
2. ΑΤΟΜΑ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	46
3. ΟΡΜΟΝΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ	50
4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	57
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	59
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	84
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	91
8. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	92
9. SUMMARY	94
10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	96

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η επίδραση του σωματικού βάρους στην αναπαραγωγική λειτουργία του ανθρώπου είναι γνωστή από πολλά χρόνια. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αρκετών επιδημιολογικών μελετών, η έναρξη της εμμηναρχής καθώς και η διατήρηση των καταμήνιων κύκλων προϋποθέτει την ύπαρξη ενός ορισμένου ποσοστού σωματικού λίπους. Ο λόγος για τη συσχέτιση αυτή μεταξύ σωματικού λίπους και αναπαραγωγής, είναι ότι η κύηση και γαλουχία απαιτούν υψηλή κατανάλωση ενέργειας για τη διατήρηση ενός βιώσιμου νεογνού. Έτσι, από τελεολογικής πλευράς, θα ήταν σκόπιμο η εμμηναρχή να συμβεί μόνο όταν η έφηβη θα είχε αποκτήσει μια κριτική μάζα σωματικού λίπους. Από την άλλη πλευρά, είναι γνωστό ότι η παχυσαρκία στις γυναίκες ασκεί δυσμενείς επιδράσεις στη γοναδική λειτουργία και κατ' επέκταση στη γονιμότητα. Μολονότι η αναπαραγωγική λειτουργία εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από διατροφικές ή μεταβολικές καταστάσεις που σχετίζονται με την πρόσληψη τροφής, οι υπεύθυνοι παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που να εξηγούν τη σχέση αυτή δεν έχουν ακόμη αποσαφηνισθεί.

Η ανακάλυψη της λεπτίνης από τον Zang το 1994, έδωσε ελπίδες στους ερευνητές για την απάντηση στα παραπάνω ερωτήματα. Η λεπτίνη είναι μία πρωτεϊνική ορμόνη που παράγεται και εκκρίνεται από τα λιποκύτταρα του λιπώδη ιστού και πληροφορεί τον υποθάλαμο για τα ενεργειακά αποθέματα του οργανισμού. Υπό το πρίσμα αυτό, διατυπώθηκε η άποψη ότι η λεπτίνη θα μπορούσε να αποτελέσει το συνδετικό κρίκο μεταξύ του λιπώδη ιστού και της γονιμότητας καθώς πληροφορεί τον υποθάλαμο ότι τα ενεργειακά αποθέματα είναι επαρκή για να φέρουν σε πέρας μία κύηση.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η σχέση των γοναδικών στεροειδών με τα επίπεδα της λεπτίνης σε φυσιολογικές γυναίκες μετά από αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία, καθώς επίσης και ο ρόλος της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στην έκκριση της λεπτίνης.

Η μελέτη αυτή προέρχεται από τη Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Ορισμένες από τις γυναίκες χειρουργήθηκαν στη Μαιευτική και Γυναικολογική κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, ενώ οι χολοκυστεκτομές έγιναν στη Χειρουργική κλινική του ίδιου Νοσοκομείου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Διευθυντή της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής κ. Χ. Ζιώγα και το Ιατρικό προσωπικό των δύο κλινικών για τις διευκολύνσεις.

Αισθάνομαι τη βαθειά υποχρέωση να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ιωάννη Μεσσήνη, για την ανάθεση σε μένα της μελέτης αυτής και την καθοδήγηση του σε όλη τη διάρκεια της. Ο κ. Μεσσήνης με

πραγματικό ενδιαφέρον και κατανόηση, παρακολούθησε όλη την εκπονησή της, προσφέροντας μου πολύτιμη επιστημονική βοήθεια καθώς και οικονομική υποστήριξη στην προσπάθεια ολοκλήρωσης της μελέτης. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Εργαστηρίου Βιολογίας κ. Νικόλαο Βαμβακόπουλο, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τις χρησιμότερες συμβουλές του καθώς και την κ. Ευτυχία Ασπροδίνη, Επίκουρο Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την ουσιαστική της συμβολή στην ολοκλήρωση της διατριβής.

1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Παρά το παγκόσμιο ιατρικό πρόβλημα της παχυσαρκίας, ένα από τα πιο αξιοσημείωτα ευρήματα στην ανθρώπινη διατροφή είναι η διατήρηση σταθερού σωματικού βάρους. Οι προσπάθειες για να εξηγήσουν την σταθερότητα του σωματικού βάρους χρονολογούνται από παλιά όταν το 1953 ο Kennedy πρότεινε τη θεωρία του λιποστάτου κατά την οποία το σωματικό βάρος διατηρείται σταθερό μέσω της ρύθμισης του σωματικού λίπους [1].

Ο ερευνητής υπέθεσε ότι ο υποθάλαμος «αντιλαμβάνεται» την συγκέντρωση ενός παράγοντα στην συστηματική κυκλοφορία ο οποίος παρέχει πληροφορίες σχετικές με το μέγεθος των λιποαποθηκών. Ο υποθάλαμος θα μπορούσε έτσι να διαμορφώσει τις πληροφορίες ώστε να επηρεάσει την πρόσληψη τροφής αντισταθμίζοντας τις αλλαγές στο σωματικό λίπος.

Το 1959 ο Hervey προσέγγισε το πρόβλημα χρησιμοποιώντας το παραβιωτικό μοντέλο στους αρουραίους. Παραβίωση είναι μια χρόνια ένωση ενός ζεύγους αρουραίων ύστερα από συρραφή των μυών και του περιτοναίου, επιτρέποντας τριχοειδικές ενδοσυνδέσεις αλλά όχι άμεσες συνδέσεις των μεγάλων αγγείων.

Κατόπιν ο Hervey προκάλεσε στερεοταξική καταστροφή του έσω κοιλιακού πυρήνα του υποθαλάμου (VMH) στο ένα τρωκτικό με αποτέλεσμα αυτό να γίνει υπερφαγικό και παχύσαρκο ενώ το άλλο έγινε αφαγικό και ισχνόσαρκο [2]. Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η αύξηση στη λιπώδη μάζα παρήγαγε μια ουσία η οποία μετά την είσοδο της στην κυκλοφορία εισέρχονταν στο άθικτο τρωκτικό για να επιφέρει αίσθημα κορεσμού. Η έλλειψη αποτελέσματος της ουσίας αυτής στο παχύσαρκο τρωκτικό υποδήλωνε ότι ο υποδοχέας για τον παράγοντα κορεσμού εντοπιζόταν σε υποθαλαμικό επίπεδο.

Πιο πειστικές ενδείξεις για την ύπαρξη στην κυκλοφορία ενός παράγοντα που ρυθμίζει την πρόσληψη τροφής, δόθηκαν με την ανακάλυψη υπολειπόμενων μεταλλάξεων σε ποντίκια από τον Coleman το 1969 [3]. Η μία αφορούσε ποντικούς οι οποίοι μετά την γέννηση τους εμφάνιζαν προοδευτικά μεγάλου βαθμού παχυσαρκία συνοδευόμενη από σακχαρώδη διαβήτη. Στους ποντικούς αυτούς (ob/ob mice) η μετάλλαξη βρέθηκε στο χρωμόσωμα 6. Η άλλη μετάλλαξη αφορούσε ποντικούς οι οποίοι φαινοτυπικά ήταν όμοιοι με τα προηγούμενους, αναπτύσσοντας παχυσαρκία και

σακχαρώδη διαβήτη με την πάροδο της ηλικίας τους, ή μετάλλαξη όμως βρέθηκε στο χρωμόσωμα 4 (db/db mice).

Σε πειράματα παραβίωσης από τον ίδιο ερευνητή το 1973 [4] μεταξύ ob/ob ποντικών και φυσιολογικών ποντικών παρατηρήθηκε ότι οι γενετικώς παχύσαρκοι ποντικοί έχαναν βάρος χωρίς να επηρεάζονται οι φυσιολογικοί, ενώ η παραβίωση των db/db ποντικών με φυσιολογικούς ποντικούς είχε ως αποτέλεσμα σοβαρού βαθμού υποφαγία και απώλεια βάρους των φυσιολογικών ποντικών. Οι παραπάνω παρατηρήσεις ενίσχυσαν την άποψη ότι ο λιπώδης ιστός παράγει ένα ερέθισμα (σήμα), το οποίο πληροφορεί τον εγκέφαλο για το μέγεθος των λιποαποθηκών και θα έπρεπε να κωδικοποιείται από γονίδιο που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 6. Η ίδια ουσία θα έπρεπε επίσης να αναγνωρίζεται από ένα υποδοχέα στην περιοχή του υποθαλάμου και θα έπρεπε να κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 4. Οι ob/ob ποντικοί οι οποίοι στερούνται αυτής της ουσίας χάνουν βάρος όταν την αποκτήσουν, ενώ οι db/db ποντικοί την υπερεκφράζουν χωρίς όμως αυτή να μπορεί να δράσει στους ίδιους (λόγω έλλειψης του υποδοχέα), είναι όμως σε αυξημένα επίπεδα ώστε να πληροφορεί λανθασμένα τον υποθάλαμο των φυσιολογικών ποντικών, με αποτέλεσμα την εκσεσημασμένη αφαγία και μείωση του βάρους τους.

Το 1994 οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν με την ανακάλυψη και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γονιδίου της ουσίας αυτής που ονομάστηκε λεπτίνη (από την ελληνική λέξη λεπτός= thin) από τον Friedman και τους συνεργάτες του , ενώ λίγο αργότερα προσδιορίστηκε και το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της λεπτίνης [5,6].

2. ΓΟΝΙΔΙΟ - ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΗ ΔΟΜΗ – ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΛΕΠΤΙΝΗΣ

Το γονίδιο της λεπτίνης (Ob gene) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7 του ανθρώπινου γονιδιώματος και εκφράζει ένα αγγελιοφόρο RNA (αποτελούμενο από 4500 ζεύγη βάσεων), πού μεταφράζεται σε πεπτίδιο 167 αμινοξέων στα ριβοσώματα. Στη συνέχεια τα πρώτα 21 αμινοξέα (το πεπτίδιο σήμα), διευκολύνουν την είσοδο στο ενδοκυτταροπλασματικό δίκτυο, οπότε το αρχικό πεπτίδιο αποκόπτεται και παραμένει η ώριμη πρωτεΐνη 146 αμινοξέων [4,6].

Η πρωτεΐνη αυτή έχει διατηρηθεί πολύ καλά μέσω της εξέλιξης των οργανισμών, καθώς η ανθρώπινη λεπτίνη και η λεπτίνη των ποντικών παρουσιάζουν ομολογία κατά 84% [7]. Η λεπτίνη είναι μια μεγάλη υδρόφιλη πρωτεΐνη πού πιθανόν ανήκει στην οικογένεια των ελικοειδών κυτοκινών ,στην οποία ανήκουν η ιντερλευκίνη 2 (IL-2), η ιντερλευκίνη 4 (IL-4), η αυξητική ορμόνη και ο διεγερτικός παράγων επικοινωνίας των μακροφάγων – ουδετερόφιλων κοκκιοκυττάρων (GM-CSF) [8]. Ο υποδοχέας της λεπτίνης (Ob-R) παρουσιάζει ομοιότητες με τούς υποδοχείς των κυτοκινών και υπάρχουν τουλάχιστον 6 μορφές (μακρά και βραχείες), ως αποτέλεσμα της εναλλακτικής διασύνδεσης του πρόδρομου RNA (ετερογενές RNA) πού προκύπτει από την μεταγραφή των ενδονίων και των εξωνίων του DNA του γονιδίου της λεπτίνης [9,10].

Οι μορφές αυτές του υποδοχέα (Ob-Ra, Ob-Rb,.....Ob-Rf) έχουν διαφορετική κατανομή και δράση. Η μορφή Ob-Ra έχει βρεθεί ότι εκφράζεται στο χοριοειδές πλέγμα και στο επιθήλιο των εγκεφαλικών τριχοειδών, και θεωρείται ότι συμβάλλει στην μεταφορά της λεπτίνης μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού [9]. Η μορφή Ob-Rb είναι η μοναδική μακρά μορφή του υποδοχέα της λεπτίνης, θεωρείται και η πλήρης, περιλαμβάνουσα ένα μεγάλο εξωκυττάριο τμήμα, ένα βραχύ διαμεμβρανικό τμήμα και ένα ενδοκυττάριο τμήμα διαφόρου μεγέθους αναγκαίο για την ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος [5]. Οι μορφές Ob-Rc και Ob-Rd οι οποίες εκφράζονται στους πνεύμονες και στους νεφρούς , θεωρούνται ότι συμβάλλουν στην αποβολή της λεπτίνης από την κυκλοφορία.. Η μορφή Ob-Re στερείται τόσο του διαμεμβρανικού όσο και του ενδοκυττάριου τμήματος, κυκλοφορεί σε διαλυτή μορφή και θεωρείται ότι συμβάλλει στην μεταφορά της λεπτίνης στην κυκλοφορία του αίματος (δεσμευτική πρωτεΐνη) [11-13]. Τέλος , η μορφή Ob-Rf εκφράζεται κυρίως σε ιστούς που εμπλέκονται στη

ρύθμιση της ανοσίας όπως ο σπλήνας και ο θύμος αδένας, αλλά η λειτουργία τους δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί. Αρχικά είχε θεωρηθεί ότι οι βραχείες μορφές δεν είχαν την ικανότητα ενδοκυττάριας μετάδοσης του σήματος εξαιτίας της έλλειψης του ενδοκυττάριου τμήματος. Σε μεταγενέστερες όμως μελέτες βρέθηκε ότι η μορφή Ob-Ra ήταν ικανή να προκαλέσει ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος.

Υποδοχείς της λεπτίνης έχουν εντοπισθεί στους περισσότερους ιστούς τόσο των τρωκτικών και ανώτερων θηλαστικών όσο και στους ανθρώπους. Η μακρά μορφή του υποδοχέα της λεπτίνης εκφράζεται κυρίως στον υποθάλαμο [14], καθώς επίσης στον μυελό των επινεφριδίων, την μυελώδη μοίρα των νεφρών [11-14], τα παγκρεατικά κύτταρα [15], τον λιπώδη ιστό [14], και λιγότερο στους άλλους ιστούς.

Ομοζυγωτία ως προς την μετάλλαξη του γονιδίου της λεπτίνης οδηγεί σε υπερφαγία και σημαντικού βαθμού παχυσαρκία σε τρωκτικά και ανθρώπους [16-19], με τη διαφορά ότι η υπερινσουλιναμία, ο υπερκορτιζολισμός, η μείωση της θερμογένεσης και ο σακχαρώδης διαβήτης που συνοδεύουν τα γενετικώς παχύσαρκα τρωκτικά, να μην έχουν εμφανισθεί ως τώρα σε ανθρώπους, υποδηλώνοντας διαφορετική μεταβολική απάντηση στην έλλειψη της λεπτίνης. Αντιθέτως, η συγγενής έλλειψη λεπτίνης συνοδεύεται από στειρότητα τόσο στα τρωκτικά (θηλυκά και αρσενικά) όσο και στους ανθρώπους (άνδρες και γυναίκες).

Στους ανθρώπους, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της λεπτίνης είναι σπάνιες και έχουν περιγραφεί ως τώρα 5 περιπτώσεις στα μέλη δύο οικογενειών [17-19], ενώ μετάλλαξη που κωδικοποιεί τον υποδοχέα της λεπτίνης είναι εξαιρετικά σπάνια και έχει αναφερθεί σε μία οικογένεια [20].

3. ΣΥΝΘΕΣΗ – ΕΚΚΡΙΣΗ

Η λεπτίνη παράγεται και εκκρίνεται από τα ώριμα λιποκύτταρα του λιπώδη ιστού ανεξάρτητα από την θέση εντοπισής του, και θεωρείται ότι τα μεγαλύτερα λιποκύτταρα εκκρίνουν περισσότερη λεπτίνη σε σύγκριση με τα μικρότερα [21-23]. Στη συνέχεια, κυκλοφορεί στο αίμα σε ελεύθερη και δεσμευμένη μορφή ασκώντας την δράση της κυρίως στον υποθάλαμο αλλά και στην περιφέρεια.

Στους ανθρώπους και στα τρωκτικά η λεπτίνη εκκρίνεται κατά ώσεις (1 ώση ανά 45 λεπτά και διάρκεια ώσης 3.2 λεπτά) και υπάρχει μία ημερήσια διακύμανση των επιπέδων της με τρόπο που να ορίζει ένα κερκάρδιο ρυθμό. Η συχνότητα και το εύρος των ώσεων παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αύξηση τις πρώτες μεταμεσονύκτιες ώρες

(μεταξύ 01:00 και 04:00), ενώ το ναδίρ της έκκρισης παρατηρείται τις πρωινές ώρες [24-26]. Ο κirkάδιος ρυθμός της λεπτίνης είναι όμοιος με αυτόν της προλακτίνης (PRL), της θυροειδοτρόπου ορμόνης (TSH) και των ελεύθερων λιπαρών οξέων, ενώ είναι αντίστροφος με αυτόν της κορτιζόλης και της φλοιοεπινεφριδιοτρόπου ορμόνης (ACTH) [26-27].

Την κύρια οδό αποβολής της λεπτίνης αποτελούν οι νεφροί τόσο στα τρωκτικά όσο και στους ανθρώπους. Στα ούρα ανευρίσκονται ελάχιστα ποσά λεπτίνης υποδηλώνοντας ότι η ορμόνη υφίσταται υποβιβασμό του μορίου της στους νεφρούς με αποκοπή πεπτιδικών τμημάτων [29-30].

4. ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΛΕΠΤΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ

Στα γενετικά παχύσαρκα τρωκτικά, η δράση της λεπτίνης προκαλεί μείωση της πρόσληψης τροφής και αύξηση της κατανάλωσης ενέργειας με τη διαμεσολάβηση του συμπαθητικού συστήματος .

Η πτώση των επιπέδων της λεπτίνης προκαλεί μια σειρά από αλλαγές στο μεταβολισμό που αποσκοπούν στην προσαρμογή του οργανισμού σε συνθήκες στέρησης τροφής. Έτσι, καταστέλλεται ο αναπαραγωγικός άξονας, απενεργοποιείται το αρνητικό σύστημα παλίνδρομης ρύθμισης μεταξύ θυροειδικών ορμονών και εκλυτικού παράγοντα της θυροειδοτρόπου ορμόνης (TRH) με αποτέλεσμα τη μείωση του τελευταίου παρά τη μείωση των θυροειδικών ορμονών, ενώ παράλληλα μειώνονται τα επίπεδα της ACTH και της κορτιζόλης εξοικονομώντας ενέργεια για την επιβίωση.

Στους γενετικά παχύσαρκους ανθρώπους, η χορήγηση λεπτίνης εμφανίζει παρόμοια αποτελέσματα στην πρόσληψη τροφής ενώ οι ενδείξεις για την κατανάλωση ενέργειας είναι περιορισμένες. Επιπλέον, η ρύθμιση της θυροειδικής και επινεφριδιακής λειτουργίας από την λεπτίνη δεν έχει πλήρως αποσαφηνισθεί. Οι δράσεις της λεπτίνης ασκούνται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ενώ ασθενέστερες δράσεις της ασκούνται και στην περιφέρεια..

4.1 ΚΕΝΤΡΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΙΝΗΣ

Ο ακριβής μηχανισμός μεταφοράς της λεπτίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα είναι άγνωστος. Ενεργητική πρόσληψη της λεπτίνης έχει περιγραφεί στο ενδοθήλιο των εγκεφαλικών τριχοειδών από ανθρώπους και ποντικούς, υποδηλώνοντας την συμμετοχή της βραχείας μορφής του υποδοχέα (Ob-Ra) της λεπτίνης.

Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η λεπτίνη ασκεί την δράση της αφού περάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, καθώς χορηγούμενη στην 3^η κοιλία του εγκεφάλου μειώνει

την πρόσληψη τροφής, ενώ η ίδια δόση της λεπτίνης χορηγούμενη ενδοφλεβίως είναι αναποτελεσματική. Η μεταφορά της λεπτίνης στο χοριοειδές πλέγμα γίνεται με διευκολυνόμενη διάχυση ακολουθώντας κινητική κορεσμού μέσω της κυτταρικής μεμβράνης [32-33]. Υπάρχει ένας ουδός στη συγκέντρωση της λεπτίνης στον ορό (25- 30ng) πάνω από τον οποίο η αύξηση της λεπτίνης δεν οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας ροής στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η παρατήρηση ότι τα επίπεδα της λεπτίνης στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι χαμηλά στα παχύσαρκα άτομα και παρόμοια με αυτά που παρατηρούνται στα ισχνά άτομα, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η πρόσληψη της λεπτίνης από τον εγκέφαλο είναι ανεπαρκής [34].

Μολονότι αρκετές ενδείξεις υποστηρίζουν ότι ο υποθάλαμος είναι η κύρια περιοχή δράσης της λεπτίνης στον εγκέφαλο [35-37], η ακριβής θέση μέσα στον υποθάλαμο δεν μπορεί να εξακριβωθεί προς το παρόν. Ισχυρή έκφραση της μακράς μορφής υποδοχέα της λεπτίνης έχει βρεθεί στον τοξοειδή, έσω – κοιλιακό και προμαστικό πυρήνα του υποθαλάμου ποντικών [38]. Έγχυση λεπτίνης στον τοξοειδή, στον έσω κοιλιακό πυρήνα και στον πλάγιο υποθάλαμο σε αρουραίους, είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της πρόσληψης τροφής για 24 ώρες, με τον τοξοειδή πυρήνα να αποτελεί την πλέον ευαίσθητη περιοχή [39-40]. Η λεπτίνη αποτελεί το κύριο κεντρομόλο σήμα με το οποίο επικοινωνεί ο λιπώδης ιστός με το ΚΝΣ, παρέχοντας πληροφορίες για το μέγεθος των λιποαποθηκών, ρυθμίζοντας έτσι την θερμιδική πρόσληψη και την κατανάλωση ενέργειας. Η δράση της λεπτίνης εκφράζεται κυρίως με την επαγωγή ή την αναστολή της έκφρασης γονιδίων τα οποία κωδικοποιούν διάφορα νευροπεπτίδια.

Η ενδοκυττάρια μετάδοση του σήματος (πληροφορίας) γίνεται μέσω του μηχανισμού JAK – STAT, τον οποίο επίσης χρησιμοποιούν οι υποδοχείς της τάξης I των κυτοκινών [41-44]. Η σύνδεση της λεπτίνης με το εξωκυττάριο τμήμα της μακράς μορφής του υποδοχέα προκαλεί ενεργοποίηση της ειδικής τυροσινικής κινάσης (JAK-2) η οποία με τη σειρά της προκαλεί φωσφορυλίωση του ουραίου ενδοκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα, παρέχοντας έτσι θέση δέσμευσης για την ειδική πρωτεΐνη ενίσχυσης του σήματος και ενεργοποίησης της μεταγραφής (STAT –3). Στη συνέχεια ο ενεργοποιημένος παράγοντας της μεταγραφής μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου δεσμεύεται σε αλληλουχίες στόχους του DNA και προκαλεί την μεταγραφή των διαφόρων ρυθμιστικών γονιδίων, όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

Η λεπτίνη ασκεί την δράση της στον υποθάλαμο αλληλεπιδρώντας με νευρώνες που παράγουν διάφορα νευροπεπτίδια. Το καλύτερα μελετημένο μέχρι τώρα είναι το νευροπεπτίδιο Y (NPY), το οποίο εμφανίζει ισχυρή ορεξιογόνο δράση. Τα επίπεδα

του NPY αυξάνονται μετά από στέρηση τροφής σε φυσιολογικούς αρουραίους, και είναι σημαντικά αυξημένα σε ποντικούς που εμφανίζουν ομόζυγο μετάλλαξη στο γονίδιο και στον υποδοχέα της λεπτίνης (ob/ob και db/db αντίστοιχα).

Η χορήγηση λεπτίνης στην 3^η κοιλία του εγκεφάλου των ob/ob ποντικών και αρουραίων είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων του NPY στον τοξοειδή πυρήνα, και αύξηση του εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης (CRH ή CRF) το οποίο είναι ένα αντιορεξιογόνο πεπτίδιο, στον παρακοιλιακό πυρήνα [45-47]. Επιπλέον, η χορήγηση anti-CRF αντισωμάτων προκάλεσε μείωση της αντιορεξιογόνου δράσης της λεπτίνης [48].

Αντιθέτως, άλλες μελέτες έδειξαν μείωση του CRF στον παρακοιλιακό πυρήνα [49]. Τα αναφερόμενα αποτελέσματα σχετικά με τη δράση της λεπτίνης στην σύνθεση και έκκριση του CRF είναι αντιφατικά. Σε in vitro μελέτες σε πειραματόζωα έχει βρεθεί ότι η λεπτίνη αύξησε τη βασική έκκριση του CRF και ανέστειλε την προκαλούμενη από τον CRF υπογλυκαιμία [50-51]. Επίσης in vivo μελέτες, έδειξαν ότι η χορήγηση λεπτίνης για 5 ημέρες στους ob/ob ποντικούς δεν μετέβαλλε τα επίπεδα του CRF στον παρακοιλιακό πυρήνα, ενώ η χορήγηση της λεπτίνης σε αρουραίους μετά από στέρηση τροφής οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του CRF [45]. Μια πιθανή εξήγηση των παραπάνω διαφορών είναι ότι σε άλλες μελέτες η λεπτίνη χορηγήθηκε ενδοφλεβίως και σε άλλες στην 3^η κοιλία του εγκεφάλου. Επιπλέον, η λεπτίνη μπορεί να ασκεί διαφορετικές δράσεις σε υποομάδες νευρώνων που παράγουν CRF [52]. Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι η χορήγηση λεπτίνης βρέθηκε να αποκαθιστά τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης και ACTH σε πειραματόζωα μετά από στέρηση τροφής, συνηγορεί για ανασταλτική δράση της λεπτίνης στην έκκριση του CRF [51,53].

Πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι ob/ob ποντικοί με ταυτόχρονη μετάλλαξη του γονιδίου του NPY (με αποτέλεσμα την έλλειψη NPY), είναι λιγότερο παχύσαρκοι από αυτούς που παρουσιάζουν μόνο έλλειψη λεπτίνης αλλά παραμένουν παχύσαρκοι, υποδηλώνοντας ότι και άλλα νευροπεπτίδια πιθανώς εμπλέκονται στη δράση της λεπτίνης [54]. Πράγματι, διάφορες μελέτες έδειξαν ότι η λεπτίνη προκαλεί μείωση της πρόσληψης τροφής, η οποία εμφανίζεται από την δράση δύο άλλων ορεξιογόνων πεπτιδίων, της γαλανίνης (GAL) και της ορμόνης που προκαλεί συγκέντρωση της μελανίνης στα μελανοκύτταρα (MCH) εγείροντας την πιθανότητα ότι οι νευρώνες που παράγουν τα πεπτίδια αυτά να αποτελούν στόχους της λεπτίνης [55-56]. Τα επίπεδα της MCH αυξάνουν σημαντικά απουσία της λεπτίνης, καθώς και στη στέρηση τροφής όπου τα επίπεδα της λεπτίνης μειώνονται. Αξίζει να σημειωθεί, ότι η MCH

ασκεί ανταγωνιστική δράση στην μελανοτρόπο ορμόνη (α -MSH) στην περιφέρεια συμβάλλοντας στην ανοιχτόχρωμη χροιά του δέρματος. Σημαντική θέση στη δράση της λεπτίνης κατέχουν οι νευρώνες που περιέχουν την προ-οπιο-μελανοκορτίνη (POMC), η οποία αποτελεί πρόδρομο ουσία της ACTH και της α -MSH. Οι ob/ob ποντικοί και οι αρουραίοι μετά από στέρηση τροφής (μείωση λεπτίνης) έχουν χαμηλότερα επίπεδα POMC συγκρινόμενα με ομάδες ελέγχου. Η αποκατάσταση των επιπέδων της λεπτίνης αποκαθιστά και τα επίπεδα της POMC στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου, υποδηλώνοντας ευδοτική δράση της λεπτίνης στην POMC [45, 57-58].

Θεωρείται, ότι το προϊόν του γονιδίου της POMC που διαμεσολαβεί στη δράση της λεπτίνης είναι η α -MSH, η οποία αποτελεί αντιορεξιογόνο πεπτίδιο και ασκεί την δράση της ύστερα από δεσμευσή της με τη μορφή MCR-4 της μελανοκορτίνης (ACTH, α -MSH, β -MSH, γ -MSH). Η ικανότητα της λεπτίνης να αναστέλλει την πρόσληψη τροφής μειώνεται με τον αποκλεισμό των MCR-4 υποδοχέων της α -MSH, υποδηλώνοντας ότι η λεπτίνη διεγείρει την α -MSH η οποία με τη σειρά της καταστέλλει την όρεξη [59].

Ο σημαντικός ρόλος των υποδοχέων της μελανοκορτίνης έχει πρόσφατα καταδειχθεί με την ανακάλυψη μιας πρωτεΐνης που ονομάζεται « αγκούτι » (agouti), της οποίας ο φυσιολογικός ρόλος είναι να ρυθμίζει τη χρωστική του τριχώματος των τρωκτικών και θηλαστικών μετά από δέσμευση με τους MCR-1 υποδοχείς της μελανοκορτίνης [60]. Σε μία μετάλλαξη που παρατηρήθηκε σε ποντικούς, η πρωτεΐνη αυτή υπερεκφράζεται και οδηγεί σε παχυσαρκία και σακχαρώδη διαβήτη [61]. Οι ερευνητές ψάχνοντας σε βιβλιοθήκες DNA εντόπισαν ένα γονίδιο με όμοια αλληλουχία με το πεπτίδιο αυτό και το ονόμασαν πεπτίδιο που σχετίζεται με το agouti (AgRp). Έτσι, κατάφεραν να βρουν ότι εκφράζεται στον υποθάλαμο και συγκεκριμένα στον τοξοειδή πυρήνα, ενώ το αγγελιοφόρο RNA της ανθρώπινης ομόλογης μορφής εκφράζεται σε διάφορους ιστούς συμπεριλαμβανομένου και του λιπώδη ιστού αλλά όχι στον εγκέφαλο. Η χορήγηση της ανασυνδυασμένης μορφής του πεπτιδίου αυτού βρέθηκε ότι προκαλεί αύξηση της πρόσληψης τροφής μέσω ανταγωνιστικής δράσης στους MCR-4 υποδοχείς της α -MSH [62-63]. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το AgRp είναι αυξημένο στους ob/ob και db/db ποντικούς, και η χορήγηση λεπτίνης οδήγησε σε σημαντική ελάττωση του αγγελιοφόρου RNA του AgRp (7πλάσια), ενώ η μείωση ήταν μικρότερη σε φυσιολογικά τρωκτικά [64]. Το γεγονός το AgRp αυξάνεται κατά την διάρκεια της νηστείας σε φυσιολογικούς ποντικούς, οδήγησε στο

συμπέρασμα ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες το AgRr καταστέλλεται από την λεπτίνη, ενώ μετά από στέρηση τροφής αίρεται η καταστολή αυτή λόγω πτώσης των επιπέδων της λεπτίνης. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι ποντικοί με μετάλλαξη στο γονίδιο που εκφράζει το αγουτί πεπτίδιο, είναι ανθεκτικοί στη δράση της λεπτίνης εξαιτίας της ανταγωνιστικής δράσης του στην α-MSH.

Επίσης έχει πρόσφατα βρεθεί, ότι η χορήγηση αμφεταμίνης – κοκαΐνης σε αρουραίους οδηγεί στην έκφραση ενός αγγελιοφόρου RNA στο ραβδωτό σώμα του υποθαλάμου, το οποίο ύστερα από προσδιορισμό του συμπληρωματικού DNA βρέθηκε ότι κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο που ονομάστηκε μεταγραφικός παράγοντας της κοκαΐνης – αμφεταμίνης (CART). Το CART είναι ένα αντιορεξιγόνο πεπτίδιο τα επίπεδα του οποίου αυξάνονται στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου ύστερα από την χορήγηση λεπτίνης [65-66].

Ένα άλλο αντιορεξιγόνο πεπτίδιο, το προσομοιάζων με το γλουκαγόνο πεπτίδιο (GLP-1) φαίνεται να εμπλέκεται στη δράση της λεπτίνης καθώς η χορήγηση ενός αναστολέα του GLP-1 η εξενδίνη, απέκλεισε την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της λεπτίνης υποδηλώνοντας την πιθανή διέγερση του GLP-1 από την λεπτίνη [67].

Τέλος, η ανακάλυψη πρόσφατα των ορεξινών (υποκρετίνες) [68], μεγάλωσε ακόμη πιο πολύ την ομάδα των νευροδιαβιβαστών που πιθανώς εμπλέκονται στη διαμεσολάβηση της δράσης της λεπτίνης. Τα αρχικά πειράματα σε αρουραίους [68], έδειξαν ότι η έγχυση ορεξίνης A και B εντός των κοιλιών του εγκεφάλου διεγείρει σημαντικά την πρόσληψη τροφής, ενώ 48ωρη περίοδος νηστείας αύξησε τα υποθαλαμικά επίπεδα του mRNA της προ – ορεξίνης (κοινό πρόδρομο πεπτίδιο). Έχει βρεθεί ότι μία υποομάδα νευρώνων ορεξίνης εκφράζει τον υποδοχέα της λεπτίνης στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου [69]. Το mRNA της προ – ορεξίνης είναι μειωμένο σε ποντικούς ob/ob και db/db, ενώ επταήμερη θεραπεία με λεπτίνη μείωσε τα επίπεδα της ορεξίνης A στη πλάγια υποθαλαμική περιοχή των αρουραίων. Ωστόσο, τα λειτουργικά δεδομένα της αλληλεπίδρασης είναι λιγότερο σαφή, δεδομένου ότι τα επίπεδα του mRNA της προ – ορεξίνης δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά σε μία ποικιλία καταστάσεων κατά τις οποίες τα επίπεδα της λεπτίνης μεταβλήθηκαν σημαντικά (υποσιτισμός, διαιτητική παχυσαρκία), ή σε στέρηση τροφής με ή χωρίς θεραπεία με λεπτίνη [70].

Συνοψίζοντας, τα μέχρι τώρα ευρήματα δείχνουν ότι η λεπτίνη ρυθμίζει την πρόσληψη τροφής και την κατανάλωση ενέργειας μειώνοντας την έκφραση διαφόρων ορεξιγόνων πεπτιδίων όπως του NPY, AgRr, της MCH και πιθανώς των ορεξινών και

αυξάνοντας την έκφραση διάφορων αντιορεξινογόνων πεπτιδίων όπως του CRF, GLP-1, CART και της α -MSH. Σε αντίθεση με τα τρωκτικά, στους ανθρώπους η παχυσαρκία συνοδεύεται με αυξημένα επίπεδα λεπτίνης υποδηλώνοντας αντίσταση στη δράση της. Ως πιθανοί μηχανισμοί λεπτινοαντίστασης, θεωρούνται η ανεπαρκής πρόσληψη λεπτίνης από τον εγκέφαλο και η ανεπαρκής μετάδοση του σήματος από τη λεπτίνη. Πρόσφατα δεδομένα δείχνουν ότι η συστηματική χορήγηση λεπτίνης επάγει την έκφραση ειδικών πεπτιδίων που αναστέλλουν την ειδική κινάση που φωσφορυλιώνει το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα (καταστολείς της σηματοδότησης των κυτοκινών –SOCS-3), όπως επίσης και την ενεργοποιημένη μορφή του παράγοντα της μεταγραφής (πεπτίδια αναστολείς του ενεργοποιημένου - STAT), ανοίγοντας νέους ορίζοντες για την αποσαφήνιση των μηχανισμών της αντίστασης στην λεπτίνη [71].

4.2 ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΙΝΗΣ

Η λεπτίνη εκτός από την κύρια δράση της στον υποθάλαμο ασκεί και περιφερική δράση στον λιπώδη ιστό. Διάφορες μελέτες έδειξαν ότι λεπτίνη αναστέλλει την λιπόλυση *in vitro* και *in vivo*. Σε καλλιέργειες κυττάρων από παγκρεατικά νησίδια αρουραίων η λεπτίνη προκάλεσε αναστολή της παραγωγής τριγλυκεριδίων ενώ ταυτόχρονα ελάττωσε και την οξειδωσή τους [72]. Η πρόκληση υπερλεπτιναμίας *in vivo* σε ποντικούς μέσω έγχυσης ανασυνδυασμένου αδενιοίου που περιείχε συμπληρωματικό DNA του γονιδίου της λεπτίνης, είχε ως αποτέλεσμα την δραματική μείωση των τριγλυκεριδίων στο ήπαρ, πάγκρεας και σκελετικούς μύς χωρίς παράλληλα να αυξηθούν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα ή τα κετονικά σώματα, εύρημα που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι προηγήθηκε ενδοκυττάρια οξείδωση [73].

Επίσης έχει βρεθεί ότι η λεπτίνη ελαττώνει και τη βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων αναστέλλοντας την καρβοξυλάση του ακετυλο- Co [74]. Επιπλέον, στα τρωκτικά αυξάνει την έκφραση μιας νέας ειδικής πρωτεΐνης (UCP-2) που προκαλεί αποσύνδεση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης με την αναπνευστική αλυσίδα, με αποτέλεσμα να σταματά η σύνθεση ATP και η ενέργεια που παράγεται να αποδίδεται με τη μορφή θερμότητας (θερμογένεση) [75].

5. ΔΡΑΣΗ ΣΕ ΑΛΛΑ ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Η λεπτίνη εμφανίζει έναν εξαιρετικό πλειοτροπισμό και θεωρείται ότι εμπλέκεται και σε άλλες φυσιολογικές λειτουργίες όπως η αιμοποίηση, η αγγειογένεση και η ανοσολογική απάντηση. Έχει βρεθεί ότι διαμεσολαβεί στην κυτταρική ανοσία αποκαθιστώντας την προκαλούμενη από την αστία ανοσοκαταστολή, μέσω ενεργοποίησης των T-λεμφοκυττάρων [76]. Ο υποδοχέας της λεπτίνης εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι η λεπτίνη διεγείρει την αγγειογένεση [77].

Τα λιποκύτταρα αποτελούν τον επικρατέστερο τύπο στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών και η παραγωγή της λεπτίνης στην περιοχή αυτή οδήγησε στην υπόθεση ότι θα μπορούσε να εκφράζει κάποια ρυθμιστική δράση στην αιμοποίηση. Πράγματι, βρέθηκε ότι η λεπτίνη εμφανίζει συνεργική δράση με την ερυθροποιητίνη στην ερυθροποίηση, σε καλλιέργειες κυττάρων αιμοποιητικού ιστού από πειραματόζωα [78]. Επιπλέον, πρόσφατα δεδομένα αναφέρουν ότι η ορμόνη αυτή επιδρά στα αιμοπετάλια και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλώντας δράσεις που ενδεχόμενα σχετίζονται με την θρομβωτική προδιάθεση των παχύσαρκων ατόμων [79].

6. ΡΥΘΜΙΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΛΕΠΤΙΝΗΣ

Για ένα δεδομένο δείκτη μάζα σώματος (BMI) και ποσοστό σωματικού λίπους υπάρχει μια ευρεία διακύμανση των επιπέδων της λεπτίνης. Μολονότι ο λιπώδης ιστός είναι ο κύριος ρυθμιστής των επιπέδων της ορμόνης, σημαντική φαίνεται να είναι και η ρυθμισή της σε νευροενδοκρινικό επίπεδο.

6.1 Λιπώδης ιστός

Το σωματικό λίπος ευθύνεται για το 50 –60% της διακύμανσης των επιπέδων της ορμόνης. Τα επίπεδα της λεπτίνης στον ορό αυξάνουν εκθετικά όσο αυξάνεται η μάζα του λιπώδη ιστού [80] και η παραγωγή της είναι μεγαλύτερη στον υποδόριο λιπώδη ιστό σε σύγκριση με τον περισπλάχνιο [81]. Έχει βρεθεί, ότι η αύξηση του σωματικού λίπους συνοδεύεται με αύξηση της ελεύθερης μορφής της λεπτίνης, σε αντίθεση με τα ισχνά άτομα όπου κυρίως κυκλοφορεί με την δεσμευμένη μορφή [82]. Τα επίπεδα λεπτίνης αυξάνονται μετά από αύξηση της πρόσληψης θερμίδων, ενώ η ελάττωση του βάρους οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της τόσο σε ενήλικες όσο και στα παιδιά [83-85]. Μετά από στέρηση τροφής η λεπτίνη ορού μειώνεται σημαντικά και φθάνει στο ναδίρ μετά από 36 ώρες [86].

6.2 Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα

Στα τρωκτικά, η δράση της λεπτίνης στην κατανάλωση ενέργειας επιτυγχάνεται με την διαμεσολάβηση του συμπαθητικού συστήματος. Η σύνδεση της λεπτίνης στους υποδοχείς της στον υποθάλαμο προκαλεί αύξηση του συμπαθητικού τόνου, με αποτέλεσμα την αύξηση της πρόσληψης των κατεχολαμινών στο λιπώδη ιστό και την επακόλουθη αύξηση της λιπόλυσης και της θερμογένεσης.

Η ενεργοποίηση της λιπόλυσης και θερμογένεσης θεωρείται ότι γίνεται μέσω των β3 – αδρενεργικών υποδοχέων [87] στο λευκό και φαιό λιπώδη ιστό. Η ικανότητα σύνδεσης των κατεχολαμινών με τους β3 υποδοχείς είναι μικρότερη σε σύγκριση με τους β1, β2 αδρενεργικούς υποδοχείς σε φυσιολογικές καταστάσεις, αλλά σε συνθήκες αυξημένης έκκρισης των κατεχολαμινών η ικανότητα αυτή αυξάνει με αποτέλεσμα οι κατεχολαμίνες να συνδέονται κυρίως με τους β3-υποδοχείς. Από την άλλη πλευρά, η χορήγηση κατεχολαμινών και η έκθεση στο ψύχος προκαλούν μείωση των επιπέδων της λεπτίνης.

Έτσι υπάρχει ένας μηχανισμός αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης μεταξύ λεπτίνης και κατεχολαμινών [88]. Δεδομένου ότι η δραστηριότητα του συμπαθητικού συστήματος μειώνεται κατά την διάρκεια του ύπνου, προτάθηκε η άποψη ότι η αύξηση της λεπτίνης μεταμεσονύκτια θα μπορούσε εν μέρει να εξηγηθεί από την ελάττωση του συμπαθητικού τόνου [89].

6.3 Φυλετικός Διμορφισμός της Λεπτίνης

Τα επίπεδα της λεπτίνης είναι τουλάχιστον διπλάσια στις γυναίκες για ένα δεδομένο δείκτη μάζας σώματος [90-91], ενώ οι παχύσαρκες γυναίκες (BMI =40) συγκρινόμενες με ισχνές (BMI =24) έχουν υψηλότερες τιμές λεπτίνης απ' ό,τι οι παχύσαρκοι άντρες συγκρινόμενοι με ισχνούς [90]. Εάν συγκριθούν άντρες και γυναίκες όχι με τον ίδιο BMI αλλά με το ίδιο ποσοστό λίπους, τότε οι διαφορές αυτές αμβλύνονται αλλά εξακολουθούν να υπάρχουν σε σημαντικό βαθμό [90]. Οι διαφορές αυτές αντανakλούν κατά ένα μέρος την διαφορετική κατανομή του σωματικού λίπους μεταξύ αντρών και γυναικών. Οι γυναίκες έχουν υψηλότερο ποσοστό σωματικού λίπους και υψηλότερη αναλογία υποδόριου/σπλαχνικού λιπώδους ιστού. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι διαφορές αυτές στα επίπεδα λεπτίνης παρατηρούνται πριν την γέννηση, καθώς η μέτρηση των επιπέδων της ορμόνης στον ομφάλιο λώρο έδειξε σε ορισμένες μελέτες σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο φύλων [92,93,94], αν και η διαφορά γίνεται έκδηλη κατά τη διάρκεια της εφηβείας [95].

Πρόσφατα δεδομένα από in vitro μελέτες έδειξαν ότι η έκκριση λεπτίνης είναι υψηλότερη ανά μονάδα λιπώδους μάζας στις γυναίκες [96]. Επιπλέον, οι γυναίκες έχουν υψηλότερα επίπεδα λεπτίνης εγκεφαλονωτιαίου υγρού για μια δεδομένη συγκέντρωση λεπτίνης στο πλάσμα, πιθανόν λόγω της αυξημένης μεταφοράς της στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό [97]. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι και άλλοι παράγοντες πέραν της λιπώδους μάζας ρυθμίζουν τα επίπεδα της λεπτίνης στα δύο φύλα..

Έχει βρεθεί ότι τα στεροειδή του φύλου επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδα της ορμόνης τόσο σε in vitro όσο και σε in vivo μελέτες. Τα οιστρογόνα διεγείρουν την έκκριση λεπτίνης in vitro [98], εύρημα το οποίο σε μια μελέτη παρατηρήθηκε μόνο σε λιποκύτταρα γυναικών [99]. Τα επίπεδα λεπτίνης μειώνονται σε θηλυκά τρωκτικά που υποβάλλονται σε ωοθηκεκτομία και η χορήγηση οιστραδιόλης οδηγεί σε αποκατάσταση των επιπέδων της [100,101].

Στους ανθρώπους η εξωγενής χορήγηση θυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH), αύξησε τα επίπεδα της λεπτίνης με παράλληλη αύξηση των οιστρογόνων [102,103]. Στα παιδιά, έχει βρεθεί ότι τα οιστρογόνα ευθύνονται για το 5% της διακύμανσης των επιπέδων της λεπτίνης [104].

Αντιθέτως, ομοφωνία υπάρχει για την δράση των ανδρογόνων η οποία είναι ανασταλτική. Η χορήγηση τεστοστερόνης σε αρουραίους μείωσε την έκφραση του mRNA της λεπτίνης, αλλά δεν μετέβαλε τα επίπεδα στον ορό [105]. Η χρήση ανδρογονικών αναβολικών στεροειδών από αθλητές σωματικής διάπλασης είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση των επιπέδων της λεπτίνης [106], ενώ η καταστολή της έκκρισης τεστοστερόνης στους αθλητές αυτούς καθώς και σε αγόρια με πρόωμη εφηβεία με την χορήγηση GnRH αγωνιστού οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της λεπτίνης [106,107]. Υπογοναδικοί άνδρες έχουν αυξημένα επίπεδα λεπτίνης [108], τα οποία μειώνονται με τη χορήγηση τεστοστερόνης [109]. Έχει βρεθεί, ότι η τεστοστερόνη ευθύνεται για το 10% της διακύμανσης των επιπέδων της λεπτίνης σε νεαρά αγόρια [104,110,111].

6.4 Ινσουλίνη –Μεταβολισμός Γλυκόζης

Οι μέχρι τώρα *in vitro* μελέτες, τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους, αποδεικνύουν ότι η ινσουλίνη διεγείρει την έκκριση της λεπτίνης σε καλλιέργειες λιποκυττάρων [112-115]. *In vitro* μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα [116-117], ενώ σε ανθρώπους η διεγερτική δράση της ινσουλίνης στην έκκριση της λεπτίνης επιτεύχθηκε μόνο σε υπερφυσιολογικές δόσεις και για μακρό χρονικό διάστημα [113,118-120]. Η χορήγηση ινσουλίνης σε διαβητικούς ασθενείς τύπου I και II οδήγησε σε αύξηση της λεπτίνης [121,122], ενώ σε ασθενείς που πάσχουν από ινσουλινώματα έχουν αυξημένα επίπεδα λεπτίνης τα οποία αποκαθίστανται μετά την αφαίρεσή τους [123]. Η χορήγηση λεπτίνης σε ποντικούς *ob/ob*, αποκαθιστά την υπεργλυκαιμία, την υπερινσουλιναίμια και την αντίσταση στην ινσουλίνη [124]. Σε φυσιολογικά διατρεφόμενους ποντικούς, η χορήγηση λεπτίνης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της ινσουλίνης και την αύξηση της γλυκόζης [125], ενώ η χορήγησή της σε αρουραίους ύστερα από στέρηση τροφής μείωσε τόσο την ινσουλίνη όσο και την γλυκόζη [126]. Ο λειτουργικός υποδοχέας της λεπτίνης (Ob –Rb) εκφράζεται στα β –κύτταρα των νησιδίων του παγκρέατος [127], και παρόμοια ανασταλτική δράση στην έκκριση της ινσουλίνης

εμφανίστηκε σε καλλιέργειες των παραπάνω κυττάρων ύστερα από την προσθήκη λεπτίνης.

Θεωρείται, ότι η ανασταλτική δράση της λεπτίνης στην έκκριση της ινσουλίνης πετυχαίνεται με την διαμεσολάβηση του συμπαθητικού συστήματος. Η απελευθέρωση νοραδρεναλίνης τοπικά αυξάνει την πρόσληψη γλυκόζης στους σκελετικούς μυς και στο λιπώδη ιστό ανεξάρτητα από την ινσουλίνη, αλλά η αδρεναλίνη αυξάνει την ηπατική παραγωγή γλυκόζης και αναστέλλει την έκκριση ινσουλίνης, καθώς επίσης και την πρόσληψη γλυκόζης από ιστούς που αποτελούν στόχους της ινσουλίνης [87].

