

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ – ΠΑΙΔΙΟΥ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Διευθυντής: Καθηγητής Ιωάννης Ε. Μεσσήνης

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ ΣΤΗΝ ΕΚΚΡΙΣΗ ΤΗΣ
GHRELIN, ADIPONECTIN & RESISTIN ΣΕ ΓΥΝΑΙΚΕΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΝΕΚΤΑΡΙΟΣ Ε. ΧΑΛΒΑΤΖΑΣ
ΜΑΙΕΥΤΗΡΑΣ – ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. **Ιωάννης Ε. Μεσσήνης**, Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Επιβλέπων
2. **Αθανάσιος Καλλιτσάρης**, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μέλος
3. **Ηλίας Ζιντζαράς**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιομαθηματικών και Βιομετρίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Μέλος

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, συμπληρούμενα από τα παρακάτω μέλη ΔΕΠ:

4. **Νικόλαος Βαμβακόπουλος**, Καθηγητής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
5. **Αλέξανδρος Δαπόντε**, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
6. **Κωνσταντίνος Νταφόπουλος**, Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
7. **Αντώνιος Γκαράς**, Λέκτορας Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

**Στους αγαπημένους γονείς μου
στη λατρευτή γυναίκα μου
και στα αξιολάτρευτα παιδιά μου**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- ΓΚΡΕΛΙΝΗ

ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΓΚΡΕΛΙΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

- ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗ

ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ADIPONECTIN ΜΕ ΤΑ ΩΟΘΗΚΙΚΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

- ΡΕΣΙΣΤΙΝΗ

ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΡΕΣΙΣΤΙΝΗΣ ΜΕ ΤΑ ΩΟΘΗΚΙΚΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

- ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

- ΠΕΡΙΛΗΨΗ

- SUMMARY

- ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η γκρελίνη (ghrelin) είναι ένα πεπτιδίδιο που έχει ανακαλυφθεί σχετικά πρόσφατα και παράγεται κυρίως από το στόμαχο. Η γκρελίνη διεγερτικό παράγοντα της έκκρισης της GH και του ενεργειακού ισοζυγίου με ορεξιγόνο και λιπογενετική δραστηριότητα. Μεταξύ των ποικίλων επιδράσεων της ghrelin συμπεριλαμβάνονται η διέγερση της έκκρισης από τα λακτοτρόφα και κορτικοτρόφα κύτταρα ενώ έχουν υπάρξει ενδείξεις και για συμμετοχή της στη λειτουργία του αναπαραγωγικού άξονα.

Ο λιπώδης ιστός, ως γνωστό, εκτός από ενεργειακή αποθήκη παρουσιάζει επιπλέον και ενδοκρινική λειτουργία. Τα εκκριτικά προϊόντα του λιπώδους ιστού ονομάζονται αντιποκίνες (adipocytokines) μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται η αντιπονεκτίνη (adiponectin) και η ρεσιστίνη (resistin).

Η αντιπονεκτίνη είναι πεπτιδική ορμόνη η οποία έχει αντιαθηρογενετικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Τα επίπεδα της στην κυκλοφορία έχουν βρεθεί να μειώνονται και όχι να αυξάνουν στην παχυσαρκία, το ΣΔ τύπου II και την καρδιαγγειακή νόσο. Η αντιπονεκτίνη μειώνει την υπεργλυκαιμία μέσω αύξησης της ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Πρόσφατα δεδομένα στη βιβλιογραφία υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα πιθανόν να εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκκρισης της αντιπονεκτίνης

Η ρεσιστίνη είναι ένα πεπτιδίο που μεσολαβεί στην εκδήλωση της αντίστασης στην ινσουλίνη και αποτελεί ένα συνδετικό κρίκο μεταξύ της παχυσαρκίας και του ΣΔ. Στον άνθρωπο έχει πιθανολογηθεί ο ρόλος της στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης και στις χρόνιες φλεγμονώδεις αντιδράσεις οι οποίες σχετίζονται με την παχυσαρκία. Μέχρι σήμερα υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα για τη δυνατότητα παραγωγής και δράσης της resistin στον αναπαραγωγικό άξονα καθώς και της επίδρασης των οιστρογόνων στην έκκριση της.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της οιστραδιόλης στην έκκριση της γκρελίνης, της αντιπνονεκτίνης και της ρεσιστίνης σε φυσιολογικές προ- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

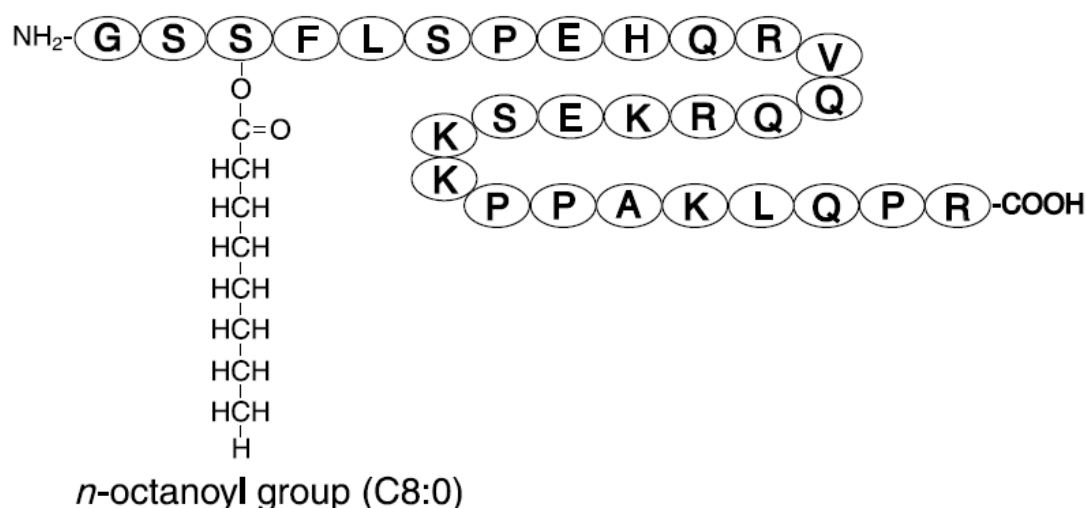
Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ιωάννη Ε. Μεσσήνη, Διευθυντή της Κλινικής, για την ανυπολόγιστη βοήθεια του στην εξεύρεση του θέματος αυτού, με σκοπό την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής και την αμέριστη συμπαράσταση και βοήθεια του στην ολοκλήρωσή της. Επίσης επιθυμώ να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και στα άλλα δύο μέλη της τριμελούς Επιτροπής Αναπληρωτές Καθηγητές κ. Αθανάσιο Καλλιτσάρη και κ. Ηλία Ζιντζαρά καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Κωνσταντίνο Νταφόπουλο για την βοήθεια του στην ολοκλήρωσή της καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή Μικροβιολογίας

κ. Σπυρίδων Πουρνάρα που συνέβαλε στην διεκπεραίωση των ορμονικών μετρήσεων.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Γκρελίνη (Ghrelin)

Η γκρελίνη (ghrelin) είναι ένα πεπτίδιο 28 αμινοξέων που έχει ανακαλυφθεί σχετικά πρόσφατα (Kojima et al., 1999). Παράγεται κυρίως από το στόμαχο καθώς τα επίπεδα της στην κυκλοφορία μειώνονται κατά 80% μετά από γαστρεκτομία (Ariyasu et al., 2001). Η γκρελίνη αποτελεί τον κύριο ενδογενή προσδέτη (ligand) του υποδοχέα GHS-R 1a (GH secretagogue-receptors). Η ανακάλυψη της αποτελεί ένα παράδειγμα ανάστροφης φαρμακολογίας, με την έννοια ότι αρχικά επιτεύχθηκε η σύνθεση των αναλόγων (Growth Hormone-Releasing Peptides-GHRPs) και των εκκριτογόνων της GH (Growth Hormone Secretagogues-GHSs) (Momany et al., 1981; Bowers, 1998) και αργότερα ανακαλύφθηκε ο ενδογενής προσδέτης (Kojima et al., 1999) μέσω της ανακάλυψης του φυσικού υποδοχέα (Smith et al., 1997).



Σχήμα 1. Η δομή της ανθρώπινης γκρελίνης. Η Ser3 τροποποιείται από ένα λιπαρό οξύ, κυρίως *n*-octanoic acid. Αυτή η τροποποίηση είναι ουσιαστική για τη βιολογική δράση της γκρελίνης (Kojima & Kangawa, 2008).

Το γονίδιο της ανθρώπινης γκρελίνης εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3 και αποτελείται από 4 εξόνια και 3 ιντρόνια (Wajnranch et al., 2000). Το προϊόν της μετάφρασης του γονιδίου προκύπτει από εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing) και παράγονται δύο διαφορετικά mRNAs, τα οποία παράγουν την πρόδρομη ουσία της γκρελίνης και την des-Gln 14- γκρελίνης. Η πρόδρομη ουσία της γκρελίνης αποτελείται από 117 αμινοξέα (Waren et al., 2000).

Και οι δύο αυτές μορφές είναι βιολογικά δραστικές, αν και η παρουσία μικρότερων ποσοτήτων της des-Gln 14- γκρελίνης στον ανθρώπινο στόμαχο υποδηλώνει ότι η γκρελίνη είναι η κύρια δραστική μορφή (Kojima et al., 2001).

Η γκρελίνη κυκλοφορεί στο αίμα τόσο σε ενεργή (acylated, ακυλιωμένη) όσο και σε ανενεργή (unacylated, μη-ακυλιωμένη) μορφή. Η ακυλίωση της σερίνης-3 (Ser3) με ένα λιπαρό οξύ, κυρίως η-οκτανοϊκό οξύ (ενεργή μορφή) είναι υποχρεωτική για τη δέσμευση της ghrelin με τους GHS-R υποδοχείς (Van der Lely et al., 2004). Ωστόσο, φαίνεται ότι η μη-ακυλιωμένη γκρελίνη δεν αποτελεί ουσιαστικά μια ανενεργή μορφή της ορμόνης, καθώς διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι αυτή η μορφή μπορεί να έχει καρδιαγγειακές, λιπογενετικές και αντι-πολλαπλασιαστικές δράσεις (Van der Lely et al., 2004; Ghigo et al., 2005).

Στον άνθρωπο, οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις της γκρελίνης στο πλάσμα είναι 10–20 fmol/ml για την ενεργό γκρελίνη και 100–150 fmol/ml για την ολική γκρελίνη (Hosoda et al. 2000). Σε μία πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της acylated γκρελίνης στον ορό φυσιολογικών γυναικών ήταν

περίπου 100 pg/ml και της unacylated γκρελίνης περίπου 250 pg/ml. Το πηλίκο συγκεντρώσεων acylated/unacylated γκρελίνη ήταν σταθερό καθ'όλη τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου και κυμαίνονταν μεταξύ 0.30 and 0.59 (Daforopoulos et al., 2009).

Η γκρελίνη έχει δύο κύριες φυσιολογικές δράσεις: διεγείρει την έκκριση της GH από την υπόφυση και αυξάνει την πρόσληψη της τροφής μέσω της διέγερσης του κέντρου της όρεξης στον υποθάλαμο. Η διέγερση της GH από τη γκρελίνη τόσο in vitro όσο και in vivo γίνεται με δόσοεξαρτώμενο τρόπο (Kojima & Kangawa, 2008). Μεταξύ των ποικίλων ενδοκρινικών δράσεων της γκρελίνης συμπεριλαμβάνονται η διέγερση της έκκρισης της PRL, της ACTH και της TSH.

Η γκρελίνη ασκεί επίσης δράσεις στο γαστρεντερικό σύστημα και στο καρδιαγγειακό σύστημα. Συγκεκριμένα στο γαστρεντερικό τροποποιεί τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του επιθηλίου, αυξάνει την κινητικότητα του παχέος εντέρου και την έκκριση των πρωτεϊνών του παγκρέατος και στο καρδιαγγειακό, προκαλεί αγγειοδιαστολή (Soares & Leite-Moreira, 2008). Στο λεμφικό ιστό, πιθανώς επηρεάζει την ανοσολογική απάντηση, ενώ μπορεί να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση διαφόρων φυσιολογικών και νεοπλασματικών κυττάρων (Soares & Leite-Moreira, 2008).

ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ GHRELIN ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

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

Στον άνθρωπο έχει διαπιστωθεί η έκφραση υποδοχέων GHS-R (GH secretagogues) στις υποθαλαμικές περιοχές παραγωγής της GnRH, στην υπόφυση με έντονη έκφραση και σε πλήθος ιστών της περιφέρειας (πιο ευρεία είναι η κατανομή των υποδοχέων τύπου 1b και όχι των 1a) (Gnanapavan et al., 2002; De Souza et al., 2004). Ωστόσο, η εφ' άπαξ i.v. χορήγηση γκρελίνης (5 έως 10 µg/kg) σε υγιείς άνδρες δεν έχει καμία επίδραση στα επίπεδα των γοναδοτροφινών στην κυκλοφορία σε διαδοχικές μετρήσεις τους μέχρι 3 ώρες (Takaya et al., 2000; Nagaya et al., 2001).

Τα επίπεδα της γκρελίνης έχουν βρεθεί να είναι αυξημένα σε γυναίκες με αμηνόρροια λόγω ψυχογενούς ανορεξίας (Tolle et al., 2003; Tanaka et al., 2003) και να μειώνονται κατά την αύξηση του σωματικού βάρους (Otto et al.,

2001). Αυξημένα επίπεδα γκρελίνης έχουν επίσης βρεθεί σε αθλήτριες με αμηνόρροια αλλά όχι σε αθλήτριες με σοβαρές διαταραχές της εμμήνου ρύσεως πιθανολογώντας ένα σημαντικό ρόλο του πεπτιδίου στην πλήρη καταστολή της αναπαραγωγικής λειτουργίας σε καταστάσεις χρόνιας ενεργειακής ανεπάρκειας (De Souza et al., 2004).

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

Στην ανθρώπινη ωοθήκη, μεταξύ πλήθους περιφερικών ιστών, έχει διαπιστωθεί η έκφραση του mRNA της γκρελίνης (Gnanapavan et al., 2002) και η ανίχνευση του πεπτιδίου κατά τον φυσιολογικό γεννητικό κύκλο έχει εντοπιστεί στα κύτταρα της πύλης και μετά το σχηματισμό του ωχρού σωματίου στα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, ενώ ο υποδοχέας της, ο οποίος ανιχνεύθηκε στα ωάρια, τα σωματικά ωοθυλακικά κύτταρα, τα ωχρινικά κύτταρα, τα κύτταρα της θήκης και τα κύτταρα της πύλης, εκφράζονταν στο ωοθυλάκιο (κοκκώδη και κύτταρα της θήκης) παράλληλα με την ωοθυλακική ανάπτυξη (Gaytan et al., 2003). Σε συνδυασμό με τον πρόσφατα προτεινόμενο ρόλο της γκρελίνης μέσω της δράσης της στον

υποδοχέα της (1a) ως τροποποιητής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξης των όγκων (Jeffery et al., 2002) θα μπορούσε να πιθανολογηθεί η συμμετοχή της στη ρύθμιση της ωοθυλακικής ανάπτυξης μέσω ενδοκρινικών, παρακρινικών ή αυτοκρινικών μηχανισμών.

