



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Διευθυντής : Ν. Βαμβακόπουλος, Καθηγητής Βιολογίας

ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ ΣΕ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥΣ
ΙΣΤΟΥΣ

ΣΤΕΦΑΝΟΥ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
Βιολόγος-Ιατρός
ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

© 2011 ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΤΕΦΑΝΟΥ

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν.5343/32 αρ. 202 παρ. 2).

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

κ. Βαμβακόπουλος Νικόλαος	Καθηγητής Βιολογίας
κα. Κόλλια Παναγούλα	Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής (ΕΚΠΑ)
κα. Τσέζου Ασπασία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής (επιβλέπουσα)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

κ. Νταλέκος Γεώργιος	Καθηγητής Παθολογίας
κ. Μεσσήνης Ιωάννης	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας
κ. Κουκούλης Γεώργιος	Αν. Καθηγητής Παθολογίας -Ενδοκρινολογίας
κ. Σακκάς Λάζαρος	Καθηγητής Παθολογίας-Ρευματολογίας
κ. Βαμβακόπουλος Νικόλαος	Καθηγητής Βιολογίας
κα. Κόλλια Παναγούλα	Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής(ΕΚΠΑ)
κα. Τσέζου Ασπασία	Αν. Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	σελ.7
-----------------	--------------

1.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Ιστορική αναδρομή	σελ.11
1.2 Γονίδιο – πρωτεΐνη της λεπτίνης	σελ.11
1.3 Γονίδιο – πρωτεΐνη των υποδοχέων της λεπτίνης	σελ.14
1.4 Ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος	σελ.16
1.5 Παραγωγή της λεπτίνης	σελ.18
1.6 Ρύθμιση της παραγωγής της λεπτίνης	σελ.19
1.7 Κεντρική και περιφερικές δράσεις της λεπτίνης	σελ.21
1.8 Ανοσορυθμιστικός ρόλος της λεπτίνης και περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος	σελ.23
1.9 Λεπτίνη και ήπαρ	σελ.27
1.10 Λεπτίνη και καρκίνος	σελ.31
1.10.1 Γενικό μέρος	σελ.31
1.10.2 Λεπτίνη και ηπατοκυτταρικός καρκίνος	σελ.32
1.11 Τελομερή, τελομεράση και ηπατοπάθειες	σελ.33
1.12 Σκοπός της διατριβής	σελ.37

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά και μέθοδοι

2.1.1 Ομάδα μελέτης	σελ.40
2.1.1α. Μελέτη στα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs)	σελ.40
2.1.1β. Μελέτη σε ηπατικό ιστό	σελ.41
2.1.1γ. Διάγνωση χρόνιας λοίμωξης από HBV	σελ.41
2.1.1δ. Διάγνωση χρόνιας λοίμωξης από τον HCV	σελ.42
2.1.1ε. Διάγνωση για το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ):	σελ.43
2.1.2. Απομόνωση κυττάρων	σελ.43
2.1.2.α Απομόνωση μονοπύρρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs)	σελ.43
2.1.2.β Βιοψίες ήπατος	σελ.44
2.1.3 Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια	σελ.44
2.1.4 Μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας	σελ.46

2.1.4α Δοκιμασία MTT για τον προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν	σελ.47
2.1.4β Δοκιμασία MTT για δείγματα	σελ.48
2.1.4γ Ανάλυση αποτελεσμάτων	σελ.49
2.1.5 Απομόνωση ολικού κυτταρικού RNA	σελ.49
2.1.6 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA:complementary DNA)	σελ.51
2.1.7 Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της λεπτίνης, των υποδοχέων της (OB-RI, OB-Rs) και της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR:Real-time polymerase chain reaction)	σελ.53
2.1.8 Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης με τη μέθοδο TRAP (telomeric repeat protocol assay)	σελ.55
2.1.9 Ανίχνευση της λεπτίνης και των προ-φλεγμονωδών παραγόντων με ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay : προσδιορισμός ανοσοπροσρόφησης συνδεδεμένης με ένζυμα)	σελ.56
2.1.10 Ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης (ChIP : Chromatin Immunoprecipitation)	σελ 57
2.1.11 Αποσιώπηση του mRNA του γονιδίου της λεπτίνης	σελ.63
2.1.12 Μελέτη του κυτταρικού κύκλου και της έκφρασης των πρωτεϊνών με κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)	σελ.68
2.1.13 Στατιστική ανάλυση	σελ.69

2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.2.A Μελέτη της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (PBMCs) και τον ορό ασθενών με HBV, HCV	σελ.71
2.2.A.1 Ποσοτικοποίηση των υποδοχέων (OB-RI, OB-Rs) της λεπτίνης στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος	σελ.71
2.2.A.2 Συσχέτιση των επιπέδων mRNA των OB-RI, OB-Rs στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών	σελ.74
2.2.A.3 Έκφραση της λεπτίνης στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος	σελ.77
2.2.A.4 Κυτταρομετρική ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέων της λεπτίνης στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος	σελ.78
2.2.A.5 Μέτρηση των επιπέδων λεπτίνης του ορού και συσχέτισή τους με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών	σελ.80

2.2.B Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της σε βιοψίες ηπατικού ιστού (καρκινικού και φυσιολογικού)	σελ.83
2.2.Γ Διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών δράσης της λεπτίνης σε ηπατοκαρκινικά κύτταρα (HepG2)	σελ.85
2.2.Γ.1 Μελέτη της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και της δραστηριότητας της τελομεράσης σε HepG2 κύτταρα μετά τη χορήγηση λεπτίνης ή την αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης	σελ.85
2.2.Γ.2 Διερεύνηση της συμμετοχής του μοριακού μονοπατιού JAK/STAT3, του δικτύου MYC/MAX/MAD και της ακετυλιωμένης H3 ιστόνης στην επαγόμενη από τη λεπτίνη ενεργοποίηση της έκφρασης της hTERT, με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης	σελ.88
2.2.Γ.3 Μελέτη της επίδρασης ή της αποσιώπησης του γονιδίου της λεπτίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό κύκλο των ηπατοκαρκινικών κυττάρων	σελ.91
2.2.Γ.4 Μελέτη της επίδρασης της λεπτίνης στην ανάπτυξη και εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων δια του ελέγχου της παραγωγής φλεγμονωδών κυταροκινών και μεταλλοπρωτεϊνών	σελ.93
2.2.Δ Διερεύνηση των μηχανισμών ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της λεπτίνης σε HepG2 κύτταρα	σελ.95
2.2.Δ.1 Μελέτη της ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης της λεπτίνης στα HCC κύτταρα από την ακετυλιωμένη H3 ιστόνη	σελ.95
2.2.Δ.2 Μελέτη της ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης της λεπτίνης στα HCC κύτταρα από την IL-6	σελ.97
 2.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	 σελ.99
 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	 σελ.116
SUMMARY	σελ.122
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ.127

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Κατά την ανακάλυψή της το 1994 από τον Zhang και τους συνεργάτες του, η λεπτίνη, το πρωτεϊνικό προϊόν του ob γονιδίου, συσχετίστηκε αποκλειστικά με τη ρύθμιση του μεταβολισμού και του ενεργειακού ισοζυγίου του οργανισμού, πράγμα που προδίδει και η ετυμολογία του όρου. Πέραν της κεντρικής δράσης της όμως, με την πάροδο των ετών, αποδείχτηκε πως έχει ένα ευρύτατο φάσμα ρυθμιστικών ρόλων με πολλούς ιστούς αποδέκτες μιας και έχει διαπιστωθεί η συμμετοχή της στην ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση, στην ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος, στην οξειδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στους σκελετικούς μύες, στην ανάπτυξη και αναμόρφωση των οστών, στην αναπαραγωγή, στην αιμοποίηση, καθώς και στην ανοσολογική απόκριση και φλεγμονή.

Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική έρευνα έχει αναδείξει τον ανοσορρυθμιστικό ρόλο της λεπτίνης ως σημαντικό μηχανισμό που ενέχεται στις διαδικασίες ίνωσης του ήπατος, καθώς και της συντήρησης της χρόνιας φλεγμονής σε αυτό. Πέραν τούτου ισχυροποιείται η συσχέτιση που φαίνεται να έχει η παχυσαρκία και συνεπώς οι κυτταροκίνες του λιπώδους ιστού, μεταξύ αυτών και η λεπτίνη, με τους μηχανισμούς ογκογένεσης σε πολλούς ιστούς και όργανα του ανθρώπινου σώματος, όπως ο μαστός, το παχύ έντερο, ο προστάτης, το ενδομήτριο, η ωοθήκη, το ήπαρ κ.α.

Οι ισχυρές βιβλιογραφικές ενδείξεις για τον πολυσχιδή ρόλο της λεπτίνης μας ώθησαν στην αναζήτηση στοιχείων που πιστοποιούν τον ανοσορρυθμιστικό και καρκινογενετικό ρόλο της στις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες και την αποσαφήνιση των μοριακών εκείνων μηχανισμών που διεκπεραιώνουν τις δράσεις της στο ήπαρ.

Για τη διαλεύκανση του ρόλου του συστήματος της λεπτίνης στην πορεία της χρόνιας, ιογενούς αιτιολογίας, φλεγμονής του ήπατος καθώς και της ενδεχόμενης μετεξέλιξης της σε ογκογόνο διαδικασία πραγματοποιήσαμε αναλυτικότερα :

➤ Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της στα PBMCs μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ομάδων των ασθενών με HBV, HCV, αλκοολική και αυτοάνοση ηπατίτιδα.

➤ Ανάλυση των κυτταρομετρικών ευρημάτων της έκφρασης του υποδοχέα της λεπτίνης στα PBMCs.

➤ Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων της λεπτίνης στα PBMCs και των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών.

➤ Σύγκριση των επιπέδων λεπτίνης ορού μεταξύ των ομάδων μελέτης που προαναφέρθηκαν.

➤ Σύγκριση της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της σε ηπατικούς ιστούς υγιών, ασθενών με χρόνιες ηπατοπάθειες και ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο.