Στους ανθρώπους, *in vitro* μελέτες σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων, έδειξαν ότι η λεπτίνη μειώνει την προκαλούμενη από την ινσουλίνη φωσφορυλίωση του υποστρώματος του ινσουλινικού υποδοχέα (IRS -1) [128], η οποία είναι μία από τις πολλές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος που μετέχουν στον μηχανισμό δράσης της ινσουλίνης. Επιπλέον, μειώνει την έκφραση της ειδικής γλυκοκινάσης η οποία φωσφορυλιώνει την συνθετάση του γλυκογόνου και την απενεργοποιεί, ενώ αυξάνει την καρβοξυκινάση του φωσφοενολπυροσταφυλικού οξέος με αποτέλεσμα την μείωση της γλουκογονόλυσης και αύξηση της νεογλυκογένεσης αντίστοιχα [129,130]. Επομένως, υψηλά επίπεδα λεπτίνης μπορούν να συμβάλουν στην εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη στο ήπαρ.

Μελέτες που διερεύνησαν την επίδραση της λεπτίνης στην δράση της ινσουλίνης σε άλλους περιφερικούς ιστούς παρέχουν αντιφατικά αποτελέσματα. Σε άλλες βρέθηκε ότι η λεπτίνη προάγει την πρόσληψη γλυκόζης από τους σκελετικούς μύς [131-134] και τα λιποκύτταρα [125,135,136], ενώ άλλες μελέτες δεν βρήκαν κάποια επίδραση της λεπτίνης στην πρόσληψη της γλυκόζης στην περιφέρεια [137-139].

6.5 Ορμόνες Επινεφριδίων

Έχει ήδη αναφερθεί ότι ο κirkάδιος ρυθμός της λεπτίνης είναι αντίστροφος με αυτόν της κορτιζόλης και της ACTH, με τη νυκτερινή αύξηση της λεπτίνης να προηγείται της πρωινής αύξησης της κορτιζόλης. Η χορήγηση λεπτίνης κεντρικά καταστέλλει τον άξονα των επινεφριδίων. Σε νηστικά τρωκτικά, όπου τα επίπεδα της λεπτίνης είναι μειωμένα και τα επίπεδα της ACTH και της κορτιζόλης είναι αυξημένα, η εξωγενής χορήγηση λεπτίνης αποκαθιστά τα επίπεδα της κορτιζόλης και της ACTH [53]. Η εξωγενής επίσης χορήγηση λεπτίνης αποκαθιστά την

υπερκορτιζολαιμία σε ποντικούς ob /ob [53]. Ο μηχανισμός της καταστολής του άξονα των επινεφριδίων θεωρείται ότι οφείλεται σε αναστολή του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης, CRF, καθώς έχει βρεθεί in vitro ότι η λεπτίνη αναστέλλει την υπογλυκαιμία που προκαλείται από το CRF [50,51]. Επιπλέον, η λεπτίνη καταστέλλει το νευροπεπτίδιο Υ που φυσιολογικά διεγείρει τον άξονα των επινεφριδίων. Υποδοχείς της λεπτίνης υπάρχουν τόσο στον φλοιό όσο και στο μυελό των επινεφριδίων [140] και έχει βρεθεί σε in vitro μελέτες ότι η λεπτίνη ρυθμίζει την έκκριση των κορτικοστεροειδών. Σε καλλιέργειες επινεφριδιακών κυττάρων από τρωκτικά και ανθρώπους, η προσθήκη λεπτίνης είχε ως αποτέλεσμα την αναστολή της βασικής έκκρισης της κορτιζόλης, της αλδοστερόνης και της δευδροεπιανδροστερόνης (DHEA -S) [141,142].

Από την άλλη μεριά, τα γλυκοκορτικοειδή διεγείρουν την έκκριση της λεπτίνης. Σε καλλιέργειες ανθρώπινων λιποκυττάρων η δεξαμεθαζόνη προκάλεσε σημαντική αύξηση της λεπτίνης [114,115,143]. Η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών σε αρουραίους οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του mRNA της λεπτίνης στο λιπώδη ιστό και παράλληλη αύξηση των επιπέδων της στον ορό, με αποτέλεσμα την μείωση της πρόσληψης τροφής και την απώλεια σωματικού βάρους [144,145]. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι καταβολικές δράσεις των υψηλών δόσεων των γλυκοκορτικοειδών είναι πιθανό να εμφανίζονται με την διαμεσολάβηση της αύξησης των επιπέδων της λεπτίνης. Η κεντρική όμως χορήγηση των γλυκοκορτικοειδών είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του NPY και μείωση του CRF, με επακόλουθη αύξηση της πρόσληψης τροφής και βάρους παρά την συνυπάρχουσα υπερλεπτιναιμία και υπερινσουλιαιμία [145], υποδηλώνοντας ότι η γνωστή διεγερτική δράση των γλυκοκορτικοειδών στην πρόσληψη τροφής είναι κεντρικού τύπου. Η αύξηση της λεπτίνης είναι πιθανόν να προκλήθηκε από τη δευτεροπαθή υπερινσουλιαιμία, αποτέλεσμα της δράσης των γλυκοκορτικοειδών. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός, ότι τα αυξημένα επίπεδα της λεπτίνης δεν κατάφεραν να υπερκεράσουν την δράση των γλυκοκορτικοειδών στην πρόσληψη της τροφής. Στους ανθρώπους, η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών αυξάνει την έκκριση λεπτίνης [146-148]. Ασθενείς με σύνδρομο Gushing έχουν αυξημένα επίπεδα λεπτίνης ανεξάρτητα από την κεντρική παχυσαρκία που παρουσιάζουν.

Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι υπάρχει ένας μηχανισμός αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης μεταξύ λεπτίνης και γλυκοκορτικοειδών ο οποίος εξηγεί

την αντίστροφη αλληλεξάρτηση που παρατηρείται στις διακυμάνσεις των δύο ορμονών στο πλάσμα. Το όποιο κατασταλτικό αποτέλεσμα της λεπτίνης στην έκκριση της κορτιζόλης μπορεί να είναι σημαντικό από φυσιολογική άποψη, καθώς τα αυξημένα επίπεδα γλυκοκορτικοειδών αμβλύνουν τα κεντρικά αποτελέσματα της λεπτίνης στην πρόσληψη τροφής.

Μολονότι οι γενετικώς παχύσαρκοι ποντικοί (ob /ob) επιδεικνύουν αυξημένη έκκριση γλυκοκορτικοειδών, στους ανθρώπους με μετάλλαξη του γονιδίου της λεπτίνης ή του υποδοχέα της, οι διακυμάνσεις της κορτιζόλης και της ACTH είναι σχεδόν φυσιολογικές [17-20]. Εάν το εύρημα αυτό αποτελεί διαφορά μεταξύ των ειδών αποτελεί ένα ερώτημα υπό διερεύνηση

6.6 Θυροειδικές Ορμόνες

Το γεγονός ότι η λεπτίνη και οι θυροειδικές ορμόνες παρουσιάζουν παρόμοιες δράσεις στη θερμογένεση και στον ενεργειακό μεταβολισμό, οδήγησε στο ερώτημα εάν οι ουσίες αυτές ασκούν την δράση τους μέσω κοινής οδού. Η παρατεταμένη στέρση τροφής σε αρουραίους έχει ως αποτέλεσμα την πτώση της λεπτίνης, των θυροειδικών ορμονών, της TSH και του εκλυτικού παράγοντα της θυρεοτροπίνης (TRH). Η εξωγενής χορήγηση λεπτίνης είχε ως αποτέλεσμα την αποκατάσταση των επιπέδων τόσο της θυροξίνης (T₄) και της TSH, όσο και των επιπέδων του TRH [149], υποδηλώνοντας ότι μια ορισμένη συγκέντρωση λεπτίνης στον ορό είναι απαραίτητη για τη σηματοδότηση των νευρώνων του παρακοιλιακού πυρήνα ώστε να διατηρήσουν την σύνθεση του TRH. Φαίνεται, ότι η πτώση της λεπτίνης στον υποσιτισμό, απενεργοποιεί το κύκλωμα παλίνδρομης ρύθμισης του άξονα υποθάλαμος –υπόφυση - θυροειδής με αποτέλεσμα τα επίπεδα του TRH και της TSH να παραμένουν χαμηλά παρά την πτώση των θυροειδικών ορμονών.

Στους ανθρώπους με μεταλλάξεις στο γονίδιο της λεπτίνης, μολονότι σε παιδιά βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα της TSH [17,19], σε ενήλικες η θυροειδική λειτουργία ήταν φυσιολογική [18,19]. Αντιθέτως, σε μια περίπτωση με μετάλλαξη του γονιδίου του υποδοχέα της λεπτίνης, παρατηρήθηκε υποθαλαμικός υποθυροειδισμός [20]. Σε ό,τι αφορά στην επίδραση των θυροειδικών ορμονών στη δράση της λεπτίνης, προτάθηκε η άποψη ότι οι θυροειδικές ορμόνες λογικά θα έπρεπε να ασκούν ανασταλτική δράση, δεδομένου ότι οι τελευταίες ασκούν έναν επιτρεπτικό ρόλο στη δράση των κατεχολαμινών στους β –υποδοχείς καθώς οι

υποδοχείς αυτοί όταν διεγείρονται αναστέλλουν την έκκριση της λεπτίνης [150]. Η υπόθεση αυτή αποδείχτηκε στα τρωκτικά, όπου η λεπτίνη αυξήθηκε σε αρουραίους που υποβλήθηκαν σε θυροειδεκτομή ενώ η χορήγηση T3 ή T4 οδήγησε σε μείωση της λεπτίνης [151]. Ωστόσο, *in vitro* η T3 βρέθηκε να διεγείρει την έκκριση της λεπτίνης [152].

Μελέτες σε ανθρώπους που διερεύνησαν την επίδραση της θυροειδικής κατάστασης στα επίπεδα της λεπτίνης παρέχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Έτσι, σε μερικές από αυτές, δεν βρέθηκε κάποια μεταβολή στα επίπεδα της λεπτίνης σε ασθενείς με υποθυροειδισμό ή υπερθυροειδισμό [15,153], σε άλλες βρέθηκε αύξηση των επιπέδων της στον υποθυροειδισμό και σε άλλες μείωση στην ίδια πάθηση [154-158], ενώ σε λίγες μελέτες βρέθηκαν χαμηλά επίπεδα λεπτίνης σε ασθενείς με υπερθυροειδισμό [159].

6.7 Αυξητική ορμόνη

Είναι γνωστό ότι η αυξητική ορμόνη (GH), εκτός από τις αυξητικές της δράσεις, διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των μεταβολικών διαδικασιών (λιπόλυση, αντινισουλινική δράση). Στους ανθρώπους, τα επίπεδα της GH μειώνονται συνήθως στην παχυσαρκία και αυξάνουν κατά τη διάρκεια της νηστείας [160]. Η χορήγηση GH έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της κατανάλωσης ενέργειας και τη μείωση του σωματικού λίπους [161].

Σε ανθρώπους με μετάλλαξη του γονιδίου του υποδοχέα της λεπτίνης, βρέθηκε μείωση της GH στον ορό [20]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η λεπτίνη αυξάνει σημαντικά την έκκριση της GH σε καλλιέργειες εμβρυϊκών κυττάρων του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης από ανθρώπους στα πρώιμα στάδια της κύησης, αποτέλεσμα το οποίο εξαφανίζεται σε καλλιέργειες των κυττάρων αυτών στο τέλος της κύησης, υποδηλώνοντας ότι η λεπτίνη θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ορμονικό σήμα για την ανάπτυξη της εμβρυϊκής υπόφυσης [162].

Διάφορες *in vivo* μελέτες σε τρωκτικά τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις όσο και σε συνθήκες στέρησης τροφής, έδειξαν ότι η λεπτίνη ασκεί ευοδωτική δράση στην έκκριση της GH [163,164], εύρημα το οποίο δεν επιβεβαιώθηκε *in vitro* [165]. Στους ανθρώπους θεωρείται ότι η λεπτίνη ασκεί ανασταλτική δράση στην έκκριση της GH *in vitro*.

Σε νοσηρές καταστάσεις, όπως η παχυσαρκία ή το σύνδρομο Gushing συνοδευόμενα από αυξημένα επίπεδα λεπτίνης, η έκκριση της GH αμβλύνεται

σημαντικά [166]. Ωστόσο, ο υποτιθέμενος αυτός ρόλος της λεπτίνης είναι υπό διερεύνηση καθώς δεν είναι σαφές προς το παρόν εάν η λειτουργική μορφή του υποδοχέα εκφράζεται στα σωματοτρόφα ή άλλου τύπου κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης.

7. ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

7.1 Υποθάλαμο –Υποφύσιο –Γεννητικός Άξονας

Το αναπαραγωγικό σύστημα στα θηλαστικά είναι εξαιρετικά ευαίσθητο σε οξείες μεταβολές του ενεργειακού ισοζυγίου, με αποτέλεσμα δυσλειτουργία του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση - γονάδες. Καταστολή της κατά ώσεις έκκρισης της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) μετά από στέρηση τροφής έχει τεκμηριωθεί σε μια πλειάδα ειδών, συμπεριλαμβανομένων των τρωκτικών, προβάτων, πιθήκων και ανθρώπων [167-171]. Η έντονη και η παρατεταμένη άσκηση θεωρούνται ότι αναστέλλουν την αναπαραγωγική λειτουργία σε τρωκτικά και ανθρώπους [172,173], ενώ ο περιορισμός στην πρόσληψη τροφής μπορεί να καθυστερήσει την εμφάνιση της ήβης και να επηρεάσει άμεσα τη σεξουαλική συμπεριφορά [174-176].

Η θεωρία, ότι οι γυναίκες με χαμηλό ποσοστό λίπους είναι συχνά αμηνορροϊκές, έχει διατυπωθεί από παλαιά και οδήγησε στο συμπέρασμα, ότι ορισμένη ποσότητα σωματικού λίπους είναι απαραίτητη για την εμφάνιση και για την διατήρηση των καταμήνιων κύκλων [177,178].

Η σύνδεση μεταξύ λεπτίνης και αναπαραγωγής έγινε εμφανής, όταν αποδείχτηκε ότι οι ποντικοί με συγγενή έλλειψη λεπτίνης (ob /ob) εμφάνιζαν στειρότητα ανεξάρτητα από το φύλο [179-181]. Το εύρημα αυτό είχε παρατηρηθεί από παλαιά, όπου οι ερευνητές αγνοούσαν την ύπαρξη της λεπτίνης και είχε αποδοθεί κυρίως στην ανεπαρκή έκκριση της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH) καθώς η απάντηση των γοναδοτροπινών στην εξωγενή χορήγηση GnRH ήταν φυσιολογική στους αρσενικούς ob/ob ποντικούς [181]. Η χορήγηση λεπτίνης στα πειραματόζωα αυτά για 14 ημέρες, είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του αναπαραγωγικού άξονα και την αποκατάσταση της γονιμότητας και στα δύο φύλα [182-184]. Συγκεκριμένα, η λεπτίνη αύξησε το βάρος της μήτρας και των ωοθηκών στα θηλυκά τρωκτικά, ενώ στα αρσενικά αύξησε το βάρος των όρχεων και των σπερματοδόχων κύστεων, συγκρινόμενα με τα ob /ob τρωκτικά της ομάδας ελέγχου που διατρέφονταν με φυσιολογικό ορό.

Το διεγερτικό αποτέλεσμα της λεπτίνης είχε ταυτόχρονα και λειτουργική σημασία, καθώς τα πειραματόζωα που θεραπεύτηκαν με τη λεπτίνη ήταν ικανά να ζευγαρώσουν με τα φυσιολογικά. Το γεγονός ότι η απώλεια βάρους στα πειραματόζωα στα οποία δεν χορηγήθηκε λεπτίνη δεν διόρθωσε τη γονιμότητα, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η παχυσαρκία από μόνη της δεν ήταν το αίτιο της στειρότητας, ενισχύοντας έτσι την άποψη ότι η λεπτίνη ήταν άμεσα υπεύθυνη για τις αλλαγές αυτές. Δεδομένου ότι οι αλλαγές αυτές συνοδεύτηκαν από παράλληλη αύξηση των γοναδοτροπινών, προτάθηκε η άποψη ότι η δράση της λεπτίνης

ασκείται σε κεντρικό επίπεδο. Διάφορες *in vitro* μελέτες, έδειξαν ότι η λεπτίνη διεγείρει την GnRH, καθώς επίσης και την έκκριση των γοναδοτροπινών (FSH, LH) σε υλικό υποθαλαμικού και υποφυσιακού ιστού αντίστοιχα, ενώ η έκκριση της προλακτίνης (PRL) αυξήθηκε μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις της λεπτίνης.

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η διεγερτική δράση της λεπτίνης στην έκκριση της LH ήταν παρόμοια με αυτή που προκλήθηκε από την GnRH σε παρόμοια συγκέντρωση, ενώ η συνχορήγηση λεπτίνης και GnRH δεν παρουσίασε αθροιστική δράση στην έκκριση της LH. Αντιθέτως, η χορήγηση λεπτίνης στην 3^η κοιλία του εγκεφάλου θηλυκών τρωκτικών που είχαν υποβληθεί σε ωθηκεκτομία είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της LH αλλά όχι της FSH [185,186].

Στην προσπάθεια να συσχετισθεί η πτώση της λεπτίνης κατά τη διάρκεια της νηστείας με την πτώση της έκκρισης των γοναδοτροπινών, αντι-ορός λεπτίνης χορηγήθηκε ενδοκοιλιακά στον εγκέφαλο θηλυκών τρωκτικών, με αποτέλεσμα τη μείωση της κατά ώσεις έκκρισης της LH και την διακοπή των οιστρικών κύκλων [187]. Ανάλογη μελέτη σε αρσενικούς πιθήκους έδειξε ότι η χορήγηση λεπτίνης ταυτόχρονα με την έναρξη της στέρησης τροφής, οδήγησε στη διατήρηση της κατά ώσεις έκκρισης της LH, σε αντιδιαστολή με την ομάδα ελέγχου όπου παρατηρήθηκε πτώση της LH [188]. Οι πιθήκοι που θεραπεύτηκαν με λεπτίνη είχαν υψηλότερα μέσα επίπεδα LH και FSH σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, υποδηλώνοντας την ικανότητα της λεπτίνης να αντισταθμίζει τα αποτελέσματα της στέρησης τροφής στην έκκριση των γοναδοτροπινών. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και σε άλλες μελέτες σε τρωκτικά [189,190]. Μολονότι, μία μελέτη έδειξε τη διεγερτική δράση της λεπτίνης στην έκκριση της LH σε πειραματόζωα που διατρέφονταν φυσιολογικά [185], οι περισσότερες μελέτες επιβεβαίωσαν το εύρημα αυτό μόνο σε συνθήκες στέρησης τροφής.

Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και σε μελέτες στα ανώτερα θηλαστικά, όπου η χορήγηση λεπτίνης σε πρόβατα που διατρέφονταν φυσιολογικά δεν μετέβαλλε την κατά ώσεις έκκριση της LH [191], ενώ σε συνθήκες στέρησης τροφής το διεγερτικό αποτέλεσμα της λεπτίνης στη έκκριση της LH ήταν εμφανές .

Πρόσφατα δεδομένα από μελέτες σε τρωκτικά, έδειξαν ότι η φαρμακευτική αναστολή της πρόσληψης γλυκόζης και της οξειδωσης των υδατανθράκων και λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της νηστείας, σε δόσεις που δεν ανέστειλαν τους οιστρικούς κύκλους, είχε ως αποτέλεσμα τη διακοπή των οιστρικών κύκλων κατά 70% παρά την ταυτόχρονη χορήγηση της λεπτίνης [192]. Δεδομένου ότι η λεπτίνη προκαλεί αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης και της οξειδωσης των λιπαρών οξέων, προτάθηκε η άποψη ότι η λεπτίνη θα μπορούσε να ρυθμίζει την αναπαραγωγική λειτουργία ασκώντας έμμεσες δράσεις στο μεταβολισμό.

Ωστόσο, ευρήματα από άλλες μελέτες ενισχύουν την άποψη για άμεση δράση της λεπτίνης στην έκκριση των γοναδοτροπινών σε φυσιολογικές καταστάσεις. Η χορήγηση οιστραδιόλης σε θηλυκά τρωκτικά που έχουν προηγουμένως (14 ημέρες) υποβληθεί σε ωοθηκεκτομία, επιτρέπει την εμφάνιση προωορρηκτικού κύματος της LH και της PRL όμοιου με αυτού που παρατηρείται πριν τον οιστρικό κύκλο των τρωκτικών [193,194]. Η χορήγηση αντι – ορού λεπτίνης στα παραπάνω πειραματόζωα που διατρέφονταν φυσιολογικά είχε ως αποτέλεσμα την κατάργηση του προωορρηκτικού κύματος της LH και της PRL, ενώ στα ίδια πειραματόζωα η χορήγηση λεπτίνης αποκατέστησε το προωορρηκτικό κύμα της LH που είχε καταργηθεί κατά την διάρκεια της νηστείας [195].

Στους ανθρώπους, μολονότι άμεσες πειραματικές ενδείξεις δεν υπάρχουν, φαίνεται ότι η λεπτίνη ασκεί ένα διεγερτικό ρόλο στην λειτουργία του άξονα GnRH – γοναδοτροπίνες. Οι μέχρι τώρα περιγραφείσες περιπτώσεις ενηλίκων με συγγενή έλλειψη λεπτίνης ή μετάλλαξη στο γονίδιο του υποδοχέα της, παρουσιάζουν εκσεσημασμένη παχυσαρκία και υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό [18,20], σε αντίθεση με τα ετερόζυγα άτομα στα οποία η ωρίμανση του αναπαραγωγικού άξονα είναι φυσιολογική.

Η χορήγηση λεπτίνης για 12 μήνες σε κορίτσι με ομόζυγο μετάλλαξη στο γονίδιο της λεπτίνης, είχε ως αποτέλεσμα εκτός της απώλειας βάρους, την εμφάνιση νυκτερινής κατά ώσεις έκκριση της LH και της FSH, υποδηλώνοντας την έναρξη της ήβης [196]. Το παχύσαρκο κορίτσι είχε οστική ηλικία που αντιστοιχούσε στα 12,5 χρόνια χωρίς εμφάνιση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου. Η πιθανότητα αυτόματης εμφάνισης της ήβης χωρίς τη θεραπεία με λεπτίνη φαίνεται να είναι απίθανη, καθώς όπως προαναφέρθηκε παραπάνω, ενήλικες με συγγενή έλλειψη λεπτίνης παρουσιάζουν υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό.

Σε αμνηορρικές γυναίκες με νευρογενή ανορεξία και σε αθλήτριες που γυμνάζονται έντονα, παρατηρήθηκε κατάργηση της κατά ώσεις έκκρισης της λεπτίνης [197,198]. Η σταδιακή επανασίτιση των γυναικών με νευρογενή ανορεξία είχε ως αποτέλεσμα την παράλληλη σχεδόν αύξηση της LH και της λεπτίνης [199], υποδηλώνοντας ότι τα χαμηλά επίπεδα λεπτίνης προκαλούν αμηνόρροια στις γυναίκες αυτές μέσω αρνητικής παλλίνδρομης ρύθμισης στην έκκριση των γοναδοτροπινών. Από την άλλη μεριά, βραχυπρόθεσμη επανασίτιση των γυναικών αυτών (3 ημέρες) δεν αύξησε τα επίπεδα της λεπτίνης παρά τα αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι ένα ορισμένο ποσοστό σωματικού λίπους είναι απαραίτητο για τη λειτουργία της λεπτίνης ως «πληροφοριοδότης» των ενεργειακών αποθεμάτων [197]. Το παραπάνω εύρημα έχει και τελεολογική σημασία διότι εάν συνέβαινε απότομη αύξηση της λεπτίνης, θα οδηγούσε σε λανθασμένη

πληροφόρηση του εγκεφάλου για την κατάσταση του ενεργειακού ισοζυγίου με αποτέλεσμα την επίταση της ανορεξίας και μόνιμη καταστολή του αναπαραγωγικού άξονα. Παρ' όλα αυτά, η αποκατάσταση των επιπέδων της λεπτίνης στον ορό και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό των γυναικών αυτών, γίνεται νωρίτερα από την αποκατάσταση του δείκτη μάζα σώματος και ίσως αυτό εξηγεί και την δυσκολία των ασθενών αυτών στην επανάκτηση βάρους [199].

Κλινική μελέτη έδειξε ότι η κατά ώσεις έκκριση της λεπτίνης και της LH είναι σύγχρονες στη διάρκεια της μέσης ωοθυλακικής φάσης φυσιολογικών γυναικών και προτάθηκε ότι η νυκτερινή αύξηση της λεπτίνης θα μπορούσε να καθορίζει τις αντίστοιχες μεταβολές της LH [200]. Βάση του υποτιθέμενου αυτού μηχανισμού, θα μπορούσαν να εξηγηθούν και οι διάφορες μεταβολές του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση - γονάδες που παρατηρούνται από τα μειωμένα επίπεδα της λεπτίνης στην νευρογενή ανορεξία.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι γυναίκες με ποσοστό λίπους κάτω από 15% του σωματικού βάρους ή / και επίπεδα λεπτίνης μικρότερα από 3 ng / ml στο πλάσμα, βρίσκονται σε μεγάλο κίνδυνο δευτεροπαθούς αμηνόρροιας [201,202], ενώ με λίγο μεγαλύτερες τιμές (αλλά μικρότερες από 5 ng / ml) μπορεί η έμμηνος ρύση να είναι κανονική, αλλά οι κύκλοι να είναι ανωορρηκτικοί.

Παρόμοια ευρήματα παρατηρήθηκαν και σε τρωκτικά, όπου συγκεντρώσεις της λεπτίνης της τάξης του 1.5 ng / ml σε διαγονιδιακά ob /ob τρωκτικά, απέτρεψε τη στειρότητα παρά το γεγονός ότι εξακολουθούσαν να παραμένουν παχύσαρκα [203]. Η τελευταία παρατήρηση υποδηλώνει ότι οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη δράση της λεπτίνης στην αναπαραγωγή και την παχυσαρκία είναι διαφορετικοί, καθώς η παχυσαρκία εξακολουθεί να υπάρχει παρά την αποκατάσταση της γονιμότητας.

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) αποτελεί ένα μοντέλο όπου θα μπορούσε να μελετηθεί η σχέση της λεπτίνης με την LH. Γυναίκες με το σύνδρομο αυτό μπορεί να εμφανίζουν παχυσαρκία, ενώ στις συνυπάρχουσες ενδοκρινικές διαταραχές περιλαμβάνονται τα υψηλότερα επίπεδα της LH, η ινσουλινοαντοχή, η υπερινσουλιναμία και η υπερανδρογοναιμία.

Οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει δεν έχουν δείξει κάποια διαφορά στα επίπεδα της λεπτίνης μεταξύ των γυναικών με PCOS και φυσιολογικών γυναικών της ίδιας ηλικίας και ίδιου δείκτη μάζας σώματος [204 - 207], αν και αρχικά είχε βρεθεί ότι ένα ποσοστό (29%) γυναικών με PCOS είχαν επίπεδα λεπτίνης μεγαλύτερα από τα ανώτατα φυσιολογικά επίπεδα ανεξάρτητα από τον BMI [208]. Επιπλέον, δεν έχει βρεθεί κάποια συσχέτιση μεταξύ λεπτίνης και υψηλότερων επιπέδων LH, ινσουλίνης και ανδρογόνων. Πρόσφατη μελέτη

έδειξε ότι σε γυναίκες με PCOS δεν βρέθηκαν μεταλλάξεις του γονιδίου της λεπτίνης ή του υποδοχέα της [209].

Η αρχική θεωρία, ότι η συνυπάρχουσα υπερλεπτιναιμία σε υποομάδα γυναικών με PCOS είναι πιθανό να προκαλεί απευαισθητοποίηση των υποδοχέων της λεπτίνης στον υποθάλαμο και επακόλουθη μείωση της δράσης της στους GnRH νευρώνες, φαίνεται να κερδίζει έδαφος τελευταία όπως συζητείται παρακάτω στο κεφάλαιο των ωθητικών στεροειδών.

Μολονότι, η λεπτίνη φαίνεται να ασκεί μια διεγερτική δράση στον άξονα GnRH – γοναδοτροπίνες, ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ακόμη αποσαφηνισθεί. Είναι γνωστό ότι οι νευρώνες που συνθέτουν GnRH βρίσκονται σε μια περιοχή κοντά στο μέσο έπαρμα η οποία περιλαμβάνει τον τοξοειδή, έσω –κοιλιακό πυρήνα και μέρος του πλάγιου υποθαλάμου. Η περιοχή αυτή στερείται του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, επιτρέποντας τη δράση της λεπτίνης χωρίς να είναι απαραίτητη η μεταφορά της με ειδικό μηχανισμό.

Καθώς η λεπτίνη έχει βρεθεί να διεγείρει την έκλυση της GnRH, προτάθηκε η άποψη ότι η ορμόνη αυτή θα μπορούσε να επηρεάζει άμεσα νευρώνες που περιέχουν GnRH. Ωστόσο, μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα έδειξαν μικρή συνέκφραση της μακράς μορφής του υποδοχέα της λεπτίνης και της GnRH, υποδηλώνοντας ότι η λεπτίνη ασκεί τη δράση της στους GnRH – νευρώνες με την διαμεσολάβηση άλλων ουσιών [188,210].

Πρώτος ο Yu και οι συνεργάτες του [185], πρότειναν ότι η δράση της λεπτίνης ασκείται με την διαμεσολάβηση του NPY και του μονοξειδίου του αζώτου (NO). Το NPY μολονότι σε οξεία χορήγηση διεγείρει την έκκριση της GnRH, σε μακροχρόνια χορήγηση εμφανίζει ανασταλτική δράση [211,212]. Έτσι οι ερευνητές υπέθεσαν ότι το NPY θα μπορούσε να καταστέλλει την έκλυση της GnRH, αναστέλλοντας τους νοραδρενεργικούς νευρώνες οι οποίοι διαμεσολαβούν στην έκκριση της GnRH. Η χορήγηση λεπτίνης μειώνοντας τα επίπεδα του NPY, προκαλεί άρση της παραπάνω αναστολής, με αποτέλεσμα την μετάδοση νοραδρενεργικών ώσεων στους υποδοχείς των νευρώνων του NO. Η απελευθέρωση του NO και η επακόλουθη διαχυσή του στις απολήξεις των GnRH νευρώνων οδηγεί στην διέγερση της έκκρισης της GnRH. Σε μεταγενέστερη μελέτη η ίδια ομάδα ερευνητών, έδειξε ότι η λεπτίνη διεγείρει την συνθετάση του NO in vitro, καθώς η διεγερτική δράση της λεπτίνης στην έκκριση της GnRH και της LH, αποτρέπεται με ταυτόχρονη χορήγηση ενός αναστολέα της συνθετάσης του NO [213]. Ωστόσο, η υπερέκφραση του NPY από μόνη της δεν μπορεί να δικαιολογήσει την στειρότητα στους ob/ ob ποντικούς, καθώς έχει βρεθεί ότι ποντικοί που φέρουν ταυτόχρονες μεταλλάξεις στο γονίδιο της λεπτίνης και στο γονίδιο του NPY, παρουσιάζουν μόνο μερική αποκατάσταση της γονιμότητας [214]. Αυτό σημαίνει ότι και

άλλες ουσίες πρέπει να αποτελούν ενδιάμεσους σταθμούς στην μετάδοση του σήματος για την έκκριση της GnRH.

Νευρώνες που περιέχουν τα προϊόντα του γονιδίου της μελανοκορτίνης, έχει βρεθεί ότι δημιουργούν συνδέσεις με νευρώνες που περιέχουν GnRH [215], και βρίσκονται στον τοξοειδή πυρήνα, μια περιοχή υψηλής έκφρασης του λειτουργικού υποδοχέα της λεπτίνης. Δεδομένου ότι η λεπτίνη ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου της POMC, προτάθηκε η άποψη ότι θα μπορούσε να επηρεάσει την έκκριση της GnRH μέσω των MCR-4 υποδοχέων της μελανοκορτίνης. Η χορήγηση αγωνιστών και ανταγωνιστών των MCR-4 υποδοχέων σε δύο πρόσφατες μελέτες, έδειξε αντικρουόμενα αποτελέσματα στην έκκριση της GnRH. Συγκεκριμένα, στη μια μελέτη [216], η χορήγηση ανταγωνιστών των MCR-4 υποδοχέων σε θηλυκά πειραματόζωα που είχαν υποστεί ωθηκεκτομία με ταυτόχρονη χορήγηση οιστραδιόλης και προγεστερόνης, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του προωορρηκτικού κύματος της LH και της PRL σε φυσιολογικά διατρεφόμενα τρωκτικά, ενώ απέτρεψε την ευοδωτική δράση της λεπτίνης στο προωορρηκτικό κύμα της LH και της PRL που είχαν μειωθεί σε τρωκτικά μετά από τριήμερη στέρηση τροφής. Αντιθέτως, στην άλλη μελέτη η χορήγηση ανταγωνιστών των MCR-4 υποδοχέων και λεπτίνης σε αρσενικούς ob /ob ποντικούς, δεν είχε κάποιο αποτέλεσμα στην έκκριση των γοναδοτροπινών οι οποίες ήταν αυξημένες. Επίσης, στην ίδια μελέτη η χορήγηση αγωνιστών των MCR-4 υποδοχέων, μολονότι μείωσε την πρόσληψη τροφής, δεν είχε κάποιο αποτέλεσμα στην έκκριση των γοναδοτροπινών [217]. Τα ευρήματα της δεύτερης μελέτης είναι σύμφωνα με αυτά που παρατηρήθηκαν σε ανθρώπους με μεταλλάξεις στα γονίδια της POMC και των MCR-4 υποδοχέων, όπου παρά την σημαντική παχυσαρκία που παρατηρήθηκε, η αναπαραγωγική λειτουργία και τα επίπεδα των γοναδοτροπινών ήταν αμετάβλητα [218,219,220], υποδηλώνοντας ότι η οδός των υποδοχέων της μελανοκορτίνης δεν είναι σημαντικός στη διαμεσολάβηση της δράσης της λεπτίνης .

Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι και ο μεταγραφικός παράγων της κοκαΐνης – αμφεταμίνης, CART, εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκκρισης της GnRH [221]. Σε in vitro πειράματα βρέθηκε ότι το CART διεγείρει την έκκριση της GnRH, ενώ η χορήγηση αντι-ορού CART απέτρεψε το ευοδωτικό αυτό αποτέλεσμα. Παρόμοια δράση έχει βρεθεί και για το ομοιάζων με το «αγκούτι» πεπτιδίο (AgRp), το οποίο είναι ένας φυσικός ανταγωνιστής των MCR-4 υποδοχέων, τόσο σε in vitro όσο και σε in vivo πειράματα σε αρουραίους [222]. Το παράδοξο είναι ότι το AgRp αυξάνεται μετά από στέρηση τροφής (ορεξιογόνο πεπτιδίο) και είναι αυξημένο σε ob /ob ποντικούς όπως ήδη έχει αναφερθεί, και επομένως η χορήγηση λεπτίνης μειώνοντας τα επίπεδα του AgRp, ελαττώνει και το πιθανό διεγερτικό αποτέλεσμα

του τελευταίου στην έκκριση της GnRH. Διάφοροι ερευνητές ερμηνεύουν το φαινόμενο αυτό, συγκρίνοντας τη δράση του AgRp με αυτή του NPY, το οποίο σε οξεία χορήγηση διεγείρει την έκκριση της GnRH, ενώ η χρόνια χορήγησή του έχει ανασταλτική δράση στις γοναδοτροπίνες. Επομένως, η λεπτήνη μειώνοντας τα επίπεδα του AgRp αίρει την ανασταλτική δράση του πεπτιδίου στην έκλυση της GnRH και των γοναδοτροπινών σε μακροχρόνια βάση. Παρ' όλα αυτά, τα πρόδρομα αποτελέσματα της δράσης των δύο αυτών πεπτιδίων αναμένουν περαιτέρω τεκμηρίωση σε μελλοντικές έρευνες. Από την άλλη πλευρά, ο διαμεσολαβητικός ρόλος των υποδοχέων της μελανοκορτίνης παραμένει ένα ερώτημα υπό διερεύνηση.

7.2. ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΗΒΗ

Η μετάβαση στην ήβη είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ωρίμανση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες και η εμφάνισή της εξαρτάται από την αύξηση της κατά ώσεις έκκρισης της GnRH, η οποία με την σειρά της προκαλεί την απελευθέρωση των γοναδοτροπινών με επακόλουθο την έκκριση των στεροειδών του φύλου [223].

Έχει ήδη αναφερθεί, ότι η εμφάνιση της εμμηναρχής προϋποθέτει την ύπαρξη ενός ορισμένου ποσοστού σωματικού λίπους. Ο λόγος για την συσχέτιση αυτή μεταξύ σωματικού λίπους και αναπαραγωγής, είναι ότι η κύηση και γαλουχία απαιτούν υψηλή κατανάλωση ενέργειας για τη διατήρηση ενός βιώσιμου νεογνού [224].

Έτσι, από τελεολογικής πλευράς θα ήταν σκόπιμο η έναρξη της εμμήνου ρύσης να συμβεί μόνο όταν μία έφηβη είχε δημιουργήσει αρκετά αποθέματα σωματικού λίπους. Η παραπάνω άποψη ενισχύεται από διάφορες επιδημιολογικές μελέτες στις οποίες έχει βρεθεί ότι στις αναπτυγμένες κοινωνίες η εμμηναρχή εμφανίζεται νωρίτερα, ενώ στα υψηλότερα και παχύτερα κορίτσια η εμμηναρχή εμφανίζεται νωρίτερα σε σύγκριση με τα ισχνά [225].

Οι παρατηρήσεις αυτές είχαν αμφισβητηθεί στο παρελθόν καθώς δεν τεκμηριώθηκε ποτέ ένας σαφής μηχανισμός που να συνδέει το σωματικό λίπος με τον υποθάλαμο. Η λεπτήνη αποτελεί ένα τέτοιο συνδετικό κρίκο καθώς αντανakλά τα επίπεδα του σωματικού λίπους, και θα μπορούσε να πληροφορήσει τον υποθάλαμο εάν η λιπώδης μάζα είναι επαρκής ή ανεπαρκής για την αναπαραγωγή. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από ένα ευρύ φάσμα μελετών στα τρωκτικά, τόσο στα γενετικώς παχύσαρκα όσο και στα φυσιολογικά.

Στους ανθρώπους, ισχυρές ενδείξεις προέρχονται από περιπτώσεις με συγγενή έλλειψη λεπτήνης καθώς και από διαχρονικές παρατηρήσεις σε διάφορα στάδια της ήβης. Στα τρωκτικά, μολονότι δύο μελέτες έδειξαν ότι η λεπτήνη προάγει την εμφάνιση της ήβης σε

κανονικά στιζόμενους θηλυκούς ποντικούς [226,227], τα αποτελέσματα αυτά δεν επιβεβαιώθηκαν σε αρουραίους [228], στους οποίους ωστόσο η χορήγηση λεπτίνης επέτρεψε την σεξουαλική ωρίμανση σε συνθήκες στέρησης σε συνθήκες στέρησης τροφής σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Σταθερή αύξηση της λεπτίνης προηβικά έχει βρεθεί τόσο σε ποντικούς όσο και αρουραίους [229,230], ενώ παρόμοια αύξηση δεν έχει βρεθεί σε αρσενικούς πιθήκους [231,232]. Τα παραπάνω ευρήματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η λεπτίνη διαδραματίζει ένα επιτρεπτικό ρόλο στην εμφάνιση της ήβης, πληροφορώντας τον υποθάλαμο ότι το νεαρό τρωκτικό είναι μεταβολικά έτοιμο για τη σεξουαλική του ωρίμανση.

Στους ανθρώπους, όπως και στα τρωκτικά, φαίνεται ότι η λεπτίνη είναι αναγκαία για την εμφάνιση της ήβης. Άμεση απόδειξη του ρόλου της λεπτίνης στην ανθρώπινη ήβη, απορρέει από οικογένειες στις οποίες παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις στο γονίδιο της ορμόνης ή του υποδοχέα της. Μόνο δύο ενήλικες με ομόζυγο μετάλλαξη του γονιδίου της λεπτίνης έχουν βρεθεί, μια γυναίκα 34 ετών με πρωτοπαθή αμηνόρροια και ένας άνδρας 22 ετών με υπογοναδοτροπικό υπογοναδισμό [18].

Επίσης σε δύο νεαρές γυναίκες με ομόζυγο μετάλλαξη στο γονίδιο του υποδοχέα, δεν εμφανίσθηκε η ήβη στην ηλικία των 13 και 19 ετών αντίστοιχα, η δε θεραπεία των ασθενών αυτών με λεπτίνη οδήγησε στη σεξουαλική ωρίμανση [20]. Σε διάφορες διαχρονικές μελέτες κατά την διάρκεια της ήβης, βρέθηκε ότι τα επίπεδα της λεπτίνης αυξάνουν και στα δύο φύλα προηβικά και κορυφώνονται κατά την έναρξη της ήβης.

Με την πρόοδο της ήβης παρατηρείται διαφοροποίηση στα επίπεδα της λεπτίνης στον ορό, στα δύο φύλα. Στα αγόρια παρατηρείται προοδευτική μείωση των επιπέδων της λεπτίνης, από το στάδιο 2 κατά Tanner έως το στάδιο 5, όπου παρατηρείται το ναδίρ των επιπέδων της λεπτίνης. Τα επίπεδα λεπτίνης προς το τέλος της ήβης στα αγόρια βρέθηκε να είναι το ίδιο χαμηλά όσο και στην ηλικία των 5-6 ετών. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα επίπεδα της λεπτίνης αυξάνουν πριν την αρχική αύξηση της τεστοστερόνης (έναρξη ήβης) και ακολουθεί σταδιακή ελάττωση τους παράλληλα με την αύξηση της τεστοστερόνης [110,233,234]. Αντίθετα, στα κορίτσια παρατηρείται αύξηση της λεπτίνης στο στάδιο 2 κατά Tanner, η οποία παραμένει σταθερή στο μέσο της ήβης για να φθάσει το μέγιστο της τιμής της στο στάδιο 5. Στο τέλος της ήβης, τα επίπεδα της λεπτίνης σε απόλυτη τιμή, είναι οκτώ φορές μεγαλύτερα στα κορίτσια σε σχέση με τα αγόρια.

Περαιτέρω ενίσχυση του ρόλου της λεπτίνης στην έναρξη και διατήρηση της ήβης προέρχεται από πρόσφατη μελέτη που έδειξε ότι η δεσμευμένη μορφή της λεπτίνης μειώνεται

όσο αυξάνει η ηλικία και το στάδιο της ήβης, οδηγώντας σε αύξηση της διαθέσιμης δραστηκής μορφής ώστε να ασκήσει την βιολογική δράση [235].

Αξιοσημείωτη είναι η διακύμανση της λεπτίνης σε σχέση με τις ορμόνες του φύλου κατά την διάρκεια της ήβης. Στα αγόρια παρατηρήθηκε μια αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της λεπτίνης και των FSH, LH και τεστοστερόνης. Η λεπτίνη αυξάνει αρχικά από την ηλικία των 5 –6 χρόνων για να φθάσει το μέγιστο της τιμής της μέχρι τα 10 χρόνια, ενώ ακολουθεί μείωσή της μετά το διάστημα αυτό. Η FSH αυξάνει γύρω στα 11 χρόνια ακολουθούμενη από ταυτόχρονη αύξηση της LH και τεστοστερόνης στα 12 χρόνια.

Αντίθετα στα κορίτσια παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα της λεπτίνης και των FSH, LH, και οιστραδιόλης. Η λεπτίνη και εδώ αυξάνει από την ηλικία των 5 –6 χρόνων και ακολουθείται από μια προοδευτική αύξηση της FSH η οποία σταθεροποιείται γύρω στα 12 χρόνια. Τα επίπεδα της λεπτίνης αυξάνονται σταθερά από την ηλικία των 10 χρόνων μέχρι την ολοκλήρωση της ήβης. Η αύξηση της οιστραδιόλης εμφανίζεται στα 11 χρόνια ενώ η LH αυξάνεται στα 12 χρόνια [234,236].

Παρά το γεγονός ότι η αύξηση της λεπτίνης συνοδεύτηκε από παράλληλη αύξηση του BMI και στα δύο φύλα, τα επίπεδα της λεπτίνης ήταν μεγαλύτερα στα κορίτσια σε όλα τα στάδια της ήβης.

Από τα παραπάνω ευρήματα προκύπτει το συμπέρασμα ότι μολονότι η λεπτίνη αυξάνεται στα αγόρια με την έναρξη της ήβης, τα αυξημένα επίπεδά της δεν είναι αναγκαία για τη ολοκλήρωση της ήβης. Αντίθετα, στα κορίτσια φαίνεται ότι χρειάζονται μεγαλύτερα επίπεδα λεπτίνης για την έναρξη της ήβης, ενώ η διατήρηση των αυξημένων επιπέδων της είναι αναγκαία για τη διατήρηση της αναπαραγωγικής λειτουργίας. Από τελεολογικής πλευράς, το γεγονός αυτό είναι επιθυμητό και σκόπιμο, καθώς η γυναίκα πρέπει να είναι μεταβολικά έτοιμη για να αντεπεξέλθει στις αυξημένες μεταβολικές απαιτήσεις ενδεχόμενης κύησης.

7.3. ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΚΥΗΣΗ

Η εγκυμοσύνη αποτελεί μια υπερμεταβολική κατάσταση, κατά τη διάρκεια της οποίας παρατηρείται σημαντική αύξηση στο σωματικό λίπος και βάρος κυρίως στο τελευταίο τρίμηνο [237]. Στους ανθρώπους και μερικά άλλα είδη θηλαστικών, το μητρικό λίπος συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια της κύησης και χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Η αύξηση του βάρους στην κύηση οφείλεται, ως γνωστόν, στην αύξηση του βάρους του πλακούντα, του αμνιακού υγρού και του εμβρύου, στην κατακράτηση ύδατος και νατρίου, και στην αύξηση του σωματικού λίπους.

Ωστόσο, οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν το βάρος της μητέρας και του εμβρύου δεν είναι ακόμα καλά ξεκαθαρισμένοι. Ορμονικοί παράγοντες (ινσουλίνη, IGFS), γενετική προδιάθεση και περιβαλλοντικοί παράγοντες επιδρούν σημαντικά στη αύξηση του βάρους του εμβρύου και της μητέρας.

Αρκετές μελέτες έχουν γίνει, με σκοπό τη διερεύνηση της διακύμανσης των επιπέδων της λεπτίνης κατά τη διάρκεια της κύησης. Τα μέχρι τώρα ευρήματα, έδειξαν ότι η ελεύθερη μορφή της λεπτίνης αυξάνει σχεδόν στο διπλάσιο κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης κύησης, συνοδευόμενη από παράλληλη (αλλά σε μικρότερο βαθμό) αύξηση της δεσμευμένης μορφής. Συγκεκριμένα, παρατηρείται μια αύξηση της λεπτίνης στο 1^ο τρίμηνο, ακολουθεί σημαντική αύξηση στο 2^ο τρίμηνο όπου και σταθεροποιείται μέχρι την 32^η-34^η εβδομάδα, και ακολουθεί προοδευτική μείωσή της καθώς η κύηση πλησιάζει στον τερματισμό της.

Μετά τον τοκετό ακολουθεί απότομη μείωση των επιπέδων της λεπτίνης σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται σε μη εγκυμονούσες γυναίκες [98,238-242]. Παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα λεπτίνης συσχετίζονται με το σωματικό λίπος κατά τη διάρκεια της κύησης, η αύξηση των επιπέδων της είναι δυσανάλογη με την αύξηση του σωματικού λίπους. Η αναφερόμενη εναπόθεση λίπους στη διάρκεια της κύησης κυμαίνεται μεταξύ 25 και 30% [243], υποδηλώνοντας ότι τα αυξημένα επίπεδα της λεπτίνης οφείλονται και σε άλλους παράγοντες. Εξάλλου η αύξηση της λεπτίνης παρατηρείται από το 1^ο τρίμηνο της κύησης, πριν από κάθε μείζονα αλλαγή στο σωματικό λίπος και το βασικό μεταβολισμό [241]. Είναι γνωστό ότι κατά την διάρκεια της κύησης παρατηρείται αύξηση διαφόρων ορμονών, όπως χοριακής γοναδοτροπίνης, οιστραδιόλης, προγεστερόνης, ινσουλίνης, κορτιζόλης και πλακουντιακού γαλακτογόνου.

Σε ό,τι αφορά στην οιστραδιόλη, την προγεστερόνη και τη χοριακή γοναδοτροπίνη, μια μελέτη έδειξε θετική συσχέτιση με τα επίπεδα της λεπτίνης κυρίως στο 1^ο τρίμηνο [238], ενώ σε άλλη μελέτη δεν βρέθηκε παρόμοια συσχέτιση [95]. Φαίνεται ότι η οιστραδιόλη in vivo, εμφανίζει περιορισμένη διεγερτική δράση στην έκκριση της λεπτίνης, σε αντίθεση με τα αποτελέσματά της σε in vitro μελέτες. Εξάλλου, η συνεχιζόμενη αύξηση της οιστραδιόλης στο 3^ο τρίμηνο δεν συνοδεύτηκε από παράλληλη αύξηση της λεπτίνης [238].

Η χοριακή γοναδοτροπίνη, είναι γνωστό ότι εμφανίζει το μέγιστο της έκκρισής της στο τέλος του 1^{ου} τριμήνου και θα μπορούσε κατά ένα μέρος να δικαιολογήσει την αύξηση της λεπτίνης. Εξάλλου, σε in vitro μελέτες βρέθηκε να διεγείρει την έκκριση της λεπτίνης σε συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται στην κύηση [95].