Η έκφραση του mRNA της γκρελίνης στο ανθρώπινο ενδομήτριο έχει βρεθεί να αυξάνει από την ωοθυλακική φάση στην ωχρινική και ακόμη περισσότερο στο φθαρτοποιημένο ενδομήτριο και το mRNA του υποδοχέα της εκφράζεται τόσο κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου όσο και στον φθαρτό, υποδηλώνοντας έναν παρακρινικό/αυτοκρινικό ρόλο του πεπτιδίου κατά τη διαδικασία της εμφύτευσης (Tanaka et al., 2003). Σε έμβρυα ποντικών (στάδιο μοριδίου) έχει βρεθεί mRNA της γκρελίνης και του υποδοχέα της και η γκρελίνη εκκρίνεται από το αναπαραγωγικό σύστημα. Τα επίπεδα της ήταν αυξημένα με τη νηστεία και μέσω δράσης στον υποδοχέα της εμποδίζουν την ανάπτυξη των εμβρύων (Kawamura et al., 2003).

Όσον αφορά στην επίδραση των στεροειδών του φύλου στην έκκριση της γκρελίνης έχει βρεθεί ότι η ορχεκτομία ή η ωθηκεκτομία δεν έχουν καμία επίδραση στα επίπεδα του mRNA της γκρελίνης στο στόμαχο αρουαίων (Gualillo et al., 2001a). Ωστόσο, μία πιο πρόσφατη μελέτη (Matsubara et al., 2004) έδειξε σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων του στομάχου που παράγουν γκρελίνη, του mRNA της και των συγκεντρώσεων της στο πλάσμα μετά ωθηκεκτομία σε θήλεα ποντίκια και αυτές οι απαντήσεις αναστρέφονταν με τη χορήγηση 17-β οιστραδιόλης, καθώς επίσης και τα κύτταρα που

παράγουν γκρελίνη βρέθηκε να εκφράζουν ER-α, υποδηλώνοντας τη συμμετοχή των οιστρογόνων στη ρύθμιση της έκκρισης της γκρελίνης.

Αφ' ετέρου σε γυναίκες με ψυχογενή ανορεξία η 6μηνη χορήγηση αντισυλληπτικού (35 µg αιθυνυλοιστραδιόλης και 0.4 mg νορεθινδρόνης) προκαλεί την αύξηση των επιπέδων της γκρελίνης (τα οποία είναι ήδη αυξημένα σε σύγκριση με φυσιολογικές γυναίκες) και έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι η θετική επίδραση των ενδογενών στεροειδών στη γκρελίνη και επομένως και την όρεξη θα μπορούσε να υποβοηθά τη γονιμότητα, τη λήψη θρεπτικών ουσιών και την ανάπτυξη κατά την κύηση (Grinspoon et al., 2004). Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστό εάν η γκρελίνη αυξάνει μετά από χορήγηση οιστρογόνων σε φυσιολογικές γυναίκες, πριν την ωοθυλακιωρήξια στο φυσιολογικό γεννητικό κύκλο και δεν έχουν διερευνηθεί επαρκώς οι μεταβολές των επιπέδων της κατά την κύηση. Υπάρχουν δεδομένα για την έκφραση του γονιδίου της και του υποδοχέα της στον ανθρώπινο πλακούντα (Gualillo et al., 2001b; Tanaka et al., 2003). Τα επίπεδα της στην κυκλοφορία φυσιολογικών εγκύων είναι μειωμένα στο τρίτο τρίμηνο σε σύγκριση με μη έγκυες, σχετίζονται αρνητικά με την αρτηριακή πίεση και στην υπέρτασική νόσο της κύησης έχουν βρεθεί να είναι αυξημένα (Makino et al., 2002).

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

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

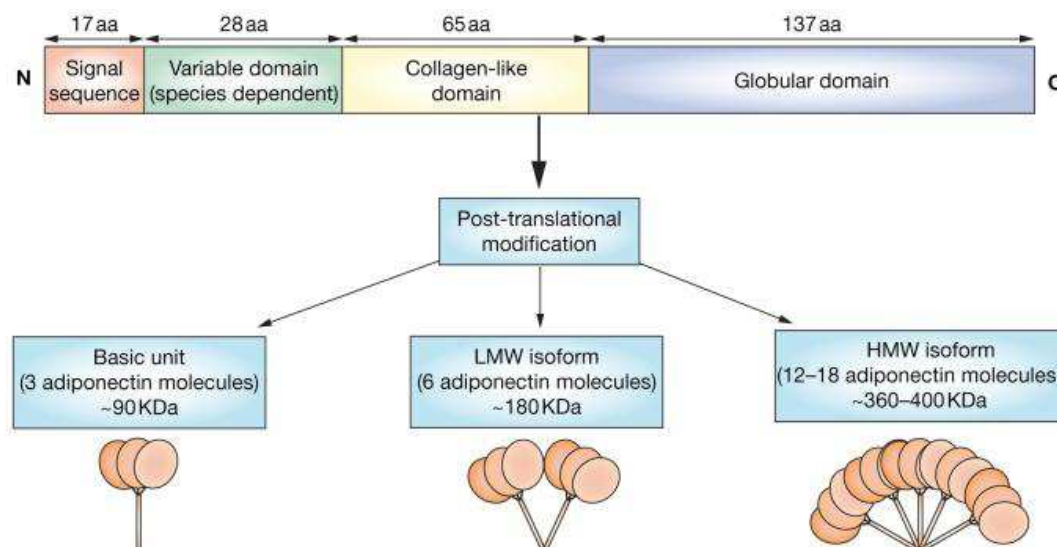
Αντιπονεκτίνη (Adiponectin)

Πολλά δεδομένα έχουν συσσωρευτεί τα τελευταία χρόνια, τα οποία υποδηλώνουν ότι ο λιπώδης ιστός εκτός από ενεργειακή αποθήκη παρουσιάζει επιπλέον και ενδοκρινική λειτουργία. Τα εκκριτικά προϊόντα του λευκού λιπώδους ιστού (WAT) ονομάζονται adipocytokines και περιλαμβάνουν τις leptin, TNF- α , IL-6, TGF- β , PAI-1, angiotensinogen, adipsin, acylation stimulating protein και metallothionein. Πρόσφατα έχουν ανακαλυφθεί άλλα δύο εκκριτικά προϊόντα του που είναι η αντιπονεκτίνη (adiponectin) και η ρεσιστίνη (resistin).

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

Η αντιπονεκτίνη χαρακτηρίστηκε ανεξάρτητα από 4 ερευνητικές ομάδες το 1995 και το 1996 και για το λόγο αυτό υπάρχουν οι διαφορετικές ονομασίες της πρωτεΐνης αυτής: apM1 (adipose most abundant gene transcript 1), Acrp30 (adipocyte complement-related protein of 30 kDa), adipoQ, and GBP28 (gelatin binding protein of 28 kDa) (Maeda et al., 1996; Scherer et al., 1995; Nakano et al., 1996; Hu et al., 1996).

Η αντιπονεκτίνη είναι ένα πολυπεπτίδιο 30 kDa περίπου που περιλαμβάνει μία αμινοτελική αλληλουχία, μία μεταβλητή περιοχή, μία τύπου-κολλαγόνου περιοχή και μία καρβοξυτελική περιοχή. Επίσης, εμφανίζει ισχυρή ομολογία αλληλουχιών με το τύπου VIII και X κολλαγόνο και το συμπλήρωμα C1q. Μετα-μεταγραφική τροποποίηση με υδροξυλίωση και γλυκοζυλίωση παράγει πολλαπλές ισομορφές (Maeda et al., 1996; Scherer et al., 1995; Nakano et al., 1996; Hu et al., 1996). Πρόσφατα δύο υποδοχείς της αντιπονεκτίνης έχουν βρεθεί (AdipoR 1 και 2) με κύρια έκφραση στους σκελετικούς μύες (AdipoR1), το ήπαρ (AdipoR2) (Yamauchi et al., 2003) και τα παγκρεατικά β κύτταρα (Kharroubi et al., 2003). Ωστόσο δεν υπάρχουν δεδομένα για την κατανομή τους σε ιστούς του αναπαραγωγικού άξονα. Έτσι, οι βιολογικές επιδράσεις της αντιπονεκτίνης εξαρτώνται όχι μόνο από τις συγκεντρώσεις των διαφόρων ισομορφών της αλλά και από την έκφραση στους διάφορους ιστούς των διαφορετικών τύπων υποδοχέων.



Σχήμα 1. Δομή της αντιπονεκτίνης. Η αντιπονεκτίνη χρειάζεται μετα-μεταγραφική τροποποίηση για τη δραστικότητα της (υδροξυλίωση και γλυκοζυλίωση). Τα μόρια της αντιπονεκτίνης εκκρίνονται από τα λιποκύτταρα ως τριμερή (~90 kDa, η βασική μονάδα), χαμηλού μοριακού βάρους εξαμερή (~180 kDa) και υψηλού μοριακού βάρους ισομορφές (12-18-μερη, >400 kDa). Συντμήσεις: aa-αμινοξέα, C-καρβοξυτελικό άκρο, HMW-υψηλό μοριακό βάρος, LMW-χαμηλό μοριακό βάρος, N-αμινοτελικό άκρο (Goldstein et al., 2009).

Η αντιπονεκτίνη κυκλοφορεί σε υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα του ανθρώπου (σε επίπεδα $\mu\text{g/ml}$) και αντιπροσωπεύει περίπου το 0.01% της συνολικής πρωτεΐνης του πλάσματος (Arita et al., 1999).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η αντιπονεκτίνη έχει αντιαθηρογενετικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και σε αντίθεση με τις άλλες adipocytokines τα επίπεδα της στην κυκλοφορία έχουν βρεθεί να μειώνονται και όχι να αυξάνουν στην παχυσαρκία, το ΣΔ τύπου II και την καρδιαγγειακή νόσο. Η αντιπονεκτίνη μειώνει την υπεργλυκαιμία όχι με διέγερση της έκκρισης

ινσουλίνης αλλά με αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη (μέσω αύξησης της οξειδωσης των λιπιδίων, άμεσης βελτίωσης της αγωγής του σήματος της ινσουλίνης τόσο στον υποδοχέα της όσο και μετά τον υποδοχέα, καταστολή της γλυκονεογένεσης και καταστολή του σήματος του TNF-α στο λιπώδη ιστό (Beltowski et al., 2003). Στο αγγειακό τοίχωμα, η αντιπονεκτίνη αναστέλλει την προσκόλληση των μονοκυττάρων μειώνοντας την έκφραση των μορίων προσκόλλησης, αναστέλλει τη μετατροπή των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα και μειώνει τον πολλαπλασιασμό των μεταναστευόντων λείων μυϊκών ινών σε απάντηση στη δράση αυξητικών παραγόντων. Επιπρόσθετα, η αντιπονεκτίνη αυξάνει την παραγωγή NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα και διεγείρει την αγγειογένεση (Kershaw and Flier, 2004).

ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗΣ ΜΕ ΤΑ ΩΟΘΗΚΙΚΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

Η οιστραδιόλη του ορού συσχετίζεται αρνητικά με τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης σε υγιείς γυναίκες ανεξάρτητα από το BMI, την ηλικία και την κατάσταση προ- ή μετ-εμμηνόπαυσης και μετά την εμμηνόπαυση τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης αυξάνουν (Gavrila et al., 2003). Στην ίδια μελέτη δεν βρέθηκε συσχέτιση των επιπέδων της αντιπονεκτίνης με την ημέρα του γεννητικού κύκλου αν και η ισχύς της μελέτης ήταν μειωμένη για αυτό τον έλεγχο. Σε μία πρόσφατη μελέτη βρέθηκε ότι τα επίπεδα στο αίμα της αντιπονεκτίνης δεν μεταβάλλονται σημαντικά, αλλά παραμένουν αμετάβλητα κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου (Daforoulou et al., 2009). Στα διάφορα στάδια της εφηβείας η αντιπονεκτίνη δεν έδειξε σημαντική

συσχέτιση με την οιστραδιόλη παρά μόνο σε παχύσαρκα κορίτσια, ενώ σε αγόρια υπήρχε σημαντική αρνητική συσχέτιση της με την τεστοστερόνη (Böttner et al., 2004). Ένα πολύ σημαντικό εύρημα της μελέτης αυτής ήταν ότι η αντιπυονεκτίνη ενώ μειώνεται με την πρόοδο της εφηβείας (από το στάδιο Tanner 1 στο 5) στα αγόρια, αυτό δεν παρατηρήθηκε και στα κορίτσια υποδηλώνοντας το σημαντικό ρόλο των ανδρογόνων στη μείωση των επιπέδων της αντιπυονεκτίνης στον ορό.

Το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) έχει χαρακτηριστεί ως μία φλεγμονώδης κατάσταση λόγω των υψηλών επιπέδων CRP και IL-6 (Morin-Papunen et al., 2003; Kelly et al., 2001; Fenkci et al., 2003) και η χορήγηση EE+drospirenone για 3 μήνες προκαλεί σημαντική μείωση στα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης εφήβων γυναικών και τάση για μείωση τους σε νέες γυναίκες με PCOS (Ibanez and De Zegher, 2004). Ωστόσο δεν έχουν βρεθεί διαφορές στα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης στην κυκλοφορία μεταξύ PCOS με αντίσταση στην ινσουλίνη και φυσιολογικών γυναικών παρόμοιου BMI (Orio et al., 2003; Panidis et al., 2003) υποδηλώνοντας ότι η αντιπυονεκτίνη πιθανότατα δεν εμπλέκεται στην παθογένεση του συνδρόμου. Στη μελέτη των Panidis και συν. (2003) στις γυναίκες με PCOS δεν υπήρχε σημαντική συσχέτιση της αντιπυονεκτίνης με τις γοναδοτροφίνες αλλά συσχετιζόνταν αρνητικά με τη Δ4-ανδροστενδιόνη.

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα σχετικά με τις μεταβολές των επιπέδων της αντιπυονεκτίνης κατά τη φυσιολογική κύηση και σε μία μελέτη

(Combs et al., 2003) σε ποντίκια βρέθηκε μείωση των επιπέδων της από το μέσο της κύησης μέχρι τον απογαλακτισμό. Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα οι συγκεντρώσεις της προλακτίνης και των πλακουντιακών prolactin-like ορμονών αυξάνουν στην κυκλοφορία υποδηλώνοντας την κατασταλτική τους επίδραση στην έκκριση της αντιπνεεκτίνης. Αφ' ετέρου έχει βρεθεί ότι από μόνη της η υπερπρολακτιναιμία μπορεί να σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη η οποία μπορεί να αντιμετωπίζεται επιτυχώς με αγωνιστές ντοπαμίνης (Landgraf et al., 1977; Ben-Jonathan & Hnasko, 2001). Η αντιπνεεκτίνη στην κυκλοφορία εγκύων με ΣΔ κύησης έχει βρεθεί να είναι μειωμένη σε σύγκριση με φυσιολογικές έγκυες (Ranheim et al., 2004) και αυτή η μείωση προηγείται και μπορεί να προβλέψει την εμφάνιση ΣΔ κύησης (Williams et al., 2004). Γυναίκες με ιστορικό ΣΔ κύησης εξακολουθούν να έχουν μειωμένα επίπεδα αντιπνεεκτίνης στην κυκλοφορία (Winzer et al., 2004). Τα επίπεδα της έχουν βρεθεί να μη μεταβάλλονται κατά τη φυσιολογική κύηση (τρίτο τρίμηνο) σε σύγκριση με τις τιμές τους μετά τον τοκετό αλλά έχουν βρεθεί παραδόξως αυξημένα σε προεκλαμπτικές κυήσεις σε σχέση με φυσιολογικές (Ramsay et al., 2003).

