



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Πιθανός μοριακός μηχανισμός της κυτταρικής μετανάστευσης στην
τροφοβλάστη

ΓΕΩΡΓΙΑ ΚΟΡΟΜΗΛΑ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2014

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

Επιβλέπουσα: Ασπασία Τσέζου, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής,
Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας



Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

Ασπασία Τσέζου: Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής, Τμήματος Ιατρικής,
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γεώργιος – Σπυρίδων Ανυφαντής: Κλινικός Εμβρυολόγος, Τμήματος Ιατρικής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κωνσταντίνος Νταφόπουλος: Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής και
Γυναικολογίας, Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ολοκλήρωση αυτής της διπλωματικής εργασίας υλοποιήθηκε με την υποστήριξη ενός αριθμού ανθρώπων στους οποίους θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου κ. Τσέζου Ασπασία για την πολύτιμη βοήθεια της καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στα μέλη του εργαστηρίου "Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής" και συγκεκριμένα στην διδακτορικό Παπαθανασίου Ιωάννα και στις υποψήφιες διδάκτορες Κωστοπούλου Φωτεινή και Μουρμούρα Ευανθία για τη στήριξη και τη σημαντική βοήθεια που μου παρείχαν καθ'όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης των πειραμάτων μου.

Επίσης, ευχαριστώ τον κ. Γκαρά Αντώνιο που μου παρείχε τα δείγματα από τις λήψεις των χοριακών λαχνών, για την πραγματοποίηση της έρευνας μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω του γονείς μου για την οικονομική και ηθική τους στήριξη.

Περιεχόμενα

Περίληψη	σελ 5 - 6
Εισαγωγή	σελ 7-44
• Κεφάλαιο 1: Η κυτταρική μετανάστευση στην τροφοβλάστη	
1.1) Πλακουντοποίηση	σελ 7-11
1.2) Η κυτταρική μετανάστευση και διήθηση στην τροφοβλάστη – Γενικά	σελ 11-13
1.3) Ο μηχανισμός της κυτταρικής μετανάστευσης στην τροφοβλάστη	σελ 13-16
• Κεφάλαιο 2: Αδιπονεκτίνη - Γενικά	
2.1) Αδιπονεκτίνη	σελ 17-18
2.2) Το γονίδιο της αδιπονεκτίνης	σελ 18-19
2.3) Η πρωτεΐνη αδιπονεκτίνη	σελ 19-22
2.4) Οι υποδοχείς της αδιπονεκτίνης	σελ 22-24
2.5) Η πλειοτροπική δράση της αδιπονεκτίνης	
2.5.1) Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης και το λιπιδίων.	σελ 24-26
2.5.2) Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στα καρδιαγγειακά νοσήματα	σελ 27-28
2.5.3) Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στον καρκίνο	σελ 29-30
• Κεφάλαιο 3: Αδιπονεκτίνη, Γυναικεία Γονιμότητα & Κύηση	
3.1) Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στον άξονα Υποθάλαμος – Υπόφυση – Ωοθήκες	σελ 31-34
3.1.1) Αδιπονεκτίνη και γυναικολογικές παθήσεις: εστίαση στο PCOS	σελ 35-36
3.2) Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στην ανάπτυξη του προεμφυτευτικού εμβρύου και στην εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο	σελ 37-40
3.3) Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στην πλακουντοποίηση	σελ 40-42
3.4) Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στην εγκυμοσύνη	σελ 42-44
Σκοπός	σελ 45
Υλικά και Μέθοδοι	σελ 46-55
Αποτελέσματα	σελ 56
Συζήτηση	σελ 57-59
Βιβλιογραφία	σελ 60-69

Περίληψη

Μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζώαριο στη λήκυθο του ωαγωγού, το γονιμοποιημένο ωοκύτταρο που καλείται πλέον ζυγώτης, αρχίζει μία σειρά μιτώσεων, διαιρώντας το ζυγώτη σε πολλά μικρότερα, θυγατρικά κύτταρα, τα βλαστομερίδια. Έως την 4^η ημέρα της ανάπτυξης, το έμβryo αποτελείται από 30 περίπου κύτταρα και είναι γνωστό ως μορίδιο. Τα κύτταρα του μοριδίου συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται αλλά ταυτόχρονα το μορίδιο αναπτύσσει μια κοιλότητα γεμάτη με υγρό και μεταμορφώνεται σε βλαστοκύστη. Η βλαστοκύστη, την 5^η μέρα εκκολάπτεται από τη διάφανη ζώνη και είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει άμεσα με το ενδομήτριο. Ωστόσο, η βλαστοκύστη, αποτελείται πλέον από την εμβρυοβλάστη, η οποία θα παράγει το μεγαλύτερο μέρος του καθαυτού εμβρύου, ενώ αντίθετα η τροφοβλάστη αποτελεί την κύρια πηγή των υμένων του πλακούντα.

Η τροφοβλάστη κατέχει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της εμφύτευσης και της πλακουντοποίησης. Κατά την εμφύτευση, τα τροφοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται μέσω δύο μονοπατιών, του λαχνωτού και του εξωλάχνιου. Το λαχνωτό μονοπάτι, θα συμβάλει στην ανάπτυξη της συγκυτιοτροφοβλάστης, η οποία με το τέλος της εμφύτευσης θα περιβάλλει πλήρως το έμβryo, ενώ ενεργή είναι και η συμμετοχής της στο σχηματισμό των λαχνών του πλακούντα.

Όσον αφορά το εξωλάχνιο μονοπάτι, οι διαφοροποιημένοι τροφοβλάστες που έχουν αποκτήσει διηθητικό φαινότυπο, θα μεταναστεύσουν μέχρι το ένα τρίτημόριο του μυομητρίου, ώστε να επιτευχθεί η εμφύτευση του πλακούντα, ενώ ένας άλλος υποπληθυσμός αυτών των κυττάρων θα μεταναστεύσουν και θα διηθήσουν τις μητρικές αρτηρίες στοχεύοντας στην αναδιαμόρφωση τους και στην εγκαθίδρυση της μητροπλακουντιακής κυκλοφορίας.

Η μετανάστευση και η συνακόλουθη διήθηση των τροφοβλαστικών κυττάρων στο ενδομήτριο και στα μητρικά αγγεία είναι δύο πολύπλοκες διαδικασίες που απαιτούν τόσο μοριακές όσο και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις, ενώ η σωστή ρύθμιση και διεκπεραίωση των παραπάνω κυτταρικών διαδικασιών διασφαλίζει τη σωστή ανάπτυξη του εμβρύου αλλά και εξασφαλίζει την φυσιολογική εξέλιξη της κύησης.

Οι έρευνες στα τροφοβλαστικά κύτταρα έχουν αποκαλύψει μία πληθώρα αυξητικών παραγόντων, κυτοκίνων και αγγειογενετικών μορίων που ρυθμίζουν τη μεταναστευτική ικανότητα αυτών των κυττάρων.

Έτσι σχετικά πρόσφατα, αποκαλύφθηκε η συμμετοχή μίας σημαντικής για τον οργανισμό ορμόνης, της αδιπονεκτίνης, στην επαγωγή της μετανάστευσης και της διήθησης των τροφοβλαστών.

Η αδιπονεκτίνη είναι μία ορμόνη που εκκρίνεται από τα λιποκύτταρα του λευκού λιπώδους ιστού σε υψηλές συγκεντρώσεις και θεωρείται " φύλακας – άγγελος " του οργανισμού μας εφόσον εμφανίζει αντιαθηροσκληρωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, ενώ σημαντικός είναι και ο ρόλος της στην ευαισθητοποίηση των ιστών στην ινσουλίνη. Πέρα από αυτά όμως, η αδιπονεκτίνη, φαίνεται να επηρεάζει και την αναπαραγωγική διαδικασία ποικιλοτρόπως, αφού μπορεί να δρα στον υποθάλαμο, στην υπόφυση, στην ωοθήκη, στο ενδομήτριο, στον πλακούντα, στο έμβρυο, και στη μητέρα.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συμμετοχή της αδιπονεκτίνης στο πιθανό μοριακό μηχανισμό της κυτταρικής μετανάστευσης στην τροφοβλάστη.

Γι' αυτό το σκοπό, χορηγήθηκε αδιπονεκτίνη σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων και ελέγχθηκε η έκφραση του NF- κ B και της ιντεγκρίνης $\alpha 5\beta 1$ αντίστοιχα. Τόσο ο NF- κ B, όσο και η ιντεγκρίνη $\alpha 5\beta 1$ ανιχνεύθηκαν στην τροφοβλάστη ενώ η έκφραση τους αυξήθηκε μετά από την επίδραση με την αδιπονεκτίνη. Η πρωτεϊνική έκφραση ήταν ακόμη μεγαλύτερη μετά από το χρονικό διάστημα των 48 ωρών.

Συμπεραίνουμε ότι ο πυρηνικός παράγοντας NF- κ B και η ιντεγκρίνη $\alpha 5\beta 1$ συμμετέχουν στον πιθανό μοριακό μηχανισμό της κυτταρικής μετανάστευσης στην τροφοβλάστη που επάγεται από την αδιπονεκτίνη.

Εισαγωγή

Κεφάλαιο 1: Η κυτταρική μετανάστευση στην τροφοβλάστη

1.1) Πλακουντοποίηση

Από το τέλος της 3^{ης} εβδομάδας, μέχρι και τη γέννηση, το έμβρυο δέχεται θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο για την ανάπτυξη του και αποβάλλει τα άχρηστα προϊόντα του μεταβολισμού του μέσω του πλακούντα, ενός οργάνου αποτελούμενου τόσο από το μητρικό όσο και το εμβρυϊκό στοιχείο.

Πέραν της ανταλλαγής των θρεπτικών συστατικών, ο πλακούντας εκκρίνει πλήθος ορμονών, στις οποίες περιλαμβάνονται τα φυλετικά στεροειδή, οιστρογόνα και προγεστερόνη, τα οποία συντηρούν την κύηση αποτρέποντας ταυτόχρονα το ενδεχόμενο της αυτόματης έκτρωσης ή του πρόωρου τοκετού. Ακόμη, τα αντισώματα της μητρικής κυκλοφορίας διασχίζουν τον πλακούντα και εισέρχονται στο έμβρυο, στο οποίο παρέχουν προφύλαξη έναντι των εμβρυϊκών και των νεογνικών λοιμώξεων. Ο ανθρώπινος πλακούντας είναι δισκοειδούς και αιμοχοριακού τύπου. Αποτελεί όργανο μείζονος σημασίας, αφού είναι βέβαιο ότι διαταραχές της ανάπτυξης και της λειτουργίας του οδηγούν σε προβλήματα στην ανάπτυξη του εμβρύου αλλά και μπορεί να επηρεάσουν την υγεία του και στην μετέπειτα ζωή του.

Η ανάπτυξη του πλακούντα καθορίζεται από ένα σύνολο πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται ανάμεσα στην υπό εμφύτευση βλαστοκύστη και στο ενδομήτριο. Με το τέλος 1^{ης} εβδομάδας της ανάπτυξης του εμβρύου και την περάτωση των αυλακώσεων, έχει σχηματιστεί η βλαστοκύστη, η οποία αποτελείται από την έσω κυτταρική μάζα ή εμβρυοβλάστη και την έξω κυτταρική μάζα ή τροφοβλάστη.

Για να πραγματοποιηθεί η εμφύτευση, το στρώμα του ενδομητρίου αλλάζει μορφολογία αμέσως μετά των ωοθυλακιορρηξία, κατά την ωχρινική φάση, με τα στρωματικά κύτταρα να αυξάνουν σε μέγεθος συσσωρεύοντας λιπίδια και γλυκογόνο και τότε αποκαλούνται φθαρτικά κύτταρα. Η συνεχής παραγωγή προγεστερόνης και οιστρογόνων, στην περίπτωση της εγκυμοσύνης, σηματοδοτεί τη μετατροπή ολοένα και περισσότερων στρωματικών κυττάρων προς φθαρτικά κύτταρα ενώ η εμφύτευση της βλαστοκύστης προκαλεί την πλήρη φθάρτωση του ενδομητρίου, που αποκαλείται πλέον φθαρτός. Οι αδένες του φθαρτού αποτελούν την αρχική πηγή των θρεπτικών

συστατικών για το έμβρυο έως ότου επιτευχθεί η μητροπλακουντιακή κυκλοφορία. Τα θρεπτικά συστατικά πριν την περάτωση της μητροπλακουντιακής κυκλοφορίας μεταφέρονται με απλή διάχυση στο έμβρυο.

Στην αρχή της 2^{ης} εβδομάδας της ανάπτυξης, η βλαστοκύστη προσκολλάται στο τοίχωμα της μήτρας, προκαλώντας το πολλαπλασιασμό της τροφοβλάστης του εμβρυϊκού πόλου. Μερικά από τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα της τροφοβλάστης χάνουν την κυτταρική τους μεμβράνη, συνενώνονται και σχηματίζουν ένα συγκύτιο (κυτταροπλασματική μάζα με πολυάριθμους πυρήνες), το οποίο αποκαλείται συγκυτιοτροφοβλάστη. Αντιθέτως, τα κύτταρα της τροφοβλάστης που σχηματίζουν το τοίχωμα της βλαστοκύστης διατηρούν την κυτταρική τους μεμβράνη και αποτελούν την κυτταροτροφοβλάστη.

Η συγκυτιοτροφοβλάστη αποτελεί το πρώτο στρώμα των διαφοροποιημένων κυττάρων που προκύπτουν από το τροφοεξώδερμα. Τα κύτταρα αυτά δεν έχουν ικανότητα πολλαπλασιασμού, παρά μόνο εκκριτική δράση, αφού εκκρίνουν χοριακή γοναδοτροπίνη για τη διατήρηση της κύησης καθώς και πρωτεολυτικά ένζυμα που προκαλούν την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων του ενδομητρίου. Ακόμη μέσω αυτής της στιβάδας μεταφέρονται τα θρεπτικά συστατικά από τη μητέρα στο έμβρυο στα αρχικά στάδια της κύησης ενώ επιπλέον η συγκυτιοτροφοβλάστη θα περιβάλλει τις λάχνες του πλακούντα κατά το σχηματισμό του.

Η κυτταροτροφοβλάστη αποτελείται από τροφοβλαστικά κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα του πολλαπλασιασμού αλλά και παράλληλα της διαφοροποίησης τους. Η διαφοροποίηση της κυτταροτροφοβλάστης ακολουθεί δύο μονοπάτια, το λαχνωτό και το εξωλάχνιο. Στο λαχνωτό μονοπάτι, κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης, αποκτούν την ιδιότητα της σύντηξης, συμβάλλοντας έτσι στον τελικό σχηματισμό της συγκυτιοτροφοβλάστης που περιβάλλει τις πλακουντιακές λάχνες. Αντίθετα, στο εξωλάχνιο μονοπάτι, τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται προς τα ενδιάμεσα τροφοβλαστικά κύτταρα με έντονη διηθητική ικανότητα, τα οποία διηθούν το φθαρτό ενώ ένας άλλος υποπληθυσμός των διηθητικών κυτταροτροφοβλαστών εισχωρούν στις μητρικές αρτηρίες και τις αναδιαμορφώνουν.

Μέχρι περίπου την 9^η μέρα της δεύτερης εβδομάδας, το έμβρυο ολοκληρώνει την εμφύτευσή του στο ενδομήτριο χάρις στην έντονη δραστηριότητα της διεισδυτικής συγκυτιοτροφοβλάστης (Εικόνα 1). Η συγκυτιοτροφοβλάστη εκκρίνει ένζυμα, όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες, οι οποίες με τη σειρά τους αποικοδομούν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα κύτταρα του ενδομητρίου. Στη

συνέχεια, από την επιφάνεια της συγκυτιοτροφοβλάστης εκβλαστάνουν αποφυάδες, οι οποίες διεισδύουν ανάμεσα στα διαχωριζόμενα κύτταρα του ενδομητρίου και έλκουν το έμβρυο προς το εσωτερικό. Η διαδικασία ολοκληρώνεται περίπου την 9^η ημέρα με τη συγκυτιοτροφοβλάστη να περιβάλλει το έμβρυο ενώ μέσα στη συγκυτιοτροφοβλάστη εμφανίζονται κενοτόπια, τα λεγόμενα τροφοβλαστικές κοιλότητες, οι οποίες τελικά θα γίνουν τα σημεία από τα οποία θα ρέει το μητρικό αίμα. Μία μικρή οπή στον αντεμβρυϊκό πόλο, υποδηλώνει το σημείο της εμφύτευσης, ενώ το σημείο καλύπτεται από το επιωματικό πήγμα.

Όσον αφορά το σχηματισμό των χοριακών λαχνών, την 10^η ημέρα, οι τροφοβλαστικές κοιλότητες επικαλύπτονται από τα μητρικά τριχοειδή, τα οποία μεταξύ των ημερών 11^η και 13^η διευρύνονται. Τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης πολλαπλασιαζόμενα τοπικώς, σχηματίζουν προεκβολές, διεισδύουν στην συγκυτιοτροφοβλάστη και εκβλαστάνουν στο αυλό των γεμάτων με αίμα κοιλοτήτων σχηματίζοντας τις πρωτογενείς λάχνες (Εικόνα 2). Την 16^η ημέρα, το εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα, πολλαπλασιαζόμενο εισχωρεί στο κέντρο κάθε πρωτογενούς λάχνης μετατρέποντάς την σε δευτερογενή λάχνη (Εικόνα 2). Η διαφοροποίηση των μεσεγγυματικών κύτταρων σε τριχοειδή αγγεία και κύτταρα του αίματος στις δευτερογενείς λάχνες, τις μετατρέπει σε τριτογενείς λάχνες (Εικόνα 2).

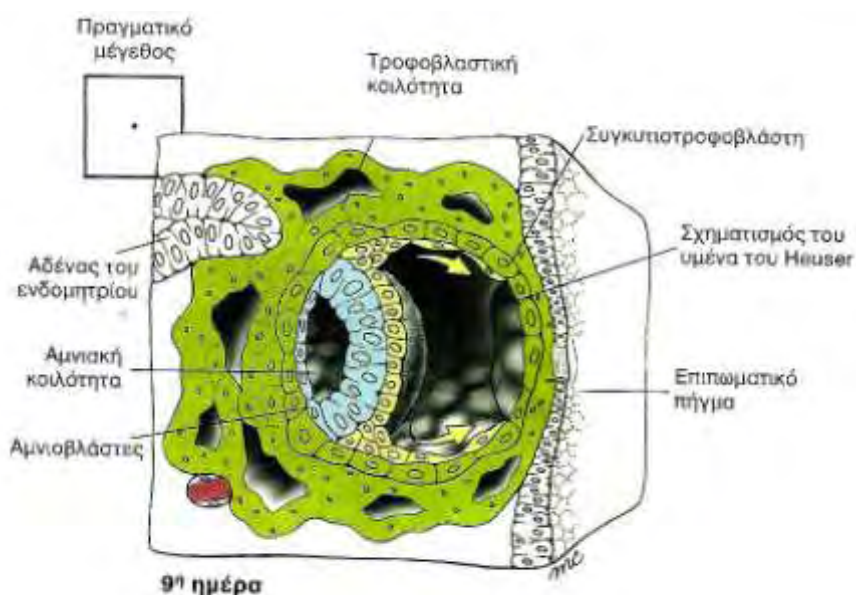
Με την αγγείωση των τριτογενών λαχνών, έχει εγκαθιδρυθεί αρχικά η μητροπλακουντιακή κυκλοφορία. Το οξυγόνο και τα θρεπτικά συστατικά της μητρικής κυκλοφορίας διοχετεύονται στο μεσολάχνιο χώρο, διαπερνούν το τοίχωμα των λαχνών και τροφοδοτούν το έμβρυο ενώ τα παραπροϊόντα του μεταβολισμού του εμβρύου διοχετεύονται προς τη μητρική κυκλοφορία. Ταυτόχρονα, οι κυτταροτροφοβλάστες έχουν ήδη αρχίσει να πολλαπλασιάζονται, σχηματίζοντας αρχικά τις τροφοβλαστικές κολώνες. Από εκεί ένας πληθυσμός κυττάρων αποκτά κινητικότητα, κινείται περιφερειακά και καλύπτει πλέον το στρώμα της συγκυτιοτροφοβλάστης, δημιουργώντας το κυτταροτροφοβλαστικό κέλυφος το οποίο εφάπτεται στο ενδομήτριο. Οι λάχνες που εφάπτονται στο κέλυφος, αποκαλούνται στελεχιαίες λάχνες. Τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα των στελεχιαίων λαχνών, είναι αυτά που θα διαφοροποιηθούν μέσω του έξω – λάχνιου μονοπατιού και θα διηθήσουν το ενδομήτριο καθώς και τα σπειροειδή αρτηριόλια.

Καθώς το έμβρυο αρχίζει να προβάλλει στον αυλό της μήτρας κατά τη διάρκεια του δεύτερου μήνα, οι λάχνες που καλύπτουν την προβάλλουσα αντεμβρυϊκή πλευρά εξαφανίζονται. Αυτή η περιοχή του χορίου αποκαλείται λείο χόριο, ενώ αντίστοιχα το

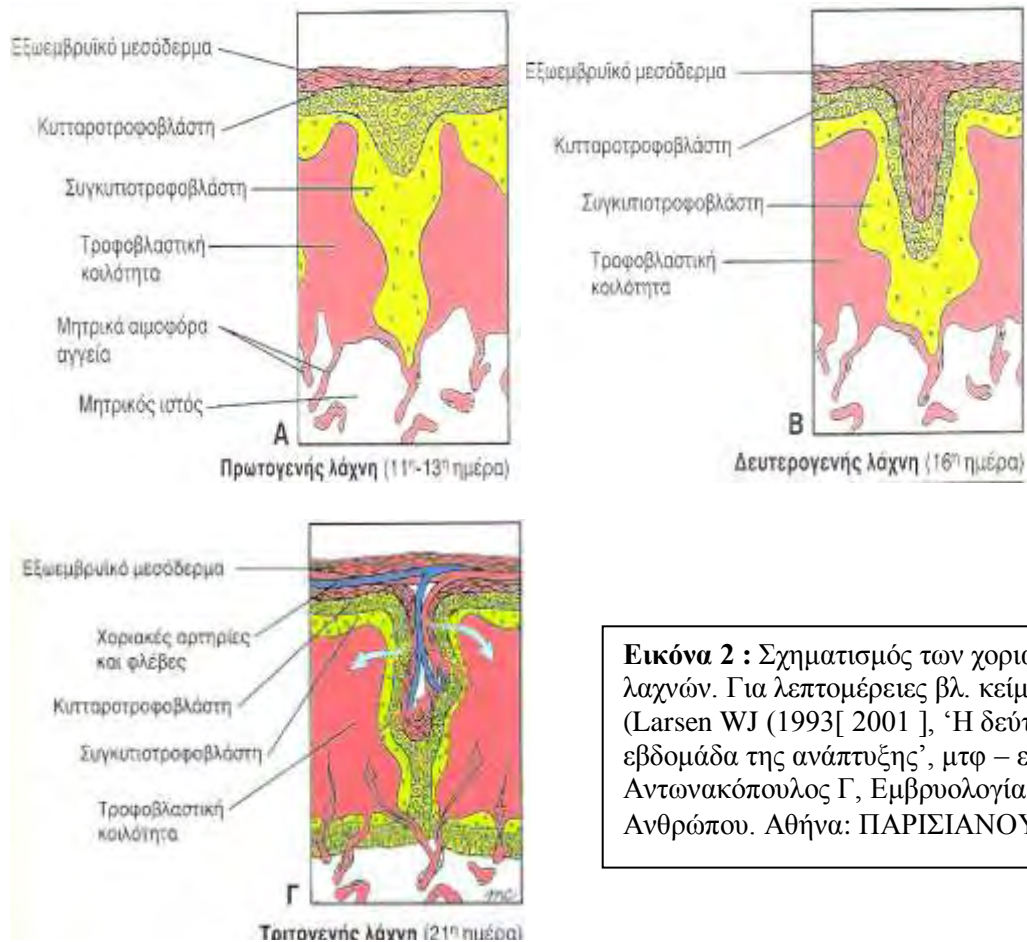
τμήμα του χορίου που συνδέεται με το βασικό φθαρτό διατηρεί τις λάχνες και αποκαλείται λαχνωτό χόριο.

Οι πλακουντιακές λάχνες υπόκεινται σε μία σειρά επιπλέον τροποποιήσεων όπως της επιμήκυνσης, καταλήγοντας στις μεσεγγυματικές λάχνες που είναι χαρακτηριστικό του πρώτου και δεύτερου τριμήνου της κύησης, ενώ η τελική διαφοροποίηση των πλακουντιακών λαχνών επέρχεται στο τρίτο τρίμηνο.

Τέλος, η μητρική επιφάνεια του πλακούντα φέρει τις λάχνες καθώς και μία στοιβάδα του βασικού φθαρτού ενώ η εμβρυϊκή πλευρά περιέχει τις στιβάδες του χόριου, οι οποίες σχηματίζουν το χοριακό πέταλο.