➤ Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της λεπτίνης, των υποδοχέων της, της hTERT και της ενεργότητας της τελομεράσης σε ηπατικό ιστό από υγιείς, ασθενείς με HBV, HCV και HCC μεταξύ τους, καθώς επίσης και με τα κλινικά χαρακτηριστικά τους.

➤ Αξιολόγηση των επιπέδων έκφρασης της hTERT και της ενεργότητας της τελομεράσης μετά τη χορήγηση λεπτίνης σε HepG2.

➤ Διερεύνηση της συμμετοχής του μοριακού μονοπατιού JAK/STAT3, του δικτύου MYC/MAX/MAD και της ακετυλιωμένης H3 ιστόνης στην επαγόμενη από τη λεπτίνη ενεργοποίηση της έκφρασης της hTERT, με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης

➤ Σύγκριση της έκφρασης της λεπτίνης και της hTERT μετά τη χορήγηση IL-6 και TSA σε HepG2.

➤ Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου και της βιωσιμότητας των HepG2 μετά τη χορήγηση λεπτίνης ή την αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης.

➤ Ανάλυση των επιπέδων MMPs και διάφορων προφλεγμονωδών παραγόντων σε HepG2 μετά τη χορήγηση λεπτίνης.

Κομβικό σημείο της παρούσας έρευνας αποτέλεσε η στοιχειοθέτηση της καταλυτικής υπομονάδας του ενζύμου της τελομεράσης (hTERT) ως στόχου της λεπτίνης στον ηπατικό ιστό.

Η μελέτη της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της στα PBMCs πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 90 άτομα με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες B και C, με αλκοολική ηπατίτιδα και με αυτοάνοση ηπατίτιδα που ήταν υπό παρακολούθηση στην ηπατολογική μονάδα της Παθολογικής Κλινικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και 36 υγιή άτομα που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (control group). Η μελέτη της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της σε ιστούς ήπατος πραγματοποιήθηκε συνολικά σε βιοψίες ήπατος από 33 ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες, από 23 ασθενείς που έπασχαν από ΗΚΚ και από 23 ασθενείς που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου, γιατί δεν εμφάνιζαν ηπατοπάθεια και η βιοψία ήπατος τους πραγματοποιήθηκε κατά την διενέργεια απλών χειρουργικών επεμβάσεων, όπως π.χ. χολοκυστεκτομή.

Η επεξεργασία όλων των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας υπό την καθοδήγηση της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Ασπασίας Τσέζου.

Επιθυμώ να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην Αναπληρώτρια καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής κ. Ασπασία Τσέζου τόσο για την υπόδειξη του θέματος της διδακτορικής διατριβής όσο και για τις συμβουλές και κατευθυντήριες οδηγίες της σε όλα τα στάδια της διεξαγωγής της. Η αξιοσημείωτη ανοχή της και η συμβουλευτική συμβολή της καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της μελέτης μου παρείχαν οφέλη που ξεπερνούν τη συγγραφή του παρόντος συγγράμματος. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Βιολογίας κ. Νικόλαο Βαμβακόπουλο και την Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας κ. Παναγούλα Κόλλια για την επίβλεψη της διατριβής. Θα ήταν παράλειψή μου να μην υπογραμμίσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου προς τον Καθηγητή Παθολογίας κ. Γεώργιο Νταλέκο για την παροχή μεγάλου μέρους των δειγμάτων της μελέτης και την άφογη συνεργασία μας, καθώς και τον Λέκτορα Χειρουργικής κ. Δημήτριο Ζαχαρούλη για την συλλογή των δειγμάτων ήπατος της ομάδας ελέγχου.

Θερμότατα ευχαριστώ το συνάδελφο και φίλο Βιολόγο κ. Βασίλη Παπανικολάου για την πολύτιμη συμμετοχή του στην επίλυση προβλημάτων που αντιμετώπισα κατά τη διάρκεια της διατριβής και την εκμάθηση μέρους των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή. Επίσης θεωρώ χρέος μου την κατάθεση των ευχαριστιών μου προς όλους τους συναδέλφους Βιολόγους του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, με τους οποίους συνεργάστηκα αρμονικά όλα αυτά τα χρόνια και ιδιαίτερα τους Παγώνα Οικονόμου, Stéphanie Dubos, Ιωάννα Παπαθανασίου, Τιμόκλεια Ορφανίδου, Φωτεινή Κωστοπούλου, Μαρία Παλιανοπούλου, Θεοδώρα Σιμοπούλου, Μαρία Σαμαρά, Ιωάννα Χιώτογλου, Σταυρούλα Σαμαρά, Χρήστο Χασανίδη, Ανδρομάχη Βαγενά. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Βιολόγο κ. Μαρία Σάτρα για την καθοριστική συμβολή της στη συλλογή μεγάλου μέρους των δειγμάτων της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Θα ήθελα να καταθέσω την ευγνωμοσύνη μου ιδιαίτερα προς τους γονείς μου για την ηθική και ψυχολογική υποστήριξη σε κάθε βήμα μου, αναγνωρίζοντας πως χωρίς αυτούς τίποτα δεν θα ήταν εφικτό. Τέλος θα ήθελα να επισημάνω πως πηγή έμπνευσης και κινητήρια δύναμη για την ενασχόληση μου με την παρούσα διδακτορική διατριβή αποτέλεσαν η σύζυγος μου και συνοδοιπόρος, Αριστέα και ο πρωτότοκος γιος μας, Ορέστης.

Νικόλαος Στεφάνου

Βιολόγος-Ιατρός

Λάρισα, 2011

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Ιστορική αναδρομή

Πριν από 60 χρόνια, αναγνωρίστηκε μετά από πειράματα σε ποντίκια από τον Ingalls και τους συνεργάτες του ένα γενετικό ελάττωμα το οποίο οδηγούσε σε κακοήγη παχυσαρκία (1). Η γενετική αυτή ανωμαλία στα παχύσαρκα ή ob/ob ποντίκια, η οποία κληρονομείται κατά τον αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα, σχετίζεται ισχυρά με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου II και την υπογονιμότητα. Τα ob/ob ποντίκια χαρακτηρίζονται από υπερφαγία και τριπλάσιο βάρος σώματος σε σχέση με τα φυσιολογικά.

Το 1973 ο Coleman και οι συνεργάτες του σε πειράματα παραβίωσης (σύνδεση της κυκλοφορίας ομόζυγων ob/ob ποντικών με αυτή φυσιολογικών ποντικών) κατέδειξαν την υποστροφή της υπερφαγίας και του αυξημένου σωματικού βάρους στα παχύσαρκα ποντίκια (2, 3). Αυτά τα πειράματα υποδεικνύουν ότι τα ob/ob ποντίκια παρουσίαζαν έλλειψη σε κάποιο παράγοντα της συστηματικής κυκλοφορίας ο οποίος ρυθμίζει την ενεργειακή πρόσληψη και το μεταβολισμό (4).

Το 1991 επιβεβαιώθηκε ότι η παχυσαρκία και ο διαβήτης τύπου II στα ob/ob ποντίκια οφειλόταν σε γονιδιακή μετάλλαξη του ob γονιδίου, η απομόνωση και η χαρτογράφηση του οποίου, όσο και του ομολόγου του στον άνθρωπο προσδιορίστηκε το 1994 από τον Zhang και τους συνεργάτες του (5, 6). Το πρωτεϊνικό προϊόν του ob γονιδίου τελικά ονομάστηκε leptin (λεπτίνη) από την ελληνική λέξη «λεπτός», επισημαίνοντας την άρρηκτη σχέση της πρωτεΐνης με τη ρύθμιση του σωματικού βάρους και την πρόσληψη της τροφής.

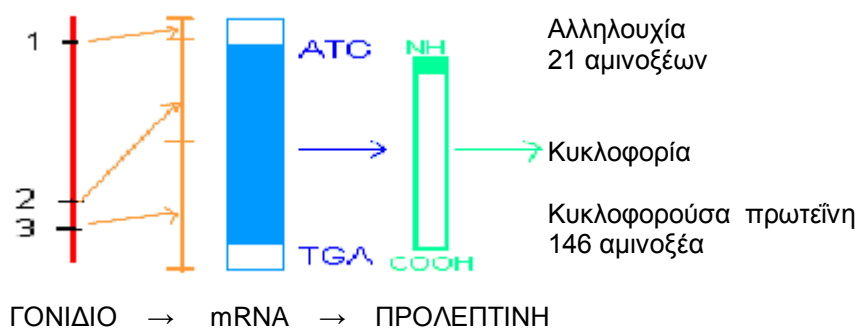
Ο κύκλος των πρώιμων ανακαλύψεων που αφορούν στη λεπτίνη ολοκληρώθηκε από τον Tartaglia, ο οποίος απομόνωσε για πρώτη φορά την ίδια χρονική περίοδο τον υποδοχέα της λεπτίνης στο χοριοειδές πλέγμα επιμυος (7).

1.2 Γονίδιο – πρωτεΐνη της λεπτίνης

Στον άνθρωπο το ob γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7 και ειδικότερα στο γονιδιακό τόπο 7q31.3., αποτελείται από τρία εξόνια και δύο ιντρόνια και εκτείνεται σε μήκος 3.5 Kb (6, 8, 9) (**εικόνα 1**).