Ρεσιιστίνη (Resistin)

Η ρεσιιστίνη, ένα πεπτιδίο 114 αμινοξέων, είναι μέλος μιας πρόσφατα αποκαλυφθείσας οικογένειας πρωτεϊνών που ονομάζονται RELM (resistin-like molecules) ή FIZZ (found in inflammatory zone) (Πίνακας 1). Η FIZZ3 (resistin) εκφράζεται κυρίως στο WAT και λιγότερο στον BAT.

	Also known as	Human	Rat	Mouse	Site	% protein homology to resistin
Resistin	FIZZ-3	X	X	X	Adipocyte	–
RELM- α	FIZZ-1	–	X	X	White adipose tissue, tongue and lung	29
RELM- β	FIZZ-2	X	–	X	Intestine	37

Πίνακας 1. Έκφραση των τριών RELMs (resistin-like molecules) ανάλογα με το είδος και τον τύπο ιστού.

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

Οι δράσεις της ρεσιιστίνης έχουν μελετηθεί in vivo και σε κυτταρικές σειρές λιποκυττάρων και μυικών κυττάρων. Πειράματα έδειξαν ότι η αδρανοποίηση της ρεσιιστίνης σε ένα μοντέλο παχυσαρκίας στον ποντικό, μείωσε τα επίπεδα της γλυκόζης και βελτίωσε την αντίσταση στην ινσουλίνη (Steppan et al., 2001). Επιπρόσθετα, η ενδοπεριτοναϊκή έγχυση ρεσιιστίνης σε φυσιολογικά

ποντίκια προκάλεσε παθολογική ανοχή στη γλυκόζη και υπερινσουλιναιμία. Σε 3T3-L1 λιποκύτταρα, ο αντιορός στη ρεσιστίνη προκάλεσε ενίσχυση της από την ινσουλίνη διεγερμένη πρόσληψη της γλυκόζης, ενώ η ρεσιστίνη από μόνη της είχε ανταγωνιστικές στην ινσουλίνη επιδράσεις. Η έκφραση της ενδοκυττάριας ρεσιστίνης σε L6 μυϊκά κύτταρα ανέστειλε την από την ινσουλίνη προκαλούμενη πρόσληψη της 2-δεοξυγλυκόζης (Moon et al., 2003). Ο μηχανισμός δράσης της ρεσιστίνης δεν αφορά στη φωσφορυλίωση του υποδοχέα της ινσουλίνης, τη φωσφορυλίωση του IRS-1, την PI3 κινάση, τη φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης B, τη φωσφορυλίωση της p38-MAP κινάσης ή τις GLUT 1 και 4. Πιθανόν άλλες οδοί αγωγής του σήματος της ινσουλίνης είναι αυτές που επηρεάζονται από τη ρεσιστίνη.

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

Το mRNA της ρεσιστίνης εκφράζεται στον υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα ποντικών με εξελικτική έκφραση πριν την εφηβεία, δηλαδή με ελάχιστη έκφραση μετά τη γέννηση, απότομη αύξηση μεταξύ ηλικίας 14-25 ημερών και μείωση στη συνέχεια (Morash et al., 2002) και έχει βρεθεί ευρεία κατανομή έκφρασης του στους ιστούς αρουραίων (Nogueiras et al., 2003a). Στον άνθρωπο η ρεσιστίνη έχει βρεθεί να εκφράζεται στο WAT παχυσάρκων αλλά όχι λεπτών ατόμων (Savage et al., 2001) και σε καλλιιεργημένα προ-

λιποκύτταρα αλλά ελάχιστα σε ώριμα λιποκύτταρα (Janke et al., 2002), στα μονοκύτταρα (Savage et al., 2001) και στον πλακούντα (Yura et al., 2003).

ΣΧΕΣΗ ΤΗΣ RESISTIN ΜΕ ΤΑ ΩΟΘΗΚΙΚΑ ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ

Όπως η leptin (Messinis et al., 2000, 2001) η ρεσιστίνη ρυθμίζεται από τις γοναδικές ορμόνες. Έχει αναφερθεί ότι τα επίπεδα της ρεσιστίνης είναι υψηλότερα (χωρίς επιβεβαίωση της στατιστικής σημαντικότητας) στο λιπώδη ιστό των θήλεων σε σύγκριση με τα άρρενα ποντίκια (Steppan et al., 2001) αλλά το αντίθετο έχει βρεθεί σε αρουραίους (Nogueiras et al., 2003b).

Μέχρι σήμερα υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα για τη δυνατότητα παραγωγής και δράσης της ρεσιστίνης στον αναπαραγωγικό άξονα. Στα κύτταρα Leydig και Sertoli όρχεων αρουραίων έχει βρεθεί να εκφράζεται η ρεσιστίνη και με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο να αυξάνει τη βασική και την από τη χοριακή γοναδοτροφίνη παραγωγή της τεστοστερόνης in vitro (Nogueiras et al., 2004). Έχει βρεθεί αύξηση της έκφρασης της ρεσιστίνης από τον ανθρώπινο πλακούντα κατά το δεύτερο ήμισυ της κύησης και με την συνδυασμένη παράλληλη μείωση της έκφρασης του γονιδίου της leptin αυξάνει η αντίσταση στην ινσουλίνη και η μεταγευματική υπεργλυκαιμία με θετική επίδραση στην ταχεία αύξηση του εμβρύου (Yura et al., 2003). Στα ποντίκια τα επίπεδα του mRNA της ρεσιστίνης αυξήθηκαν στο περιγοναδικό λίπος, κατά τη διάρκεια του διοίστρου, αλλά στο πλάσμα δεν διαπιστώθηκαν διαφορές καθ'όλη τη

διάρκεια του κύκλου (Gui et al., 2004). Στη μελέτη αυτή, η χορήγηση οιστρογόνων ελάττωσε την έκφραση της ρεσιστίνης σε ωθηκεκτομηθέντες ποντικούς, υποδηλώνοντας ότι οι μεταβολές στα επίπεδα E2 σε όλη τη διάρκεια του κύκλου ενδέχεται να είναι υπεύθυνες, τουλάχιστον εν μέρει, για τη διακύμανση των επιπέδων του mRNA της ρεσιστίνης στο περιγοναδικό λιπώδη ιστό. Επιπλέον, σε ωθηκεκτομηθέντα ποντίκια, τα οιστρογόνα μείωσαν τα επίπεδα του mRNA της ρεσιστίνης στο πλάσμα και το λιπώδη ιστό (D'Eon et al., 2005). Ωστόσο, οι Nogueiras και συν. (2003), με χρήση της μεθόδου Northern blot μόνο, διαπίστωσαν ότι μετά από την ωθηκεκτομία δεν τροποποιήθηκε η έκφραση του mRNA της ρεσιστίνης σε ποντίκια. Σε μια άλλη μελέτη, σε ωθηκεκτομηθέντες αρουραίους, βρέθηκε ότι τα οιστρογόνα ρυθμίζουν προς τα κάτω την έκφραση του mRNA της ρεσιστίνης στον λιπώδη ιστό, τόσο *in vitro* και *in vivo*, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα οιστρογόνα μπορεί να αποτελούν ένα από τους ρυθμιστικούς παράγοντες της γονιδιακής έκφρασης της ρεσιστίνης (Huang et al., 2005). Αντιθέτως, σε *in vitro* πειράματα με 3T3-L1 adipocytes, η 17β-E2 ρύθμιζε προς τα άνω μέσω των α-υποδοχέων των οιστρογόνων την έκφραση του mRNA της ρεσιστίνης κατά δόσο-και χρόνο-εξαρτώμενο τρόπο (Chen et al., 2006).

Σε μία πρόσφατη μελέτη σε γυναίκες, βρέθηκε ότι οι συγκεντρώσεις της ρεσιστίνης στην κυκλοφορία δεν μεταβάλλονται σημαντικά, αλλά παραμένουν αμετάβλητες κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου (Daforoulis et al., 2009). Σε παχύσαρκες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με το μεταβολικό σύνδρομο, σε σύγκριση με προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες διαπιστώθηκαν υψηλότερα επίπεδα ρεσιστίνης (Chu et al., 2006) αλλά αυτό

δεν επιβεβαιώθηκε από άλλους ερευνητές (Hong et al., 2007) που διαπίστωσαν ότι, ανεξάρτητα από το BMI, τα επίπεδα της ρεισιστίνης ήταν παρόμοια μεταξύ προεμμηνοπαυσιακών και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών.

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

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της οιστραδιόλης στην έκκριση της γκρελίνης, της αντιπονεκτίνης και της ρεσιστίνης σε φυσιολογικές προ- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Για το λόγο αυτό μελετήθηκαν οι μεταβολές στα επίπεδα της ακυλιωμένης γκρελίνης, της αντιπονεκτίνης και της ρεσιστίνης μετά αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία σε φυσιολογικές προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και μετά τη χορήγηση εξωγενών οιστρογόνων σε προ- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γυναίκες

Ένα σύνολο 21 υγιών εθελοντριών γυναικών συμπεριλήφθηκε στη μελέτη. Οι γυναίκες αυτές χωρίστηκαν σε 3 ομάδες. Επτά γυναίκες με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο, ηλικίας 42-48 ετών (ομάδα 1) πήραν διαδερμικά αυτοκόλλητα οιστρογόνων (Estraderm TTS; Ciba-Geigy, Athens, Greece) στη δόση των 100 μg την ημέρα 3 του κύκλου και των 150 μg τις ημέρες 4 και 5 του κύκλου, έτσι ώστε να αυξηθούν σε βραχύ χρονικό διάστημα οι τιμές της E2 στον ορό ώστε να φθάσουν σε προωοθυλακιορρηκτικά επίπεδα, όπως έχει δημοσιευθεί και σε προηγούμενες μελέτες. Δείγματα αίματος λαμβάνονταν από όλες τις γυναίκες κάθε πρωί (9:00 π.μ.), μετά από ολονύκτια νηστεία, από την 3η ως την 9η ημέρα του κύκλου.

Άλλες 6 από τις 21 γυναίκες οι οποίες είχαν φυσιολογικούς γεννητικούς κύκλους (ομάδα 2) υποβλήθηκαν σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων λόγω καλοήθων παθήσεων της μήτρας. Η επέμβαση πραγματοποιήθηκε την ημέρα 3 του κύκλου (9:00 π.μ.) και καμία από αυτές τις γυναίκες δεν έλαβε κάποια ορμονική θεραπεία. Δείγματα αίματος λαμβάνονταν κάθε πρωί, μετά από ολονύκτια νηστεία, από την ημέρα της επέμβασης μέχρι και την 7η μετεγχειρητική ημέρα. Πριν την επέμβαση, όλες οι γυναίκες ήταν σε καλή κατάσταση, με επίπεδα αιμοσφαιρίνης $> 12 \text{ g/dl}$. Δεν

υπήρξαν διεγχειρητικές επιπλοκές, ενώ η απώλεια αίματος ήταν περίπου στα 300 ml χωρίς καμία ανάγκη μετάγγισης. Η μετεγχειρητική περίοδος ήταν ομαλή και οι γυναίκες ήταν σε καλή κατάσταση όταν έλαβαν εξιτήριο. Η ύπαρξη φυσιολογικών ωοθυλακιορρηκτικών γεννητικών κύκλων επιβεβαιώθηκε στις γυναίκες των ομάδων 1 και 2 με μέτρηση της προγεστερόνης του ορού κατά τη μέση ωχρινική φάση και διαπίστωση της ωοθυλακικής ανάπτυξης και της ωοθυλακιορρηξίας με υπερηχογραφήματα σε προηγούμενο γεννητικό κύκλο πριν τη διεξαγωγή της μελέτης. Η ιστολογική εξέταση των παρασκευασμάτων είχε επιβεβαιώσει ότι οι ωοθήκες ήταν φυσιολογικές.

Οι υπόλοιπες 8 από τις 21 γυναίκες, ηλικίας 55-68 ετών, ήταν υγιείς μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (ομάδα 3). Πριν τη διεξαγωγή της μελέτης, οι γυναίκες της ομάδας 3 εκτιμήθηκαν με γυναικολογική εξέταση, τεστ Παπανικολάου, μέτρηση των καρκινικών δεικτών του ορού, διακολπικό υπερηχογράφημα και μαστογραφία. Τα κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν: ιστορικό προηγούμενων σοβαρών γυναικολογικών ή άλλων ασθενειών, θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης αντικαταστάσεως, υστερεκτομία με ετερόπλευρη ή αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία, ενδοκρινοπάθειες και φαρμακευτική αγωγή η οποία μπορεί δυνητικά να αλληλεπιδράσει με τη λειτουργία των ενδοκρινών αδένων. Όλες οι γυναίκες της ομάδας 3 έλαβαν σχήμα χορήγησης οιστρογόνων και προγεστερόνης όπως είχε περιγραφεί και σε προγενέστερη μελέτη. Συγκεκριμένα, μετά από πριμοδότηση μίας εβδομάδας με βαλεριανική E2 (E2V) από του στόματος σε δόση 1 mg ημερησίως (Divina tablets, 2mg estradiol valerate; Organon, Greece),

χορηγήθηκαν διάφορες δόσεις E2V για 43 ημέρες και προγεστερόνη (Utrogestan capsules, 100 mg progesterone; Faran, Greece) για 13 ημέρες (Σχήμα 1), έτσι ώστε οι συγκεντρώσεις στον ορό αυτών των ορμονών να προσομοιάζουν με αυτές μίας ωοθυλακικής φάσης (FP-1, ημέρες 1-15) και μίας ωχρινικής φάσης (LP, ημέρες 16-28) ακολουθούμενες από μία δεύτερη ωοθυλακική φάση (FP-2, ημέρες 29-43). Κατά τη διάρκεια της FP-1, η E2V χορηγήθηκε από του στόματος ημερησίως ως εξής: 2 mg τις ημέρες 1-3, 3 mg τις ημέρες 4-6, 4 mg τις ημέρες 7-9, 6 mg τις ημέρες 10-12, 8 mg τις ημέρες 13 και 14, και 2 mg την ημέρα 15. κατά τη διάρκεια της LP, η ημερήσια δόση της E2V ήταν 2 mg τις ημέρες 16-19 και 26-28, και 3 mg τις ημέρες 20-25. Η προγεστερόνη χορηγήθηκε ενδοκολπικά στις ακόλουθες δόσεις: 100 mg τις ημέρες 16 και 28, 200 mg τις ημέρες 17 και 27 και 300 mg τις ημέρες 18-26. Κατά τη διάρκεια της FP-2, το δοσολογικό σχήμα χορήγησης της E2 που χρησιμοποιήθηκε κατά την FP-1 χρησιμοποιήθηκε ξανά κατά τις ημέρες 29-43 (Σχήμα 1). Δείγματα αίματος λαμβάνονταν κάθε πρωί μετά από ολονύκτια νηστεία. Για την εξυπηρέτηση των σκοπών της παρούσας μελέτης μόνο τα δείγματα τα οποία ελήφθησαν κατά τη διάρκεια των 15 ημερών της δεύτερης προσομοιωμένης ωοθυλακικής φάσης χρησιμοποιήθηκαν. Σε αυτήν την ομάδα, η από του στόματος χορήγηση οιστρογόνων επιλέχθηκε έτσι ώστε να αποφευχθεί η ταχεία αύξηση των επιπέδων της E2 του ορού, όπως συνέβη στην ομάδα 1, και να επιτευχθεί μία προοδευτική αύξηση των επιπέδων της E2 όπως στη φυσιολογική ωοθυλακική φάση του κύκλου.