Εικόνα 1: Η εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο την 9^η ημέρα. Για λεπτομέρειες βλ. κείμενο. (Larsen WJ (1993[2001], ‘Η δεύτερη εβδομάδα της ανάπτυξης’, μτφ – επιμ. Αντωνακόπουλος Γ, Εμβρυολογία του Ανθρώπου. Αθήνα: ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ, σελ. 38.)



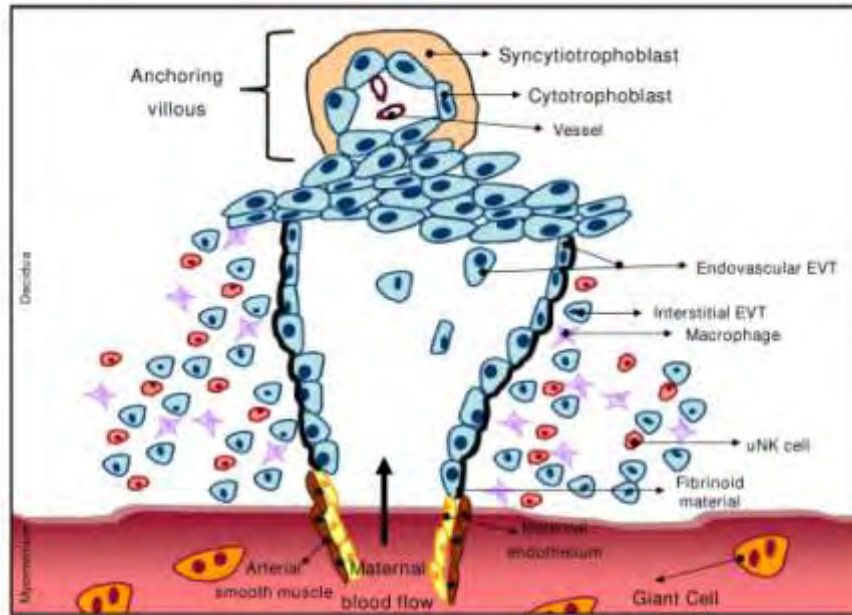
Εικόνα 2 : Σχηματισμός των χοριακών λαχνών. Για λεπτομέρειες βλ. κείμενο. (Larsen WJ (1993[2001], ‘Η δεύτερη εβδομάδα της ανάπτυξης’, μτφ – επιμ. Αντωνακόπουλος Γ, Εμβρυολογία του Ανθρώπου. Αθήνα: ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ, σελ. 43)

1.2) Η κυτταρική μετανάστευση και διήθηση στην τροφοβλάστη - Γενικά

Η επίτευξη της εγκυμοσύνης, απαιτεί εκτός από την εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο και τη σωστή εμφύτευση του πλακούντα. Η ανάπτυξη του πλακούντα, εξαρτάται από τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση και τη διήθηση των τροφοβλαστικών κυττάρων. Όπως προαναφέρθηκε, τα κύτταρα της τροφοβλάστης, διαφοροποιούνται μέσω δύο ξεχωριστών μονοπατιών, του λαχνωτού και του εξωλάχιου. Όσον αφορά το λαχνωτό μονοπάτι, τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης συνενώνονται, σχηματίζοντας την συγκυτιοτροφοβλάστη, η οποία μετέπειτα θα περιβάλλει τις λάχνες του πλακούντα (Carson et al., 2000). Αντίθετα στο εξωλάχιου μονοπάτι, μετά το σχηματισμό των διηθητικών, κυτταροτροβλαστικών κολωνών, τα κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης διαφοροποιούνται, αποκτώντας αρχικά την μεταναστευτική ικανότητα, ώστε να σχηματίσουν περιφερειακά το κυτταροτροφοβλαστικό κέλυφος ενώ ένας άλλος

υποπληθυσμός αυτών των κυττάρων αποκτά την ικανότητα της μετανάστευσης και της διήθησης κατά μήκος του φθαρτού και του εσωτερικού τριτημόριου του μυομητρίου. Αυτοί οι διαφοροποιημένοι κυτταροτροφοβλάστες είναι γνωστοί ως EVT's (extravillous trophoblasts). Τα EVT's διαφοροποιούνται εκ νέου στους ενδοαγγειακούς τροφοβλάστες και στους ενδιάμεσους. Οι ενδοαγγειακοί τροφοβλάστες αντικαθιστούν πλήρως το ενδοθήλιο των μητρικών αγγείων με μαλακό ινώδη ιστό (Εικόνα 3). Με τον τρόπο αυτό καταργείται το φυσιολογικό μυοελαστικό αρτηριακό τοίχωμα του αγγείου που φυσιολογικά αποκρίνεται σε εντολές του αυτονόμου νευρικού συστήματος. Διευρύνεται ο αρτηριακός αυλός σε πολύ μεγάλο βαθμό και έτσι εξασφαλίζονται χώροι πολύ χαμηλής αιματικής αντίστασης και συνεπώς ιδιαίτερα υψηλής ροής, μη ανταποκρινόμενοι σε αγγειοσυσπαστικές νευρικές εντολές. Οι ενδιάμεσοι τροφοβλάστες εισέρχονται στο φθαρτό, το διηθούν και μεταναστεύουν μέχρι το στρώμα του μυομητρίου (Brosens et al., 2002) ενώ παράλληλα αντικαθιστούν μερικώς το μυϊκό τοίχωμα των μητρικών αγγείων (Εικόνα 3). Όταν τα κύτταρα της ενδιάμεσης τροφοβλάστης ολοκληρώσουν το διηθητικό τους ταξίδι στο μυομήτριο στη θέση της εμφύτευσης, οι κυτταροτροφοβλάστες συγχωνεύονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας τα πολυπύρηννα τροφοβλαστικά γιγαντοκύτταρα, τα οποία χάνουν πλέον την ικανότητα της διήθησης.

Η μετανάστευση και η διείσδυση των EVT's, είναι δύο διαδικασίες υψίστης σημασίας για την δημιουργία του πλακούντα και την εγκαθίδρυση της μητροπλακουντιακής κυκλοφορίας. Η ατελής τροφοβλαστική διείσδυση των μητρικών αρτηριών, οδηγεί σε χαμηλά ποσοστά επίτευξης εγκυμοσύνης κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση και φαίνεται να συμμετέχει στην εμφάνιση επιπλοκών κατά την κύηση, όπως αυτή τις προεκλαμψίας και της ενδομήτριας καθυστέρησης ανάπτυξης του εμβρύου (Norwitz et al., 2001; Anin et al., 2004; Kadyrov et al., 2006). Αντίθετα, η εκτενής διήθηση των τροφοβλαστικών κυττάρων, μπορεί να οδηγήσει τόσο στην ανάπτυξη χοριοκαρκινώματος, όσο και στη δημιουργία ανώμαλων μορφών του πλακούντα όπως ο στιφρός (placenta accreta) και ο διεισδυτικός πλακούντας (placenta percreta) (Lala et al., 2002).



Εικόνα 3: Τροποποίηση της μητρικής σπειροειδούς αρτηρίας από την ταυτόχρονη δράση των ενδιάμεσων (interstitial EVT) και των ενδο –αγγειακών (endovascular EVT) κυτταροτροφοβλαστών (Lunghi et al., 2007)

1.3) Ο μηχανισμός της κυτταρικής μετανάστευσης στην τροφοβλάστη

Αν και ο πλακούντας αποτελεί ένα φυσιολογικό και απαραίτητο ιστό για την ανάπτυξη του εμβρύου, τα κύτταρα που τον δομούν, οι τροφοβλάστες, φέρουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τα καρκινικά κύτταρα. Η έντονη πολλαπλασιαστική τους ικανότητα, οι μεταναστευτικές και οι διηθητικές τους ιδιότητες, καθώς και η ικανότητα να ξεφεύγουν από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ειδικά κατά το πρώτο τρίμηνο της κύησης, οδήγησε τους επιστήμονες να χαρακτηρίσουν τα τροφοβλαστικά κύτταρα ως ψευδο – κακοήγη, εφόσον κατέχουν την ιδιότητα της “φυσιολογικής μετάστασης” (Strickland and Richards, 1992; Genbacev et al., 1997; Redman, 1997; Even-Ram et al., 1998; Mullen, 1998). Εν τούτοις, σε αντίθεση με τα καρκινικά κύτταρα, η μετανάστευση και η διήθηση των τροφοβλαστικών κυττάρων είναι αυστηρά, χωροχρονικά ρυθμιζόμενη (Bischof et al. 2000).

Η διήθηση των τροφοβλαστικών κυττάρων τόσο στο φθαρτό όσο και στον αυλό των μητρικών αγγείων προϋποθέτει την απόκτηση της μεταναστευτικής ικανότητας και κίνησης από τα συγκεκριμένα κύτταρα. Η μετανάστευση και η συνακόλουθη διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων στο ενδομήτριο είναι δύο πολύπλοκες

διαδικασίες που απαιτούν τόσο μοριακές όσο και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις. Οι μοριακοί παράγοντες περιλαμβάνουν τα μόρια της κυτταρικής προσκόλλησης, της πρωτεΐνης της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και τις μεταλλοπρωτεΐνες. Οι κυτταρικοί παράγοντες που συμμετέχουν εν μέρει στον έλεγχο των τροφοβλαστικών κυττάρων, είναι στα στρωματικά κύτταρα, τα λευκοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονιάδες.

Τα τροφοβλαστικά κύτταρα των κυτταροτροφοβλαστικών κολωνών, χάνουν την πολλαπλασιαστική τους ιδιότητα και μεταπίπτουν σε ένα διηθητικό φαινότυπο έχοντας πρώτα αποκτήσει την ικανότητα της μετανάστευσης. Η πραγματοποίηση αυτών των διαδικασιών απαιτεί την αλλαγή στην έκφραση των ιντεγκρινών, την υποέκφραση της E – καδερίνης καθώς και τη δράση των μεταλλοπρωτεϊνών.

Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερείς, διαμεμβρανικοί υποδοχείς, οι οποίοι προσδέονται πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Έχουν ανιχνευθεί 19 α υπομονάδες και 8 β που σχηματίζουν 24 ετεροδιμερείς υποδοχείς (Giancotti et al., 1999; Humphries et al., 2000). Κάθε υπομονάδα είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, με μικρή κυτταροπλασματική περιοχή. Η ικανότητά τους να συνδέονται με πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής ύλης (κολλαγόνο, λαμινίνες, βιτρονεκτίνη, φμπρονεκτίνη) συνεπάγεται τη μεταγωγή σημάτων στο εσωτερικό του κυττάρου (outside-in signaling). Τα σήματα αυτά ρυθμίζουν την ενεργότητα διαφόρων κυτταροπλασματικών κινασών καθώς και υποδοχέων αυξητικών παραγόντων επηρεάζοντας δραστηριότητες όπως η οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, η επιβίωση, η μετανάστευση, η κυτταροφαγία και η διαφοροποίηση (Howe et al., 1998; Giancotti et al., 1999).

Τα τροφοβλαστικά κύτταρα εκφράζουν τις ιντεγκρίνες, οι οποίες εμφανίζουν ποικίλη πρόσδεση στις πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας (Εικόνα 4). Οι τροφοβλάστες των κυτταροτροφοβλαστικών κολωνών, οι οποίοι εντοπίζονται στις στελεχιαίες λάχνες εκφράζουν την ιντεγκρίνη $\alpha\beta 4$ LM που προσδέει τη λαμινίνη. Ωστόσο, όταν τα τροφοβλαστικά κύτταρα αποκτήσουν το διεισδυτικό φαινότυπο, η ιντεγκρίνη $\alpha\beta 4$ L υποεκφράζεται, ενώ παρατηρείται υπερέκφραση των ιντεγκρινών $\alpha 5\beta 1$ FN (ιντεγκρίνη που προσδέει φμπρονεκτίνη) και $\alpha 1\beta 1$ LM/collagen (ιντεγκρίνη που προσδέει λαμινίνη ή κολλαγόνο) (Damsky et al. 1994).

Η προσκόλληση των διαφορετικών προσδετών στους υποδοχείς φαίνεται να επάγει τη μετακίνηση, ενεργοποιώντας το μετασχηματισμό των ακίνητων τροφοβλαστών προς τους κινητούς τροφοβλάστες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως

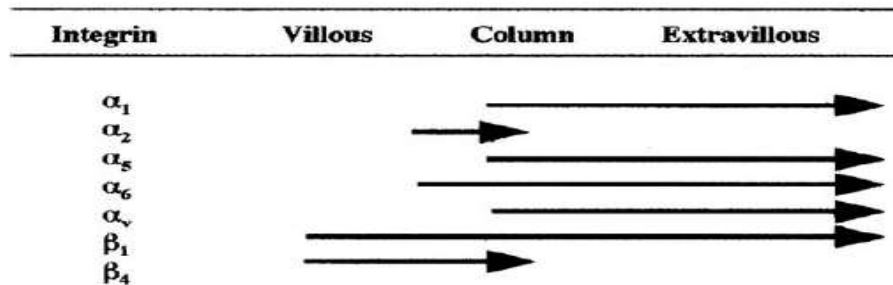
αυτός ο μετασχηματισμός δεν συμβαίνει όταν η μετανάστευση των τροφοβλαστών είναι ανεπαρκής, όπως συμβαίνει στην παθολογική κατάσταση της προεκλαμψίας (Zhou et al., 1993).

Οι ιντεγκρίνες αποτελούν την αφετηρία για πολύ σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Αρχικά οι ιντεγκρίνες αναγνωρίζουν το τριπεπτίδιο RGD στα μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας σαν αποτέλεσμα να επάγεται η ενεργοποίηση των πρώτων και να ακολουθείται η συσσώρευσή τους στα σημεία εστιακής προσκόλλησης. Τα σημεία εστιακής προσκόλλησης, είναι δομές μέσω των οποίων οι ιντεγκρίνες συνδέουν το εξωκυττάριο περιβάλλον με τα ενδοκυτταρικά κυτταροσκελετικά σύμπλοκα. Καθώς οι ιντεγκρίνες στερούνται εγγενούς ενζυματικής δραστηριότητας, επάγουν τη ρύθμιση της οργάνωσης της ακτίνης και τη μεταγωγή σήματος, μέσω της στρατολόγησης διαφόρων κινασών, μορίων σηματοδότησης και κυτοσκελετικών πρωτεϊνών στο κυτταροπλασματικό τους άκρο. Από τα πρώτα μόρια που στρατολογούνται ως απόκριση στην ενεργοποίηση και στη συγκέντρωση των ιντεγκρινών στα σημεία της εστιακής προσκόλλησης είναι η FAK κίνηση της τυροσίνης (Focal Adhesion Kinase). Αυτή η ενεργή κίνηση φέρει ειδικές θέσεις για την αλληλεπίδρασή της με την ταλίνη, την παξιλίνη καθώς και με τις πρωτεΐνες της οικογένειας των Src κινασών (Schlaepfer and Mitra, 2004). Η αυτοφωσφορυλίωση της FAK στο αμινοξικό κατάλοιπο Tyr -397 επάγει την πρόσδεση της Src στη FAK και οι δύο μέσω ειδικών φωσφορυλίωσεων και των μικρών GTPασών, Ras και Rho προκαλούν αλλαγές στο κύτταρο που ενέχονται στην κυτταρική μετανάστευση των τροφοβλαστών (Knofler M, 2010). Η σηματοδότηση μέσω των ιντεγκρινών και της FAK οδηγεί στον πολυμερισμό των ινιδίων της ακτίνης στο κυτταροπλασματικό άκρο των κυττάρων καθώς και τη δημιουργία των νηματίων πίεσης, υποβοηθώντας έτσι τα κύτταρα να αποκτήσουν συσταλτικότητα και να κινηθούν.

Εκτός από την αλλαγή στην έκφραση των ιντεγκρινών, παρατηρούμε και αλλαγή στην έκφραση των E – καδερινών. Συγκεκριμένα, όταν οι κυτταροτροφοβλάστες αποκτήσουν την ικανότητα να μετακινούνται, η E- καδερίνη παύει σταδιακά να εκφράζεται (Irish et al., 2006), το κύτταρο χάνει την επαφή του με τα γειτονικά κύτταρα και είναι ικανό να μετακινηθεί.

Για να επαχθεί ωστόσο η σωστή μετανάστευση και διήθηση, τόσο στο μητρικό φθαρτό όσο και στις μητρικές αρτηρίες είναι απαραίτητο να συμβεί η “ επιλεκτική ” αποικοδόμηση της θεμέλιας ουσίας. Τα EVTs τροφοβλαστικά κύτταρα, είναι εφοδιασμένα με συστήματα πρωτεασών που αποικοδομούν την εξωκυττάρια θεμέλια

ουσία, με στόχο να προωθήσουν την κυτταρική μετανάστευση ενώ αντίθετα το φθαρτό εκκρίνει ανασταλτικούς παράγοντες που ελέγχουν την διεισδυτικότητα. Τα μεταναστευτικά κύτταρα εκφράζουν τις μεταλλοπρωτεΐνες MMP 2 και MMP9, τις καθεψίνες και τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (Bischof *et al.*, 2000; Lala and Chakraborty, 2003; Varanou *et al.*, 2006). Τα φθαρτικά κύτταρα από την άλλη εκφράζουν τους αναστολείς των μεταλλοπρωτεΐνσεων, TIMP1 και TIMP2 καθώς και τον αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, PAI (Lala and Graham, 1990; Schatz and Lockwood, 1993). Η τοπική ισορροπία μεταξύ των πρωτεασών και των αναστολέων τους, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σημείο της διείσδυσης.



Εικόνα 4: Η έκφραση των υπομονάδων των ιντεγκρινών στους διαφορετικούς υποπληθυσμούς των τροφοβλαστικών κυττάρων (Burrows *et al.*, 1996)

Κεφάλαιο 2: Αδιπονεκτίνη - Γενικά

2.1) Αδιπονεκτίνη

Τα τελευταία χρόνια, πολλές ερευνητικές ομάδες ανά τον κόσμο, έχουν εστιάσει την προσοχή τους σε μία ενδιαφέρουσα κυτοκίνη, της οποίας ο ρόλος είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με την εμφάνιση της παχυσαρκίας και των συνοδών της νοσημάτων : αντίσταση στην ινσουλίνη, σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, υψηλές συγκεντρώσεις χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων, αθηροσκλήρωση, μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος, καρκίνος . Η κυτοκίνη είναι η επονομαζόμενη αδιπονεκτίνη, η οποία εκκρίνεται σε υψηλές ποσότητες από τα λιποκύτταρα του λευκού λιπώδους ιστού. Ο κύριος ρόλος της αφορά τη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης και τον καταβολισμό των λιπαρών οξέων. Τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης στο αίμα σχετίζονται αρνητικά με το ποσοστό σωματικού λίπους στα ενήλικα άτομα.

Η αδιπονεκτίνη έχει χαρακτηριστεί ως ο "φύλακας άγγελος" του οργανισμού μας , έναντι της ανάπτυξης της παχυσαρκίας και των μεταβολικών νοσημάτων.

Η αδιπονεκτίνη ανακαλύφθηκε σχεδόν ταυτόχρονα από τέσσερις, διαφορετικές επιστημονικές ομάδες. Το 1995, οι Scherer et al. απομόνωσαν από κυτταρική σειρά λιποκυττάρων ποντικού (3T3 – L1), μία εκκριτική πρωτεΐνη 30kDa, η οποία παρουσίαζε δομική ομολογία με τον παράγοντα C1q του συμπληρώματος και την ονόμασαν Acrp30 (adipose - complement - related protein of 30kDa). Παράλληλα, μία άλλη ερευνητική ομάδα, οι Hu et al. (1996) χρησιμοποιώντας την λιποκυτταρική σειρά 3TE-F442A, απομόνωσαν την ίδια πρωτεΐνη και την χαρακτήρισαν ως AdipoQ. Οι ονομασίες Acrp30 και AdipoQ χρησιμοποιούνται σήμερα όταν αναφερόμαστε στην πρωτεΐνη που εκφράζεται αποκλειστικά στον ποντικό (Chandran et al., 2003).

Όσον αφορά τη μελέτη της ανθρώπινης προελεύσεως αδιπονεκτίνης, μία ομάδα Ιαπώνων ερευνητών, κατάφεραν να απομονώσουν από cDNA βιβλιοθήκη λιπώδους ιστού, το γονίδιο που εκφράζονταν σε υψηλές ποσότητες στο συγκεκριμένο ιστό και το ονόμασαν ApM1 (adipose most abundant gene transcript 1) (Maeda et al., 1996). Οι Nakato et al. (1996) απομόνωσαν επίσης τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη , χρησιμοποιώντας υψηλής συγγένειας χρωματογραφία, και την ονόμασαν ως GBP – 28 (gelatin – binding protein of 28kDa). Οι ερευνητές υπέθεσαν ότι το συγκεκριμένο γονιδιακό προϊόν ανήκει στις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας που

συντίθενται από τον λιπώδη ιστό και έτσι το 1999, οι Arita et al, ονόμασαν την πρωτεΐνη ως αδιπονεκτίνη. Αν και οι ονομασίες Acrp30, AdipoQ, ApM1, GBP – 28 χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιβλιογραφία, η ονομασία που επικρατεί για την προαναφερθείσα κυτοκίνη, είναι η λεγόμενη αδιπονεκτίνη.

2.2) Το γονίδιο της αδιπονεκτίνης

Για να κατανοήσουμε το ρόλο μια πρωτεΐνης, είναι σημαντικό, αρχικά, να έχουμε αποκτήσει γνώσεις για τη δομή, την έκφραση και τους διαφορετικούς πολυμορφισμούς του γονιδίου, που μπορεί να επηρεάσουν την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης.

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά του ανθρώπινου γονιδίου της αδιπονεκτίνης, είναι η γενετική του θέση. Το ανθρώπινο γονίδιο της αδιπονεκτίνης, ADIPOQ, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3, στο γενετικό τόπο 3q27 και καταλαμβάνει μία περιοχή 17 kb. Ο συγκεκριμένος γονιδιακός τόπος έχει χαρακτηριστεί ως περιοχή με αυξημένη ευαισθησία για την ανάπτυξη σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και καρδιαγγειακών παθήσεων, δύο παθήσεις οι οποίες σχετίζονται με το βιολογικό ρόλο της αδιπονεκτίνης (Vionnet et al., 2000).

Ανάλυση της γονιδιακής δομής, που πραγματοποιήθηκε από τους Takahashi et al. (2000) έδειξε ότι το γονίδιο της αδιπονεκτίνης αποτελείται από τρία εξόνια και δύο εσώνια. Η μεταγραφή του ADIPOQ ενεργοποιείται από μία ποικιλία μεταγραφικών παραγόντων, ενώ η μετά - μεταφραστική τροποποίηση της παραγόμενης πρωτεΐνης αποτελεί υψίστης σημασίας διαδικασία για τη λειτουργικότητα της. Οι παράγοντες PPAR γ , C-EBP, SREBP/E47 προσδένονται ο καθένας σε διαφορετικές θέσεις στον υποκινητή του γονιδίου της αδιπονεκτίνης διεγείροντας τη μεταγραφή του (Fajas et al., 1998; Osborne, 2000; Motoshima et al., 2002; Yilmaz et al., 2004). Σε αρκετές όμως περιπτώσεις, όπως σε παχύσαρκα άτομα και σε άτομα που πάσχουν από το μεταβολικό σύνδρομο, η μεταγραφή του γονιδίου καταστέλλεται από την υπερέκφραση των TNF - α , IL- 6, IL- 18 (Shehzad et al., 2012). Αυτές οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες ενεργοποιούν πολύπλοκα σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως αυτά των JNK, ERK1/2 που στοχεύουν στην καταστολή της έκφρασης της ADIPOQ (Shehzad et al., 2012).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει δοθεί στην ταυτοποίηση των διαφορετικών πολυμορφισμών του γονιδίου. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι οι πολυμορφισμοί

στο ADIPOQ γονίδιο σχετίζονται με αλλαγές στην λειτουργικότητα της πρωτεΐνης και κατά συνέπεια με την εμφάνιση ασθενειών. Μέχρι σήμερα, αρκετοί πολυμορφισμοί έχουν ταυτοποιηθεί για το γονίδιο της αδιπονεκτίνης. Εν τούτοις, μόνο ένας μικρός αριθμός αυτών έχει κλινική σημασία και αποτελούν αντικείμενο μελέτης. Οι πιο σημαντικοί μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί SNPs είναι οι εξής : +45T>G (rs2241766) στο εξώνιο 2, +276G>T (rs1501299) στο ιντρόνιο 2, και οι -11377C>G (rs266729) , -11391G>A (rs17300539) στον υποκινητή του γονιδίου (Gable et al., 2006). Στην μετά - ανάλυση που πραγματοποιήθηκε από τους Han et al. (2011) φάνηκε να υπάρχει υψηλή συσχέτιση του μονονουκλεοτιδικού πολυμορφισμού -11377C>G (rs266729) με την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Η μεταλλαγή εντοπίζεται στον υποκινητή του γονιδίου και αποτελεί αιτία για τη μείωση των επιπέδων της αδιπονεκτίνης. Όπως προαναφέρθηκε, μειωμένα επίπεδα αδιπονεκτίνης χαρακτηρίζουν μεταβολικές νόσους που προκύπτουν από την παχυσαρκία όπως αυτή του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Η ταυτοποίηση των πολυμορφισμών στον γενικό πληθυσμό, θα δώσει την ευκαιρία να κατανοηθεί εκτενέστερα ο μηχανισμός δράσης της αδιπονεκτίνης αλλά παράλληλα θα αποτελέσει τη βάση για τη δημιουργία φαρμακευτικών αναλόγων για την θεραπεία των μεταβολικών νοσημάτων

2.3) Η πρωτεΐνη αδιπονεκτίνη

Η αδιπονεκτίνη είναι μία πρωτεΐνη που εκφράζεται κυρίως στο λευκό λιπώδη ιστό. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η αδιπονεκτίνη εκφράζεται σε σκελετικά μυϊκά κύτταρα, σε μυοκαρδιακά καθώς και σε ενδοθηλιακά. Η πεπτιδική αλυσίδα της πρωτεΐνης αποτελείται από 244 αμινοξέα και έχει μέγεθος 30kDa. Στο αμινό-τελικό άκρο υπάρχει μία μικρή αλληλουχία 17 αμινοξέων, η οποία σηματοδοτεί την έκκριση της ορμόνης στον εξωκυττάριο χώρο, ακολουθεί μία βραχεία υπερ-μεταβλητή περιοχή και μία περιοχή που αμινοξικά ομοιάζει με κολλαγόνο VIII και X Το καρβοξυλικό άκρο της περιλαμβάνει μία σφαιρική περιοχή που είναι ομόλογη με το κλάσμα του συμπληρώματος C1q (Εικόνα 5). Η τριτοταγής δομή της αδιπονεκτίνης (C-τελική σφαιρική περιοχή) παρουσιάζει συν τοις άλλοις ομολογία με την οικογένεια των κυτταροκινών και συγκεκριμένα με τον παράγοντα νέκρωσης όγκων TNF-α.