Μελέτες στον άνθρωπο έχουν αναδείξει μεταλλάξεις του ob γονιδίου οι οποίες συναντώνται σε άτομα που εκδηλώνουν φαινότυπο κακοήθους παχυσαρκίας, στην παιδική ηλικία ή την ενήλικη ζωή, συνοδευόμενης από πληθώρα ενδοκρινολογικών ανωμαλιών (10-15). Χαρακτηριστικά, μεταξύ άλλων, σε γονιδιακή μελέτη ασθενών με κακοήγη παχυσαρκία αποκαλύφθηκε πολυμορφισμός στο εξόνιο

1 του γονιδίου της λεπτίνης (A→G, βάση 19), ο οποίος είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του επιπέδου λεπτίνης στην κυκλοφορία συγκριτικά με παχύσαρκους ασθενείς χωρίς τη μετάλλαξη (16). Σε μια πιο σύγχρονη μελέτη συσχετίστηκε ισχυρά τόσο ο πολυμορφισμός A19G όσο και ο G2548A, καθώς και μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα, όχι μόνο με τον παχύσαρκο φαινότυπο αλλά και με την προτίμηση στην κατανάλωση γλυκισμάτων, παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες για την διάγνωση και θεραπεία της παχυσαρκίας (17). Παρόλα αυτά, συνηθέστερα στην αιτιοπαθογένεια της παχυσαρκίας εμπλέκεται μάλλον η αντοχή στη δράση της λεπτίνης είτε σε επίπεδο υποδοχέων είτε σε επίπεδο υποθαλάμου, παρά η κάθε είδους μετάλλαξη του ob γονιδίου (18).



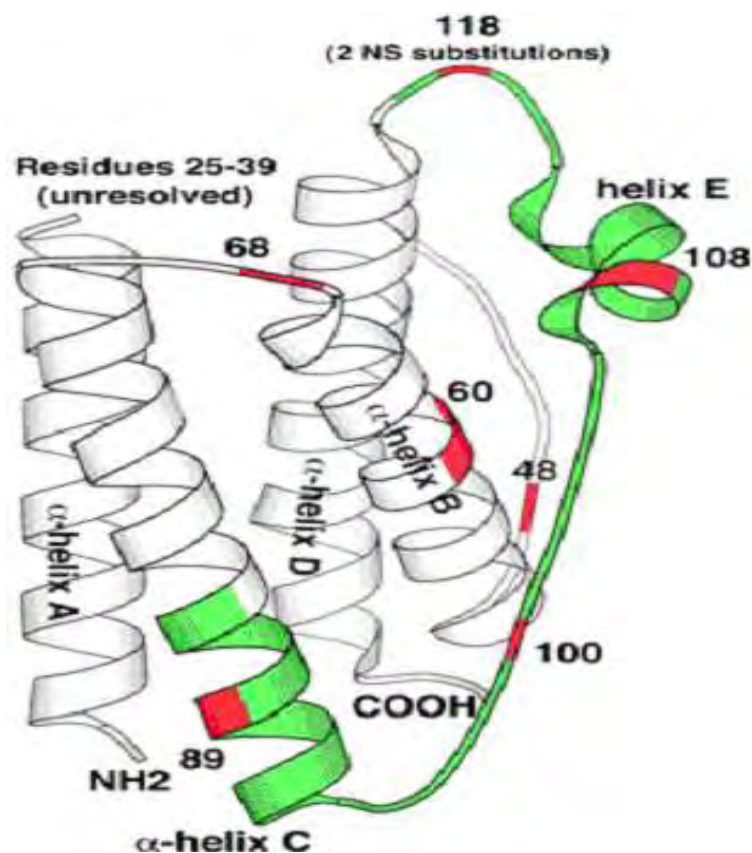
Εικόνα 1: Αναπαράσταση της σύνθεσης της λεπτίνης. Το γονίδιο της λεπτίνης αποτελείται από 3 εξόνια και 2 ιντρόνια. Το ob γονίδιο μεταγράφεται σε mRNA μεγέθους 3.5 Kb που κωδικοποιεί την προ-λεπτίνη μεγέθους 167 αμινοξέων (πράσινο). Αλληλουχία 21 αμινοξέων αποκόπτεται πριν την απελευθέρωση της λεπτίνης στην κυκλοφορία (11).

Η περιοχή του υποκινητή του ob γονιδίου καταλαμβάνει έκταση ~3 Kb και περιλαμβάνει ένα TATA «κουτί» (ή Goldberg-Hogness, αλληλουχίας 5' –TATAAAA–3') γύρω από τη θέση -26, ένα «κουτί» CAAT (θέση σύνδεσης C/EBP: προωθητές σύνδεσης πρωτεϊνών) στη θέση -90, θέσεις ανταποκρινόμενες στα γλυκοκορτικοειδή (GRE), καθώς και άλλες στις οποίες προσδένεται το cAMP (CREB: cAMP response element – binding proteins) (19, 20).

Το πρωτεϊνικό προϊόν του ob γονιδίου είναι ένα μη γλυκοζυλιωμένο πεπτίδιο το οποίο αποτελείται από 146 αμινοξέα με μοριακό βάρος 14-16 KDa. Η πρόδρομος μορφή της λεπτίνης αποτελείται από 167 αμινοξέα και η ενεργοποίηση της περιλαμβάνει την αποκοπή ενός τμήματος 21 αμινοξέων από το N- τελικό της άκρο, πριν την έκκρισή της στην κυκλοφορία (6, 19) (**εικόνα 1**). Παρουσιάζει 84% ομολογία με την λεπτίνη των ποντικών και 83% με αυτή των αρουραίων (6). Στη δομή της διακρίνονται τρία επιμέρους λειτουργικά τμήματα:

- 1) Το αμινο-τελικό (N-τελικό), το οποίο κυρίως ευθύνεται για τη βιολογική δράση του μορίου και την πρόσδεση αυτού στους υποδοχείς του,
- 2) Το καρβοξυτελικό (C-τελικό) τμήμα, το οποίο χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενδομοριακού δισουλφιδικού δεσμού, που προσδίνει τη χαρακτηριστική δομή αγκύλης και συμβάλλει επίσης στη βιολογική δράση του μορίου,
- 3) Το τμήμα του δισουλφιδικού δεσμού, το οποίο δε φαίνεται να συμμετέχει στη δραστηριότητα του μορίου, αλλά επηρεάζει τη σταθερότητα, την έκκριση και μεταφορά της πρωτεΐνης (21).

Η μελέτη της τρισδιάστατης δομής της λεπτίνης, με την τεχνολογία του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), αποκάλυψε τη διαμόρφωσή της σε μια δέσμη τεσσάρων ελίκων με δύο ενδιάμεσους θυλάκους και την κατέταξε ως μέλος της οικογένειας των μακράς αλυσίδας ελικοειδών πρωτεϊνών που μεταξύ άλλων περιλαμβάνει την IL-6, IL-11, IL-12, LIF (leukemia inhibitory factor: ανασταλτικός παράγοντας λευχαιμίας), CNTF (ciliary neurotrophic factor: ακτινοειδής νευροτροφικός παράγοντας) και την ογκοστατίνη M (22, 23) (**εικόνα 2**).



Εικόνα 2. Η αναπαράσταση της τεταρτοταγούς δομής της ανθρώπινης λεπτίνης (23).

Η λεπτίνη στον άνθρωπο ακολουθεί κιρκαδικό πρότυπο έκκρισης σύμφωνα με το οποίο εκκρίνεται κατά μέσο όρο με 32 ώσεις/ημέρα, διάρκειας περίπου 33 λεπτών η κάθε μία (24). Επιπλέον έχει χρόνο ημίσειας ζωής περίπου 25 λεπτά τόσο σε παχύσαρκους όσο και σε φυσιολογικού βάρους άτομα και απεκκρίνεται από τους νεφρούς (25). Εκτός των άλλων, κυκλοφορεί στο αίμα σε δύο μορφές, την ελεύθερη και τη συζευγμένη η οποία είναι συνδεδεμένη με μια πρωτεΐνη φορέα (26). Στα αδύνατα άτομα υπερτερεί στην κυκλοφορία η συζευγμένη μορφή της πρωτεΐνης, ενώ στα παχύσαρκα η λεπτίνη κυκλοφορεί κυρίως ασύζευκτη (27, 28).

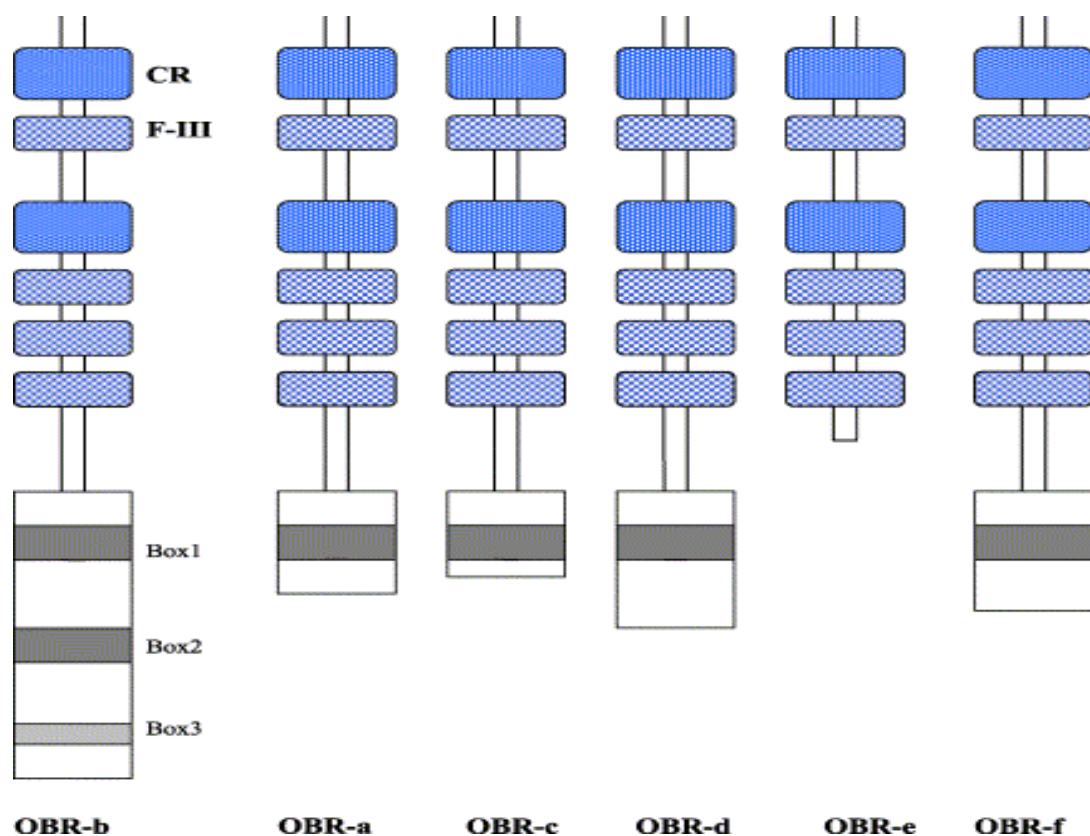
1.3 Γονίδιο – πρωτεΐνη των υποδοχέων της λεπτίνης

Οι πλειοτροπικές βιολογικές δράσεις της λεπτίνης θα ήταν ανέφικτες χωρίς την ευρεία κατανομή των υποδοχέων της (OB-R: OB-receptor) στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Το γονίδιο του ανθρώπινου υποδοχέα της λεπτίνης εδράζει στο γονιδιακό τόπο 1p31 και αποτελείται από 20 εξόνια (29). Από το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA του προκύπτουν οι 6 διαφορετικές ισομορφές του υποδοχέα της λεπτίνης (OB-Ra-f) (30, 31) **(εικόνα 3)**.