Όλες οι γυναίκες συμμετείχαν εθελοντικά στη μελέτη και έδωσαν γραπτή συγκατάθεση. Η μελέτη εγκρίθηκε από το τοπικό επιστημονικό συμβούλιο.

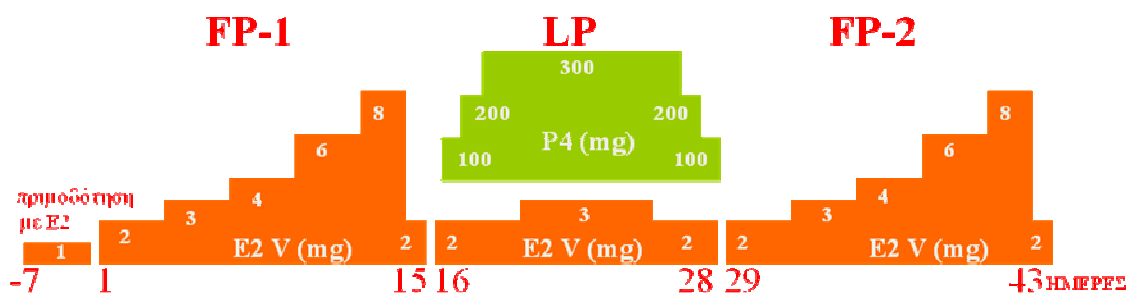
Όλες οι γυναίκες είχαν επίσης παρόμοιο BMI. Τα χαρακτηριστικά όλων των γυναικών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

Και στις 3 ομάδες, Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρούνταν άμεσα και ο ορός τους καταψύχονταν στους -20 °C μέχρι τη μέτρηση των ορμονών στο εργαστήριο.

Τα επίπεδα της γκρελίνης, της αντιπονεκτίνης, της ρεσιστίνης και της E2 στον ορό μετρήθηκαν σε όλα τα δείγματα αίματος. Τα επίπεδα των FSH και LH είχαν μετρηθεί πριν τη χορήγηση των εξωγενών οιστρογόνων ή την διεξαγωγή της εγχείρησης.

	Ομάδα 1	Ομάδα 2	Ομάδα 3
Ηλικία (έτη)	44.7±0.6	44.8±1.0	60.8 ± 2.0
BMI (Kg/m²)	27.7±1.7	28.1±1.8	26.4 ± 0.8
FSH (IU/l)	11.9±2.8	9.1±2.2	91.5 ± 13.4
LH (IU/l)	6.7±1.1	5.8±1.4	41.6 ± 6.4
Οιστραδιόλη (pg/ml)	86.5±26.2	65.2±12.1	59.3 ± 6.0

Πίνακας 1. Τα χαρακτηριστικά των γυναικών των τριών ομάδων πριν την έναρξη των πειραματικών διαδικασιών. Τα δεδομένα εκφράζονται ως means±SEM.



Σχήμα 1. Η εξομοιωτική αγωγή με βαλεριανική οιστραδιόλη (E2V) και προγεστερόνη (P4) στην ομάδα 3. Η εξομοιωμένη δεύτερη ωοθυλακική φάση (FP-2) μελετήθηκε με καθημερινές αιμοληψίες.

Ορμονικές μετρήσεις

Η μέτρηση της ακυλιωμένης γκρελίνης του πλάσματος έγινε με μία ανοσοενζυμική μέθοδο (double-antibody sandwich enzyme immunoassay) (Human Acylated Ghrelin ELISA, BioVendor Laboratory Medicine, Inc., Modrice, Czech Republic). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως pg/ml. Η μέτρηση της αντιπονεκτίνης στον ορό χρησιμοποιώντας μια ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA (Human Adiponectin ELISA; BioVendor Laboratory Medicine, Modrice, Czech Republic). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως mg/mL. Η μέτρηση της ρεσιστίνης στον ορό έγινε με μία ανοσοενζυμική μέθοδο (biotin-labeled antibody-based sandwich ELISA) (Human Resistin ELISA, BioVendor Laboratory Medicine). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ng/mL. Η μέτρηση E2 στον ορό έγινε μέσω με μία μικροσωματιδιακή ανοσολογική μέθοδο χημειοφωταύγειας (Chemiluminescent Microparticle Immunoassay) (Architect Estradiol; Abbott Laboratories, Illinois, USA). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως pg/ml. Η προγεστερόνη μετρήθηκε στον ορό με μία μικροσωματιδιακή ανοσολογική μέθοδο (microparticle enzyme immunoassay) (AxSYM Progesterone, Abbott Laboratories). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ng/mL. Οι FSH και LH μετρήθηκαν με μικροσωματιδιακή ανοσολογική μέθοδο χημειοφωταύγειας (Architect FSH, Architect LH και Architect Estradiol αντίστοιχα, Abbott Laboratories). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως IU/I για τις FSH και LH. Τα κατώτερα όρια ανίχνευσης της γκρελίνης, της αντιπονεκτίνης, της ρεσιστίνης, της E2, της προγεστερόνης, της FSH και της LH ήταν 4.0 pg/ml, 210 ng/mL, 0.1 ng/mL, 17.9 pg/ml, 0.2 ng/ml, 0.05 IU/I και 0.07 IU/I αντίστοιχα. Οι συντελεστές μεταβλητότητας μεταξύ και εντός των

μεθόδων (inter- and intra-assay coefficients of variation) ήταν 3.4 και 2.9%, 6.4 και 7.3%, 2.8 και 5.1%, 4.5 και 6%, 6.0% και 6.7%, 3.1 και 3.4%, και 2.0 και 3.4% αντίστοιχα.

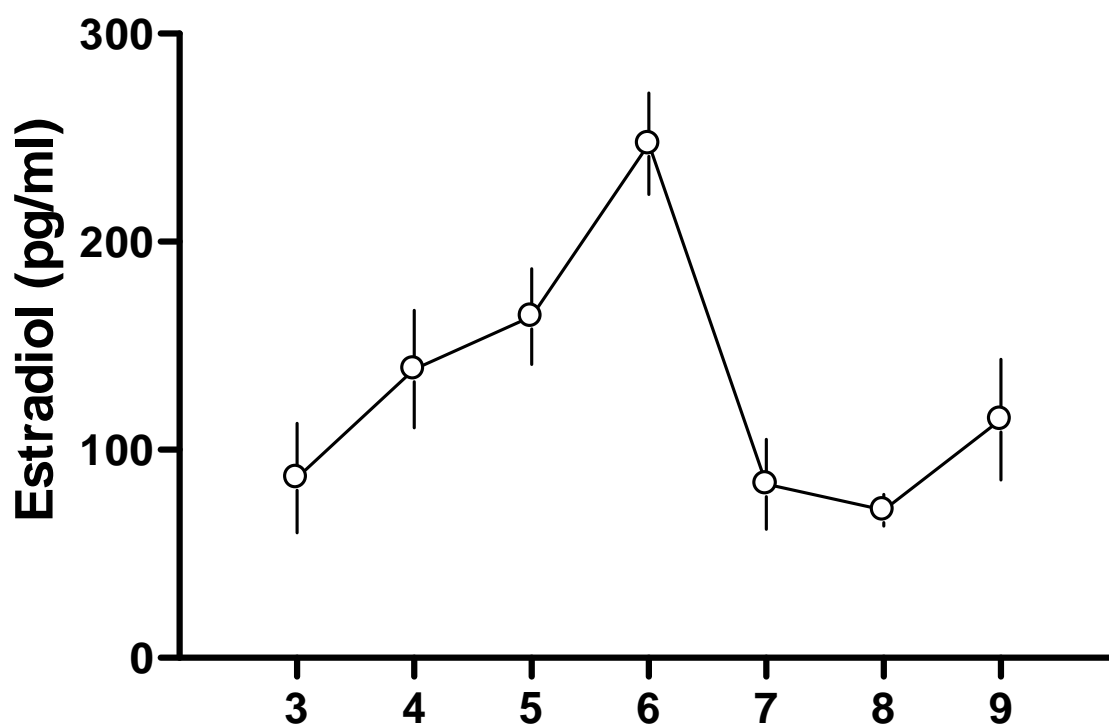
Ανάλυση των δεδομένων

Οι τιμές των ορμονών είχαν κανονικές κατανομές (one sample Kolmogorov-Smirnov test), και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικές δοκιμασίες. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με την για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ανάλυση της διακύμανσης (repeated

measures one-way analysis of variance-ANOVA) και στη συνέχεια από την post hoc ανάλυση με test Bonferroni και το Student's t-test. Ωστόσο, λόγω του μικρού αριθμού των περιπτώσεων σε κάθε ομάδα, αναλύσαμε επίσης τα δεδομένα χρησιμοποιώντας μη παραμετρικές δοκιμασίες. Η στατιστική σημαντικότητα ήταν συγκρίσιμη είτε πραγματοποιούσαμε παραμετρικές είτε μη παραμετρικές δοκιμασίες. Για το λόγο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των παραμετρικών δοκιμασιών μόνο. Όλες οι τιμές εκφράστηκαν ως mean \pm SEM. Το στατιστικό πακέτο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το NCSS 2001 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA).

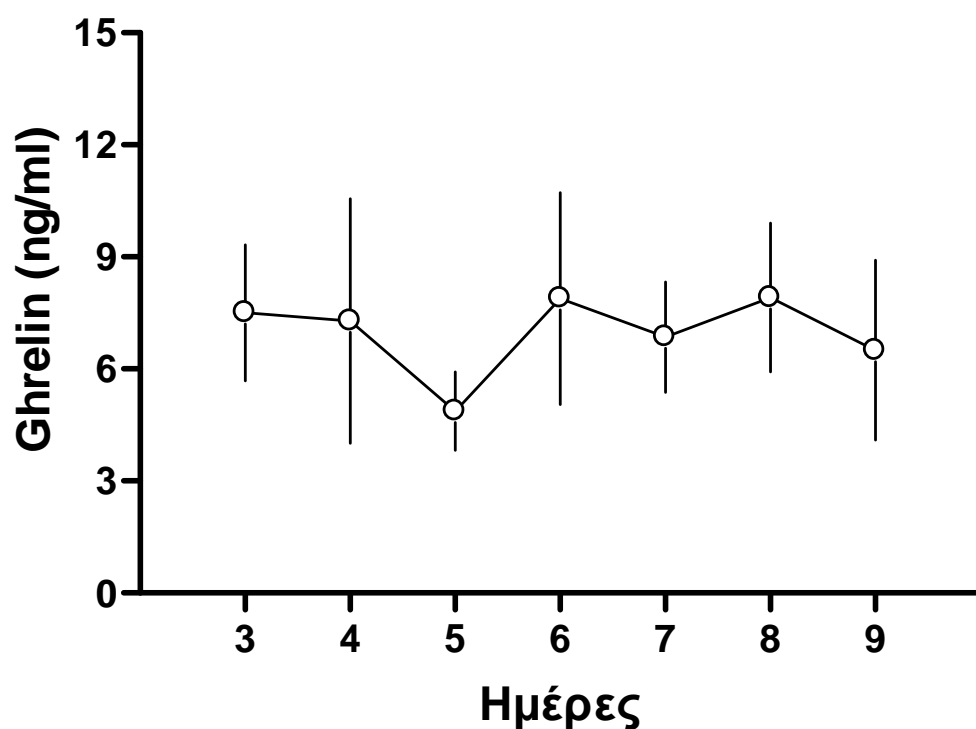
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην ομάδα 1, ως αποτέλεσμα της χορήγησης εξωγενούς χορήγησης της E2, οι τιμές της E2 στον ορό αυξήθηκαν σημαντικά μέχρι την ημέρα 6 ($p<0.001$) και στη συνέχεια μειώθηκαν ($p<0.001$) (Σχήμα 2). Συγκεκριμένα, οι τιμές της E2 αυξήθηκαν από 86.5 ± 26.2 πριν τη χορήγηση της στα 247.2 ± 24.4 pg/ml την ημέρα 6 ($p<0.001$).



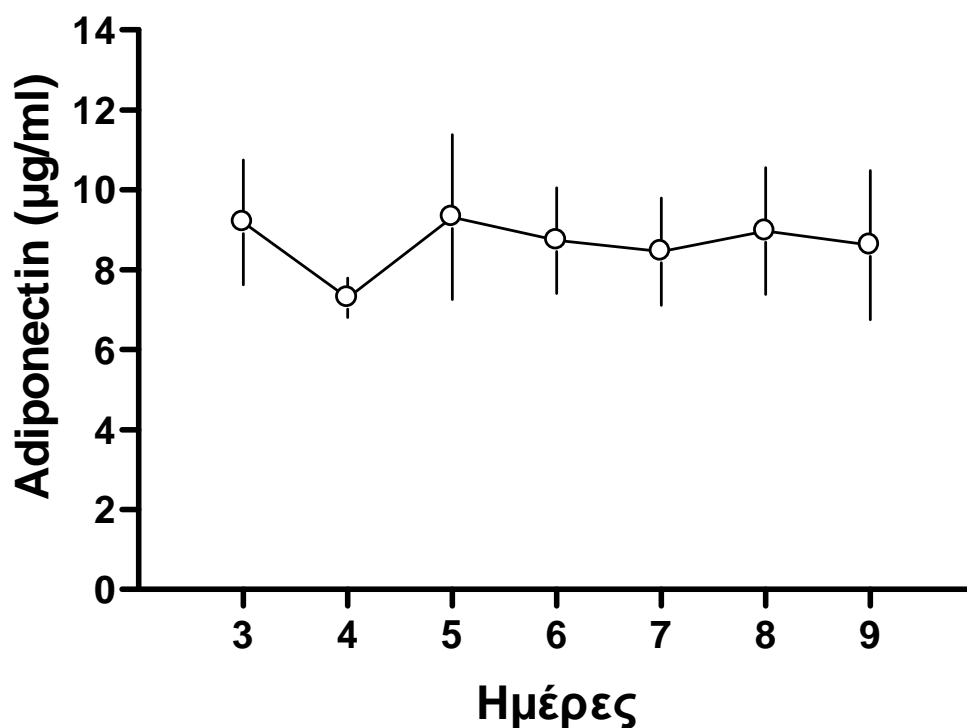
Σχήμα 2. Τα επίπεδα της οιστραδιόλης στον ορό σε 7 γυναίκες με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο (ομάδα 1) οι οποίες έλαβαν πήραν διαδερμικά οιστρογόνα στη δόση των 100 μg την ημέρα 3 του κύκλου και των 150 μg τις ημέρες 4 και 5 του κύκλου.

Τα επίπεδα της γκρελίνης του πλάσματος δεν έδειξαν καμία σημαντική αλλαγή από την αρχή έως και το τέλος του πειράματος (Σχήμα 3).