Η αύξηση της ινσουλίνης που παρατηρείται στην κύηση δεν φαίνεται επίσης να επηρεάζει τα επίπεδα της λεπτίνης καθώς δεν βρέθηκε κάποια θετική συσχέτιση [95]. Όπως ήδη έχει

αναφερθεί, η διεγερτική δράση της ινσουλίνης *in vitro* εμφανίζεται σε υπερφυσιολογικές συγκεντρώσεις (>200 pmol/L) σε ανθρώπους, οι οποίες δεν παρατηρούνται σε φυσιολογικές κτήσεις. Η κορτιζόλη δεν θα μπορούσε να εξηγήσει από μόνη της την αύξηση της λεπτίνης, καθώς θετική συσχέτιση βρέθηκε να παρουσιάζει μόνο στο 2^ο τρίμηνο [95].

Η υπόθεση της συμμετοχής του πλακούντα στην αύξηση των επιπέδων της λεπτίνης συνάδει με το γεγονός ότι η λεπτίνη εκκρίνεται από τον πλακούντα και επιπλέον οι υποδοχείς της λεπτίνης εκφράζονται στο όργανο αυτό [244,245]. Εξάλλου, ο πλακούντας διπλασιάζεται σε μέγεθος ανάμεσα στην 24^η και 36^η εβδομάδα, ενισχύοντας την παραπάνω άποψη. Επίσης, τα επίπεδα της λεπτίνης μειώνονται απότομα όταν η λειτουργία του πλακούντα εξαφανίζεται τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις (τοκετός) όσο και σε παθολογικές όπως η αυτόματη έκτρωση [246]. Η παθολογία επίσης του πλακούντα συνοδεύεται από αποκλίσεις στα επίπεδα της λεπτίνης. Στην προεκλαμψία, έχει βρεθεί αυξημένη παραγωγή λεπτίνης από τον πλακούντα [247], ενώ παρόμοια αύξηση βρέθηκε και στον ορό προεκλαμπτικών γυναικών πριν την κλινική εμφάνιση της νόσου [248].

Με βάση τα παραπάνω ευρήματα, προτάθηκε η άποψη ότι η λεπτίνη ίσως αποτελεί ένα δείκτη υποξίας του πλακούντα, καθώς *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι η έκκριση λεπτίνης αυξάνεται από τον πλακούντα σε συνθήκες υποξίας [247]. Επιπλέον, η λεπτίνη είναι πιθανό να εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία της προεκλαμψίας δεδομένου ότι αυξάνει την πρόσληψη της νοραδρεναλίνης στον λιπώδη ιστό.

In vivo, έχει βρεθεί ότι η λεπτίνη αυξάνεται σε ασθενείς με χοριοκαρκίνωμα και μύλη κύηση [245], ενώ παρόμοια αύξηση παρατηρείται και στην έκφραση του mRNA της λεπτίνης σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων από ασθενείς με τις παραπάνω παθήσεις [249,250]. Παρά το γεγονός ότι η ινσουλίνη δεν φαίνεται να επηρεάζει άμεσα τα επίπεδα λεπτίνης στον μητρικό ορό, είναι πιθανό η επίδραση της να είναι έμμεση καθώς βρέθηκε να είναι σημαντικά αυξημένη (3 – 5 φορές) σε πλακούντες διαβητικών γυναικών, οι οποίες ήταν υπό αγωγή με ινσουλίνη [251]. Ο πλακούντας περιέχει μεγάλα ποσά υποδοχέων της ινσουλίνης και ανταποκρίνεται στην υπερινσουλιναίμια με αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης. Στην παραπάνω μελέτη, μολονότι τα νεογνά είχαν φυσιολογικό βάρος, η γλυκόζη ορού ήταν φυσιολογική και η ινσουλίνη αυξημένη. Δεδομένου ότι η ινσουλίνη εμφανίζει λιπογόνο δράση προτάθηκε η άποψη ότι η αύξηση της πλακουντιακής λεπτίνης αντιστάθμισε την λιπογόνο δράση της ινσουλίνης αναστέλλοντας την αύξηση του σωματικού λίπους.

Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η πλακουντιακή λεπτίνη εμφανίζει αυτοκρινή ή / και παρακρινή δράση στη λειτουργία του πλακούντα ενώ θα μπορούσε να λειτουργήσει ως ρυθμιστής του σωματικού λίπους στο έμβryo. Σε μια οντογενετική ανάλυση,

αποδείχτηκε ότι η λεπτίνη ανιχνεύεται στο αίμα του ομφάλιου λώρου την 18^η εβδομάδα [252,253], ενώ σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε την 34^η εβδομάδα. Το εύρημα αυτό είναι σύμφωνο με την έναρξη της ανάπτυξης του λιπώδους ιστού στο 2^ο τρίμηνο της κύησης και της αντιπροσωπευτικής αύξησής του τις τελευταίες εβδομάδες.

Τα επίπεδα της λεπτίνης στα νεογνά σχετίζονται με τη μάζα του λιπώδους ιστού, αλλά όχι με τα επίπεδα λεπτίνης στο μητρικό ορό, υποδηλώνοντας ότι η εμβρυϊκή σύνθεση και έκκριση της λεπτίνης θα μπορούσε να είναι ανεξάρτητη από της μητέρας [253]. Η συγκέντρωση της λεπτίνης είναι μικρότερη στα νεογνά που έχουν μικρό βάρος για την ηλικία κύησης (SGA), και σημαντικά μεγαλύτερη στα μεγάλου βάρους νεογνά (LGA) σε σχέση με τα κανονικού βάρους νεογνά για την ηλικία κύησης (AGA), μέσα στις πρώτες ώρες της ζωής [254 - 256]. Στη συνέχεια και μέχρι τις πρώτες 48 ώρες, τα επίπεδα της λεπτίνης μειώνονται τόσο στα LGA όσο και στα AGA νεογνά, όχι όμως και στα SGA νεογνά. Μετά το χρονικό αυτό διάστημα, η λεπτίνη ορού παραμένει σε συγκρίσιμες τιμές και στις τρεις ομάδες νεογνών [254,255]. Μια πιθανή εξήγηση της μείωσης της λεπτίνης, είναι ότι η μείωση αυτή αποτελεί ένα ερέθισμα για την αύξηση της όρεξης και την έναρξη της σίτισης [255]. Εάν η λεπτίνη αντανακλά απλά τις αλλαγές των λιποαποθηκών ή έχει ένα πιο σύνθετο ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι άγνωστο προς το παρόν.

Τέλος, πρόσφατα δεδομένα από in vitro μελέτες, έδειξαν ότι η λεπτίνη εμπλέκεται σε πρώιμα στάδια της αναπαραγωγικής διαδικασίας, όπως αυτά της διείσδυσης της τροφοβλάστης και της εμφύτευσης της βλαστοκύστης. Σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων από ανθρώπινους πλακούντες κύησης του 1^{ου} τριμήνου, η λεπτίνη διεγείρει την έκκριση διαφόρων γλυκοπρωτεϊνών του εξωκυττάριου σκελετικού δικτύου, οι οποίες μετέχουν στην πρωτεόλυση (μεταλλοπρωτεϊνάσες-MMP-2) και στην κυτταρική προσκόλληση (ιντεγκρίνες), διαδικασιών ουσιαστικής σημασίας για την εμφύτευση της βλαστοκύστης [257]. Επιπλέον, η οιστραδιόλη, και η ιντερλευκίνη IL-1β η οποία αυξάνει την υποδεκτικότητα του ενδομητρίου, βρέθηκε ότι διεγείρουν την έκκριση της λεπτίνης σε επώαση ανθρώπινων βλαστοκύστεων, ενώ η IL-1β εμφανίζει παρόμοια δράση και in vivo σε ανθρώπους [258,259]. Από την άλλη μεριά, μολονότι η έκκριση λεπτίνης αυξάνεται ύστερα από επώαση ανθρώπινων βλαστοκύστεων, η συγκαλλιέργεια των τελευταίων με επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της έκκρισης της λεπτίνης, υποδηλώνοντας μια παρακρινική ή / και αυτοκρινική ρύθμιση της έκκρισης της κατά την διάρκεια της εμφύτευσης [260,261].

Παρά τις ενδιαφέρουσες αυτές παρατηρήσεις ο φυσιολογικός ρόλος της λεπτίνης στην ανθρώπινη κύηση δεν είναι ξεκάθαρος. Γεγονός είναι, ότι θα περίμενε κανείς μειωμένα

επίπεδα λεπτίνης στην κύηση καθώς η τελευταία συνοδεύεται από αυξημένες μεταβολικές απαιτήσεις. Παρά τα αυξημένα όμως επίπεδα της λεπτίνης, η αντιορεξιογόνος δράση της δεν εμφανίζεται στην κύηση, υποδηλώνοντας μια μορφή αντίστασης στην δράση της. Ενώ λοιπόν στην παχυσαρκία η λεπτινοαντίσταση δεν είναι επιθυμητή, στην κύηση είναι τελεολογικά σκόπιμη. Από την άλλη μεριά, δεν αποκλείεται τα αυξημένα επίπεδα της λεπτίνης να έχουν ειδική σημασία για την αναπαραγωγή και όχι για τον μεταβολισμό.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η λεπτίνη δεν φαίνεται να είναι αναγκαία για την κύηση στους γενετικά παχύσαρκους ποντικούς (ob /ob), στους οποίους ο ρόλος της λεπτίνης διερευνήθηκε με το ζευγάριωμα θηλυκών και αρσενικών ob/ob ποντικών, τα οποία θεραπεύτηκαν αρχικά με λεπτίνη και στη συνέχεια η χορήγηση λεπτίνης διακόπτονταν σε διαφορετικά διαστήματα μετά την γονιμοποίηση. Κατά αυτόν τον τρόπο, δημιουργήθηκε ένα μοντέλο κύησης με διαφορετικά διαστήματα απουσίας της κυκλοφορούσας λεπτίνης και στην μητέρα και στο έμβρυο [262]. Στις μελέτες αυτές βρέθηκε ότι η απουσία της λεπτίνης δεν εμποδίζει την εμφύτευση και την ανάπτυξη του εμβρύου, όπως επίσης την κύηση ή τον τοκετό.

Παρόλα αυτά, η σύγκριση μεταξύ ανθρώπων και τρωκτικών δεν είναι εύκολη. Εξάλλου, στα τρωκτικά η υπερέκκριση της λεπτίνης προέρχεται κυρίως από τον λιπώδη ιστό, ενώ στους ανθρώπους σημαντικό μέρος προέρχεται από τον πλακούντα. Επομένως, χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να αποσαφηνισθεί ο φυσιολογικός ή / και ο παθολογικός ρόλος της λεπτίνης στην ανθρώπινη κύηση.

7.4. ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Τα επίπεδα της λεπτίνης εμφανίζουν διακύμανση κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Συγκεκριμένα, αυξάνονται κατά τη διάρκεια της μέσης προς όψιμης ωοθυλακικής φάσης, ακολουθεί περαιτέρω αύξηση κατά την ωχρινικής φάση, ενώ αρχίζουν να μειώνονται στο τέλος της όψιμης ωχρινικής φάσης και επανέρχονται στα βασικά επίπεδα με την έλευση της εμμηνορρυσίας. Η αύξηση αυτή των επιπέδων της λεπτίνης συσχετίστηκε θετικά με διάφορες ορμόνες του γεννητικού κύκλου, όπως της LH [263], της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης [264] ή μόνο της προγεστερόνης [238].

Σε μία μελέτη όπου διερευνήθηκε η διακύμανση των επιπέδων της λεπτίνης στην ωοθυλακική φάση σε φυσιολογικούς κύκλους καθώς και σε κύκλους όπου χορηγήθηκε εξωγενώς FSH [102], βρέθηκε ότι στους φυσιολογικούς κύκλους η λεπτίνη μειώνεται σταδιακά στην πρώιμη ωοθυλακική φάση (3^η –7^η ημέρα), ενώ στη συνέχεια ακολουθεί

αύξηση μέχρι την 10^η ημέρα με παράλληλη αύξηση της οιστραδιόλης. Από την άλλη μεριά, η εξωγενής χορήγηση FSH από την 2^η ημέρα της ωοθυλακικής φάσης, είχε ως αποτέλεσμα όχι μόνο την αποτροπή της σταδιακής μείωσης της λεπτίνης που παρατηρήθηκε στους φυσιολογικούς κύκλους, αλλά και την περαιτέρω αύξηση των επιπέδων της, η οποία συνοδεύτηκε από παράλληλη αύξηση της οιστραδιόλης στο διάστημα αυτό. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η οιστραδιόλη μπορεί να επηρεάζει τα επίπεδα της λεπτίνης στην ωοθυλακική φάση.

Ωστόσο, μελέτες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν διάφορα πρωτόκολλα ωοθηκικής διέγερσης στα πλαίσια εξωσωματικής γονιμοποίησης, παρέχουν αντιφατικά αποτελέσματα. Παρά το γεγονός ότι σε όλες τις μελέτες παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της λεπτίνης κατά την διάρκεια της ωοθηκικής διέγερσης, δεν βρέθηκε κάποια θετική συσχέτιση της αύξησης των επιπέδων της οιστραδιόλης και της λεπτίνης. Αντιθέτως σε μία μελέτη βρέθηκε θετική συσχέτιση των επιπέδων της λεπτίνης και της οιστραδιόλης κατά τη διάρκεια της καταστολής του άξονα [265] όπου τα οιστρογόνα ήταν μειωμένα, εύρημα το οποίο δεν επιβεβαιώθηκε από άλλη μελέτη [266]. Επίσης, σε άλλη μελέτη βρέθηκε σημαντική συσχέτιση των επιπέδων της λεπτίνης και της προγεστερόνης κατά τη διάρκεια της μέγιστης ωοθηκικής διέγερσης [267]. Παρά τις μεμονωμένες συσχετίσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, ο σημαντικότερος παράγοντας συσχέτισης σε όλες τις μελέτες ήταν ο δείκτης μάζας σώματος και το ποσοστό του σωματικού λίπους.

Ο υπεύθυνος μηχανισμός αύξησης της λεπτίνης κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου δεν είναι ξεκάθαρος. Τα παραπάνω ευρήματα υποδηλώνουν ότι η οιστραδιόλη πιθανόν να ασκεί σε κάποιο βαθμό διεγερτική δράση στην έκκριση της λεπτίνης, άποψη η οποία ενισχύεται από το γεγονός ότι η οιστραδιόλη έχει βρεθεί ότι διεγείρει την έκκριση της λεπτίνης *in vitro* σε καλλιέργειες ανθρώπινων λιποκυττάρων [98,99] καθώς επίσης σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες σε πειραματόζωα [100,101,143]. Δεδομένου ότι σε ορισμένες μελέτες βρέθηκε θετική συσχέτιση της αύξησης των επιπέδων της λεπτίνης και της προγεστερόνης στην ωχρινική φάση, προτάθηκε η άποψη ότι η διεγερτική δράση της οιστραδιόλης στην ωοθυλακική φάση επαυξάνεται στη συνέχεια από την προγεστερόνη στην ωχρινική φάση [238].

Η συσχέτιση της LH με τη λεπτίνη υποστηρίχθηκε από μελέτη η οποία έδειξε ότι η κατά ώσεις έκκριση των δυο ορμονών είναι σύγχρονη στη διάρκεια της μέσης προς όψιμης ωοθυλακικής φάσης [200]. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η νυκτερινή αύξηση της λεπτίνης συνοδεύεται από εμφανή αλλαγή της κατά ώσεις έκκρισης της LH, από μεγαλύτερης συχνότητας και μικρότερης έντασης ώσεις κατά τη διάρκεια της ημέρας, και μικρότερης

συχνότητας και μεγαλύτερης έντασης κατά την διάρκεια της νύκτας. Σύγχρονη έκκριση αλλά σε μικρότερο βαθμό, βρέθηκε μεταξύ λεπτίνης και οιστραδιόλης. Τα ευρήματα αυτά, οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η νυκτερινή αύξηση της λεπτίνης θα μπορούσε να συμβάλει στις αλλαγές της κατά ώσεις έκκρισης της LH που παρατηρούνται στη φάση του κύκλου η οποία προηγείται της ωορρηξίας .

Μια άλλη πιθανή εξήγηση της αύξησης της λεπτίνης στην ωχρινική φάση θα μπορούσε να είναι η αύξηση της πρόσληψης των θερμίδων, καθώς έχει αναφερθεί ότι η πρόσληψη θερμίδων είναι μεγαλύτερη στην ωρινική φάση [268]. Ωστόσο, μία πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η πρόσληψη τροφής και ο βασικός μεταβολισμός δεν παρουσιάζουν σημαντικές αλλαγές κατά τη διάρκεια του κύκλου [269] .

Η φυσιολογική σημασία της διακύμανσης των επιπέδων της λεπτίνης κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου δεν έχει ακόμη αποσαφηνισθεί. Μια πιθανή τελεολογική εξήγηση είναι, ότι η ορμόνη αυτή πληροφορεί τον υποθάλαμο για τις αυξημένες μεταβολικές απαιτήσεις μιας πιθανής κύησης [264]. Η παραπάνω άποψη ενισχύεται από πρόσφατα δεδομένα που έδειξαν ότι η έκφραση του mRNA του υποδοχέα της λεπτίνης εμφανίζει χαμηλή έκφραση στην πρόωμη παραγωγική φάση του ενδομητρίου, αυξάνει βαθμιαία κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης και εμφανίζει την υψηλότερη έκφραση στην πρόωμη εκκριτική φάση [270]. Εάν οι παραπάνω μεταβολές σηματοδοτούν διεργασίες που σχετίζονται με την αναπαραγωγή και όχι με τον μεταβολισμό, είναι ένα ερώτημα υπό διερεύνηση.

7.5. ΛΕΠΤΙΝΗ ΚΑΙ ΩΟΘΗΚΙΚΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

Υποδοχείς της λεπτίνης έχουν βρεθεί τόσο στα κοκκώδη κύτταρα όσο και στα κύτταρα της θήκης των ανθρώπινων ωοθυλακίων, και οι βραχείες μορφές παρουσιάζουν μεγαλύτερη έκφραση σε σύγκριση με την μακρά μορφή [271]. Το mRNA της λεπτίνης καθώς και η πρωτεΐνη έχουν επίσης ανιχνευθεί στα παραπάνω κύτταρα [272], υποδηλώνοντας ότι η λεπτίνη εκκρίνεται από την ωοθήκη. Ενώ η δράση της λεπτίνης είναι διεγερτική στην έκκριση των γοναδοτροπινών, οι άμεσες δράσεις της στην ωοθηκική στεροειδογένεση μπορεί να είναι είτε διεγερτικές είτε ανασταλτικές.

Σε πειράματα που έγιναν *in vitro*, η δράση της λεπτίνης στην ωοθηκική στεροειδογένεση φαίνεται να εξαρτάται από την παρουσία της LH . Σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων από ανθρώπινα ωοθυλάκια, η λεπτίνη αναστέλλει την έκκριση οιστραδιόλης που επάγεται από την LH, ενώ δεν εμφανίζει καμία δράση στην έκκριση της οιστραδιόλης απουσία της LH

[271]. Η συγκέντρωση της λεπτίνης που χρησιμοποιήθηκε στην παραπάνω μελέτη ήταν της τάξης των 100 ng/ml, συγκέντρωση η οποία ανευρίσκεται σε παχύσαρκα άτομα . Παρόμοια μελέτη σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων [273], έδειξε ότι η λεπτίνη δεν είχε καμία επίδραση στη βασική έκκριση της οιστραδιόλης ανεξάρτητα από την παρουσία της FSH, ενώ προκάλεσε μια δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συνεργιστικής δράσης της FSH και του IGF-1 στην έκκριση της οιστραδιόλης. Σημαντική αναστολή της συνεργιστικής δράσης επιτεύχθηκε με συγκεντρώσεις της λεπτίνης παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται σε φυσιολογικά άτομα, ενώ πλήρης αναστολή σημειώθηκε με συγκεντρώσεις της τάξης των 100 ng/ml (επίπεδα παχύσαρκων ατόμων). Στην ίδια μελέτη, σε καλλιέργειες κυττάρων της θήκης των ωοθυλακίων (περιοχή παραγωγής των ανδρογόνων), η λεπτίνη ανέστειλε με δοσοεξαρτώμενο επίσης τρόπο την ευοδωτική δράση του IGF-1 στην έκκριση της ανδροστενδιόνης, η οποία προηγουμένως είχε διεγερθεί από την LH .

Επίσης, η λεπτίνη έχει βρεθεί να επηρεάζει αρνητικά την ινσουλίνη ως προς την ικανότητά της να διεγείρει την ωθηκική στεροειδογένεση [274]. Σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων από μικρά (1-5mm) και μεγάλα (> 8mm) ωοθυλάκια βοοειδών, η προσθήκη λεπτίνης σε υπερφυσιολογικές συγκεντρώσεις (100-300 ng/ml) προκάλεσε σημαντική αναστολή της στεροειδογένεσης, η οποία προηγουμένως είχε διεγερθεί από την ινσουλίνη, ενώ φυσιολογικές συγκεντρώσεις προκάλεσαν μικρότερη αναστολή. Αντιθέτως, η λεπτίνη δεν επηρέασε την αύξηση του πολλαπλασιασμού των κοκκωδών κυττάρων την οποία είχε προηγουμένως διεγείρει η ινσουλίνη, υποδηλώνοντας ότι η λεπτίνη δεν έχει καμία επίδραση στην μιτογόνο δράση της ινσουλίνης. Παρόμοια ευρήματα βρέθηκαν και σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων από ανθρώπινα ωοθυλάκια τα οποία πάρθηκαν μετά από ωοληψία στα πλαίσια εξωσωματικής γονιμοποίησης [275]. Η λεπτίνη παρουσία της ινσουλίνης, προκάλεσε δοσοεξαρτώμενη αναστολή της έκκρισης της προγεστερόνης, η οποία προηγουμένως είχε διεγερθεί από την χοριακή γοναδοτροπίνη, δράση όμως η οποία δεν εμφανίστηκε απουσία της ινσουλίνης .

Ωστόσο, σε άλλες μελέτες βρέθηκε ότι η λεπτίνη εμφανίζει διεγερτική δράση στην ωθηκική στεροειδογένεση. Η χορήγηση λεπτίνης στους γενετικά παχύσαρκους ποντικούς (ob/ob), είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης του mRNA της 17-α υδροξυλάσης, ένζυμο το οποίο καταλύει τα πρόδρομα στάδια της βιοσυνθετικής οδού των στεροειδών στην ωοθήκη [276]. Επιπλέον, η προσθήκη λεπτίνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις (1 ng/ml) σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων από ανθρώπινα προωορρηκτικά ωοθυλάκια, προκάλεσε αύξηση της έκκρισης οιστραδιόλης, με παράλληλη αύξηση της αρωματάσης (P450), ένζυμο που καταλύει την αρωματοποίηση των ανδρογόνων [277]. Παρόμοια δράση, αλλά σε

υψηλές συγκεντρώσεις, εμφάνισε επίσης η λεπτίνη, σε καλλιέργειες λιποκυττάρων από φυσιολογικές γυναίκες [278].

Φαίνεται λοιπόν, ότι διάφοροι αυτοκρινικοί και παρακρινικοί μηχανισμοί υπεισέρχονται στη ρύθμιση της έκκρισης της λεπτίνης στην ωοθήκη. Είναι γνωστό ότι η ανάπτυξη και η ωρίμανση των ωοθυλακίων ρυθμίζεται από σύνθετους αυτοκρινικούς και παρακρινικούς μηχανισμούς [279]. Ο προσομοιάζων με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας (IGF-1) ο οποίος παράγεται από τα κύτταρα της θήκης, διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην ωοθηκική στεροειδογένεση. Στα κύτταρα της θήκης ασκεί μία αυτοκρινική δράση επαυξάνοντας την έκκριση των ανδρογόνων η οποία επάγεται από την LH . Στα κοκκώδη κύτταρα ασκεί μία παρακρινική δράση επαυξάνοντας την παραγωγή της προγεστερόνης παρουσία της LH, ενώ παράλληλα διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων. Σε συνεργασία με την FSH διεγείρει την αρωματοποίηση των ανδρογόνων στα κοκκώδη κύτταρα, αυξάνοντας έτσι την παραγωγή των οιστρογόνων.

Δεδομένου ότι η λεπτίνη εμφάνισε ανασταλτική δράση στην ωοθηκική στεροειδογένεση in vitro, προτάθηκε η άποψη ότι η ορμόνη αυτή σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλεί εχθρικό περιβάλλον (αντιοιστρογονικό) για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, ενώ η μείωση των επιπέδων της οιστραδιόλης θα μπορούσε να αποτελέσει ανεπαρκές ερέθισμα για την έκλυση του προωρρηκτικού κύματος της LH [273].

Ένας τέτοιος μηχανισμός θα μπορούσε να υπεισέρχεται στη παθοφυσιολογία του PCOS, καθώς όπως αρχικά είχε βρεθεί, ένα ποσοστό γυναικών με PCOS (29%) παρουσίαζε αυξημένα επίπεδα λεπτίνης σε σχέση με αυτά που αναμένονταν με βάση τον δείκτη μάζας σώματος, εύρημα το οποίο ωστόσο δεν επιβεβαιώθηκε από μεταγενέστερες μελέτες.

Οι παραπάνω απόψεις υποστηρίζονται από πρόσφατη μελέτη, η οποία έδειξε ότι τα χαμηλά επίπεδα λεπτίνης του ωοθυλακικού υγρού αποτελούν προγνωστικό παράγοντα επιτυχούς έκβασης κατά την διάρκεια εξωσωματικής γονιμοποίησης [280]. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι φυσιολογικές γυναίκες οι οποίες πέτυχαν εγκυμοσύνη μετά από 3 κύκλους θεραπείας, είχαν χαμηλότερα επίπεδα λεπτίνης στο ωοθυλακικό υγρό σε σύγκριση με τις γυναίκες που απέτυχαν να κυοφορήσουν στο ίδιο διάστημα θεραπείας, ακόμη και όταν τα επίπεδα της λεπτίνης προσαρμόστηκαν βάση την ηλικία και τον δείκτη μάζας σώματος. Ομοίως, γυναίκες με PCOS οι οποίες πέτυχαν εγκυμοσύνη είχαν χαμηλότερα επίπεδα λεπτίνης στο ωοθυλακικό υγρό, σε σύγκριση με τις γυναίκες με το ίδιο σύνδρομο οι οποίες απέτυχαν να κυοφορήσουν. Ωστόσο, κάποια συσχέτιση μεταξύ οιστραδιόλης πλάσματος και λεπτίνης πλάσματος ή ωοθυλακικού υγρού δεν βρέθηκε, ενώ επισημάνθηκε το γεγονός ότι η μέτρηση της

οιστραδιόλης του ωοθυλακικού υγρού ίσως αποτελέσει ένα πιο αξιόπιστο δείκτη για τον συσχετισμό των δύο ορμονών σε μελλοντικές έρευνες.

Τα ευρήματα σχετικά με τη δράση της λεπτίνης περιπλέκονται ακόμη περισσότερο από μία πρόσφατη μελέτη [281] σε πειραματόζωα, η οποία σε αντίθεση με τις μέχρι τώρα *in vitro* μελέτες, έδειξε ότι η λεπτίνη προκαλεί μείωση των ωοθυλακίων που υφίστανται ρήξη τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, χωρίς παράλληλα να επηρεάζει την στεροειδογένεση. Συγκεκριμένα, ομάδα αρουραίων προηβικής ηλικίας (21-28 ημερών), οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ωοθηκική διέγερση και πρόκληση ωοθυλακιόρρηξιας (με FSH για 3 ημέρες και χοριακή γοναδοτροπίνη για πρόκληση ωορρηξίας), παρουσίασαν αύξηση του αριθμού των ωοθυλακίων που υπέστησαν ρήξη, ενώ στην ομάδα όπου συγχορηγήθηκε λεπτίνη 1 ημέρα πριν την ωοθυλακιόρρηξια σε δόσεις ώστε να επιτευχθούν συγκεντρώσεις στα ανώτερα φυσιολογικά επίπεδα, ο αριθμός των ραγέντων ωοθυλακίων μειώθηκε σημαντικά . Η ιστολογική εξέταση των ωοθυλακίων πριν και μετά την ωοθυλακιόρρηξια, έδειξε ότι η λεπτίνη δεν επηρέασε τον αριθμό των ωοθυλακίων που στρατολογούνται στο προωρρηκτικό στάδιο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και *in vitro*, όπου έγινε έγχυση λεπτίνης σε ωοθήκες αρουραίων στους οποίους χορηγήθηκε χοριακή γοναδοτροπίνη 2 ημέρες πριν την ωοθηκεκτομία, έτσι ώστε να επιταχυνθεί η ανάπτυξη και η ωρίμανση των ωοθυλακίων. Ωοθήκες στις οποίες έγινε έγχυση λεπτίνης και LH παρουσίασαν μικρότερο αριθμό ραγέντων ωοθυλακίων, σε σύγκριση με τις ωοθήκες στις οποίες η έγχυση αφορούσε μόνο την LH. Αντιθέτως, η χορήγηση της λεπτίνης πριν την ωοθυλακιόρρηξια, δεν επηρέασε τα επίπεδα της προγεστερόνης ενώ τα επίπεδα της οιστραδιόλης ήταν κάτω από την ευαισθησία της μεθόδου. Ομοίως *in vitro*, η έγχυση λεπτίνης σε ωοθηκικό ιστό, δεν μετέβαλε την έκκριση της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης η οποία είχε προηγουμένως διεγερθεί από την LH. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε και μια ομάδα αρουραίων οι οποίοι υποβλήθηκαν σε ωοθηκική διέγερση και πρόκληση ωοθυλακιόρρηξιας, αλλά διατρέφονταν με την ίδια ποσότητα τροφής με αυτή των αρουραίων στους οποίους χορηγήθηκε λεπτίνη, δεδομένου ότι η λεπτίνη προκάλεσε μείωση της πρόσληψης τροφής στην ομάδα αυτή. Τα αποτελέσματα της ωοθυλακιόρρηξιας στην ομάδα αυτή, ήταν παρόμοια με αυτά της ομάδας όπου χορηγήθηκε FSH-χοριακή γοναδοτροπίνη, υποδηλώνοντας ότι το ανασταλτικό αποτέλεσμα στην ωορρηξία οφειλόταν στην ίδια την λεπτίνη και όχι στις μεταβολικές συνέπειες της. Μολονότι ο απόλυτος αριθμός των προωρρηκτικών ωοθυλακίων δεν μειώθηκε, ο αριθμός των ωοθυλακίων που υπέστησαν ρήξη μειώθηκε σημαντικά. Στην προσπάθεια να εξηγηθεί το παραπάνω εύρημα προτάθηκε η άποψη ότι η λεπτίνη εμπλέκεται στο μηχανισμό της ρήξης του

ωοθυλακίου, καθώς η αρχική υπόθεση ότι τα ωάρια θα μπορούσαν να είχαν παγιδευτεί στα ωοθυλάκια δεν αποδείχτηκε ιστολογικά .

Διαφορετική προσέγγιση στη δράση της λεπτίνης προέρχεται από μελέτες σε διαγονιδιακά τρωκτικά (ποντικοί) τα οποία υπερεκφράζουν τη λεπτίνη από τη γεννησή τους [282]. Διαγονιδιακά τρωκτικά προκύπτουν από την εισαγωγή σε γονιμοποιημένα ωάρια ποντικών, συμπληρωματικού DNA του γονιδίου της λεπτίνης κατόπιν ενσωμάτωσης ειδικού υποκινητή (promoter) ώστε η λεπτίνη να εκφράζεται αποκλειστικά στο ήπαρ. Τα τρωκτικά αυτά εκφράζουν την λεπτίνη ανάλογα με τον αριθμό των αντιγράφων του DNA που έχουν εισαχθεί, και τα επίπεδα της ορμόνης στο πλάσμα δεν μεταβάλλονται με την πρόοδο της ηλικίας . Σε ένα τέτοιο μοντέλο στο οποίο επιτεύχθηκε υψηλή έκφραση της λεπτίνης (επίπεδα ορού 66,4-96,4ng/ml), παρατηρήθηκε ότι εμφανίζεται πρόωμη ήβη, και η γονιμότητα μολονότι παρέμεινε ανέπαφη για ένα διάστημα, σε μεγαλύτερες ηλικίες εμφανίστηκε υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός. Τα επίπεδα της GnRH παρουσίασαν μείωση στα εκχυλίσματα υλικού υποθαλαμικού ιστού, ενώ το προωορρηκτικό κύμα της LH καθώς και η απάντηση της τελευταίας στην εξωγενή χορήγηση GnRH παρουσίασαν σημαντική μείωση. Η δυσλειτουργία του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-γονάδες δεν ήταν αποτέλεσμα της μεταβολικής δράσης της λεπτίνης καθώς δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στα επίπεδα τόσο της ACTH όσο και των θυροειδικών ορμονών. Στα τρωκτικά αυτά παρατηρήθηκε ατροφία των ωοθηκών και μείωση των ωοθυλακίων στο στάδιο εμφάνισης του άντρου. Ωστόσο, η χορήγηση γοναδοτροπινών είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του βάρους των ωοθηκών ενώ η ανάπτυξη των ωοθυλακίων ήταν παρόμοια με την ομάδα ελέγχου. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα, ότι ο υπογοναδισμός που εμφανίστηκε στα τρωκτικά αυτά ήταν αποτέλεσμα υποθαλαμικής δυσλειτουργίας. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η έκπτωση της αναπαραγωγικής λειτουργίας δεν εμφανίστηκε στα αρσενικά τρωκτικά, υποδηλώνοντας φυλετικό διμορφισμό στη δράση της λεπτίνης.

Οι παραπάνω διαπιστώσεις επιβεβαιώνουν παλιότερες παρατηρήσεις που έγιναν σε γενετικά παχύσαρκους ποντικούς (ob/ob), όπου οι ερευνητές αγνοούσαν την ύπαρξη της λεπτίνης. Το 1957, οι Smithberg και Runner [283], χορήγησαν γοναδοτροπίνες σε στείρους ob/ob ποντικούς με αποτέλεσμα τη γονιμοποίηση και την επίτευξη κύησης. Το 1959, ο Lane [284] στην προσπάθεια να εκτιμήσει την απάντηση των ωοθηκών των ob/ob ποντικών στις γοναδοτροπίνες, χρησιμοποίησε ένα παραβιωτικό μοντέλο μεταξύ φυσιολογικών θηλυκών ποντικών που είχαν υποβληθεί σε ωοθηκεκτομία και γενετικά παχύσαρκων ποντικών. Η λογική του πειράματος αυτού βασίστηκε στο γεγονός, ότι η εξάλειψη των οιστρογόνων από τις ωοθήκες των ποντικών που υποβλήθηκαν σε ωοθηκεκτομία, θα οδηγούσε σε υπερέκκριση

γοναδοτροπινών οι οποίες θα περνούσαν στην κυκλοφορία των ob/ob ποντικών. Στα πειράματα αυτά, βρέθηκε ότι η απάντηση των ωοθηκών στις γοναδοτροπίνες στους ob/ob ποντικούς ήταν φυσιολογική παρουσιάζοντας έκκριση οιστρογόνων και αύξηση του μεγέθους των ωοθηκών.

Στους ανθρώπους, έμμεσες ενδείξεις για την αρνητική επίδραση της υπερλεπτιναιμίας σε κεντρικό επίπεδο, προέρχονται από κλινικές μελέτες [285], όπου η εξωγενής χορήγηση αγωνιστών GnRH στη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης συνοδεύτηκε με μείωση της έκκρισης των γοναδοτροπινών παρουσιάζοντας μάλιστα φυλετικό διμορφισμό. Συγκεκριμένα, σε κορίτσια που ολοκλήρωναν την ήβη ή βρισκόταν στο μετεβικό στάδιο, η έκκριση των γοναδοτροπινών μετά από εξωγενή χορήγηση GnRH ήταν μικρότερη στα παχύσαρκα κορίτσια και όσο μεγαλύτερα ήταν τα επίπεδα της λεπτίνης, τόσο μικρότερη ήταν η απάντηση των γοναδοτροπινών στην εξωγενή χορήγηση GnRH. Αντιθέτως, στα αγόρια δεν παρατηρήθηκε κάποια αξιοσημείωτη συσχέτιση .

Είναι πιθανό η χρόνια υπερλεπτιναιμία να προκαλεί απευαισθητοποίηση των υποδοχέων της, με αποτέλεσμα την ανεπαρκή μετάδοση του σήματος στους νευρώνες που παράγουν GnRH στον υποθάλαμο.

Οι απόψεις που υπάρχουν για την δράση των οιστρογόνων στην έκκριση της λεπτίνης είναι επίσης αντικρουόμενες. *In vitro* μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η οιστραδιόλη διεγείρει την έκκριση λεπτίνης τόσο σε λιποκύτταρα θηλυκών όσο και αρσενικών τρωκτικών, παρουσιάζοντας μάλιστα αθροιστικό αποτέλεσμα όταν συγχορηγείται με δεξαμεθαζόνη [100]. Αντιθέτως, η οιστρόνη και η προγεστερόνη δεν βρέθηκε να επηρεάζουν την έκκριση της λεπτίνης. Σε αντίθεση με τα τρωκτικά, *in vitro* μελέτες σε ανθρώπους έδειξαν ότι η οιστραδιόλη διεγείρει την έκκριση λεπτίνης μόνο σε λιποκύτταρα γυναικών, ενώ ομοίως η προγεστερόνη δεν επηρεάζει την έκκριση της λεπτίνης [98,99]. Άλλα στοιχεία που ενισχύουν την άποψη για τη διεγερτική δράση της οιστραδιόλης στην έκκριση της λεπτίνης είναι η μείωση της έκφρασης του mRNA του γονιδίου της λεπτίνης στο λιπώδη ιστό ύστερα από ωοθηκεκτομία, η μείωση των επιπέδων της λεπτίνης στο πλάσμα των αρουραίων που υποβλήθηκαν στην ωοθηκεκτομία, και η αποκατάσταση των επιπέδων της λεπτίνης στα φυσιολογικά ύστερα από χορήγηση οιστραδιόλης [101,286]. Ωστόσο, σε άλλες μελέτες δεν επιβεβαιώθηκαν τα παραπάνω ευρήματα και βρέθηκε ότι τα επίπεδα της λεπτίνης δεν μεταβάλλονται από την ωοθηκεκτομία [287,288], ενώ αντιθέτως η χορήγηση οιστραδιόλης προκάλεσε μείωση των επιπέδων της λεπτίνης η οποία αποδόθηκε στη λιπολυτική δράση της οιστραδιόλης [287]. Επιπλέον, όταν τα επίπεδα της λεπτίνης συσχετίστηκαν με το μειωμένο σωματικό λίπος, φάνηκε ότι η οιστραδιόλη δεν επηρεάζει τα επίπεδα της λεπτίνης [287]. Σε

ό,τι αφορά στην τεστοστερόνη, υπάρχει ομοφωνία για την ανασταλτική δράση της στην έκκριση της λεπτίνης, τόσο στα τρωκτικά όσο και στους ανθρώπους. Έχει βρεθεί ότι οι εμμηνοπαυσιακές γυναίκες παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα λεπτίνης σε σύγκριση με τις προεμμηνοπαυσιακές [101]. Ωστόσο, η χορήγηση ορμονικής θεραπείας υποκατάστασης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες δεν αυξάνει τα επίπεδα της λεπτίνης στον ορό, ενώ η χορήγηση αντισυλληπτικών δισκίων δεν μεταβάλλει τα επίπεδα της λεπτίνης σε γυναίκες αναπαραγωγικής ηλικίας [289,290,291]. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, διάφοροι ερευνητές πρότειναν την άποψη ότι οι συγκεντρώσεις των οιστρογόνων στα αντισυλληπτικά δισκία δεν ήταν αρκετές να διεγείρουν την έκκριση της οιστραδιόλης, δεδομένου ότι σε προγράμματα εξωσωματικής γονιμοποίησης παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων της λεπτίνης κατά τη διάρκεια της ωθηκικής διέγερσης. Παρόλα αυτά, δεν βρέθηκε από όλους θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της λεπτίνης και της οιστραδιόλης.

Συνοψίζοντας, μολονότι η δράση της λεπτίνης έχει μελετηθεί διεξοδικά, ο φυσιολογικός της ρόλος στην αναπαραγωγική λειτουργία δεν έχει πλήρως διευκρινισθεί. Η αδυναμία φαρμακολογικής παρέμβασης στους ανθρώπους προς το παρόν, δεν επιτρέπει την εξαγωγή σαφών συμπερασμάτων για τη δράση της, από μελέτες αιτίου – αποτελέσματος. Από την άλλη μεριά, χρειάζεται περισσότερη έρευνα για την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν την δράση της λεπτίνης στα διάφορα επίπεδα του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – γονάδες.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΥΠΑΡΧΟΥΣΑ ΓΝΩΣΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η άποψη ότι η αναπαραγωγική λειτουργία εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από διατροφικές ή μεταβολικές καταστάσεις που σχετίζονται με την πρόσληψη της τροφής, είναι κοινώς αποδεκτή τόσο στον άνθρωπο όσο και σε μοντέλα πειραματοζώων. Ο λόγος για την συσχέτιση αυτή μεταξύ σωματικού βάρους και αναπαραγωγής, είναι ότι η κύηση και η γαλουχία απαιτούν υψηλή κατανάλωση ενέργειας για την διατήρηση ενός βιώσιμου νεογνού. Έτσι, από τελεολογικής πλευράς θα ήταν σκόπιμο η εμμηναρχή να συμβεί μόνο όταν η έφηβη θα είχε αποκτήσει μια κριτική μάζα σωματικού λίπους.

Η λεπτίνη αποτελεί ένα συνδετικό κρίκο μεταξύ λιπώδη ιστού και υποθάλαμου καθώς πληροφορεί τον υποθάλαμο ότι τα ενεργειακά αποθέματα είναι επαρκή για να φέρουν σε πέρας μία κύηση. Από την άλλη πλευρά, η παχυσαρκία είναι γνωστό ότι συνοδεύεται από ελάττωση της αναπαραγωγικής λειτουργίας λόγω διαταραχής στην έκκριση των γοναδοτροπινών. Γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών εμφανίζουν παχυσαρκία σε σημαντικό ποσοστό, ενώ στις συνυπάρχουσες ενδοκρινικές διαταραχές περιλαμβάνονται τα υψηλότερα επίπεδα της LH, η ινσουλινοαντοχή, η υπερινσουλιναμία και η υπερανδρογοναιμία. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μοιλονότι οι απόψεις που υπάρχουν για το ρόλο της λεπτίνης στη παθοφυσιολογία του συνδρόμου αυτού είναι αντικρουόμενες, δεδομένα από πρόσφατες μελέτες ενισχύουν την αρχική θεωρία ότι η συνυπάρχουσα υπερλεπτιναμία σε υποομάδα γυναικών με PCOS είναι πιθανό να προκαλεί απευαισθητοποίηση των υποδοχέων της λεπτίνης στον υποθάλαμο και επακόλουθη μείωση της δράσης της στους GnRH νευρώνες.

Μία πιθανή συσχέτιση μεταξύ οιστραδιόλης και λεπτίνης έχει πρόσφατα διερευνηθεί σε πειραματόζωα τα οποία υποβλήθηκαν σε ωοθηκεκτομία, η οποία προκάλεσε μείωση της λεπτίνης στον ορό καθώς και της έκφρασης του γονιδίου της σε ορισμένες περιοχές του λιπώδη ιστού. Οι αλλαγές αυτές αποκαταστάθηκαν από τη χορήγηση οιστραδιόλης. Στους ανθρώπους, χαμηλότερα επίπεδα της λεπτίνης έχουν βρεθεί σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες συγκρινόμενες με τις προεμμηνοπαυσιακές, ενώ κατά την διάρκεια του εμμηνορυσιακού κύκλου τα επίπεδα της είναι υψηλότερα στην ωχρινική φάση.

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να εξετάσει περαιτέρω τη σχέση μεταξύ ωοθηκικών στεροειδών και λεπτίνης σε φυσιολογικές γυναίκες και να απαντήσει στα παρακάτω ερωτήματα:

1. Εάν υπάρχουν αλλαγές στα επίπεδα της λεπτίνης μετά από λαπαροτομία και κατά πόσο αυτές επηρεάζονται από την ταυτόχρονη εκτέλεση αμφοτερόπλευρης ωοθηκτομίας.

2. Εάν και κατά πόσο μία ακολουθία γεγονότων με την έννοια των αλλαγών της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης (χορηγούμενων εξωγενώς), και που ομοιάζουν με αυτές που συμβαίνουν στο φυσιολογικό κύκλο, μπορούν να επηρεάσουν την έκκριση της λεπτίνης κατά τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου.

2. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Ασθενείς που μελετήθηκαν

Μελετήθηκαν συνολικά 41 γυναίκες, ηλικίας 38-46 ετών οι οποίες προήλθαν από το εξωτερικά Ιατρεία της Μαιευτικής/Γυναικολογικής και της Χειρουργικής Κλινικής του Περιφερειακού, Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Απ' όλες τις γυναίκες λήφθηκε η συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους στην εργασία αυτή, αφού δόθηκαν σχετικές πληροφορίες.

2.2 Σχεδιασμός της μελέτης

Η μελέτη περιελάμβανε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση, διερευνήθηκαν τα επίπεδα της λεπτίνης του ορού σε 20 γυναίκες κατά τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου μετά από λαπαροτομία. Από αυτές, οι 14 υποβλήθηκαν σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων κατά τη διάρκεια της μέσης - όψιμης ωοθυλακικής (7 γυναίκες) και πρώιμης προς μέσης ωχρινικής (7 γυναίκες) φάσης του κύκλου. Οι ανευρεθείσες τιμές συγκρίθηκαν με αυτές που βρέθηκαν σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε χολοκυστεκτομία (ομάδα ελέγχου – 6 γυναίκες).

Στη δεύτερη φάση, 21 γυναίκες διερευνήθηκαν για αλλαγές στα επίπεδα της λεπτίνης μετά από χορήγηση οιστραδιόλης ή συνδυασμού οιστραδιόλης και προγεστερόνης, σε διάφορα στάδια της μετεγχειρητικής περιόδου μετά από κοιλιακή υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων. Οι επεμβάσεις εκτελέστηκαν στη μέση ωοθυλακική φάση του κύκλου (6^η -9^η ημέρα). Οι ανευρεθείσες τιμές συγκρίθηκαν με αυτές της ομάδας ελέγχου (7 γυναίκες) στην οποία δεν χορηγήθηκε ορμονική θεραπεία..

2.3. Κριτήρια εισαγωγής στη μελέτη

Για την εισαγωγή των γυναικών στη μελέτη έπρεπε να πληρούνται τα ακόλουθα κριτήρια:

1. Προεμμηνοπαυσιακή ηλικία.
2. Φυσιολογικό ατομικό αναμνηστικό.
3. Παρουσία και των δύο ωοθηκών.
4. Φυσιολογικός ωοθυλακιόρρηκτικός κύκλος μέσης διάρκειας 24-35 ημερών.
5. Βασική τιμή FSH < 10 IU/L

Σε όλες τις γυναίκες η ωοθυλακιόρρηξία επιβεβαιώθηκε με υπερηχοτομογραφικό έλεγχο και μέτρηση της προγεστερόνης στον ορό πριν την εισαγωγή τους στη μελέτη.

2.4. Φάρμακα που χορηγήθηκαν κατά τη μελέτη και πειραματικές ομάδες

2.4.1. Φάρμακα που χορηγήθηκαν

Κατά τη διάρκεια της 2^{ης} φάσης της μελέτης χορηγήθηκαν τα εξής φάρμακα:

- α) Οιστραδιόλη με αυτοκόλλητο σύστημα διαδερμικής χορήγησης (Estraderm TTS 100 µg/24h ; Novartis, Αθήνα, Ελλάδα)
- β) Προγεστερόνη ενδοκοιλικά (Utrogestan capsules, 100 mg / capsule; Faran, Αθήνα, Ελλάδα)

2.4.2 Ομάδες γυναικών

Α Φάση

Ομάδα 1

Επτά γυναίκες υποβλήθηκαν σε ολική υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη αφαίρεση των ωοθηκών για καλοήθεις παθήσεις των έσω γεννητικών οργάνων, όπως ινομύματα και μηνορραγία. Οι επεμβάσεις έγιναν κατά τη διάρκεια της μέσης-όψιμης ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (όταν η διάμετρος του κυρίαρχου ωοθυλακίου ήταν 15-16mm από τον υπερηχοτομογραφικό έλεγχο)

Ομάδα 2

Επτά γυναίκες υποβλήθηκαν στην ίδια επέμβαση για τους ίδιους λόγους, με τη διαφορά ότι οι επεμβάσεις έγιναν κατά τη διάρκεια της πρώιμης - μέσης ωχρινικής φάσης και συγκεκριμένα 5 ημέρες μετά το προωορρηκτικό κύμα της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH). Το κύμα αυτό ανιχνεύθηκε με καθημερινή μέτρηση της LH στα ούρα χρησιμοποιώντας ειδικά αντιδραστήρια και επιβεβαιώθηκε με 2-3 μετρήσεις στον ορό την ημέρα που η δοκιμασία των ούρων ήταν θετική.