Δομικά οι υποδοχείς της λεπτίνης ανήκουν στην κατηγορία I των υποδοχέων των κυτταροκινών που περιλαμβάνει τους υποδοχείς των IL-2, -3, -4, -6, -7 και του GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor/παράγοντας διέγερσης αποικιών κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων) (7, 32). Οι διάφορες ισομορφές των υποδοχέων είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες έχουν ένα κοινό εξωκυττάριο τμήμα που αποτελείται από 816-820 αμινοξέα, ένα επίσης κοινό ενδομεμβρανικό τμήμα 34 αμινοξέων και διάφορα ενδοκυττάρια τμήματα, μετά τα πρώτα 29 ενδοκυττάρια αμινοξέα που είναι κοινά (επιπλέον 273, 5, 3, 11 για τους OB-Rb, Ra, Rc, Rd αντίστοιχα) (31, 33). Έτσι διακρίνονται στις βραχείες ισομορφές (OB-Ra, c, d, f), την μακριά ισομορφή (OB-Rb) και τη διαλυτή ισομορφή (OB-Re) που κατ' εξαίρεση το μήκος της φτάνει ως την ιστιδίνη 796 (33). Το κοινό εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα της λεπτίνης έχει 2 περιοχές ανάλογες των υποδοχέων κυτταροκίνης και 4 περιοχές ινωδονεκτίνης τύπου III μήκους περίπου 90 αμινοξέων (34, 35).

Ο OB-Rb είναι ο λειτουργικός υποδοχέας ο οποίος κυρίως ενεργοποιεί διαδικασίες ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος και η γενετική ανεπάρκεια του οδηγεί σε παχύσαρκο φαινότυπο (db/db ποντίκι, fa/fa αρουραίος) (36). Υψηλά επίπεδα έκφρασης του OB-Rb παρατηρούνται στους πυρήνες του υποθαλάμου, ενώ χαμηλότερα επίπεδα στους πνεύμονες, στους νεφρούς, στο ήπαρ, στο πάγκρεας,

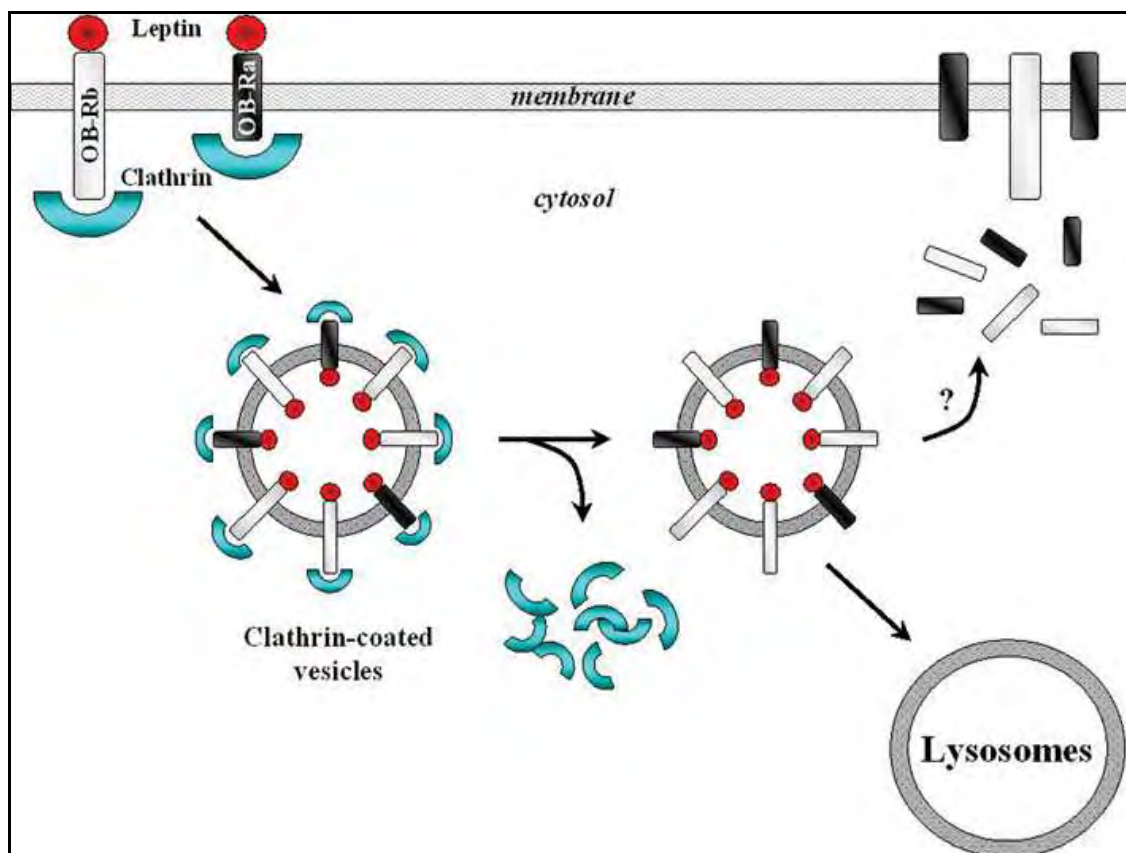
στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες, στα λιποκύτταρα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος, στους οστεοβλάστες, στο ενδομήτριο, στον πλακούντα, στον προστάτη και στην ωοθήκη (37-46). Οι βραχείες ισομορφές (Ra, c, d, f, e) εκφράζονται σε υψηλότερα επίπεδα και φαίνεται ότι δε συμμετέχουν τόσο στη μεταφορά σήματος ενδοκυττάρια, όσο στην κυκλοφορία της λεπτίνης και στην αναδόμησή της (38, 47, 48). Επιπλέον συμμετέχουν (Ra, c, e) στην μεταφορά της λεπτίνης εντός του εγκεφάλου διευκολύνοντας τη διέλευσή της δια μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (49, 50).



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση των 6 ισομορφών του υποδοχέα της λεπτίνης. CR= τμήμα υποδοχέα ανάλογο των υποδοχέων κυτταροκίνης, F-III= τμήμα υποδοχέα ανάλογο του τύπου III υποδοχέα φιμπρονεκτίνης, Box 1, 2, 3=σταθερά ενδοκυττάρια τμήματα (34).

Εκτιμάται ότι, υπό φυσιολογικές συνθήκες, μόνο το 5-25% της ολικής ποσότητας των υποδοχέων εντοπίζονται στην κυτταρική επιφάνεια, ενώ η πλειοψηφία βρίσκεται σε ενδοκυττάρια δεξαμενές (Golgi, λυσοσώματα). Ειδικότερα

η σύνδεση λεπτίνης-υποδοχέα οδηγεί στο σχηματισμό κυστιδίων επικαλυμμένων με κλαθρίνη που είτε οδηγούν τους υποδοχείς προς αποδόμηση στα λυσοσώματα είτε ανακυκλώνουν τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας (51, 52) (εικόνα 4).



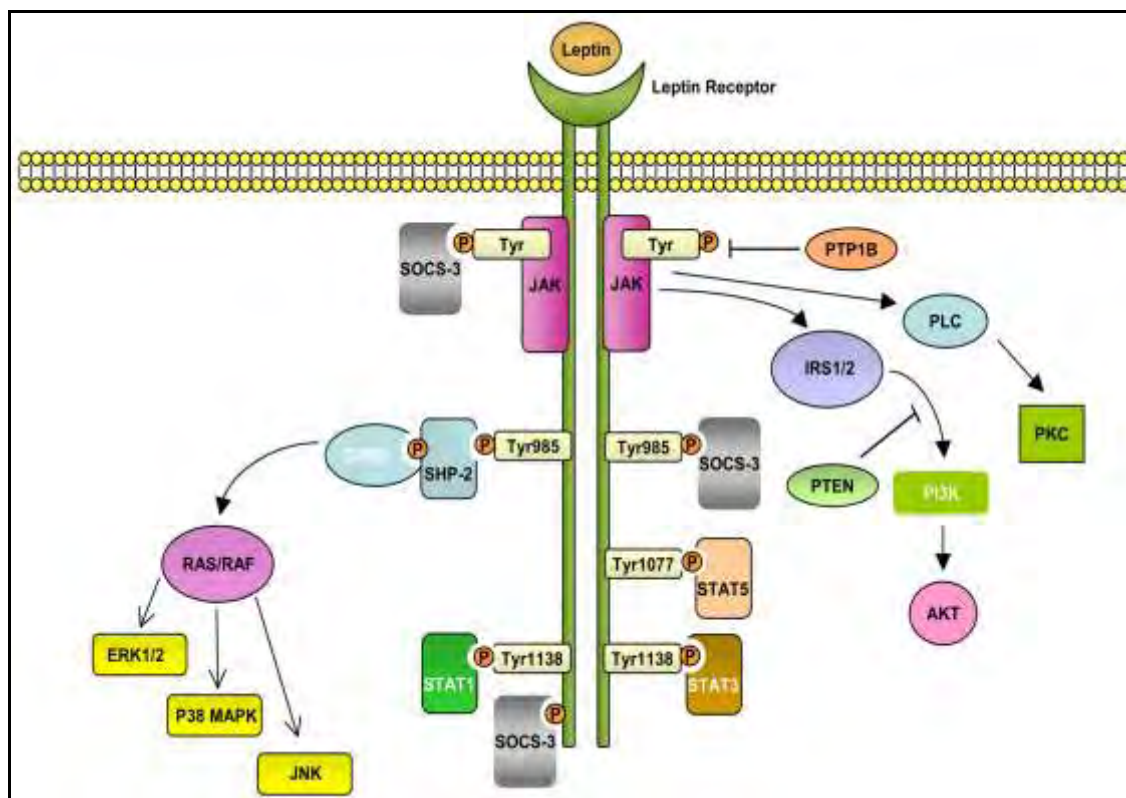
Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση της εισόδου στο κυταρόπλασμα των υποδοχέων της λεπτίνης μέσω κυστιδίων επικαλυμμένων με κλαθρίνη (clathrin-coated vesicles) και της επακόλουθης αποδόμησής τους στα λυσοσώματα (53).