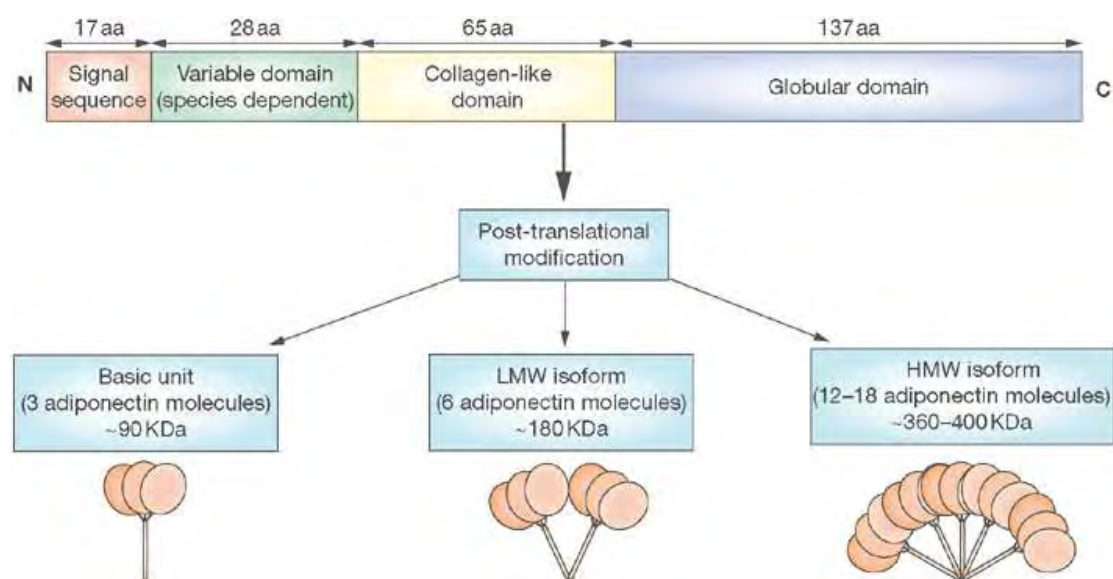
Η μονομερής μορφή της αδιπονεκτίνης (30kDa) συναντάται μόνο στα αδιποκύτταρα ενώ δεν έχει ανιχνευθεί με αυτή τη μορφή στην κυκλοφορία. Απαντά τόσο σε μορφή πλήρους μήκους (full length) αλλά και ως κλάσμα πρωτεολυτικής διάσπασης που

αποτελείται από τη σφαιρική καρβοξυτελική περιοχή και είναι γνωστή ως σφαιρική αδιπονεκτίνη (globular). Η λιποκίνη σε μορφή πλήρους μήκους συναντάται ως τριμερές, χαμηλού μοριακού βάρους αδιπονεκτίνη (LMW – 90 kDa), ως εξαμερές αποτελούμενο από δύο τριμερή συνδεδεμένα με δισουλφιδικό δεσμό, μεσαίου μοριακού βάρους αδιπονεκτίνη (MMW – 180kDa) και ως 12- έως 18 - μέρες υψηλού μοριακού βάρους αδιπονεκτίνη (HMW – 360 kDa). Όσον αφορά τη σφαιρική αδιπονεκτίνη, δεν έχει εντοπίζεται στην κυκλοφορία και πιθανολογείται ότι η πρωτεολυτική διάσπαση πραγματοποιείται τοπικά σε συγκεκριμένους ιστούς ή σε σημεία φλεγμονής (Fruebis et al., 2001; Waki et al., 2005). Η μετά - μεταφραστική τροποποίηση που υφίσταται η μονομερής αδιπονεκτίνη διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη λειτουργικότητα της (Εικόνα 6). Το αρχικό στάδιο της μετά - μεταφραστικής τροποποίησης, είναι ο πολυμερισμός της αδιπονεκτίνης όπου οι σφαιρικές περιοχές της κάθε μονομερούς αδιπονεκτίνης συνδέονται προς το σχηματισμό των τριμερών (Waki et al., 2003). Ακολούθως, τα τριμερή συνδεόμενα με ένα δισουλφιδικό δεσμό στη θέση Cys 39 (ποντικό) ή Cys 36 (άνθρωπο), σχηματίζουν την εξαμερή μορφή (Tsao et al., 2003). Ο δισουλφιδικός δεσμός αποτελεί κριτικό σημείο για τον πολυμερισμό της αδιπονεκτίνης και σχηματίζεται με τη βοήθεια της DsbA-L (oxidoreductase- like protein). Επιπροσθέτως, για τη δημιουργία της HMW αδιπονεκτίνης, είναι απαραίτητη η υδροξυλίωση και η γλυκοζυλίωση τεσσάρων συντηρημένων καταλοίπων λυσίνης (lys68, lys71, lys80, lys 104) (Wang et al., 2002). Οι LMW, MMW και HMW μετά τη μετα - μεταφραστική τους τροποποίηση στον ενδοπλασματικό δίκτυο, εκκρίνονται προς την κυκλοφορία.

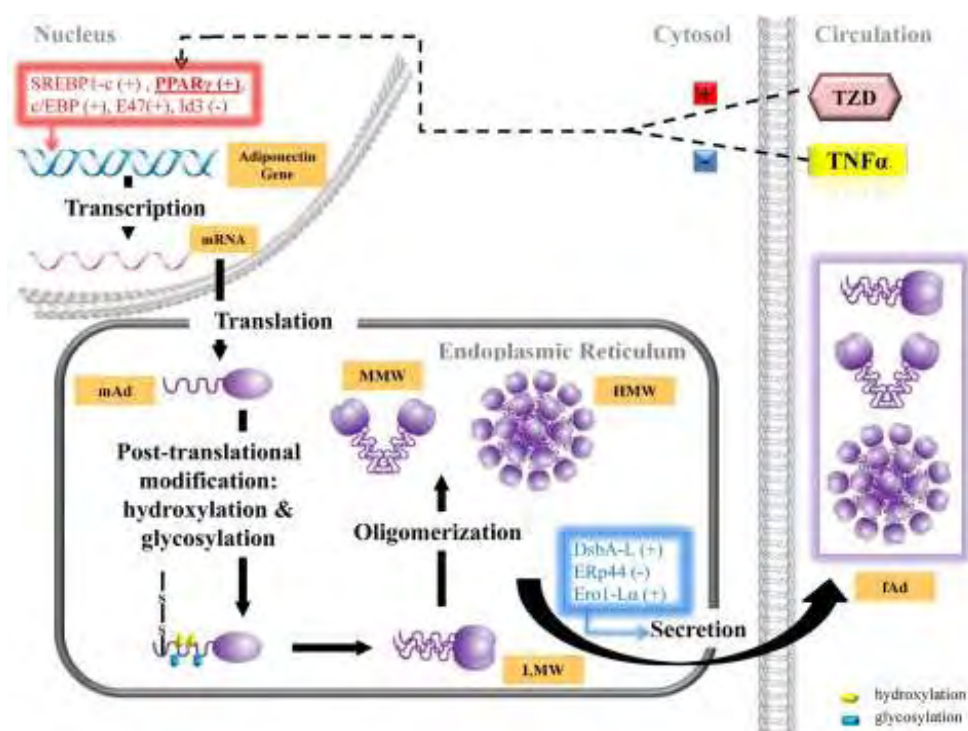
Στον ορό, η αδιπονεκτίνη υψηλού μοριακού βάρους επικρατεί ενώ ακολουθεί η μεσαίου μοριακού βάρους, με τα επίπεδα της, να είναι 20% - 50% χαμηλότερα από την πρώτη, ενώ η αδιπονεκτίνη χαμηλού μοριακού βάρους ανιχνεύεται σε μικρές συγκεντρώσεις (Schober et al., 2007; Baessle et al., 2011). Τα oligομερή σύμπλοκα της αδιπονεκτίνης κυκλοφορούν στο αίμα και έχουν εν μέρει αποκλίνουσες βιολογικές δραστηριότητες.

Η συγκέντρωση της αδιπονεκτίνης στο πλάσμα, κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 5μg/ml-30μg/ml ξεπερνώντας τα επίπεδα άλλων γνωστών ορμονών και κυτοκινών, ενώ στο σύνολο η αδιπονεκτίνη αγγίζει το ποσοστό του 0.01% του συνόλου των πρωτεϊνών του πλάσματος (Gil-Campos et al., 2004). Η αδιπονεκτίνη ως πρωτεΐνη είναι πολύ σταθερή αλλά έχει εξαιρετικά μικρό χρόνο ημίσειας ζωής ~ 45-75 min, ο οποίος εξαρτάται από τη μορφή του συμπλόκου της αδιπονεκτίνης (Halberg et al.,

2009). Παράδοξο φαινόμενο αποτελεί το γεγονός ότι ενώ η αδιπονεκτίνη εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό, η συγκέντρωσή της μειώνεται, όταν υπάρχει κυρίως κεντρική τύπου παχυσαρκία (Ariga et al., 1999; Turer et al., 2011). Επιπλέον σημαντικό θα ήταν να αναφερθεί ότι οι γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες έχουν υψηλότερα επίπεδα αδιπονεκτίνης στο πλάσμα (Chandran et al., 2003). Αυτό το εύρημα χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, δεδομένου ότι οι γυναίκες έχουν υψηλότερα ποσοστά σωματικού λίπους και όπως αναφέρθηκε πρωτίστως τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης μειώνονται όσο αυξάνεται το σωματικό λίπος. Συνδυάζοντας τα δύο τελευταία δεδομένα, η αδιπονεκτίνη του πλάσματος φαίνεται να επηρεάζεται από την κατανομή του σωματικού λίπους (Staiger et al., 2003), η οποία με τη σειρά της επηρεάζεται από τις ορμόνες του φύλου. Τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης στους άνδρες είναι χαμηλότερα λόγω της ανασταλτικής επίδρασης που ασκούν τα ανδρογόνα στην παραγωγή της αδιπονεκτίνης (Nishizawa et al., 2002; Combs et al., 2003). Ακόμη έχει δειχθεί ότι τα υψηλά επίπεδα ανδρογόνων αποτελούν αιτία για την ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης, στεφανιαίας νόσου και υπέρτασης (Liu et al., 2003; Song et al., 2004). Η ανασταλτική επίδραση των ανδρογόνων στην έκκριση της αδιπονεκτίνης δίνει μία πιθανή εξήγηση για τα υψηλότερα ποσοστά εμφάνισης σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 καθώς και αθηροσκλήρωσης στον ανδρικό πληθυσμό.



Εικόνα 5 : Η δομή της αδιπονεκτίνης (Goldstein et al., 2009)



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση της μεταγραφής, της μετάφρασης, της μετά - μεταφραστικής τροποποίησης, του πολυμερισμού και της έκκρισης της αδιπονεκτίνης (Dadson et al., 2011).

2.4) Οι υποδοχείς της αδιπονεκτίνης

Η δράση της αδιπονεκτίνης επιτυγχάνεται αρχικά μέσω πρόσδεσής της σε διαμεμβρανικούς υποδοχείς των κυττάρων και στη συνέχεια μέσω ενεργοποίησης πολύπλοκων σηματοδοτικών μονοπατιών που προάγουν συγκεκριμένες κυτταρικές αποκρίσεις.

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί 3 υποδοχείς της αδιπονεκτίνης, οι AdipoR1, AdipoR2 και ο T – Cadherin. Ωστόσο ανάμεσα στους 3 υποδοχείς υπάρχει διαφορά τόσο στη δομή και στην ιστοειδική τους έκφραση όσο και στην ικανότητα τους να προσδέουν διαφορετικές μορφές της αδιπονεκτίνης (globular, LMW, MMW, HMW αδιπονεκτίνη). Τα γονίδια του ADIPOR1 και ADIPOR2 στον άνθρωπο, εδράζονται στα χρωμοσώματα 1p36.13–q41 και 12p13.31 αντίστοιχα. Οι υποδοχείς AdipoR1 και AdipoR2 ανήκουν στην εντεκά – μελή οικογένεια των PAQR (progestin and adipoQ receptors) υποδοχέων (Michalakis et al., 2010). Έχουν σχετικά υψηλή

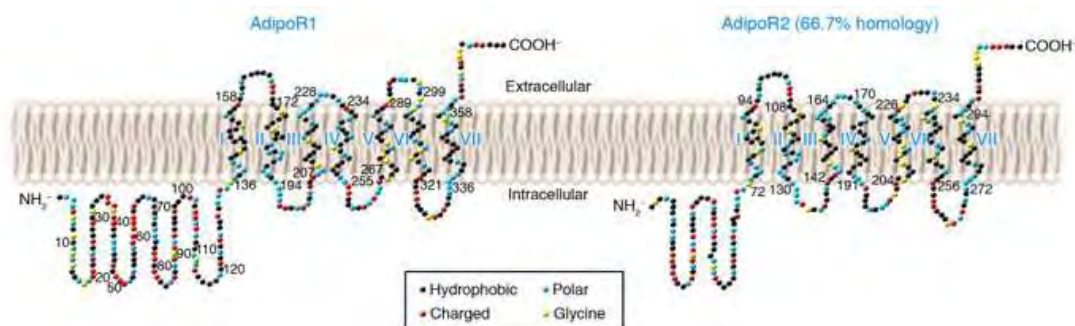
ομολογία ως προς την αμινοξική τους αλληλουχία σε ποσοστό 67% ενώ η δομή τους είναι συντηρημένη από τους μύκητες έως και τον άνθρωπο (Yamauchi et al., 2003). Οι AdipoR1 και AdipoR2 φέρουν 7 διαμεμβρανικά τμήματα, που θυμίζουν στη δομή, τους υποδοχείς που είναι συζευγμένοι με τις G πρωτεΐνες (Εικόνα 7). Παρόλα αυτά, οι δυο κατηγορίες των υποδοχέων έχουν μία σημαντική διαφορά, καθώς οι πρώτοι (AdipoR1 και AdipoR2) φέρουν το αμινοτελικό τους άκρο στο κυτταροπλασματικό χώρο και το καρβοξυτελικό τους άκρο στον εξωκυττάριο χώρο (το αντίθετο συμβαίνει με τους υποδοχείς που είναι συζευγμένοι με τις G πρωτεΐνες) (Ledoux et al., 2006)

Αν και η αδιπονεκτίνη εκφράζεται και παράγεται κυρίως από τον λιπώδη ιστό, οι υποδοχείς της αδιπονεκτίνης αντιθέτως εμφανίζουν μία ευρεία έκφραση σε διάφορους ιστούς του ανθρώπινου σώματος, συμπεριλαμβανομένου και τις δομές του κεντρικού νευρικού συστήματος (Yamauchi et al., 2003).

Ο AdipoR1 υποδοχέας εκφράζεται ιδιοστατικά αλλά η αυξημένη παρουσία του εντοπίζεται στα κύτταρα του σκελετικού μύος προσδένοντας κυρίως την σφαιρική αδιπονεκτίνη (Yamauchi et al., 2003). Αντίθετα, ο AdipoR2, είναι ευρέως κατανεμημένος σε ηπατικά κύτταρα και εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης για την αδιπονεκτίνη πλήρους μήκους σε σχέση με την σφαιρική αδιπονεκτίνη (Yamauchi et al., 2008).

Πρόσφατα έχει ταυτοποιηθεί ένας ακόμη υποδοχέας για την αδιπονεκτίνη, η T – cadherin. Η T– cadherin είναι μία μορφή υποδοχέα η οποία συνδέεται ειδικά με τη MMW και τη HMW αδιπονεκτίνη (Hug et al., 2004). Σε αντίθεση με τους AdipoR1 και AdipoR2 υποδοχείς, η T – cadherin εκφράζεται ευρέως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα κύτταρα των λείων μυϊκών ινών και η πρόσδεση της πρωτεΐνης στον υποδοχέα ενεργοποιεί το μονοπάτι του NF – κB. Ωστόσο ο υποδοχέας από μόνος του δεν μπορεί να ενεργοποιήσει ενδοκυττάρια σήματα διότι στερείται ενδοκυττάριας περιοχής. Ο ακριβής ρόλος της T – cadherin δεν είναι γνωστός αν και πιστεύεται ότι μπορεί να δρα ως συνυποδοχέας για τη δράση της αδιπονεκτίνης (Hug et al., 2004). Η σύνδεση της αδιπονεκτίνης με τους υποδοχείς της, ενεργοποιεί διάφορα ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια ως απόκριση σε ποίκιλλα κυτταρικά ερεθίσματα. Μερικά από τα γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται είναι αυτά των κινασών: AMPK, PI3K, P38/P42/P44 - MAPK, JUN (Yamauchi T et al., 2003; Luo et al., 2005; Miyazaki et al., 2005).

Τέλος η ταυτοποίηση των υποδοχέων καθώς και η κλωνοποίηση αυτών έδωσε την ευκαιρία να κατανοηθούν οι δράσεις της αδιπονεκτίνης τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.



Εικόνα 7: Δομή των υποδοχέων αδιπονεκτίνης. Οι AdipoR1 και AdipoR2 (66.7% ομοιότητα στα αμινοξέα με τον AdipoR1) υποδοχείς περιέχουν 7 διαμεμβρανικές περιοχές αλλά είναι δομικά διαφορετικοί από τους υποδοχείς που δεσμεύουν G πρωτείνες (Kadowaki et al.,2006).

2.5) Η πλειοτροπική δράση της αδιπονεκτίνης

Η ύπαρξη των υποδοχέων AdipoR1 και AdipoR2, σε πολλά όργανα και ιστούς του ανθρώπινου σώματος, υποδεικνύει ότι η αδιπονεκτίνη εμφανίζει πλειοτροπική δράση, συμμετέχοντας σε αρκετές φυσιολογικές λειτουργίες. Ο κύριος ρόλος της αφορά τη ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων. Επιπρόσθετα, από τις πλέον γνωστές της λειτουργίες, είναι η αντι – διαβητική της δράση αφού έχει την ικανότητα να ευαισθητοποιεί τους ιστούς στην ινσουλίνη. Ακόμη, είναι γνωστή για την αντι -φλεγμονώδη δράσης της, καθώς και για τον προστατευτικό της ρόλο έναντι της ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης. Νεότερα δεδομένα δίνουν έμφαση και στην αντικαρκινική της ιδιότητα. Ευεργετική τέλος θεωρείται η αδιπονεκτίνη στη σωστή λειτουργία του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, στην εμφύτευση του εμβρύου καθώς και στην σωστή ανάπτυξη του πλακούντα.

2.5.1) Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης και το λιποειδών.

Πλέον είναι ευρέως γνωστό ότι η αδιπονεκτίνη κατέχει το ρόλο του “ευαισθητοποιητή της ινσουλίνης” και συμμετέχει άμεσα στο μεταβολισμό των

υδατανθράκων και των λιπιδίων ,τόσο στον σκελετικό μυ όσο και στο ήπαρ, αποτρέποντας έτσι την ανάπτυξη μεταβολικών νοσημάτων (Εικόνα 8).

Όσον αφορά τον ανθρώπινο σκελετικό μύ, η πρόσδεση της σφαιρικής αδιπονεκτίνης στον AdipoR1,σηματοδοτεί κυτταρικά μονοπάτια με στόχο την αυξημένη πρόσληψη της γλυκόζης από το μυϊκό κύτταρο, την αύξηση της β – οξειδωσης των λιπαρών οξέων, με ταυτόχρονη μείωση των ενδομυϊκών τριγλυκεριδίων.

Όταν τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης είναι φυσιολογικά και επέρχεται η σωστή πρόσδεσή της στον υποδοχέα, παρατηρείται έκφραση και ενεργοποίηση του πυρηνικού υποδοχέα PPARα (peroxisome – proliferator – activated receptor a) (Yamauchi et al., 2003). Ο PPARα με τη σειρά του, προσδέεται σε ρυθμιστικές περιοχές στους υποκινητές (PPRE peroxisome – proliferator – response elements) συγκεκριμένων γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, όπως το FAT/CD 36 (fatty acid translocase), το ACO (acyl – Coa oxidase) και το UCP2(mitochondrial uncoupling protein 2) (Tugwood et al., 1992).

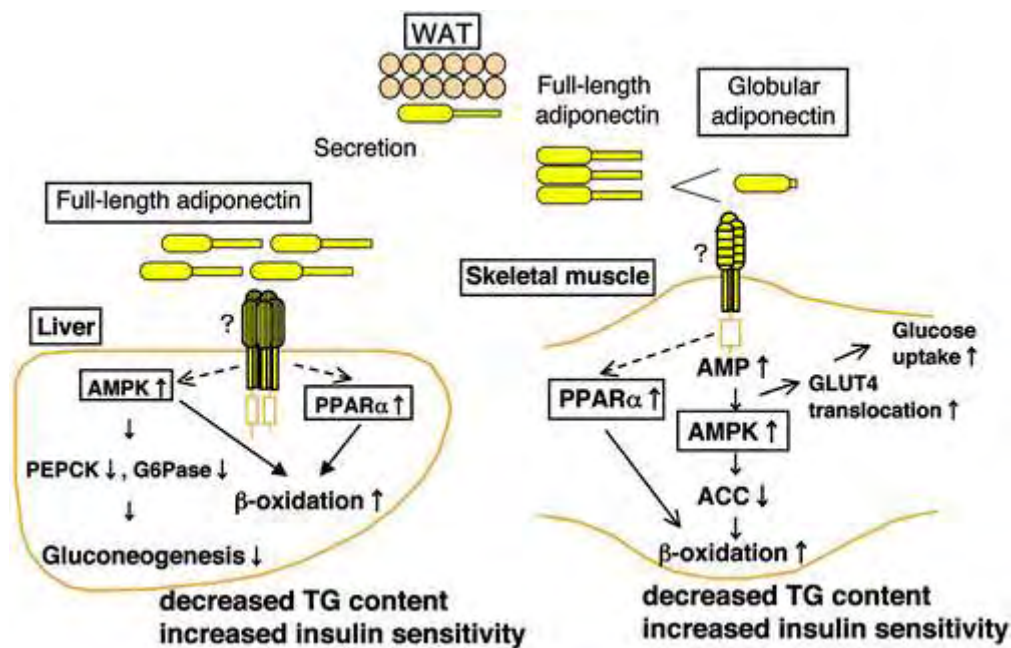
Επιπρόσθετα , κατά την διέγερση των μυών, υπάρχει κατανάλωση του ATP ενώ το AMP αντίστοιχα αυξάνεται. Η αύξηση της αναλογίας AMP/ATP ενεργοποιεί την AMPK (AMP- activated protein kinase) κινάση ενώ η αλληλεπίδραση αδιπονεκτίνης – υποδοχέα, προκαλεί την υπερφωσφορυλίωση της (Yamauchi et al., 2003; Tomas et al., 2002). Η ενεργοποίηση της AMPK κινάσης, είναι απαραίτητη τόσο για την οξείδωση των λιπαρών οξέων όσο και την πρόσληψη της γλυκόζης από το μυϊκό κύτταρο (Kahn et al., 2005). Στο μονοπάτι της AMPK, η κινάση αναστέλλει την ACC(acetyl-CoA carboxylase)μέσω φωσφορυλίωσης, σαν συνέπεια τη μείωση των επιπέδων του αναστολέα Malonyl-CoA(Kahn et al., 2005) . Η μείωση του Malonyl-CoA οδηγεί στη απελευθέρωση της τρανσφεράσης CPT-1(carnitine palmitoyl transferase 1), η οποία είναι πλέον ικανή να οδηγήσει τα λιπαρά οξέα στη θέση οξείδωσης τους, στα μιτοχόνδρια (Roepstorff et al., 2005). Οι παραπάνω διαδικασίες συντελούν στη μείωση των αποθηκευμένων τριγλυκεριδίων στο σκελετικό μυ. Τέλος η αδιπονεκτίνη μέσω της AMPK, προκαλεί τη μετακίνηση των GLUT4 (glucose transporter 4) υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη ώστε να προσλάβουν την γλυκόζη και να την μεταφέρουν στο εσωτερικό του κύτταρο (Ceddia et al., 2005).