Ομάδα 3

Έξι γυναίκες χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου και υποβλήθηκαν σε ανοικτή χολοκυστεκτομία για καλοήθεις παθήσεις της χοληδόχου κύστης (χολολιθίαση). Οι επεμβάσεις έγιναν κατά τη διάρκεια της πρώιμης - μέσης ωοθυλακικής φάσης (4^η -7^η ημέρα του κύκλου).

B' Φάση

Ομάδα 4 (ομάδα οιστραδιόλης)

Επτά γυναίκες υποβλήθηκαν σε ολική υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη αφαίρεση των ωοθηκών για καλοήθεις παθήσεις των έσω γεννητικών οργάνων όπως ινομύματα και μηνορραγία. Η επέμβαση έγινε στη μέση ωοθυλακική φάση του κύκλου. Οι γυναίκες αυτές έλαβαν οιστραδιόλη διαδερμικώς μέσω τριών αυτοκόλλητων ετικετών (Estraderm TTS 100 μg / 24H). Η πρώτη αυτοκόλλητη ετικέτα διαδερμικής χορήγησης τοποθετήθηκε αμέσως μετά το πέρας της επέμβασης και οι άλλες δύο την 3^η και 6^η μετεγχειρητική ημέρα αντίστοιχα. Η αφαίρεση της τελευταίας ετικέτας γινόταν την ημέρα εξόδου της ασθενούς από την κλινική (7^η ημέρα).

Ομάδα 5 (ομάδα οιστραδιόλης + προγεστερόνης)

Στην ομάδα αυτή επτά γυναίκες που υποβλήθηκαν σε ολική υστερεκτομία και ωοθηκεκτομία στη μέση ωοθυλακική φάση έλαβαν οιστραδιόλη όπως στην ομάδα 4, ενώ επιπροσθέτως χορηγήθηκε προγεστερόνη ενδοκολπικά (Utrogestan caps, 100 mg/caps) από την 2^η έως και την 6^η μετεγχειρητική ημέρα. Η δόση της προγεστερόνης ήταν 200mg τη 2^η ημέρα (100 mg ανά 12ωρο) και εν συνεχεία 300 mg / 24ωρο (100mg ανά 8ωρο). Σκοπός ήταν να επιτευχθούν συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται φυσιολογικά στη μέση προς όψιμη ωοθυλακική και μέση ωχρινική φάση του φυσιολογικού κύκλου αντίστοιχα.

Πληροφορίες σχετικά με τον καθορισμό της δόσης αποκτήθηκαν από πιλοτική μελέτη σε δύο γυναίκες που προσφέρθηκαν εθελοντικά πριν την έναρξη της κύριας μελέτης. Συγκεκριμένα, 2 δοσολογικά σχήματα οιστραδιόλης (50 μg και 100 μg) και 2 δοσολογικά σχήματα προγεστερόνης (100mg και 300mg) δόθηκαν σε κάθε γυναίκα κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης σε δύο κύκλους ως εξής: οιστραδιόλη την 2^η, 5^η, και 8^η ημέρα, και προγεστερόνη την 3^η, 4^η, 5^η, 6^η, και 7^η ημέρα. Η δόση των 50 μg της οιστραδιόλης και η δόση των 100mg της προγεστερόνης προκάλεσαν συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης και προγεστερόνης στον ορό οι οποίες δεν ξεπέρασαν τα επίπεδα των 500 pmol/l και 10 nmol/l αντίστοιχα., ενώ με τις υψηλότερες δόσεις επιτεύχθηκαν συγκεντρώσεις της τάξης των 1000 pmol/l και 20 nmol/l αντίστοιχα.

Ομάδα 6 (ομάδα ελέγχου)

Στην ομάδα αυτή περιελήφθησαν 7 γυναίκες οι οποίες υποβλήθηκαν σε ολική υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη αφαίρεση των ωοθηκών αλλά δεν χορηγήθηκε ορμονική θεραπεία και αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου.

2.5 Καταγραφή στοιχείων – Λήψη δειγμάτων αίματος

Σε όλες τις γυναίκες καταγράφηκαν τα εξής στοιχεία πριν ή/και κατά τη διάρκεια της επέμβασης

- Ηλικία
- Ανάστημα
- Βάρος σώματος πριν την επέμβαση καθώς και καθημερινά από την 4^η μετεγχειρητική ημέρα.
- Δείκτης μάζας σώματος (BMI= Kg / m²)

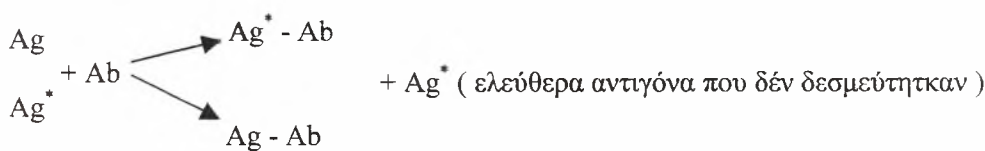
Όλες οι επεμβάσεις εκτελέστηκαν πρωινή ώρα (08.00) και σε περίπτωση που κάποια ασθενής μεταγγιζόταν αποκλειόταν από τη μελέτη. Η μετεγχειρητική πορεία ήταν ομαλή σε όλες τις περιπτώσεις και η έξοδος των ασθενών από την κλινική γινόταν την 7^η ή 8^η μετεγχειρητική ημέρα. Δείγματα φλεβικού αίματος (5 ml) για ορμονικούς προσδιορισμούς, λήφθηκαν από όλες τις γυναίκες σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Την ημέρα της επέμβασης, το 1^ο δείγμα πάρθηκε πριν τη χορήγηση αναισθησίας και το 2^ο δείγμα 12 ώρες μετά την επέμβαση. Ακολούθησε καθημερινή πρωινή λήψη (09.00) δειγμάτων από την 3^η έως και την 7^η μετεγχειρητική ημέρα. Τα αίματα φυγοκεντρήθηκαν μετά τη λήψη και οι οροί μετά το διαχωρισμό τους φυλάσσονταν σε ψυγείο (-20° C) μέχρι τη στιγμή που έγιναν οι μετρήσεις. Η απόψυξη των ορών γινόταν 15 min προ της δοκιμασίας σε θερμοκρασία δωματίου (18-25° C).

3. ΟΡΜΟΝΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

Όλοι οι ορμονικοί προσδιορισμοί έγιναν στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Διευθυντής: Καθηγητής Ορέστης Τσόλας).

3.1. Λεπτίνη

Ο προσδιορισμός της λεπτίνης έγινε με ραδιοανοσοχημική μέθοδο (Radio Immune assay,RIA) χρησιμοποιώντας την εμπορική συσκευασία (Kit) της εταιρείας Linco Research (St Charles,MO,USA). Οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν και λαμβάνονταν οι μέσες τιμές. Οι ραδιοανοσοχημικές μέθοδοι (RIAs), βασίζονται στην αντιστρεπτή δέσμευση ενός αντιγόνου Ag σε ένα ειδικό αντίσωμα Ab κατά την αντίδραση $Ag + Ab \leftrightarrow Ag - Ab$ (1). Η προσθήκη στα αντιδρώντα βιομόρια Ag και Ab του ίδιου αντιγόνου Ag αλλά επισημασμένου με ένα ραδιονουκλίδιο ($^{125}I, ^3H$) (ιχνηθετημένο αντιγόνο) οδηγεί την (1) στην εξής αντίδραση:



Όπου Ag είναι η ουσία (αντιγόνο) της οποίας ζητείται η συγκέντρωση ή γνωστή σταθερή ποσότητα αυτής, και Ag^* η ίδια ουσία αλλά επισημασμένη με ραδιονουκλίδιο (ιχνηθετημένο αντιγόνο). Το αντίσωμα Ab δεσμεύει εξίσου το αντιγόνο Ag και Ag^* καθώς με την σήμανση του Ag δεν αλλάζει η χημική συγγένεια του έναντι του Ab. Το ποσοστό του συνδεδεμένου ιχνηθετημένου αντιγόνου (Ag^*) μειώνεται ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης του μη επισημασμένου αντιγόνου (Ag) στο υπό εξέταση δείγμα.. Ο προσδιορισμός της υπό εξέταση ουσίας (Ag) γίνεται με μέτρηση της ραδιενέργειας του συμπλόκου $Ag^* - Ab$ (αφού προηγουμένως διαχωριστεί από τα ελεύθερα επισημασμένα αντιγόνα Ag^* που δεν δεσμεύτηκαν) σε μετρητή β ή γ ακτινοβολίας και εκφράζεται σαν αριθμός κρούσεων ανά λεπτό. Στη προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ιχνηθετημένο μόριο καθαρής ανθρώπινης λεπτίνης με ραδιοσότοπο ^{125}I , το οποίο επώαστηκε σε καθορισμένη συγκέντρωση με σταθερή αραίωση αντιορού λεπτίνης (αντίσωμα έναντι ανθρώπινης λεπτίνης), έτσι ώστε μόνο 50% της ολικής συγκέντρωσης του ιχνηθετημένου αντιγόνου να συνδέεται με το αντίσωμα. Η προσθήκη μη

επισημασμένου αντιγόνου (ο υπό εξέταση ορός), έχει ως αποτέλεσμα τον ανταγωνισμό μεταξύ αυτού και του επισημασμένου αντιγόνου για τον περιορισμένο και σταθερό αριθμό των θέσεων δέσμευσης στο αντίσωμα.

Για την μέτρηση της λεπτίνης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια:

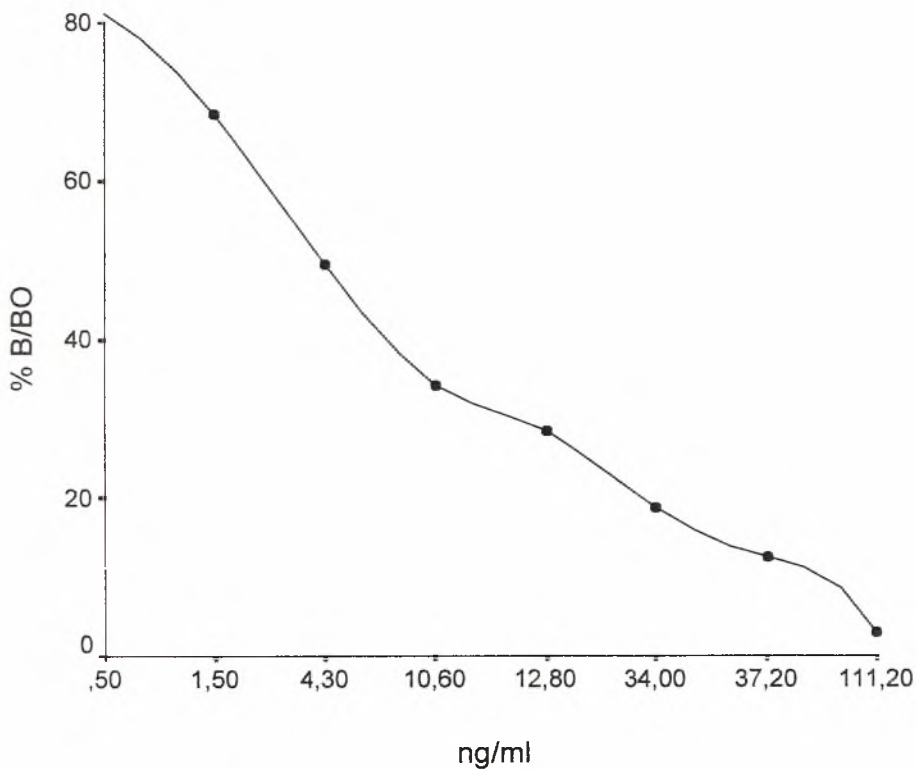
1. Αντιγόνο: Χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινη λεπτίνη (27 ml/φιαλίδιο) επισημασμένη με ^{125}I (ειδική ραδιενέργεια 135 $\mu\text{Ci} / \mu\text{g}$), που προσφέρεται σε λυόφιλο μορφή για σταθερότητα.
2. Ειδικό αντίσωμα : Χρησιμοποιήθηκε ειδικό αντίσωμα έναντι της λεπτίνης που αναπτύχθηκε σε κουνέλια. (26 ml / φιαλίδιο έτοιμο προς χρήση).
3. Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα για τη διάλυση του αντισώματος (pH =7.4).
4. Ρυθμιστικό διάλυμα (φυσιολογική IgG κουνελιού) για τον σχηματισμό υδρόφιλης επισημασμένης λεπτίνης.
5. Μάρτυρες ελέγχου (αντιδραστήριο για έλεγχο ποιότητας) : Γνωστή ποσότητα καθαρής ανασυνδυασμένης ανθρώπινης λεπτίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα (2 ml / φιαλίδιο).
6. Αντιδραστήριο καθίζησης του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος (για τον διαχωρισμό των επισημασμένων αντιγόνων που δεν δεσμεύτηκαν). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε δεύτερο αντίσωμα (αντι – γάμμα σφαιρίνη) το οποίο αναπτύχθηκε σε κατσίκες, στις οποίες έγινε ένεση αντισωμάτων κουνελιού σε μίγμα με πολυαιθυλενική γλυκόλη.

Για τη κατασκευή της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκε καθαρή ανασυνδυασμένη ανθρώπινη λεπτίνη σε συγκεντρώσεις 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 και 100 ng / ml (standards λεπτίνης).

Η όλη διαδικασία μέτρησης της λεπτίνης διαρκεί δύο ημέρες. Την πρώτη ημέρα γίνεται η ανταγωνιστική σύνδεση της λεπτίνης του ορού και της επισημασμένης λεπτίνης για το πρώτο αντίσωμα έναντι της λεπτίνης σε ειδικά σωληνάκια, και ακολουθεί επώαση για 20-24 ώρες στη θερμοκρασία των 4°C σε περιστροφικό αναδευτήρα. Την επόμενη ημέρα προστίθεται το δεύτερο αντίσωμα (αντίσωμα καθίζησης) και η επώαση διάρκεισε 20 min σε θερμοκρασία 4°C. Ο διαχωρισμός των κλασμάτων μετά την καθίζηση έγινε σε ψυχή (4°C) φυγόκεντρο. Η ραδιενέργεια του ιζήματος (μετά τη απόρριψη του υπερκείμενου) μετρήθηκε σε καταμετρητή γ – ακτινοβολίας για ένα λεπτό. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη (καμπύλη αναφοράς) σε δύο άξονες. Στον άξονα Y τοποθετήθηκε η ποσοστιαία

μέγιστη δέσμευση για κάθε πρότυπο διάλυμα (μη επισημασμένης λεπτίνης) και στον άξονα X οι ποσότητες των προτύπων σε ng / ml. Με την χρήση λογαριθμικού χαρτιού σχηματίζεται μία σχεδόν γραμμική καμπύλη με βάση την οποία υπολογίσθηκαν οι συγκεντρώσεις των αγνώστων δειγμάτων.

Πρότυπη καμπύλη λεπτίνης



Ευαισθησία μεθόδου (sensitivity)

Η ελάχιστη ποσότητα λεπτίνης που μπορεί να ανιχνευθεί με τη μέθοδο είναι 0.5 ng / ml όταν χρησιμοποιείται δείγμα 100μl.

Εξειδίκευση (specificity).

Η εξειδίκευση μιας αναλυτικής δοκιμασίας είναι η ικανότητα της να μετρά επιλεκτικά την υπό εξέταση ουσία (αναλύτης) παρουσία άλλων παρόμοιων ορμονών.

Διασταυρούμενη ευαισθησία

Ανθρώπινη λεπτίνη	100%
Λεπτίνη αρουραίου	< 0.2%
Λεπτίνη ποντικού	< 0.2%
Ανθρώπινη ινσουλίνη	*
Ανθρώπινη προινσουλίνη	*
Ινσουλίνη αρουραίου	*
Ανθρώπινο – C –πεπτιδίο	*
Γλουκαγόνο	*
Προσομοιάζων με την ινσουλίνη αυξητικός παράγοντας (IGF)	*

* Μη ανιχνεύσιμη

Ακρίβεια (precision)

Ο εντός της μέτρησης (intra –assay) συντελεστής διασποράς (coefficient of variation) υπολογίστηκε με διπλές μετρήσεις 5 δειγμάτων ορού στην ίδια μέθοδο και βρέθηκε 7.1% και 7% στη πρώτη και δεύτερη φάση της μελέτης αντίστοιχα. Ο μεταξύ των μετρήσεων συντελεστής διασποράς (inter – assay) υπολογίστηκε με μία μέτρηση 5 δειγμάτων ορού σε πολλαπλές μεθόδους και βρέθηκε 6.2% και 6.3% στη πρώτη και δεύτερη φάση της μελέτης αντίστοιχα.

Ανάκτηση (recovery)

Η ακρίβεια της μεθόδου εκτιμήθηκε με προσθήκη γνωστών ποσοτήτων λεπτίνης σε δείγματα ανθρώπινων ορών και μετρήθηκαν με ραδιοανοσολογική μέθοδο εις διπλούν. Οι ανευρεθείσες τιμές είναι ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων. Το ποσοστό ανάκτησης υπολογίστηκε από τον λόγο της μετρηθείσας προς την αναμενόμενη ποσότητα.

Ποσότητα λεπτίνης Που προστέθηκε (ng / ml)	Μετρηθείσα ποσότητα	Αναμενόμενη τιμή	% Ανάκτηση
0	4.9	-	-
2	7.2	6.9	104
5	10.4	9.9	105
10	15.7	14.9	105
20	25.6	24.9	103

3.2. Ωχρινοτρόπος (LH) και Θυλακιοτρόπος ορμόνη (FSH)

Οι τιμές της LH και FSH προσδιορίστηκαν με ανοσομετρική τεχνική η οποία βασίζεται στην ενισχυμένη χημειοφωταύγεια. Χρησιμοποιήθηκαν οι εμπορικές συσκευασίες (kits) Amerlite FSH assay και Amerlite LH assay αντίστοιχα, της εταιρείας Amersam International plc, Amersam, (UK). Η μέθοδος της χημειοφωταύγειας βασίζεται στην εκπομπή φωτονίων κατά την διάρκεια μιας χημικής αντίδρασης. Οι περισσότερες αντιδράσεις που συνοδεύονται από χημειοφωταύγεια είναι οι αντιδράσεις οξείδωσης με υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) διαφόρων οργανικών ουσιών. Η αντίδραση αντιγόνου – αντισώματος είναι παρόμοια με τις RIA μεθόδους με τη διαφορά ότι το χρησιμοποιείται και δεύτερο αντίσωμα επισημασμένο με ένζυμο ($Ab^* - E$) το οποίο δεσμεύει το αντιγόνο Ag αλλά σε άλλη περιοχή. Στο διπλό σύμπλοκο που δημιουργείται ($Ag - Ab + Ab^* - E$), προστίθεται το αντιδραστήριο σήματος (στο οποίο συμπεριλαμβάνεται η προς οξείδωση ουσία , το οξειδωτικό μέσο (H_2O_2) και ένας ενισχυτής του σήματος) για την έναρξη της χημειοφωταύγειας. Εν συνεχεία γίνεται ποσοτικός προσδιορισμός της

LH και FSH με μέτρηση της έντασης της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας σε ειδική συσκευή και ακολουθεί η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, με τη διαφορά ότι στον άξονα Y τίθεται η ένταση του εκπεμπόμενου φωτεινού σήματος. Για τον προσδιορισμό της LH, χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό ολικό αντίσωμα έναντι της LH καθώς και επισημασμένο με ένζυμο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της β – υπομάδας τα οποία αναπτύχθηκαν σε ποντικούς. Για τον προσδιορισμό της FSH, χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της ορμόνης που αναπτύχθηκε σε πρόβατα, καθώς και δεύτερο επισημασμένο με ένζυμο μονοκλωνικό αντίσωμα που αναπτύχθηκε σε ποντικούς. Οι ελάχιστες ποσότητες ανίχνευσης ήταν 0.5 IU/l και 0.12 IU/l για την FSH και τη LH αντίστοιχα. Ο εντός της μέτρησης (intra – assay) και ο μεταξύ των μετρήσεων (inter – assay) συντελεστής διασποράς βρέθηκε 6% και 7.5% αντίστοιχα για την FSH, και 6.8% και 9.0% αντίστοιχα για την LH.

3.3. Οιστραδιόλη

Στη πρώτη φάση της μελέτης η οιστραδιόλη προσδιορίστηκε με ανοσολογική εξέταση ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Amerlite Estradiol – 60 assay, Amersam International plc, Amersam, UK). Η ελάχιστη ποσότητα ανίχνευσης ήταν 50pmol/l. Ο εντός της μέτρησης (intra – assay) και ο μεταξύ των μετρήσεων (inter – assay) συντελεστής διασποράς βρέθηκε 8% και 9.1% αντίστοιχα. Στη δεύτερη φάση της μελέτης προσδιορίστηκε με μικροσωματιδιακή ενζυμοανοσολογική μέθοδο (MEIA) σε αυτόματο αναλυτή (AxSYM Estradiol assay, Abbott Park, IL, USA). Η τεχνολογία αυτή χρησιμοποιεί ένα διάλυμα αιωρούμενων μικροσκοπικών σωματιδίων για την μέτρηση των διάφορων ουσιών. Τα σωματίδια αυτά επικαλύπτονται με ένα αντίσωμα ειδικό για τη δέσμευση της υπό εξέταση ουσίας (αντιγόνου). Η αποτελεσματική επιφάνεια των μικροσωματιδίων αυξάνει την κινητική της μεθόδου και μειώνει την περίοδο επώασης. Η τεχνική έχει ως εξής: Τα μικροσωματίδια σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με το αντιγόνο και ακολουθεί προσθήκη δεύτερου αντισώματος επισημασμένου με ένζυμο. Μετά από επανειλημμένες πλύσεις του περιεχομένου των σωληναρίων, απομακρύνεται το επιπλέον επισημασμένο δεύτερο αντίσωμα που δεν αντέδρασε και παραμένει στα μικροσωματίδια το σύμπλοκο αντιγόνου – 1^ο αντισώματος – 2^ο αντισώματος – ενζύμου. Στη συνέχεια με την προσθήκη φθορίζοντος υποστρώματος του ενζύμου παράγεται έγχρωμο προϊόν του οποίου η ένταση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του υπό εξέταση αντιγόνου. Ακολουθεί ο σχηματισμός της πρότυπης καμπύλης όπου στο άξονα Y τίθεται η

μετρούμενη οπτική πυκνότητα των αντιστοιχών πρότυπων δειγμάτων και στον άξονα X οι γνωστές συγκεντρώσεις του αντιγόνου. Στη συνέχεια διαβάζεται η συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων μετά την μέτρηση της οπτικής τους πυκνότητας. Η ελάχιστη ποσότητα ανίχνευσης της οιστραδιόλης ήταν 73 pmol / l. Ο εντός της μέτρησης (intra – assay) και ο μεταξύ των μετρήσεων (inter – assay) συντελεστής διασποράς βρέθηκε 7.1% και 8.4% αντίστοιχα.

3.4. Προγεστερόνη

Στη πρώτη φάση της μελέτης η προγεστερόνη προσδιορίστηκε με ραδιοανοσοχημική μέθοδο (Kodak Amerlite Progesterone assay, Amersam). Η ελάχιστη ποσότητα ανίχνευσης ήταν 0.35 nmol / l. Ο εντός της μέτρησης (intra – assay) και ο μεταξύ των μετρήσεων (inter – assay) συντελεστής διασποράς βρέθηκε 6.6% και 7% αντίστοιχα.. Στη δεύτερη φάση της μελέτης προσδιορίστηκε με ανοσολογική εξέταση χημειοφωταύγειας (IMMULITE Progesterone, DPC, Los Angeles, CA, USA). Η ελάχιστη ποσότητα ανίχνευσης ήταν 0.6 nmol / l. Ο εντός της μέτρησης (intra – assay) και ο μεταξύ των μετρήσεων (inter – assay) συντελεστής διασποράς βρέθηκε 5.8% και 7.2% αντίστοιχα..

3.5. Κορτιζόλη

Η κορτιζόλη προσδιορίστηκε με εξέταση ανοσοφθορισμού χρησιμοποιώντας πολωμένο φως (FPIA) (TDx/TDxFLx Cortisol assay, Abbot Laboratories). Στην τεχνική αυτή, χρησιμοποιούνται δύο αντιγόνα:: η ουσία που πρόκειται να μετρηθεί και επισημασμένο φθορίζον αντιγόνο τα οποία ανταγωνίζονται για την δέσμευση τους στο ίδιο αντίσωμα. Όταν η συγκέντρωση της υπό εξέτασης ουσίας είναι υψηλή, μεγαλύτερη ποσότητα αυτής δεσμεύεται στο αντίσωμα με αποτέλεσμα το φθορίζον αντιγόνο να μένει αδέσμευτο. Η εστίαση πολωμένου φωτός στα αντιγόνα αυτά (φθορίζοντα) προκαλεί μικρή εκπομπή φθορισμού γιατί είναι μικρά και στρέφονται γρήγορα, σε αντίθεση με τα σύμπλοκα φθορίζοντος αντιγόνου-αντισώματος που είναι μεγάλα μόρια, στρέφονται πιο αργά και εκπέμπουν περισσότερο φθορισμό. Έτσι, η μείωση του φθορισμού σημαίνει ότι ποσότητα της υπό εξέτασης ουσίας είναι μεγάλη και το αντίστροφο. Ειδικά φίλτρα χρησιμοποιούνται για τις μετρήσεις. Η ελάχιστη ποσότητα ανίχνευσης ήταν 0.5 µg/dl. Ο εντός της μέτρησης (intra – assay) και ο μεταξύ των μετρήσεων (inter – assay) συντελεστής διασποράς βρέθηκε 7.8% και 6.4% αντίστοιχα.

4. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Για τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μέθοδοι:

4.1. Ανάλυση διακύμανσης (Analysis of variance, ANOVA)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την σύγκριση των αριθμητικών μέσων (means) σε τρεις ή και περισσότερες ομάδες πληθυσμών. Η διασπορά των τιμών υπολογίζεται με δύο διαφορετικού τρόπους: μέσω της μεταβλητότητας των ξεχωριστών τιμών γύρω από τους μέσους των πληθυσμιακών ομάδων (“εντός των ομάδων” μεταβλητότητα – within groups variability) και μέσω της μεταβλητότητας των μέσων των ομάδων γύρω από το συνολικό μέσο (“μεταξύ των ομάδων μεταβλητότητα” – between groups variability). Η μέθοδος ελέγχει γενικά αν οι αριθμητικοί μέσοι είναι διαφορετικοί αλλά δεν παρέχει πληροφορίες αν όλοι οι μέσοι είναι διαφορετικοί ή μόνο κάποιοι από αυτούς διαφέρουν. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστοί έλεγχοι για κάθε ζευγάρι αριθμητικών μέσων (paired t – test), όπου αυτό κρίθηκε απαραίτητο με τη βοήθεια της διόρθωσης του Bonferroni (Bonferroni correction), ώστε να αποφευχθούν στατιστικά σφάλματα τύπου I (σφάλματα απόρριψης της μηδενικής υπόθεσης ελέγχου, η οποία θεωρεί ότι οι αριθμητικοί μέσοι είναι ταυτόσημοι). Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά όταν το επίπεδο σημαντικότητας (P – value) ήταν < 0.05 .

4.2. Γραμμική παλινδρόμηση (απλή και πολλαπλή – Simple and multiple regression analysis)

Αυτή η μέθοδος αποσκοπούσε στη διαπίστωση τυχόν ταυτόχρονης μεταβολής ορισμένων παραμέτρων σε κάθε πειραματική ομάδα γυναικών. Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στη διερεύνηση της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ της λεπτίνης και των ωοθηκικών στεροειδών (οιστραδιόλης και προγεστερόνης). Η τεχνική αυτή μας δίνει τη δυνατότητα να διερευνήσουμε την αλλαγή (θετική ή αρνητική) σε κάποια μεταβλητή (εξαρτημένη μεταβλητή – dependent variable), που αντιστοιχεί σε μία δεδομένη αλλαγή στην άλλη μεταβλητή, γνωστή ως επεξηγηματική μεταβλητή (explanatory variable). Πιο συγκεκριμένα, σκοπός ήταν να διερευνηθεί αν κάποια αλλαγή στα επίπεδα της οιστραδιόλης ή/και της προγεστερόνης (επεξηγηματικές μεταβλητές), αντιστοιχούσε σε αλλαγή (θετική ή αρνητική) στα επίπεδα της λεπτίνης. Η απλή γραμμική παλινδρόμηση χρησιμοποιήθηκε για την διερεύνηση της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ δύο συνεχών μεταβλητών (π.χ οιστραδιόλης ή προγεστερόνης και λεπτίνης) και η πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση για τη

διερεύνηση της ύπαρξης συσχέτισης ανάμεσα σε πολλές μεταβλητές με τη προσέγγιση διαδοχικών βημάτων (*stepwise approach*). Η τεχνική της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης παρέχει τις πλέον ισχυρές στατιστικές συσχετίσεις όπου καταδεικνύεται αν μία μεταβλητή (στη παρούσα μελέτη η λεπτίνη) σχετίζεται με μία άλλη, ανεξάρτητα από την παρουσία άλλων μεταβλητών. Οι συσχετίσεις αυτές απεικονίζονται διαγραμματικά με τη γραμμή ή τις γραμμές παλινδρόμησης (εξισώσεις μίας ή περισσότερων ευθειών γραμμών) δύο ή περισσότερων μεταβλητών αντίστοιχα, όπου η επεξηγηματική μεταβλητή (π.χ οιστραδιόλη, προγεστερόνη, δείκτης μάζας σώματος) μετράται στον οριζόντιο άξονα και η εξαρτημένη μεταβλητή (λεπτίνη) εμφανίζεται στον κάθετο άξονα. Για το σκοπό της στατιστικής ανάλυσης, τα αποτελέσματα των ορμονικών μετρήσεων μετασχηματίστηκαν λογαριθμικά (αντικατάσταση των τιμών με το νεπέριο λογάριθμο τους). Ωστόσο, στα αποτελέσματα παρουσιάζονται οι αριθμητικοί μέσοι. Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά όταν το επίπεδο σημαντικότητας (*P - value*) ήταν < 0.05

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. Πρώτη φάση της μελέτης

Στη πρώτη φάση διερευνήθηκαν, όπως έχει αναφερθεί, τα επίπεδα της λεπτίνης του ορού μετά από λαπαροτομία. Τα κλινικά και ενδοκρινολογικά χαρακτηριστικά των γυναικών στις διάφορες ομάδες πριν την επέμβαση δείχνονται στον πίνακα.1.

Πίνακας 1.

	Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3 (ελέγχου)
Αριθμός γυναικών	7	7	6
Ηλικία (χρόνια)	42.8 ± 0.7	41.7 ± 0.6	40.5 ± 1.8
Βάρος (Kg)	69.2 ± 3.8	72.7 ± 1.9	71.3 ± 4.9
BMI (Kg/m ²)	26.3 ± 1.1	26.9 ± 0.8	28.2 ± 1.5
FSH (IU /l)	6.8 ± 1.4	3.5 ± 0.7 ^a	6.2 ± 0.6
LH (IU/l)	5.9 ± 1.1	2.1 ± 0.5 ^a	5.4 ± 0.6
Λεπτίνη (ng/ml)	22.7 ± 3.4	44.7 ± 4.5 ^a	20.2 ± 3.8

Ομάδα 1: Γυναίκες που υποβλήθηκαν σε κοιλιακή υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία στη μέση προς όψιμη ωοθυλακική φάση.

Ομάδα 2: Γυναίκες που υποβλήθηκαν σε κοιλιακή υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία στη πρόιμη προς μέση ωχρινική φάση.

Ομάδα 3: Γυναίκες που υποβλήθηκαν σε χολοκυστεκτομία στη πρόιμη προς μέση ωοθυλακική φάση του κύκλου(ομάδα ελέγχου).

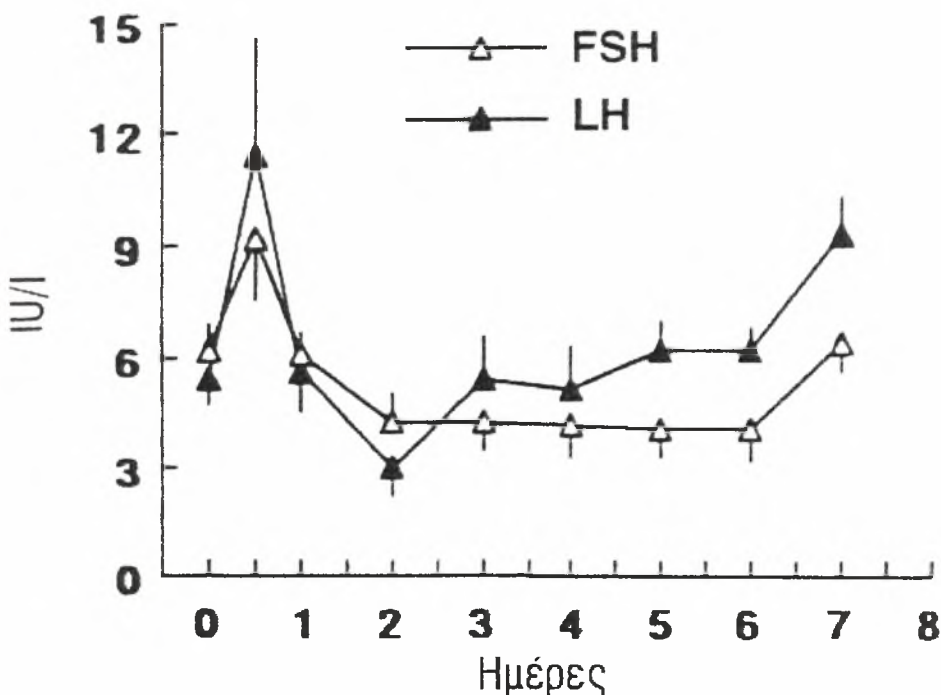
^a : Στατιστικά σημαντικές διαφορές σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των ομάδων 1 και 3.

Οι τιμές είναι μέση τιμή ± SEM

Μεταβολές στα επίπεδα των γοναδοτροπινών

Τα επίπεδα της FSH και της LH την ημέρα της επέμβασης (ημέρα 0) ήταν σημαντικά χαμηλότερα στην ομάδα 2 (3.5 ± 0.7 και 2.1 ± 0.5 IU/l αντίστοιχα) σε σύγκριση με την ομάδα 1 (6.8 ± 1.4 και 5.9 ± 1.1 IU/l αντίστοιχα, $P < 0.05$), και την ομάδα 3 (6.2 ± 0.6 και 5.4 ± 0.6 IU/l αντίστοιχα, $P < 0.05$, πίνακας 1). Τα επίπεδα της FSH και της LH, αυξήθηκαν βαθμιαία αλλά σημαντικά από την ημέρα της επέμβασης έως την 8^η μετεγχειρητική ημέρα τόσο στην ομάδα 1 (32.9 ± 2.0 και 12.8 ± 1.7 IU/l αντίστοιχα, $P < 0.01$), όσο και στην ομάδα 2 (15.4 ± 3.1 και 5.5 ± 1.0 IU/l αντίστοιχα, $P < 0.01$). Στην ομάδα 3, παρατηρήθηκε μία παροδική αλλά σημαντική αύξηση των επιπέδων της FSH και LH, 12 ώρες μετά από την επέμβαση ($P < 0.05$, εικόνα 1). Στη συνέχεια, και οι δύο γοναδοτροπίνες ελαττώθηκαν την 2^η μετεγχειρητική ημέρα στα προ της επέμβασης επίπεδα, παρέμειναν σταθερές από την 3^η έως και την 6^η ημέρα, ενώ παρατηρήθηκε μία αύξηση τους την 7^η ημέρα υποδηλώνοντας ένα εκκριτικό κύμα της LH (θετικός feedback μηχανισμός οιστραδιόλης).

Εικόνα 1. Μεταβολές στα επίπεδα των γοναδοτροπινών (μέση τιμή \pm SEM), στην ομάδα 3 (χολοκυστεκτομία στη μέση ωοθυλακική φάση, ημέρα 0 : ημέρα επέμβασης)



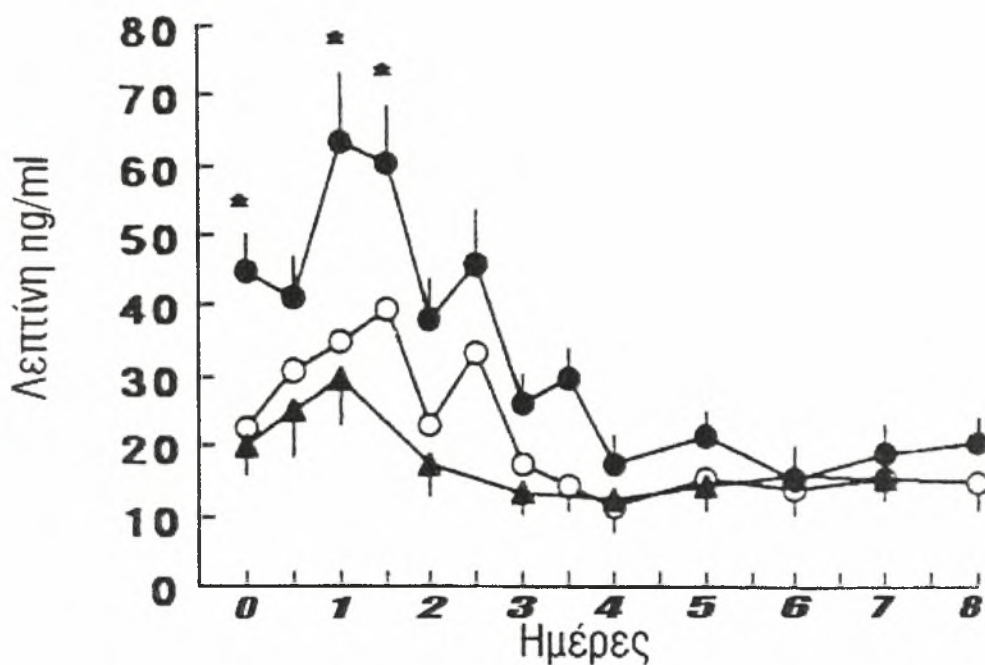
5.1.1. Μεταβολές στα επίπεδα της λεπτίνης

Τα επίπεδα της λεπτίνης την ημέρα της επέμβασης ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα 2 ($44,7 \pm 4.5$ ng/ml) σε σύγκριση με την ομάδα 1 (22.7 ± 3.4 ng/ml, $P < 0.05$), και την ομάδα 3 (20.2 ± 3.8 ng/ml, $P < 0.05$, πίνακας 1, εικόνα 2), χωρίς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες 1 και 3. Κατά τη διάρκεια του πρώτου 24ωρου μετά την επέμβαση, τα επίπεδα της λεπτίνης αυξήθηκαν σημαντικά σε όλες τις ομάδες παρουσιάζοντας εκκριτική αιχμή την 1^η μετεγχειρητική ημέρα ($P < 0.05$). Την ημέρα αυτή, τα επίπεδα της λεπτίνης ήταν υψηλότερα στην ομάδα 2 σε σύγκριση με τις ομάδες 1 και 3 χωρίς να υπάρχει και πάλι σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες 1 και 3 (εικόνα 2). Στη συνέχεια, η λεπτίνη ελαττώθηκε σημαντικά από την 1^η – 4^η ημέρα. Η ελάττωση αυτή ήταν σταδιακή στις ομάδες 1 και 3 και πιο γρήγορη στην ομάδα 2 ($P < 0.01$). Ωστόσο, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στα επίπεδα λεπτίνης μεταξύ των τριών ομάδων. Από την 4^η – 8^η ημέρα, τα επίπεδα της λεπτίνης δεν μεταβλήθηκαν στις ομάδες 1 και 2 αλλά αυξήθηκαν στην ομάδα 3 ($P < 0.05$). Ωστόσο, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διάφορες ομάδες στα διάφορα χρονικά σημεία.

5.1.2. Μεταβολές στα επίπεδα της οιστραδιόλης.

Τα επίπεδα της οιστραδιόλης την ημέρα της επέμβασης δεν διέφεραν ανάμεσα στις ομάδες 1 (286 ± 57 pmol/l), 2 (270 ± 71 pmol/l) και 3 (227 ± 38 pmol/l) παρά το γεγονός ότι ήταν χαμηλότερα στην ομάδα 3. Δώδεκα ώρες μετά την επέμβαση, τα επίπεδα της οιστραδιόλης ελαττώθηκαν σημαντικά ($P < 0.05$) στις ομάδες 1 και 2, και ακολούθησε περαιτέρω ελάττωση τους μέχρι την 8^η μετεγχειρητική ημέρα, χωρίς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες σε κάθε χρονικό σημείο (εικόνα 3). Στην ομάδα 3 (ομάδα ελέγχου), τα επίπεδα της οιστραδιόλης παρουσίασαν μία παροδική αλλά σημαντική αύξηση την 1^η μετεγχειρητική ημέρα ($P < 0.05$), στη συνέχεια μειώθηκαν ελαφρά την 2^η μετεγχειρητική ημέρα και ακολούθησε σταδιακή αύξηση τους μέχρι την 7^η μετεγχειρητική ημέρα (500 ± 78 pmol/l, $P < 0.01$). Στην ομάδα 3 οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σύγκριση με τις ομάδες 1 και 2, καθ'όλη την διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου.

Εικόνα 2. Επίπεδα λεπτίνης (μέση τιμή \pm SEM), πριν και μετά από κοιλιακή ολική υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία καθώς και μετά από χολοκυστεκτομία



- Η ημέρα της επέμβασης συμβολίζεται ως ημέρα 0

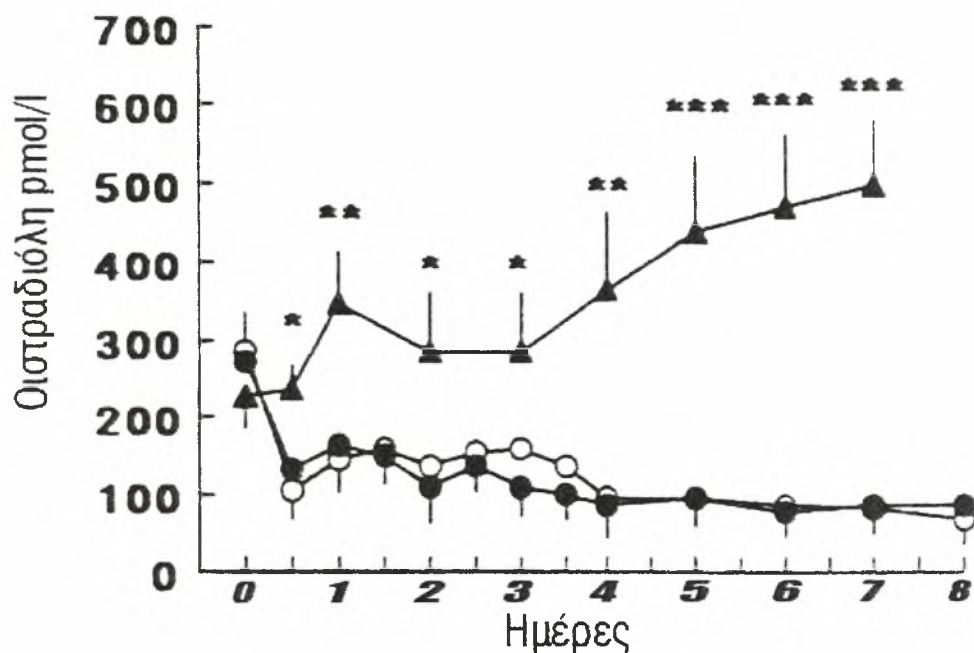
● Γυναίκες που υποβλήθηκαν σε κοιλιακή υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων κατά τη διάρκεια της πρώιμης - μέσης ωχρινικής φάσης του κύκλου (ομάδα 2)

○ Γυναίκες που υποβλήθηκαν σε κοιλιακή υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων κατά τη διάρκεια της μέσης - όψιμης ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (ομάδα 1)

▲ Γυναίκες που υποβλήθηκαν σε χολοκυστεκτομία κατά τη διάρκεια της πρώιμης - μέσης ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (ομάδα 3)

* $P < 0.05$ (διαφορά ανάμεσα στην ομάδα 2 και στις ομάδες 1 & 3)

Εικόνα 3. Επίπεδα οιστραδιόλης (μέση τιμή \pm SEM), πριν και μετά από κοιλιακή ολική υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία καθώς και μετά από χολοκυστεκτομία



- Η ημέρα της επέμβασης συμβολίζεται ως ημέρα 0

● Γυναίκες που υποβλήθηκαν σε κοιλιακή υστερεκτομία μετα των εξαρτημάτων κατά τη διάρκεια της πρώιμης - μέσης ωχρινικής φάσης του κύκλου (ομάδα 2)

○ Γυναίκες που υποβλήθηκαν σε κοιλιακή υστερεκτομία μετα των εξαρτημάτων κατά τη διάρκεια της μέσης - όψιμης ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (ομάδα 1)

▲ Γυναίκες που υποβλήθηκαν σε χολοκυστεκτομία κατά τη διάρκεια της πρώιμης - μέσης ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (ομάδα 3)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (διαφορές ανάμεσα στην ομάδα 3 και τις ομάδες 1 & 2)

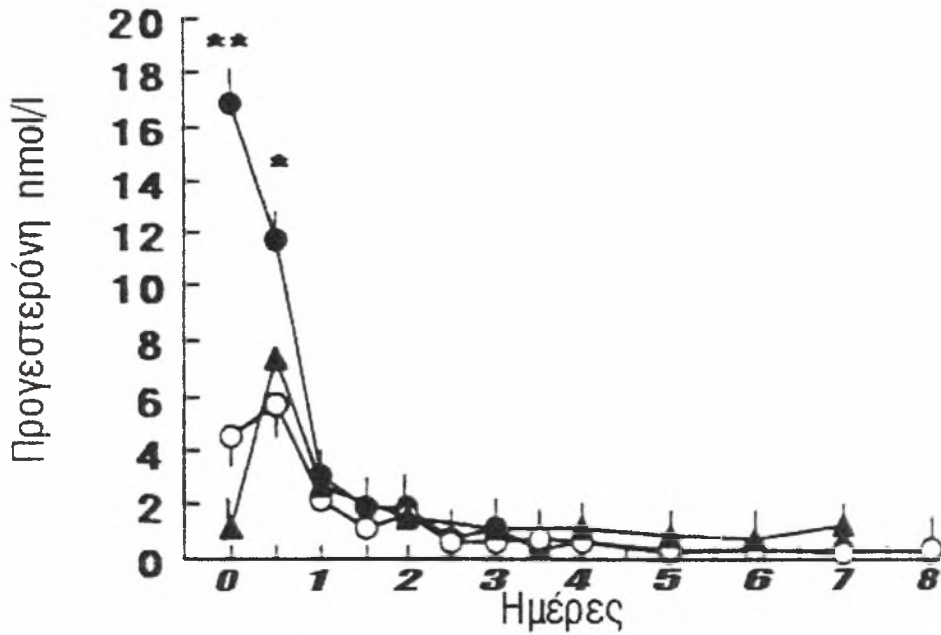
5.1.3. Μεταβολές στα επίπεδα της προγεστερόνης

Τα επίπεδα της προγεστερόνης την ημέρα της επέμβασης ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα 2 (16.9 ± 1.2 nmol/l), σε σύγκριση με την ομάδα 1 (4.5 ± 0.6 nmol/l, $P < 0.01$) και την ομάδα 3 (1.2 ± 0.26 nmol/l, $P < 0.01$). Κατά τη διάρκεια του πρώτου 24ωρου μετά την επέμβαση η προγεστερόνη ελαττώθηκε σημαντικά και απότομα στις ομάδες 1 και 2, και ακολούθησε σταδιακή ελάττωση της μέχρι την 8^η μετεγχειρητική ημέρα χωρίς σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων σε κάθε χρονικό σημείο (εικόνα 4). Στην ομάδα 3, η προγεστερόνη παρουσίασε παροδική αλλά σημαντική αύξηση 12 ώρες μετά την επέμβαση ($P < 0.01$) και παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα καθ'όλη την διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι προαναφερθείσες αλλαγές στις συγκεντρώσεις της FSH, της LH, της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης κατά τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου την ομάδα 3, είναι παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται στη μέση προς όψιμη ωοθυλακική φάση του κύκλου.

5.1.4 Μεταβολές στο σωματικό βάρος και τον δείκτη μάζας σώματος

Μικρή αλλά όχι σημαντική ελάττωση του σωματικού βάρους (σε σύγκριση με την ημέρα της επέμβασης) σημειώθηκε την 8^η μετεγχειρητική ημέρα στις ομάδες 1 (0.53 ± 0.20 Kg) και 2 (0.71 ± 0.3 Kg) χωρίς σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες. Στην ομάδα 3, η μείωση του σωματικού βάρους (3.2 ± 0.2 Kg) την 7^η μετεγχειρητική ημέρα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με τις ομάδες 1 και 2. Σε ότι αφορά τον δείκτη μάζας σώματος (BMI), δεν σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές μεταξύ της 8^η μετεγχειρητικής ημέρας και της ημέρας της επέμβασης στις ομάδες 1 (26.1 ± 1.1 και 26.3 ± 1.1 Kg/m² αντίστοιχα) και 2 (26.7 ± 0.7 και 26.9 ± 0.9 Kg/m² αντίστοιχα), ενώ μειώθηκε σημαντικά στην ομάδα 3 από την ημέρα της επέμβασης (28.2 ± 1.5 Kg/m²) έως την 7^η μετεγχειρητική ημέρα (26.3 ± 1.5 Kg/m², $P < 0.001$). Μία σημαντική ελάττωση στον δείκτη μάζα σώματος επίσης βρέθηκε στην ομάδα 3, ανάμεσα στα χρονικά διαστήματα 0 – 4^η μετεγχειρητική ημέρα (27.3 ± 1.5 Kg/m²) και 4 – 7^η μετεγχειρητική ημέρα ($P < 0.001$).