1.4 Ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος

Τόσο ο λειτουργικός OB-Rb υποδοχέας της λεπτίνης, όσο και οι βραχείες ισομορφές σχηματίζουν μετά τη σύνδεση της λεπτίνης ομοδιμερή δημιουργώντας έτσι ένα τετραμερές σύμπλεγμα (συνδέτης/υποδοχέας x 2) απαραίτητο για την ενεργοποίηση του υποδοχέα και την ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος (54-56). Όπως και οι άλλοι υποδοχείς της οικογένειας των κυταροκινών ο OB-Rb περιέχει ενδοκυττάρια μια υψηλά διατηρημένη περιοχή box 1 πλούσια σε προλίνη και δύο λιγότερο διατηρημένες περιοχές box 2 (57, 58). Αν και μόνο η περιοχή box 1 και τα

πέριξ αυτής αμινοξέα (Leu 896, Phe 897) είναι υπεύθυνες για την πλήρη ενεργοποίηση των JAK κυτταροπλασματικών κινασών, (Janus family tyrosine kinase/τυροσινική κινάση του Ιανού) είναι απαραίτητη και η συμβολή της περιοχής box 2 για πλήρη επαγωγή του JAK/STAT μοριακού μονοπατιού (STAT: signal transducer and activator of transcription/μεταβιβαστές σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής) (58-60).

Αφού η λεπτίνη συνδεθεί στον OB-Rb συνδέεται στο box 1 και ενεργοποιείται η JAK2 τυροσινική κινάση (με αυτοφωσφορυλίωση) προκαλώντας φωσφορυλίωση τυροσινών στον υποδοχέα, που παρέχουν με τη σειρά τους περιοχές που προσελκύουν πρωτεΐνες με τμήματα SH2 (src homology 2) (38) (εικόνα 5). Η αυτοφωσφορυλιωμένη JAK2 κινάση προκαλεί έπειτα τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος του υποδοχέα της ινσουλίνης τύπου 1/2 (IRS-1/2: insulin receptor substrate) με επακόλουθη ενεργοποίηση του μοριακού μονοπατιού PI3K/AKT (PI3K:κινάση 3 της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης/AKT: πρωτεϊνική κινάση β ή κινάση σερίνης-θρεονίνης) (61, 62). Η AKT κινάση μπορεί επίσης να επάγει μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο NF-κΒ (πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας) που στη συνέχεια ρυθμίζει την έκφραση πρωτοογκογονιδίων όπως τα Bcl-2, Bcl-xL (62, 63).



Εικόνα 5. Σχηματικό διάγραμμα των μοριακών μονοπατιών που ενεργοποιούνται μετά την πρόσδεση της λεπτίνης στην μακριά ισομορφή του υποδοχέα της (OB-Rb) (38).

Τόσο η φωσφορυλιωμένη τυροσίνη 1077 όσο και η τυροσίνη 1138 προσδένουν τους STAT5 και STAT6, ενώ μόνο η τυροσίνη 1138 προσδένει τους STAT1 και 3 (64-66). Στην συνέχεια κυρίως ο STAT3 σχηματίζει ομοδιμερείς ή ετεροδιμερείς δομές που μεταναστεύουν στον πυρήνα του κυττάρου και επιδρούν επί των υποκινητών γονιδίων όπως τα c-jun, c-fos, erg-1, AP-1(μεταγραφικός παράγοντας που σχηματίζεται ως ετεροδιμερές από τα προϊόντα των πρωτοογκογονιδίων jun, fos) και SOCS3 (suppressor of cytokine signaling: καταστολέας της σηματοδότησης κυτταροκινών) (67-69). Ο SOCS3 ειδικότερα προκαλεί αναστολή της μεταγωγής σήματος του ενεργοποιημένου υποδοχέα εμποδίζοντας τη σύνδεση των STATs σε αυτόν (69). Τόσο ο SOCS3 όσο και τα υπόλοιπα 7 μέλη της οικογένειας SOCS με την αρνητική ανάδρομη δράση τους στη σηματοδότηση της λεπτίνης έχουν ενοχοποιηθεί για την αντοχή στη λεπτίνη και την επακόλουθη υπερλεπτιναιμία που παρατηρείται στην πλειοψηφία των παχύσαρκων ατόμων (70). Εκτός των άλλων η φωσφορυλιωμένη τυροσίνη 985 συνδέεται με τη φωσφατάση SHP2 (φωσφατάση περιέχουσα SHP2 περιοχή), η οποία στη συνέχεια επάγει μετά την αλληλεπίδραση με τον GRB2 (growth factor receptor-bound protein: πρωτεΐνη προσδένουσα στον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα) το μοριακό μονοπάτι ERK 1/2, MAPK (κινάσες σερίνης/θρεονίνης που ενεργοποιούνται από μιτογόνα, π.χ. ras1, raf1, MEK1) (70-72).

Υπάρχει τέλος μια πληθώρα ενδοκυτταρικών μοριακών μονοπατιών που ενεργοποιούνται μετά τη σύνδεση της λεπτίνης με τον υποδοχέα της στα οποία συμμετέχουν παράγοντες όπως η PLC (φωσφολιπάση C), το NO, η DEK-J (κινάση της διακυλογλυκερόλης), οι PGE2/PGF2 (προσταγλανδίνες E2/ F2), η PDE (φωσφοδιεστεράση) και το cAMP που χρήζουν περαιτέρω ερευνών για την πλήρη αποσαφήνιση της μοριακής διαπλοκής τους (51, 53).

1.5 Παραγωγή της λεπτίνης

Στα ζώα το mRNA και η πρωτεΐνη της λεπτίνης εντοπίζονται κυρίως στο φαιό και στον καστανό λιπώδη ιστό, συντίθενται όμως και από άλλους ιστούς πλην του λιπώδους, όπως το γαστρικό βλεννογόνο, τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού, τις μυϊκές ίνες, τα κύτταρα του πλακούντα, την ωοθήκη, τους όρχεις, την υπόφυση και το ήπαρ (45, 73-79). Έρευνα επίσης σε εγκυμονούντα ποντίκια ανέδειξε την παραγωγή λεπτίνης στην καρδιά, στα οστά και στους χόνδρους, στο χοριοειδές πλέγμα, στους πνεύμονες, στους νεφρούς και στους θυλάκους των τριχών του εμβρύου (80).

Στον άνθρωπο η κύρια πηγή παραγωγής λεπτίνης είναι ο φαιός και ο καστανός λιπώδης ιστός, ενώ το υποδόριο λίπος υπερτερεί στην παραγωγή λεπτίνης έναντι του επιπλοϊκού (81, 82). Σε μικρότερη ποσότητα ανιχνεύεται και σε άλλους ιστούς, όπως οστά, δόντια, εγκέφαλο, μύες, γαστρικό βλεννογόνο και τα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (PBMCs: peripheral blood mononuclear cells) (45, 83-86). Λεπτίνη έχει απομονωθεί επίσης στο ωοθυλακικό υγρό και το σπέρμα με πιθανές πηγές προέλευσης τα κύτταρα της θήκης ή τα κοκκώδη κύτταρα της ωοθήκης και τα σπερματικά σωληνάκια ή τα κύτταρα του προστάτη αντίστοιχα (87-89).

Αν και τα επίπεδα λεπτίνης παρουσιάζουν αντιστοιχία με τη μάζα του λιπώδους ιστού, σε φυσιολογικού βάρους άτομα η λεπτίνη σχετίζεται υψηλότερα με το Δείκτη μάζας σώματος (BMI: body mass index) παρά με το % ποσοστό λίπους του σώματος (90, 91). Ο συνδυασμός της παραγωγής λεπτίνης από το λιπώδη ιστό και από τα κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου αποτελεί μέσο για την άμεση αλλά και τη χρόνια ρύθμιση της διατροφικής συμπεριφοράς, δίνοντας πληροφορίες στον εγκέφαλο για τις ενδογενείς (λιπώδης ιστός) και τις εξωγενείς ενεργειακές πηγές (τροφή).

1.6 Ρύθμιση της παραγωγής της λεπτίνης

Όπως προαναφέρθηκε η λεπτίνη στον άνθρωπο ακολουθεί κιρκαδικό πρότυπο έκκρισης, ενώ τα υψηλότερα επίπεδα λεπτίνης σημειώνονται από τα μεσάνυχτα μέχρι τις πρώτες πρωινές ώρες και τα χαμηλότερα τις απογευματινές ώρες, αντίθετα από ότι συμβαίνει με το προφίλ έκκρισης της κορτιζόλης (24, 25, 92). Η ημερήσια διακύμανση της λεπτίνης μοιάζει με αυτή της προλακτίνης και της TSH (θυρεοειδοτρόπος) (92).