Αν και οι σκελετικοί μύες κατέχουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης και στην οξείδωση των λιπαρών οξέων, το μεταβολικό κέντρο του οργανισμού μας είναι ως επί το πλείστον το ήπαρ. Στο ήπαρ, η πλήρης μήκους αδιπονεκτίνη με ικανότητα πρόσδεσης στον AdipoR2, σηματοδοτεί τόσο το μονοπάτι

των PPARα όσο και το μονοπάτι της AMPK. Ο PPARα όπως και στον σκελετικό μυ, ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων για την οξείδωση των λιπαρών οξέων στο συκώτι σαν απόρροια τη μείωση των αποθηκευμένων τριγλυκεριδίων σε αυτό. Σε περιπτώσεις περίσσειας γλυκόζης, είναι απαραίτητο να ανασταλεί η γλυκονεογένεση το ήπαρ. Η αναστολή της γλυκονεογένεσης σηματοδοτείται από την AMPK, η οποία καταστέλλει την έκφραση των PEPCK(phosphoenolpyruvate carboxykinase) και G6Pase (glucose – 6 – phospatase) γονιδίων (Yamauchi T et al., 2003).

Ο σωστός μεταβολισμός της γλυκόζης καθώς και των λιπιδίων, συνδέονται άμεσα την αύξηση της ευαισθησίας των ιστών στην ινσουλίνη , η οποία με τη σειρά της ασκεί θετική επίδραση στη σωστή λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού.

Τέλος, φαίνεται ότι η αδιπονεκτίνη δρα μέσω της ενεργοποίησης της AMPK και σε άλλα κύτταρα στόχους, όπως ο λιπώδης ιστός, όπου αναστέλλει τη σύνθεση των λιπαρών οξέων και τη λιπόλυση, η καρδιά όπου διεγείρει τη σύνθεση και την οξείδωση των λιπαρών οξέων καθώς και τη γλυκόλυση, τα β κύτταρα του παγκρέατος όπου διεγείρει την έκκριση της ινσουλίνης.



Εικόνα 8: Δράσεις της αδιπονεκτίνης στο ήπαρ και στο σκελετικό μυ - Για λεπτομέρειες βλ. κείμενο. (Kadowaki et al., 2005).

2.5.2) Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στα καρδιαγγειακά νοσήματα

Μετά από κρυσταλλογραφική ανάλυση της αδιπονεκτίνης φάνηκε ότι η εν λόγω πρωτεΐνη παρουσιάζει δομική ομολογία με το κολλαγόνο τύπου VIII και IX, με το παράγοντα C1q του συμπληρώματος καθώς και με την οικογένεια των TNF πρωτεϊνών, γεγονός που ώθησε τις ερευνητικές ομάδες να υποθέσουν για πρώτη φορά ότι η αδιπονεκτίνη έχει αντι – φλεγμονώδη και αντι – αθηροσκληρωτική δράση (Maeda et al. 1996; Shapiro and Scherer 1998). Έτσι, ενώ άλλες γνωστές κυτοκίνες όπως η λεπτίνη, ο TNF-a και η IL-6 διεγείρουν τη φλεγμονή στον ανθρώπινο σώμα, η αδιπονεκτίνη αντίθετα χαρακτηρίζεται από αντι – φλεγμονώδη δράση όπως έχει αποδειχθεί in vivo σε καλλιέργειες μακροφάγων (Ouchi et al. 2003; Berg and Scherer 2005).

Η φλεγμονή, είναι σημαντικός παράγοντας για την έναρξη και την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης (Ross, 1999). Η δημιουργία αθηρωματικών πλακών απαιτεί αρκετά στάδια και φαίνεται πως η αδιπονεκτίνη δρα στο κάθε ένα από αυτά αποτρέποντας την επερχόμενη καρδιαγγειακή νόσο.

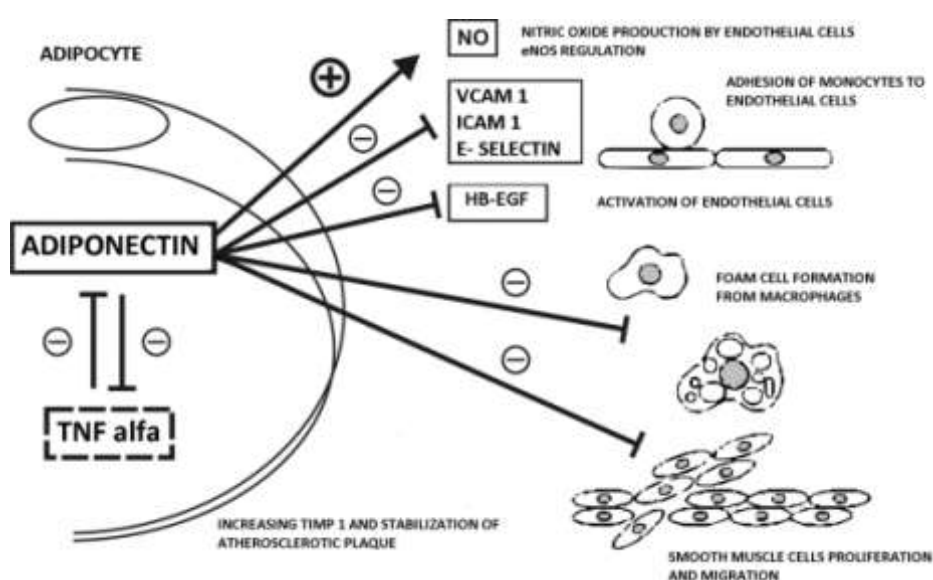
Η πρώτη επιβλαβής διαταραχή που προηγείται της δημιουργίας των αθηρωματικών πλακών, είναι η βλάβη του ενδοθηλίου, η οποία σηματοδοτείται από διάφορα φλεγμονώδη σήματα, συμπεριλαμβανομένου του TNF - a (Guzel S and Yalcin A, 2012). Αυξημένα επίπεδα αδιπονεκτίνης, μπλοκάρουν τη φλεγμονώδη δράση του TNF- a.

Η αρχική ενδοθηλιακή βλάβη έχει ως αποτέλεσμα την προσέλκυση λευκών αιμοσφαιρίων. Αυτά προσδένονται σε ειδικά προσκολλητικά μόρια, όπως είναι τα VCAM-1, τα ICAM-1 και οι σελεκτίνες P και E (Libby., 2002). Έχει φανεί ότι η αδιπονεκτίνη δρα στα ενδοθηλιακά κύτταρα, και μέσω του ενδοκυττάριου μονοπατιού της AMPK και της PI -3K, διεγείρει την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO) (Chen et al., 2003) ενώ παράλληλα μειώνει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης (VCAM-1, ICAM-1, σελεκτίνες P και E) μέσω αναστολής του πυρηνικού παράγοντα NF –kB (Ouchi et al., 1999) (Εικόνα 9).

Μειωμένα επίπεδα αδιπονεκτίνης οδηγούν στην εγκατάσταση των μονοπύρηνων στο ενδοθήλιο με επακόλουθη συνέπεια τη μετατροπή τους σε μακροφάγα κύτταρα και την ενεργοποίηση ειδικών υποδοχέων, που συνδέονται με τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες. Η τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών συνίσταται σε οξείδωση ή σπανιότερα σε γλυκοζυλίωσή τους. Αυτές ενώνονται με τα μακροφάγα κύτταρα, τα

οποία στη συνέχεια μετατρέπονται στα θεμελιώδη κύτταρα της αθηρωματικής πλάκας, τα αφρώδη κύτταρα. Σε αυτό το στάδιο, μπορεί ακόμη να δράσει ευεργετικά η αδιπονεκτίνη εφόσον αναστέλλει την έκφραση του εκκαθαριστή υποδοχέα της τάξης A1 (scavenger receptor class A1) στα μακροφάγα, ο οποίος δεσμεύει την οξειδωμένη LDL, αναστέλλοντας έτσι το σχηματισμό των αφρώδων κυττάρων (Ouchi et al., 2003) (Εικόνα 9). Τα κύτταρα αυτά, αφενός μεν αποτελούν προϊόν φλεγμονωδών διαδικασιών, αφετέρου δε εκκρίνουν τα ίδια προφλεγμονώδεις ουσίες, όπως κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες, δημιουργώντας ένα φαύλο κύκλο εξελισσόμενης φλεγμονής. Η φλεγμονή εξελίσσεται καθώς οι IL-1 και TNFα προάγουν την περαιτέρω έκκριση IL-6 από άλλα κύτταρα του αγγείου, όπως τα λεία μυϊκά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα λεία μυϊκά κύτταρα μεταναστεύουν από το μέσο χιτώνα στον έσω χιτώνα του εξελισσόμενου αθηρώματος δημιουργώντας αθηρωματικές πλάκες στο αθηρωματικό τοίχωμα. Ωστόσο και εδώ δρα ευεργετικά η αδιπονεκτίνη εφόσον αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων (Arita et al., 2002) (Εικόνα 9).

Τέλος είναι γνωστό ότι η αδιπονεκτίνη συμβάλλει στη σωστή καρδιαγγειακή λειτουργία, μέσω του ρόλου της στην προαγωγή της ινσουλινοευαισθησίας και την προστασία της έναντι της ανάπτυξης του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.



Εικόνα 9: Η προστατευτική δράση της αδιπονεκτίνης, στην έναρξη και την πρόοδο της αθηροσκλήρωσης μέσω των αντι - φλεγμονωδών και των αντι - αθηρογόνων δράσεων της (Novotný et al., 2012).

2.5.3) Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στον καρκίνο

Το αυξημένο σωματικό βάρος, έχει συσχετισθεί όχι μόνο με την ανάπτυξη σακχαρώδους διαβήτη και καρδιαγγειακών παθήσεων αλλά και με την ανάπτυξη διαφόρων μορφών καρκίνου.

Τα τελευταία χρόνια πολλές ερευνητικές ομάδες εστίασαν το ενδιαφέρον τους στη μελέτη του ρόλου της αδιπονεκτίνης στην καρκινογένεση, καθώς παρατήρησαν ότι τα μειωμένα επίπεδα αδιπονεκτίνης στην κυκλοφορία αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης κακοηθειών όπως αυτών του : καρκίνου του ενδομητρίου, καρκίνου του μαστού σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, καρκίνου του εντέρου, καρκίνου των νεφρών, καρκίνου του προστάτη και κακοήθειες του αίματος. Αντίθετα αυξημένα επίπεδα αδιπονεκτίνης, φαίνεται να έχουν αντι – καρκινική δράση.

Πληθώρα επιστημονικών ευρημάτων, υποδεικνύουν ότι η αδιπονεκτίνη έχει αντικαρκινικό ρόλο, δρώντας κυρίως μέσω δύο μηχανισμών. Πρώτον, η αδιπονεκτίνη προσδεμένη στους υποδοχείς της ενεργοποιεί ενδοκυτταρικά, σηματοδοτικά μονοπάτια που στοχεύουν είτε στην αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, είτε στην απόπτωση των καρκινικών κυττάρων. Δεύτερον, η αδιπονεκτίνη μπορεί να δράσει έμμεσα , ευαισθητοποιώντας τους ιστούς – στόχους ως προς την ινσουλίνη, ρυθμίζοντας φλεγμονώδεις αποκρίσεις ή επηρεάζοντας την αγγειογένεση του καρκινικού ιστού (Dalamaga et al., 2012).

Οι φυσιολογικές αποκρίσεις των κυττάρων στην αδιπονεκτίνη μετά την πρόσδεση της στους υποδοχείς των κύτταρων ενεργοποιεί ενδοκυτταρικά μονοπάτια όπως αυτά των : AMPK, mTOR, PI3K/Akt, MAPK, JAK/ STAT3, NF-κB (Dalamaga et al., 2012). Ωστόσο τα συγκεκριμένα μονοπάτια συνδέονται και με την αντικαρκινική δράση της αδιπονεκτίνης.

Η αδιπονεκτίνη μπορεί μέσω μοριακών μονοπατιών, να επάγει την έκφραση γονιδίων που οδηγούν στην αναστολή του κυτταρικού κύκλου ή στην απόπτωση. Ένας ακόμη τρόπος δράσης της, είναι να καταστείλει τη σηματοδότηση μονοπατιών που οδηγούν στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική επιβίωση μπλοκάροντας τους μεταγωγείς σήματος. Εν τούτοις, νέα επιστημονικά ευρήματα , προκάλεσαν έκπληξη καθώς διαπίστωσαν πως η αδιπονεκτίνη διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό σε καρκινικά κύτταρα μαστικού αδένου ποντικού. Συγκεκριμένα, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η σύνδεση της αδιπονεκτίνης με τους AdipoR1/R2 αυξάνει την ενζυμική ενεργότητα της κεραμιδάσης, η οποία με τη σειρά

τη καταβολίζει το κεραμίδιο προς τη σφιγγοσίνη καθώς και προς τη φωσφατάση της σφιγγοσίνης 1 (S1P) (Hebbard et al., 2008; Landskroner-Eiger et al., 2009; Holland et al., 2011). Υψηλά επίπεδα S1P, έχουν συσχετισθεί με αυξημένη κυτταρική επιβίωση και υψηλή προ – αγγειογενετική ενεργότητα όπως παρατηρήθηκε σε ποντίκια μοντέλα με καρκίνο του μαστικού αδένου στα οποία χορηγήθηκε αδιπονεκτίνη (Denzel et al., 2009; Landskroner-Eiger et al., 2009; Holland et al., 2011).

Ακόμη η ενεργοποίηση της PKA (cAMP/protein kinase A) (Li et al., 2011) , η καταστολή της β – κατενίνης (Wang et al., 2006; Liu et al., 2008), όπως και η μείωση των αντιδραστικών ενώσεων του οξυγόνου (Goldstein et al., 2004), εμπλέκονται στην απόκριση των καρκινικών κυττάρων στην αδιπονεκτίνη.

Επιπλέον, η αντικαρκινική δράση της αδιπονεκτίνης φανερώνεται από την ικανότητα της να ευαισθητοποιεί τους ιστούς ως προς ινσουλίνη, από τον αντιφλεγμονώδη ρόλο της καθώς και από την ικανότητα της να αναστέλλει την αγγειογένεση. Η αντίσταση στην ινσουλίνη καθώς και η υπερινσουλιναίμια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου, ειδικά όταν αυτές οι καταστάσεις σχετίζονται με την παχυσαρκία (van Kruijsdijk et al., 2009). Υψηλά επίπεδα ινσουλίνης αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητα του IGF – I, διεγείροντας την έκφραση του, ενώ ταυτόχρονα απορρυθμίζεται η έκφραση των IGFBP - 1 και IGFBP – 2. Η ινσουλίνη και ο IGF – 1 προσδενόμενοι στους υποδοχείς τους, IR και IGF – IR αντίστοιχα, αναστέλλουν την απόπτωση και προωθούν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Dalamataga et al., 2012), δύο μηχανισμοί που χαρακτηρίζουν την καρκινογένεση. Τα επίπεδα της κυκλοφορούντος αδιπονεκτίνης είναι αντιστρόφως ανάλογα με τα επίπεδα της ινσουλίνης (Hotta et al., 2000), ενώ η συγκέντρωση της πρώτης μειώνεται σε περιπτώσεις παχυσαρκίας και ινσουλινοαντίστασης (Arita et al., 1999; Weyer et al., 2001). Παρόλα αυτά, οι μηχανισμοί με τους οποίους η αδιπονεκτίνη ευαισθητοποιεί την ινσουλίνη, δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί.

Η ικανότητα της αδιπονεκτίνης να ευαισθητοποιεί την ινσουλίνη, συνεργατικά με την αντιπολλαπλασιαστική της ιδιότητα καθιστούν τη συγκεκριμένη αδιποκίνη , ένα πολύ σημαντικό προγνωστικό και διαγνωστικό δείκτη όσο και ένα πιθανό θεραπευτικό “εργαλείο” για τη θεραπεία κακοηθειών. Τέλος, απαιτείται εντατική, ερευνητική μελέτη ώστε να αποσαφηνιστούν οι μηχανισμοί με τους οποίους η αδιπονεκτίνη ασκεί τον προστατευτικό της ρόλο έναντι της καρκινογένεσης.

Κεφάλαιο 3: Αδιπονεκτίνη, Γυναικεία Γονιμότητα & Κύηση

3.1) Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στον άξονα Υποθάλαμος – Υπόφυση – Ωοθήκες

Η αδιπονεκτίνη της κυκλοφορίας, μπορεί να διαπεράσει τον αιματό – εγκεφαλικό φραγμό ως LMW (τριμερή και εξαμερή) και όχι ως HMW (Escobar-Morreale et al., 2006;Aroda et al., 2008; Glinborg et al., 2008). Η αδιπονεκτίνη εισέρχεται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και από εκεί προσδένεται στους υποδοχείς της, οι οποίοι εντοπίζονται κυρίως στον υποθάλαμο και στην υπόφυση του ανθρώπινου εγκεφάλου. Το 2008, οι Wen et al, διαπίστωσαν την έκφραση των AdipoR1/R2 σε νευροεκκριτικά κύτταρα GT1 -7 του υποθαλάμου ενώ μετά από χορήγηση αδιπονεκτίνης στην καλλιέργεια των κυττάρων, διαπίστωσαν την αναστολή της έκκρισης της GnRH ορμόνης, η οποία σηματοδοτείται από το μονοπάτι AMPK. Πρόσφατα, η ίδια ερευνητική ομάδα ,συνεχίζοντας τα πειράματα τους σε GT1 -7 κύτταρα, ανακάλυψαν ότι η αδιπονεκτίνη μέσω του AMPK αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου KISS1. Αναφορικά το προϊόν του γονιδίου, είναι ένα μικρό πεπτίδιο, το λεγόμενο kisspeptin και είναι το ανώτερο σηματοδοτικό μόριο της GnRH.

Έχοντας την ιδιότητα, η αδιπονεκτίνη, να αναστέλλει την έκκριση της GnRH, μειώνοντας συνεπώς και τα επίπεδα της, επηρεάζει μετέπειτα και την έκκριση της LH από τα LβT2 γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης μέσω του AMPK χωρίς όμως να δρα ανασταλτικά στην FSH (Lu et al., 2008). Οι ερευνητές προτείνουν πως η υποθαλαμική AMPK δρα ως ένας αισθητήρας ενέργειας του οργανισμού. Σε καταστάσεις αστίας όπως για παράδειγμα στη νευρική ανορεξία τα επίπεδα ενέργειας του οργανισμού είναι πολύ χαμηλά. Η μείωση στο κυτταρικό ATP, ενεργοποιεί το μονοπάτι AMPK με σκοπό την παραγωγή ATP μέσω αύξησης της πρόσληψης της γλυκόζης και της οξείδωσης των λιπαρών οξέων. Έτσι ένας τέτοιος οργανισμός δεν δαπανά ενέργεια για λειτουργίες υψηλής ανάγκης σε ενέργεια όπως αυτή της αναπαραγωγής αλλά επιζητά άμεσα την παραγωγή ενέργειας για την επίτευξη των βασικών του λειτουργιών. Θα ήταν σημαντικό να αναφερθεί πως γυναίκες που πάσχουν από νευρική ανορεξία έχουν και αμηνόρροια. Αντίθετα σε παχύσαρκες γυναίκες, τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης είναι αρκετά χαμηλά, οπότε δεν μπορεί να επέλθει καταστολή GnRH αλλά ούτε και μείωση των επιπέδων της LH, μια κατάσταση που μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια αυξημένα επίπεδα LH (Michalakis et al., 2010).

Στο επίπεδο του υποθαλάμου, φαίνεται ακόμη πως δρα η αδιπονεκτίνη. Στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου (PVN) εδράζονται τα μεγαλοκυτταρικά κύτταρα (νευροεκκριτικά κύτταρα), τα οποία μέσω των νευρικών τους απολήξεων εκκρίνουν στην οπίσθια υπόφυση, δυο ορμόνες, την βαζοπρεσίνη και την οξυτοκίνη. Στον PVN ανιχνεύθηκαν οι υποδοχείς της αδιπονεκτίνης ενώ η χορήγηση της αδιποκίνης προκάλεσε αλλαγή στη διεγερσιμότητα των μεγαλοκυτταρικών νευρώνων προκαλώντας υπερπόλωση των κυττάρων που εκκρίνουν την οξυτοκίνη, υπερπόλωση ή εκπόλωση των νευρώνων που εκκρίνουν βασοπρεσίνη χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται η έκφραση της οξυτοκίνης και βασοπρεσίνης. Τα παραπάνω ευρήματα πιθανώς να εξηγούν την αυξημένη απελευθέρωση οξυτοκίνης στην κυκλοφορία στα παχύσαρκα άτομα (Hoyda et al., 2007)

Στο επίπεδο των ωοθηκών, η επίδραση της αδιπονεκτίνης, δεν έχει πλήρως διερευνηθεί. Ωστόσο, οι Lord et al, (2005) ήταν οι πρώτοι που δημοσίευσαν ότι οι ωοθήκες καθώς και τα ωοθυλάκια των χοίρων, εκφράζουν τους υποδοχείς της αδιπονεκτίνης. Μεταγενέστερες έρευνες επιβεβαίωσαν την ύπαρξη των υποδοχέων της αδιπονεκτίνης στην ανθρώπινη ωοθήκη (Cambos et al., 2008).

Οι ισομορφές της αδιπονεκτίνης βρέθηκαν να είναι παρούσες τόσο στο ωοθυλακικό υγρό των χοίρων όσο και του ανθρώπου σε συγκεντρώσεις αντίστοιχες με αυτές του ορού (Bersinger et al. 2006).

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην ωοθήκη του ποντικού (Chabrolle et al., 2007) και του κοτόπουλου, φανέρωσαν ότι η αδιπονεκτίνη παράγεται και τοπικά στα κύτταρα της θήκης, στα κοκκώδη καθώς και στα κύτταρα του ωχρού σηματίου. Τόσο η αδιπονεκτίνη του ορού όσο και η αδιπονεκτίνη που παράγεται τοπικά από κύτταρα του ωοθυλακίου μπορούν να ασκήσουν τη βιολογική τους δράση.

Όσον αφορά τα ανθρώπινα ωοθυλάκια, βρέθηκε *in vivo* ότι τα κύτταρα της θήκης εκφράζουν τόσο την αδιπονεκτίνη όσο και τους υποδοχείς της σε αντίθεση με τα κοκκώδη που εκφράζουν μόνο τους υποδοχείς AdipoR1/R2 (Chabrolle et al., 2009). Λόγω του ότι μόνο τα κύτταρα της θήκης εκφράζουν την αδιπονεκτίνη και όχι τα κοκκώδη, πιθανολογείται ότι η αδιπονεκτίνη ασκεί παρακρινική δράση στα κοκκώδη κύτταρα. Ακόμη παρατηρήθηκε, ότι στα κοκκώδη κύτταρα μετά από την καλλιέργεια τους με ανθρώπινη ανασυνδυασμένη αδιπονεκτίνη ενεργοποιήθηκε το μονοπάτι της MAPK κινάσης, το οποίο επάγει την έκφραση των γονιδίων των στεροειδών ορμονών καταλήγοντας στη παραγωγή οιστρογόνων και προγεστερόνης. Εν τούτοις, η αδιπονεκτίνη κατέχοντας τον πρωταρχικό ρόλο της ευαισθητοποίησης της

ινσουλίνης, δρα συνεργατικά με την ινσουλίνη ώστε να επάγουν την έκφραση γονιδίων στόχων ενώ ο IGF-1 ενισχύει την απόκριση των κυττάρων στην ινσουλίνη (Chabrolle et al., 2009). Η MAPK κινάση φωσφορυλιώνει την κινάση ERK $\frac{1}{2}$, η οποία με τη σειρά υπερφωσφορυλιώνει τον μεταγραφικό παράγοντα SF-1 (stereogenic factor 1). Η ενεργοποίηση του SF-1 οδηγεί στην πρόσδεση αυτού στον υποκινητή του STAR γονιδίου, επάγοντας την έκφραση του και την συνακόλουθη παραγωγή της Star πρωτεΐνης (Gyles et al., 2001). Η παραγωγή της Star αποτελεί κυρίαρχο γεγονός για την στεροειδογένεση. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στην κυτταρική σειρά KGN (human ovarian granulosa tumor cell line) έδειξαν ότι μόνο ο υποδοχέας AdipoR2 μπορεί μέσω αλληλεπίδρασής του με τον προσδέτη του, να επάγει την έκφραση γονιδίων απαραίτητων για τη στεροειδογένεση (Pierre et al., 2009).