Εικόνα 4. Επίπεδα προγεστερόνης (μέση τιμή \pm SEM), πριν και μετά από κοιλιακή ολική υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία καθώς και μετά από χολοκυστεκτομία



- Η ημέρα της επέμβασης συμβολίζεται ως ημέρα 0

● Γυναίκες που υποβλήθηκαν σε κοιλιακή υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων κατά τη διάρκεια της πρώιμης - μέσης ωχρινικής φάσης του κύκλου (ομάδα 2)

○ Γυναίκες που υποβλήθηκαν σε κοιλιακή υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων κατά τη διάρκεια της μέσης - όψιμης ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (ομάδα 1)

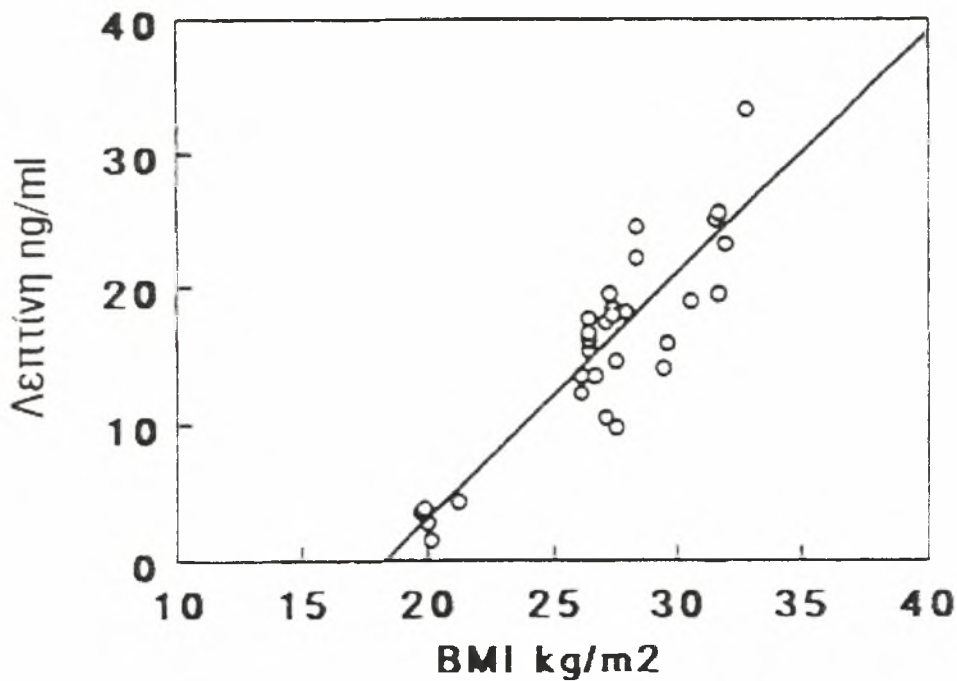
▲ Γυναίκες που υποβλήθηκαν σε χολοκυστεκτομία κατά τη διάρκεια της πρώιμης - μέσης ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (ομάδα 3)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (διαφορές ανάμεσα στην ομάδα 2 και τις ομάδες 1 & 3)

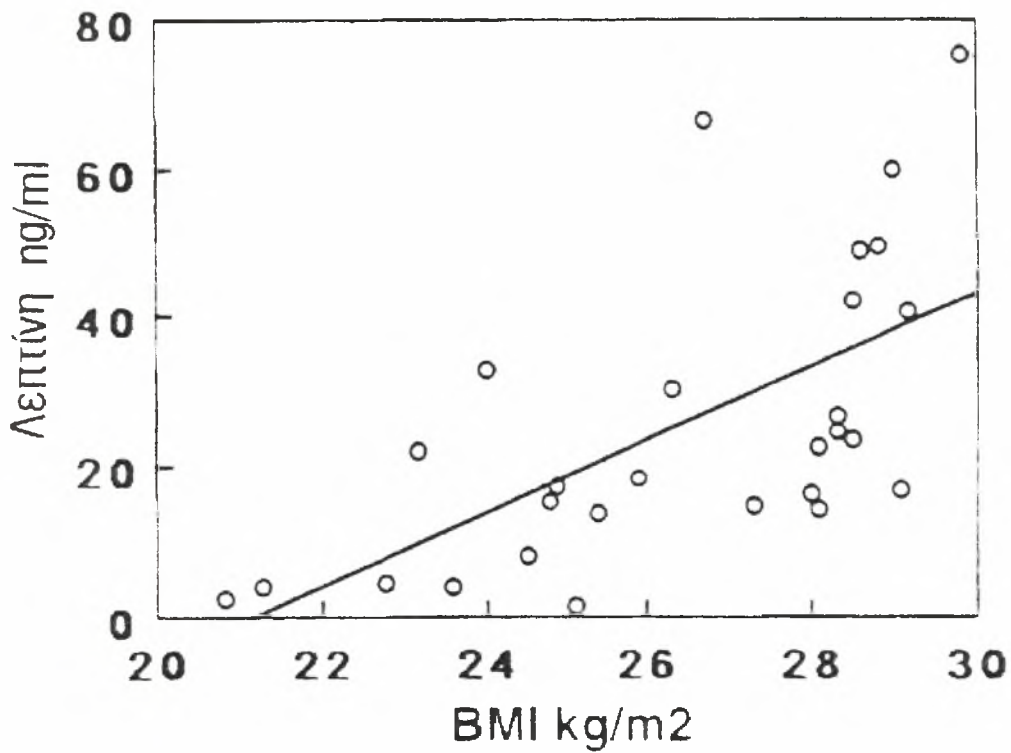
5.1.5. Συσχετίσεις μεταξύ της λεπτίνης και του δείκτη μάζα σώματος (BMI) (μέθοδος απλής γραμμικής παλινδρόμησης)

Υπήρξε μία στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της λεπτίνης και του BMI τόσο πριν την επέμβαση όσο και μετεγχειρητικά στις ομάδες 1 και 2 συνολικά ($r = 0.632$, $P < 0.001$, $n = 28$, εικόνα 5). Σημαντική επίσης θετική συσχέτιση βρέθηκε και στην ομάδα 3 ($r = 0.892$, $P < 0.001$, $n = 30$, εικόνα 6).

Εικόνα 6. Συσχέτιση μεταξύ της λεπτίνης και του BMI σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε χολοκυστεκτομία (ομάδα 3) τις ημέρες 0 (ημέρα επέμβασης) και 4, 5, 6, και 7 μετά την επέμβαση ($r = 0.892$, $P < 0.001$, $n = 30$)



Εικόνα 5. Συσχέτιση μεταξύ της λεπτίνης και του BMI σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία (ομάδες 1 και 2) τις ημέρες 0 (ημέρα επέμβασης) και 8 μετά την επέμβαση ($r = 0.632$, $P < 0.001$, $n = 28$)

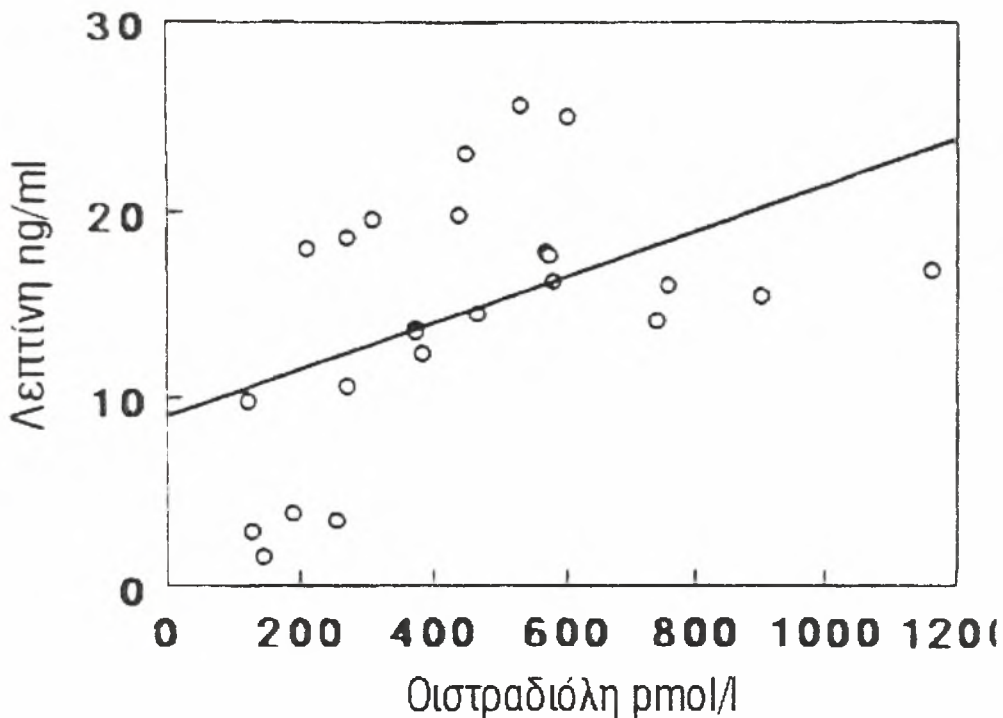


5.1.6. Συσχετίσεις μεταξύ λεπτίνης και οιστραδιόλης

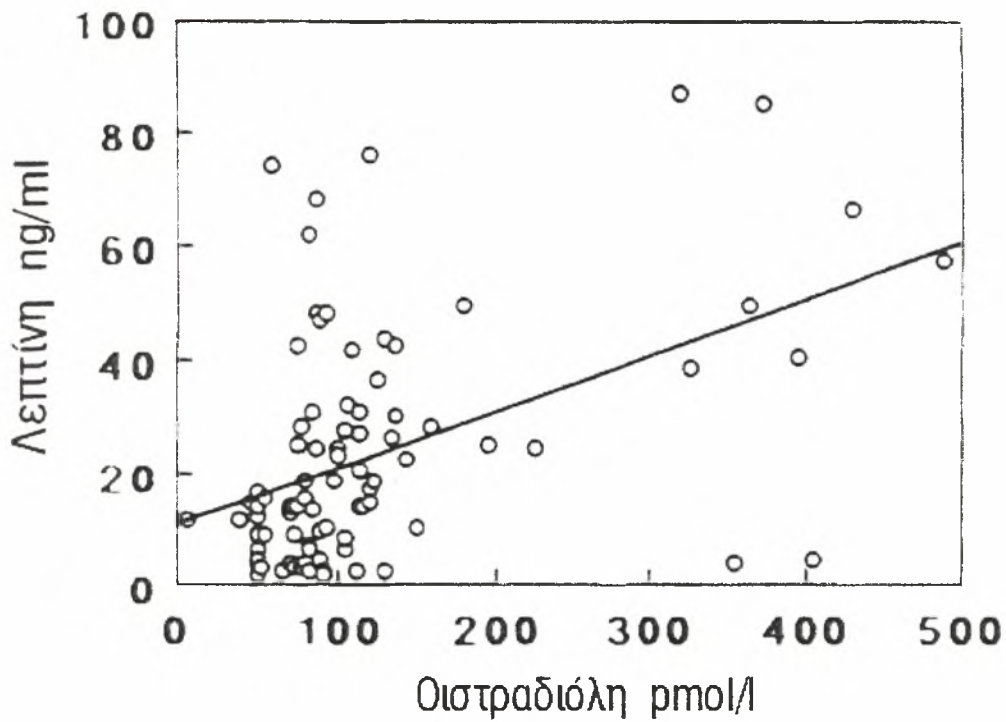
(μέθοδος απλής γραμμικής παλινδρόμησης)

Τα επίπεδα της λεπτίνης συσχετίστηκαν σημαντικά με την οιστραδιόλη από την 4^η – 7^η μετεγχειρητική ημέρα στην ομάδα 3 ($r = 0.480$, $P < 0.05$, $n = 24$, εικόνα 7), και από την ημέρα της επέμβασης έως την 8^η μετεγχειρητική ημέρα στην ομάδα 1 ($r = 0.467$, $P < 0.001$, $n = 91$, εικόνα 8). Στην ομάδα 2 οι συσχετίσεις μεταξύ λεπτίνης και οιστραδιόλης δεν ήταν σημαντικές.

Εικόνα 7. Συσχέτιση μεταξύ της λεπτίνης και της οιστραδιόλης σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε χολοκυστεκτομία στη πρώιμη - μέση ωοθυλακική φάση του κύκλου (ομάδα 3) τις ημέρες 4 – 7 μετά την επέμβαση ($r = 0.480$, $P < 0.05$, $n = 24$)



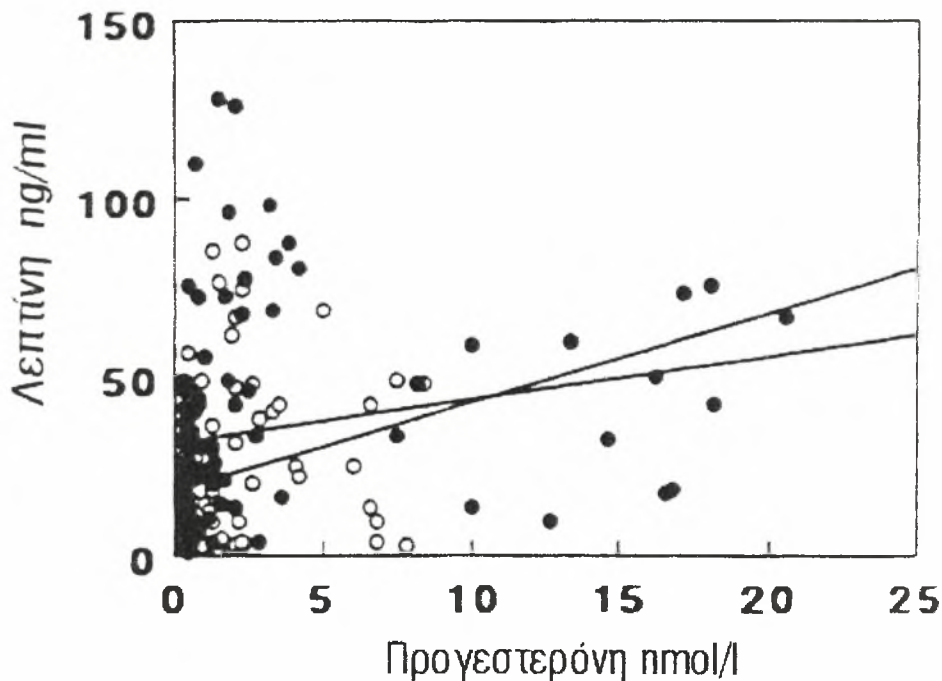
Εικόνα 8. Συσχέτιση μεταξύ της λεπτίνης και της οιστραδιόλης σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων κατά τη διάρκεια της μέσης - όψιμης ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (ομάδα 1) την ημέρα της επέμβασης (ημέρα 0) και τις μετεγχειρητικές ημέρες 1 – 8 ($r = 0.467$, $P < 0.001$, $n = 91$)



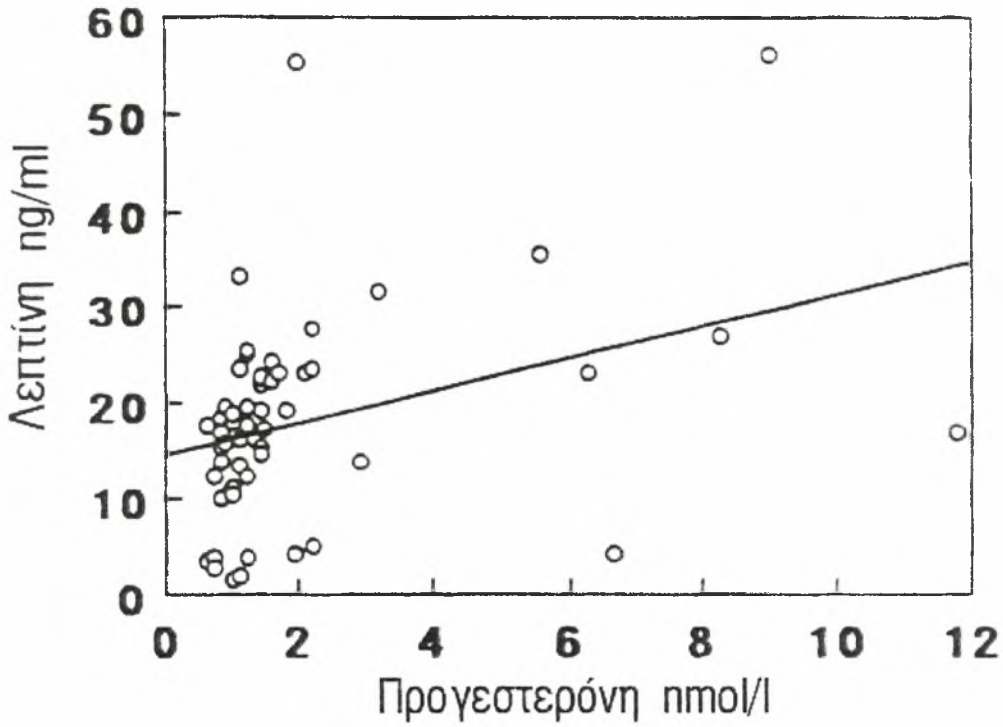
5.1.7. Συσχετίσεις μεταξύ λεπτίνης και προγεστερόνης (μέθοδος απλής γραμμικής παλινδρόμησης)

Σημαντικές θετικές συσχετίσεις μεταξύ λεπτίνης και προγεστερόνης βρέθηκαν από την ημέρα της επέμβασης έως και την 8^η μετεγχειρητική ημέρα στην ομάδα 1 ($r = 0.239$, $P < 0.05$, $n = 91$, εικόνα 9), στην ομάδα 2 ($r = 0.217$, $P < 0.05$, $n = 91$, εικόνα 9), και από την ημέρα της επέμβασης έως και την 7^η μετεγχειρητική ημέρα στην ομάδα 3 ($r = 0.323$, $P < 0.05$, $n = 54$, εικόνα 10)

Εικόνα 9. Συσχέτιση μεταξύ της λεπτίνης και της προγεστερόνης σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων, είτε κατά τη διάρκεια της μέσης - όψιμης ωοθυλακικής φάσης (ομάδα 1) (\circ) ($r = 0.239$, $P < 0.05$, $n = 91$) είτε κατά τη διάρκεια της πρώιμης - μέσης ωχρινικής φάσης (ομάδα 2) (\bullet) του κύκλου ($r = 0.217$, $P < 0.05$, $n = 91$).



Εικόνα 10. Συσχέτιση μεταξύ της λεπτίνης και της προγεστερόνης σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε χολοκυστεκτομία στη πρώιμη - μέση ωοθυλακική φάση του κύκλου (ομάδα 3) ($r = 0.323$, $P < 0.05$, $n = 54$).



5.1.8. Ανάλυση αποτελεσμάτων με τη μέθοδο της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης

Όταν εφαρμόστηκε η πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση στην ομάδα 3, η σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ λεπτίνης – οιστραδιόλης, που φαίνεται στην εικόνα 6, εξαλείφτηκε και η λεπτίνη συσχετίστηκε μόνο με το δείκτη μάζας σώματος. Όταν οι τιμές της λεπτίνης στις ομάδες 1 και 2 συνδυάστηκαν, η εφαρμογή της απλής γραμμικής παλινδρόμησης έδειξε σημαντική θετική συσχέτιση με το δείκτη μάζας σώματος ($r = 0.602$, $P < 0.01$, $n = 28$), την προγεστερόνη ($r = 0.601$, $P < 0.01$, $n = 28$), και την οιστραδιόλη ($r = 0.386$, $P < 0.05$, $n = 24$). Όταν όμως εφαρμόστηκε η πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση, η θετική συσχέτιση μεταξύ λεπτίνης και οιστραδιόλης εξαλείφτηκε, ενώ η συσχέτιση μεταξύ λεπτίνης και προγεστερόνης ή λεπτίνης και δείκτη μάζας σώματος διατηρήθηκε. Τα επίπεδα οιστραδιόλης συσχετίστηκαν σημαντικά με αυτά της προγεστερόνης από την ημέρα της επέμβασης έως και την 8^η μετεγχειρητική ημέρα στις ομάδες 1 και 2 ($r = 0.520$, $P < 0.01$, $n = 28$), και στην ομάδα 3 από την 4^η – 7^η μετεγχειρητική ημέρα ($r = 0.405$, $P < 0.05$, $n = 24$). Τέλος, δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του δείκτη μάζας σώματος και της οιστραδιόλης ή της προγεστερόνης σε όλες τις ομάδες γυναικών.

5.2. Δεύτερη φάση της μελέτης

Στη δεύτερη φάση διερευνήθηκε ο ρόλος της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στην έκκριση της λεπτίνης και περιελάμβανε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομία και κοιλιακή ολική υστερεκτομία στη μέση ωοθυλακική φάση του κύκλου (6^η – 9^η ημέρα), στις οποίες χορηγήθηκαν οιστραδιόλη ή οιστραδιόλη και προγεστερόνη κατά τη μετεγχειρητική περίοδο. Ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε για σύγκριση. Τα κλινικά και ενδοκρινολογικά χαρακτηριστικά των γυναικών στις διάφορες ομάδες πριν την επέμβαση αναγράφονται στον πίνακα. 2.

Πίνακας 2. Κλινικά και ενδοκρινολογικά χαρακτηριστικά των γυναικών

	Ομάδα 4	Ομάδα 5	Ομάδα 6 (ελέγχου)
Αριθμός γυναικών	7	7	7
Ηλικία (χρόνια)	44.4 ± 0.5 (42 – 46)	43.5 ± 0.6 (41 – 46)	43.5 ± 0.6 (41 – 46)
BMI (Kg/m ²)	25.7 ± 1.2 (21 – 29)	25.3 ± 1.5 (20 – 28)	25.3 ± 1.5 (20 – 28)
FSH (IU / I)	7.6 ± 0.7 (6.2 – 10.5)	6.4 ± 0.6 (5.5 – 9.3)	6.4 ± 0.6 (5.5 – 9.3)
LH (IU/I)	4.9 ± 0.5 (4.5 – 6.0)	5.4 ± 0.5 (4.9 – 6.3)	5.4 ± 0.5 (4.9 – 6.3)
Λεπτίνη (ng/ml)	13.3 ± 3.4 (4.2 – 24.9)	16 ± 3.9 (2.8 – 24.3)	16 ± 3.9 (2.8 – 24.3)
Κορτιζόλη (μg/ dl)	24.4 ± 1.8 (21.5 – 34.7)	18.2 ± 1.0 (14.3 – 31.1)	18.2 ± 1.0 (14.3 – 31.1)

Ομάδα 4: Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη αμέσως μετά το πέρας της επέμβασης και καθ' όλη τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου.

Ομάδα 5: Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη όπως στην ομάδα 4 και προγεστερόνη από την 2^η – 6^η μετεγχειρητική ημέρα.

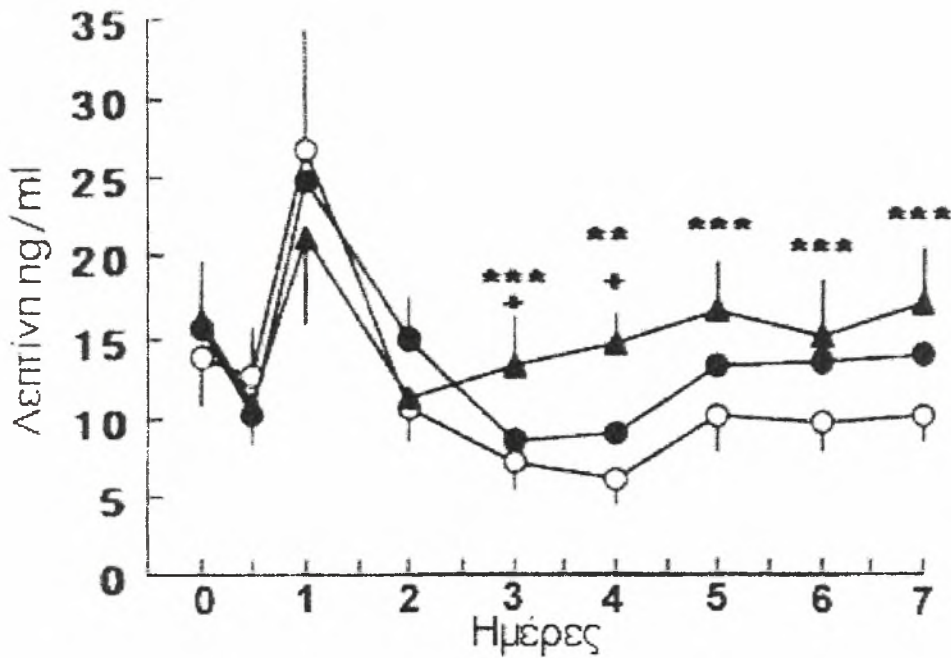
Ομάδα 6: Γυναίκες που δεν έλαβαν ορμονική θεραπεία (ομάδα ελέγχου)

BMI: Δείκτης μάζας σώματος

5.2.1 Μεταβολές στα επίπεδα της λεπτίνης

Πριν την έναρξη της επέμβασης, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα λεπτίνης, οιστραδιόλης, προγεστερόνης και κορτιζόλης ανάμεσα στις ομάδες των γυναικών (πίνακας 2, εικόνα 11). Τα επίπεδα της λεπτίνης ελαττώθηκαν σημαντικά 12 ώρες μετά την επέμβαση ($P < 0.05$), πριν εμφανίσουν μία παροδική αλλά σημαντική αύξηση κατά τη διάρκεια του πρώτου 24ωρου (1^{ης} μετεγχειρητικής ημέρας) σε όλες τις ομάδες (ομάδα 1: 26.9 ± 7.7 , ομάδα 2: 24.8 ± 2.0 και ομάδα 3: 21.2 ± 5.7 ng/ml , $P < 0.05$, εικόνα 11). Στη συνέχεια, τα επίπεδα ελαττώθηκαν την 2^η μετεγχειρητική ημέρα σε όλες τις ομάδες ($P < 0.01$) και ακόμη περισσότερο την 3^η και 4^η ημέρα στην ομάδα ελέγχου (7.2 ± 1.4 και 6.2 ± 1.4 αντίστοιχα., $P < 0.05$) και στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη (8.5 ± 1.1 και 9.0 ± 1.4 αντίστοιχα, $P < 0.05$). Αντιθέτως, στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη και προγεστερόνη, τα επίπεδα της λεπτίνης αυξήθηκαν σταδιακά από τη 2^η – 5^η ($P < 0.01$) και – 7^η ($P < 0.01$) μετεγχειρητική ημέρα (εικόνα 11). Μία μικρή αλλά σημαντική αύξηση της λεπτίνης παρατηρήθηκε από την 4^η – 5^η μετεγχειρητική ημέρα στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη, ενώ στη συνέχεια δεν παρατηρήθηκε κάποια αλλαγή. Τα επίπεδα της λεπτίνης στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη και προγεστερόνη, ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου στο διάστημα μεταξύ 3^{ης} και 7^{ης} μετεγχειρητικής ημέρας καθώς και σε σύγκριση με την ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη την 3^η και 4^η μετεγχειρητική ημέρα.

Εικόνα 11. Επίπεδα λεπτίνης (μέση τιμή \pm SEM), πριν και μετά από κοιλιακή ολική υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία .



- Η ημέρα της επέμβασης συμβολίζεται ως ημέρα 0

● Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη αμέσως μετά το πέρας της επέμβασης και καθ' όλη τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου (ομάδα 4).

○ Γυναίκες που δεν έλαβαν ορμονική θεραπεία. (ομάδα 6)

▲ Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη όπως στην ομάδα 4 και προγεστερόνη από την 2^η - 6^η μετεγχειρητική ημέρα. (ομάδα 5)

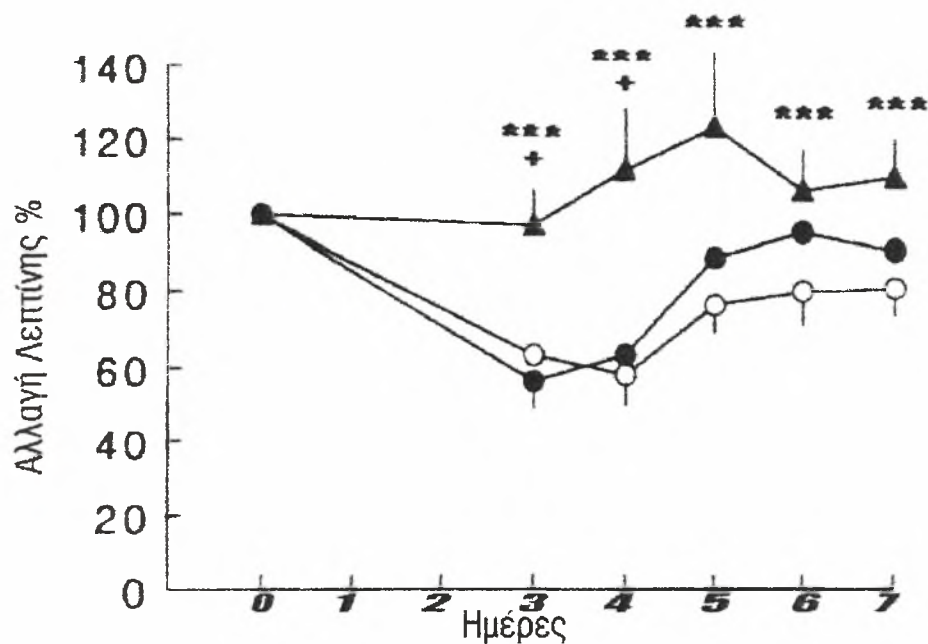
+ $P < 0.05$ (διαφορά μεταξύ των ομάδων 4 και 5)

** $P < 0.01$, *** $P < 0.05$ (διαφορές μεταξύ των ομάδων 5 και 6)

5.2.2 Μεταβολές στο ποσοστό της λεπτίνης

Στην εικόνα 12, φαίνεται το ποσοστό αλλαγής των επιπέδων της λεπτίνης σε σχέση με τα προεγχειρητικά επίπεδα. Στην ομάδα ελέγχου (ομάδα 6) και στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη (ομάδα 4), τα επίπεδα λεπτίνης ελαττώθηκαν την 3^η μετεγχειρητική ημέρα στο $63.2 \pm 6.7\%$ ($P < 0.05$) και $55 \pm 4.5\%$ ($P < 0.05$) αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες μειώσεις την 4^η μετεγχειρητική ημέρα ήταν στο $57.5 \pm 7.5\%$ (ομάδα ελέγχου, $P < 0.05$) και $63.1 \pm 11.7\%$ (ομάδα οιστραδιόλης, $P < 0.05$). Αντιθέτως, στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη και προγεστερόνη (ομάδα 5), δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στο αντίστοιχο διάστημα ($97.1 \pm 12.8\%$ και $112.0 \pm 18.2\%$ αντίστοιχα). Η ελάττωση του ποσοστού των επιπέδων της λεπτίνης, ήταν επίσης σημαντική στην ομάδα ελέγχου στο χρονικό διάστημα μεταξύ 5^{ης} – 7^{ης} μετεγχειρητικής ημέρας ($P < 0.05$). Η διαφορές στο ποσοστό αλλαγής της λεπτίνης, ήταν στατιστικά σημαντικές σε όλα τα χρονικά σημεία από τη 3^η – 7^η μετεγχειρητική ημέρα μεταξύ της ομάδας που έλαβε οιστραδιόλη + προγεστερόνη και της ομάδας ελέγχου, ενώ μεταξύ της ομάδας που έλαβε οιστραδιόλη + προγεστερόνη και της ομάδας που έλαβε οιστραδιόλη οι διαφορές ήταν σημαντικές την 3^η και 4^η μετεγχειρητική ημέρα.

Εικόνα 12. Ποσοστιαία μεταβολή της λεπτίνης κατά τη μετεγχειρητική περίοδο (μέση τιμή \pm SEM)



- Η ημέρα της επέμβασης συμβολίζεται ως ημέρα 0

● Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη αμέσως μετά το πέρας της επέμβασης και καθ' όλη τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου (ομάδα 4).

○ Γυναίκες που δεν έλαβαν ορμονική θεραπεία (ομάδα 6).

▲ Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη όπως στην ομάδα 4 και προγεστερόνη από την 2^η – 6^η μετεγχειρητική ημέρα. (ομάδα 5)

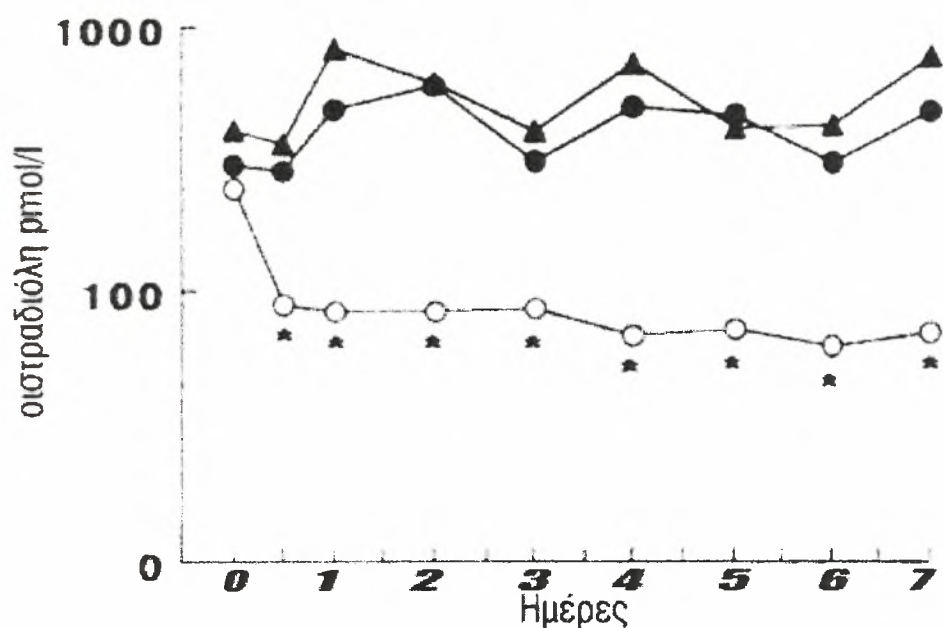
+ $P < 0.05$ (διαφορές μεταξύ των ομάδων 4 και 5)

*** $P < 0.05$ (διαφορές μεταξύ των ομάδων 5 και 6)

5.2.3 Μεταβολές στα επίπεδα της οιστραδιόλης

Τα επίπεδα της οιστραδιόλης ελαττώθηκαν σημαντικά 12 ώρες μετά την επέμβαση στην ομάδα ελέγχου και παρέμειναν κάτω από τα επίπεδα των 100 pmol/l μέχρι την 7^η μετεγχειρητική ημέρα (εικόνα 13). Αντιθέτως, στις ομάδες που έλαβαν οιστραδιόλη ή/και προγεστερόνη, τα επίπεδα της οιστραδιόλης δεν ελαττώθηκαν αλλά παρέμειναν σε προεγχειρητικά ή μεγαλύτερα επίπεδα καθ' όλη την διάρκεια της μελέτης. Σε όλα τα χρονικά σημεία τα επίπεδα της οιστραδιόλης ήταν σημαντικά υψηλότερα στις ομάδες αυτές σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

Εικόνα 13. Επίπεδα οιστραδιόλης (μέση τιμή \pm SEM), πριν και μετά από κοιλιακή ολική υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία .



● Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη αμέσως μετά το πέρας της επέμβασης και καθ' όλη τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου (ομάδα 4)

○ Γυναίκες που δεν έλαβαν ορμονική θεραπεία (ομάδα 6)

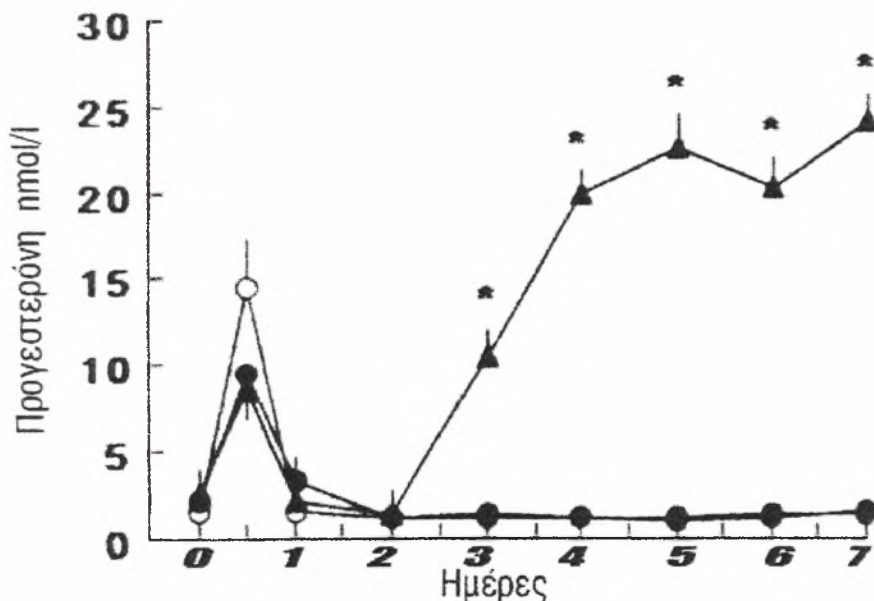
▲ Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη όπως στην ομάδα 4 και προγεστερόνη από την 2^η – 6^η μετεγχειρητική ημέρα (ομάδα 5)

* $P < 0.001$ (διαφορά ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και τις ομάδες που έλαβαν ορμονική θεραπεία)

5.2.4 Μεταβολές στα επίπεδα της προγεστερόνης

Σε ό,τι αφορά σε τιμές της προγεστερόνης, παρατηρήθηκε μία παροδική αλλά σημαντική αύξηση τις πρώτες 12 ώρες μετά την επέμβαση ($P < 0.001$), και στη συνέχεια ελαττώθηκαν σε προεγχειρητικά επίπεδα την 1^η μετεγχειρητική ημέρα (εικόνα 14). Μία σημαντική ελάττωση σημειώθηκε την 1^η προς 2^η μετεγχειρητική ημέρα σε όλες τις ομάδες. Από την 2^η – 7^η μετεγχειρητική ημέρα, η προγεστερόνη παρέμεινε σε χαμηλά επίπεδα στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα έλαβε οιστραδιόλη, ενώ στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη + προγεστερόνη σημειώθηκε γρήγορη αύξηση της από τη 2^η – 4^η μετεγχειρητική ημέρα και παρέμεινε χωρίς αλλαγή σε αυξημένα επίπεδα μέχρι την 7^η μετεγχειρητική ημέρα λόγω εξωγενούς χορήγησης της ορμόνης αυτής ($P < 0.001$).

Εικόνα 14. Επίπεδα προγεστερόνης (μέση τιμή \pm SEM), πριν και μετά από κοιλιακή ολική υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία (ημέρα 0).



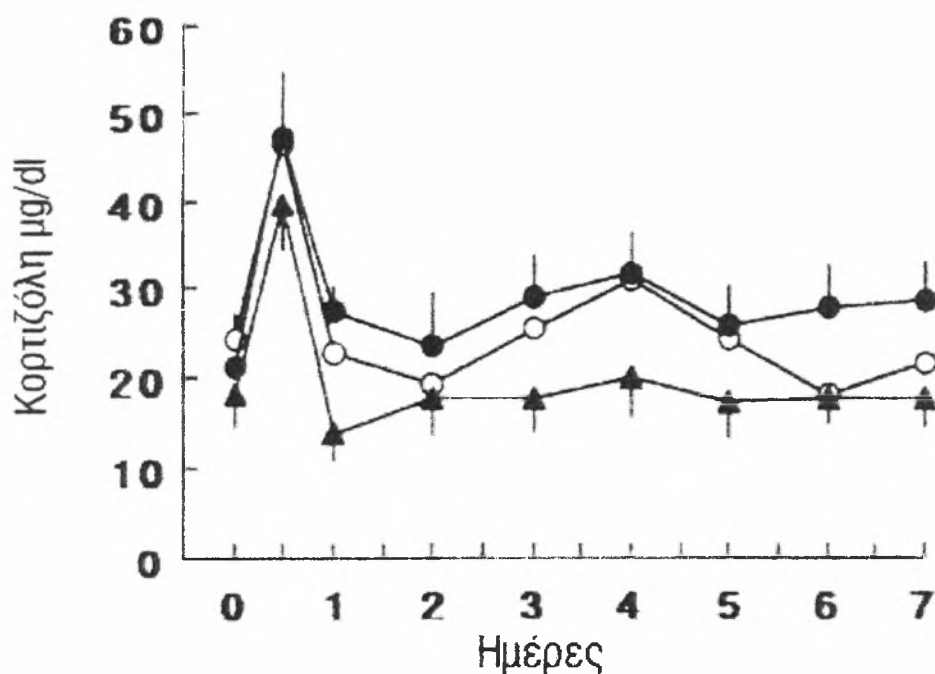
- Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη αμέσως μετά το πέρας της επέμβασης και καθ' όλη τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου (ομάδα 4).
- Γυναίκες που δεν έλαβαν ορμονική θεραπεία (ομάδα 6).
- ▲ Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη όπως στην ομάδα 4 και προγεστερόνη από την 2^η – 6^η μετεγχειρητική ημέρα (ομάδα 5).

* $P < 0.001$ (διαφορά ανάμεσα στην ομάδα 5 και τις ομάδες 4 και 6)

5.2.5 Μεταβολές στα επίπεδα της κορτιζόλης

Μία παροδική αλλά σημαντική αύξηση ($P < 0.001$) ταυτόχρονα με την αύξηση της προγεστερόνης, παρατηρήθηκε επίσης στα επίπεδα της κορτιζόλης 12 ώρες μετά την επέμβαση (εικόνα 15). Στη συνέχεια, τα επίπεδα της ελαττώθηκαν την 1^η μετεγχειρητική ημέρα, παραμένοντας αμετάβλητα στο υπόλοιπο διάστημα της μελέτης, αν και σημειώθηκε μία τάση για χαμηλότερες τιμές στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη + προγεστερόνη.

Εικόνα 15. Επίπεδα κορτιζόλης (μέση τιμή \pm SEM), πριν και μετά από κοιλιακή ολική υστερεκτομία και αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομία (ημέρα 0)



- Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη αμέσως μετά το πέρας της επέμβασης και καθ' όλη τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου (ομάδα 4).
- Γυναίκες που δεν έλαβαν ορμονική θεραπεία (ομάδα 6).
- ▲ Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη όπως στην ομάδα 4 και προγεστερόνη από την 2^η – 6^η μετεγχειρητική ημέρα (ομάδα 5).

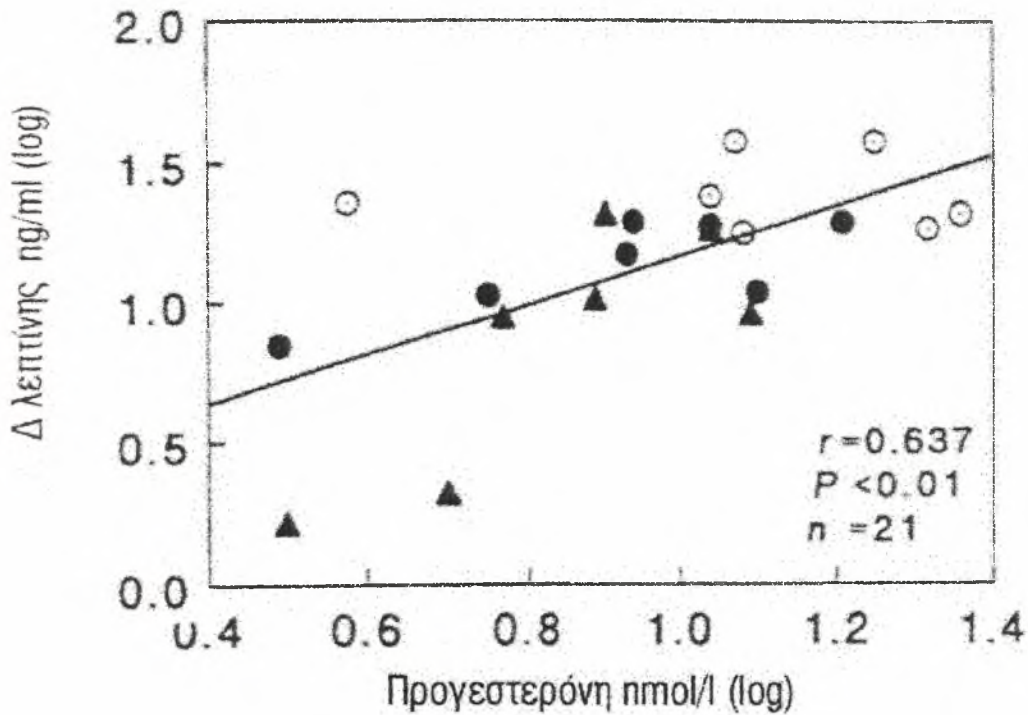
5.2.6 Μεταβολές στο σωματικό βάρος και το δείκτη μάζας σώματος (BMI)

Σημαντική ελάττωση του σωματικού βάρους από την ημέρα της επέμβασης έως την 7^η μετεγχειρητική ημέρα σημειώθηκε στην ομάδα ελέγχου (2.7 ± 0.1 Kg) και στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη από την ημέρα της επέμβασης (3.6 ± 0.1 Kg, $P < 0.001$), αλλά όχι στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη + προγεστερόνη (1.0 ± 0.5 Kg). Κατά συνέπεια, ο δείκτης μάζας σώματος ελαττώθηκε στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη από την ημέρα της επέμβασης, αλλά όχι στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη + προγεστερόνη.

5.2.7 Συσχετίσεις μεταξύ λεπτίνης και προγεστερόνης, οιστραδιόλης, κορτιζόλης και δείκτη μάζας σώματος

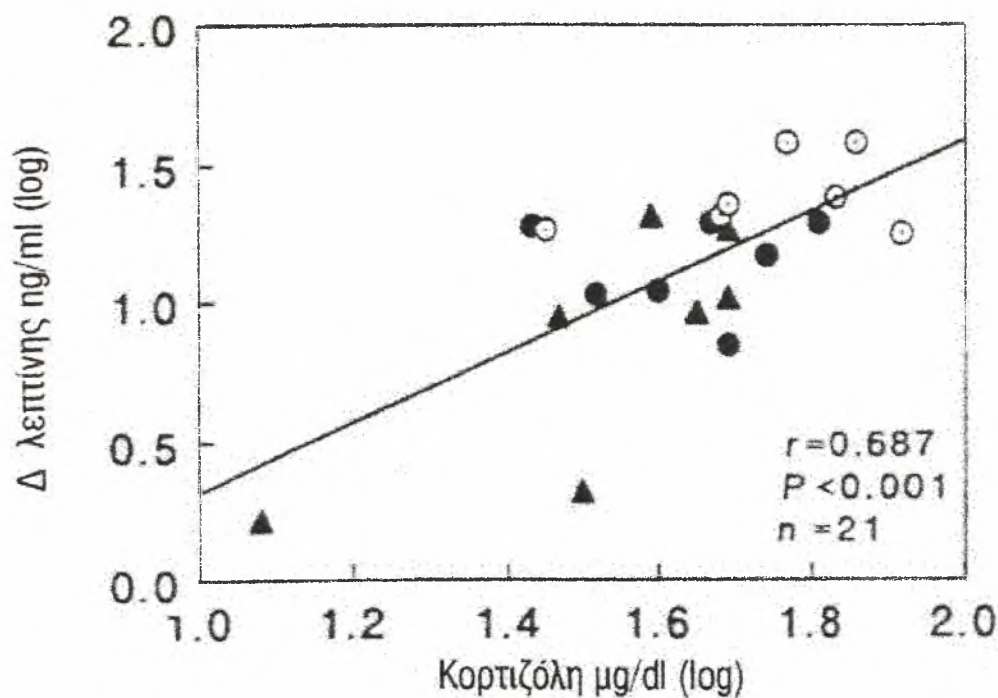
Τα επίπεδα λεπτίνης πριν και μετά την επέμβαση, συσχετίστηκαν σημαντικά με το δείκτη μάζας σώματος σε όλες τις ομάδες (πριν την επέμβαση: $r = 0.555$, $P < 0.01$, $n = 21$ και την 7^η μετεγχειρητική ημέρα: $r = 0.496$, $P < 0.05$, $n = 21$). Σημαντικές επίσης συσχετίσεις βρέθηκαν από την 2^η – 7^η μετεγχειρητική ημέρα μεταξύ λεπτίνης και προγεστερόνης ($r = 0.409$, $P < 0.01$, $n = 42$), και μεταξύ λεπτίνης και οιστραδιόλης ($r = 0.363$, $P < 0.05$, $n = 42$) μόνο στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη + προγεστερόνη. Όταν εφαρμόστηκε η στατιστική μέθοδος της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης, οι αλλαγές του δείκτη μάζας σώματος από την 2^η – 7^η μετεγχειρητική ημέρα ήταν ο πιο σημαντικός παράγοντας ο οποίος συσχετίστηκε σημαντικά με τα επίπεδα της λεπτίνης σε όλες τις ομάδες. (ομάδα ελέγχου: $r = 0.419$, $P < 0.05$; ομάδα οιστραδιόλης: $r = 0.400$, $P < 0.01$; ομάδα οιστραδιόλης + προγεστερόνης: $r = 0.728$, $P < 0.001$, $n = 42$). Ωστόσο, στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη + προγεστερόνη, η προγεστερόνη συσχετίστηκε σημαντικά με τα επίπεδα της λεπτίνης ανεξάρτητα από τις αλλαγές στο δείκτη μάζας σώματος. Όταν και οι τρεις ομάδες συνδυάστηκαν, οι λογαριθμικές τιμές της αύξησης (increment) της λεπτίνης κατά τη διάρκεια των πρώτων 12 – 24 ωρών μετά την επέμβαση, συσχετίστηκαν με αυτές της κορτιζόλης ($r = 0.687$, $P < 0.001$, $n = 21$) και της προγεστερόνης ($r = 0.637$, $P < 0.01$, $n = 21$) στις 12 ώρες (εικόνες 16 και 17). Μεταξύ των τιμών της κορτιζόλης και της προγεστερόνης την ημέρα 0 (0 και 12 h) και ημέρα 1 υπήρχε σημαντική θετική συσχέτιση ($r = 0.641$, $P < 0.001$, $n = 63$).