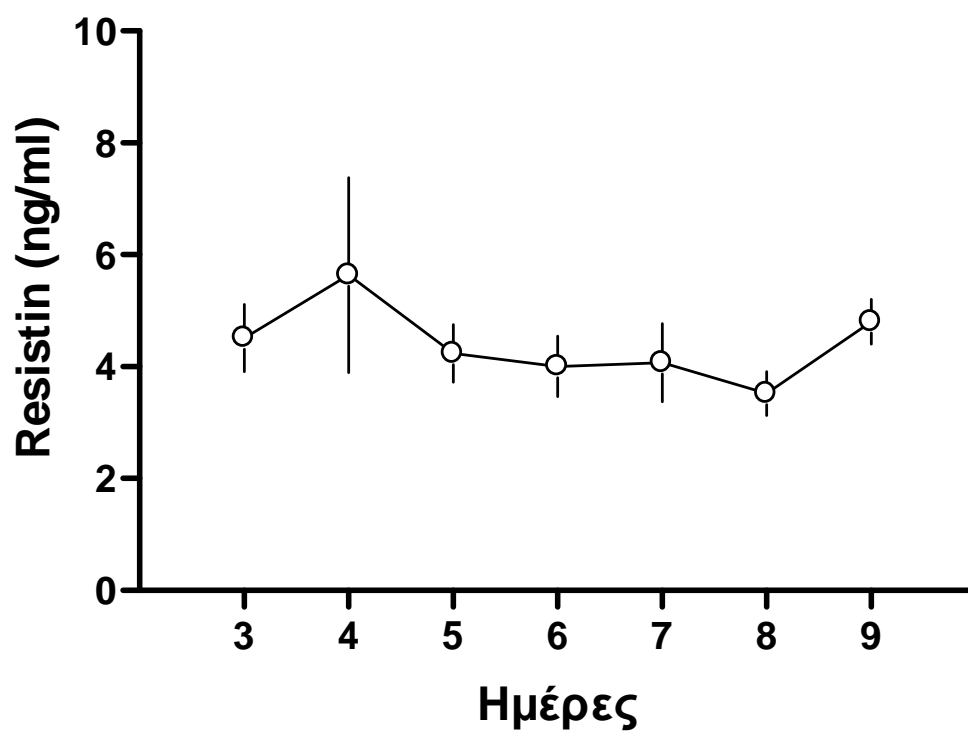


Σχήμα 3. Τα επίπεδα της γκρελίνης στο πλάσμα σε 7 γυναίκες με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο (ομάδα 1) οι οποίες έλαβαν πήραν διαδερμικά οιστρογόνα στη δόση των 100 μg την ημέρα 3 του κύκλου και των 150 μg τις ημέρες 4 και 5 του κύκλου.

Παρομοίως, τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης και της ρεισιστίνης στον ορό δεν έδειξαν κάποια σημαντική αλλαγή σε όλη τη διάρκεια της περιόδου διεξαγωγής του πειράματος (Σχήματα 4 και 5).

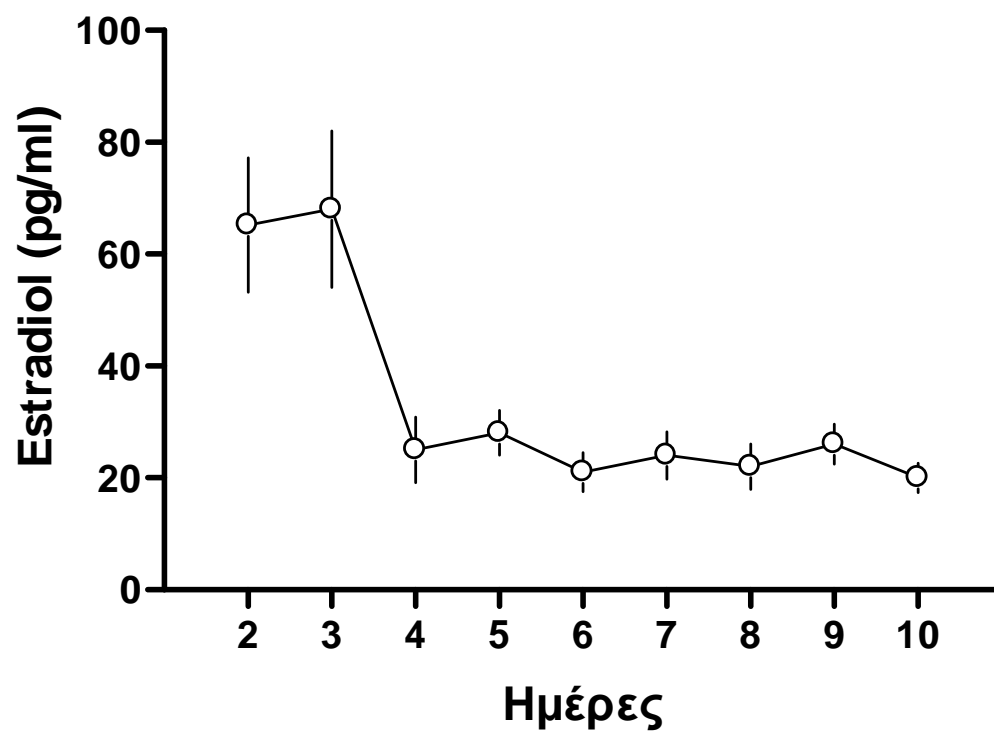


Σχήμα 4. Τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης στον ορό σε 7 γυναίκες με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο (ομάδα 1) οι οποίες έλαβαν πήραν διαδερμικά οιστρογόνα στη δόση των 100 μg την ημέρα 3 του κύκλου και των 150 μg τις ημέρες 4 και 5 του κύκλου.



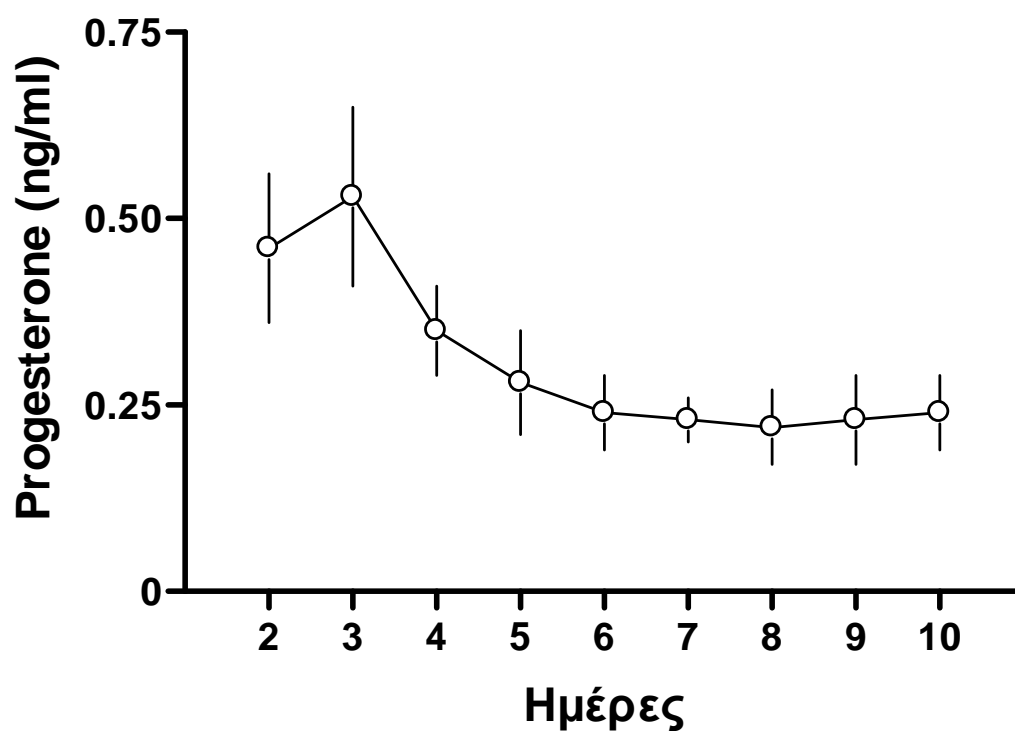
Σχήμα 5. Τα επίπεδα της ρεσιστίνης στον ορό σε 7 γυναίκες με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο (ομάδα 1) οι οποίες έλαβαν πήραν διαδερμικά οιστρογόνα στη δόση των 100 μg την ημέρα 3 του κύκλου και των 150 μg τις ημέρες 4 και 5 του κύκλου.

Στην ομάδα 2, τα επίπεδα της E2 στον ορό μειώνονταν προοδευτικά μετά την επέμβαση ($p < 0.001$) (Σχήμα 6).



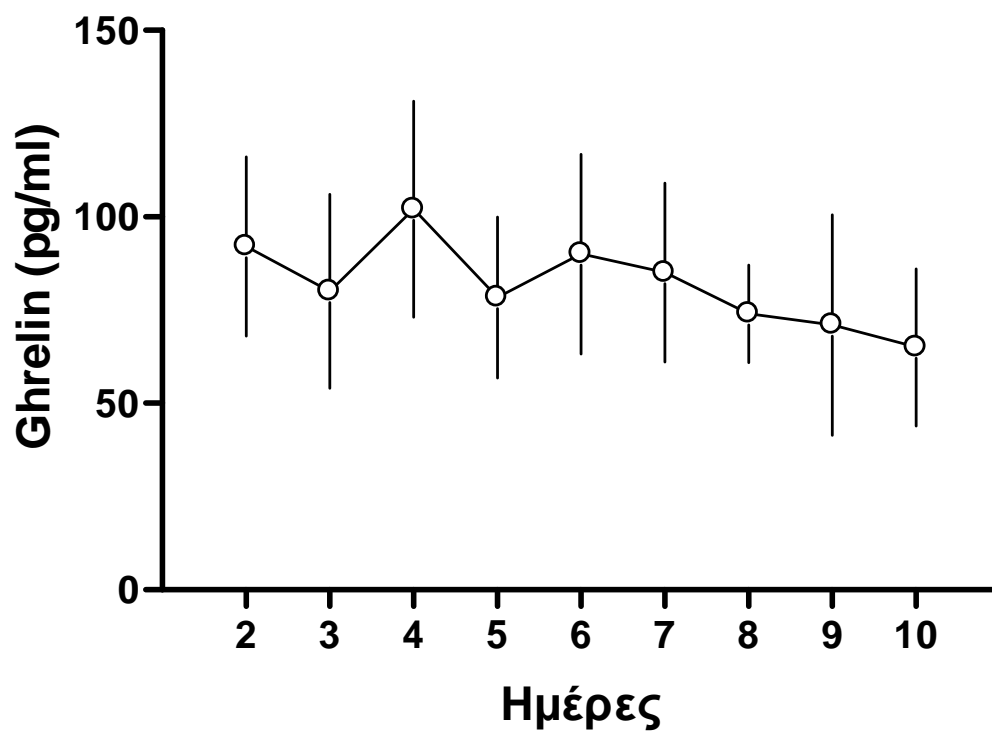
Σχήμα 6. Τα επίπεδα της οιστραδιόλης στον ορό σε 6 γυναίκες με φυσιολογικούς γεννητικούς κύκλους οι οποίες υποβλήθηκαν σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων την ημέρα 3 του κύκλου (ομάδα 2).

Επίσης, τα επίπεδα της προγεστερόνης μειώθηκαν σημαντικά μετά την ολική υστερεκτομή μετά των εξαρτημάτων ($p < 0.05$) (Σχήμα 7).



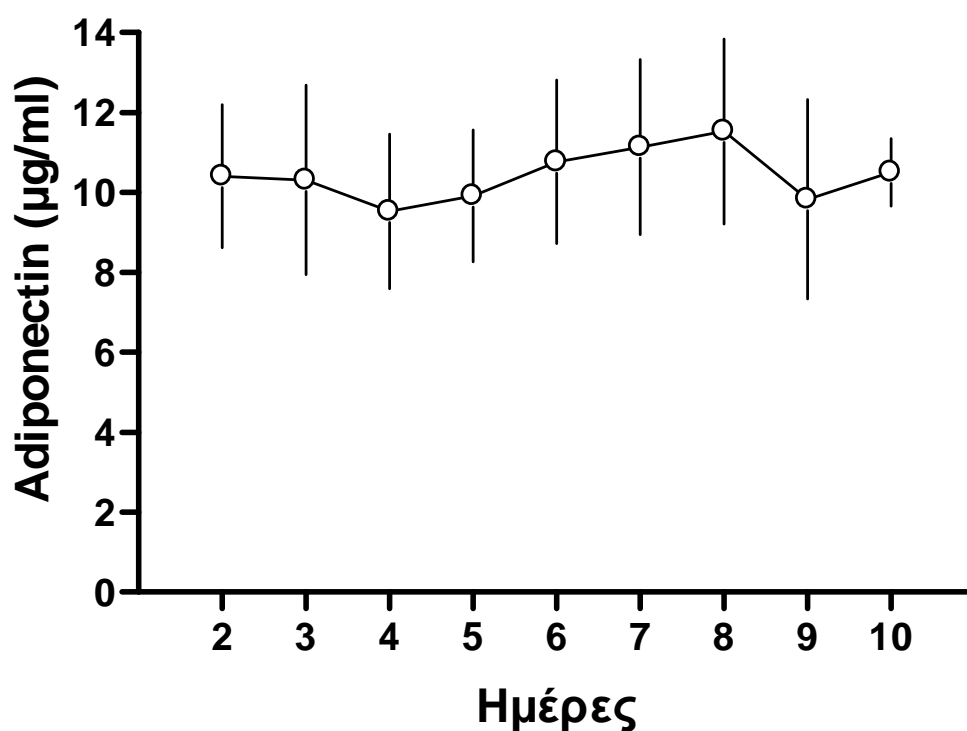
Σχήμα 7. Τα επίπεδα της προγεστερόνης στον ορό σε 6 γυναίκες με φυσιολογικούς γεννητικούς κύκλους οι οποίες υποβλήθηκαν σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων την ημέρα 3 του κύκλου (ομάδα 2).

Ωστόσο, τα επίπεδα γκρελίνης παρέμειναν σταθερά κατά τη μετεγχειρητική περίοδο, παρόμοια με εκείνα της προεγχειρητικής περιόδου (Σχήμα 8).

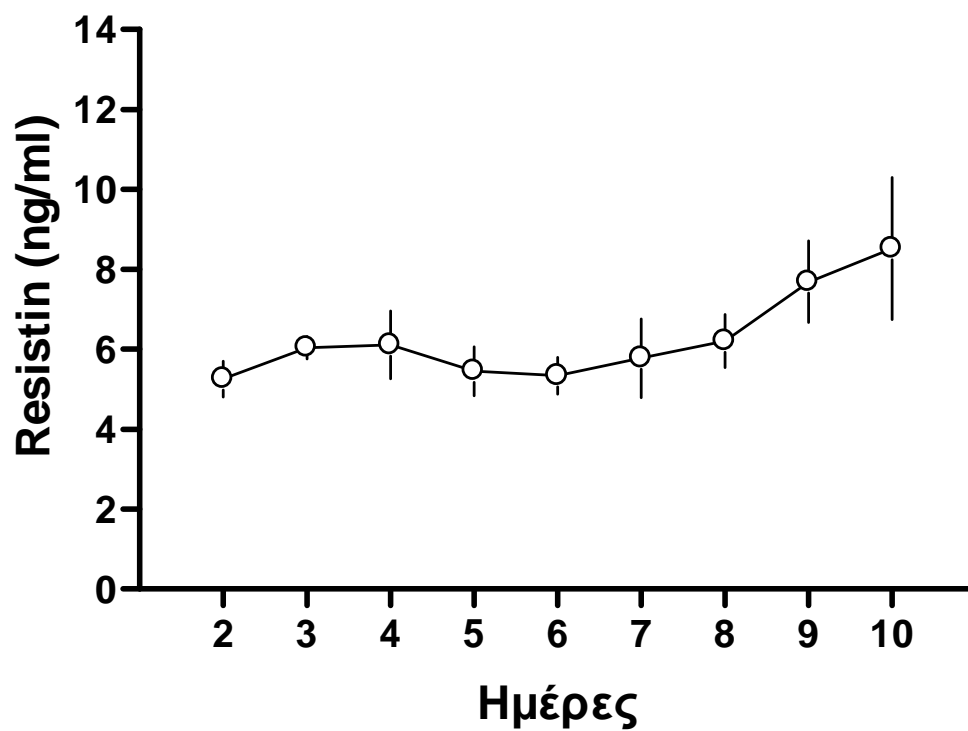


Σχήμα 8. Τα επίπεδα της γκρελίνης στο πλάσμα σε 6 γυναίκες με φυσιολογικούς γεννητικούς κύκλους οι οποίες υποβλήθηκαν σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων την ημέρα 3 του κύκλου (ομάδα 2).