Επιπλέον, στο προ-ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο μέσω του μονοπατιού MAPK/ERK 1-2 η αδιπονεκτίνη επάγει την έκφραση των γονιδίων COX-2, PG-E καθώς και του VEGF, ώστε να διεκπεραιωθεί η διαδικασία της ωορρηξίας (Ledoux et al., 2006). Η cyclooxygenase-2 και η prostaglandin E synthase είναι 2 ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση των προσταγλανδινών και οι οποίες στη συνέχεια θα δράσουν στις συνδέσεις των κοκκωδών κυττάρων με το ωάριο ώστε το τελευταίο να καταφέρει να απελευθερωθεί. Ο VEGF συμμετέχει στην αγγειογένεση των κοκκωδών που πρόκειται να ωχρινοποιηθούν μετά τη ρήξη του ωοθυλακίου.

Το 2008, οι Gutman et al διαπίστωσαν μετά από χορήγηση ανασυνδυασμένης LH, στο τέλος της ωοθυλακικής φάσης, την αύξηση των επιπέδων της αδιπονεκτίνης στην ωοθήκη. Η LH, προκαλεί περαιτέρω αύξηση της ευαισθησίας του ωοθυλακίου στην ινσουλίνη ενώ μειώνονται τα επίπεδα των ανδρογόνων λόγω αυξημένης παραγωγής αδιπονεκτίνης. Σημαντική αποδείχθηκε η έρευνα των Lagaly et al. (2008) οι οποίοι διαπίστωσαν την ανασταλτική επίδραση της αδιπονεκτίνης στη στεροειδογένεση στα μεγάλα κύτταρα θήκης των ωοθυλακίων (8-22 mm) των ωοθηκών των βοοειδών. Συγκεκριμένα, αρχικά η LH επάγει τη σύνθεση των AdipoR2 στα μεγάλα κύτταρα της θήκης. Με τη σειρά της η αδιπονεκτίνη αναστέλλει τη σύνθεση των LH/R καθώς και τον ενζύμων CYP11A1 και CYP17A1. Αναφορικά, το ένζυμο CYP11A1 που εκφράζεται στα κύτταρα θήκης, συμμετέχει στη μετατροπή της χοληστερόλης σε προγεστερόνη, ενώ η προγεστερόνη μετατρέπεται σε ανδροστενδιόνη με τη βοήθεια του CYP17A1. Συνοπτικά, η αδιπονεκτίνη ασκεί τοπική ανασταλτική δράση στα κύτταρα θήκης, μπλοκάροντας την παραγωγή των ανδρογόνων ενώ η LH δρώντας

συνεργατικά με τον IGF – 1 επάγουν την απόκριση των κυττάρων στην αδιπονεκτίνη, ρυθμίζοντας την παραγωγή των AdipoR2 υποδοχέων της. Το παραπάνω επιστημονικό εύρημα παρέχει πληροφορίες σχετικά με την παθοφυσιολογία των γυναικών με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών.

Η αδιπονεκτίνη παραγόμενη από τον λιπώδη ιστό ασκεί ενδοκρινική δράση στις ωοθήκες ενώ η έκφραση της στα κύτταρα θήκης των ανθρώπινων ωοθυλακίων φαίνεται να έχει παρακρινική δράση. Παρόλα αυτά, η συγκέντρωση της αδιπονεκτίνης δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού εμμηνορρυσιακού κύκλου καθώς δεν επηρεάζεται από τις αυξομειώσεις των οιστρογόνων (Daforoulos et al.,2009). Αντίθετα η χορήγηση GnRH αγωνιστή για δύο μήνες, η οποία οδήγησε σε καταστολή της λειτουργίας των γονάδων, προκάλεσε αύξηση των κυκλοφορούντων επιπέδων της αδιπονεκτίνης στον ορό (Toth et al., 2008).

Τέλος μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Liu et al,(2008) συσχέτισαν τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης του ορού σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε υπερδιέγερση των ωοθηκών για την πραγματοποίηση της εξωσωματικής γονιμοποίησης. Συγκεκριμένα, εξήχθησαν δύο συμπεράσματα : 1) την ημέρα πριν την χορήγηση της χοριακής γοναδοτροπίνης, τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης του ορού ήταν μειωμένα, πιθανότατα λόγω αρνητικής επίδρασης των υψηλών επιπέδων των οιστρογόνων από την υπερδιέγερση και 2) την ημέρα μετά την χορήγηση της χοριακής και αφού υπήρξε απελευθέρωση του ωαρίου και ωχρινοποίηση των κοκκωδών κυττάρων, τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης ήταν πολύ αυξημένα και πιθανότατα η αδιπονεκτίνη να συμβάλλει στην αύξηση των επιπέδων της προγεστερόνης.

Έχει προταθεί ότι τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης είναι χαμηλά σε γυναίκες με υπογονιμότητα. Έτσι περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν για την διεύρυνση των πιθανών μηχανισμών με τους οποίους δρα η αδιπονεκτίνη στον άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – ωοθήκες. .

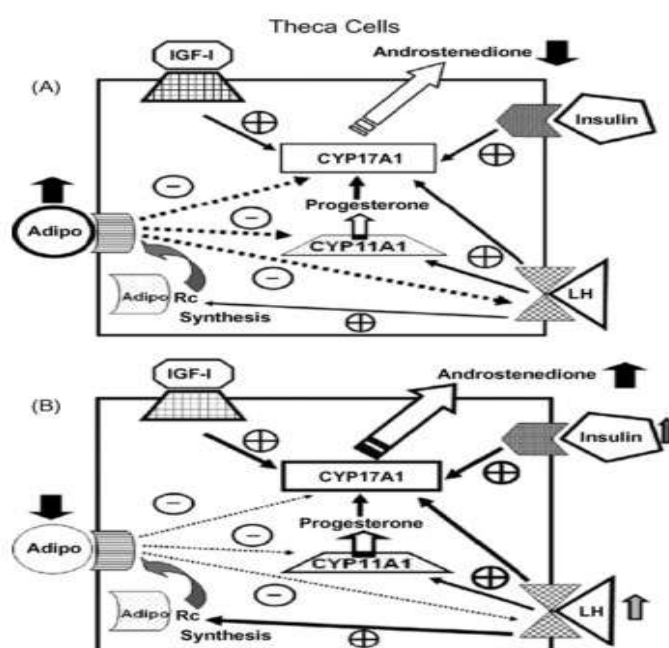
3.1.1) Αδιπονεκτίνη και γυναικολογικές παθήσεις:εστίαση στο PCOS

Το 5 – 10% των γυναικών που βρίσκονται στην αναπαραγωγική ηλικία, πάσχουν από το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (Dunaif A et al., 1997). Τα βασικά χαρακτηριστικά του συνδρόμου είναι : a) ο βιοχημικός ή κλινικός υπερανδρογονισμός, b) η χρόνια ανωοθυλακιορρηξία και c) η υπερηχογραφική εικόνα των πολυκυστικών ωοθηκών (Carmina et al., 2004). Ένα ποσοστό των γυναικών με PCOS εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη. Τόσο η αντίσταση στην ινσουλίνη όσο και η παχυσαρκία συνοδεύονται από μείωση της SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) και αντίστοιχα από αύξηση των ελεύθερων ανδρογόνων (Ehrmann et al., 2005). Δεδομένου ότι η αδιπονεκτίνη α) ευαισθητοποιεί την ινσουλίνη β) τα επίπεδα της μειώνονται σε παχύσαρκα άτομα καθώς και σε αυτούς που εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη γ) τα ανδρογόνα ασκούν αρνητική επίδραση στην παραγωγή της αδιπονεκτίνης , είναι λογικό να υποθέσουμε ότι τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης είναι χαμηλά σε γυναίκες με PCOS. Πολλές μελέτες απέδειξαν τη συγκεκριμένη υπόθεση η οποία επιβεβαιώθηκε και από μετα – αναλύσεις των ερευνών. Σύμφωνα με μία μετα – ανάλυση , τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης ήταν χαμηλότερα σε γυναίκες με PCOS σε σχέση με την υγιή ομάδα των γυναικών, οι οποίες χαρακτηρίζονταν από τον ίδιο δείκτη μάζας σώματος. Επιπλέον, τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης ήταν χαμηλότερα σε παχύσαρκες γυναίκες με PCOS σε σύγκριση με γυναίκες που ήταν παχύσαρκες αλλά δεν έπασχαν από PCOS. Στην ίδια μετά – ανάλυση τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης συσχετίστηκαν με την ευαισθησία στην ινσουλίνη : οι ασθενείς που εμφάνιζαν αντίσταση στην ινσουλίνη είχαν πολύ χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης (Toulis et al., 2009).

Όπως προαναφέρθηκε , η αδιπονεκτίνη ασκεί ανασταλτικό ρόλο στην παραγωγή των ανδρογόνων στα κύτταρα θήκης. Έτσι τα χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης δεν μπορούν να ασκήσουν την ανασταλτική τους δράση στα κύτταρα της θήκης σαν αποτέλεσμα να αυξάνονται τα ανδρογόνα πέραν του φυσιολογικού τους επιπέδου. Αυτός είναι ο πιθανός μηχανισμός που εξηγεί την υπερανδρογοναιμία στις γυναίκες με PCOS (Εικόνα 10). Επιπρόσθετα οι Bik et al. (2007) απέδειξαν την αρνητική συσχέτιση των επιπέδων αδιπονεκτίνης σε γυναίκες με PCOS και της τεστοστερόνης, της χοληστερόλης, των τριγλυκεριδίων, της γλυκόζης και της αρτηριακής πίεσης.

Στις γυναίκες με PCOS δεν συνίσταται η μέτρηση της συγκέντρωσης της αδιπονεκτίνης, καθώς η ασθένεια σχετίζεται με την παθοφυσιολογία της ινσουλινο – αντίστασης.

Τέλος, εξαιρουμένου του συνδρόμου των πολυκυστικών ωοθηκών, χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης έχουν ανιχνευθεί στο περιτοναϊκό υγρό των γυναικών που πάσχουν από ενδομητρίωση σταδίου III – IV ενώ νέα δεδομένα συσχετίζουν τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης με την ανάπτυξη λειομώματος της μήτρας καθώς και με τον καρκίνο του ενδομητρίου.



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης μεταξύ της αδιπονεκτίνης, της ινσουλίνης, του IGF – 1 και της LH σε φυσιολογικές ωοθήκες (A) και σε πολυκυστικές ωοθήκες (B). Υπό φυσιολογικές συνθήκες (A) η αδιπονεκτίνη αναστέλλει την παραγωγή ανδροστενδίωνης που επάγεται από τον IGF -1 και την ινσουλίνη ενώ η LH επάγει τη σύνθεση των AdipoRs υποδοχέων. Αντίθετα στο σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (B), τα χαμηλά επίπεδα της αδιπονεκτίνης μειώνουν την ανασταλτική της επίδραση στον LHR, στην 17 – υδροξυπρογεστερόνη και στην ανδροστενδίωνη σαν αποτέλεσμα μία γενική αύξηση των επιπέδων της ανδροστενδίωνης στα κύτταρα της θήκης (η διακεκομμένη γραμμή με τον κύκλο και το - υποδεικνύει τις ανασταλτικές δράσεις ενώ η συνεχόμενη γραμμή με τον κύκλο με το + υποδεικνύει τις διεγερτικές δράσεις) (Lagaly et al., 2008)

3.2) Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στην ανάπτυξη του προεμφυτευτικού εμβρύου και στην εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο

Η επίτευξη της κύησης εξαρτάται από δύο κρίσιμα γεγονότα, την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο καθώς και την πλακουντοποίηση. Η αδιπονεκτίνη και οι υποδοχείς της φαίνεται να συμμετέχουν ενεργά στις δύο διαδικασίες διαδραματίζοντας σπουδαίο ρόλο. Πέραν αυτών, η αδιπονεκτίνη μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη του προεμφυτευτικού εμβρύου από το στάδιο των 2 κυττάρων έως το στάδιο της βλαστοκύστης.

Οι Schmidt et al. (2008) έδειξαν ότι σε βλαστοκύστες ποντικών και κουνελιών, εκφράζονταν τα mRNAs των AdipoR1/R2s, ενώ το mRNA της αδιπονεκτίνης εκφραζόταν μόνο στη βλαστοκύστη του κουνελιού. Επιπλέον, στο ενδομήτριο του κουνελιού, μετά την πραγματοποίηση της εμφύτευσης εκφράζονταν όλα τα γονίδια: ADIPOQ, ADIPOR1/R2. Μία άλλη μελέτη φανέρωσε την υψηλή έκφραση των υποδοχέων στο ανθρώπινο ενδομήτριο στη μέση – εκκριτική φάση (Takemura et al., 2005). Τα παραπάνω ευρήματα συνηγορούν υπέρ της άποψης, ότι η σηματοδότηση μέσω των AdipoR1/R2s ρυθμίζεται ορμονικά στα στάδια προ και μετά της εμφύτευσης. Ανωμαλίες στη έκφραση των ADIPOQ και ADIPOR1/R2, πιθανότατα να συνδέονται τόσο με παθολογικές καταστάσεις της εμφύτευσης όσο και με την απώλεια της κύησης (Kim et al., 2011).

Οι Cikos et al. (2010) στην έρευνα που πραγματοποίησαν σε ωοκύτταρα και σε έμβρυα ποντικού (στάδια που μελετήθηκαν: 4 - 16 κύτταρα, μορίδιο, βλαστοκύστη), διαπίστωσαν ότι οι υποδοχείς της αδιπονεκτίνης εκφράζονται σε όλα τα παραπάνω στάδια, με τον υποδοχέα AdipoR2 να εκφράζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό. Ποσοτική real time pcr έδειξε ότι τα επίπεδα mRNA των υποδοχέων στο ωοκύτταρο είναι αυξημένα σε σχέση με το γονιμοποιημένο ωάριο στο οποίο παρατηρείται μείωση των επιπέδων mRNA. Μετά το στάδιο του μοριδίου οι υποδοχείς εμφανίζουν τη μεγαλύτερη έκφραση σε σχέση με τα προηγούμενα στάδια. Όσον αφορά την αδιπονεκτίνη, δεν ανιχνεύθηκε η έκφραση της σε κανένα προεμφυτευτικό στάδιο παρα μόνο μετά την εμφύτευση της βλαστοκύστης στον ενδομήτριο (Schmidt et al., 2008; Cikos et al., 2010). Αργότερα, οι Kim et al. (2011), σε μελέτες που πραγματοποίησαν σε προεμφυτευτικά έμβρυα 2 – 8 κυττάρων, ανίχνευσαν τα μετάγραφα των ADIPOQ, ADIPOR1/R2, PPARS, καθώς και των SLC27AI – I, ACOX1. Αναφορικά, η σύνδεση αδιπονεκτίνης με τους υποδοχείς της, ενεργοποιεί

τον πυρηνικό υποδοχέα της οικογένειας των PPARs, ο οποίος μπορεί να επάγει την έκφραση των γονιδίων SLC27A1-I και ACOX1, τα προϊόντα των οποίων συμμετέχουν στην οξείδωση των λιπαρών οξέων. Η έκφραση όλων των παραπάνω γονιδίων στο στάδιο των 2 έως 8 κυττάρων οφείλεται στη επικράτηση του μητρικού γονιδιώματος. Στο επίπεδο της βλαστοκύστης ωστόσο εντοπιστήκαν όλα τα παραπάνω μετάγραφα, με εξαίρεση αυτό της αδιπονεκτίνης. Η ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος μετά το στάδιο των 8 κυττάρων, εξηγεί τη μη έκφραση της αδιπονεκτίνης στο στάδιο της βλαστοκύστης. Παρόλα αυτά, ενώ το mRNA της αδιπονεκτίνης δεν ανιχνεύεται στο επίπεδο της βλαστοκύστης, οι Kim et al, (2011) χρησιμοποιώντας την τεχνική του ανοσοφθορισμού εντόπισαν την πρωτεΐνη αδιπονεκτίνη σε όλα τα στάδια του προεμφυτικού εμβρύου. Στο στάδιο των 2 – 8 κυττάρων, η ύπαρξη της πρωτεΐνης, πηγάζει από το υγρό των ωαγωγών. Η αδιπονεκτίνη που υπάρχει στο υγρό του ωαγωγού, μπορεί να προέρχεται είτε από την κυκλοφορία του αίματος, είτε από το επιθήλιο του ωαγωγού (Leese, 1988; Buih et al., 2000; Archanco et al., 2007). Στο στάδιο της βλαστοκύστης, η ανυπαρξία του mRNA της αδιπονεκτίνης έρχεται σε αντίθεση με την ανίχνευση της πρωτεΐνης στο στάδιο αυτό, οδηγώντας τους Kim et al (2011) να υποθέσουν, πως η πρωτεΐνη υπάρχει ως μήνυμα από τα προηγούμενα στάδια του μοριδίου ή των 8 κυττάρων. Εναλλακτική υπόθεση και περισσότερο αληθοφανής φαίνεται να είναι η παραγωγή της αδιπονεκτίνης από το επιθήλιο του ενδομητρίου. Ανεξαρτήτως του ιστού παραγωγής της αδιπονεκτίνης, φαίνεται πως η συγκεκριμένη αδιποκίνη διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην προεμφυτευτική ανάπτυξη του εμβρύου και στην εμφύτευση της βλαστοκύστης στον ποντικό. Το σηματοδοτικό μονοπάτι της αδιπονεκτίνης κατά της προεμφυτευτική περίοδο φαίνεται να είναι το εξής: η αδιπονεκτίνη προσδεδεμένη στους υποδοχείς της, σηματοδοτεί της ενδοκυτταρική προσκόλληση της APPL1 στην N-αμινοτελική περιοχή του υποδοχέα. Η πρόσδεση αυτή, επάγει της ενεργοποίηση της MAPK κινάσης η οποία επάγει την έκφραση των SLC27A1-I και ACSOX1 (Mao et al., 2006; Campos et al., 2008; Dupont et al., 2008). Η slc27A1-1 και η acsox1 συμμετέχουν στην οξείδωση των λιπαρών οξέων. Το έμβρυο, καθώς κατέρχεται εκ του ωαγωγού θα πρέπει να προμηθεύεται με την απαραίτητη ενέργεια τόσο για την μετακίνηση του, όσο και για την πραγματοποίηση των αυλακώσεων.

Η διεργασία της εμφύτευσης αρχίζει 1-2 ημέρες μετά την είσοδο της βλαστοκύστης στην κοιλότητα της μήτρας, περίπου την 18η -19η ημέρα του κύκλου. Μετά την είσοδό της, η βλαστοκύστη παραμένει αιωρούμενη για περίπου 1-2 ημέρες,

αναμένοντας μηνύματα για την κατάλληλη θέση εμφύτευσης στο ενδομήτριο. Οι ιδανικές συνθήκες εμφύτευσης που δημιουργούνται, διατηρούνται για ορισμένο χρονικό διάστημα, αποτελώντας το λεγόμενο «παράθυρο εμφύτευσης» και διαρκούν περίπου 4 μέρες (20^η -24^η ημέρα). Η δράση της αδιπονεκτίνης στην εμφύτευση φαίνεται να είναι υψίστης σημασίας καθώς τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης είναι μειωμένα σε γυναίκες με ενδομητρίωση (Takemura et al., 2005), PCOS, παχυσαρκία και διαβήτη τύπου 2 (Weyer et al., 2001), παθολογικές καταστάσεις οι οποίες έχουν συνδεθεί με την αποτυχία της εμφύτευσης και με την απώλεια της κυήσεως.

Οι Dos Santos et al. (2012), χρησιμοποιώντας βιοψίες ενδομητρίου από γόνιμες γυναίκες (control) και από γυναίκες που είχαν συνεχείς αποτυχίες εμφύτευσης κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση, μελέτησαν την έκφραση της αδιπονεκτίνης και των υποδοχέων της, στις 2 καταστάσεις. Η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων εντοπίστηκε στην έκφραση των AdipoR1/R2. Στις γυναίκες που εμφάνιζαν συνεχείς αποτυχίες εμφύτευσης, τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων ήταν χαμηλά σε σχέση με την ομάδα – control, ενώ τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης μεταξύ των δύο ομάδων δεν παρουσίαζαν διαφοροποίηση. Οι Takemura et al. (2006) απέδειξαν ότι οι υποδοχείς της αδιπονεκτίνης εκφράζονται σε υψηλά ποσοστά στο ενδομήτριο κατά το μέσο της εκκριτικής φάσης που αντιστοιχεί στο «παράθυρο της εμφύτευσης». Επιπλέον, η αδιπονεκτίνη παράγεται από το επιθήλιο της μήτρας πριν την εμφύτευση, αποτελώντας μία τοπικά παραγόμενη εκκριτική πρωτεΐνη (Kim et al., 2011). Η αδιπονεκτίνη του ενδομητρίου ασκεί αυτοκρίνη δράση στα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου σηματοδοτώντας εν μέρει τη φθαρτοειδή αντίδραση, αλλά δρα και παρακρινικά επηρεάζοντας την ανάπτυξη της βλαστοκύστης (Kim et al., 2011). Όπως έχουμε δει έως τώρα η αδιπονεκτίνη ασκεί τους ρόλους της μέσω του AMPK μονοπατιού και την ενεργοποίησης της καταλυτικής υπομονάδας PRKAA (protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit) της AMPK κινάσης. Η PRKAA ενεργοποιείται όταν υπάρξει ενδοκυττάρια αύξηση της αναλογίας AMP:ATP και προκαλεί μία σειρά μεταβολικών αλλαγών στο κύτταρο με στόχο της παραγωγή ενέργειας. Σε τροφοβλαστικά κύτταρα της βλαστοκύστης, η ενεργοποίηση της PRKAA προκάλεσε τη μεταφορά της Slc2A8 από το εσωτερικό των κυττάρων στη μεμβράνη με στόχο την πρόσληψη της γλυκόζης (Eng et al., 2007; Loudon et al., 2008). Όμως εδώ φαίνεται να δρα η αδιπονεκτίνη όντας ο βασικός ενεργοποιητής του μονοπατιού AMPK, οδηγώντας στην πρόσληψη επαρκούς γλυκόζης για το προεμφυτευτικό έμβρυο του σταδίου της βλαστοκύστης. Η σηματοδότηση της

αδιπονεκτίνης που αποσκοπεί στη φθαρτοειδή αντίδραση, επάγεται από την αλληλεπίδραση τριών μονοπατιών των Akt, Erk, και PRKAA ενώ ο υποδοχέας AdipoR1 φαίνεται πως δρα σε αυτή τη διαδικασία (Kim et al., 2011).

Εν κατακλείδι, έγινε φανερό ότι η αδιπονεκτίνη δρώντας ενδοκρινικά – παρακρινικά – αυτοκρινικά, ενεργοποιεί ποικίλα σηματοδοτικά μονοπάτια, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη του προεμφυτευτικού εμβρύου, από το στάδιο των 2 κυττάρων έως το στάδιο της βλαστοκύστης ενώ καθοριστικός είναι ο ρόλος της στη βελτιστοποίηση της υποδεκτικότητας του ενδομητρίου. Η έκφραση της αδιπονεκτίνης και των υποδοχέων της στο αναπαραγωγικό σύστημα, τόσο πριν όσο και μετά την εμφύτευση, υποδεικνύει την εμβryo – μητρική επικοινωνία, η οποία είναι απαραίτητη για την εξέλιξη της κύησης.

3.3) Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στην πλακουντοποίηση

Συνοψίζοντας τις παραπάνω μελέτες, είδαμε ότι οι υποδοχείς AdipoR1/R2 είναι παρόντες στα ανθρώπινα ωοκύτταρα, στο προεμφυτευτικό έμβρυο, στη βλαστοκύστη και στο ενδομήτριο. Επιπλέον οι υποδοχείς της αδιπονεκτίνης είναι παρόντες και στον ανθρώπινο πλακούντα (Benaitreau et al. 2009). Αντίθετα, προηγούμενες μελέτες έκαναν αναφορά στην παραγωγή και στην έκκριση της αδιπονεκτίνης από τον πλακούντα. Παρόλα αυτά νεότερα δεδομένα έρχονται να ανατρέψουν αυτήν την άποψη, υποστηρίζοντας πως η αδιπονεκτίνη παράγεται μόνο από το ενδομήτριο και ασκεί θετική επίδραση στην ανάπτυξη του πλακούντα.