Εικόνα 16. Συσχέτιση των λογαριθμικών τιμών της αύξησης (increment) της λεπτίνης (Δ λεπτίνης) κατά τη διάρκεια των πρώτων 12 - 24 ωρών από την επέμβαση με τις τιμές της προγεστερόνης 12 ώρες μετά την επέμβαση (κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων).



- Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη αμέσως μετά το πέρας της επέμβασης και καθ' όλη τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου (ομάδα 4).
- Γυναίκες που δεν έλαβαν ορμονική θεραπεία (ομάδα 6).
- ▲ Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη όπως στην ομάδα 4 και προγεστερόνη από την 2^η - 6^η μετεγχειρητική ημέρα (ομάδα 5).

Εικόνα 17. Συσχέτιση των λογαριθμικών τιμών της αύξησης (increment) της λεπτίνης (Δ λεπτίνης) κατά τη διάρκεια των πρώτων 12 – 24 ωρών από την επέμβαση με τις τιμές της κορτιζόλης 12 ώρες από την επέμβαση (κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων).



- Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη αμέσως μετά το πέρας της επέμβασης και καθ' όλη τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου (ομάδα 4).
- Γυναίκες που δεν έλαβαν ορμονική θεραπεία (ομάδα 6).
- ▲ Γυναίκες που έλαβαν οιστραδιόλη όπως στην ομάδα 4 και προγεστερόνη από την 2^η – 6^η μετεγχειρητική ημέρα (ομάδα 5).

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Μολονότι υπάρχουν αρκετά στοιχεία που ενισχύουν την άποψη ότι η λεπτίνη εμπλέκεται στη λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος σε τρωκτικά και ανώτερα θηλαστικά, ο ρόλος της στην ανθρώπινη γονιμότητα είναι ακόμη υπό διερεύνηση. Διάφορες μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η οιστραδιόλη υπεισέρχεται στη ρύθμιση των επιπέδων της λεπτίνης, ωστόσο, στον άνθρωπο ένας αντίστοιχος ρόλος δεν είναι ξεκάθαρος. Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη στη διεθνή βιβλιογραφία, στην οποία διερευνήθηκαν αλλαγές στα επίπεδα της λεπτίνης σε γυναίκες μετά από λαπαροτομία. Επίσης, διερευνήθηκε εάν και κατά πόσο μία ακολουθία γεγονότων με την έννοια των αλλαγών της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης (χορηγούμενων εξωγενώς), και που ομοιάζουν με αυτές που συμβαίνουν στο φυσιολογικό κύκλο, μπορούν να επηρεάσουν την έκκριση της λεπτίνης κατά την διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο σκοπός της μελέτης δεν ήταν να διερευνήσει το ρόλο των δύο στεροειδικών ορμονών ξεχωριστά.

Τα επίπεδα της λεπτίνης ελαττώθηκαν σημαντικά και στις δύο φάσεις του κύκλου κατά τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου, καθώς και στην ομάδα ελέγχου που υποβλήθηκε σε χολοκυστεκτομία. Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα επίπεδα της λεπτίνης την 4^η μετεγχειρητική ημέρα ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τα προεγχειρητικά επίπεδα. Το εύρημα αυτό είναι δύσκολο να ερμηνευθεί. Είναι γνωστό ότι τα επίπεδα της λεπτίνης ελαττώνονται σημαντικά μετά από στέρηση τροφής (φθάνουν στο ναδίρ μετά από 36 ώρες, [86]). Στη παρούσα μελέτη, τα επίπεδα της λεπτίνης μετά τη μείωση τους μέχρι την 4^η μετεγχειρητική ημέρα παρέμειναν αμετάβλητα στην περίοδο που οι ασθενείς άρχισαν να σιτίζονται κανονικά, μολονότι μία αύξηση τους (από την 4^η – 8^η ημέρα) παρατηρήθηκε στην ομάδα που υποβλήθηκε σε χολοκυστεκτομία, χωρίς ωστόσο σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Μολονότι η στέρηση τροφής οδηγεί σε δραματική μείωση των επιπέδων της λεπτίνης, η υπερσίτιση για μία ημέρα οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της λεπτίνης κατά 40% χωρίς ουσιαστική αλλαγή του σωματικού βάρους [85]. Στη παρούσα μελέτη, οι ασθενείς επανασιτίστηκαν βαθμιαία και ίσως έτσι εξηγείται το γεγονός ότι τα επίπεδα της λεπτίνης παρέμειναν αμετάβλητα προς το τέλος της μετεγχειρητικής περιόδου στις ομάδες που υποβλήθηκαν σε ωοθηκτομία. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις ομάδες αυτές το σωματικό βάρος δεν επηρεάστηκε σημαντικά σε αντίθεση με την ομάδα που υποβλήθηκε σε χολοκυστεκτομία, όπου παρατηρήθηκε σημαντικότερη μείωση του σωματικού βάρους και του δείκτη μάζας σώματος, εύρημα που έρχεται σε αντίθεση με τη γενική παραδοχή ότι ο

δείκτης μάζας σώματος σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα της λεπτίνης. Είναι πιθανό στο στάδιο αυτό της μετεγχειρητικής περιόδου, η πρόσληψη θερμίδων να αποτελεί ισχυρότερο ρυθμιστή της έκκρισης της λεπτίνης παρά το σωματικό βάρος ή ο δείκτης μάζας σώματος.

Ενδιαφέρον εύρημα της παρούσας μελέτης, ήταν ότι προηγήθηκε της ελάττωσης των επιπέδων της λεπτίνης μία απότομη αύξηση τους το πρώτο 24ωρο. Μία σημαντική αύξηση της κορτιζόλης και της προγεστερόνης σε όλες τις ομάδες και μία σημαντική ελάττωση της οιστραδιόλης στις γυναίκες που υποβλήθηκαν σε ωθηκεκτομία, προηγήθηκε της παροδικής αυτής αύξησης της λεπτίνης. Η παροδική αυτή αύξηση της λεπτίνης φαίνεται απίθανο να σχετίζεται με την απότομη ελάττωση των επιπέδων της οιστραδιόλης δεδομένου ότι παρόμοια παροδική αύξηση της λεπτίνης παρατηρήθηκε και στην ομάδα ελέγχου στην οποία τα επίπεδα της οιστραδιόλης, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ομάδες, παρουσίασαν αύξηση. Ο τύπος της επέμβασης, δεν φαίνεται επίσης να σχετίζεται με την αύξηση αυτή καθώς παρόμοια αύξηση βρέθηκε και σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε χολοκυστεκτομία. Είναι πιθανό, αυξημένα ποσά λεπτίνης να απελευθερώθηκαν κατά την διάνοιξη του υποδόριου λιπώδη ιστού, υπόθεση η οποία, ωστόσο, χρειάζεται επιβεβαίωση. Επίσης, η αύξηση αυτή μπορεί να αποτελεί μία απάντηση στο stress της επέμβασης. Παρόμοια αύξηση παρατηρήθηκε επίσης στις γοναδοτροπίνες και στα γοναδικά στεροειδή τόσο στη παρούσα μελέτη όσο και σε προηγούμενες μελέτες [292 - 293]. Η άποψη αυτή ενισχύεται περαιτέρω από το γεγονός ότι πριν της αύξησης της λεπτίνης προηγήθηκε αύξηση της κορτιζόλης, τα επίπεδα της οποίας συσχετίστηκαν σημαντικά με αυτά της λεπτίνης. Δεδομένου ότι η δεξαμεθαζόνη έχει βρεθεί ότι ασκεί διεγερτική δράση στην έκκριση της λεπτίνης in vivo (Larson and Ahren 1996 [146], Papaspyrou – Rao et al 1997 [148]), είναι πιθανό η σχετιζόμενη με το stress της επέμβασης αύξηση της κορτιζόλης να είχε ως αποτέλεσμα την επακόλουθη αύξηση της λεπτίνης.

Ένα άλλο ενδιαφέρον εύρημα στη παρούσα μελέτη, είναι ότι παράλληλα με την κορτιζόλη αυξήθηκε παροδικά και η προγεστερόνη η προέλευση της οποίας ήταν από τα επινεφρίδια δεδομένου ότι οι ωθήκες είχαν ήδη αφαιρεθεί. Επομένως, η διεγερτική δράση της προγεστερόνης στο στάδιο αυτό δεν μπορεί να αποκλειστεί καθώς βρέθηκαν θετικές συσχετίσεις μεταξύ προγεστερόνης και λεπτίνης.

Προηγούμενες μελέτες σε τρωκτικά (αρουραίους) [101], έχουν δείξει ότι η χορήγηση οιστραδιόλης αποκατέστησε τα ελαττωμένα επίπεδα της λεπτίνης που παρατηρήθηκαν μετά από ωθηκεκτομία. Ωστόσο, σε άλλες μελέτες δεν επιβεβαιώθηκαν τα παραπάνω ευρήματα, ενώ βρέθηκε ότι τα επίπεδα της λεπτίνης δεν μεταβάλλονται από την ωθηκεκτομία [287, 288]. Αντιθέτως, η χορήγηση οιστραδιόλης προκάλεσε ελάττωση των επιπέδων της

λεπτίνης, η οποία αποδόθηκε στη λιπολυτική δράση της οιστραδιόλης [287]. Στην παρούσα μελέτη, η χορήγηση οιστραδιόλης δεν επηρέασε τα επίπεδα της λεπτίνης, δηλαδή η λεπτίνη ελαττώθηκε όπως και στις γυναίκες που δεν χορηγήθηκε οιστραδιόλη. Αντίθετα, η χορήγηση οιστραδιόλης μαζί με προγεστερόνη απέτρεψε την προκαλούμενη από την ωθηκεκτομία μείωση της λεπτίνης. Η αιτία για τις διαφορές αυτές στα αποτελέσματα μεταξύ της παρούσας μελέτης και των προηγούμενων μελετών σχετικά με την οιστραδιόλη δεν είναι ξεκάθαρη. Αξιίζει όμως να σημειωθεί ότι στη μελέτη με τους αρουραίους, η οιστραδιόλη χορηγήθηκε για μερικές εβδομάδες ενώ στη παρούσα μελέτη μόνο για λίγες ημέρες. Επίσης, η ύπαρξη διαφοράς μεταξύ των ειδών δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έρχονται επίσης σε αντίθεση με τα ευρήματα προηγούμενων μελετών, όπου η θεραπεία φυσιολογικών γυναικών με διάφορους συνδυασμούς οιστρογόνων και προγεστερόνης είτε με τη μορφή αντισυλληπτικών δισκίων είτε με τη μορφή σκευασμάτων ορμονικής υποκατάστασης, δεν επηρέασαν τα επίπεδα της λεπτίνης (Cella et al 2000 [264], Castrance et al 1998 [289]). Ωστόσο, υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των μελετών αυτών και της παρούσης μελέτης, με την έννοια του σχεδιασμού και του σκοπού της μελέτης, καθώς επίσης και διαφορές που έχουν σχέση με τον τύπο και τη δόση των στεροειδών που χρησιμοποιήθηκαν. Συγκεκριμένα, το αντισυλληπτικό χάπι περιέχει συνθετικά στεροειδή που μπορούν να δρουν διαφορετικά από τα φυσικά στεροειδή, ενώ στα σκευάσματα ορμονικής υποκατάστασης οι συγκεντρώσεις των στεροειδών που επιτεύχθηκαν ίσως ήταν ανεπαρκείς να διεγείρουν τα λιποκύτταρα. Κατά τη διάρκεια της θεραπείας με οιστραδιόλη και προγεστερόνη στη παρούσα εργασία, οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης παρουσίασαν ένα πρότυπο αύξησης παρόμοιο με αυτό που παρατηρείται στο προωορρηκτικό στάδιο του κύκλου, ενώ οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης αν και παρουσίασαν μία απότομη αύξηση, ήταν παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται στην ωχρινική φάση του κύκλου. Είναι επομένως πιθανό, για την πρόκληση διεγερτικού αποτελέσματος στην έκκριση της λεπτίνης να απαιτούνται δόσεις των συγκεκριμένων στεροειδών ορμονών τέτοιες ώστε να προκληθεί απότομη αύξηση της στάθμης τους στο πλάσμα ακόμη και για μικρό χρονικό διάστημα παρά παρατεταμένη χορήγηση ενός σκευάσματος με χαμηλή περιεκτικότητα στεροειδούς.

Παρά το γεγονός ότι ο δείκτης μάζας σώματος σχετίζεται σταθερά με τα επίπεδα της λεπτίνης και θα μπορούσε να εξηγήσει κατά ένα μέρος την ελάττωση της μετά την ωθηκεκτομία, βρέθηκε ότι η χορήγηση προγεστερόνης και οιστραδιόλης απέτρεψε την προκαλούμενη από την ωθηκεκτομία ελάττωση της λεπτίνης, ενώ η οιστραδιόλη από μόνη της δεν είχε κάποιο αποτέλεσμα. Δεδομένου ότι με την ορμονική θεραπεία επιτεύχθηκαν

συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται στον εμμηνορυσιακό κύκλο, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι η οιστραδιόλη σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις έχει περιορισμένο ρόλο στη ρύθμιση της έκκρισης της λεπτίνης, ενώ ο αντίστοιχος ρόλος της προγεστερόνης είναι σημαντικός. Ωστόσο, το ενδεχόμενο της ευαισθητοποίησης των λιποκυττάρων από την οιστραδιόλη σε άλλες ορμόνες με διεγερτική δράση, όπως η προγεστερόνη, δεν μπορεί να αποκλειστεί δεδομένου ότι η οιστραδιόλη έχει διαπιστωθεί να ασκεί διεγερτική δράση *in vitro* σε καλλιέργειες ανθρώπινων λιποκυττάρων (Casabiel et al 1998 [99]). Η παρουσία υποδοχέων των οιστρογόνων στο λιπώδη ιστό [294], υποδηλώνει ότι τα αποτελέσματα των γοναδικών στεροειδών στη σύνθεση της λεπτίνης συμβαίνει άμεσα στα λιποκύτταρα. Το γεγονός ότι τα επίπεδα της λεπτίνης ελαττώνονται σημαντικά μετά από ωθηκετομία στα τρωκτικά υποδηλώνει ότι η λεπτίνη αποτελεί ένα τροφικό παράγοντα στην έκκριση της λεπτίνης. Παράδοξο είναι, ωστόσο, το γεγονός ότι η ελάττωση αυτή συνοδεύεται από παράλληλη υπερφαγία και αύξηση της λιπώδους μάζας των τρωκτικών, υποδηλώνοντας ότι η έλλειψη των ενδογενών οιστρογόνων αποτελεί ισχυρό παράγοντα στη ρύθμιση των επιπέδων της λεπτίνης. Επίσης, θετικές συσχετίσεις μεταξύ οιστραδιόλης και λεπτίνης έχουν βρεθεί και στο γεννητικό κύκλο με σημαντική αύξηση της λεπτίνης στην όψιμη ωοθυλακική φάση (Μεσσήνης και συν 1998 [102], Cella et al 2000 [264]). Ωστόσο, η πιθανότητα αυτή απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση καθώς στη παρούσα μελέτη ομάδα γυναικών στην οποία να χορηγήθηκε μόνο προγεστερόνη δεν συμπεριλήφθηκε. Εναλλακτικά, η οιστραδιόλη μπορεί να ασκεί ένα όψιμο αποτέλεσμα στην έκκριση της λεπτίνης, δεδομένου ότι μία τάση για υψηλότερες τιμές λεπτίνης κατά τη διάρκεια του δεύτερου μισού της μετεγχειρητικής περιόδου, παρατηρήθηκε στις γυναίκες που έλαβαν μόνο οιστραδιόλη.

Η υπόθεση της συμμετοχής της ωθήκης στην αύξηση των επιπέδων της λεπτίνης συνάδει με το γεγονός ότι η λεπτίνη εκκρίνεται από την ωθήκη και επιπλέον οι υποδοχείς της λεπτίνης εκφράζονται στο όργανο αυτό. Η παρουσία της λεπτίνης στο ωοθυλακικό υγρό εγείρει τη πιθανότητα ότι το προωορρηκτικό ωοθυλάκιο μπορεί να αποτελεί σημαντική πηγή της ορμόνης αυτής κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης του κύκλου. Η παραπάνω άποψη ενισχύεται από δεδομένα που έδειξαν ότι η έκφραση του mRNA του υποδοχέα της λεπτίνης εμφανίζει χαμηλή έκφραση στην πρώιμη παραγωγική φάση του ενδομητρίου, αυξάνει βαθμιαία κατά τη διάρκεια της παραγωγικής φάσης και εμφανίζει την υψηλότερη έκφραση στην πρώιμη εκκριτική φάση [267] .

Οι διαφορές στην ελάττωση του σωματικού βάρους και του δείκτη μάζας σώματος κατά τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου μεταξύ των ομάδων που έλαβαν οιστραδιόλη και

προγεστερόνη ή μόνο οιστραδιόλη, είναι δύσκολο να εξηγηθούν. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, στη δεύτερη φάση της μελέτης, σημαντική ελάττωση του σωματικού βάρους και κατά συνέπεια του BMI από την ημέρα της επέμβασης έως και την 7^η μετεγχειρητική ημέρα σημειώθηκε στην ομάδα ελέγχου (2.7 ± 0.1 Kg) και στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη (3.6 ± 0.1 Kg, $P < 0.001$), αλλά όχι στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη + προγεστερόνη (1.0 ± 0.5 Kg). Φαίνεται απίθανο οι διαφορές αυτές να οφείλονται σε διαφορές στα αποθέματα λίπους, δεδομένου ότι παρόμοιοι διαιτητικοί περιορισμοί εφαρμόστηκαν σε όλες τις ομάδες. Μία πιθανή εξήγηση είναι να οφείλονται σε κατακράτηση ύδατος, η οποία μπορεί να συμβεί στην ωχρινική φάση του κύκλου, αν και η εκδοχή αυτή δεν διερευνήθηκε στη παρούσα μελέτη. Από την άλλη πλευρά, είναι γνωστό ότι τα οιστρογόνα θεωρούνται καταβολικοί παράγοντες προκαλώντας ελάττωση της πρόσληψης τροφής και του σωματικού βάρους, ενώ η χορήγηση προγεστερόνης προκαλεί τα αντίθετα αποτελέσματα. Οι δράσεις αυτές των οιστρογόνων έχουν επιβεβαιωθεί επαρκώς σε τρωκτικά από μελέτες, που έχουν δείξει ότι φυσιολογικά επίπεδα οιστρογόνων σχετίζονται αρνητικά με την πρόσληψη τροφής κατά τη διάρκεια κύκλων [295-296], ενώ η ωθηκεκτομία οδηγεί σε αύξηση της πρόσληψης τροφής, αποτέλεσμα όμως το οποίο αντιστρέφεται μετά από φυσιολογική εξωγενή χορήγηση οιστρογόνων [297-298]. Η χορήγηση υπερφυσιολογικών δόσεων οιστρογόνων σε ποντικούς οδηγεί σε ελάττωση του σωματικού βάρους κατά 30%, πιθανώς λόγω ελάττωσης της λιπώδους μάζας [299-300]. Επίσης, σε αρουραίους, μία σημαντική δοσο-εξαρτώμενη ανορεξία προκαλείται μετά από φαρμακολογική χορήγηση οιστρογόνων [296 -298]. Στα ίδια τρωκτικά, φαίνεται επίσης ότι τα οιστρογόνα αυξάνουν την κατανάλωση ενέργειας μολονότι οι υπεύθυνοι μηχανισμοί παραμένουν ασαφείς [301]. Παρά τις ενδιαφέρουσες αυτές παρατηρήσεις στα πειραματόζωα, τα αποτελέσματα της ωθηκεκτομίας ή της εμμηνόπαυσης στο σωματικό βάρος στους ανθρώπους φαίνεται να έχουν μικρότερη σημασία. Σε δύο προοπτικές μελέτες, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο σωματικό βάρος ή στη λιπώδη μάζα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που έλαβαν οιστρογόνα συγκρινόμενες με την ομάδα ελέγχου, μολονότι παρατηρήθηκε μία τάση προς το αποτέλεσμα αυτό [302-303]. Ωστόσο, σε δύο άλλες προοπτικές μελέτες βρέθηκε ότι η χορήγηση οιστρογόνων απέτρεψε την αύξηση της λιπώδους μάζας (περίπου 1Kg), καθώς και την ανακατανομή της λιπώδους μάζας από το υποδόριο στο σπλαγχνικό τμήμα [304-305]. Είναι πιθανό ο διαφορετικός τρόπος χορήγησης των φυσικών οιστρογόνων στη παρούσα μελέτη να πέτυχε συγκεντρώσεις οι οποίες ήταν ικανές να εμφανίσουν ένα αρνητικό αποτέλεσμα στο σωματικό βάρος, το οποίο όμως αμβλύθηκε από τη συγχορήγηση προγεστερόνης.

Στην παρούσα μελέτη, ασαφής επίσης είναι και η αιτία της αύξησης της λεπτίνης κατά το δεύτερο μισό της μετεγχειρητικής περιόδου στην ομάδα που υποβλήθηκε σε χολοκυστεκτομία (ομάδα ελέγχου), καθώς και στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη, εύρημα που έρχεται σε αντίθεση με αυτά που προαναφέρθηκαν παραπάνω. Η αύξηση της πρόσληψης τροφής (θερμίδων) στο στάδιο αυτό ίσως αποτελεί μία βάσιμη αιτία, αν και μία όσιμη δράση της οιστραδιόλης, όπως προαναφέρθηκε δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Ανακεφαλαιώνοντας, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν προηγούμενες παρατηρήσεις ότι οι συγκεντρώσεις της λεπτίνης είναι υψηλότερες στην ωχρινική από ό,τι στην ωοθυλακική φάση του κύκλου. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν για πρώτη φορά, ότι τα επίπεδα της λεπτίνης μετα από λαπαροτομία σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, αυξάνονται παροδικά την πρώτη μετεγχειρητική ημέρα και στη συνέχεια ελαττώνονται ταχέως έως την 4^η μετεγχειρητική ημέρα ανεξάρτητα εάν έχει προηγηθεί ή όχι αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία. Μία σημαντική αύξηση της κορτιζόλης και της προγεστερόνης προηγήθηκε της παροδικής αύξησης της λεπτίνης με σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ των ορμονών αυτών, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της οιστραδιόλης στο στάδιο αυτό.

Τέλος, η επακόλουθη ελάττωση της λεπτίνης σε κατώτερα από τα βασικά επίπεδα, ανεστάλη από τη χορήγηση προγεστερόνης και οιστραδιόλης αλλά όχι από τη χορήγηση μόνο οιστραδιόλης. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν, ότι η προγεστερόνη και η κορτιζόλη ασκούν διεγερτική επίδραση στην έκκριση της λεπτίνης ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση της οιστραδιόλης.

Από φυσιολογική άποψη, τα ευρήματα μας ενισχύουν την υπόθεση ότι οι αυξανόμενες συγκεντρώσεις οιστραδιόλης και προγεστερόνης κατά τη διάρκεια του προωορρηκτικού σταδίου και της ωχρινικής φάσης του κύκλου, είναι πιθανώς υπεύθυνες για την αύξηση της λεπτίνης κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής, παρά το γεγονός ότι υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με τη σημαντική συσχέτιση της λεπτίνης και της προγεστερόνης κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης (Hardie et al 1997 [235], Quinton et al 1999 [232]). Μια άλλη πιθανή εξήγηση της αύξησης της λεπτίνης στην ωχρινική φάση θα μπορούσε να είναι η αύξηση της πρόσληψης των θερμίδων, καθώς έχει αναφερθεί ότι η πρόσληψη θερμίδων είναι μεγαλύτερη στην ωχρινική φάση [265]. Ωστόσο, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η πρόσληψη τροφής και ο βασικός μεταβολισμός δεν παρουσιάζουν σημαντικές αλλαγές κατά την διάρκεια του κύκλου [266]. Η φυσιολογική σημασία της αύξησης της λεπτίνης κατά τη διάρκεια της ωχρινικής φάσης δεν έχει ακόμη αποσαφηνισθεί. Πρόσφατα δεδομένα από in vitro μελέτες [254], έδειξαν ότι η λεπτίνη στο στάδιο αυτό μπορεί να διαδραματίσει ένα ρόλο στην εμφύτευση της βλαστοκύστης μέσω ενός μηχανισμού που επηρεάζει τη διείσδυση

της τροφοβλάστης. Επίσης, από τελεολογικής πλευράς, είναι πιθανό τα αυξημένα επίπεδα λεπτίνης να ενημερώνουν τον υποθάλαμο για τις αυξημένες μεταβολικές απαιτήσεις μιας πιθανής κύησης, με την έννοια ότι το ανθρώπινο σώμα διαθέτει τα απαραίτητα αποθέματα λίπους για να αντεπεξέλθει σε μία υπερμεταβολική κατάσταση, όπως η κύηση.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων που αφορούν τις μεταβολές των επιπέδων της λεπτίνης μετά από λαπαροτομία σε συνδυασμό ή όχι με αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία, καθώς και στις μεταβολές τους μετά από ορμονική θεραπεία με οιστραδιόλη ή οιστραδιόλη και προγεστερόνη, οδηγεί στα ακόλουθα συμπεράσματα::

1. Διαπιστώθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της λεπτίνης είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερες στην ωχρινική από ό,τι στην ωοθυλακική φάση του κύκλου.
2. Τα επίπεδα λεπτίνης του ορού ελαττώθηκαν μετά από λαπαροτομία ανεξάρτητα αν εκτελέστηκε ή όχι αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία.
3. Παροδική αύξηση των επιπέδων της λεπτίνης παρατηρήθηκε το πρώτο 24ωρο μετά την επέμβαση πριν την επακόλουθη ελάττωση τους, της οποίας επίσης προηγήθηκε παροδική σημαντική αύξηση της κορτιζόλης και της προγεστερόνης.
4. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση των τιμών της λεπτίνης με εκείνες της κορτιζόλης και της προγεστερόνης κατά το στάδιο της παροδικής αύξησης της λεπτίνης.
5. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του δείκτη μάζας σώματος και των επιπέδων της λεπτίνης σε όλα τα στάδια της μετεγχειρητικής περιόδου.
6. Η χορήγηση οιστραδιόλης δεν επηρέασε την ελάττωση των επιπέδων της λεπτίνης μετά από την επέμβαση.
7. Η χορήγηση προγεστερόνης και οιστραδιόλης απέτρεψε την ελάττωση των επιπέδων της λεπτίνης που προκλήθηκε από την επέμβαση.
8. Δεν διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ της οιστραδιόλης και της λεπτίνης σε όλα τα στάδια της μελέτης
9. Διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της προγεστερόνης και της λεπτίνης κατά τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου μετά από ωοθηκεκτομία, καθώς και μετά από τη χορήγηση προγεστερόνης και οιστραδιόλης, ανεξάρτητα από το δείκτη μάζα σώματος.
10. Η παρούσα μελέτη παρέχει για πρώτη φορά δεδομένα σχετικά με το ρόλο των ωοθηκικών στεροειδών στην έκκριση της λεπτίνης στον άνθρωπο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μελέτη αυτή σχεδιάστηκε με σκοπό τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ γοναδικών στεροειδών και λεπτίνης μετά από λαπαροτομία σε φυσιολογικές προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, καθώς και του ρόλου της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στην έκκριση της λεπτίνης.

Για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν μελετήθηκαν συνολικά 41 γυναίκες. Η όλη μελέτη διαιρέθηκε σε δύο φάσεις.

Στην πρώτη φάση, 20 γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο διερευνήθηκαν για αλλαγές στα επίπεδα της λεπτίνης κατά τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου μετά από λαπαροτομία, εξ αυτών οι 14 υποβλήθηκαν σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων κατά τη διάρκεια είτε της μέσης - όψιμης ωοθυλακικής φάσης (ομάδα 1, 7 γυναίκες) είτε της πρώιμης - μέσης ωχρινικής φάσης του κύκλου (ομάδα 2, 7 γυναίκες), και οι υπόλοιπες 6 υποβλήθηκαν σε χολοκυστεκτομία κατά τη διάρκεια της πρώιμης - μέσης ωοθυλακικής φάσης του κύκλου (ομάδα ελέγχου).

Στη δεύτερη φάση, 21 γυναίκες υποβλήθηκαν σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων στη μέση ωοθυλακική φάση. Σε 14 από τις 21 γυναίκες, χορηγήθηκε οιστραδιόλη (7 γυναίκες) ή οιστραδιόλη και προγεστερόνη (7 γυναίκες) κατά τη μετεγχειρητική περίοδο, και οι υπόλοιπες 7 αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου και δεν έλαβαν ορμονική θεραπεία..

Στη πρώτη φάση της μελέτης, σε όλες τις ομάδες γυναικών τα επίπεδα της λεπτίνης ελαττώθηκαν ταχέως έως τη 4^η μετεγχειρητική ημέρα. Στη συνέχεια, τα επίπεδα της λεπτίνης αυξήθηκαν σημαντικά μόνο στην ομάδα ελέγχου ($P < 0.05$). Με την ανάλυση της πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης, βρέθηκε ότι τα επίπεδα της λεπτίνης συσχετίστηκαν θετικά μόνο με τον δείκτη μάζας σώματος στην ομάδα ελέγχου (ημέρα 0 και 4^η - 7^η), ενώ στις ομάδες 1 και 2 η προγεστερόνη και ο δείκτης μάζας σώματος έδειξαν ανεξάρτητες σημαντικές θετικές συσχετίσεις με τα επίπεδα της λεπτίνης (ημέρα 0 και 8^η, $r = 0.601$ και $r = 0.602$ αντίστοιχα).

Στη δεύτερη φάση της μελέτης, τα επίπεδα της λεπτίνης παρουσίασαν παροδική αλλά σημαντική αύξηση 24 ώρες μετά την επέμβαση και συσχετίστηκαν σημαντικά με τα επίπεδα της κορτιζόλης και της προγεστερόνης, τα οποία παρουσίασαν αύξηση 12 ώρες νωρίτερα. Στο στάδιο αυτό, παρατηρήθηκε σημαντική ελάττωση των επιπέδων της οιστραδιόλης. Μετά την παροδική αύξηση, τα επίπεδα της λεπτίνης ελαττώθηκαν σημαντικά μέχρι την 4^η

μετεγχειρητική ημέρα, ενώ η ελάττωση δεν παρατηρήθηκε στην ομάδα που έλαβε οιστραδιόλη και προγεστερόνη. Έτσι, στην ομάδα αυτή τα επίπεδα της λεπτίνης ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τα επίπεδα των ομάδων που έλαβαν μόνο οιστραδιόλη ή της ομάδας ελέγχου. Ο δείκτης μάζας σώματος ήταν ο σημαντικότερος υπεύθυνος παράγοντας για τις αλλαγές που παρατηρήθηκαν στα επίπεδα της λεπτίνης στη μετεγχειρητική περίοδο. Ωστόσο, διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της προγεστερόνης και της λεπτίνης κατά τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου, καθώς και μετά από τη χορήγηση προγεστερόνης και οιστραδιόλης, ανεξάρτητα από το δείκτη μάζα σώματος.

Η παρούσα εργασία δείχνει για πρώτη φορά τις σχέσεις λεπτίνης και γοναδικών στεροειδών σε φυσιολογικές γυναίκες μετά από ωθηκεκτομία. Συμπεραίνεται ότι η προγεστερόνη είναι σημαντικός παράγοντας ο οποίος διεγείρει την έκκριση της λεπτίνης σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, παρουσία οιστρογόνων. Πιθανολογείται ο ρόλος των ορμονών αυτών στην αύξηση της λεπτίνης κατά την ωχρινική φάση του κύκλου. Υπό συνθήκες stress, όπως μετά από χειρουργική επέμβαση η κορτιζόλη αποτελεί ένα πρόσθετο παράγοντα αύξησης της λεπτίνης.

Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Thessalia**Director: Prof. Ioannis E. Messinis****Investigation of the relationships between leptin and gonadal steroids in normal cycling premenopausal women after ovariectomy as well as the role of estradiol and progesterone in the secretion of leptin****By****Ioannis E. Karyotis****Summary**

The purpose of the present study was to investigate the relationships between gonadal steroids and leptin in premenopausal women with normal cycles during the postoperative period following laparotomy as well as to study the role of oestradiol and progesterone in the secretion of leptin. For that purpose, 41 women were studied in two phases. In phase I, 14 out of 20 women underwent total abdominal hysterectomy plus bilateral ovariectomy either in the mid – to late follicular phase (group 1, n = 7) or in the early to midluteal phase (group 2, n = 7), while the remaining 6 women underwent cholecystectomy in the early to midfollicular phase (control group). In phase II, 21 women underwent total abdominal hysterectomy plus bilateral ovariectomy in the mid follicular phase of the cycle. Fourteen of them, received oestradiol (7 women) or oestradiol plus progesterone (7 women) during the postoperative period, while the remaining 7 received no hormonal treatment postoperatively and were used as controls. In phase I, in all three groups, serum leptin values decreased rapidly up to postoperative day 4. Then, leptin values increased significantly only in group 3 ($P < 0.05$). With multiple regression analysis, BMI was the only parameter significantly correlated with leptin in group 3 (days 0 and 4 – 7), whereas in groups 1 and 2 progesterone and BMI showed independent significant correlations with leptin (days 0 and 8, $r = 0.601$ and $r = 0.602$ respectively). In phase II, serum leptin values showed a temporal but significant increase 24h after the operation and were significantly correlated with the cortisol and progesterone values, which increased temporarily at 12h. At that time, a marked decline in oestradiol concentrations was seen. After the temporal increase, leptin values decreased significantly up to day 4, while in the oestradiol plus progesterone group they increased and were significantly

higher than in the other groups. Body mass index (BMI) was the most important variable accounting for the changes in leptin values post – operatively. However, progesterone correlated significantly with leptin independently of BMI during the postoperative period, as well as after oestradiol plus progesterone treatment. These results suggest that progesterone and cortisol can stimulate leptin secretion in women regardless of oestradiol concentrations. In conclusion, the present study demonstrates for the first time the relationships between gonadal steroids and leptin in premenopausal women with normal cycles after ovariectomy. It is suggested that progesterone in normal concentrations exerts stimulating effects on leptin secretion in normal women, in the presence of oestradiol. It is thought likely a role of these steroids on the higher leptin concentrations in the luteal phase of the cycle. Under stress conditions, like after surgery, cortisol is an additional factor contributing to the increase of leptin.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kennedy G. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc London* 1953; 140: 578–592
2. Herey G. The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J. Physiol* 1959; 145: 336–352
3. Coleman D, Hummel K. Effects of parabiosis of normals with genetically diabetic mice. *Am. J Physiol* 1969; 217: 1298–1304
4. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425–432
5. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ et al. Identification and expression cloning of leptin receptor, OB-R. *Cell* 1995; 83: 1263–1271
6. Campfield LA, Smith FL and Burn P. The ob protein (leptin) –A link between adipose tissue mass and central neural networks. *Hormone and Metabolic Research* 1996; 28: 619–632
7. Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, Satoh N, Okazaki T, Shigemoto M, et al. Human obese gene expression: adipocyte specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 1995; 44: 855–858
8. Madej T, Boguski MS and Bryant Sh. Theading analysis suggests that obese gene product may be a helical cytokine. *FEBS Letters* 1995; 373: 13–18
9. Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, and Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 1996; 379: 632–635
10. Tartaglia. The leptin receptor. *Journal of Biological chemistry* 1997; 272: 6093–6096
11. Wang M–Y, Zhou YT, Newgard CB and Unger RH. A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Letters* 1996; 392: 87–90
12. Murakami T, Yamashita T, Iida M, Kawajima M and Shima K. A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem Research Communicatios* 1997; 231: 26–29
13. Cumin F, Baum HP, Levens N. Leptin is cleared from the circulation primarily by the Kidney. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996; 20: 1120–1126
14. Luoh S–M, Di Marco F, Levin N, Armanini M, Xie M–H, Nelson C, Bennet GL et al. Cloning and characterization of a human leptin receptor using a biologically active leptin immunoadhesin. *J Molecular Endocrinology* 1997; 18: 77–85
15. Emilson V, Liu Y–I, Cawthorne MA, Morton NM and Davenport. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action on insulin. *Diabetes* 1997; 46: 313–316
16. Bray GA, York DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals. An autonomic and endocrine hypothesis *physiol Rev* 1979; 59: 719–809
17. Montague CT, Farooqi IS, White head JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early–onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387: 903–908
18. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M and Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat. Genet* 1998; 18: 213–215
19. Ozata M, Ozdemir IC, Licinro J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune dysfunction indicate new targets for leptin, and spontaneous correction of leptin–mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3686–3695

20. Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pellouy V, Cassuto D, Goumelen et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998; 392: 398–401
21. Gong DW, Bi S, Pratley RE, Weintraub BD. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 3971–3974
22. Klein S, Coppack SW, Mohamed Al. V and Landt M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin Kinetics in humans. *Diabetes* 1996; 45: 984–987.
23. Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, Satoh N, Okazaki T, Shigemoto M, Mori K et al. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 1995; 44: 855–858.
24. Considine R, Sinha M.K, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med* 1996; 334: 292–295.
25. Pombo M, Herrera-Justiniano E, Considine RV, Hermida RC, Galvez, et al. Nocturnal rise of leptin in normal pubertal children and in patients with perinatal stalk-transection syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2751–4.
26. Matcovic V, Hich JZ, Batenhop NE, Skugor M, Clairmont A, et al. Gain fat is inversely related to the nocturnal rise in serum leptin in young females. *J Clin Endocrinol Metabol* 1997; 82: 1368–1372
27. Licinio J, Mantzoros C, Negro AB, Cizza G, Wong ML, Bongromo PB, et al. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nature Medicine* 1997; 3: 575–579
28. Cumin F, Baum H-P, de Gasparo M, Levens N. Removal of endogenous leptin from the circulation by the kidney. *Int J Obes* 1997; 21: 495–504
29. Zeng J, Patterson B, Klein S et al. Whole body leptin kinetics and renal metabolism in vivo. *Am J Physiol* 1997; 273: E 1102–6.
30. Meyer C, Robson D, Rackovsky N, Nadkarni V and Gerich J. Role of the kidney in human leptin metabolism. *Am J Physiol* 1997; 273: E 903–907
31. Jensen MD, Moller N, Nair KS, Eisenberg P, Landt M and Klein S. Regional leptin kinetics in humans. *Am J Clin Nutr* 1999; 69 (1): 18–21
32. Banks WA, Kastin AJ, Haug W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 1996; 17: 305–311
33. Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko Ej, Porte D, Jr. Cerebrospinal fluid leptin levels: Relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nature Medicine* 1996; 2: 589–593
34. Caro JF, Kolaczynk JN, Nyce MR et al. Decreased cerebrospinal-fluid / serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 1996; 348: 159–161
35. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995; 269: 543–546
36. Campfield LA, Smith FL, Guisez Y, Devos R, Bum P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995; 269: 546–549
37. Schwartz MW, Baskin DG, Bakowski TR, Kuijper JL, Foster D, et al. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 1996; 45: 531–535
38. Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Morgan PJ, Trayhurn P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (OB/Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization *FEBS Letters* 1996; 387: 113–116

39. Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, Hagase M, Tsuji T, Imagawa K, Yoshimasa Y, Nishi S, Hosoda K, Nakao K. The arcuate nucleus is a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neuroscience Letters* 1997; 224: 149–152
40. Jacob RJ, Dziura J, Medwick MB, Leone P, Caprio S, Daring M, Shulman GI, Sherwin RS. The effect of leptin is enhanced by microinjection into the ventromedial hypothalamus. *Diabetes* 1997; 46: 150–152
41. Chilardi N, Skoda RC. The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Molecular Endocrinology* 1997; 11: 393–399
42. Baumann H, Morella KK, White DW, et al. The full length leptin receptor has signalling capabilities of interleukin 6-type receptors. *Proceedings of National Academy of Science USA* 1996; 93: 8374–78
43. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC. Defective STAT signalling by leptin receptor in diabetic mice. *Proceedings of National Academy of Science USA* 1996; 93: 6231–35
44. Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of stat 3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nature Genetics* 1996; 14: 95–97
45. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Bum P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 1996; 98: 1101–1106
46. Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffman J, et al. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 1995; 377: 530–532
47. Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC et al. Leptin increases hypothalamic proopiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 1997; 4: 2119–23
48. Gardner JD, Rothwell NJ, Luheshi GN. Leptin affects food-intake via CRF-receptor mediated pathways. *Nat Neurosci* 1998; 1: 103
49. Haug Q, Rives R and Richard D. Effects of leptin on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (ob/ob) mice. *Endocrinology* 1998; 139: 1524–1532
50. Costa A, Poma A, Martignoni E, Nappi G, Ur E, Grossman A. Stimulation of corticotrophin-releasing hormone release by the obese (ob) gene product, leptin, from hypothalamic explants. *Neuroreport* 1997; 8: 1131–1134
51. Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schoner B, Stephens TW, Flier JS. Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology* 1997; 138: 3859–3863
52. Dijk GV, Seeley RJ, Thiele TE, Friedman MI, Hong JI, Wilkinson CW et al. Metabolic, gastrointestinal, and CNS neuropeptide effects of brain leptin administration in the rat. *Am J physiol* 1999; 276: R 1425–R 1433
53. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Roles of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; 382: 250–252
54. Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 1998; 280: 1378–1383
55. Sahy A. Leptin decreases food intake induced by galanin (CAL), melanin concentrating hormone (MCH) and neuropeptide Y in the rat. Program of the both Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, LA, 1998 (abstract P3–253) p 439
56. Bradley RI, Kokkotou EG, Maratos-Flier E, Cheatham B. Melanin-Concentrating Hormone Regulates leptin synthesis and secretion in rat adipocytes. *Diabetes* 2000; 19: 1073–76

57. Mizuno TM, Kleopulos SP, Bergen HT, Roberts JL, Priest CA, Mobbs CV. Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice but is stimulated by leptin. *Diabetes* 1998; 47: 294–297
58. Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology* 1997; 138: 5063–5066
59. Seeley RJ, Yagoloff KA, Fisher SL, Burn P, Thiele TE, Van Dijk G, Baskin DG, Schwartz MW. Melanocortin receptors in leptin effects. *Nature* 1997; 390: 349
60. Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP. Molecular cloning of the mouse agouti gene. *Cell* 1992; 71: 1195–1204
61. Zemel MB. Agouti / Melanocortin interactions with leptin pathways in obesity. *Nutr Rev* 1998; 56: 271–274
62. Friedman JM. Leptin, leptin receptors, and the control of body weight. *Nutr Rev* 1998; 56: 38–46
63. Miller MW, Duhe DMJ, Vrieling H, Cordes SP, Ollman MM, Winkes BM, Barsh GS. Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the Lethal Yellow mutation. *Genes Dev* 1993; 7: 454–457
64. Wilson BD, Bagnol D, Kaelin CB, Oliman MM, Gantz IRA, Watson SJ and Barsh GS. Physiological and anatomical Circuitry between agouti-related protein and leptin signaling. *Endocrinology* 1999; 140 (5) 2387–97
65. Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel V, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998; 393: 72–76
66. Lambert PD, Couceyro RP, Koyla EO, Ling NC, Desouza EB, Kuhar MJ. A role for novel CART peptide fragments in the central control of food intake. *Neuropeptides* 1997; 31: 620–21
67. Goedstone AP, Mercer JG, Gunn I, Moar KM, Edwards CM, Rossi M, Howard JK, Rasheed S, et al. Leptin interacts with glucagon-like peptide-1 neurons to reduce food intake and body weight in rodents. *FEBS Letters* 1997; 415: 134–138
68. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, et al. Orexins and orexin receptors: A family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573–585
69. Horvath TL, Diano S and van den Pol AN. Synaptic interaction between the hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: A novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neuroscience* 1999; 19: 1072–1087
70. Cai X, Widdowson PS, Harrold J, et al. Hypothalamic orexin expression: Modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes*, in press 1999.
71. Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Molecular Cell* 1998;
72. Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang M-Y, Trieu F, et al. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proceedings of National Academy of Science. USA* 1997; 94: 4637–4641
73. Chen G, Koyama K, Yuan X, Lee Y, Zhou Y-T, O'Doherty R, Newgard CB, and Unger RH. Disappearance of body fat in normal rats induced by adenovirus-mediated leptin gene therapy. *Proceedings of National Academy of Science* 1996; 93: 14795–14799
74. Bai Y, Zhang S, Kim K-S, Lee J-K, Kim K-H. Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones. *J Biologic Chemistry* 1996; 271: 13939–13942

75. Zhou Y -T, Shimakuro M, Koyama K, Lee Y, Wang M -Y, Trieu F, Newgard CB, Unger RH. Induction by leptin of uncoupling protein -2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proceedings of National Academy of Science USA* 1997; 94: 6386 -6390
76. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, and Lechler RL. Leptin modulates the T -cell immune response and reverses starvation -induced immunosuppression. *Nature* 1998, 27, 394 (6696): 897 -901
77. Sierra -Honigman MR, Nath Ak, Murakami C, Garcia -Gardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor *Science* 1998; 281: 1683 -1686
78. Mikhai A, Beck A, Shafer B, Brarut J, Smith G, Zupanic A et al. Leptin stimulates fetal and adult erythroid and myeloid development. *Blood* 1997, 1; 89 (5): 1507 -1512
79. Maruyama I, Nakata M, Yamaji K. Effects of leptin in platelets and endothelial cells. *Obesity and arterial thrombosis. Ann NY Acad Sci* 2000; 902: 315 319
80. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriaucinas A, Stephens TW et al. Serum immunoreactive -leptin concentrations in normal weight and obese humans. *N. Engl J Med* 1996; 334: 292 -295
81. Montague CT, Prins JB, Sanders L, Digby JE, O' Rahilly S. Depot and sex -specific differences in human leptin m RNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes* 1997; 46: 342 -347
82. Sihna MK, Opentanova I, Ohannesian JP et al. Evidence of free and bound leptin in human circulation: studies in lean and obese subjects and during short -term fasting. *J Clin Investigation* 1996; 98: 1277 -82
83. Weigle DS, Duell PB, Connor WE, Steiner RA, Soules MR, Kuijpe JL. Effect of fasting, refeeding and dietary fat restriction on plasma leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 561 -565
84. Holub M, Zwiauer K, Winkler C, Dillinger -Paller B, Schuller E, Stocker -Ipsirogla S, et al. Relation of plasma leptin to lipoproteins in overweight children undergoing weight reduction. *Int J Obes* 1999; 23: 60 -66
85. Kolaczynki JW, Considine RV, Ohannesian J, Marco CC, Caro JF. Responses of leptin to short -term fasting and prolonged overfeeding in humans. *J. Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4162 -5
86. Kolaczynki JW, Considine RV, Ohannesian J, Marco CC, Caro JF. Responses of leptin to short -term fasting and refeeding in humans. *Diabetes* 1996; 45: 15111 -5
87. Nonogaki K. New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 2000; 43 (5): 533 -49
88. Trayhurn P, Hoggard N, Mercer JF and Rayner DV. A review emphasizing the key role of sympathetic tone in the regulation of leptin release. *Int J Obes* 1999; 23 (suppl 1): 22 -28
89. Fain JN, and Bahouth SW. Regulation of leptin release by mammalian adipose tissue. *Bioch Biophys Res Commun* 2000; 274: 571 -573
90. Maffei M, Halaas J, Rarussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, et al. Leptin levels in human and rodent: measurment of plasma leptin and ob RNA in obese and weight -reduced subjects. *Nature Med* 1995; 1: 1155 -1161
91. Clemment K, Lahlou N, Ruiz J, Hager J, Bougnere P, Basderant A, Guy -Grand B, Froquel P. Association of poorly controlled diabetes with low serum leptin in morbid obesity. *Int J Obes* 1997; 21: 556 -561
92. Tome MA, Lage M, Camina JP, Garcia -Mayor RV, Dieguez C and Casanuera FF. Sex -based differences in serum leptin concentrations from umbilical cord blood at delivery. *European journal of Endocrinology* 1997; 137: 655 -658