Η παραγωγή της λεπτίνης καθώς και η συχνότητα και το εύρος των ώσεων έκκρισής της εξαρτώνται κυρίως από το μέγεθος της μάζας του λιπώδους ιστού και σε μικρότερο βαθμό από τη λήψη τροφής, το φύλο ή ορισμένους ορμονικούς παράγοντες (90). Επιπλέον φαίνεται ότι η ίδια η ορμόνη αυτορυθμίζεται με μείωση του mRNA της (παλινδρομη ρύθμιση) (92). Επίσης η παχυσαρκία δε σχετίζεται μόνο με υψηλότερα επίπεδα λεπτίνης αλλά και με τη μειωμένη βραδινή έκκριση λεπτίνης-χαμηλότερες αιχμές έκκρισης- και μειωμένη συχνότητα ώσεων έκκρισης. Αυτοί οι επηρεασμένοι κιρκαδικοί ρυθμοί έκκρισής της πιθανά συμβάλλουν στην ανάπτυξη ανοχής στη δράση της λεπτίνης σε παχύσαρκους ασθενείς (93).

Ο Licinio και οι συνεργάτες του περιέγραψαν τη συσχέτιση του φύλου με τα επίπεδα και το ρυθμό έκκρισης της λεπτίνης (94). Ειδικότερα, η διακύμανση της έκκρισης της λεπτίνης μέσα στο 24ωρο είναι ίδια και για τα δύο φύλα, ενώ η διαφορά τους εντοπίζεται στη συνολική ποσότητα λεπτίνης που εκκρίνεται ανά μονάδα χρόνου, υποδεικνύοντας ότι ίσως οι γυναίκες έχουν μεγαλύτερο βαθμό αντοχής στη δράση της ορμόνης. Είναι πλέον αποδεκτό ότι τα επίπεδα λεπτίνης είναι αρκετά πιο υψηλά στις γυναίκες από ότι στους άνδρες ανεξαρτήτως του BMI (95). Είναι άλλωστε γνωστό ότι για δεδομένο BMI το ποσοστό υποδόριου λίπους στο γυναικείο σώμα είναι σημαντικά υψηλότερο από ότι στον άνδρα (96).

Οι μηχανισμοί ρύθμισης της έκκρισης λεπτίνης, αν και δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί, φαίνεται ότι συμπεριλαμβάνουν πλήθος ορμονικών παραγόντων. Παρά τη γνωστή παλίνδρομο επίδραση του υποθάλαμο-υπόφυσο-επινεφριδιακού άξονα στη συγκέντρωση της λεπτίνης, φαίνεται ότι η δράση των εξωγενών κορτικοστεροειδών είναι μάλλον διεγερτική (24, 97-100).

Η ινσουλίνη επίσης επάγει την παραγωγή λεπτίνης από τα λιποκύτταρα τόσο σε αρουραίους όσο και στον άνθρωπο, όπως προκύπτει τόσο από *in vitro* όσο και από *in vivo* δεδομένα (101, 102). Αυτό μπορεί να συμβάλλει στην αύξηση της λεπτίνης κατά τη σίτιση και στην υπερλεπτιναιμία που χαρακτηρίζει τις καταστάσεις με παθολογική ανοχή στην ινσουλίνη (103). Ενδιαφέρον είναι ότι η *in vivo* επαγωγή της λεπτίνης δεν είναι έκδηλη σε περιπτώσεις βραχείας έγχυσης ινσουλίνης, αντίθετα με τη χρόνια υπερινσουλιναιμία που διεγείρει τη σύνθεση και έκκριση λεπτίνης (104).

Η σωματοστατίνη φαίνεται ότι καταστέλλει την έκκριση λεπτίνης όπως και η αυξητική ορμόνη, που σε υγιή άτομα, παρουσιάζει αντίστροφη σχέση με την παραγωγή λεπτίνης δρώντας πιθανά απευθείας στα λιποκύτταρα (105). Στο μηχανισμό παραγωγής λεπτίνης επιδρούν και άλλοι παράγοντες όπως οι β-αδρενεργικοί αγωνιστές, το ενδοκυττάριο cAMP, τα ανδρογόνα, το κάπνισμα, η έκθεση στο κρύο, τα ελεύθερα λιπαρά οξέα που δρουν ανασταλτικά στην παραγωγή και έκκρισή της (106-113). Αντίθετα, κάποιες κυταροκίνες, όπως ο TNFα και η IL-1, επάγουν την έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης υπογραμμίζοντας το ρόλο της στις τοπικές ανοσοαπαντήσεις, στη φλεγμονή και την αγγειογένεση (114, 115).

Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν μεν ότι τα επίπεδα της λεπτίνης στο πλάσμα συσχετίζονται άμεσα κυρίως με τα αποθέματα λιπώδους ιστού στο σώμα, αλλά επίσης ότι είναι συνάρτηση μιας πληθώρας παραγόντων που δεν έχουν πάντα σχέση με την ενεργειακή ομοιόσταση.

1.7 Κεντρική και περιφερικές δράσεις της λεπτίνης

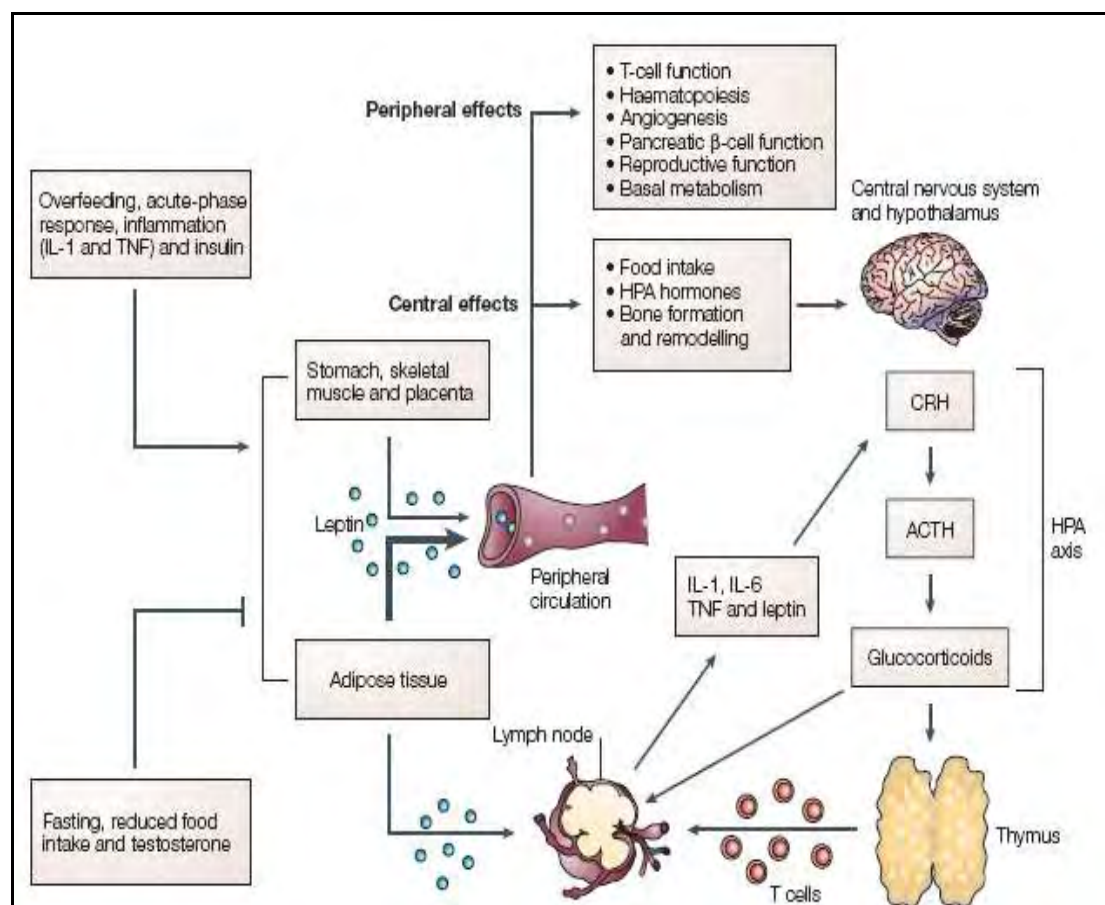
Κατά τα πρώιμα στάδια της ανακάλυψης της λεπτίνης η μόνη δράση που της αποδόθηκε ήταν η ρύθμιση του σωματικού βάρους μέσω του ελέγχου της όρεξης και του μεταβολισμού (**εικόνα 6**). Πιο συγκεκριμένα, θεωρήθηκε πρωτεΐνη-πληροφοριοδότης του εγκεφάλου για τα αποθέματα λίπους του σώματος, αποτελώντας έτσι παράγοντα του παλίνδρομου μηχανισμού μείωσης της όρεξης και αύξησης του καταβολισμού (116). Η κεντρική αυτή δράση της λεπτίνης εξασφαλίζεται από την συσχέτιση, αν και όχι γραμμική, του επιπέδου της στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό με τη συγκέντρωσή της στο πλάσμα και το BMI (117, 118).

Η ορμόνη ασκεί τη δράση της κυρίως σε περιοχές του υποθαλάμου –ιδίως στο μεσοκοιλιακό πυρήνα- ο οποίος και θεωρείται ότι κατέχει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πρόσληψης τροφής (119, 120). Θεωρείται ότι η λεπτίνη δρα μέσω του νευροπεπτιδίου Υ (NPY) μειώνοντας την παραγωγή του από τον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου και οδηγώντας σε μείωση της όρεξης και αύξηση του καταβολισμού (121-123). Το NPY άλλωστε είναι το μόνο γνωστό νευροπεπτίδιο που προκαλεί παχυσαρκία και χωρίς αυξημένη πρόσληψη τροφής (116). Άλλοι πιθανοί στόχοι της πρωτεΐνης στον υποθάλαμο είναι η μελανοτροπίνη (MSH), οι ορεξίνες A και B, η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτρόπου ορμόνης (CRH), η προοπιομελανοτροπίνη (POMC), το πεπτίδιο της γλυκαγόνης 1 (GLP-1) και τα προϊόντα γονιδίων ρυθμιζόμενων από την κοκαΐνη και την αμφεταμίνη (CART) (124-128).