Σε αρκετά στάδια της δημιουργίας του πλακούντα φαίνεται να συμμετέχει η αδιπονεκτίνη. Συνοπτικά, η αδιπονεκτίνη:

Ελέγχει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της τροφοβλάστης. Οι Benaitreau et al. (2009) απέδειξαν ότι τόσο στις κυτταρικές σειρές BeWO και JEG – 3 όσο και σε κύτταρα από εκχυλίσματα πλακούντα (1 τρίμηνο), η χορηγούμενη ανθρώπινη ανασυνδυασμένη αδιπονεκτίνη αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των παραπάνω κυττάρων μέσω των μονοπατιών της MAPK και της PI3 –K. Τα παραπάνω κύτταρα δεν εκφράζουν την αδιπονεκτίνη παρά μόνο τους υποδοχείς της. Σύμφωνα με τους μελετητές η αδιπονεκτίνη που δρα στην ανάπτυξη του πλακούντα είναι αυτή του ενδομητρίου ασκώντας παρακρινική δράση.

Προωθεί τη δημιουργία της συγκιτιοτροφοβλάστης. Οι Benaitreau et al. (2010a) με μελέτες που πραγματοποίησαν στην κυτταρική σειρά BeWO καθώς και σε

ανθρώπινα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα από πλακούντα των 5 εβδομάδων, έδειξαν ότι η χορηγούμενη αδιπονεκτίνη μπορεί να επάγει τη δημιουργία της συγκυτιοτροφοβλάστης. Η αδιπονεκτίνη οδηγεί στην υπερέκραση της syncytin-2 και αναστέλλει την έκφραση της E-cadherin. Επιπλέον βρέθηκε ότι το μονοπάτι που σηματοδοτεί τη διαφοροποίηση των κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης προς το μέρος της συγκυτιοτροφοβλάστης είναι το μονοπάτι της PKA κινάσης, το οποίο ενεργοποιείται μετά από την αύξηση του ενδοκυτταρικού cAMP.

Ρυθμίζει τη μετανάστευση και τη διήθηση των κυττάρων της

κυτταροτροφοβλάστης. Συνεχίζοντας τις έρευνες οι Benaitreau et al. (2010b) διαπίστωσαν ότι η αδιπονεκτίνη μπορεί να επάγει την κυτταρική μετανάστευση σε αθανοτοποιημένα κύτταρα HTR-8/Svneo ανεξαρτήτως της χορηγούμενης δόσης της αδιπονεκτίνης. Επιπλέον, η αδιπονεκτίνη ενισχύει την διεισδυτική ικανότητα των κυττάρων HTR-8/Svneo και των EVT's. Ο αντιπολλαπλασιαστικός ρόλος της αδιπονεκτίνης που παρατηρήθηκε σε κύτταρα HTR-8/Svneo σε συνδυασμό με την αυξημένη επαγωγή της κινητικότητας μετά από τη χορήγηση της αδιπονεκτίνης, αποκλείουν το γεγονός ότι η μεταναστευτική ικανότητα μπορεί να επάγεται από μιτογόνους παράγοντες. Η διηθητική ικανότητα αυτών των κυττάρων που επάγεται από την αδιπονεκτίνη, αυξάνει την ενεργότητα των μεταλλοπρωτεϊνών MMP2, MMP9 καθώς και αναστέλλει την έκφραση του TIMP2 mRNA. Οι μελετητές προτείνουν ότι η ισορροπία ανάμεσα στην έκφραση των MMP2/9 και του TIMP2 που ελέγχεται από την αδιπονεκτίνη, καθορίζει τα αρχικά στάδια της διήθησης των EVT's στο ενδομήτριο. Ωστόσο άγνωστος παραμένει ο μοριακός μηχανισμός με τον οποίο η αδιπονεκτίνη επάγει την κυτταρική μετανάστευση στους τροφοβλάστες. Η αδιπονεκτίνη γενικά δρα μέσω του μονοπατιού της AMPK. Παρόλα αυτά η χορήγηση του αναστολέα της κίνησης, AICAR, στα HTR-8/Svneo, δεν κατέστειλε τις διεισδυτικές της ικανότητες, γεγονός που υποδηλώνει ότι η αδιπονεκτίνη συνεργάζεται με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια για να ασκήσει το συγκεκριμένο ρόλο της.

Θα ήταν σημαντικό να αναφερθεί ότι η επαγωγή της κινητικότητας από την αδιπονεκτίνη έχει παρατηρηθεί και σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Tang & Lu 2009), σε κύτταρα από χονδροσάρκωμα (Chiu et al. 2009), όσο και σε προγονικά κύτταρα του ενδοθηλίου (Nakamura et al. 2009). Σε όλους τους παραπάνω κυτταρικούς τύπους, η αδιπονεκτίνη συμμετέχει στη ρύθμιση των ιντεγκρινών $\alpha 5 \beta 1$

και $\alpha 2\beta 1$, επάγοντας την μετανάστευση. Όσον αφορά τη διείσδυση, η αδιπονεκτίνη φαίνεται να λειτούργει ως ένας προ-διεισδυτικός παράγοντας.

Δεδομένου ότι η μεταναστευτική και η διεισδυτική ικανότητα των τροφοβλαστικών κυττάρων ομοιάζει με αυτή των καρκινικών, με τη μόνη διαφορά ότι η πρώτη είναι γωρο-χρονικά καθορισμένη, η μελέτη του ενδοκυτταρικού μονοπατιού σηματοδότησης της μετανάστευσης και της διείσδυσης στα καρκινικά κύτταρα, παρέχει αρκετές πληροφορίες για το πιθανό μηχανισμό στους τροφοβλάστες. Σε μία πρόσφατη μελέτη, οι Tang and Lu (2009), διαπίστωσαν ότι οι υποδοχείς AdipoR, η p38 MAPK κινάση, η AMPK κινάση καθώς και τα σηματοδοτικά μονοπάτια του NF- κ B, απαιτούνται για την επαγόμενη από την αδιπονεκτίνη κυτταρική μετανάστευση στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Chiu et al, (2009) στις μελέτες τους σε κύτταρα του χονδροσαρκώματος. Οι τελευταίοι διαπίστωσαν ότι η υπερέκφραση της $\alpha 2\beta 1$ ιντεγκρίνης, η οποία οφείλεται για την υψηλή μεταστατική ικανότητα αυτών των κυττάρων, επάγεται από την ενεργοποίηση των AdipoRs υποδοχέων, των p38, AMPK κινασών αλλά και του NF- κ B. Έτσι είναι πιθανό τα παραπάνω σηματοδοτικά μόρια να συμμετέχουν και στο μοριακό μηχανισμό της κυτταρικής μετανάστευσης στα τροφοβλαστικά κύτταρα. Συμπεραίνουμε λοιπόν, ότι η αδιπονεκτίνη δρα ποικιλοτρόπως στα τροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα επάγοντας έτσι την ανάπτυξη του. Απώτερος στόχος αποτελεί η ανίχνευση των μοριακών μονοπατιών καθώς και η ταυτοποίηση των σηματοδοτικών μορίων που συμμετέχουν στη ρύθμιση της μετανάστευσης και της διήθησης των τροφοβλαστών.

3.4) Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στην εγκυμοσύνη

Κατά την εγκυμοσύνη συμβαίνουν σημαντικές αλλαγές στο μεταβολισμό της γυναίκας λόγω της ανάπτυξης του κυοφορούμενου εμβρύου και του πλακούντα. Στις αρχές της κύησης, παρατηρείται αύξηση της έκκρισης της ινσουλίνης, η οποία διεγείρει τη λιπογένεση και ελαττώνει την οξείδωση των λιπαρών οξέων, προωθώντας έτσι την συσσώρευση του λίπους στην έγκυο γυναίκα. Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από ευαισθησία στην ινσουλίνη. Από τα μέσα της κύησης έως και τα τέλη αυτής, ο μεταβολισμός της μητέρας μετασχηματίζεται, με κυρίαρχη αλλαγή την εμφάνιση της αντίστασης στην ινσουλίνη. Αυτός ο "προστατευτικός μηχανισμός" αποσκοπεί στην αύξηση της γλυκονογένεσης στο ήπαρ της μητέρας,

στην μειωμένη πρόσληψη της γλυκόζης από τους σκελετικούς της μύες καθώς και στην αυξημένη λιπόλυση στο λιπώδη ιστό. Έτσι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται ως πηγή ενέργειας για τη μητέρα, ενώ η γλυκόζη, τα αμινοξέα, τα απαραίτητα λιπαρά οξέα και οι κετόνες διατίθενται σε επάρκεια για την ανάπτυξη του εμβρύου (Aye et al. 2013).

Η αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη σηματοδοτείται από την αδιπονεκτίνη, τα επίπεδα της οποίας είναι αυξημένα σε εγκυμονούσες σε σχέση με μη έγκυες γυναίκες (Mazaki-Toni et al., 2007). Με την πρόοδο της εγκυμοσύνης, η αύξηση του σωματικού λίπους της μητέρας οδηγεί στη μειωμένη έκκριση αδιπονεκτίνης από το λιπώδη ιστό, η οποία συσχετίζεται με την εμφάνιση της φυσιολογικής ινσουλινοαντίστασης (Catalano et al., 2006).

Μητέρες παχύσαρκες ή με σακχαρώδη διαβήτη κύησης έχουν χαμηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης σε αντίθεση με τις αδύνατες μητέρες που τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης είναι φυσιολογικά έως υψηλά (Aye et al., 2013). Πληθώρα μελετών, υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα της μητρικής αδιπονεκτίνης σχετίζονται αρνητικά με το βάρος του νεογνού (Jansson et al., 2008). Οι Aye et al. (2013) υποστηρίζουν πως η μητρική αδιπονεκτίνη επηρεάζει την ανάπτυξη του εμβρύου ρυθμίζοντας την μεταφορά των θρεπτικών συστατικών από τον πλακούντα στο έμβρυο.

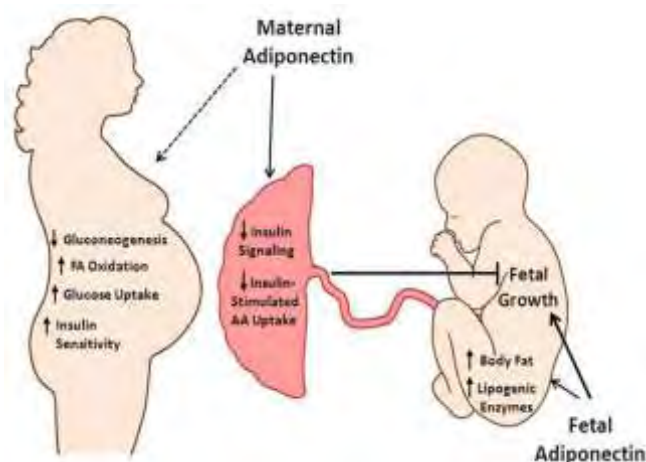
Αν και κάποιοι ερευνητές είχαν αναφέρει ότι ο πλακούντας εκκρίνει αδιπονεκτίνη (Camino et al., 2005; Lappas et al., 2005), τα ευρήματα αυτών δεν μπόρεσαν να επιβεβαιωθούν έως σήμερα. Σύμφωνα με τους Aye et al (2013), η μητρική αδιπονεκτίνη δρώντας στα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης, αναστέλλει την επαγόμενη από την ινσουλίνη μεταφορά των αμινοξέων προς τον πλακούντα, ελέγχοντας έτσι την περαιτέρω την ανάπτυξη του εμβρύου.

Σε αντίθεση με την αδιπονεκτίνη των ενηλίκων, υψηλά επίπεδα αδιπονεκτίνης στο αίμα του ομφάλιου λώρου σχετίζονται με το αυξημένο σωματικό βάρος των νεογνών (Sivan et al., 2003). Έτσι η μητρική και η εμβρυϊκή αδιπονεκτίνη έχουν αντίθετα αποτελέσματα στην ανάπτυξη του εμβρύου (Εικόνα 11). Με τη γέννηση, η αδιπονεκτίνη του αίματος του ομφάλιου λώρου είναι 4-7 φορές υψηλότερη από αυτή της μητέρας (Kotani et al., 2004) ενώ με την ανάπτυξη του νεογνού τα επίπεδα της αδιπονεκτίνης του σταδιακά μειώνονται (Mantzoros et al., 2009). Τόσο η εμβρυϊκή αδιπονεκτίνη όσο και η νεογνική προωθούν την ανάπτυξη του λιπώδους ιστού (Aye et al., 2013).

Τα μειωμένα επίπεδα της μητρικής αδιπονεκτίνης δεν επηρεάζουν μόνο την ανάπτυξη και το βάρος του νεογνού αλλά αυξάνουν τον κίνδυνο για την ανάπτυξη του σακχαρώδη διαβήτη της κύησης. Μελέτες έχουν φανερώσει τα εξής :

1. Τόσο η ολική αδιπονεκτίνη όσο και η HMW σχετίζονται αντίστροφα την εμφάνιση την ινσουλινοαντίστασης (Retnakaran et al., 2007)
2. Μειωμένα επίπεδα HMW σχετίζονται με τη δυσλειτουργία των β κυττάρων του παγκρέατος (Retnakaran et al., 2007)
3. Πολυμορφισμοί στο γονίδιο ADIPOQ αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης της ασθένειας (Low et al., 2001)

Η παθοφυσιολογία της ασθένειας ομοιάζει με αυτή του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1, καταλήγοντας σε υπεργλυκαιμικές καταστάσεις. Η υπεργλυκαιμία της μητέρας συνεπάγεται την εμβρυϊκή υπεργλυκαιμία, η οποία σηματοδοτεί την υπερέκριση της εμβρυϊκής ινσουλίνης, με άμεση συνέπεια το αυξημένο βάρος του εμβρύου (Metzger et al., 2008). Ωστόσο μητέρες που αναπτύσσουν σακχαρώδη διαβήτη κύησης έχουν μεγάλη πιθανότητα να εμφανίσουν μετέπειτα σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (Kim et al., 2002; Feig et al., 2008; Bellamy et al., 2009). Είναι λοιπόν σημαντικό όχι μόνο να αντιμετωπίσουμε την ασθένεια, αλλά να μπορέσουμε κυρίως να την προβλέψουμε. Η μέτρηση των επιπέδων της αδιπονεκτίνης αποτελεί έναν αξιόλογο προγνωστικό δείκτη για την ανάπτυξη της ασθένειας τόσο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης όσο και μετά το πέρας αυτής (Retnakaran A and Retnakaran R 2012).



Εικόνα 11: Ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στη μητρική, στην πλακουντιακή και στην εμβρυϊκή φυσιολογία (Aye et al., 2013).

Σκοπός

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη διερευνήθηκε ο ρόλος της αδιπονεκτίνης στην κυτταρική μετανάστευση στην τροφοβλάστη με απώτερο στόχο την ανακάλυψη του πιθανού μοριακού μηχανισμού.

Υλικά και Μέθοδοι

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα τροφοβλάστης από λήψεις χοριακών λαχνών που πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα του Προγεννητικού Ελέγχου του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας από τον Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κ. Γκαρά Αντώνιο. Τα δείγματα, άνηκαν σε 3 φυσιολογικές γυναίκες, 32 -35 ετών, οι οποίες βρίσκονταν στο πρώτο τρίμηνο της κύησης (11^η με 13^η εβδομάδα).

Απομόνωση κυττάρων τροφοβλάστης από τις χοριακές λάχνες και δημιουργία πρωτεγενοούς καλλιέργειας

Μετά τη λήψη των χοριακών λαχνών, ο τροφοβλαστικός ιστός τοποθετήθηκε σε ειδικό falcon με θρεπτικό υλικό και μεταφέρθηκε στο εργαστήριο για επεξεργασία. Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε επωαστικό κλίβανο, θερμοκρασίας 37°C και παρουσίας 5 % CO₂. Όλοι οι απαραίτητοι χειρισμοί, πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες και εντός του θαλάμου κάθετης νηματικής ροής ώστε να αποφευχθούν οι πιθανές μολύνσεις. Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- ✎ Καθαρισμός του ιστού από τα πήγματα σε τρυβλίο Petri που περιέχει 1-3 ml ισοτονικού διαλύματος PBS.
- ✎ Μεταφορά του ιστού σε falcon των 15 ml, παρουσία PBS και αναμονή έως ότου καθιζάνει ο ιστός.
- ✎ Αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθήκη 1 με 2 ml κολλαγενάσης και 1 με 2 ml θρυψίνης. Η ποσότητα των ενζύμων εξαρτάται από την ποσότητα του ιστού.
- ✎ Επώαση στον κλίβανο για μία ώρα. Ανά 15 min, μεσολαβεί ανακίνηση του falcon.
- ✎ Προσθήκη πλήρους καλλιεργητικού μέσου DMEM/F12 (10- 15% FBS, 2% L- γλουταμίνη, 1% πενικιλίνη – στρεπτομυκίνη) για αναστολή της δράσης των ενζύμων.
- ✎ Φυγοκέντρηση στις 1700 rpm για 7 min.

- ✘ Αφαίρεση υπερκείμενου, προσθήκη 1 ml του παραπάνω καλλιεργητικού μέσου στο ίζημα, αναρρόφηση του εναιωρήματος με σύριγγα ινσουλίνης για τουλάχιστον 20 φορές ώστε να αναδιαλυθεί το ίζημα και να απελευθερωθούν τα κύτταρα.
- ✘ Προσθήκη 6 με 7 ml καλλιεργητικού μέσου, ξεπλένοντας τα τοιχώματα του falcon και φυγοκέντρωση στις 1300 rpm για 10 min.
- ✘ Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 3 ml θρεπτικού για αναδιάλυση του ιζήματος.
- ✘ Μεταφορά σε φλάσκα των 25cm² και επώαση στον κλίβανο.
- ✘ Παρατήρηση της καλλιέργειας στο οπτικό μικροσκόπιο και όταν τα κύτταρα καλύψουν περίπου το 80% της φλάσκας, πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια.

Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιείται κάθε 7 με 10 μέρες. Ωστόσο το μέγεθος του αρχικού ιστού καθώς και ο αριθμός των κυττάρων που απομονώνονται μπορεί να τροποποιήσουν ελαφρώς το παραπάνω χρονικό διάστημα. Τα κύτταρα ανακαλλιεργούνται κάθε φορά που οι φλάσκες έχουν μεγάλο αριθμό κυττάρων, πριν τα κύτταρα φτάσουν σε αναπαραγωγική γήρανση. Στόχος της ανακαλλιέργειας είναι ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων της φλάσκας. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- ✘ Αφαίρεση του καλλιεργητικού μέσου με πιπέτα pasteur.
- ✘ Πλύση των κυττάρων με PBS 4 έως 5 ml.
- ✘ Αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα με προσθήκη 1 έως 1.5 ml προθερμασμένης θρυψίνης και επώαση στον κλίβανο για 5 min.
- ✘ Έλεγχος των αποκολλημένων κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο.
- ✘ Προσθήκη διπλάσιας ποσότητας, σε σχέση με τη θρυψίνη, θρεπτικού μέσου με ορό, με στόχο την καταστολή της δράσης του ενζύμου.
- ✘ Μεταφορά των κυττάρων σε falcon και φυγοκέντρωση στις 1700 rpm για 7 min.
- ✘ Αφαίρεση υπερκείμενου με πιπέτα pasteur.
- ✘ Επαναιώρηση των κυττάρων σε PBS για να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα θρυψίνης.

- ✎ Δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες.
- ✎ Απομάκρυνση του υπερκείμενου και καλή επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων, έπειτα από προσθήκη πλήρους θρεπτικού, μέχρις ότου να μην υπάρχουν συσσωματώματα. Η ποσότητα του θρεπτικού μέσου εξαρτάται από το μέγεθος του ιζήματος των κυττάρων.
- ✎ Προσθήκη 20 μl από το εναιώρημα των κυττάρων σε 20 μl ειδικής χρωστικής (trypan blue) και εναπόθεση στην ειδική υποδοχή του αιματοκυτταρομέτρου.
- ✎ Υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων στο μικροσκόπιο.
- ✎ Για κάθε ανακαλλιέργεια χρησιμοποιούνται 80.000-100.000 κύτταρα ανά ml θρεπτικού μέσου, εκτός από τις περιπτώσεις που τα κύτταρα θα χρησιμοποιηθούν σε ειδικά πειράματα.
- ✎ Ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων, προστίθεται και η αντίστοιχη ποσότητα καλλιεργητικού μέσου και εν συνέχεια μοιράζεται στις φλάσκες
- ✎ Επώαση στον κλίβανο στους 37⁰C, σε ατμόσφαιρα με 5% CO₂ και σε ελεγχόμενες συνθήκες υγρασίας.

Κατάψυξη κυττάρων

Πολλές φορές μετά τις καλλιέργειες των κυττάρων, δεν είναι εφικτό (από πρακτικής άποψης) να προχωρήσουμε αμέσως στους ανάλογους πειραματικούς χειρισμούς των κυττάρων, σαν συνέπεια να πρέπει να καταψύξουμε τα κύτταρα. Η διαδικασία κατάψυξης περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- ✎ Αφαίρεση του καλλιεργητικού μέσου με πιπέτα pasteur.
- ✎ Πλύση των κυττάρων με PBS 4 έως 5 ml.
- ✎ Αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα με προσθήκη 1 έως 1.5 ml προθερμασμένης θρυψίνης και επώαση στον κλίβανο για 5 min.
- ✎ Έλεγχος των αποκολλημένων κυττάρων στο οπτικό μικροσκόπιο.
- ✎ Προσθήκη διπλάσιας ποσότητας, σε σχέση με τη θρυψίνη, θρεπτικού μέσου με ορό, με στόχο την καταστολή της δράσης του ενζύμου.
- ✎ Μεταφορά των κυττάρων σε falcon και φυγοκέντρηση στις 1700 rpm για 7 min.
- ✎ Αφαίρεση υπερκείμενου με πιπέτα pasteur.
- ✎ Επαναιώρηση των κυττάρων σε PBS για να απομακρυνθούν τυχόν

- ✘ υπολείμματα τρυψίνης.
- ✘ Δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και αφαίρεση υπερκειμένου.
- ✘ Προσθήκη 2 ml υλικού κατάψυξης που αποτελείται κατά 30% από FBS, 10% από DMSO και κατά 60% από θρεπτικό μέσο χωρίς αντιβιοτικό.
- ✘ Μεταφορά του μείγματος σε φιαλίδιο κατάψυξης και τοποθέτηση στους -20°C για περίπου 4h και στη συνέχεια στους -80°C για μία εβδομάδα το πολύ και τέλος στους -150°C μέχρι την απόψυξη.

Απόψυξη κυττάρων

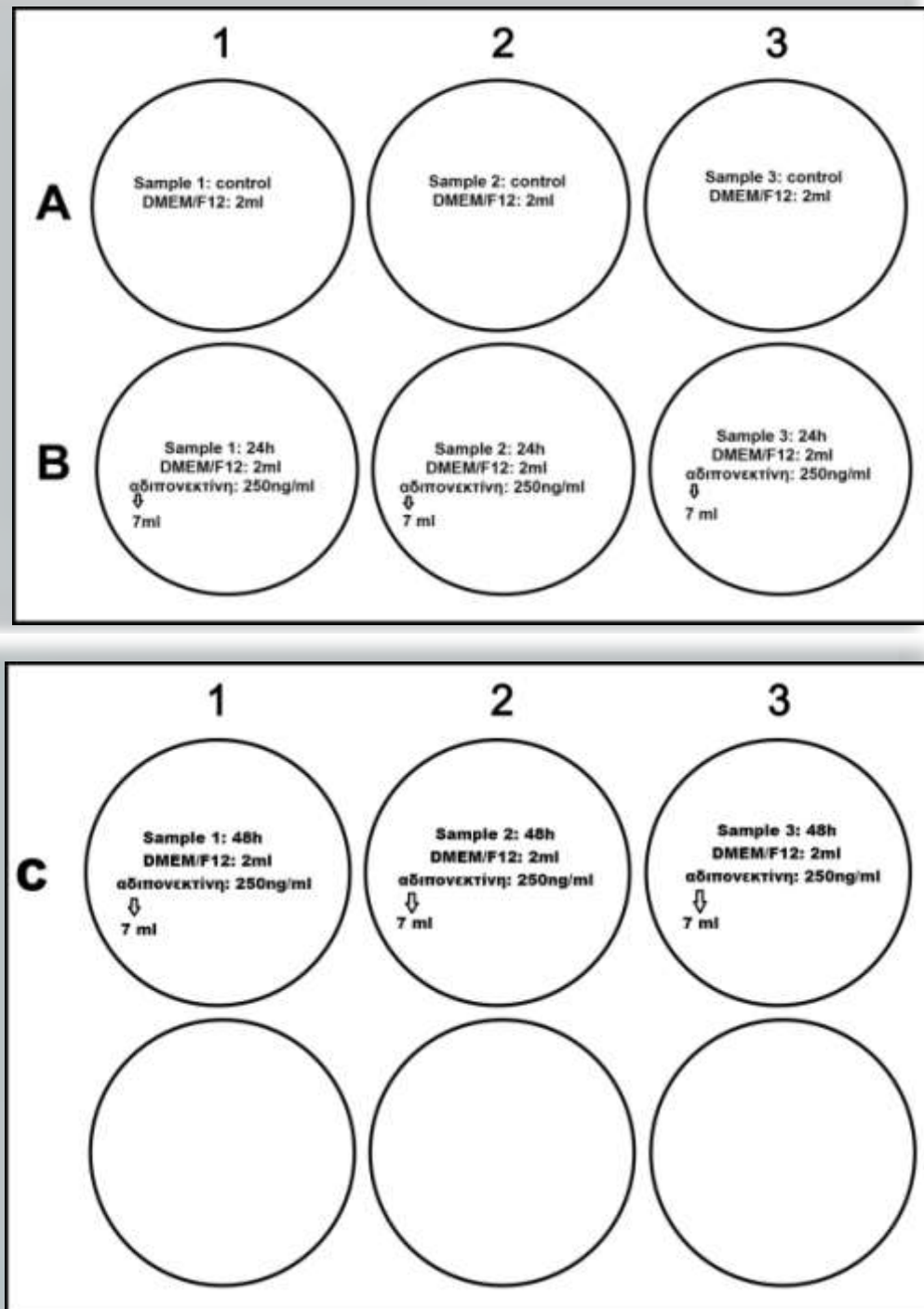
- ✘ Τοποθέτηση κρυοφιαλίδιων στο υδατόλουτρο των 37°C μέχρι την αρχική ρευστοποίηση των δειγμάτων.
- ✘ Μεταφορά των δειγμάτων σε falcon με παράλληλη προθήκη 2 ml θρεπτικού μέσου.
- ✘ Φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 min.
- ✘ Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη 5 ml θρεπτικού σε κάθε falcon.
- ✘ Μεταφορά σε φλάσκες των 25 ml και αποθήκευση στον κλίβανο.