93. Hassink SG, de Lancey E, Sheslow DV, Smith –Kirwin SM, O’ Connor DM, Considine RV et al. Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics* 1997; 100: 124
94. Matsuda J, Yokota I, Lida M, Murakami T, Naito E, Ito M, et al. Serum leptin concentrations in cord blood: relationship to birth weight and gender. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1642–1644
95. Falorni A, Bini V, Molinari D, Papi F, Celi F, Di Stefano G, et al. Leptin serum levels in normal weight and obese children and adolescents: relationship with age, sex, pubertal development, body mass index, and insulin. *Int J Obes* 1997; 21: 881–89
96. Hellstrom L, Wahrenberg H, Hruska K, Reynisdottir S, Arner P. Mechanisms behind gender differences in circulating leptin levels. *J Intern Med* 2000 247 (4): 457–62
97. Schwartz M, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ and Porte D. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nature Medicine* 1996; 2: 589–593
98. Sivan E, Whittaker P, Sinha D, Homko CJ, Lin M, Reece EA et al. Leptin in human pregnancy: the relationship with gestational hormones. *Am J Obst Gynecol* 1998; 179: 1128–1132
99. Casabiell X, Pineir V, Peino R, Lage M, Camina J, et al. Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J. Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2149–2155.
100. Kristensen K, Pedersen SB and Richelsen B. Regulation of leptin by steroid hormones in rat adipose tissue. *Bioch Biophys Res Commun* 1999; 259: 624–630
101. Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Fatawatari T, Ontani K, et al. Estrogen increases in vitro leptin production in rats and human subjects. *J Endocrinology* 1997; 154: 285–292
102. Messinis IE, Milingos S, Zikopoulos K, Kollios G, Seferiadis K, Lolis D. Leptin concentrations in the follicular phase of the spontaneous cycles and cycles superovulated with follicle stimulating hormone. *Hum. Reprod* 1998; 13 (5): 1152–1156
103. Mannuci E, Ognibene A, Becorpi A, Crmasco F, Pellegrine S, et al. Relationship between leptin and oestrogens in healthy women. *Eur J Endocrinol* 1998; 139: 198–201
104. Roemmich JN, Clark PA, Berr SS, Mai V, Mantzoros CS, Flier JS et al. Gender differences in leptin levels during puberty are related to the subcutaneous fat depot and sex steroids. *Am J Physiol* 1998; 275: E 543–E 551
105. Wu –Peng S, Rosenbaum M, Nicolson M, Chua SC and Leibel RL. Effects of exogenous gonadal steroids on leptin homeostasis in rats. *Obesity Research* 1999; 7: 586–592
106. Hislop M, Ratanjee B, Soule S and Marais A. Effects of anabolic –androgenic steroid use or gonadal testosterone suppression on serum leptin concentration in men. *Eur J Endocrinol* 1999; 141: 40–46
107. Palmert MR, Radovick S and Boepple PA. The impact of reversible gonadal sex steroid suppression on serum leptin concentrations in children with central precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1091–1096
108. Behre HM, Simoni M and Nieschlag E. Strong association between serum levels of leptin and testosterone in men. *Clinical Endocrinology* 1997; 47: 237–240
109. Jockenhovel F, Blum WF, Vogel E, Englaro P, Muller –Wieland D, Reinwein D et al. Testosterone substitution normalizes elevated serum leptin levels in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2510–2513
110. Blum Wf, Englaro P, Hanitsch S, Juul A, Hertel NT et al. Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2904–2910

111. Wabitsch M, Blum WF, Muche R, Braun M, Hube F et al. Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Investigation* 1997; 100: 808–813
112. Rentsch J and Chiesi M. Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Letters* 1996; 379: 55–59
113. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, Boden G, et al. Acute and chronic effect of insulin on leptin production in humans –studies in vivo and in vitro. *Diabetes* 1996; 45: 699–701
114. Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, Christoffersen CT, Englaro P et al. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 1996; 45: 1435–1438
115. Hardie L, Guilhot N and Trayhurn P. Regulation of leptin production in cultured mature white adipocytes. *Hormone and Metabolic Research* 1996; 28: 685–689
116. Patel B, Koenig J, Kaplan L and Hooi S. Increase in plasma leptin and Lep mRNA concentrations by food intake is dependent on insulin. *Metabolism* 1998; 47: 603–607
117. Sivitz WI, Walsh S, Morgan D, Donohue P, Haynes W and Leibel R. Plasma leptin in diabetic and insulin-treated diabetic and normal rats. *Metabolism* 1998; 47: 584–591
118. Malmstrom R, Taskinen M –R, Karonen S –L and Yki –Jarvinen H. Insulin increases plasma leptin concentrations in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetologia* 1996; 39: 993–996
119. Utriainen T, Malmstrom R, Makimattila S and Yki –Jarvinen H. Supraphysiological hyperinsulinemia increases plasma leptin concentrations after 24 h in normal subjects. *Diabetes* 1996; 45: 1364–1366
120. Boden G, Chen X, Kolaczynski J and Polansky M. Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Invest* 1997; 100: 1107–1113
121. Widjaja A, Stratton IM, Horn R, Holman RR, Turner R and Brabant G. Plasma leptin, obesity, and plasma insulin in type 2 diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 654–657
122. Nagasaka S, Ishikawa S, Nakamura T, Kawakami A et al. Association of endogenous insulin secretion and mode of therapy with body fat and serum leptin levels in diabetic subjects. *Metabolism* 1998; 47: 1391–1396
123. Korbonotis M, Trainer PJ, Little JA, Edwards R, et al. Leptin levels do not change acutely with administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary –adrenal activity. *Clinical Endocrinology* 1997; 46: 751–757
124. Muzzin P, Eisensmith RC, Copeland KC and Woo SL. Correction of obesity and diabetes in genetically obese mice by leptin gene therapy. *Proceedings of National Academy of Science* 1996; 93: 14804–14808
125. Harris RB. Acute and chronic effects of leptin on glucose utilization in lean mice. *Bioch Biophys Res Commun* 1998; 245: 502–509
126. Sivitz WL, Walsh S, Morgan D, Thomas M and Haynes W. Effects of leptin on insulin sensitivity in normal rats. *Endocrinology* 1997; 138: 3395–3401
127. Kieffer TJ, Heller RS and Habener JF. Leptin receptors expressed on pancreatic β –cells. *Bioch Biophys Res Commun* 1996; 224: 522–527
128. Cohen B, Novick D and Rubinstein M. Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 1996; 274: 1185–88
129. Rossetti L, Massillon D, Barzilai N, Vuguin P, Chen W, et al. Short term effects of leptin on hepatic gluconeogenesis and in vivo insulin action. *J Biol chemistry* 1997; 272: 27758–27763

130. Liu L, Karkanias GB, Morales JC, Hawkins M, Barzilai N et al. Intracerebroventricular leptin regulates hepatic but not peripheral glucose fluxes. *J Biol Chemistry* 1998; 273: 31160–31167
131. Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM and Charron MJ. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 1997; 389: 374–377
132. Berti L, Kellerer M, Capp E and Haring H. Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C₂C₁ myotubes: evidence for a PI₃-Kinase mediated effect. *Diabetologia* 1997; 40: 606–609
133. Ceddia R, William W and Curi R. Comparing effects of leptin and insulin on glucose metabolism in skeletal muscle: evidence for an effect of leptin on glucose uptake and decarboxylation. *Int J Obes* 1999; 23: 75–82
134. Muoio DM, Dohm GL, Tapscott EB and Coleman RA. Leptin opposes insulin's effects on fatty acid partitioning in muscles isolated from ob/ob mice. *Am J physiol* 1999; 276: E 913–E 921
135. Muller G, Ertl J, Gerl M and Preibisch. Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chemistry* 1997; 272: 10585–10593
136. Williams LB, Ohannesian DW, Kogon BE et al. Leptin increases basal and insulin-stimulated glucose uptake into human subcutaneous adipocytes. *Diabetes* 1998; 47: A 73
137. Zierath JR, Frevert EU, Ryder JW, Berggren P-O and Kahn BB. Evidence against a direct effect of leptin on glucose transport in skeletal muscle and adipocytes. *Diabetes* 1998; 47: 1–4
138. Ranganathan S, Ciaraldi T, Henry R, Mudaliar S and Kern P. Lack of effect of leptin on glucose transport, lipoprotein lipase, and insulin action in adipose and muscle cells. *Endocrinology* 1998; 139: 2509–2513
139. Mick G, Vanderbloomer T, Fu CL and Mc Cormick K. Leptin does not affect adipocyte glucose metabolism: studies in fresh and cultured adipocytes. *Metabolism* 1998; 47: 1360–1365
140. Glasow A, Haidan A, Hilbers U, Breidert M et al. Expression of Ob receptor in normal human adrenals: differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4459–4466
141. Kruse M, Bornstein S, Uhlmann KK, Paeth G and Scherbaum W. Leptin down-regulates the steroid producing system in the adrenal. *Endocrine Research* 1998; 24: 587–590
142. Pralong F, Roduit R, Waeber G, Castillo E, Mosimann F et al. Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology* 1998; 139: 4264–4268
143. Murakami T, Iida M and Shima K. Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. *Bioch Biophys Res Commun* 1995; 214: 1260–1267
144. De Vos P, Saladin R, Auwerx J and Staels B. Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chemistry* 1995; 270: 15958–15961
145. Zakrzewska KE, Cusin I, Stricker-Krongrad et al. Induction of obesity and hyperleptinemia by central glucocorticoid infusion in the rat. *Diabetes* 1999; 48: 365–370
146. Larson H and Ahren B. Short-term dexamethasone treatment increases plasma leptin independently of changes in insulin sensitivity in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4428–4432
147. Miel J, Englaro and Blum W. dexamethasone induces an acute and sustained rise in circulating leptin levels in normal subjects. *Hormone and Metabolic Research* 1996; 28: 704–707
148. Papaspyrou-Rao S, Schneider S, Petersen R and Fried S. Dexamethasone increases leptin expression in humans in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1635–1637

149. Lagardi G, Emerson C, Ahima R, Flier J and Lechan R. Leptin prevents fasting –induced suppression of prothyrotropin –releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1997; 138: 2569 –2576
150. Fain J, Coronel E, Beauchamp M and Bahouth S. Expression of leptin and beta –3 adrenergic receptors in rat adipose tissue in altered thyroid states. *Biochemical journal* 1997; 322: 145 –150
151. Escobar –Morreale HF, Escobar del Rey F and Morreale de Escobar G. Thyroid hormones influence serum leptin concentrations in the rat. *Endocrinology* 1997; 138: 4485 –4488
152. Yoshida T, Monkawa T, Hayashi M and Saruta T. Regulation of expression of leptin mRNA and secretion of leptin by thyroid hormone in 3T3 –L1 adipocytes. *Bioch Biophys Res Commun* 1997; 232: 822 –826
153. Corbetta S, Englaro P, Giambona S, Persani L, Blum WF and Beck Peccoz P. Lack of effects of circulating thyroid hormone levels on serum leptin concentrations. *Eur J Endocrinol* 1997; 137: 659 –663
154. Sreenan S, Caro JF, Refetoff S. Thyroid dysfunction is not associated with alterations in serum leptin levels. *Thyroid* 1997; 7: 407 –409
155. Leonhardt U, Ritzel U, Schafer G, Becker W and Ramadori G. Serum leptin levels in hypo and hyperthyroidism. *J Endocrinology* 1998; 157: 75 –79
156. Pinkey j, Goodrick S, Katz J et al. Leptin and the pituitary –thyroid axis: A comparative study in lean, obese, hypothyroid and hyperthyroid subjects. *Clinical Endocrinology* 1998; 49: 583 –588
157. Valcavi R, Zini M, Peino R, Casanueva FF and Dreguez C. Influence of thyroid status on serum immunoreactive leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1632 –1634
158. Yoshida T, Momotani N, Hayashi M, Monkawa T, Ito K, and Saruta T. Serum leptin concentrations in patients with thyroid disorders. *Clinical Endocrinology* 1998; 48: 299 –302
159. Zimmerman RC, Krahn L, Rahmanie N, Sauer MV. Prolonged inhibition of presynaptic catecholamine synthesis does not alter leptin secretion in normal –weight men and women. *Hum Reprod* 1998; 13: 822 –825
160. Scacchi M, Pincelli A and Cavagnini F. Growth hormone in obesity. *Int J Obes* 1999; 23: 260 –271
161. Hartman ML, Veldhuis JD, Johnson ML et al. Augmented growth hormone (GH) secretory burst frequency and amplitude mediate enhanced GH secretion during a two –day fast in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 757 –765
162. Shimon I, Yan X, Magoffin D, Friedman T and Melmed S. Intact leptin receptor is selectively expressed in human fetal pituitary and pituitary adenomas and signals human fetal pituitary growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4059 –4064
163. Carro E, Senaris R, Considine RV, Casanueva FF, Dieguez C. Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology* 1997; 138: 2203 –2206
164. Carro E, Senaris RM, Seoane LM, Frohman LA, Arimura A, Casanueva FF, Dieguez C. Role of growth hormone (GH) –releasing hormone and somatostatin on leptin –induced GH secretion. *Neuroendocrinology* 1999; 69: 13 –10
165. Roh SG, Clarke IJ, Xu RW, Coding JW, Loneragan K, Chen C. The in vitro effect of leptin on basal and growth hormone –releasing hormone –stimulating growth hormone secretion from the ovine pituitary gland. *Neuroendocrinology* 1998; 68: 361 –364
166. Casanueva FF, Dieguez C. Interaction between body composition, leptin and growth hormone status. *Bailliere’s Clin Endocrinol Metab* 1998; 12: 297 –314
167. Badger TM, Lynch EA, Fox PH. Effects of fasting on luteinizing hormone dynamics in the male rat. *J Nutrition* 1985; 115: 788 –797

168. Cagampang FRA, Maeda K -I, Yokoyama A, Ota K. Effect of food deprivation on the pulsatile release in the cycling and ovariectomized female rat. *Horm Metab Res* 1990; 22: 269 -272
169. Foster DL, Olster DH. Effect of restricted nutrition on puberty in the lamb: patterns of tonic luteinizing (LH) secretion and competency of the LH surge system. *Endocrinology* 1985; 116: 375 -381
170. Cameron JL, Nobschisch C. Suppression of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion during short term food restriction in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 1991; 128: 1532 -1540
171. Rojdmarm S. Influence of short -term fasting on the pituitary -testicular axis in normal men. *Horm Res* 1987; 25: 140 -146
172. Manning JM, Bronson FH. Effects of prolonged exercise on puberty and luteinizing hormone secretion in female rats. *Am J physiol* 1989; 257: R 1359 -R 1364
173. Cumming DC, Wheeler GD. Exercise -associated changes in reproduction: a problem common to women and men. In Frisch RE (ed). *Adipose tissue and Reproduction*, vol 14 *Prog Reprod Biol Med*. Basel: Karger; 1990: 125 -135
174. Kennedy GC, Mitra J. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J physiol* 1963; 166: 408 -418
175. Dickerman RW, Li H -Y, Wade GN. Decreased availability of metabolic fuels suppresses estrous behavior in Syrian hamsters. *Am J physiol* 1993; 264: R 568 -R 572'
176. Gill CJ, Rissman EF. Female sexual behavior is inhibited by short -and long -term food restriction. *Physiol Behav* 1997; 61: 387 -394
177. Frisch RE. The right weight: body fat, menarche and fertility. *Proc Nutr Soc* 1994; 53: 113 -129
178. Frish RE, Mc Arthur JW. Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. *Science* 1974; 185: 949 -951
179. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 1950; 41: 317 -318
180. Swerdloff RS, Batt RA, Bray GA. Reproductive hormonal function in the genetically obese (*ob /ob*) mouse. *Endocrinology* 1976; 98: 1359 -1364
181. Swerdloff RS, Peterson M, Vera A, Batt RAL, Heber D, Bray GA. The hypothalamic - pituitary axis in genetically obese (*ob /ob*) mice: response to luteinising hormone - releasing hormone. *Endocrinology* 1978; 103: 542 -547
182. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 1996; 137: 3144 -3147
183. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genetics* 1996; 12: 318 -320
184. Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese *ob /ob* males. *Endocrinology* 1997; 138: 1190 -1193
185. Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, Mc Cann SM. Role of leptin in hypothalamic -pituitary function. *Proceedings of National Academy of Science USA* 1997; 94: 1023 -1028
186. Magni P, Vettor R, Pagano C, Calcagno A, Beretta E, Messi E, Zanisi M, Martini L, Motta M. Expression of a leptin receptor in immortalized gonadotropin -releasing hormone - secreting neurons. *Endocrinology* 1999; 140: 1581 -1585
187. Carro E, Pinilla L, Seoane LM, Considine RV, Aguilar E, Casanueva FF, Dieguez C. Influence of endogenous leptin tone on the estrous cycle and luteinizing hormone pulsatility in female rats. *Neuroendocrinology* 1997; 66: 375 -377

188. Finn PD, Cunningham MJ, Pau K -YF, Spies HG, Clifton DK, Steiner RA. Leptin' s stimulatory effect on the neuroendocrine axis of the monkey. *Endocrinology* 1998; 139: 4652 -4662
189. Nagatani S, Guthikonda P, Thompson RC, Tsukamura H, Maeda K -I, Foster DL. Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. *Neuroendocrinology* 1998; 67: 370 -376
190. Kalra SP, Xu B, Dube MG, Moldawer LL, Martin D, Kalra PS. Leptin and ciliary neurotropic factor (CNTF) inhibit fasting -induced suppression of luteinizing hormone release in rats: role of neuropeptide Y. *Neuroscience Letters* 1998; 240: 45 -49
191. Nagatani S, Zeng Y, Keisler DH, Foster DL, Jaffe CA. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and Growth hormone secretion in the sheep.
192. Schneider JE and Zhou D. Interactive effects of central leptin and peripheral fuel oxidation on estrous cyclicity. *Am J physiol* 1999; 277: R 1020 -R 1024
193. Banks JA, Mick C and Freeman MC. A possible cause for the differing responses of the luteinizing hormone surge mechanism of ovariectomized rats to short term exposure to estradiol. *Endocrinology* 1980; 106: 1677 -1681
194. Legan S, Coon G and Karsch F. Role of estrogen as initiator of daily LH surges in the ovariectomized rat. *Endocrinology* 1975; 95: 50 -56
195. Kohsaka A, Watanobe H, Kakizaki Y, Habu S, Suda T. A significant role of leptin in the generation of steroid -induced luteinizing hormone and prolactin surges in female rats. *Bioch Biophys Res Commun* 1999; 254: 578 -581
196. Farooqi S, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Chreetham CH et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency.
197. Balligand JL, Brichard SM, Brichard V, Desager JP and Jambert M. Hypoleptinemia in patients with anorexia nervosa: loss of circadian rhythm and unresponsiveness to short - term refeeding. *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 415 -420
198. Laughlin GA and Yen SSC. Hypoleptinemia in women athletes: absence of a diurnal rhythm with amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 318 -321
199. Ballauff A, Ziegler G, Emons G et al. Serum leptin and gonadotropin levels in patients with anorexia nervosa during weight gain. *Mol Pshchiatry* 1999; 4: 71 -75
200. Licincio J, Negrao AB, Mantzoros CS, Kaklamani V, Wong M -L, et al. Synchrony of frequently sampled 24 -h concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone, and estradiol in healthy women. *Proceedings of National Academy of Science USA*. 1998; 95 (5): 2541 -2546
201. Tatarini PA, Monroe MB, Dueck CA, Traub SA, Nicolson M, Manore MM, Matt KS, Ravussin E. Adiposity, plasma leptin concentration and reproductive function in active and sedentary females. *Int J Obes* 1997; 21: 818 -821
202. Kropp W, Blum W, Von Prittwitz S, Ziegler A et al. Low leptin levels predict amenorrhea in underweight and eating disorders in females. *Mol psychiatry* 1997; 2 (4): 335 -40
203. Ioffe E, Moon B, Connolly E, Friedman JM. Abnormal regulation of the leptin gene in the pathogenesis of obesity. *Proceedings of National Academy of Science USA* 1998; 95 (20): 11852 -11857
204. Mantzoros CS, Dunaif A, Flier JS. Leptin concentrations in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Metab* 1997; 82: 1687 -1691
205. Chapman IM, Wittert GA, Norman RJ. Circulating leptin concentrations in polycystic: relation to anthropometric and metabolic parameters. *Clinical Endocrinology* 1997; 46: 175 -181
206. Laughlin GA, Morales AJ, Yen SSC. Serum leptin levels in women with polycystic ovary syndrome: the role of insulin resistance / hyperinsulinemia. *J Clin Metab* 1997; 82: 1692 -1696

207. Rouru J, Anttila L, Koskinen P et al. Serum leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1697–1700
208. Brzechffa PR, Jakimiuk AJ, Agarwal SK et al. Serum immunoreactive leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 4166–4169
209. Oksanen L, Titinen A, Kaprio J, Koistinen HA et al. No evidence for mutations of the leptin or leptin receptor gene in women with polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod* 2000; 6 (10): 873–876
210. Hakanson M –L, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC, Meister B. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neuroscience* 1998; 18: 559–572
211. Minami S, Sarkar DK. Central administration of NPY induces precocious puberty in female rats. *Endocrinology* 1992; 56: 930–934
212. Pierroz DD, Gruaz NM, d'Alleva ML. Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle starting at 30 days of life delays sexual maturation in the female rat. *Neuroendocrinology* 1995; 61: 293–300
213. Yu WH, Walczewska A, Karanth S, Cann S. Nitric oxide mediates leptin –induced luteinizing hormone –releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin –induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology* 1997; 138: 5055–5058
214. Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD. Attenuation of the obesity syndrome of ob /ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* 1996; 274: 1704–1707
215. Leranath C, MacLusky NJ, Shanabrough M and Naftolin F. Immunohistochemical evidence for synaptic connections between pro –opiomelanocortin –immunoreactive axons and LH –RH neurons in the preoptic area of the rat. *Brain Research* 1988; 449: 167–176
216. Watanabe H, Schioth HB, Wikeberg JE, Suda T. The melanocortin 4 receptor mediates leptin stimulation of luteinizing hormone and prolactin surges in steroid –primed ovariectomized rats. *Bioch Biophys Res Commun* 1999; 275: 860–864
217. Hohmann JG, Teal TH, Cifton DK et al. Differential role of melanocortins in mediating leptin' s central effects on feeding and reproduction. *Am J physiol* 2000; 278: R 50 –R 59
218. Krude H, Bieberman H, Luck W, Horn R, Brabant G and Gruters A. Severe early –onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature Genetics* 1998; 19: 155–157
219. Vaisse C, Clement K, Cuy –Grand B, Froquel P. A frameshift mutation in human MCR4 is associated with a dominant form obesity. *Nature Genetics* 1998; 20: 113–114
220. Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Hoilsall DJ, Stanhope RG, and O' Rahilly S. A frameshift mutation in MCR4 associated with dominantly inherited human obesity. *Nature Genetics* 1998; 20: 111–112
221. Lebrethon MC, Vandersmissen E, Gerad A, Parent AS, and Bourguignon JP. Cocaine and amphetamine –regulated –transcript peptide mediation of leptin stimulatory effect on the rat gonadotropin –releasing hormone pulse generator in vitro. *J Neuroendocrinology* 2000; 12: 383–385
222. Stanley Sa, Small CJ, Kim MS, Heath MM, Seal LJ, Russel SH, Gnatei MA, Bloom SR. Agouti related peptide (Agrp) stimulates the hypothalamo pituitary gonadal axis in vivo and vitro in males rats. *Endocrinology* 1999; 140: 5459–5462
223. Apter D, Butzow TL, Laughlin GA and Yen SS. Gonadotropin –releasing hormone pulse generator activity during pubertal transition in girls: pulsatile and diurnal patterns of circulating gonadotropins. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 940–949
224. Frisch R, Rvelle R. Height and weight at menarche and hypothesis of critical body weights and adolescent events. *Science* 1971; 169: 397–399

225. St George I, Williams S, Silva P. Body size and the menarche. The Dunedin study. *J Adolesc Health* 1994; 15: 573 -576
226. Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin invest* 1997; 99: 391 -395
227. Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 1997; 275: 88 -90
228. Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, Weigle DS, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 1997; 138: 855 -858
229. Gruaz NM, Lalaoui M, Prerroz DD, Englaro P et al. Chronic administration of leptin into the lateral ventricle induces sexual maturation in severely food -restricted female rats. *J Neuroendocrinology* 1998; 10: 627 -633
230. Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest* 1998; 101: 1020 -1027
231. Plant TM, Durrant AR. Circulating leptin does not appear to provide a signal for triggering the initiation of puberty in the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 1997; 138: 4505 -4508
232. Urbanski HF, Pau K -YT. A biphasic developmental pattern of circulating leptin in the male rhesus macaque (*Malaca mulatta*). *Endocrinology* 1998; 139: 2284 -2286
233. Mantzoros CS, Flier JS, and Rogol AD. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys.V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. *J Clin Metab* 1997; 82 (4): 1066 -1070
234. Garcia -Mayor RV, Andrade MA, Rios M, Lage M, Dieguez C, Casanueva FF. Serum leptin levels in normal children: Relationship to age, body mass index, pituitary -gonadal hormones, and pubertal stage. *J Clin Metab* 1997; 82: 2849 -55
235. Quinton MD, Smith RF, Clayton PE, Gill MS, Shalet S, Justice SK et al. Leptin bindings activity changes with age: the link between leptin and puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2336 -41
236. Ambrosius WT, Compton JA, Bowsher RR, Pratt JH. Relation of race, age and sex hormone differences to serum leptin concentrations in children and adolescents. *Horm Res* 1998; 49: 240 -6
237. Herrera E, Lasuncion M, Palacin M, Zorzano A, Bonet B. Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the freinkel era. *Diabetes* 1991; 40: 83 -88
238. Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D and Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clinical Endocrinology* 1997; 47: 101 -106
239. Tamas P, Sulyok E, Szabo I, Vizer M, Ertl T et al. Changes of maternal serum leptin levels during pregnancy. *Gynecologic and obstetric investigation* 1998; 46: 169 -171
240. Tamura T, Goldenberg R, Johnston K and Cliver S. Serum leptin concentrations during pregnancy and their relationship to fetal growth. *Obstetrics and Gynecology* 1998; 91: 389 -395
241. Highman TJ, Friedman JE, Huston LP et al. Longitudinal changes in maternal serum leptin concentrations, body composition, and resting metabolic rate in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 1010 -5
242. Lewandowski K, Horn R, O' Callaghan CJ, Dunlop D, Medley GF, O' Hare P and G. Brabant. Free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 300 -306
243. King JC, Butte NF, Bronstein M, Kopp I, Lindquist SA. Energy metabolism during pregnancy: influence of maternal energy status. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 4395 -4455

244. Senaris R, Garcia –Caballero T, Casabiell X et al. Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 1997; 138: 4501–4504
245. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K et al. Nonadipose tissue production of leptin: Leptin as a novel placenta –derived hormone in humans. *Nature Medicine* 1997; 3: 1029–1033
246. Lage M, Garcia –Mayor RV, Tomo MA, et al. Serum leptin levels in women through pregnancy and the postpartum period and in women suffering spontaneous abortion. *Clin Endocrinol* 1999; 50: 211–216
247. Mise H, Sagawa N, Matsumoro N et al. Augmented placental production of leptin in pre –eclampsia: possible involvement of placental hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3225–3229
248. Nyame NA, Soorana SR, Steer PJ and Johnson MR. Longitudinal analysis of maternal plasma leptin concentrations during normal pregnancy and pre –eclampsia. *Hum Reprod* 2000, 15 (9): 2033–2036
249. Yura S, Sagawa N, Ogawa Y, Masuzaki H, Mise H et al. Augmentation of leptin synthesis and secretion through activation of protein kinases A and C in cultured human trophoblastic cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 3609–3614
250. Sagawa N, Mori T, Masuzaki H, Ogawa Y, Nakao K. Leptin production by hydatidiform mole. *Lancet* 1997; 350: 1518–1519
251. Lepercq J, Cauzac M, Lahlou N, Timsit J, Girard J, Auwerx J and Hauguel –de Mouzon S. Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy. A critical role for insulin. *Diabetes* 1998; 47: 847–850
252. Harigaya A, Nagashima K, Nako Y, Morikawa A. Relationship between concentration of serum leptin and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3281–3284
253. Jaquet D, Leger J, Marshal LC, Oury JF, Czernichow P. Ontogeny of leptin in human fetuses and newborns. Effect of intrauterine growth retardation on serum leptin concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1243–1246
254. Harigaya A, Nagashima K, Nako Y, Morikawa A. Relationship between concentration of serum leptin and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3281–84
255. Schubring C, Kiess W, Englaro P, Rascher W, Dotsch J et al. Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid and arterial and venous cord blood: Relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1480–3
256. Koistinen HA, Koivisto VA, Andersson S, Karonen SL, Kontula K et al. Leptin concentration in cord blood correlates with intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3329–30
257. Conzalez RR, Devoto L, Campana A and Bischof P. Effects of interleukin –1 alpha, interleukin 6, transforming growth factor beta and leptin on integrin expression and metalloproteinase secretion by human cytotrophoblastic cells. *Fertility* 1999; 72 (Suppl 1): 5136
258. Chardonens D, Cameo P, Aubert ML et al. Modulation of human cytotrophoblastic secretion by interleukin –1a and 176 oestradiol, and its effects on human chorionic gonadotropin secretion. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 1077–1082
259. Janik JE, Curti BD, Considine RV et al. Interleukin –1 alpha increases serum leptin concentrations in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3084–86
260. Simon C, Frances A, Piquette G et al. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin –1 receptor antagonist. *Endocrinology* 1994; 134: 521–528
261. Conzalez RR, Caballero –Campo P, Jasper M et al. Dynamics of leptin secretion by human blastocyst and endometrial epithelial cells. *Fertility Sterility* 1999; 72 (suppl 1): S 239

262. Mounzih K, Qiu J, Ewart –Toland A, Chehab F. Leptin is not necessary for gestation and parturition but regulates maternal nutrition via a leptin resistance state. *Endocrinology* 1998; 139: 5259 –5262
263. Teirmaa T, Luukkaa V, Rouru J, Koula M and Huupponen R. Correlation between circulating leptin and luteinizing hormone during the menstrual cycle in normal –weight women. *Eur J Endocrinol* 1998; 139: 190 –194
264. Cella F, Giordano G, Cordera R. Serum leptin concentrations during the menstrual cycle in normal weight women: Effects of an oral triphasic estrogen –progestin medication. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 174 –178
265. Stock SM, Sande EM, Bremme KA. Leptin levels vary significantly during the menstrual cycle, pregnancy, and in vitro fertilization treatment: possible relation to estradiol. *Fertility Sterility* 1999; 72 (4): 657 –662
266. Lindheim SR, Sauer MV, Carmina E, Chang PL, et al. Circulating leptin levels during ovulation induction: relation to adiposity and ovarian morphology. *Fertility Sterility* 2000; 73 (3): 493 –498
267. Butzow TL, Moilanen JM, Lehtovirta M, Tuomi T, et al. Serum and follicular fluid leptin during in vitro fertilization: Relationship among leptin increase, body fat mass, and reduced Ovarian response. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84 (9): 3135 –3140
268. Buffenstein R, Poppitt SD, Mc Devitt RM and Prentice AM. Food intake and the menstrual cycle: a retrospective analysis, with implications for appetite research. *Physiology and Behavior* 1995; 58: 1067 –1077
269. Paolisso G, Rizzo MR, Mazzioti G et al. Lack of association between changes in plasma leptin concentration and in food intake during the menstrual cycle. *Eur J Clin Invest* 1999; 29 (6): 490 –495
270. Kitawaki JO, Koshiba H, Ishihara H, Kusuzi I, Tsukamoto K, Honjo H. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle.
271. Karlsson C, Lindell K, Svensson E, et al. Expression of functional leptin receptors in human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4144 –4148
272. Loffler S, Aust G, Kohler U, Spanel – Borowski K. Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 1143 – 1149.
273. Agarwal SK, Vogel K, Weitsman SR, and Magoffin DA. Leptin antagonize the insulin – like growth factor –I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1072 –1076
274. Spicer LJ and Francisco CC. The adipose obese gene product leptin: Evidence of direct inhibitory Role in Ovarian function. *Endocrinology* 1997; 138 (8): 3374 –3379
275. Brannian JD, Zhao Y and Mc Elroy M. Leptin inhibits gonadotropin –stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. *Human Relationship* 1999; 14 (6): 1445 –1448
276. Zamorano PL, Madesh VB, Sevilla LM et al. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat.
277. Kitawaki J, Kusuki I, Koshiba H, Tsukamoto K and Honjo H. Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod* 1999; 5 (8): 708 –713
278. Magoffin DA, Weitsman SR, Agarwal SK and Jakimiuk AJ. Leptin regulation of aromatase activity in adipose stromal cells from regularly cycling women. *Ginekol Pol* 1999; 70 (1): 1 –7
279. Sperof L, Glass R, Kase N. *Clinical Gynecologic Endocrinology and infertility*, Williams and Wilkins (eds) 5th edition 1994.
280. Mantzoros CS, Cramer KW, Liberman RF and Barbieri RL. Predictive value of serum and follicular fluid leptin concentrations during assisted reproductive cycles in normal women

- and in women with the polycystic ovarian syndrome. *Human Reproduction* 2000; 15 (3): 539–544
281. Duggal PS, Van der Hock KH, Milner CR, et al. The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology* 2000; 141 (6): 1971–1976
 282. Yura S, Ogawa Y, Sagawa N et al. Accelerated puberty and late –onset hypothalamic hypogonadism in female transgenic skinny mice overexpressing leptin. *J Clin Invest* 2000; 105 (6): 749–755
 283. Smithberg M and Runner NN. Pregnancy induced in genetically sterile mice. *J Hered* 1957; 48: 97–100
 284. Lane PW. The pituitary –gonad response of genetically obese mice in parabiosis thin and obese siblings. *Endocrinology* 1959; 65: 863–868
 285. Bouvattier C, Lahlou N, Roger M and Boungneres P. Hyperleptinemia is associated with impaired gonadotropin response to GnRH during late puberty in obese girls, not boys. *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 653–658
 286. Brann DW, Sevilla L, Zamorano PL and Mahesh VB. Regulation of leptin gene expression and secretion by steroid hormones. *Steroids* 1999; 64: 659–663
 287. Pellemounter MA, Baker MB and Mc Caleb M. Does estradiol mediate leptin' s effects on adiposity and body weight ? *Am J physiol* 1999; 276(5): E 955 –E 963
 288. Wu –Peng S, Rosenbaum M, Nicolson M, Chu SC and Leibel RL. Effects of exogenous gonadal steroids on leptin homeostasis in rats. *Obesity Research* 1999; 7: 586–592
 289. Castracane VD, Kraemer RR, Franken MA, et al. Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity, and estrogen administration. *Fertility Sterility* 1998; 70: 472–477
 290. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J, et al. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3424 –3427
 291. Haffner SM, Mykkanen L, Sern MP. Leptin concentrations in women in the San Antonio Heart study: effect of menopausal status and post menopausal replacement therapy. *Am J Epidemiol* 1997; 146: 581–585
 292. Messinis I.E, Milingos S, Zikopoulos K, et al. Changes in pituitary response to gonadotrophin – releasing hormone following bilateral ovariectomy in women treated with follicle – stimulating hormone. *Gynecol. Endocrinol*; 1996; 10: 383-390
 293. Alexandris E, Milingos S, Kollios G, et al. Changes in gonadotrophin response to gonadotrophin – releasing hormone in normal women following bilateral ovariectomy. *Clin Endocrinol* 1997; 47: 721-726
 294. Brobeck J, Wheatland M, and Strominger J. Variations in regulation of energy exchange associated with estrus, diestrus, and pseudopregnancy in rats. *Endocrinology* 1947; 40: 65-69
 295. Blaustein and Wade G.N. Ovarian influences on the meal patterns of female rats. *Physiol Behav* 1976; 17: 201-205
 296. Wade G.N. Some effects of ovarian hormones on food intake and body weight in female rats. *J Comp Phys Psych* 1973; 88: 183-186
 297. Kakolewski J, Cox V, and Valenstein E. Sex differences in body weight changes following gonadectomy of rats . *Psychol Rep* 1968; 22: 547-551
 298. Donohoe T.P, Stevens R, Johnson N.J, et al. Effects of stereoisomers of estradiol on food intake, body weight and hoarding behavior in female rats. *Physiol Behav* 1984; 32: 589-593
 299. Mordes J.P, Longcope C, Flatt J, et al. The rat LTW (m) Leyding cell tumor: cancer anorexia due to estrogen. *Endocrinology* 1984; 115: 167-172
 300. Roy E.J and Wade G.N. Role of food intake in estradiol – induced body weight changes in female rats. *Horm Behav* 1977; 8: 265-269

301. Mystkowski P, Seeley R.J, Havel P, et al. Hypothalamic melanin concentrating hormone is a target for the anorexic effect of estrogen (abstract 245). *Diabetes* 2000; 49 (suppl 1): A60
302. Haarbo J, Marslew U, Gotfredsen A, et al. Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. *Metabolism* 1991; 40: 1323-1327
303. Reubinoff B.E, Wurtman J, Rojansky N, et al. Effects of hormone replacement therapy on weight, body composition, fat distribution, and food intake in early postmenopausal women: a prospective study. *Fertil Steril* 1995; 64: 963-967
304. Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, et al.. Body weight, body fat, fat distribution and hormone replacement therapy in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4074- 4078
305. Espeland M.A, Stefanick M.L, D. Kritz-Silverstein, et al.. Effect of postmenopausal hormone therapy on body weight and waist and hip girths. *Postmenopausal Estrogen – Progestin Interventions Study Investigators J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1549-1553.

Treatment of normal women with oestradiol plus progesterone prevents the decrease of leptin concentrations induced by ovariectomy

I.E.Messinis^{1,4}, I.Kariotis^{1,2}, S.Milingos¹, G.Kollios³ and K.Seferiadis³

¹Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Thessalia, ²State Department of Obstetrics and Gynaecology, Larissa and ³Department of Biological Chemistry, University of Ioannina, Ioannina, Greece

⁴To whom correspondence should be addressed at: Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Thessalia, 22 Papakiriazi Street, 41222 Larissa, Greece. E-mail: messinis@med.uth.gr

To study the role of oestradiol and progesterone in the secretion of leptin, 21 normally ovulating women were recruited from those scheduled for ovariectomy plus hysterectomy performed in mid-follicular phase of the cycle. Seven of the women were used as controls and received no hormonal treatment post-operatively. Another seven women received oestradiol (oestradiol group) and the remaining seven women received oestradiol plus progesterone (oestradiol plus progesterone group). Serum leptin values showed a temporal but significant increase 24 h after the operation and were significantly correlated with the cortisol and progesterone values, which increased temporarily at 12 h. At that time a marked decline in oestradiol concentrations was seen. After the temporal increase, leptin values in the controls and the oestradiol group decreased significantly up to day 4 ($P < 0.05$), while in the oestradiol plus progesterone group they increased ($P < 0.01$) and were significantly higher than in the other two groups ($P < 0.05$). Body mass index (BMI) was the most important variable accounting for the changes in leptin values post-operatively, but in the oestradiol plus progesterone group progesterone correlated significantly with leptin independently of BMI. These results suggest that progesterone and cortisol can stimulate leptin secretion in women regardless of oestradiol concentrations.

Key words: leptin/oestradiol/ovariectomy/ovary/progesterone

Introduction

Leptin, a product of the *ob* gene, is a protein that is secreted by the adipocytes (Zhang *et al.*, 1994). Evidence has been provided that this substance may participate in various metabolic and endocrine processes including reproductive function (Mantzoros and Moschos, 1998; Messinis and Milingos, 1999). It has recently been demonstrated that in women, leptin and oestradiol values show significant positive correlations both in the follicular phase of the menstrual cycle and during treatment with follicle-stimulating hormone (FSH) (Messinis *et al.*, 1998). Also in rats, the significant decrease in serum leptin

values that follows ovariectomy can be prevented by treatment with oestradiol (Shimizu *et al.*, 1997; Chu *et al.*, 1999). A significant decline in leptin concentrations after bilateral ovariectomy, which was significantly correlated with progesterone values, has also been seen in normal women (Messinis *et al.*, 1999).

Although these results suggest that ovarian steroids may play a role in leptin secretion, treatment of normal women with oestrogen plus progesterone in the form of the oral contraceptive pill or hormone replacement therapy did not have any effect on serum leptin concentrations (Kohrt *et al.*, 1996; Castracane *et al.*, 1998; Cella *et al.*, 2000). It may be that the doses of the steroids used in these preparations were not sufficient to stimulate leptin secretion. It remains, therefore, to investigate whether induction of 'physiological' concentrations of oestradiol and progesterone in blood, similar to those seen in the normal menstrual cycle, can affect leptin secretion. Furthermore, previous data in women have shown a temporal increase in leptin values within the first 24 h after ovariectomy (Messinis *et al.*, 1999), but the reason for this phenomenon is not known. The present study was undertaken to investigate the mechanisms of changes in leptin values following ovariectomy in normal women and to study further the role of oestrogen and progesterone in the secretion of this protein.

Materials and methods

Patients

The study included 21 normally ovulating women who volunteered for the study and gave written informed consent. Approval for the study was obtained from the local ethical committee. Clinical and endocrine characteristics of the women are shown in Table I. There were no significant differences in the age, body mass index (BMI), FSH, luteinizing hormone (LH), leptin and cortisol values between the three groups of women before the onset of the study. All women were studied during the first week following bilateral ovariectomy plus total abdominal hysterectomy performed for benign lesions of the genitalia, such as fibroids and menorrhagia. The operation was performed in the mid-follicular phase of the cycle (follicle size 14–16 mm in diameter by ultrasound). The women were divided into three groups based on whether they received hormonal treatment during the post-operative period. In the control group ($n = 7$), the women received no treatment. In the oestradiol group ($n = 7$), the women received oestradiol through three skin patches (Estraderm TTS®; Ciba-Geigy, Athens, Greece) releasing 100 µg/24 h. The first patch was applied immediately after the operation and the other two on post-operative days 3 and 6. All patches were removed on the day of discharge (day 7). In the oestradiol plus progesterone group ($n = 7$), the women received oestradiol, as in the oestradiol group, plus progesterone intravaginally from days 2–6 (Utrogestan® capsules,

100 mg/capsule; Faran, Athens, Greece). The dose of progesterone was 200 mg on day 2 (100 mg 12 h apart) and 300 mg/day from day 3 onwards (100 mg every 8 h). The intention was to induce concentrations of oestradiol and progesterone that are normally found in the mid- to late follicular and mid-luteal phases of the menstrual cycle respectively. Information regarding the dosages was obtained from pilot experiments performed in two volunteers before the onset of the study. In particular, two dosages of oestradiol (50 µg and 100 µg) and two dosages of progesterone (100 mg and 300 mg) were given to each of the two women during the follicular phase of two spontaneous cycles as follows: oestradiol on cycle days 2, 5 and 8 and progesterone on days 3, 4, 5, 6 and 7. The 50 µg dose of oestradiol and the 100 mg dose of progesterone induced serum oestradiol and progesterone concentrations that in peaks did not exceed 500 pmol/l and 10 nmol/l respectively, while with the higher doses concentrations approaching 1000 pmol/l and 20 nmol/l respectively were achieved. All operations were performed in the morning (0800 h) and lasted less than 90 min. No complications occurred during the operation in any of the women and the blood loss did not exceed 200 ml. The post-operative period was uneventful in all cases. A blood sample was taken from all women on the day of the operation (day 0), i.e. before the administration of the anaesthetic drugs. Another blood sample was taken 12 h after the operation. Further blood samples were obtained from each woman daily (0900 h) on days 3–7. In all blood samples oestradiol, progesterone, leptin and cortisol were measured.

Hormone assays

Oestradiol was measured in serum using a microparticle enzyme immunoassay (AxSYM Estradiol assay). Kits were purchased from Abbott Laboratories (Abbott Park, IL, USA). The results are expressed as pmol/l. For progesterone measurement in serum a solid-phase, chemiluminescent enzyme immunoassay was used (IMMULITE Progesterone). Kits were purchased from DPC (Los Angeles, CA, USA). The results are expressed as nmol/l. Leptin was measured in all serum samples in duplicate using a radioimmunoassay method and all samples were assayed in one batch. Kits were purchased from Linco Research (RIA, Linco Research, St Charles, MO, USA) and contained human leptin antibody prepared in rabbit and raised against highly purified human leptin and standards and tracer prepared with human leptin. The results are expressed as ng/ml. Cortisol was measured in serum using a fluorescence polarization immunoassay (TDx/TDxFLx Cortisol assay). Kits were purchased from Abbott Laboratories. The

results are expressed as µg/dl. The lower limits of detection for oestradiol, progesterone, leptin and cortisol were 73 pmol/l, 0.6 nmol/l, 0.5 ng/ml and 0.64 µg/dl respectively, while interassay and intra-assay coefficients of variation were 8.4 and 7.1%, 7.2 and 5.8%, 6.3 and 7.0% and 6.4 and 7.8% respectively.

Statistical analysis

The results were statistically analysed using one-way analysis of variance. To achieve an approximate normal distribution of the data, before the statistical evaluation hormonal values were transformed into logarithms. However, in the results the arithmetic values are presented unless stated otherwise. Correlations between various parameters were calculated by using simple and multiple linear regressions.

Results

Figure 1 shows serum concentrations of leptin, oestradiol, progesterone and cortisol before and after the operation in the three groups of women. Basal values of these hormones before the onset of the operation (day 0) did not differ between the three groups. Serum leptin values (mean ± SEM) declined significantly 12 h from the operation ($P < 0.05$), before showing a temporal but significant increase at 24 h (post-operative day 1) in all three groups (26.9 ± 7.7 , 24.8 ± 2.0 and 21.2 ± 5.7 ng/ml respectively, $P < 0.05$). Leptin values then declined on day 2 in all three groups ($P < 0.01$) and further on days 3 and 4 in the control group (7.2 ± 1.4 and 6.2 ± 1.0 ng/ml respectively, $P < 0.05$) and the oestradiol group (8.5 ± 1.1 and 9.0 ± 1.4 ng/ml respectively, $P < 0.05$), while in the oestradiol plus progesterone group leptin values increased gradually from day 2 to 5 ($P < 0.01$) and 7 ($P < 0.01$). A slight but significant increase in leptin values was seen from day 4 to 5 in the controls and the oestradiol group ($P < 0.05$) with no change thereafter. Leptin values in the oestradiol plus progesterone group were significantly higher than in the control group from day 2 to 7 and the oestradiol group on days 3 and 4 (Figure 1).

Figure 1 also shows the percentage change in serum leptin values in relation to the pre-operative value on day 0. In the controls and the oestradiol group, leptin values (mean ± SEM) decreased respectively on day 3 to $63.2 \pm 6.7\%$ ($P < 0.05$) and $55.9 \pm 4.5\%$ ($P < 0.001$) and on day 4 to $57.5 \pm 7.5\%$ ($P < 0.05$) and $63.1 \pm 11.7\%$ ($P < 0.05$), while in the oestradiol plus progesterone group there was no significant change on either day ($97.1 \pm 12.8\%$ and $112.0 \pm 18.2\%$ respectively). The decrease in the control group was also significant on days 5–7 ($P < 0.05$). The difference was significant between the oestradiol plus progesterone group and the controls at all points from days 3–7 and between the oestradiol plus progesterone group and the oestradiol group on days 3 and 4 (Figure 1).

Serum oestradiol values declined significantly as early as 12 h after the operation in the control group and remained below the value of 100 pmol/l up to day 7 (Figure 1). In contrast, in the oestradiol group and the oestradiol plus progesterone group serum oestradiol values did not decline, but remained at or above the pre-operative value throughout the whole experimental period. At all points, serum oestradiol

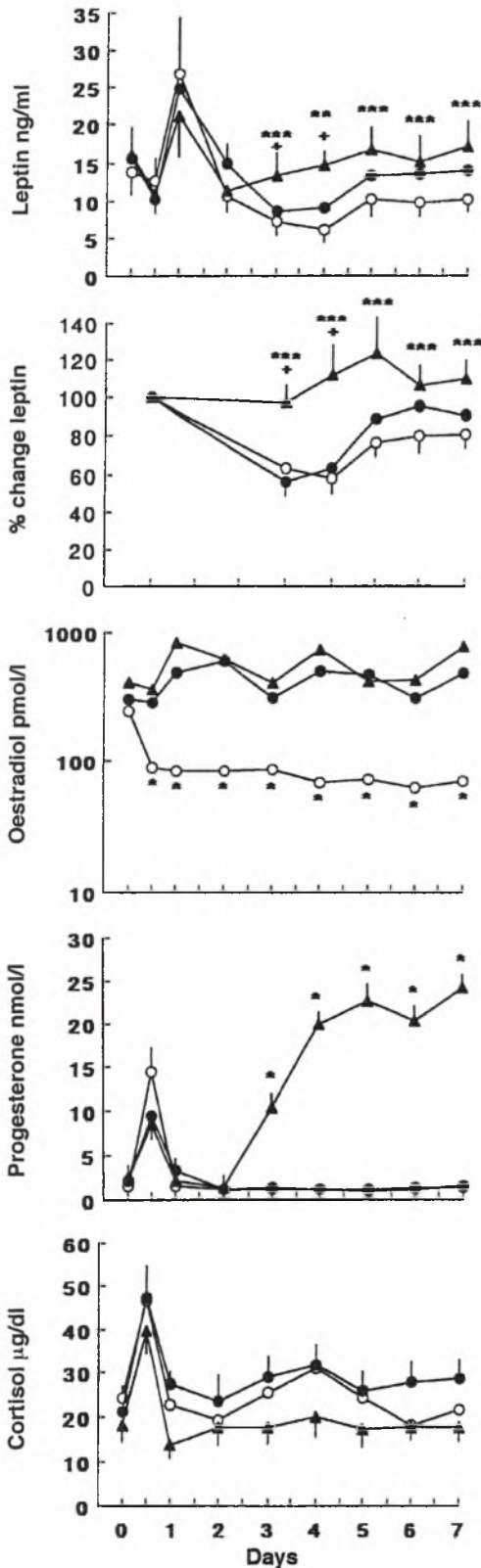
Table I. Clinical and hormonal parameters in the three groups of women before the operation (day 0)

	Control group	Oestradiol group	Oestradiol plus progesterone group
Women (n)	7	7	7
Age (years)	44.4 ± 0.5 (42–46)	44.8 ± 0.5 (42–46)	43.5 ± 0.6 (41–46)
BMI (kg/m ²)	25.7 ± 1.2 (21–29)	26.3 ± 0.8 (23–29)	25.3 ± 1.5 (20–28)
FSH (IU/l)	7.6 ± 0.7 (6.2–10.5)	7.4 ± 1.1 (6.0–10.7)	6.4 ± 0.6 (5.5–9.3)
LH (IU/l)	4.9 ± 0.5 (4.5–6.0)	5.0 ± 0.5 (4.6–6.0)	5.4 ± 0.5 (4.9–6.3)
Leptin (ng/ml)	13.3 ± 3.4 (4.2–24.9)	15.6 ± 2.0 (6.0–21.7)	16.0 ± 3.9 (2.8–24.3)
Cortisol (µg/dl)	24.4 ± 1.8 (21.5–34.7)	21.4 ± 4.1 (13.2–32.8)	18.2 ± 1.0 (14.3–31.1)

Values are mean ± SEM. Ranges are in parentheses.
BMI = body mass index.

concentrations were significantly higher in these two groups than in the control group (Figure 1).