Πέραν της κεντρικής δράσης της όμως, η λεπτίνη με την πάροδο των ετών αποδείχτηκε πως έχει ένα ευρύτατο φάσμα δράσεων με πολλούς ιστούς αποδέκτες.

Η σημασία της λεπτίνης στην αναπαραγωγή μελετήθηκε αρχικά σε ποντίκια με γενετική ανεπάρκεια της πρωτεΐνης (ob/ob). Τα ποντίκια αυτά εκδηλώνουν παχυσαρκία, αμηνόρροια, στειρότητα και ατροφικά γεννητικά όργανα, χαρακτηριστικά τα οποία αντιμετωπίστηκαν επιτυχώς με την εξωγενή χορήγηση λεπτίνης, η οποία συγχρόνως αύξησε τα χαμηλά επίπεδα LH, τη μάζα της μήτρας και της ωοθήκης (130-132). Η σημασία των ενεργειακών αποθεμάτων στη διατήρηση της γονιμότητας αντανακλάται στις διαταραχές του εμμηνορυσιακού κύκλου που παρατηρούνται σε γυναίκες που χάνουν βάρος κάτω από κάποιο κρίσιμο όριο (133). Ενδιαφέρον είναι ότι στις γυναίκες αυτές το ορμονικό προφίλ μοιάζει με το αντίστοιχο των κοριτσιών προ της εφηβείας (χαμηλή FSH, LH, οιστραδιόλη), ενώ τα επίπεδα λεπτίνης πλάσματος είναι εξαιρετικά χαμηλά και η έκκριση της ορμόνης χάνει το φυσιολογικό κίρκαδικό ρυθμό της (134-136). Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει μια δυναμική αλληλεπίδραση της λεπτίνης με τις ορμόνες του άξονα υποθάλαμος-

υπόφυση-ωθήκη αφού, εκτός των ανωτέρω, η οιστραδιόλη και η LH συγχρονίζονται με τα επίπεδα λεπτίνης (92, 94).



Εικόνα 6. Κεντρικές και περιφερικές νευροενδοκρινικές δράσεις της λεπτίνης (129).

Σημαντικός είναι ο ρόλος της λεπτίνης και στην κύηση, γεγονός που ενισχύεται από την παραγωγή της από την μητέρα, το έμβρυο και τον πλακούντα (137, 138). Τα επίπεδα της λεπτίνης αυξάνουν κυρίως μετά τις 34 εβδομάδες της κύησης και μειώνονται μετά τον τοκετό, ενώ στο αίμα του ομφάλιου λώρου είναι ανάλογα με το βάρος σώματος του εμβρύου στη γέννηση, καθώς και το βάρος του πλακούντα (139). Όσον αφορά στην παρουσία της λεπτίνης στον πλακούντα πιθανολογείται ότι συμμετέχει τόσο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη όσο και στη φυλετική διαφοροποίηση (140, 141).

Έχει προταθεί ότι τα λιποκύτταρα του μυελού των οστών όχι μόνο εφοδιάζουν με ενέργεια, αλλά ταυτόχρονα ευοδώνουν την ωρίμανση των αιμοποιητικών κυττάρων (142). Ο πιθανός ρόλος της λεπτίνης στην αιμοποίηση ενισχύεται από την παρουσία των υποδοχέων της σε μια πληθώρα αιμοποιητικών κυττάρων μεταξύ των οποίων είναι τα βλαστικά κύτταρα, τα προμυελοκύτταρα, τα προμυελοκύτταρα, τα μακροφάγα κ.α (31, 143, 144).

Είναι γνωστό ότι η μείωση της πρόσληψης της τροφής και του σωματικού βάρους βελτιώνουν την ευαισθησία και απαντητικότητα των ιστών στην ινσουλίνη (145). Υπό αυτά τα δεδομένα είναι λοιπόν εύλογο ότι η λέπτινο-εξαρτώμενη απώλεια βάρους βελτιώνει την ομοιόσταση γλυκόζης-ινσουλίνης (146). Σε αρκετές μελέτες υπήρξαν παρόλα αυτά αντικρουόμενα ευρήματα σε σχέση με την άμεση επίδραση της λεπτίνης στην έκκριση ινσουλίνης από παγκρεατικά κύτταρα (απομονωμένα ή κυτταρικές σειρές), αφού στην πλειοψηφία αυτών η λεπτίνη είχε κατασταλτική δράση, ενώ σε άλλες διεγερτική (147-152). Τα προαναφερθέντα ευρήματα ενισχύονται ακόμα περισσότερο από πειράματα σε ποντίκια με προβληματική παραγωγή υποδοχέων λεπτίνης (db/db) καθώς σε άλλα με αντοχή στη δράση της ορμόνης (fa/fa), στα οποία η δράση της λεπτίνης (διεγερτική ή ανασταλτική) επί της παραγωγής ινσουλίνης καταργείται πλήρως (19). Η επίδραση της λεπτίνης στην παραγωγή ινσουλίνης τόσο κεντρικά όσο και άμεσα από τα παγκρεατικά κύτταρα είναι γεγονός, αλλά οι μηχανισμοί μέσω των οποίων διενεργείται αυτή απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση.

Τα τελευταία χρόνια ο πολυδιάστατος ρόλος του συστήματος της λεπτίνης στον ανθρώπινο οργανισμό αναδεικνύεται συνεχώς μιας και έχει διαπιστωθεί η δράσης της ως παράγοντα που συμμετέχει στην ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση (153, 154), στην ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος (155), στην οξείδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στους σκελετικούς μύες (156), στην ανάπτυξη και αναμόρφωση των οστών (157, 158), καθώς και στην ανοσολογική απόκριση και φλεγμονή (159).

Ο ρόλος της λεπτίνης στη λειτουργία του ανοσολογικού συστήματος και τη διαδικασία της φλεγμονής θα αναπτυχθεί παρακάτω εκτενώς.

1.8 Ανοσορυθμιστικός ρόλος της λεπτίνης και περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος

Την τελευταία δεκαετία το πρωτεϊνικό προϊόν του ob γονιδίου αναδεικνύεται ως ένας σημαντικός διαμεσολαβητής ενός πολύπλοκου δικτύου που συνδέει τη διατροφή, το μεταβολισμό και την ομοιόσταση του ανοσολογικού συστήματος. Πληθώρα μελετών υπέδειξαν ότι η λεπτίνη δρα όχι μόνο ως κλασσικός «αισθητήρας» της συσσώρευσης λίπους στον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά και ως ορμόνη απαραίτητη για την ανοσολογική απάντηση και γενικότερα τους μηχανισμούς στους οποίους συμμετέχουν κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος (129, 160, 161).

Η λεπτίνη φαίνεται να αποτελεί σημαντικό κρίκο της ανοσοαπάντησης αφού παράγεται σε υψηλά επίπεδα μαζί με άλλες πρωτεΐνες οξείας φάσης όπως η CRP (C-reactive protein: C-αντιδρώσα πρωτεΐνη), η IL-1 και η IL-6 κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, της σήψης και του πυρετού και παράλληλα επάγουν τη σύνθεση κυταροκινών, όπως ο TNF (tumor necrosis factor: παράγων νέκρωσης όγκων) και η IL-1 (129).