Επίδραση με αδιπονεκτίνη

Τα κύτταρα της φλάσκας μοιράζονται σε πιατάκια των 6 θέσεων (6 well plates). Όταν τα κύτταρα καλύψουν περίπου το 60 % της επιφάνειας, αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και προστίθεται 2 ml θρεπτικού υλικού που περιέχει τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη αλλά όχι ορό FBS. Αυτή η διαδικασία καλείται starvation, διαρκεί μία μέρα και σκοπός είναι να προετοιμάσει τη κύτταρα για την επερχόμενη επαγωγή με την αδιπονεκτίνη. Την επόμενη μέρα ξεκινάει η επίδραση με την ανθρώπινη ανασυνδυασμένη αδιπονεκτίνη (εταιρεία : R&D SYSTEMS)

- ✘ Αρχικά αφαιρείται το θρεπτικό υλικό από τα 6-well plates με πιπέτα παστέρ, 24 ώρες μετά το starvation.
- ✘ Ξέπλυμα με 2 ml PBS και αφαίρεση αυτού.
- ✘ Διαχωρισμός των πηγαδιών σε 3 κατηγορίες: 1^η κατηγορία – controls,
- ✘ 2^η κατηγορία – επίδραση με αδιπονεκτίνη για 24h, 3^η κατηγορία – επίδραση με αδιπονεκτίνη για 48h (Εικόνα 12)

- ✎ Σε όλα τα δείγματα προστέθηκε 2 ml θρεπτικού υλικού DMEM/F12. Ακόμη σε όλα τα δείγματα εκτός από τα controls προστέθηκε αδιπονεκτίνη 5ml , τελικής συγκέντρωσης 250ng/ml.
- ✎ Επώαση στον κλίβανο για 24h και 48h.



Εικόνα 12: Πιατάκια των 6 θέσεων (6 well plates) στα οποία απεικονίζονται οι επιδράσεις με την αδιπονεκτίνη που πραγματοποιήθηκαν.

Μετά το πέρας των παραπάνω χρονικών διαστημάτων, ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- ✎ Προσθήκη 2 ml PBS για ξέπλυμα και αφαίρεση αυτού.
- ✎ Προσθήκη 500 µl θρυψίνης για την αποκόλληση των κυττάρων και επώαση στον κλίβανο για 10 min.
- ✎ Έλεγχος των 6 – well plates στο οπτικό μικροσκόπιο για την επιβεβαίωση των αποκολλημένων κυττάρων.
- ✎ Προσθήκη 2 ml καλλιεργητικού μέσου σε κάθε πιατάκι για την καταστολή της θρυψίνης.
- ✎ Μεταφορά των κυττάρων και του θρεπτικού σε falcon για φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 min.
- ✎ Αφαίρεση καλλιεργητικού μέσου και προσθήκη 5 ml PBS για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων θρυψίνης.
- ✎ Δεύτερη φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 5 min.
- ✎ Αφαίρεση PBS και αναμονή έως ότου στεγνώσουν τα falcon από την υπόλοιπη ποσότητα του PBS.
- ✎ Αποθήκευση των falcon που περιέχουν ως ίζημα τα κύτταρα, στους -80°C για την πραγματοποίηση του επόμενου σταδίου.

Απομόνωση των πρωτεϊνών από τα κύτταρα

- ✎ Απόψυξη των κυττάρων σε υδατόλουτρο στους 37°C .
- ✎ Προσθήκη 5 ml PBS σε κάθε falcon και φυγοκέντρηση των κύτταρων στις 2000 rpm για 5 min.
- ✎ Αφαίρεση του υπερκειμένου και αναμονή έως ότου στεγνώσει καλά το ίζημα.
- ✎ Σε κάθε falcon προσθέτουμε 100 µl RIPA buffer το οποίο χρησιμοποιείται για τη λύση των κυττάρων μέσω διάσπασης της κυτταρικής μεμβράνης. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 10 µl ενός μίγματος αναστολέων πρωτεασών.
- ✎ Μεταφορά των δειγμάτων από τα falcons σε eppendoffs. Τοποθέτηση των eppendoffs σε πάγο και ανά 10 min γίνεται έντονο vortex για ενίσχυση της διάτρησης των κυτταρικών μεμβρανών.
- ✎ Φυγοκέντρηση στις 13000 rpm για 15 min

- Απομόνωση του υπερκειμένου και μεταφορά σε νέα eppendofis.
- Διατήρηση των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων στους -80°C .

Υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα δείγματα

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα δείγματα πραγματοποιείται με πολλούς μεθόδους. Ωστόσο ευρέως διαδεδομένη σε πολλά ερευνητικά εργαστήρια είναι η δοκιμασία Bradford, η οποία είναι μια χρωματομετρική μέθοδος. Η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στην αναλογική πρόσδεση της χρωστικής Coomassie, στις πρωτεΐνες του δείγματος. Η παραπάνω χρωστική απορροφά στα 595 nm. Η ένταση του χρώματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα, όσο εντονότερο είναι το χρώμα μετά την προσθήκη της πρωτεΐνης, τόσο περισσότερη πρωτεΐνη υπάρχει στο εκχύλισμα.

Για να γίνει η ποσοτικοποίηση μιας πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα, αρχικά κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία δημιουργείται με το προσδιορισμό της BSA σε διάφορες συγκεντρώσεις. Από την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία σχεδιάζεται με βάση την απορρόφηση των διαλυμάτων της BSA, υπολογίζεται η συγκέντρωση του άγνωστου δείγματος σε mg/ml. Στην παρούσα μελέτη, για τη φωτομέτρηση χρησιμοποιήθηκαν 5 μl πρωτεΐνης από κάθε δείγμα και 450 μl χρωστικής.

Ανοσοαποτύπωση – Western blot analysis

Η ανάλυση Western blot ή αλλιώς ανοσοεντοπισμός είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση συγκεκριμένου μοριακού βάρους πρωτεϊνών σε ένα πρωτεϊνικό εκχύλισμα. Περιλαμβάνει δύο βασικά μέρη: την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε gel πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS, για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών και την ανίχνευση της επιθυμητής πρωτεΐνης σε ειδική μεμβράνη μετά από την επώαση με το κατάλληλο αντίσωμα. Τα βήματα αυτής της μεθόδου που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- Προετοιμασία ειδικού μίγματος όγκου 24μl που περιέχει την πρωτεΐνη (στην κατάλληλη συγκέντρωση 10 – 50 μgr), την χρωστική – 5 μl (sample buffer), το διάλυμα αποδιάταξης – 2μl (reducing buffer) και ddH₂O.
- Μεταφορά των δειγμάτων στη συσκευή της PCR για αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο και με το μέγεθος τους σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS.

- ✎ Δημιουργία gel πολυακρυλαμίδης, παρουσία SDS.
- ✎ Στήσιμο της συσκευής.
- ✎ Δημιουργία Running buffer και τοποθέτηση στη συσκευή.
- ✎ Φόρτωση 24 μl από το κάθε δείγμα στα πηγαδάκια και 5 μl από τον πρωτεϊνικό μάρτυρα.
- ✎ Οι πρωτεΐνες ηλεκτροφορούνται στα 200V και 120mA για 1h.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, ακολουθεί η διαδικασία της ανοσοαποτύπωσης σε μεμβράνη PVDF με τη μέθοδο του semi – dry transfer.

- ✎ Προετοιμασία transfer buffer: 50ml Transfer + 850ml dd H₂O + 100ml μεθανόλη + 1ml antioxidant.
- ✎ Επώαση 4 χαρτιών Whatman – filter papers και του gel της ηλεκτροφόρησης στο transfer buffer.
- ✎ Επώαση της μεμβράνης PVDF σε μεθανόλη για 30sec ώστε να ενεργοποιηθεί η μεμβράνη για τη μεταφορά και τοποθέτηση της μεμβράνης στο transfer buffer.
- ✎ Κατασκευή δομής sandwich στην ειδική συσκευή της μεταφοράς: 3 σφουγγαράκια - 2 Whatman – gel - μεμβράνη PVDF - 2 Whatman -3 σφουγγαράκια (κάθε φορά που τοποθετούμε ένα από τα παραπάνω στρώματα, τα πατάμε με μία πιπέτα pasteur για να μην υπάρχουν φυσαλίδες).
- ✎ Μεταφορά των πρωτεϊνών στην ειδική συσκευή για 30 min στα 30V και 220 mA.
- ✎ Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη βάφεται με τη χρωστική PONSEAU για την εμφάνιση των μπαντών, ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη των πρωτεϊνών στη μεμβράνη και για να επιβεβαιωθεί αν όντως πραγματοποιήθηκε η μεταφορά των πρωτεϊνών.
- ✎ Ξέπλυμα της μεμβράνης με TBS –Tween για 15 min και μετά τρεις φορές για 5 min υπό ανάδευση.
- ✎ Blocking της μεμβράνης για 1h ώστε να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις στη μεμβράνη, blocker: 2.5 gr ειδικού γάλακτος σε 5 ml διαλύματος TBS – Tween.
- ✎ Ξέπλυμα και πάλι για 15 min και 3 φορές για 5 min.

Τη διαδικασία των πλύσεων, ακολουθεί η διαδικασία της επώασης της μεμβράνης με το κατάλληλο αντίσωμα. Η επώαση με το αντίσωμα ακολουθήθηκε 3 φορές: 1^η επώαση με το αντίσωμα έναντι του NF – κB, 2^η επώαση με το αντίσωμα έναντι της ιντεγκρίνης α5β1, 3^η επώαση για το μάρτυρα GADPH. Τα αντισώματα, οι αραιώσεις καθώς και οι εταιρείες από τις οποίες τα προμηθευτήκαμε φαίνονται στο παρακάτω πίνακα:

	ΠΡΩΤΕΪΝΗ	1^ο ΑΝΤΙΣΩΜΑ	2^ο ΑΝΤΙΣΩΜΑ
	NF – κB (p65) : 64kDa	1) Αραίωση 1:100 2) Mouse monoclonal 3) Thermo Scientific, Pierce antibodies	1) Αραίωση 1:10000 2) HRP-GaM goat- anti-mouse 3) Invitrogen
	α5β1 : 125 kDa	1) Αραίωση 1:100 2) Mouse monoclonal 3) R&D systems	<<
	GADPH : 37 kDa	1) Αραίωση 1:1000 2) Mouse monoclonal 3) Santa Cruz Biotechnology	<<

- ☞ Επώαση της μεμβράνης Ο/Ν με το πρώτο αντίσωμα το οποίο είναι αραιωμένο σε TBS – Tween με 1% BSA (δυνατές συγκεντρώσεις αντισώματος : 1/250 – 1/5000).
- ☞ Την επόμενη μέρα, η μεμβράνη ξεπλένεται με TBS – Tween για 15 min και 3 φορές για 5 min υπό ανάδευση.
- ☞ Επώαση της μεμβράνης για 1h με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (δυνατές συγκεντρώσεις αντισώματος: 1/2000 – 1/10000).
- ☞ Ξέπλυμα και πάλι για 15 min και 3 φορές για 5 min.

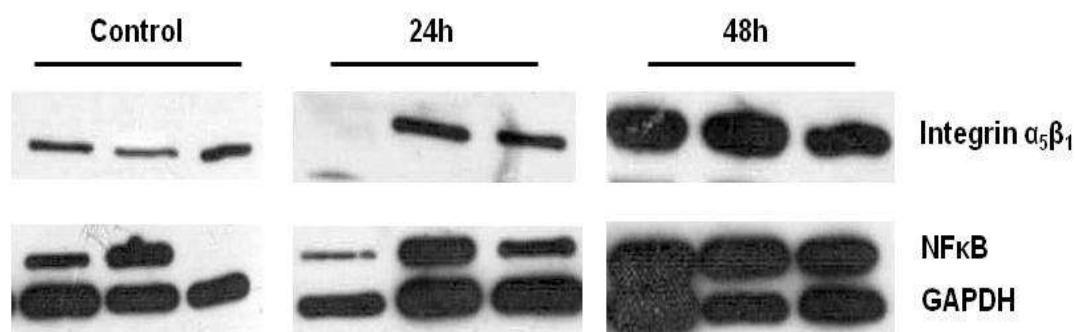
Τέλος ακολουθεί η εμφάνιση των μπαντών των επιθυμητών πρωτεϊνών σε φιλμ. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών, εξαρτάται από την αντίδραση που πραγματοποιείται ανάμεσα στην HRPeroxidase και στο υπόστρωμα της, όπου το άχρωμο υπόστρωμα χρωματίζεται και το παρατηρούμε σε X – ray films.

- ✎ Επώαση της μεμβράνης με ειδικά ενισχυτικά για περίπου 5 min. Η περοξιδάση που είναι συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης σε 3-aminophthalate μέσω διαφόρων ενδιάμεσων. Η αντίδραση συνοδεύεται από εκπομπή φωτός χαμηλής έντασης στα 428 nm. Ωστόσο, υπό την παρουσία ορισμένων χημικών ουσιών, το φως που εκπέμπεται ενισχύεται έως 1000 φορές, καθιστώντας την ανίχνευση του φωτός ευκολότερη και αυξάνοντας την ευαισθησία της αντίδρασης. Αρκετοί ενισχυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν, αλλά πολύ αποτελεσματικοί είναι τροποποιημένες φαινόλες και ειδικά p-ιωδοφαινόλη.
- ✎ Μετά την επώαση μεταφέρουμε την μεμβράνη στην κασέτα των films.
- ✎ Σε σκοτεινό δωμάτιο, ανοίγουμε την κασέτα και τοποθετούμε X - ray film.
- ✎ χρόνος παραμονής του film στη μεμβράνη ποικίλλει από δευτερόλεπτα, μέχρι ώρες ακόμη και μία μέρα.
- ✎ Μετά τον πέρας του χρονικού διαστήματος που έχει οριστεί, το film μεταφέρεται στο διάλυμα του developer για όσο χρειαστεί και ελέγχεται η ύπαρξη των επιθυμητών μπαντών.
- ✎ Τέλος εμβαπτίζεται το film στο διάλυμα του fixer και ξεπλένεται στο ddH₂O.

Αποτελέσματα

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για την διεξαγωγή των αποτελεσμάτων αναφέρθηκε διεξοδικά παραπάνω.

Συνοπτικά, σε πρωτογενείς καλλιέργειες τροφοβλατικών κυττάρων έγινε επίδραση με την αδιπονεκτίνη, συγκεκριμένης συγκέντρωσης, αλλά για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, 24h και 48h. Εν συνεχεία, απομονώθηκε από το κάθε δείγμα το πρωτεϊνικό εκχύλισμα, και με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης, ανιχνεύθηκε η παρουσία και η έκφραση του NF – Kβ, της ιντεγκρίνης α5β1 και του μάρτυρα GAPDH. Τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης φαίνονται παρακάτω:



Όπως φαίνεται, η χορήγηση συγκεκριμένης συγκέντρωσης αδιπονεκτίνης 250ng/ml, αύξησε την έκφραση των NF – Kβ και της ιντεγκρίνης α5β1 ενώ μετά τις 48 ώρες η έκφραση αυτών φαίνεται να αυξάνεται ακόμη περισσότερο. Όσον αφορά το μάρτυρα GAPDH, η έκφραση του παραμένει σταθερή.

Συζήτηση

Η σωστή ανάπτυξη του πλακούντα εγγυάται τη βέλτιστη ανάπτυξη του εμβρύου αλλά και την φυσιολογική εξέλιξη της κύησης. Καθοριστικό ρόλο στην διαδικασία της πλακουντοποίησης διαδραματίζουν οι κυτταροτροφοβλάστες που χαρακτηρίζονται τόσο από την ικανότητα του πολλαπλασιασμού όσο και από την ικανότητα της διαφοροποίησής τους. Η διαφοροποίηση των κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης επιτυγχάνεται μέσω του λαχνωτού και του εξωλάχνιου μονοπατιού. Στο λαχνωτό μονοπάτι, οι κυτταροτροφοβλάστες συντήκονται με απώτερο στόχο την ανάπτυξη της συγκιοτροφοβλάστης. Αντίθετα στο εξωλάχνιο, τα κυτταροτροβλαστικά κύτταρα αποκτώντας μεταναστευτικό και διηθητικό φαινότυπο, διηθούν το φθαρό και τις μητρικές αρτηρίες, επιτυγχάνοντας αρχικά την εμφύτευση των πλακουντιακών λαχνών στο μυομήτριο και εγκαθιδρύοντας μετέπειτα την μητροπλακουντιακή κυκλοφορία.

Η μετανάστευση των κυτταροτροφοβλαστών σηματοδοτείται από τις ιντεγκρίνες, οι οποίες μεταβιβάζοντας σήματα από το εξωκυττάριο περιβάλλον, αναδιαμορφώνουν τον κυτταροσκελετό υποβοηθώντας έτσι την κυτταρική μετανάστευση. Συγκεκριμένα, είναι πλέον γνωστό ότι οι κυτταροτροφοβλάστες που μεταναστεύουν εκφράζουν την ιντεγκρίνη $\alpha 5 \beta 1$ (Damsky et al. 1994).

Όσον αφορά τη διήθηση μία πληθώρα παραγόντων όπως οι ιντερλευκίνες 6, 10, 11, ο ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας – LIF, η αγγειοτενσίνη II και η λεπτίνη ενέχονται στο έλεγχο της ρύθμισης των διηθητικών ιδιοτήτων αυτών των κυττάρων μέσω ρύθμιση της έκκρισης των μεταλλοπρωτεϊνών (MMPs) καθώς και των αναστολέων τους (TIMPs) (Castellucci et al., 2000; Gonzalez et al., 2001; Qiu et al., 2004; Araki-Taguchi et al., 2008; Fitzgerald et al., 2008; Pang et al., 2008).

Μία ακόμη ενδιαφέρουσα κυτοκίνη που συμμετέχει στην ανάπτυξη του πλακούντα είναι η αδιπονεκτίνη. Η συμμετοχή της αδιπονεκτίνης στην επαγωγή της μετανάστευσης και της διήθησης των τροφοβλαστικών κυττάρων αποδεικνύει ακόμη ένα ρόλο αυτής της πλειοτροπικής ορμόνης (Benetrau et al., 2010). Η αδιπονεκτίνη επάγει την κυτταρική μετανάστευση σε HTR-8/Svneo καλλιέργειες αθανοποιημένων τροφοβλαστών όπως φάνηκε με τη μέθοδο της wound healing assay (Benetrau et al., 2010). Εντονότερο ήταν το φαινόμενο, όταν τα συγκεκριμένα κύτταρα επώαστηκαν με αδιπονεκτίνη συγκέντρωσης 250ng/ml για 48 ώρες εν σύγκριση με εκείνα που επώαστηκαν με την ίδια συγκέντρωση για 24 ώρες, ενώ η επώαση των κυττάρων με

αδιπονεκτίνη σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις οδήγησε στην κυτταρική μετανάστευση αλλά σε χαμηλότερα ποσοστά. Η συγκεκριμένη αδιποκίνη εκκρίνεται από το ενδομητρίο και όχι από τον πλακούντα όπως είχε αρχικά προταθεί ενώ αντίθετα οι υποδοχείς της AdipoR1/R2 εκφράζονται στον πλακούντα του πρώτου τριμήνου αλλά και στα αθανοτοποιημένα κύτταρα HTR-8/SVneo cells (Benetrau et al., 2009 ; 2010).

Η ατελής πλακουντοποίηση που προκύπτει από την ανεπαρκή διήθηση των EVT's έχει συνδεθεί με την εμφάνιση της προεκλαμψίας και της ενδόμητριας καθυστέρησης της ανάπτυξης ενώ η χαμηλή συγκέντρωση της μητρικής αδιπονεκτίνης του πλάσματος σε γυναίκες με προεκλάμψια ενισχύει την άποψη της συμμετοχής της αδιπονεκτίνης στον έλεγχο της μετανάστευσης και της διήθησης (Takemura et al. 2006a, Nien et al. 2007, Fasshauer et al. 2008, Herse et al. 2009)

Επιπρόσθετα η επαγωγή της κυτταρικής μετανάστευσης μετά από τη χορήγηση της ανθρώπινης ανασυνδυασμένης αδιπονεκτίνης παρατηρήθηκε και σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη (Tang & Lu 2009), σε προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Nakamura et al. 2009), καθώς και σε κύτταρα του χονδροσαρκώματος (Chiu et al. 2009). Επιπλέον στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη και του χονδροσαρκώματος, βρέθηκε πως η αδιπονεκτίνη επάγει την κυτταρική μετανάστευση μέσω των κινασών p38 και AMPK, οι οποίες με τη σειρά του σηματοδοτούν τη μεταφορά του πυρηνικού παράγοντα NF – κB από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, με στόχο την ρύθμιση μεταγραφής διάφορων γονιδίων που ενέχονται στη μετάσταση και στη διήθηση αυτών των κυττάρων (Chiu et al. 2009; Tang & Lu 2009). Πλέον, αυτό που μας ενδιαφέρει είναι να αποκαλύψουμε τον πιθανό μοριακό μηχανισμό με το οποίο δρα η αδιπονεκτίνη στην κινητικότητα των κυττάρων.

Δεν αποκλείεται λοιπόν το γεγονός τα παραπάνω σηματοδοτικά μόρια να ενέχονται και στον πιθανό μοριακό μηχανισμό της μετανάστευσης των τροφοβλαστών εφόσον τα τελευταία παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με τα καρκινικά μεταστατικά κύτταρα.

Στο δικό μας πείραμα χορηγήσαμε αδιπονεκτίνη σε πρωτογενείς τροφοβλαστικές καλλιέργειες σε συγκέντρωση 250ng/ml τόσο για 24 όσο και για 48 ώρες και μελετήσαμε την έκφραση της ιντεγκρίνης α5β1 και του NF – κB.

Εμείς παρατηρήσαμε ότι η χορήγηση της αδιπονεκτίνης για 48 ώρες αυξάνει την έκφραση της ιντεγκρίνης α5β1 και του NF – κB σε σχέση με τα δείγματα control στα οποία δεν είχαμε χορηγήσει αδιπονεκτίνη.

Συμπερασματικά, επιβεβαιώσαμε τη συμμετοχή του NF – Κβ και της ιντεγκρίνης α5β1 στο πιθανό μηχανισμό της κυτταρικής μετανάστευσης στην τροφοβλάστη που επάγεται από την αδιπονεκτίνη.

Επόμενος ερευνητικός στόχος αποτελεί η ανίχνευση των ενδιάμεσων σηματοδοτικών μορίων όπως πιθανώς αυτά των κινασών p38 και AMPK .