Serum values of progesterone showed a temporal but significant increase at 12 h after the operation ($P < 0.001$), returning to the pre-treatment value on day 1 (Figure 1). A significant decrease was seen from days 1–2 ($P < 0.05$). From days 2–7, progesterone values remained very low in the control and the oestradiol groups, while in the oestradiol plus progesterone group, due to the exogenous administration of this hormone, the values increased rapidly from days 2–7 ($P < 0.001$) and remained unchanged at this increased value (Figure 1). A temporal but significant increase ($P < 0.001$), coincident with that of progesterone, was also seen in serum cortisol values 12 h after the operation in all three groups (Figure 1). Then, cortisol concentrations declined on day 1 and did not change significantly thereafter, although there was a trend for lower values in the oestradiol plus progesterone group (Figure 1).



A significant decrease in body weight (mean \pm SEM) from days 0 to 7 was seen in the controls (2.7 ± 0.1 kg) and in the oestradiol group (3.6 ± 0.2 kg) ($P < 0.001$), but not in the oestradiol plus progesterone group (1.0 ± 0.5 kg). Consequently, BMI was decreased in the controls and the oestradiol group but not in the oestradiol plus progesterone group. Serum leptin concentrations before and after the operation were significantly correlated with BMI in all three groups combined (day 0: $r = 0.555$, $P < 0.01$, $n = 21$ and day 7: $r = 0.496$, $P < 0.05$, $n = 21$). Significant positive correlations were found from days 2–7 between leptin and progesterone values ($r = 0.409$, $P < 0.01$, $n = 42$) and between leptin and oestradiol values ($r = 0.363$, $P < 0.05$, $n = 42$) only in the oestradiol plus progesterone group. In multiple regression analysis, changes in BMI from days 2–7 was the most important determinant that was significantly correlated with leptin values in all three groups (controls $r = 0.419$, $P < 0.01$; oestradiol group $r = 0.400$, $P < 0.01$; oestradiol plus progesterone group $r = 0.728$, $P < 0.001$, $n = 42$); however, in the oestradiol plus progesterone group progesterone was significantly correlated with leptin independently of BMI. When all three groups were combined, the log-transformed values of leptin increment from 12–24 h following the operation (changes in leptin) were significantly correlated with those of cortisol ($r = 0.687$, $P < 0.001$, $n = 21$) and progesterone ($r = 0.637$, $P < 0.01$, $n = 21$) at 12 h (Figure 2). Between cortisol and progesterone values on day 0 (0 and 12 h) and day 1 there was a significant positive correlation ($r = 0.641$, $P < 0.001$, $n = 63$).

Figure 1. Serum values (mean \pm SEM) of leptin, oestradiol, progesterone and cortisol before and after bilateral ovariectomy plus total abdominal hysterectomy performed in mid-follicular phase (day 0) in 21 normally cycling women. (○) Control group ($n = 7$), no hormonal treatment post-operatively. (●) Oestradiol group ($n = 7$), treatment with oestradiol through skin patches (post-operative days 0, 3 and 6). (▲) Oestradiol plus progesterone group ($n = 7$), treatment with oestradiol, as in the oestradiol group, plus progesterone intravaginally on days 2–7. * $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.05$ (differences in leptin values between the oestradiol plus progesterone group and the controls, differences in oestradiol values between the controls and the two treatment groups and differences in progesterone values between the oestradiol plus progesterone group and the other two groups). † $P < 0.05$ (differences in leptin values between the two treatment groups).

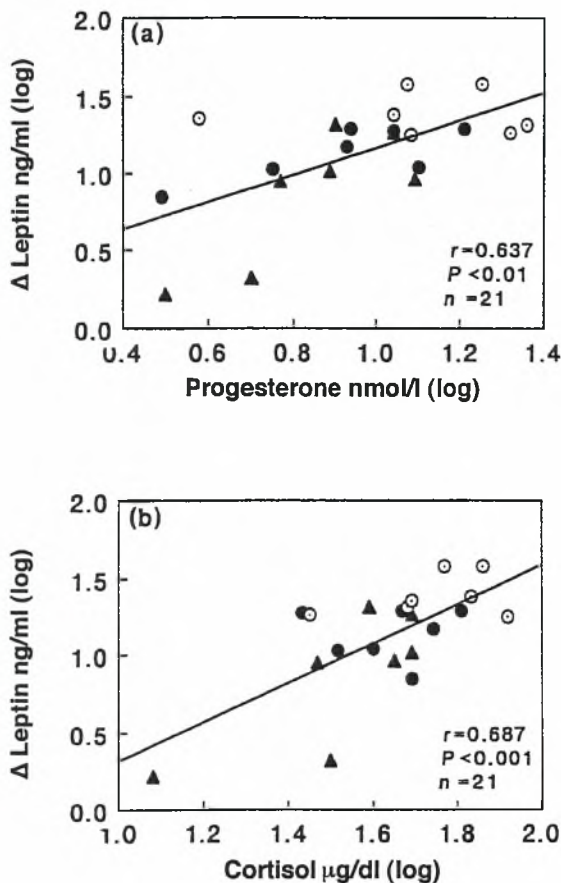


Figure 2. Correlations between the log transformed values of leptin increment (Δ leptin) from 12–24 h following bilateral ovariectomy and those of (a) progesterone and (b) cortisol at 12 h after the operation. Ovariectomy plus total abdominal hysterectomy was performed in mid-follicular phase in 21 normally cycling women. (○) Control group ($n = 7$), no hormonal treatment post-operatively. (●) Oestradiol group ($n = 7$), treatment with oestradiol through skin patches (post-operative days 0, 3 and 6). (▲) Oestradiol plus progesterone group ($n = 7$), treatment with oestradiol, as in oestradiol group, plus progesterone intravaginally from days 2–7.

Discussion

The present study confirms previous data that leptin concentrations decline significantly in normal women after bilateral ovariectomy in parallel with the concentrations of oestradiol and progesterone (Messinis *et al.*, 1999). The reason for this decline is not known. Although BMI seems to be an important determinant, the present study shows for the first time that treatment of the women with oestradiol plus progesterone prevented the ovariectomy-induced decrease in leptin values, while oestradiol alone did not have any effect. Since with this treatment, concentrations of oestradiol and progesterone in blood similar to those normally seen in the menstrual cycle were achieved, it is suggested that oestradiol at 'physiological' concentrations is not a principal regulator of leptin secretion, while the role of progesterone is critical.

The present results, in terms of the effect of oestrogen on leptin secretion, do not confirm earlier studies on rats according to which treatment of the animals with oestradiol prevented

the ovariectomy-induced decline in leptin values (Shimizu *et al.*, 1997; Chu *et al.*, 1999). The reason for this difference is not known. However, in the studies on rats treatment with oestradiol was applied for a few weeks, while in the present study it was applied for only a few days. It is also possible that species differences are important, since administration of oestradiol to female rats significantly elevated within 12 h amounts of leptin mRNA in adipose tissue and plasma leptin concentrations (Brann *et al.*, 1999), while in the present study in women oestradiol was without any effect. Also, the results of the current study are different from those in previous studies in which treatment of normal women with combinations of oestrogen plus progesterone, in the form of either the oral contraceptive pill or hormone replacement therapy, did not affect leptin values (Kohrt *et al.*, 1996; Castracane *et al.*, 1998; Cella *et al.*, 2000). There are, however, great differences between these and the present study in terms of the design, the aim and the dosages used, which in those preparations may have been insufficient to stimulate leptin secretion.

Although according to the present results, the role of oestradiol in the control of leptin secretion during the normal menstrual cycle is of minor significance, *in-vitro* data have shown that oestradiol can stimulate leptin production from human adipocytes in cultures (Casabiell *et al.*, 1998), while oestradiol high affinity binding sites have been detected in fat cells (Wade and Gray, 1978). Additionally, *in-vivo* data have shown significant positive correlations between oestradiol and leptin values during the follicular phase of the cycle with a significant increase in circulating leptin in the late follicular phase (Messinis *et al.*, 1998; Cella *et al.*, 2000). The possibility, therefore, exists that oestradiol may exert a priming effect on adipocytes thus sensitizing these cells to subsequent stimulants, such as progesterone. However, since in the present study a progesterone alone group was not included, this possibility needs to be further examined. Alternatively, oestradiol may exert a delaying effect on leptin secretion, since a trend for higher leptin values during the second part of the post-operative period was seen in the oestradiol-treated women in this study as compared to controls. However, this requires further investigation.

The finding that leptin values were increased when progesterone was added to the oestradiol regimen could be interpreted as indicating that increased concentrations of oestradiol are a prerequisite for progesterone to exert an effect on leptin secretion in women. However, based on further results of the present study this possibility is not likely. In particular, a temporal increase in leptin values occurred in all women within the first 24 h following ovariectomy. This increase, which has been reported previously, does not seem to be related to the type of the operation, because it has also been seen after cholecystectomy in women (Messinis *et al.*, 1999). Since the temporal increase in leptin values was preceded by a significant increase in cortisol concentrations, which were significantly correlated with leptin values, and since dexamethasone can stimulate leptin production *in vivo* (Larsson and Ahren, 1996; Papaspyrou-Rao *et al.*, 1997), it is possible that a stress-related increase in cortisol was responsible for the subsequent increase in circulating leptin values. Coincident

with the increase of cortisol was an increase in progesterone concentrations and since the ovaries had already been removed, it is suggested that progesterone at that stage was of adrenal origin. The possibility therefore cannot be excluded that the temporal increase in progesterone values contributed to the temporal increase in leptin, because significant positive correlations were also found between progesterone and leptin values. Since at the time of the progesterone increase oestradiol values declined markedly, it is suggested that progesterone may be able to stimulate leptin secretion even in the presence of low concentrations of oestradiol.

From a physiological point of view, the present findings could explain the previously reported higher concentrations of leptin in the luteal than in the follicular phase of the cycle (Hardie *et al.*, 1997; Mannucci *et al.*, 1998; Messinis *et al.*, 1998; Riad-Gabriel *et al.*, 1998; Quinton *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 2000) as the result of a stimulating effect of progesterone, although there is controversy as to whether leptin and progesterone titres are significantly correlated during the luteal phase (Hardie *et al.*, 1997; Quinton *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 2000). The disparity between oestradiol plus progesterone group and the other two groups in terms of the decrease in body weight and BMI during the post-operative period is difficult to explain. Nevertheless, it is rather unlikely that this is related to changes in fat stores, since similar dietary restrictions were applied to all three groups of women. It is possible that this is related to water retention, which may happen during the luteal phase of the cycle, although this was not investigated in this study. Finally, the reason for the increase in leptin values in the controls and the oestradiol-treated group during the second half of the experimental period is unclear; however, this may be related to the increased intake of food that was initiated at that stage of the study.

In conclusion, the present study demonstrates for the first time that the temporal increase in leptin values that occurs 24 h after bilateral ovariectomy in pre-menopausal women is preceded by a significant increase in progesterone and cortisol values and a marked decline in oestradiol concentrations. In addition, the subsequent decrease in leptin values below the pre-operative value is prevented by treatment with oestradiol plus progesterone, but not with oestradiol alone. It is suggested that progesterone and cortisol exert stimulating effects on leptin secretion in normal women regardless of the concentrations of oestradiol.

Acknowledgements

We wish to thank Professor O.Tsolas, Director of the Department of Biological Chemistry, University of Ioannina for providing the laboratory facilities for the hormone assays.

References

Brann, D.W., De Sevilla, L., Zamorano, P.L. and Mahesh, V.B. (1999) Regulation of leptin gene expression and secretion by steroid hormones. *Steroids*, **64**, 659–663.

Casabiell, X., Pineiro, V., Peino, R. *et al.* (1998) Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue *in vitro*: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 2149–2155.

Castracane, V.D., Kraemer, R.R., Franken, M.A. *et al.* (1998) Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity, and estrogen administration. *Fertil. Steril.*, **70**, 472–477.

Cella, F., Giordano, G. and 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**, 174–178.

Chu, S.C., Chou, Y.C., Liu, J.Y. *et al.* (1999) Fluctuation of serum leptin concentration in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. *Life Sci.*, **64**, 2299–2306.

Hardie, L., Trayhurn, P., Abramovich, D. and Fowler, P. (1997) Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin. Endocrinol.*, **47**, 101–106.

Kohrt, W.M., Landt, M. and Birge, S.J. Jr (1996) Serum leptin concentrations are reduced in response to exercise training, but not hormone replacement therapy in older women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 3980–3985.

Larsson, H. and Ahren, B. (1996) Short-term dexamethasone treatment increases leptin independently of changes in insulin sensitivity in healthy women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 4428–4432.

Ludwig, M., Klein, H.H., Diedrich, K. and Ortmann, O. (2000) Serum leptin concentrations throughout the menstrual cycle. *Arch. Gynecol. Obstet.*, **263**, 99–101.

Mannucci, E., Ognibene, A., Becorpi, A. *et al.* (1998) Relationship between leptin and oestrogen in healthy women. *Eur. J. Endocrinol.*, **139**, 198–201.

Mantzoros, C.S. and Moschos, S.J. (1998) Leptin: in search of role(s) in human physiology and pathophysiology. *Clin. Endocrinol.*, **49**, 551–567.

Messinis, I.E. and Milingos, S.D. (1999) Leptin in human reproduction. *Hum. Reprod. Update*, **5**, 52–63.

Messinis, I.E., Milingos, S., Zikopoulos, K. *et al.* (1998) Leptin concentrations in the follicular phase of spontaneous cycles and cycles superovulated with follicle stimulating hormone. *Hum. Reprod.*, **13**, 1152–1156.

Messinis, I.E., Milingos, S.D., Alexandris, E. *et al.* (1999) Leptin concentrations in normal women following bilateral ovariectomy. *Hum. Reprod.*, **14**, 913–918.

Papaspyrou-Rao, S., Schneider, S.H., Petersen, R.N. and Fried, S.K. (1997) Dexamethasone increases leptin expression in humans *in vivo*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 1635–1637.

Quinton, N.D., Laird, S.M., Okon, M.A. *et al.* (1999) Serum leptin concentrations during the menstrual cycle of healthy fertile women. *Br. J. Biomed. Sci.*, **56**, 16–19.

Riad-Gabriel, M.G., Jinagouda, S.D., Sharma, A. *et al.* (1998) Changes in plasma leptin during the menstrual cycle. *Eur. J. Endocrinol.*, **139**, 528–531.

Shimizu, H., Shimonura, Y., Nakanishi, Y. *et al.* (1997) Estrogen increases *in vivo* leptin production in rats and human subjects. *J. Endocrinol.*, **154**, 285–292.

Wade, G.N. and Gray, J.M. (1978) Cytoplasmic 17 beta-³H estradiol binding in rat adipose tissues. *Endocrinology*, **103**, 1695–1701.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M. *et al.* (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372**, 425–432.

Received on March 16, 2000; accepted on August 7, 2000

Leptin concentrations in normal women following bilateral ovariectomy

I.E.Messinis^{1,5}, S.D.Milingos¹, E.Alexandris²,
I.Kariotis^{2,3}, G.Kollios⁴ and K.Seferiadis⁴

¹Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Thessalia, 22 Papakiriazi Street, 41222 Larissa, State Departments of ²Obstetrics and Gynaecology and ³General Surgery, Larissa and ⁴Department of Biological Chemistry, University of Ioannina, Ioannina, Greece

⁵To whom correspondence should be addressed

To study the relationships between gonadal steroids and leptin, 20 women with normal cycles were investigated during the postoperative period following a laparotomy. Fourteen women underwent bilateral ovariectomy plus total hysterectomy either in the mid- to late follicular phase ($n = 7$, group 1) or in the early to midluteal phase ($n = 7$, group 2). The remaining six of the 20 women underwent cholecystectomy in the early to midfollicular phase of the cycle and were used as controls (group 3). In all three groups, serum leptin values decreased rapidly up to postoperative day 4. Then, leptin values increased significantly only in group 3 ($P < 0.05$). Leptin values before and after the operation showed significant positive correlations with body mass index (BMI), oestradiol and progesterone. However, with multiple regression analysis, BMI was the only parameter significantly correlated with leptin in group 3 (days 0 and 4–7), whereas in groups 1 and 2 progesterone and BMI showed independent significant correlations with leptin (days 0 and 8, $r = 0.601$ and $r = 0.602$ respectively). These results demonstrate for the first time a significant reduction in leptin concentrations in normal women following bilateral ovariectomy. Although BMI seems to be the predominant factor, it is also suggested that oestradiol and progesterone may participate in the control of leptin production during the human menstrual cycle.

Key words: body mass index/leptin/oestradiol/ovariectomy/ovary

Introduction

Leptin, a 16 kDa protein, is a product of the *ob* gene secreted by adipose tissue (Zhang *et al.*, 1994). In humans, the secretion of leptin is performed in a pulsatile fashion (Licinio *et al.*, 1998). This protein appears to regulate fat stores and body weight by decreasing appetite and increasing thermogenesis (Halaas *et al.*, 1995; Caro *et al.*, 1996a). The *ob/ob* mice that lack leptin become very obese and infertile and develop insulin resistance. However, fertility is restored in these animals after treatment with recombinant leptin (Barash *et al.*, 1996; Chehab

et al., 1996). In humans, the relationship between leptin and obesity is rather obscure. An association between obesity and leptin resistance has been proposed (Caro *et al.*, 1996b; Schwartz *et al.*, 1996), but the mechanism is not clear. Recently, a leptin binding factor has been identified in human serum which may influence the physiological response to leptin (Diamond *et al.*, 1997). On the other hand, although human obesity has not been linked to mutations of the leptin gene, recently a mutation of the gene for leptin was detected in two severely obese children with very low serum leptin concentrations (Montague *et al.*, 1997).

Since obesity is one of the symptoms in a significant proportion of women with polycystic ovary syndrome (PCOS), several studies have investigated changes in leptin concentrations in this syndrome (Brzechffa *et al.*, 1996; Chapman *et al.*, 1997; Laughlin *et al.*, 1997; Mantzoros *et al.*, 1997; Rouru *et al.*, 1997). Although the results are conflicting, it has become evident that leptin may play a role in certain cases of PCOS and may act as a link between fat and reproduction. Recent studies have detected leptin receptor mRNA in the human ovary and specific binding of leptin in ovine granulosa cells (Cioffi *et al.*, 1996; Spicer and Francisco, 1997), whereas experiments *in vitro* have shown that leptin may directly affect follicle stimulating hormone (FSH)-induced production of oestradiol by rat granulosa cells (Zachow and Magoffin, 1997). A possible relationship between oestrogen and leptin has been recently postulated. In rats, ovariectomy reduced significantly serum leptin values and the expression of *ob* gene in certain sites of white adipose tissue, changes which were reversed by oestradiol supplement (Shimizu *et al.*, 1997; Yoneda *et al.*, 1998). In humans, lower concentrations of leptin have been found in postmenopausal compared to premenopausal women and in men compared to pre- or postmenopausal women, while during the normal menstrual cycle the concentrations of leptin are higher in the luteal than in the follicular phase (Hardie *et al.*, 1997; Shimizu *et al.*, 1997; Messinis *et al.*, 1998).

The present study was undertaken to examine further the relationships between gonadal steroids and leptin in normal women by investigating changes in leptin concentrations following bilateral ovariectomy.

Materials and methods

Patients

The study included 20 normally cycling women who volunteered for the study and gave written informed consent. Approval for the study was obtained from the local ethical committee. In all women ovulation was confirmed by ultrasound and serum progesterone measurement before admission to the study. Clinical and endocrine characteristics

Table I. Clinical and hormonal parameters of the women at the start of the study before the operation (day 0)

	Group 1	Group 2	Group 3
Women (n)	7	7	6
Age (years)	42.8 ± 0.7	41.7 ± 0.6	40.5 ± 1.8
Weight (kg)	69.2 ± 3.8	72.7 ± 1.9	71.3 ± 4.9
BMI (kg/m ²)	26.3 ± 1.1	26.9 ± 0.8	28.2 ± 1.5
FSH (IU/l)	6.8 ± 1.4	3.5 ± 0.7 ^a	6.2 ± 0.6
LH (IU/l)	5.9 ± 1.1	2.1 ± 0.5 ^a	5.4 ± 0.6
Leptin (ng/ml)	22.7 ± 3.4	44.7 ± 4.5 ^a	20.2 ± 3.8

Values are mean ± SEM.

^a*P* < 0.05 (differences from groups 1 and 3).

BMI = body mass index; FSH = follicle stimulating hormone; LH = luteinizing hormone.

of the women are shown in Table I. All women were studied during the postoperative period following a laparotomy performed under general anaesthesia. Fourteen of them underwent bilateral ovariectomy plus total hysterectomy because of benign conditions of the genitalia, such as fibroids and menorrhagia, while the ovaries were normal. In seven of the 14 women (group 1), the operation was performed during the mid- to late follicular phases of the cycle, i.e. when the size of the dominant follicle was 15–16 mm in diameter as assessed by ultrasound, and in the remaining seven (group 2) in the early to midluteal phase, i.e. 5 days after the spontaneous luteinizing hormone (LH) surge. The latter was detected by daily urine evaluation using kits for LH measurements (Organon LH color; Organon Hellas, Greece) and was confirmed by two or three blood samples on the day on which the test was positive. The remaining six of the 20 women were used as controls (group 3). These women underwent cholecystectomy for benign conditions of the gallbladder, such as cholelithiasis, and the operation was performed in early to midfollicular phases of the menstrual cycle (days 4–7). All operations were performed in the morning (0800 h) and lasted less than 90 min. During the operation there were no complications and the loss of blood did not exceed 200 ml. The postoperative period was uneventful in all cases and the women were discharged home on postoperative days 7 (group 3) or 8 (groups 1 and 2). During the operation the presence of a dominant follicle in group 1 or a corpus luteum in group 2 was confirmed. Blood samples were taken from all women starting on the day of the operation, i.e. before the administration of the anaesthetic drugs and continuing initially every 12 h and then every 24 h up to the day of discharge. In all blood samples FSH, LH, oestradiol, progesterone and leptin concentrations were measured.

Hormone assays

For FSH and LH measurements, immunometric assays based on enhanced luminescence were used (Amerlite FSH and Amerlite LH assay respectively; Amersham International plc, Amersham, UK). The results are expressed as IU/l of standards calibrated against the WHO 2nd IRP of human FSH (58/549) and the 1st IRP of human LH (68/40). Oestradiol was measured using a competitive immunoassay based on enhanced luminescence (Amerlite Estradiol-60 assay; Amersham). The results are expressed as pmol/l. For progesterone measurement a competitive immunoassay was used (Kodak Amerlite Progesterone assay; Amersham). The results are expressed as nmol/l. Leptin was measured in all serum samples in duplicate using a radioimmunoassay method and all samples were assayed in one batch. Kits were purchased from Linco Research (RIA, Linco Research, St Charles, MO, USA) and contained human leptin antibody prepared in rabbit and raised against highly purified human leptin and standards and tracer prepared with human leptin. The results are expressed as

ng/ml. The lower limits of detection for FSH, LH, oestradiol and progesterone were 0.5 IU/l, 0.12 IU/l, 50 pmol/l and 0.35 nmol/l respectively, while interassay and intra-assay coefficients of variation were 7.5 and 6.0%, 9.0 and 6.8%, 9.1 and 8.0%, and 7.0 and 6.6% respectively. The lower limit of detection for leptin was 0.5 ng/ml, while inter- and intra-assay coefficients of variation were 6.2 and 7.1% respectively.

Statistical analysis

For the purpose of the statistical analysis, hormone results were transformed into logarithms in order to achieve an approximately normal distribution of the data. However, in the results the arithmetic means are presented. For comparisons within the same group, statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) and paired *t*-test as appropriate, while for comparisons between groups two-way ANOVA was used (effects of time and of women). Correlations between various parameters were calculated by using simple and multiple linear regression.

Results

Serum concentrations of FSH and LH (mean ± SEM) before the onset of the operation (day 0) were significantly lower in group 2 (3.5 ± 0.7 and 2.1 ± 0.5 IU/l respectively) than in group 1 (6.8 ± 1.4 and 5.9 ± 1.1 IU/l respectively, *P* < 0.05) and group 3 (6.2 ± 0.6 and 5.4 ± 0.6 IU/l respectively, *P* < 0.05, Table I). Both FSH and LH values increased gradually but significantly from the day of the operation up to postoperative day 8 both in group 1 (32.9 ± 2.0 and 12.8 ± 1.7 IU/l respectively, *P* < 0.01) and group 2 (15.4 ± 3.1 and 5.5 ± 1.0 IU/l respectively, *P* < 0.01). Details of gonadotrophin changes in 10 of the 14 patients of groups 1 and 2 are reported elsewhere (Alexandris *et al.*, 1997). In group 3, both FSH and LH showed a temporal but significant increase 12 h from the operation (*P* < 0.05, Figure 1). Then, both gonadotrophins decreased on day 2, remaining stable from day 3 to day 6 and increasing on day 7, indicating the onset of an LH surge.

Serum leptin values (mean ± SEM) on day 0 were significantly higher in group 2 (44.7 ± 4.5 ng/ml) than in groups 1 (22.7 ± 3.4 ng/ml, *P* < 0.05) and 3 (20.2 ± 3.8 ng/ml, *P* < 0.05, Table I, Figure 1) with no significant difference between groups 1 and 3. During the first 24 h following the operation, leptin values increased significantly in all three groups, peaking on day 1 (*P* < 0.05) and remaining on that day significantly higher in group 2 than in groups 1 and 3 with no significant difference between groups 1 and 3 (Figure 1). Then, leptin values declined significantly from days 1–4, gradually in groups 1 and 3 and more rapidly in group 2 (*P* < 0.01) with no significant difference between the three groups. From day 4 to day 7 or 8 after the operation serum leptin concentrations did not change significantly in groups 1 and 2, but increased significantly in group 3 (*P* < 0.05); however, there were significant differences between the three groups at any point (Figure 1).

Serum oestradiol values (mean ± SEM) on day 0 did not differ significantly between groups 1 (286 ± 57 pmol/l), 2 (270 ± 71 pmol/l) and 3 (227 ± 38 pmol/l), although they were lower in group 3. Oestradiol values decreased significantly in groups 1 and 2 at 12 h from the operation (*P* < 0.05) and

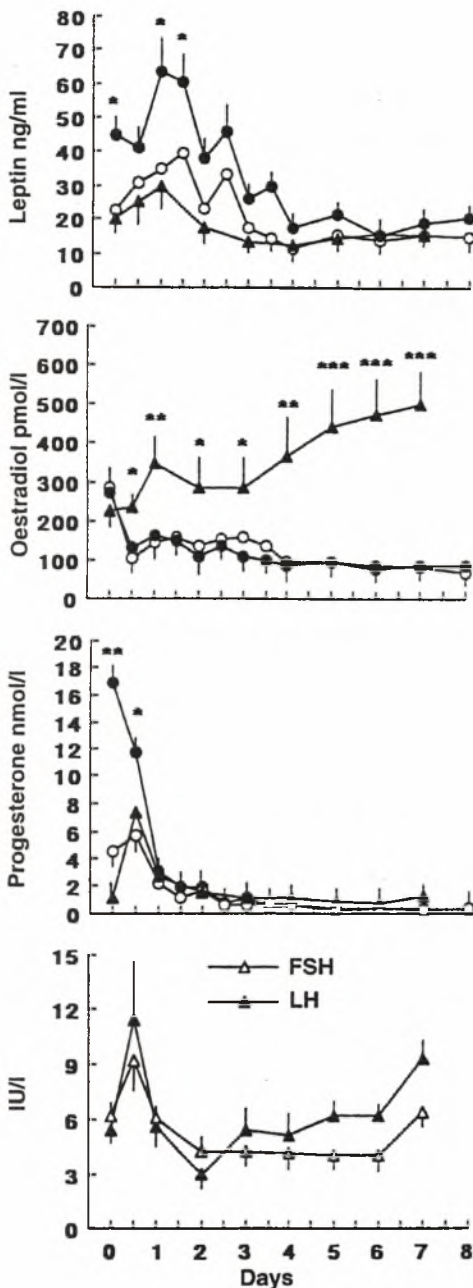


Figure 1. Serum concentrations (mean \pm SEM) of leptin, oestradiol, progesterone and gonadotrophins in normally cycling women before and after bilateral ovariectomy plus total abdominal hysterectomy performed (day 0) (○) in the mid- to late follicular phases (seven women, group 1) or (●) in the early to midluteal phase of the cycle (seven women, group 2). Another six women underwent cholecystectomy (▲) in the early to midfollicular phase of the cycle. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (differences from the other two groups). FSH = follicle stimulating hormone; LH = luteinizing hormone.

further up to day 8 with no significant difference between the two groups at any point (Figure 1). In group 3, however, serum oestradiol values showed a temporal but significant increase on day 1 ($P < 0.05$), decreasing slightly on day 2 and then increasing gradually up to day 7 (500 ± 78 pmol/l,

$P < 0.01$, Figure 1). Oestradiol values were significantly higher in group 3 than in groups 1 and 2 during the whole postoperative period (Figure 1). Serum concentrations of progesterone (mean \pm SEM) were on day 0 significantly higher in group 2 (16.9 ± 1.2 nmol/l) than in group 1 (4.5 ± 0.6 nmol/l, $P < 0.01$) and group 3 (1.2 ± 0.2 nmol/l, $P < 0.01$). After the operation, in groups 1 and 2 progesterone values decreased rapidly during the first 24 h, particularly in group 2 and gradually thereafter up to postoperative day 8 with no significant difference between the two groups at any point (Figure 1). In group 3, serum progesterone values showed a temporal but significant increase 12 h from the operation ($P < 0.01$) remaining low throughout the rest of the postoperative period (Figure 1). The described changes in FSH, LH, oestradiol and progesterone concentrations during the postoperative period in group 3 (Figure 1) resemble those seen during the mid- to late follicular phase of the normal menstrual cycle.

A slight but non-significant decrease in body weight (mean \pm SEM) was noted on postoperative day 8 compared with day 0 in group 1 (0.53 ± 0.20 kg) and group 2 (0.71 ± 0.30 kg) with no significant difference between the two groups. In group 3, the decrease in body weight on day 7 (3.2 ± 0.2 kg) was significantly greater than in groups 1 and 2 ($P < 0.01$). BMI values were available in groups 1 and 2 on days 0 and 8 and in group 3 on days 0, 4, 5, 6 and 7. BMI (mean \pm SEM) did not change significantly on postoperative day 8 compared with the value on day 0 both in group 1 (26.1 ± 1.1 and 26.3 ± 1.1 kg/m² respectively) and group 2 (26.7 ± 0.7 and 26.9 ± 0.8 kg/m² respectively), while it decreased significantly in group 3 from day 0 (28.2 ± 1.5 kg/m²) to day 7 (26.3 ± 1.5 kg/m², $P < 0.001$). A significant decrease in BMI was also seen in group 3 from day 0 to day 4 (27.3 ± 1.5 kg/m², $P < 0.001$) and from day 4 to day 7 ($P < 0.001$). Serum leptin concentrations before and after the operation correlated significantly with BMI in groups 1 and 2 combined ($r = 0.632$, $P < 0.001$, $n = 28$, Figure 2b). A significant positive correlation between leptin and BMI was also found in group 3 before and after the operation ($r = 0.892$, $P < 0.001$, $n = 30$) (Figure 2a). Serum leptin values correlated significantly with oestradiol values from postoperative days 4–7 in group 3 ($r = 0.480$, $P < 0.05$, $n = 24$, Figure 3a) and from day 0 to day 8 in group 1 ($r = 0.467$, $P < 0.001$, $n = 91$, Figure 3c). In group 2, the correlations between leptin and oestradiol values were not significant. Significant positive correlations were also found between serum leptin and progesterone concentrations from postoperative day 0 to day 8 in group 1 ($r = 0.239$, $P < 0.05$, $n = 91$, Figure 3d) and group 2 ($r = 0.217$, $P < 0.05$, $n = 91$, Figure 3d) and from day 0 to day 7 in group 3 ($r = 0.323$, $P < 0.05$, $n = 54$, Figure 3b). When multiple regression analysis was performed in group 3, the significant positive correlation between leptin and oestradiol shown in Figure 3a was eliminated and leptin correlated significantly only with BMI. When leptin values on days 0 and 8 of groups 1 and 2 were combined, by simple regression analysis they correlated significantly with BMI ($r = 0.602$, $P < 0.01$, $n = 28$), progesterone ($r = 0.601$, $P < 0.01$, $n = 28$) and oestradiol values ($r = 0.386$, $P < 0.05$, $n = 28$).

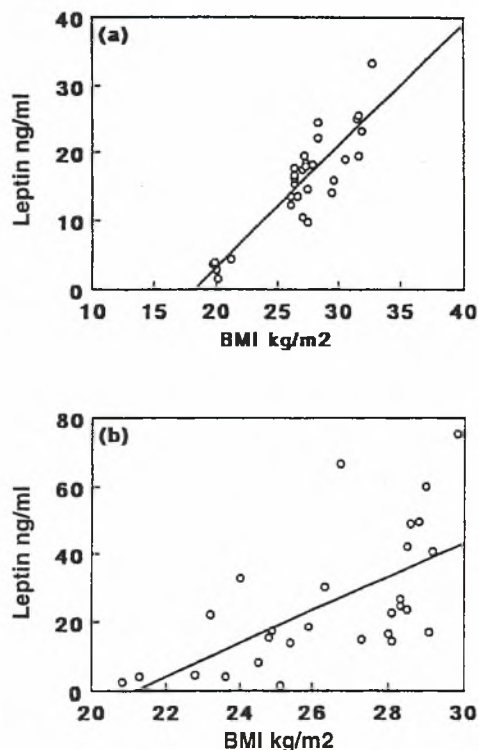


Figure 2. Correlations between serum leptin concentrations and body mass index (BMI) (a) in six cholecystectomized women (group 3) before the onset of the operation (day 0) and on postoperative days 4, 5, 6 and 7 ($r = 0.892$, $P < 0.001$, $n = 30$) and (b) in 14 ovariectomized women (groups 1 and 2) on days 0 and 8 ($r = 0.632$, $P < 0.001$, $n = 28$).

When multiple regression analysis was applied, the significant correlation of leptin with oestradiol was eliminated, while the correlation of leptin with progesterone and BMI were preserved. Oestradiol values correlated significantly with those of progesterone on days 0 and 8 in groups 1 and 2 ($r = 0.520$, $P < 0.01$, $n = 28$) and in group 3 from days 4–7 ($r = 0.405$, $P < 0.05$, $n = 24$). No significant correlations were found between BMI and oestradiol or progesterone values in all three groups of women.

Discussion

The present study is the first in which changes in leptin concentrations were investigated in women following bilateral ovariectomy. A significant reduction in leptin values was seen in both phases of the cycle during the week following the operation which, however, was preceded by a rapid increase during the first 24 h after the operation. This temporal increase in leptin values is difficult to explain. It seems rather unlikely that this is related to the abrupt decrease in oestradiol and progesterone concentrations as a similar temporal increase in leptin values was also seen in women of group 3, in whom serum oestradiol values, instead of declining, increased significantly. So far, oestradiol has been found to exert a stimulatory effect on leptin production in rats *in vitro* (Murakami *et al.*, 1995). An explanation for this early increase in leptin values

might be that during the incision of the abdominal wall manipulation of the s.c. fat tissue took place and as a result leptin was released in high amounts into the circulation, but this needs to be investigated. Finally, one cannot exclude the possibility that the early increase in leptin following the operation was a response to the surgical stress, as happened with gonadotrophins and gonadal steroids in this and previous studies (Messinis *et al.*, 1996; Alexandris *et al.*, 1997).

After the temporal increase, leptin values declined rapidly in all three groups of women up to postoperative day 4 to concentrations that were significantly lower than before the operation. At the same time, changes in oestradiol values varied considerably among groups, indicating that leptin changes during the immediate period following ovariectomy are independent of oestradiol. These results contradict data in rats in which treatment with oestrogen reversed the significant reduction in serum leptin concentrations and in the expression of *ob* gene in white adipose tissue that was seen 2–8 weeks after ovariectomy (Shimizu *et al.*, 1997; Yoneda *et al.*, 1998). It is evident, therefore, that factors other than oestradiol controlled leptin secretion during the postoperative period in the present study. Such factors could be changes in food intake, reduction in fat stores and body weight and consequently in BMI and decrease in motor activity. These factors, however, are interrelated and, although fat stores were not measured in the present study, only a small reduction in body weight with no significant changes in BMI was seen in the groups of ovariectomized women 1 week after the operation. Since body weight measurements were not available in the ovariectomized women during the greater part of the postoperative period, one cannot exclude the possibility that a significant reduction in body weight occurred in these women during the first 4 days after the operation at a time when great restrictions in food intake were applied. Although dramatic changes in leptin values in response to changes in food intake are not expected in normal or obese subjects (Korbonits *et al.*, 1997), a recent study has shown that even a 4% reduction in body weight over a period of 7 days resulted in a 61% decrease in leptin values in men and women (Dubuc *et al.*, 1998). These data, together with the significant positive correlations between leptin values and BMI that were seen in our patients during the postoperative period, indicate that changes in leptin values following the operation were predominantly determined by changes in this parameter.

The possibility, however, that oestradiol itself can affect leptin production in women is not excluded. A significant positive correlation between leptin and oestradiol values was seen during the second half of the postoperative period in the cholecystectomized women and this is in accordance with data in mid- to late follicular phase of the normal menstrual cycle (Messinis *et al.*, 1998). At the same time, leptin and oestradiol values increased significantly in this group of women, even though BMI continued to decline. Furthermore, high affinity binding of 17β -oestradiol in the cytoplasmic fraction of various white adipose tissues has been demonstrated in rats (Wade and Gray, 1978).

The finding that in ovariectomized women a significant independent association was found between progesterone and

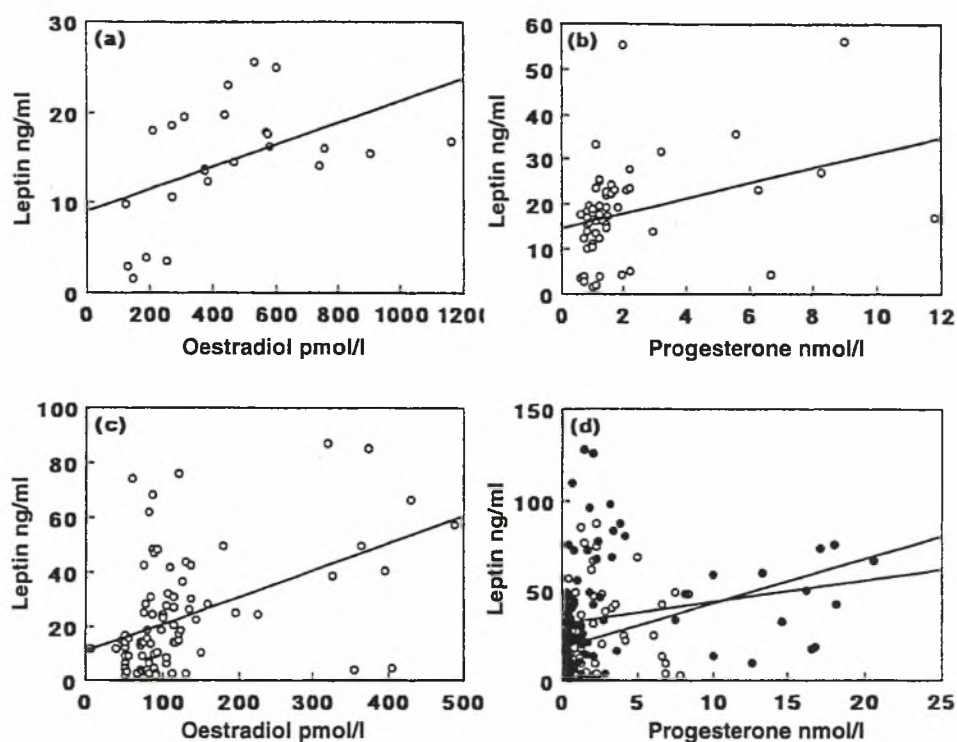


Figure 3. Correlations between leptin and oestradiol or progesterone values in normally cycling women after bilateral ovariectomy plus hysterectomy performed in mid- to late follicular phases (seven women, group 1) or in early to midluteal phases (seven women, group 2) and in six women after cholecystectomy (group 3). Operations were performed on day 0. (a) Group 3, postoperative days 4–7 ($r = 0.480$, $P < 0.05$, $n = 24$), (b) group 3, days 0–7 ($r = 0.323$, $P < 0.05$, $n = 54$), (c) group 1, days 0–8 ($r = 0.467$, $P < 0.01$, $n = 91$) and (d) (○) group 1, days 0–8 ($r = 0.239$, $P < 0.05$, $n = 91$) and (●) group 2, days 0–8 ($r = 0.217$, $P < 0.05$, $n = 91$).

leptin values suggests that this steroid may also participate in the production of leptin by adipocytes. Significant positive correlations of leptin with progesterone were also found in a previous study during the normal menstrual cycle (Hardie *et al.*, 1997). It is possible, therefore, that oestradiol during the follicular phase of the cycle primes the adipocytes to the stimulating effect of progesterone. This could explain the significantly higher values of leptin in the early to midluteal compared with the mid- to late follicular phase of the cycle seen in the present and in previous studies (Hardie *et al.*, 1997; Shimizu *et al.*, 1997; Messinis *et al.*, 1998). The rapid decline of luteal phase leptin values after ovariectomy to concentrations similar to those of the follicular phase supports this assumption. The possibility that the ovaries may contribute to the circulating leptin concentrations in women cannot be excluded despite the fact that in this study leptin values declined both in the ovariectomized and the non-ovariectomized women. Recent data have suggested that the pre-ovulatory follicle itself may be an important source of leptin (Cioffi *et al.*, 1997). Oestradiol and progesterone, therefore, may act within the follicle to increase leptin production at that site. On the other hand, leptin produced inside the ovary might act as a paracrine factor to affect steroid synthesis in the follicle and corpus luteum, since both binding of leptin and a direct effect of this substance on steroidogenesis have been demonstrated *in vitro* (Spicer and Francisco, 1997; Zachow and Magoffin, 1997). Alternatively, however, changes in leptin concentrations on

days 0–4 in the group of cholecystectomized women could simply reflect the stage of the cycle in these women, i.e. early to midfollicular phase, during which a decline in leptin values has been recently described, although the mechanism is not clear (Messinis *et al.*, 1998).

From a physiological point of view, these results support the hypothesis that leptin may be the missing link between body fat and reproduction (Conway and Jacobs, 1997). Apart from the relationship with gonadal steroids, this protein may also affect reproduction through other mechanisms, such as by controlling early development of embryos before implantation (Antczak and Van Blerkon, 1997).

In conclusion, the present study confirms previous data that leptin concentrations are higher in the luteal than the follicular phase of the cycle. The results demonstrate for the first time that leptin concentrations following a laparotomy decline rapidly from the first to the fourth postoperative day both in ovariectomized and non-ovariectomized women. Although BMI seems to be the predominant factor responsible for these changes, it is also possible that oestradiol and progesterone are involved in the mechanism which controls the production of leptin during the normal menstrual cycle.

Acknowledgements

We wish to thank Professor O.Tsolas, Director of the Department of Biological Chemistry, University of Ioannina for providing the laboratory facilities for the hormone assays.

References

- Alexandris, E., Milingos, S., Kollios, G. *et al.* (1997) Changes in gonadotrophin response to gonadotrophin releasing hormone in normal women following bilateral ovariectomy. *Clin. Endocrinol.*, **47**, 721–726.
- Antczak, M. and Van Blerkom, J. (1997) Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantations stage embryo. *Mol. Hum. Reprod.*, **3**, 1067–1086.
- Barash, I.A., Cheung, C.C., Weigle, D.S. *et al.* (1996) Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*, **137**, 3144–3147.
- Brzechffa, P.R., Jakimiuk, A.J., Agarwal, S.K. *et al.* (1996) Serum immunoreactive leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **81**, 4166–4169.
- Caro, J.F., Sinha, M.K., Kolaczynski, J.W. *et al.* (1996a) Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes*, **45**, 1455–1462.
- Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R. *et al.* (1996b) Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity. A possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*, **348**, 159–161.
- Chapman, I.M., Wittert, G.A. and Norman, R.J. (1997) Circulating leptin concentrations in polycystic ovary syndrome. Relation to anthropometric and metabolic parameters. *Clin. Endocrinol.*, **46**, 175–181.
- Chehab, F.F., Lim, M.E. and Lu, R. (1996) Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genet.*, **12**, 318–320.
- Cioffi, J.A., Shafer, A.W., Zupancic, T.J. *et al.* (1996) Novel B219/0B receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nature Med.*, **2**, 585–589.
- Cioffi, J.A., Van-Blerkom, J., Antczak, M. *et al.* (1997) The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol. Hum. Reprod.*, **3**, 467–472.
- Conway, G.S. and Jacobs, H.S. (1997) Leptin: a hormone of reproduction. *Hum. Reprod.*, **12**, 633–635.
- Diamond, F.B. Jr., Eichler, D.C., Duckett, G. *et al.* (1997) Demonstration of a leptin binding factor in human serum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **233**, 818–822.
- Dubuc, G.R., Phinney, S.D., Stern, J.S. and Havel, P.J. (1998) Changes of serum leptin and endocrine and metabolic parameters after 7 days of energy restriction in men and women. *Metabolism*, **47**, 429–434.
- Halaas, J.L., Gajawala, K.S., Maffei, M. *et al.* (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, **269**, 543–546.
- Hardie, L., Trayhum, P., Abramovich, D. and Fowler, P. (1997) Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin. Endocrinol.*, **47**, 101–106.
- Korbonits, M., Trainer, P.J., Little, J.A. *et al.* (1997) Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary–adrenal activity. *Clin. Endocrinol.*, **46**, 751–757.
- Laughlin, G.A., Morales, A.J. and Yen, S.S.C. (1997) Serum leptin levels in women with polycystic ovary syndrome: The role of insulin resistance/hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 1692–1696.
- Licinio, J., Mantzoros, C., Negrao, A.B. *et al.* (1998) Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary–adrenal function. *Nature Med.*, **3**, 575–579.
- Mantzoros, C.S., Dunaif, A. and Flier, J.S. (1997) Leptin concentrations in the polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 1687–1691.
- Messinis, I.E., Milingos, S., Kollios, K. *et al.* (1996) Changes in pituitary response to gonadotropin-releasing hormone following bilateral ovariectomy in women treated with follicle-stimulating hormone. *Gynecol. Endocrinol.*, **10**, 383–390.
- Messinis, I.E., Milingos, S., Zikopoulos, K. *et al.* (1998) Leptin concentrations in the follicular phase of spontaneous cycles and cycles superovulated with follicle stimulating hormone. *Hum. Reprod.*, **13**, 1152–1156.
- Montague, C.T., Farooki, I.S., Whitehead, J.P. *et al.* (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, **387**, 903–908.
- Murakami, T., Iida, M. and Shima, K. (1995) Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 1260–1267.
- Rouru, J., Anttila, L., Koskinen, P. *et al.* (1997) Serum leptin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**, 1697–1700.
- Schwartz, M.W., Peskind, E., Raskind, M. *et al.* (1996) Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nature Med.*, **2**, 589–593.
- Shimizu, H., Shimonura, Y., Nakanishi, Y. *et al.* (1997) Estrogen increases *in vivo* leptin production in rats and human subjects. *J. Endocrinol.*, **154**, 285–292.
- Spicer, L.J. and Francisco, C.C. (1997) The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology*, **138**, 3374–3379.
- Wade, G.N. and Gray, J.M. (1978) Cytoplasmic 17 β -[³H]estradiol binding in rat adipose tissues. *Endocrinology*, **103**, 1695–1701.
- Yoneda, N., Saito, S., Kimura, M. *et al.* (1998) The influence of ovariectomy on *ob* gene expression in rats. *Horm. Metab. Res.*, **30**, 263–265.
- Zachow, R.J. and Magoffin, D.A. (1997) Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 β production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, **138**, 847–850.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M. *et al.* (1994) Positional cloning of the mouse obese-gene and its human homologue. *Nature*, **372**, 425–432.

Received on August 28, 1998; accepted on January 7, 1999