Παρά τις παραπάνω σημαντικές μεταβολές των ωοθηκικών στεροειδών, τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης και της ρεσιστίνης παρέμειναν σταθερά κατά τη διάρκεια της μετεγχειρητικής περιόδου και χωρίς διαφορές από τα προεγχειρητικά τους επίπεδα (Σχήματα 9 και 10).

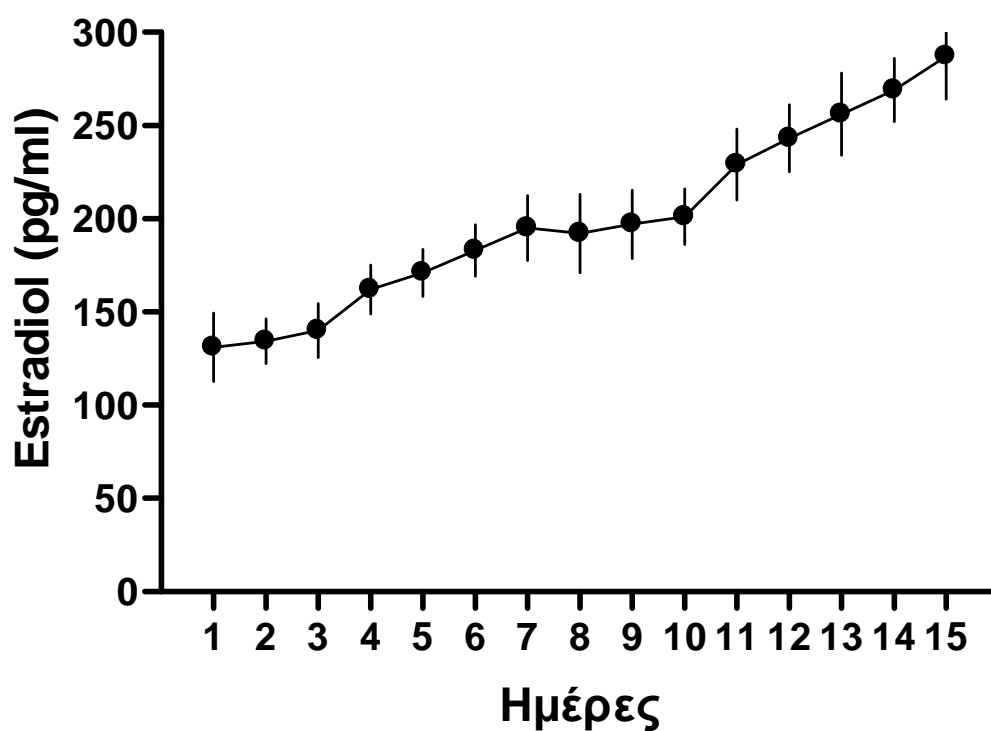


Σχήμα 9. Τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης στον ορό σε 6 γυναίκες με φυσιολογικούς γεννητικούς κύκλους οι οποίες υποβλήθηκαν σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων την ημέρα 3 του κύκλου (ομάδα 2).



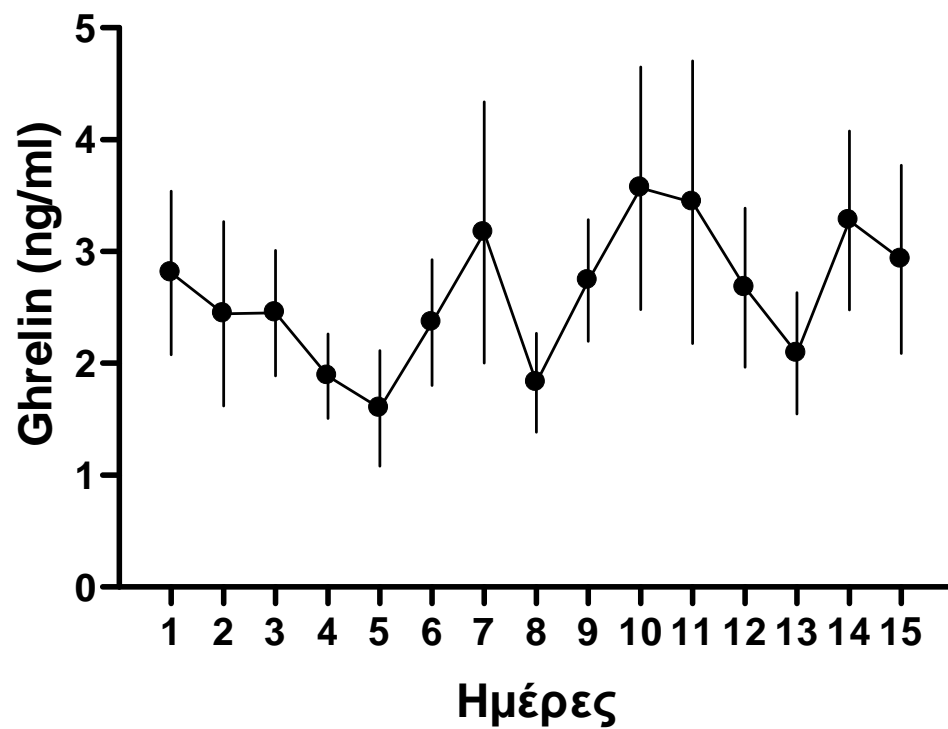
Σχήμα 10. Τα επίπεδα της ρεσιστίνης στον ορό σε 6 γυναίκες με φυσιολογικούς γεννητικούς κύκλους οι οποίες υποβλήθηκαν σε κοιλιακή ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων την ημέρα 3 του κύκλου (ομάδα 2).

Στην ομάδα 3, τα επίπεδα E2 στον ορό αυξήθηκαν βαθμιαία κατά τη διάρκεια των 15 ημερών της πειραματικής περιόδου ($p < 0.001$) ακολουθώντας ένα τύπο μεταβολών παρόμοιο με αυτόν που παρατηρείται κατά την ωοθυλακική φάση ενός φυσιολογικού κύκλου (Σχήμα 11).



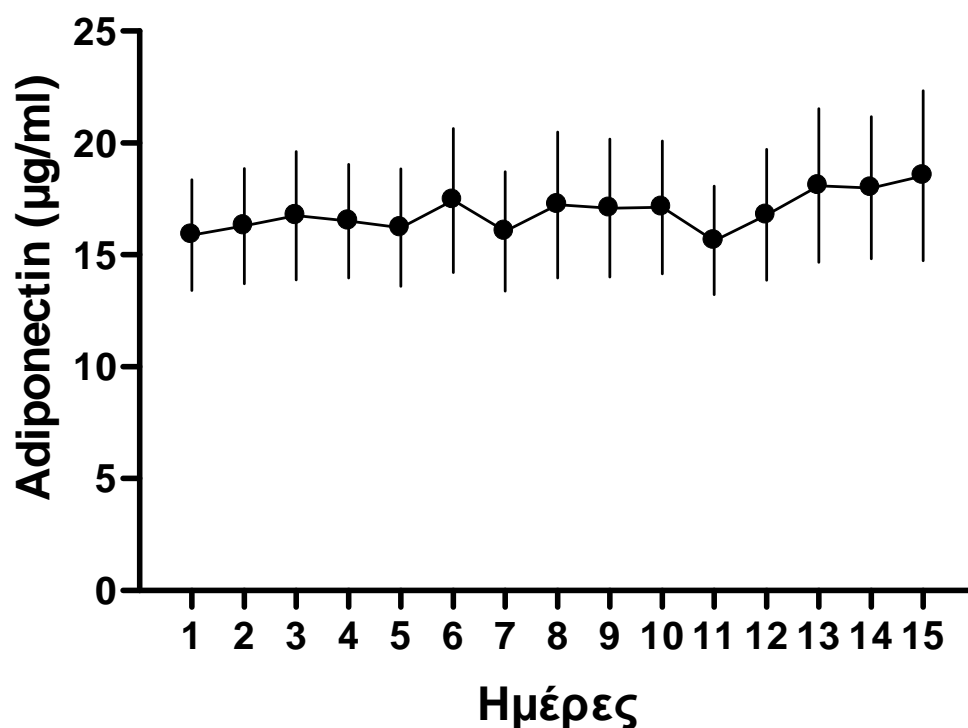
Σχήμα 11. Τα επίπεδα της οιστραδιόλης στον ορό σε 8 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες οι οποίες έλαβαν σχήμα χορήγησης οιστρογόνων και προγεστερόνης (ομάδα 3).

Τα επίπεδα της γκρελίνης του πλάσματος, ωστόσο, δεν έδειξαν καμία αλλαγή καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου (Σχήμα 12).

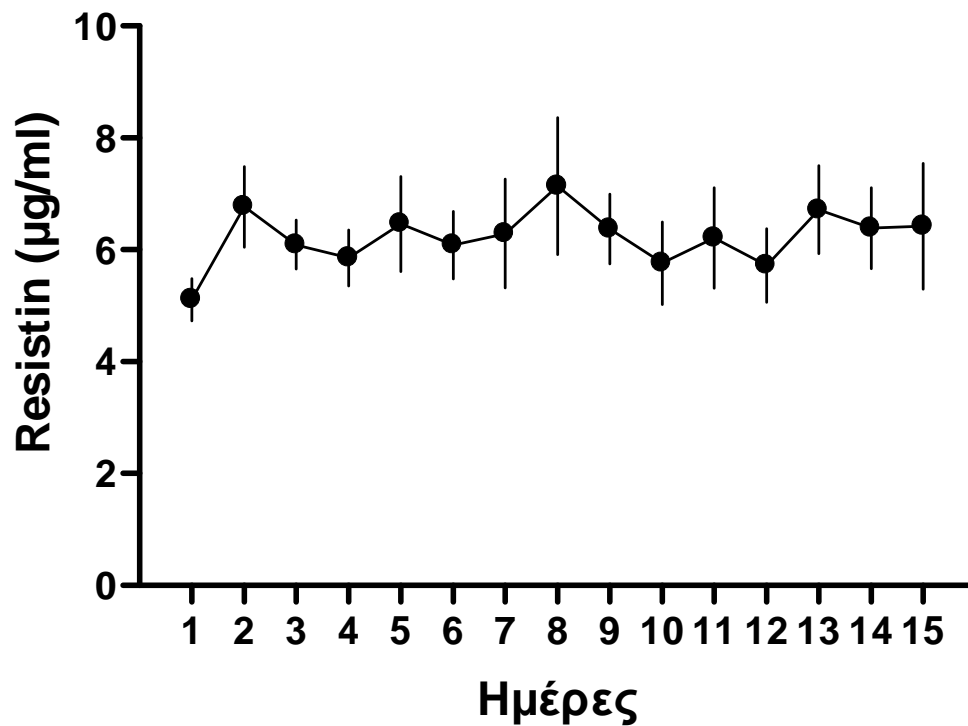


Σχήμα 12. Τα επίπεδα της γκρελίνης στο πλάσμα σε 8 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες οι οποίες έλαβαν σχήμα χορήγησης οιστρογόνων και προγεστερόνης (ομάδα 3).

Παρομοίως, τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης και της ρεισιστίνης στον ορό παρέμειναν αμετάβλητα καθ' όλη τη διάρκεια της χορήγησης των εξωγενών οιστρογόνων στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Σχήματα 13 και 14).



Σχήμα 13. Τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης στον ορό σε 8 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες οι οποίες έλαβαν σχήμα χορήγησης οιστρογόνων και προγεστερόνης (ομάδα 3).



Σχήμα 14. Τα επίπεδα της ρεισιστίνης στον ορό σε 8 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες οι οποίες έλαβαν σχήμα χορήγησης οιστρογόνων και προγεστερόνης (ομάδα 3).

Στατιστικά σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα γκρελίνης παρατηρήθηκαν σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σύγκριση με προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ($p < 0.05$).

Τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης την 1η ημέρα της πειραματικής περιόδου ήταν σημαντικά αυξημένα ($p < 0.05$) στις μετεμμηνοπαυσιακές (15.9 ± 2.5 $\mu\text{g/ml}$, ομάδα 3) σε σύγκριση με τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (8.8 ± 1.2 και 10.4 ± 1.8 $\mu\text{g/ml}$, ομάδα 1 και ομάδα 2 αντίστοιχα). Ωστόσο, τα επίπεδα της ρευστίνης στον ορό ήταν παρόμοια και στις 3 ομάδες (5.1 ± 0.4 , 4.4 ± 0.4 και 5.2 ± 0.4 ng/ml , αντίστοιχα).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα από την ομάδα 1 δείχνουν ότι σε φυσιολογικές προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η βραχυπρόθεσμη διαδερμική χορήγηση οιστρογόνων, επάγοντας τα επίπεδα της E2 σε τιμές ανάλογες με αυτές που παρατηρούνται πριν την ωοθυλακιορρηξία, δεν είχε καμία επίδραση πάνω στα επίπεδα της γκρελίνης του πλάσματος. Επιπλέον, στην ομάδα 2, η μείωση των ενδογενών οιστρογόνων έπειτα από την αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία δεν μετέβαλε καθόλου τα επίπεδα της γκρελίνης του πλάσματος. Αυτά τα δεδομένα που αφορούν στην ταχεία μεταβολή των επιπέδων της E2 στον ορό δείχνουν ότι, σε φυσιολογικές γυναίκες κάτω από αυτές τις συνθήκες, τα οιστρογόνα δεν συνιστούν σημαντικό παράγοντα ρύθμισης της έκκρισης της γκρελίνης. Η πιθανότητα η νηστεία κατά τη διάρκεια των πρώτων 24 ωρών μετεγχειρητικά να έχει επηρεάσει τα επίπεδα γκρελίνης του πλάσματος, αποκρύπτοντας επομένως μία πιθανή επίδραση της μείωσης οιστρογόνων, είναι μάλλον απομακρυσμένη, εξ' αιτίας του γεγονότος ότι τα επίπεδα της γκρελίνης δεν παρουσίασαν μεταβολές, ακόμη και κατά τη διάρκεια της υπόλοιπης μετεγχειρητικής περιόδου.