Βιβλιογραφία

- Anin SA, Vince G and Quenby S. **Trophoblast invasion.** *Human Fertility* 2004;7:169–174.
- Araki-Taguchi M, Nomura S et al. **Angiotensin II mimics the hypoxic effect on regulating trophoblast proliferation and differentiation in human placental explant cultures.** *Life Sciences* 2008;82:59–67.
- Archanco M, Gomez-Ambrosi J, Tena-Sempere M et al. **Expression of leptin and adiponectin in the rat oviduct.** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2007;55:1027 – 1037.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N et al. **Paradoxical decrease of an adipose specific protein, adiponectin, in obesity.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 257:79–83.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N et al. **Adipocyte – derived plasma protein adiponectin acts as a platelet – derived growth factor – BB – binding protein and regulates growth factor – induces common post – receptor signal in vascular smooth muscle cell.** *Circulation* 2002;105:2893- 2898.
- Aroda V, Ciaraldi TP, Chang S et al. **Circulating and cellular adiponectin in polycystic ovary syndrome: relationship to glucose tolerance and insulin action.** *Fertility and Sterility* 2008;89: 1200–1208.
- Aye ILMH, Powell TL and Jansson T. **Adiponectin – The Missing Link between Maternal Adiposity, Placental Transport and Fetal Growth?** *Placenta* 2013;34:40–45.
- Baessle A, Schlossbauer S, Stark K et al. **Adiponectin multimeric forms but not total adiponectin levels are associated with myocardial infarction in non-diabetic men.** *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2011;18:616–627.
- Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD et al. **Type 2 diabetes after gestational diabetes a systematic review and meta-analysis.** *Lancet* 2009; 373: 1773-1779.
- Benaitreau D, Dieudonne MN, Dos Santos E et al. **Antiproliferative Effects of Adiponectin on Human Trophoblastic Cell Lines JEG-3 and BeWo.** *Biology Of Reproduction* 2009; 80: 1107–1114.
- Benaitreau D, Dieudonne MN, Dos Santos E et al. **Adiponectin promotes syncytialisation of BeWo cell line and primary trophoblast cells.** *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010a;8:1-12.
- Benaitreau D, Dos Santos E, Leneveu MC et al. **Effects of adiponectin on human trophoblast invasion.** *Journal of Endocrinology* 2010b;207:45–53.
- Berg AH and Scherer PE. **Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease.** *Circulation Research* 2005; 96: 939–949.
- Bersinger NA, Birkhauser MH and Wunder DM. **Adiponectin as a marker of success in intracytoplasmic sperm injection/embryo transfer cycles.** *Gynecological Endocrinology* 2006; 22: 479–483.
- Bik W, Baranowska-Bik A, Wolinska-Witort E et al. **The relationship between metabolic status and levels of adiponectin and ghrelin in lean women with polycystic ovary syndrome.** *Gynecological Endocrinology* 2007; 23:325-331.
- Bischof P, Meisser A and Campana A. **Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion – a review.** *Placenta* 2000;21: 55–60.

- Brosens JJ, Pijnenborg R and Brosens IA. **The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2002; 187:1416-1423.
- Buhi WC, Alvarez IM and Kouba AJ. **Secreted proteins of the oviduct.** *Cells Tissues Organs* 2000; 166:165–179.
- Burrows TD, King A and Loke YW. **Trophoblast migration during human placental Implantation.** *Human Reproduction Update* 1996;2:307–321.
- Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R et al. **Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005;90:4276–4286.
- Campos DB, Palin MF, Bordignon V et al. **The ‘beneficial’ adipokines in reproduction and fertility.** *International Journal of Obesity (Lond)* 2008;32:223–231.
- Carmina E. **Diagnosis of polycystic ovary syndrome: from NIH criteria to ESHRE-ASRM guidelines.** *Minerva Gynecology* 2004;56:1-6.
- Carson DD, Bagchi I, Dey SK et al. **Embryo implantation.** *Developmental Biology* 2000;223:217-237.
- Castellucci M, De Matteis R, Meisser A et al. **Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion.** *Molecular Human Reproduction* 2000; 6:951–958.
- Catalano PM, Hoegh M, Minium J et al. **Adiponectin in human pregnancy implications for regulation of glucose and lipid metabolism.** *Diabetologia* 2006;49:1677-1685.
- Ceddia RB, Somwar R, Maida A et al. **Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells.** *Diabetologia* 2005;48: 132-139.
- Chandran M Phillips SA, Ciaraldi T et al. **Adiponectin: More Than Just Another Fat Cell Hormone?** *DIABETES CARE* 2003; 26: 2442 – 2450.
- Chen H, Montagnani M, Funahashi Tet al. **Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells.** *Journal of Biological Chemistry* 2003;278: 45021-45026.
- Chiu YC, Shieh DC, Tong KM et al. **Involvement of AdipoR receptor in adiponectin-induced motility and $\alpha_2\beta_1$ integrin up-regulation in human chondrosarcoma cells.** *Carcinogenesis* 2009;30:1651–1659.
- Čikoš^{*}S, Burkuš J, Bukovská A et al. **Expression of adiponectin receptors and effects of adiponectin isoforms in mouse preimplantation embryos.** *Human Reproduction* 2010;25:2247-2255.
- Combs TP, Berg AH, Rajala MW et al. **Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin.** *Diabetes* 2003;52:268–276.
- Dadson K, Liu Y and Sweeney G. **Adiponectin action: a combination of endocrine and autocrine/paracrine effects.** *Frontiers in Endocrinology* 2011;2:1-14.
- Dafopoulos K, Sourlas D, Kallitsaris A, Pournaras S and Messinis IE. **Blood ghrelin, resistin, and adiponectin concentrations during the normal menstrual cycle.** *Fertility and Sterility* 2009; 92:1389-1394.
- Dalamaga M, Diakopoulos KN and Mantzoros CS. **The Role of Adiponectin in Cancer: A Review of Current Evidence.** *Endocrine Reviews* 2012;33:547–594.
- Damsky CH, Librach C, Lim KH et al. **Integrin switching regulates normal trophoblast invasion.** *Development* 1994;120:3657–3666.

Denzel MS, Hebbard LW, Shostak G et al. **Adiponectin deficiency limits tumor vascularization in the MMTV-PyV-mT mouse model of mammary cancer.** *Clinical Cancer Research* 2009; 15:3256 – 3264.

Dos Santos E, Serazin V, Morvan C et al. **Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation.** *Fertility and Sterility* 2012;97:771-778.

Dunaif A. **Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanisms and implications for pathogenesis.** *Endocrine Reviews* 1997;18:774-800.

Dupont J, Chabrolle C, Rame C et al. **Role of the peroxisome proliferator-activated receptors, adenosine monophosphate-activated kinase, and adiponectin in the ovary.** *PPAR Research* 2008;2008:176275.

Ehrmann DA. **Polycystic ovary syndrome.** *New England Journal of Medicine* 2005;352:1223–1236.

Eng GS, Sheridan RA, Wyman A et al. **AMP kinase activation increases glucose uptake, decreases apoptosis, and improves pregnancy outcome in embryos exposed to high IGF-I concentrations.** *Diabetes* 2007;56:2228– 2234.

Escobar-Morreale HF, Villuendas G et al. **Adiponectin and resistin in PCOS: a clinical, biochemical and molecular genetic study.** *Human Reproduction* 2006; 21:2257–2265.

Even-Ram S, Uziely B, Cohen P et al. **Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes.** *Nature Medicine* 1998;4:909–914.

Fajas L, Fruchart JC and Auwerx J. **Transcriptional control of adipogenesis.** *Current Opinion in Cell Biology* 1998;10:165–173.

Fasshauer M, Waldeyer T, Seeger J et al. **Circulating high-molecular weight adiponectin is upregulated in preeclampsia and is related to insulin sensitivity and renal function.** *European Journal of Endocrinology* 2008;158:197–201.

Feig DS, Zinman B, Wang X et al. **Risk of development of diabetes mellitus after diagnosis of gestational diabetes.** *C.M.A.J.* 2008;179: 229-234.

Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E et al. **Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3).** *Human Reproduction Update* 2008;14:335–344.

Fruebis J, Tsao T S, Javorschi S et al. **Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98: 2005–2010.

Gable DR, Hurel SJ and Humphries SE. **Adiponectin and its gene variants as risk factors for insulin resistance, the metabolic syndrome and cardiovascular disease.** *Atherosclerosis* 2006;188:231–244.

Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW et al. **Regulation of human placental development by oxygen tension.** *Science* 1997; 277: 1669–1672.

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

Chabrolle C, Tosca L, Rame C et al. **Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells.** *Fertility and Sterility* 2009;92:1988-1996.

Giancotti FG and Ruoslahti E. **Integrin Signaling.** *Science* 1999;285:1028-1032.

Gil-Campos M, Canete RR and Gil A. **Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity.** *Clinical Nutrition* 2004;23:963–74.

Glintborg D, Frystyk J, Hojlund K et al. **Total and high molecular weight (HMW) adiponectin levels and measures of glucose and lipid metabolism following pioglitazone treatment in a randomized placebo- controlled study in polycystic ovary syndrome.** *Clinical Endocrinology (Oxf)* 2008;68:165–174.

Goldstein BJ and Scalia R. **Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004;89:2563–2568.

Goldstein BJ, Scalia RG and Ma XL. **Protective vascular and myocardial effects of adiponectin.** *Nature Reviews Cardiology* 2009;6:27–35.

Gonzalez RR, Devoto L, Campana A et al. **Effects of leptin, interleukin-1 α , interleukin-6, and transforming growth factor- β on markers of trophoblast invasive phenotype: integrins and metalloproteinases.** *Endocrine* 2001;15:157–164.

Gutman G, Barak V, Maslovitz S et al. **Recombinant luteinizing hormone induces increased production of ovarian follicular adiponectin in vivo: implications for enhanced insulin sensitivity.** *Fertility and Sterility* 2008; 91:1837–1841.

Guzel S and Yalcin A. **Adiponectin and Its Protective Effects.** *J. BIOL. ENVIRON. SCI.*, 2012;6:135–139.

Gyles SL, Burn CJ, Whitehouse BJ et al. **ERKs Regulate Cyclic AMP-induced Steroid Synthesis through Transcription of the Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) Gene.** *The Journal Of Biological Chemistry* 2001;276:34888–34895.

Halberg N, Schraw TD, Wang ZV et al. **Systemic fate of the adipocyte-derived factor adiponectin.** *Diabetes* 2009;58:1961–1970.

Han LY, Wu QH, Jiao ML et al. **Associations between single-nucleotide polymorphisms (+45T>G, +276G>T, –11377C>G, –11391G>A) of adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis.** *Diabetologia* 2011;54:2303–2314.

Hebbard LW, Garlatti M, Young LJ et al. **T-Cadherin supports angiogenesis and adiponectin association with the vasculature in a mouse mammary tumor model.** *Cancer Research* 2008; 68:1407–1416.

Herse F, Bai Y, Staff AC et al. **Circulating and uteroplacental adipocytokine concentrations in preeclampsia.** *Reproductive Sciences* 2009;16:584–590.

Holland WL, Miller RA, Wang ZV et al. **Receptor – mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin.** *Nature Medicine* 2011;17:55– 63.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y et al. **Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients.** *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2000; 20:1595–1599.

Howe A, Aplin AE, Alahari SK et al. **Integrin signaling and cell growth control.** *Current Opinion in Cell Biology* 1998;10:220–231.

Hoyda TD, Fry M, Ahima RS et al. **Adiponectin selectively inhibits oxytocin neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus.** *Journal of Physiology* 2007;585:805–816.

Hu E, Liang P and Spiegelman BM. **AdipoQ is a novel adipose specific gene dysregulated in obesity.** *Journal of Biological Chemistry* 1996;271:10697–10703.

Hug C, Wang J, Ahmad NS et al. **T – cadherin is a receptor for hexameric and high molecular weight forms of Acrp30/adiponectin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2004; 101:10308–10313.

Humphries MJ. **Integrin structure.** *Biochemical Society Transactions* 2000;28:311–339.

Irish JM, Kotecha N and Nolan GP. **Mapping normal and cancer cell signalling networks: towards single-cell proteomics.** *Nature Reviews Cancer* 2006;6:146–155.

Jansson N, Nilsson A, Gellerstedt M et al. **Maternal hormones linking maternal body mass index and dietary intake to birth weight.** *American Journal of Clinical Nutrition* 2008;87:1743–1749.

Kadowaki T and Yamauchi T. **Adiponectin and adiponectin receptors.** *Endocrinology Reviews* 2005; 26:439–51.

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N et al. **Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome.** *Journal of Clinical Investigation* 2006;116:1784–1792.

Kadyrov M, Kingdom JC and Huppertz B. **Divergent trophoblast invasion and apoptosis in placental bed spiral arteries from pregnancies complicated by maternal anemia and early-onset preeclampsia/intrauterine growth restriction.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2006;194: 557–563.

Kahn BB, Alquier T, Carling D et al. **AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism.** *Cell Metabolism* 2005;1:15–25.

Kim C, Newton KM and Knopp RH. **Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review.** *Diabetes Care* 2002; 25: 1862–1868.

Kim ST, Marquard K and Stephens S. **Adiponectin and adiponectin receptors in the mouse preimplantation embryo and uterus.** *Human Reproduction (Oxf)* 2011;26: 82–95.

Knöfler M. **Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion.** *The International Journal of Developmental Biology* 2010;54:269–280.

Kotani Y, Yokota I, Kitamura S et al. **Plasma adiponectin levels in newborns are higher than those in adults and positively correlated with birth weight.** *Clinical Endocrinology* 2004;61:418–23.

Lala PK and Graham CH. **Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: The role of proteases and protease inhibitors.** *Cancer Metastasis Reviews* 1990; 9: 369–379.

Lala PK, Lee BP, Xu G et al. **Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression.** *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2002; 80:142–149.

Lala PK and Chakraborty C. **Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: Possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury.** *Placenta* 2003;24:575–587.

Lagaly DV, Aad PY, Grado-Ahuir JA et al. **Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function.** *Molecular and Cellular Endocrinology* 2008;284:38–45.

Landskroner-Eiger S, Qian B et al. **Proangiogenic contribution of adiponectin toward mammary tumor growth in vivo.** *Clinical Cancer Research* 2009;15:3265–3276.

Lappas M, Yee K, Permezel M et al. **Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies.** *Journal of Endocrinology* 2005;186:457–65.

Ledoux S, Campos DB, Lopes FL et al. **Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells.** *Endocrinology* 2006;147:5178–5186.

Leese HJ. **The formation and function of oviduct fluid.** *Journal of Reproduction and Fertility* 1988;2:843 – 856.

Li G, Cong L, Gasser J et al. **Mechanisms underlying the anti – proliferative actions of adiponectin in human breast cancer cells. MCF7-dependency on the cAMP/protein kinase-A pathway.** *Nutrition and Cancer* 2011;63:80 – 88.

Libby P. **Inflammation in atherosclerosis.** *Nature* 2002;420:868-74.

Liu PY, Death AK, and Handelsman DJ. **Androgens and cardiovascular disease.** *Endocrine Reviews* 2003;24:313-340.

Liu PY, Wishart SM, Celermajer DS et al. **Do reproductive hormones modify insulin sensitivity and metabolism in older men? A randomized, placebo – controlled clinical trial of recombinant human chorionic gonadotrophin.** *European Journal of Endocrinology* 2003; 148:55–66.

Liu J, Lam JB, Chow KH et al. **Adiponectin stimulates Wnt inhibitory factor-1expression through epigenetic regulations involving the transcription factor specificity protein 1.** *Carcinogenesis* 2008;29:2195–2202.

Lord E, Ledoux S, Murphy B et al. **Expression of adiponectin and its receptors in swine.** *Journal of Animal Science* 2005;83:565–78.

Louden E, Chi M and Moley K. **Crosstalk between the AMP-activated kinase and insulin signaling pathways rescues murine blastocyst cells from insulin resistance.** *Reproduction* 2008;136:335 – 344.

Low CF, Mohd Tohit E, Chong PP. **Adiponectin SNP45TG is associated with gestational diabetes mellitus.** *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2001;283:1255-1260.

Lu M, Tang Q, Olefsky JM et al. **Adiponectin activates adenosine monophosphate-activated protein kinase and decreases luteinizing hormone secretion in LbetaT2 gonadotropes.** *Molecular Endocrinology* 2008;22:760-771.

Lunghi L, Ferretti ME, Medici S et al. **Control of human trophoblast function.** *Reproductive Biology and Endocrinology* 2007;5:1-14.

Luo XH, Guo LJ, Yuan LQ et al. **Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway.** *Experimental Cell Research* 2005; 309:99–109.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I et al. **cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1).** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996;221:286–9.

Mantzoros CS, Rifas-Shiman SL, Williams CJ et al. **Cord blood leptin and adiponectin as predictors of adiposity in children at 3 years of age: a prospective cohort study.** *Pediatrics* 2009;123:682–689.

Mao X, Kikani CK, Riojas RA et al. **APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function.** *Nature Cell Biology* 2006;8:516–523.

Mazaki-Tovi S, Kanety H, Pariente C et al. **Maternal serum adiponectin levels during human pregnancy.** *Journal of Perinatology* 2007;27:77–81.

Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR et al. **Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes.** *New England Journal of Medicine* 2008; 358:1991-2002.

Michalakis KG and Segars JH. **The role of adiponectin in reproduction:from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction.** *Fertility and Sterility* 2010;94:1949-1957.

Miyazaki T, Bub JD, Uzuki M et al. **Adiponectin activates c-Jun NH2-terminal kinase and inhibits signal transducer and activator of transcription .** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005;333:79–87

- Motoshima H, Wu X, Sinha MK et al. **Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous adipocytes: effects of insulin and rosiglitazone.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002;87:5662–5667.
- Mullen CA. **Review, analogies between trophoblastic and malignant cells.** *American Journal of Reproduction Immunology* 1997;39:41–49.
- Nakamura N, Naruse K, Matsuki T et al. **Adiponectin promotes migration activities of endothelial progenitor cells via Cdc42/Rac1.** *FEBS Letters* 2009;583:2457–2453.
- Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH et al. **Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin binding protein purified from human plasma.** *Journal of Biochemistry* 1996;120: 803–12.4.
- Nien JK, Mazaki-Tovi S, Romero R et al. **Adiponectin in severe preeclampsia.** *Journal of Perinatal Medicine* 2007;35:503–512.
- Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K et al. **Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein.** *Diabetes* 2002;51:2734–2741.
- Norwitz ER, Schust DJ and Fisher SJ. **Implantation and the survival of early pregnancy.** *New England Journal of Medicine* 2001;345:1400–1408.
- Osborne TF. **Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs):key regulators of nutritional homeostasis and insulin action.** *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:32379–32382.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y et al. **Novel modulator for endothelial adhesion molecules adipocyte – derived plasma protein adiponectin.** *Circulation* 1999; 100: 2473-2476.
- Ouchi N, Kihara S, Funahashi T et al. **Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease.** *Current Opinion in Lipidology* 2003; 114:561–566.
- Pang ZJ, Zhou JG and Huang LP. **Interleukin-10 may participate in regulating trophoblast invasion in human placenta throughout gestation.** *American Journal of Reproductive Immunology* 2008;60:19–25.
- Pierre P, Froment P, Negre D et al. **Role of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in the steroidogenesis of the human granulosa tumor cell line, KGN.** *Human Reproduction* 2009; 24: 2890-2901.
- Qiu Q, Yang M, Tsang BK et al. **EGF-induced trophoblast ecretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways.** *Reproduction* 2004;128 355–128363.
- Redman CW. **Cytotrophoblasts, masters of disguise.** *Nature Medicine* 1997;3:610–611.
- Retnakaran R, Connelly PW, Maguire G et al. **Decreased high molecular weight adiponectin in gestationaldiabetes: implications for the pathophysiology of type 2 diabetes.** *Diabetic Medicine* 2007; 24:245-252.
- Retnakaran A and Retnakaran R . **Adiponectin in Pregnancy: Implications for Health and Disease.** *Current Medicinal Chemistry* 2012;19:5444-5450.
- Roepstorff C, Halberg N, Hillig T et al. **Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise.** *American Journal of Physiology –Endocrinology and Metabolism* 2005;288:133-142.
- Ross R. **Atherosclerosis—an inflammatory disease.** *The New England Journal of Medicine* 1999; 340:115-126.

Saime Guzel and Abdullah Yalcin. **Adiponectin and Its Protective Effects.** *Journal of Environmental Sciences* 2012;6:135-139.

Schatz F and Lockwood CJ. **Progesterone regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 in primary cultures of endometrial stromal and decidual cells.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997;77:621-625.

Scherer PE, Williams S, Fogliano et al. **A novel serum protein similar to C1q produced exclusively in adipocytes.** *Journal of Biological Chemistry* 1995;270:26746–26749.

Schlaepfer DD and Mitra SK. **Multiple connections link fak to cell motility and invasion.** *Current Opinion in Genetics and Development* 2004;14:92–101.

Schmidt T, Fischer S, Tsikolia N et al **Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice embryos.** *Histochemistry and Cell Biology* 2008;129:817– 825.

Schober F, Neumeier M, Weigert J et al. **Low molecular weight adiponectin negatively correlates with the waist circumference and monocytic IL-6 release.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007;361:968–973.

Shapiro L and Scherer PE. **The crystal structure of a complement- 1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor.** *Current Biology* 1998;8:335-338.

Shehzad A, Iqbal W, Shehzad O et al. **Adiponectin: Regulation of its production and its role in human diseases.** *Hormones* 2012;1:8-20.

Sivan E, Mazaki-Tovi S, Pariente C et al. **Adiponectin in human cord blood: relation to fetal birth weight and gender.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88:5656–5660.

Song D, Arikawa E, Galipeau D, et al. **Androgens Are Necessary for the Development of Fructose-Induced Hypertension.** *Hypertension* 2004;43:667-672.

Staiger H, Tschritter O, Machann J et al. **Relationship of Serum Adiponectin and Leptin Concentrations with Body Fat Distribution in Humans.** *Obesity* 2003;11:368–376.

Strickland S and Richards WG. **Invasion of the trophoblasts.** *Cell* 1992;7:355–357.

Takahashi M, Arita Y, Yamagata K et al. **Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin.** *International Journal of Obesity* 2000;24:861–868.

Takemura Y, Osuga Y, Harada M, et al. **Concentration of adiponectin in peritoneal fluid is decreased in women with endometriosis.** *American Journal of Reproductive Immunology* 2005;54:217-221.

Takemura Y, Osuga Y, Koga K et al. **Selective increase in high molecular weight adiponectin concentration in serum of women with preeclampsia.** *Journal of Reproductive Immunology* 2006a;73: 60–65.

Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T et al. **Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium.** *Endocrinology* 2006b;147:3203–3210.

Tang CH and Lu ME. **Adiponectin increases motility of human prostate cancer cells via adipoR, p38, AMPK, and NF-kappaB pathways.** *Prostate* 2009 ;69:1781–1789.

Tomas E, Tsao TS, Saha AK, et al. **Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation.** . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99:16309-16313.

Toth MJ, Cooper BC, Pratley RE et al. **Effect of ovarian suppression with gonadotropin-releasing hormone agonist on glucose disposal and insulin secretion.** *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2008;294:1035-1045.

Toulis KA, Goulis DG, Farmakiotis D et al. **Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and a meta-analysis.** *Human Reproduction Update*. 2009; 15:297–307.

Tsao TS, Tomas E, Murrey HE et al. **Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. Different oligomers activate different signal transduction pathways.** *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:50810–50817.

Tugwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S. **The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene.** *EMBO Journal* 1992;11:433-439.

Turer AT, Khera A, Ayers CR et al. **Adipose tissue mass and location affect circulating adiponectin levels.** *Diabetologia* 2011;54:2515–2524.

van Kruijsdijk RC, van der Wall E and Visseren FL. **Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue.** *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 2009; 18:2569 –2578.

Varanou A, Withington SL, Lakasing L et al. **The importance of cysteine cathepsinproteases for placental development.** *Journal of Molecular Medicine* 2006; 84: 305-317.

Vionnet N, Hani El-H, Dupont S et al. **Genome wide search for type 2 diabetes susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2 diabetes locus on chromosome 1q21–q24.** *American Journal of Human Genetics* 2000;67:1470–1480.

Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y et al. **Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin.** *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 40352–40363.

Waki H, Yamauchi T, Kamon J et al. **Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1.** *Endocrinology* 2005;146: 790–796.

Wang Y, Xu A, Knight C et al. **Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity.** *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:19521–19529.

Wang Y, Lam JB, Lam KS et al. **Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase -3 β / β -catenin signaling pathway and attenuates mammary tumorigenesis of MDA -MB-231 cells in nude mice.** *Cancer Research* 2006; 66:11462–11470.

Wen JP, Lv WS, Yang J et al. **Globular adiponectin inhibits GnRH secretion from GT1-7 hypothalamic GnRH neurons by induction of hyperpolarization of membrane potential.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008;371:756-761.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S et al. **Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulinresistance and hyperinsulinemia.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86:1930 –1935

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y et al. **Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.** *Nature* 2003;423:762-769.

Yamauchi T and Kadowaki T. **Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases.** *International Journal of Obesity* 2008;32:13-18.

Yilmaz MI, Sonmez A, Caglar K et al. **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) agonist increases plasma adiponectin levels in type 2 diabetic patients with proteinuria.** *Endocrine* 2004;25:207–214.

Zhou Y, Damsky CH, Chio K, et al. **Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblast.** *Journal of Clinical Investigation* 1993;91:950–960.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Larsen WJ (2001). 'Η δεύτερη εβδομάδα της ανάπτυξης', μτφ – επιμ. Αντωνακόπουλος Γ, **Εμβρυολογία του Ανθρώπου**. Αθήνα: ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ, σελ. 35 - 48 (Το πρωτότυπο έργο δημοσιεύτηκε το 1993).