Η βιβλιογραφία στερείται παρόμοιων δεδομένων για σύγκριση. Είχε προταθεί σε προγενέστερη μελέτη ότι τα εξωγενή οιστρογόνα, χορηγούμενα με τη μορφή των από του στόματος αντισυλληπτικών, αυξάνουν τα επίπεδα της γκρελίνης σε περιπτώσεις ψυχογενούς ανορεξίας (Grinspoon et al., 2004) και πιο πρόσφατα σε γυναίκες με το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών

(PCOS) (Sağsöz et al., 2008). Επιπρόσθετα, σε γυναίκες με αμηνόρροια των αθλητριών τα επίπεδα της γκρελίνης ήταν χαμηλά (De Souza et al., 2004). Ωστόσο, αυτές οι περιπτώσεις αντιπροσωπεύουν διαφορετικά μοντέλα μελέτης και μέχρι σήμερα δεδομένα σε γυναίκες με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο εκλείπουν. Η χρόνια στέρηση οιστρογόνων μπορεί να διαδραμάτισε κάποιο ρόλο στις συγκεκριμένες περιπτώσεις. Η πιθανότητα ότι μόνο τα από του στόματος χορηγούμενα εξωγενή οιστρογόνα έχουν άμεση επίδραση πάνω στα κύτταρα του στομάχου τα οποία παράγουν γκρελίνη δεν μπορεί να αποκλεισθεί, όπως είχε προταθεί και παλαιότερα (Kellokoski et al., 2005). Παρόλα αυτά, σε κορίτσια με βραχύ ανάστημα, στα οποία χορηγήθηκαν εξωγενή οιστρογόνα από του στόματος για 2 ημέρες με αποτέλεσμα την επίτευξη υπέρ του φυσιολογικού συγκεντρώσεων E2 στον ορό, δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στα επίπεδα της γκρελίνης του ορού (Lebenthal et al., 2006). Σε μία πρόσφατη μελέτη έχουμε δείξει ότι σε γυναίκες με φυσιολογικό γεννητικό κύκλο, ανεξάρτητα από τις φυσιολογικές μεταβολές των ωοθηκικών στεροειδών κατά τη διάρκεια του κύκλου, τα επίπεδα γκρελίνης του πλάσματος δεν παρουσίασαν καμία απολύτως μεταβολή καθ' όλη τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου (Daforoulou et al., 2009).

Τα αποτελέσματα από την ομάδα 3 δείχνουν ότι σε φυσιολογικές μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η θεραπεία με από του στόματος χορηγούμενα οιστρογόνα, η οποία αύξησε τα επίπεδα της E2 του ορού σε προωοθυλακιωρηκτικά επίπεδα μέσα σε ένα χρονικό διάστημα ανάλογο της φυσιολογικής ωοθυλακικής φάσης του κύκλου, δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα της γκρελίνης του πλάσματος. Σχετικά δεδομένα στη βιβλιογραφία σε

μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είναι αντικρουόμενα. Σε μία προγενέστερη μελέτη σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, αν και μία σημαντική αύξηση της γκρελίνης βρέθηκε μετά από 6 μήνες θεραπείας με από του στόματος οιστρογόνα, η χορήγηση οιστρογόνων διαδερμικά δεν μετέβαλε σημαντικά τα επίπεδα της γκρελίνης (Kellokoski et al., 2005). Επιπρόσθετα, η θεραπεία των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών με διαδερμική χορήγηση 17β-οιστραδιόλης σε δόση των 50 μg/ημέρα σε συνεχές σχήμα για τουλάχιστον 24 μήνες και νομεγεστρόλης (norgestrol) στη δόση των 5 mg/ημερησίως για 12 ημέρες μηνιαίως σε διαδοχικό σχήμα είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων της γκρελίνης σε σύγκριση με μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που δεν ελάμβαναν θεραπεία (Di Carlo et al., 2007). Μία άλλη πρόσφατη μελέτη έχει δείξει σημαντική μείωση των επιπέδων της γκρελίνης μετά από χορήγηση τόσο με από του στόματος όσο και διαδερμικών οιστρογόνων για 3 μήνες σε γυναίκες με το μεταβολικό σύνδρομο (Chu et al., 2006a). Πιο πρόσφατα, έχει δεχθεί ότι η θεραπεία με ημιϋδρική E2 (hemihydrate E2) μαζί με διϋδρογεστερόνη για 2 μήνες (Villa et al., 2008), ή με συζευγμένα ίππεια οιστρογόνα και 17β-E2 μαζί με οξική νορεθιστερόνη για 3 μήνες (Lambrinoudaki et al., 2008) σε φυσιολογικές μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα της γκρελίνης στο πλάσμα.

Στη δική μας μελέτη, τα επίπεδα της γκρελίνης του πλάσματος ήταν σαφώς χαμηλότερα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε σύγκριση με τις προεμμηνοπαυσιακές. Ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) είναι ένας γνωστός καθοριστικός παράγοντας των επιπέδων της γκρελίνης (Tschöp et al., 2001), όμως πιθανότατα δεν ευθύνονταν για αυτή τη διαφορά, καθώς ήταν

συγκρίσιμος και στις 3 ομάδες. Σχετικά δεδομένα είναι αντικρουόμενα στη βιβλιογραφία καθώς, οι παχύσαρκες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχουν βρεθεί να έχουν χαμηλότερα επίπεδα γκρελίνης σε σύγκριση με παχύσαρκες προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Chu et al., 2006b), ενώ σε άλλη μελέτη έχει βρεθεί ότι η εμμηνόπαυση δεν επηρεάζει τις τιμές της γκρελίνης του πλάσματος (Purnell et al., 2003).

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φάνηκε ότι, σε φυσιολογικές προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, η βραχυπρόθεσμη αγωγή με διαδερμικά οιστρογόνα που αύξησε τις τιμές της E2 στον ορό σε προωθυλαιορρηκτικά επίπεδα, δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα της αντιπνεκτίνης του ορού. Τα επίπεδα της αντιπνεκτίνης στον ορό παρέμειναν σταθερά ακόμη και σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες μετά αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομία παρά την σταδιακή μείωση των επιπέδων της E2 στον ορό, υποδηλώνοντας ότι ούτε τα εξωγενή αλλά ούτε τα ενδογενή οιστρογόνα έχουν κάποια επίδραση στη επίπεδα αυτής της αντιποκίνης στην κυκλοφορία. Παρομοίως, σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες η θεραπεία με από του στόματος οιστρογόνα η οποία αύξησε τις τιμές της E2 στον ορό σε προωθυλακιωρρηκτικά επίπεδα μέσα σε μία περίοδο περίπου ίση σε διάρκεια με εκείνη της φυσιολογικής ωθυλακικής φάσης, δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα της αντιπνεκτίνης στον ορό.

Προηγούμενες μελέτες σχετικά με τη μακροχρόνια χορήγηση οιστρογόνων έχουν δείξει διφορούμενα αποτελέσματα. Σε μερικές από αυτές, καμία

επίδραση των οιστρογόνων, είτε στη μορφή από του στόματος αντισυλληπτικών σε μακροχρόνια αγωγή είτε στη μορφή θεραπείας ορμονικής υποκατάστασης, πάνω στα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης δεν βρέθηκε (Ibanez & de Zegher, 2004; Sumino et al., 2004; Sieminska et al., 2005). Ωστόσο, σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με το μεταβολικό σύνδρομο, η διαδερμική και όχι η από του στόματος χορήγηση οιστρογόνων για 3 μήνες αύξησε τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης (Chu et al., 2006a), ενώ η μακροχρόνια θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης μείωσε τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης στο πλάσμα (Im et al., 2006). Επιπλέον, σε υγιείς γυναίκες χωρίς ορμονική αγωγή, τα επίπεδα της E2 στην κυκλοφορία βρέθηκαν να σχετίζονται αρνητικά με τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης, ανεξάρτητα από την ηλικία και την ύπαρξη ή μη εμμηνόπαυσης (Gavrilu et al., 2003). Επιπρόσθετα, σε δύο πρόσφατες μελέτες, τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης στον ορό παρέμειναν αμετάβλητα καθ' όλη τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου σε φυσιολογικές γυναίκες (Kleiblova et al., 2006; Daforoulos et al., 2009). Οι λόγοι για αυτές τις αντικρουόμενες απόψεις παραμένουν άγνωστοι, αν και μπορεί να οφείλονται στα διαφορετικά μοντέλα μελετών. Ωστόσο, η επίδραση της βραχυχρόνιας χορήγησης οιστρογόνων ή της εξαφάνισης των ενδογενών οιστρογόνων, όπως έγινε στην παρούσα μελέτη, δεν έχει διερευνηθεί στο παρελθόν.

Σε συμφωνία με τις περισσότερες προηγούμενες μελέτες (Gavrilu et al., 2003; Jurimae & Jurimae 2007; Tamakoshi et al., 2007) αλλά όχι όλες (Hong et al., 2007) βρίσκεται το εύρημα της παρούσας μελέτης ότι στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα αντιπυονεκτίνης σε σύγκριση με τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Αν και οι

Gavrila και συν. (2003) πρότειναν ότι η διαφορά αυτή οφείλονταν στα υψηλότερα επίπεδα E2 στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, οι οποίες βρέθηκαν να είναι ένας δυνατός αρνητικός καθοριστικός παράγοντας των επιπέδων αντιπυονεκτίνης, τα δεδομένα της βιβλιογραφίας για τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της E2 και της αντιπυονεκτίνης είναι αντικρουόμενα (Sieminska et al., 2005; Im et al., 2006; Hong et al., 2007; Tworoger et al., 2007). Στην παρούσα μελέτη, η επίτευξη υψηλών επιπέδων E2 σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες μετά από αγωγή με εξωγενή οιστρογόνα δεν επηρέασε τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης, τα οποία παρέμειναν σημαντικά υψηλότερα σε σύγκριση με τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι άλλοι παράγοντες εκτός από την E2, οι οποίοι σχετίζονται με την εμμηνόπαυση μπορεί να ευθύνονται για αυτήν τη διαφορά. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι η ηλικία (Jurimae & Jurimae 2007), όπως έχει προταθεί και προγενέστερα, η σχετική αύξηση στο πηλίκιο ανδρογόνα-οιστρογόνα μετά την εμμηνόπαυση (Laughlin et al., 2006) και άλλοι που δεν έχουν διευκρινισθεί ακόμη. Ο δείκτης σχετικής μάζας σώματος (BMI) συνιστά, επίσης, έναν γνωστό καθοριστικό παράγοντα των επιπέδων της αντιπυονεκτίνης (Arita et al., 1999; Weyer et al., 2001; Gavrila et al., 2003; Jurimae & Jurimae 2007; Laughlin et al., 2006), όμως δεν φαίνεται να έχει επηρεάσει τα αποτελέσματα, επειδή ήταν παρόμοιος και στις 3 ομάδες γυναικών.

Τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη επίσης υποδηλώνουν ότι, εκτός από τα οιστρογόνα, άλλες ωοθηκικές στεροειδείς και μη στεροειδείς ορμόνες πιθανόν δεν εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκκρισης της αντιπυονεκτίνης,

επειδή τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης στον ορό παρέμειναν αμετάβλητα μετά από την αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομία στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Τα παρόντα δεδομένα έχουν δείξει ακόμη ότι η βραχυπρόθεσμη αγωγή με οιστρογόνα διαδερμικά ή από του στόματος σε προ- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα της ρεισιστίνης στον ορό. Επιπλέον, παρά τη μείωση των ενδογενών οιστρογόνων μετά την αμφοτερόπλευρη ωθηκεκτομία, τα επίπεδα της ρεισιστίνης παρέμειναν αμετάβλητα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα δεν συνιστούν σημαντικό παράγοντα ρύθμισης της έκκρισης της ρεισιστίνης. Η βιβλιογραφία στερείται παρόμοιων δεδομένων για σύγκριση.

Σε μία μελέτη, η αγωγή για 6 μήνες με από του στόματος αντισυλληπτικά δεν είχε επίδραση στα επίπεδα της ρεισιστίνης στον ορό (Rechberger et al., 2004), ενώ σε μία άλλη μελέτη η αγωγή για 3 μήνες με τα από του στόματος αλλά όχι τα διαδερμικά οιστρογόνα αύξησε τα επίπεδα της ρεισιστίνης στον ορό (Chu et al., 2006a). Επιπρόσθετα, σε *in vitro* πειράματα με 3T3-L1 λιποκύτταρα, η 17β-E2 ρυθμίζει προς τα άνω (*up-regulation*) την έκφραση του mRNA της ρεισιστίνης σε δοσο- και χρονο-εξαρτώμενο τρόπο (Chen et al., 2006), ενώ σε ωθηκεκτομηθέντα ποντίκια η υποδόρια ένεση με βενζοϊκή E2 μείωσε τα επίπεδα του mRNA της ρεισιστίνης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (Huang et al., 2005).

Τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη δείχνουν ότι μετά την

εμμηνόπαυση τα επίπεδα της ρεισιστίνης στον ορό παρέμειναν αμετάβλητα σε φυσιολογικές γυναίκες. Ωστόσο, σε μία προηγούμενη μελέτη βρέθηκαν υψηλότερα επίπεδα ρεισιστίνης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με το μεταβολικό σύνδρομο σε σύγκριση με προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Chu et al., 2006b). Επομένως, υπάρχει ανάγκη για περισσότερα δεδομένα για τη διευκρίνιση του κατά πόσον η εμμηνόπαυση και η γήρανση μπορεί να επηρεάζουν τα επίπεδα και την έκκριση της ρεισιστίνης, ανεξάρτητα από την παχυσαρκία και μεταβολικές παραμέτρους.

Είναι επίσης σαφές από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ότι άλλοι ωοθηκικοί παράγοντες, εκτός από τα οιστρογόνα, οι οποίοι εξαφανίζονται από την κυκλοφορία μετά από την αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, δεν εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκκρισης της ρεισιστίνης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, αυτή είναι η πρώτη μελέτη η οποία διερεύνησε τα επίπεδα της γκρελίνης, της αντιπονεκτίνης και της ρεσιστίνης μετά από βραχυχρόνια χορήγηση εξωγενών οιστρογόνων σε προ- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχοντας ως αποτέλεσμα φυσιολογικές συγκεντρώσεις E2 ή μετά από αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα οιστρογόνα δεν εμπλέκονται σημαντικά στη ρύθμιση της έκκρισης της γκρελίνης, της αντιπονεκτίνης και της ρεσιστίνης σε φυσιολογικές γυναίκες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Τα δεδομένα σχετικά με την επίδραση των οιστρογόνων στην έκκριση γκρελίνης, τα αντιπονεκτίνης και της ρεσιστίνης στους ανθρώπους είναι περιορισμένα και αντικρουόμενα.

Σκοπός της μελέτης: Η διερεύνηση των επιδράσεων της οιστραδιόλης στα επίπεδα της γκρελίνης, της αντιπονεκτίνης και της ρεσιστίνης σε φυσιολογικές προ- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

Υλικά και μέθοδοι: Το υλικό μας αποτέλεσαν ένα σύνολο 21 γυναικών χωρισμένων σε 3 ομάδες. Οι 13 γυναίκες είχαν φυσιολογικό κύκλο (n=7, ομάδα 1, n=6 ομάδα 2) και οι 8 ήταν μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (ομάδα 3). Οι γυναίκες της ομάδας 1 έλαβαν αυξημένες δόσεις οιστραδιόλης διαδερμικά από την 3η έως την 5η ημέρα του κύκλου. Οι γυναίκες της ομάδας 2 υποβλήθηκαν σε ολική υστερεκτομία μετά των εξαρτημάτων την 3η ημέρα του κύκλου. Οι γυναίκες της ομάδας 3 έλαβαν από του στόματος αυξημένες δόσεις E2 για 15 ημέρες. Η ακυλιωμένη γκρελίνη, η αντιπονεκτίνη, η ρεσιστίνη και η E2 μετρήθηκαν σε όλα τα δείγματα αίματος.

Αποτελέσματα: Στην ομάδα 1, τα επίπεδα της γκρελίνης του πλάσματος και της αντιπονεκτίνης και της ρεσιστίνης στον ορό δεν έδειξαν καμία αλλαγή καθ'όλη την εβδομάδα μετά την 3η ημέρα του κύκλου. Στην ομάδα 2, τα επίπεδα της γκρελίνης, της αντιπονεκτίνης και της ρεσιστίνης ήταν παρόμοια πριν και μετά την επέμβαση και παρέμειναν σταθερά κατά την πρώτη μετεγχειρητική εβδομάδα. Στην ομάδα 3, καμία σημαντική αλλαγή στα

επίπεδα της γκρελίνης του πλάσματος και της αντιπυονεκτίνης και της ρεσιστίνης του ορού δεν παρατηρήθηκε κατά τη διάρκεια των 15 ημερών της χορήγησης E2.

Συμπεράσματα: Η παρούσα μελέτη δείχνει για πρώτη φορά ότι οι τιμές της γκρελίνης, της αντιπυονεκτίνης και της ρεσιστίνης δεν επηρεάζονται ούτε από εξωγενή βραχυχρόνια χορήγηση οιστρογόνων σε προ- και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ούτε μετά από την αμφοτερόπλευρη ωοθηκεκτομία σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι ωοθηκικές ορμόνες δεν εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκκρισης γκρελίνης, της αντιπυονεκτίνης και της ρεσιστίνης στις γυναίκες.

SUMMARY

Background: Data regarding the possible effects of estrogen on ghrelin, adiponectin and resistin secretion in humans are limited and contradictory.

Aim: To investigate the effect of estradiol on ghrelin, adiponectin and resistin levels in normal pre- and post-menopausal women.

Materials and Methods: A total of 21 women divided into three groups, i.e. 13 normally cycling women (n=7, group 1 and n=6, group 2) and 8 postmenopausal women (group 3). Women of group 1 received increasing doses of estradiol (E2) through skin patches from cycle days 3 to 5. Women of group 2, underwent total abdominal hysterectomy plus bilateral salpingo-oophorectomy (TAH+BSO) on cycle day 3. Women of group 3 received per os increasing doses of E2 valerate for 15 days. Acylated ghrelin, adiponectin, resistin and E2 were measured in all blood samples.

Results: In group 1, plasma ghrelin and serum adiponectin and resistin levels did not show any significant changes for the week following cycle day 3. In group 2, ghrelin, adiponectin and resistin levels were similar before and after TAH+BSO and remained stable during the first seven postoperative days. In group 3, no significant changes in plasma ghrelin and serum adiponectin and resistin levels were seen during the 15 days of E2 administration.

Conclusions: The present study demonstrates for the first time that ghrelin, adiponectin and resistin values were not affected either by exogenous short-term estrogen administration to pre- and post-menopausal women or following

ovariectomy in pre-menopausal women. It is suggested that ovarian hormones are not involved in the regulation of ghrelin, adiponectin and resistin secretion in women.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

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

Barreiro ML, Gaytan F, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M (2002) Cellular location and hormonal regulation of ghrelin in rat testis. *Biol Reprod* 67:1768-1776

Beltowski J (2003) Adiponectin and resistin—new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 9:55–61.

Ben-Jonathan N, Hnasko R (2001) Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22:724-763

Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE (2001) The adipocyte secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7:947–53.

Bottner A, Kratzsch J, Muller G, Kapellen TM, Bluher S, Keller E, Bluher M, Kiess W. (2004) Gender Differences of Adiponectin Levels Develop during the Progression of Puberty and Are Related to Serum Androgen Levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:4053-61.

Bowers CY (1998) Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cell Molec Life Sci* 54: 1316–1329.

Casanueva FF, et al (2003) Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner. *FEBS Lett* 548:21–7.

Chen YH, Lee MJ, Chang HH, Hung PF, Kao YH. 17 Beta-estradiol stimulates resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes via the estrogen receptor, extracellularly regulated kinase, and CCAAT/enhancer binding protein- α pathways. *Endocrinology* 2006;147:4496–504.

Chu MC, Cospers P, Nakhuda GS, Lobo RA (2006a) A comparison of oral and transdermal short-term estrogen therapy in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Fertil Steril* 86: 1669-75. 35.

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

Clegg DJ, Brown LM, Zigman JM, et al. (2007) Estradiol-dependent decrease in the orexigenic potency of ghrelin in female rats. *Diabetes* 56:1051-8.

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

Combs T, Berg A, Rajala M, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron J, et al (2003) Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 52:268–76.

Dafopoulos K, Kotsovassilis CG, Milingos S, et al. (2004) Changes in pituitary sensitivity to GnRH in estrogen-treated post-menopausal women: evidence that gonadotrophin surge attenuating factor plays a physiological role. *Hum Reprod* 19: 1985-92.

Dafopoulos K, Mademtzis I, Vanakara P, et al. (2006) Evidence that termination of the estradiol-induced LH surge in women is regulated by ovarian factors. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 641-5.

Dafopoulos K, Sourlas D, Kallitsaris A, Pournaras S, Messinis IE (2008) Blood ghrelin, resistin and adiponectin concentrations during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril* (Epub ahead of print).

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

Di Carlo C, Tommaselli GA, Gargano V, et al. (2007) Effects of estrogen-progestin therapy on serum levels of RANKL, osteoprotegerin, osteocalcin, leptin, and ghrelin in postmenopausal women. *Menopause* 14: 1-7.

Fenkci V, Fenkci S, Yilmazer M, Serteser M (2003) Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertil Steril* 80:123-127

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

Furuta M, Funabashi T, Kimura F (2001) Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 288:780-785.

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

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

Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2988–2991.

Goldstein BJ, Scalia RG, Ma XL (2009) Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 6:27-35.

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

Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F (2001b) Ghrelin, a novel placental delivered hormone. *Endocrinology* 142:788-794.

Gualillo O, Caminos JE, Kojima M, et al. (2001) Gender and gonadal influences on ghrelin mRNA levels in rat stomach. *Eur J Endocrinol* 144: 687-90.

Hoffstedt J, Arvidsson E, Sjolin E, Wahlen K, Arner P (2004) Adipose tissue adiponectin production and adiponectin serum concentration in human obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1391–6.

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

Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K (2000a) Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 279:909–913

Hu E, Liang P, Spiegelman BM (1996) AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697–10703

Huang SW, Seow KM, Ho LT, Chien Y, Chung DY, Chang CL, et al. (2005) Resistin mRNA levels are downregulated by estrogen in vivo and in vitro. *FEBS Lett* 579:449–54.

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

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

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

Jeffery PL, Herington AC, Chopin LK (2002) Expression and action of the growth hormone releasing peptide ghrelin and its receptor in prostate cancer cell lines. *J Endocrinol* 172:R7-R11

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

Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Nakamura A, Honda Y, Sato T and Tanaka T (2003) Ghrelin Inhibits the Development of Mouse preimplantation Embryos in Vitro *Endocrinology* 144:2623-2633.

Kellokoski E, Pöykkö SM, Karjalainen AH, et al. (2005) Estrogen replacement therapy increases plasma ghrelin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2954-63.

Kelly CC, Lyall H, Petrie JR, Gould GW, Connell JM, Sattar N (2001) Low grade chronic inflammation in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2453-2455.

Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metabol* 89:2548–2556

Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik DL, Cnop M (2003) Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 312:1118-1122.

Kishida K, Nagaretani H, Kondo H, Kobayashi H, Tanaka S, Maeda N, Nagasawa A, Hibuse T, Ohashi K, Kumada M, Nishizawa H, Okamoto Y, Ouchi N, Maeda K, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y (2003) Disturbed secretion of mutant adiponectin associated with the metabolic syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306:286-92.

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

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

Kojima M, Hosoda H, Matsuo H, Kangawa K (2001) Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *Trends in Endocrinol Metabol* 12: 118–122.

Kojima M, Kangawa K (2008) Structure and function of ghrelin. *Results Probl Cell Differ.* 2008;46:89-115.

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from the stomach. *Nature* 402:656-660.

Koutkia P, Canavan B, Breu J, Johnson ML, Grinspoon SK (2004) Nocturnal Ghrelin Pulsatility and Response to Growth Hormone Secretagogues in healthy men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004 287:E506-12

Lambrinoudaki IV, Christodoulakos GE, Economou EV, et al. (2008) Circulating leptin and ghrelin are differentially influenced by estrogen/progestin therapy and raloxifene. *Maturitas* 59: 62-71.

Landgraf R, Landraf-Leurs MM, Weissmann A, Horl R, von Werder K, Scriba PC (1977) Prolactin: a diabetogenic hormone. *Diabetologia* 13:99-104.

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

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

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K (1996) cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 286–9.

Makino Y, Hosoda H, Shibata K, et al. (2002) Alteration of plasma ghrelin levels associated with the blood pressure in pregnancy. *Hypertension* 39: 781-4.

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

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

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

Moon B, Kwan J, Duddy N, Sweeny G, Begum N. (2003) Resistin inhibits glucose uptake in L6 skeletal muscle cells independent of changes in insulin signaling components and Glut-4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E106–E115.

Momany FA, Bowers CY, Reynolds GA, et al. (1981) Design, synthesis and biological activity of peptides which release growth hormone in vitro. *Endocrinology* 108: 31–39.

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

Morin-Papunen L, Rautio K, Ruokonen A, Hedberg P, Puukka M, Tapanainen JS (2003) Metformin reduces serum C-reactive protein levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4649-4654

Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K (2001) Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 280: R1483–R1487.

Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M (1996) Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)* 120:803–812.

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

Nogueiras R, Gualillo O, Caminos JE, Casanueva FF, Dieguez C (2003b) Regulation of resistin by gonadal, thyroid hormone, and nutritional status. *ObesRes.*11:408-14.

Nogueiras R, Barreiro ML, Caminos JE, Gaytan F, Suominen JS, Navarro VM, Casanueva FF, Aguilar E, Toppari J, Dieguez C, Tena-Sempere M. (2004) Novel expression of resistin in rat testis: functional role and regulation by nutritional status and hormonal factors. *J Cell Sci* 117:3247-3257

Orio F Jr, Lucidi P, Palomba S, Tauchmanova L, Cascella T, Russo T, Zullo F, Colao A, Lombardi G, De Feo P (2003) Circulating ghrelin concentrations in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 88:942-945.

Orio F Jr, Palomba S, Cascella T, Milan G, Mioni R, Pagano C, Zullo F, Colao A, Lombardi G, Vettor R. (2003) Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2619-2623.

Otto B, Cuntz U, Fruehauf E, Wawarta R, Folwaczny C, Riepl RL, Heiman ML, Lehnert P, Fichter M, Tschop M (2001) Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa. *Eur J Endocrinol* 145:669–673.

Panidis D, Kourtis A, Farmakiotis D, Mouslech T, Rousso D, Koliakos G (2003) Serum adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 18:1790-1796.

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

Purnell JQ, Weigle DS, Breen P, Cummings DE (2003) Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5747-52

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

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

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

Sağsöz N, Orbak Z, Noyan V, Yücel A, Uçar B, Yıldız L (2008) The effects of oral contraceptives including low-dose estrogen and drospirenone on the concentration of leptin and ghrelin in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 92:660-6.

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

Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal, D.G., Vidal-Puig, A., Considine, R.V., O'Rahilly, S. (2001) Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and

peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 50: 2199-2202.

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

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF (1995) A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270:26746–9.

Shibata K, Hosoda H, Kojima M, et al. (2004) Regulation of ghrelin secretion during pregnancy and lactation in the rat: possible involvement of the hypothalamus. *Peptides* 25: 279-87.

Sieminska L, Wojciechowska C, Niedziolka D, Marek B, Kos-Kudla B, Kajdaniuk D, et al (2005) Effect of postmenopause and hormone replacement therapy on serum adiponectin levels. *Metabolism* 54:1610–4.

Sir-Petermann T, Maliqueo M, Palomino A, Vantman D, Recabarren SE, Wildt L (1999) Episodic leptin release is independent of luteinizing hormone secretion. *Hum.Reprod.*14:2695-9.

Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, et al. (1997) Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 18: 621–645.

Soares JB, Leite-Moreira AF (2008) Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: three pieces of the same puzzle. *Peptides*. 29, 1255-1270.

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

Steppan CM, Lazar MA. (2002) Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 13:18-23.

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

Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2000) Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4908-4911.

Tamakoshi K, Yatsuya H, Wada K, Matsushita K, Otsuka R, Yang PO, et al (2007) The transition to menopause reinforces adiponectin production and its

contribution to improvement of insulin-resistant state. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66:65–71.

Tanaka K, Minoura H, Isobe T, Yonaha H, Kawato H, Wang DF, Yoshida T, Kojima M, Kangawa K and Toyoda N (2003) Ghrelin Is Involved in the Decidualization of Human Endometrial Stromal Cells. *J Clin Endocrinol Metabol* 88:2335-2340.

Tanaka M, Naruo T, Yasuhara D, Tatebe Y, Nagai N, Shiiya T, Nakazato M, Matsukura S, Nozoe S (2003) Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 28:829–835.

Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, Gaytan F, Zhang FP, Caminos JP, Pinilla L, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E (2002) Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143:717-725.

Tolle V, Kadem M, Bluet-Pajot MT, Frere D, Foulon C, Bossu C, Dardennes R, Mounier C, Zizzari P, Lang F, Epelbaum J, Estour B (2003) Balance in ghrelin and leptin plasma levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J Clin Endocrinol Metab* 88:109–116.

Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407: 908-13.

Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman M (2001) Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes* 50: 70.

Twoogor S, Mantzoros C, Hankinson S (2007) Relationship of Plasma adiponectin with sex hormone and insulin-like growth factor levels. *Obesity* 15:2217-9.

Yamamoto Y, Hirose H, Saito I, Tomita M, Taniyama M, Matsubara K, et al. (2002) Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. *Clin Sci (Lond)* 103:137–42.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* ;7:941–6.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S,

Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423:762-769.

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

Yildiz BO, Suchard MA, Wong ML, McCann SM, Licinio J (2004) Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*.101:10434-9.

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

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

Viengchareun S, Zennaro MC, Pascual-Le Tallec L, Lombes M (2002) Brown adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin. *FEBS Lett* 532:345-350.

Villa P, Costantini B, Perri C, Suriano R, Ricciardi L, Lanzone A (2008) Estro-progestin supplementation enhances the growth hormone secretory responsiveness to ghrelin infusion in postmenopausal women. *Fertil Steril* 89: 398-3.

Wajn ranch MP, Ten IS, Gertner JM, Leibel RL (2000) Genomic organization of human ghrelin gene. *J of Med Gen* 1: 231–233.

Waren AM, Small CJ, Ward HL, et al (2000) The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141:4325–4328.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al. (2001) Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1930–5.

Williams MA, Qiu C, Mui-Rivera M, Vadachkoria S, Song T, Luthy DA. (2004) Plasma adiponectin concentrations in early pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:2306-11.

Winzer C, Wagner O, Festa A, Schneider B, Roden M, Bancher-Todesca D, Pacini G, Funahashi T, Kautzky-Willer A (2004) Plasma adiponectin, insulin

sensitivity, and subclinical inflammation in women with prior gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 27:1721 -7. .

Wren AM, Small CJ, Ward HL, et al. (2000) The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141: 4325-8.