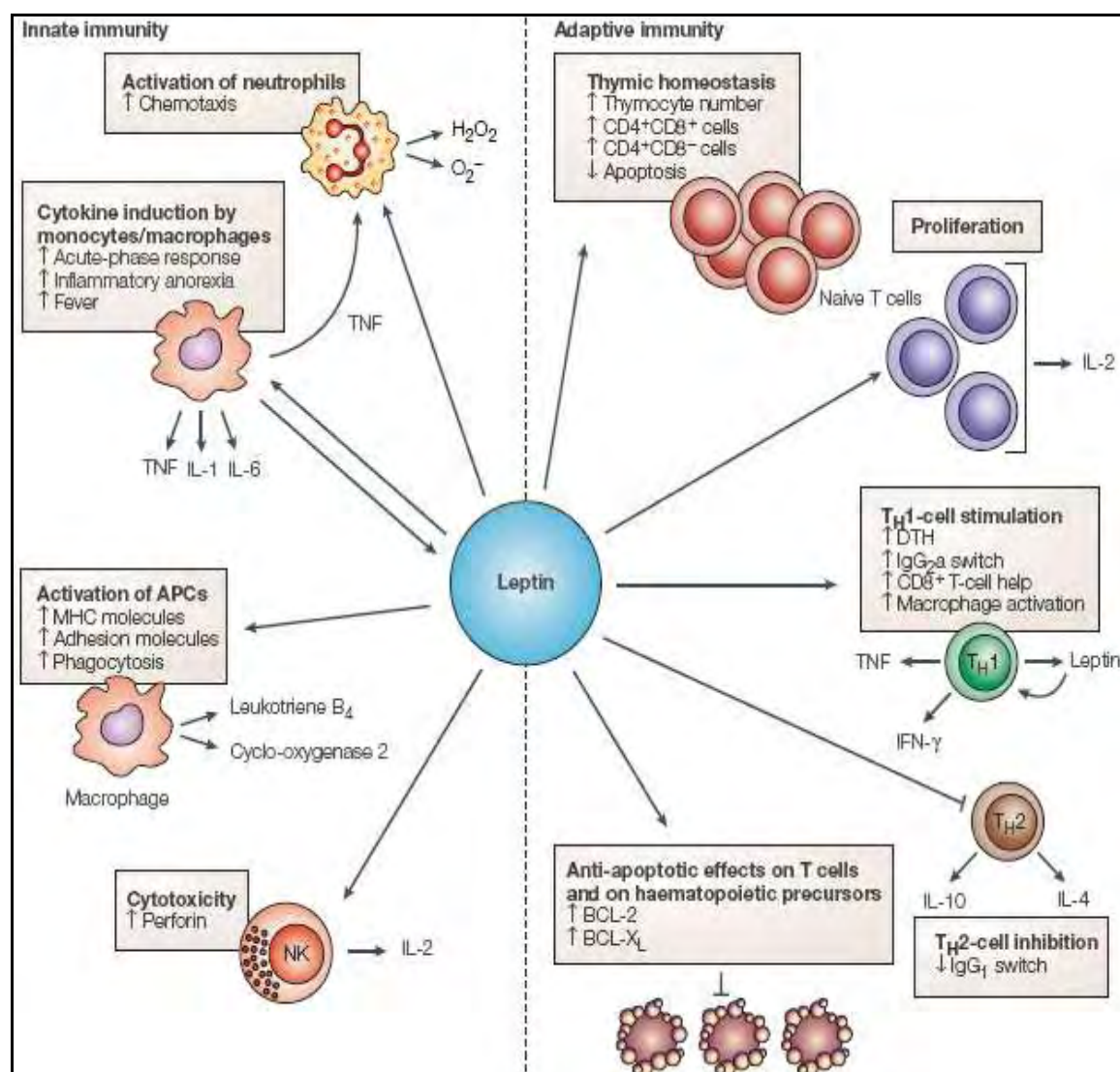
Η ανατομική γειτνίαση των λιποκυττάρων και των κυττάρων του λεμφικού συστήματος το οποίο περιλαμβάνει τους λεμφαδένες, το θύμο, το μυελό των οστών, το επίπλου και τις πλάκες του Payer δικαιολογεί και την συχνή αλληλεπίδρασή τους (161). Ειδικότερα ο λεμφικός ιστός και ο λιπώδης ιστός αλληλεπιδρούν δυναμικά μέσω ουσιών όπως η λεπτίνη, η αντιπονεκτίνη, οι χημειοκίνες και οι προ-φλεγμονώδεις κυταροκίνες. Για παράδειγμα, ο TNF και οι χημειοκίνες προάγουν τη διαφοροποίηση του λιπώδους ιστού και την έκκριση λεπτίνης, η οποία με τη σειρά της διεγείρει τη διαφοροποίηση των T-1 βοηθητικών κυττάρων (TH1:T-helper cells) (162, 163). Πειράματα επίσης σε ποντίκια με δυσλειτουργικό υποδοχέα λεπτίνης (db/db) ή ανεπάρκεια της (ob/ob) την κατέδειξαν ως απαραίτητο συστατικό της φυσιολογικής λεμφοποίησης και της ανάπτυξης της T-κυτταρικής σειράς (164-166).

Η λεπτίνη επιδρά στους μηχανισμούς τόσο της έμφυτης όσο και της επίκτητης ανοσίας (**εικόνα 7**). Σε ό,τι αφορά στην έμφυτη ανοσία η πρωτεΐνη του ob γονιδίου ρυθμίζει τη δραστηριότητα και λειτουργικότητα των ουδετερόφιλων αυξάνοντας τη χημειοταξία και την έκκριση από αυτά, προϊόντων του οξυγόνου, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υπεροξειδικό ανιόν (O_2^-), είτε έμμεσα είτε άμεσα (167-169). Πρόκειται, δηλαδή, για ενίσχυση της δράσης των ουδετερόφιλων αφού τα παραπάνω προϊόντα του οξυγόνου αποσυνθέτουν πρωτεΐνες και λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς και νουκλεϊκά οξέα. Ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους η λεπτίνη διεγείρει τα ουδετερόφιλα στον άνθρωπο φαίνεται να είναι μέσω της επαγωγής της παραγωγής TNF από τα μονοκύτταρα (170).

Μια ακόμη από τις δράσεις της σε σχέση με την έμφυτη ανοσία είναι η ενεργοποίηση της φαγοκυττάρωσης από τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και της έκκρισης από αυτά λευκοτριενίων, κυκλοοξυγενάσης 2 (COX 2), οξειδίου του αζώτου (NO) και προ-φλεγμονωδών κυταροκινών (171, 172). Στα κύτταρα φυσικούς-φονείς (NK) αυξάνει την κυταροτοξική τους ικανότητα, καθώς και τα επίπεδα της έκκρισης των περφορινών 1 και 2 και της IL-2 (173, 174). Ο Tian και οι συνεργάτες του προτείνουν μια ευρεία ρυθμιστική δράση της λεπτίνης επί των NK-κυττάρων

υποστηρίζοντας ότι επιδρούν στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση, στην ενεργοποίηση και στην κυτταροτοξικότητά τους (175).

Όπως πολλές κυτταροκίνες έτσι και η λεπτίνη φαίνεται να συμβάλλει δραστικά στην αποτροπή της απόπτωσης και την προαγωγή κατ' αυτόν τον τρόπο της κυτταρικής επιβίωσης των περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος (PBMCs) (176, 177). Κάποιες εργασίες προτείνουν πως ένας από τους μηχανισμούς που ενεργοποιεί η λεπτίνη ευνοώντας την κυτταρική επιβίωση, είναι το μοριακό μονοπάτι p42/44 MAPK (178, 179). Ο Fujita και οι συνεργάτες του παρουσιάζουν ισχυρές ενδείξεις ότι η λεπτίνη αναστέλλει την απόπτωση των T-λεμφοκυττάρων η οποία προκαλείται από τη νηστεία και τη χορήγηση στεροειδών σε ποντίκια, πιθανά αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου bcl-xL (62).

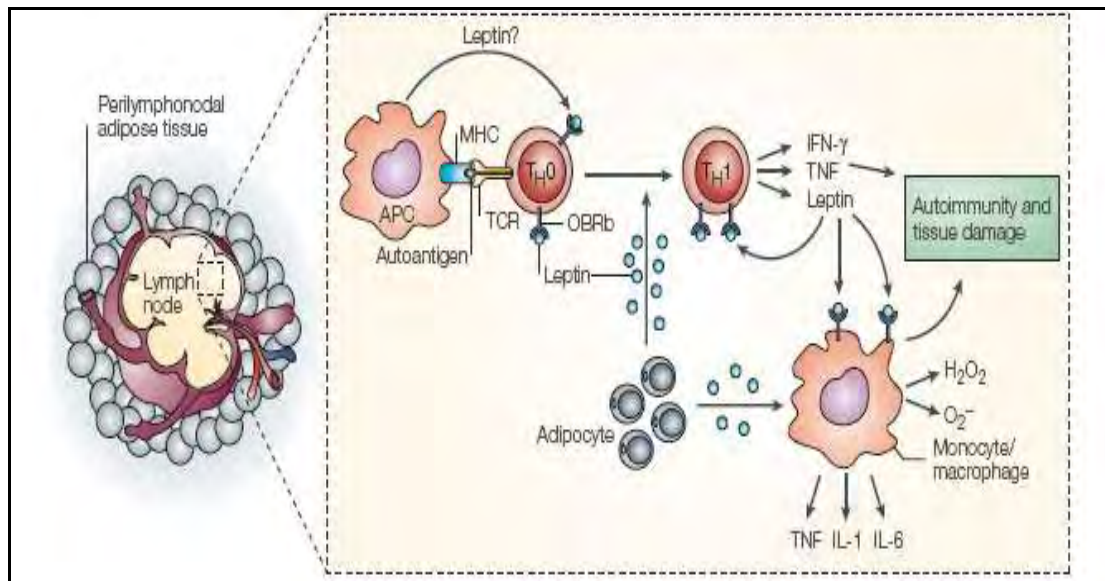


Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων της λεπτίνης στις έμφυτες και επίκτητες ανοσολογικές απαντήσεις (129).

Σε ό,τι αφορά στην επίκτητη ανοσοαπάντηση η λεπτίνη έχει επίσης καθοριστική συμβολή, αφού επηρεάζει την παραγωγή, ωρίμανση και επιβίωση των θυμικών T-κυττάρων μειώνοντας τον ρυθμό της απόπτωσής τους (180). Ειδικότερα, στα CD45 T-λεμφοκύτταρα που δεν έχουν έρθει σε επαφή με το αντιγόνο (naïve) διεγείρει τον πολλαπλασιασμό τους και την έκκριση IL-2 μέσω του MAPK/PI3K μοριακού μονοπατιού (181). Στα μνημονικά T-λεμφοκύτταρα (memory T-cells) προάγει το κλάσμα των TH-1 λόγω της επαγωγής της έκκρισης ιντερφερόνης-γ και του TNF, την παραγωγή IgG2a από τα B-κύτταρα και τις αντιδράσεις καθυστερημένης υπερευαισθησίας (DTS: Delayed-type hypersensitivity). Παράλληλα ευοδώνει την έκφραση μορίων διακυττάριας προσκόλλησης όπως ICAM1, CD54 και αντιγόνων της οικογένειας των β-ιντεγκρινών (όπως τα πολύ «ύστερα» αντιγόνα VLA) η παρουσία των οποίων είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση και μετανάστευση των T-κυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής (182). Η ανωτέρω διαδικασία ενισχύεται στη συνέχεια αυτοκρινώς, με την έκκριση λεπτίνης από τα ίδια τα TH-1 κύτταρα (183). Τελικώς η λεπτίνη παρουσιάζει αντι-αποπτωτική δράση επάγοντας την έκφραση πρωτεϊνών όπως οι BCL-2, BCL-xL τόσο στα ώριμα T-λεμφοκύτταρα όσο και στα θυμοκύτταρα (62, 63, 178).

Ο εκτεταμένος ρόλος της λεπτίνης στην ανοσολογική απάντηση και τη φλεγμονή ενισχύεται τα τελευταία χρόνια από την ανάμειξή της στις διαδικασίες της αυτοανοσίας (**εικόνα 8**). Σε μια από τις ισχύουσες θεωρίες, η λεπτίνη που εκκρίνεται από τα περιλεμφικά λιποκύτταρα προάγει τη διαφοροποίηση των TH-1 κυττάρων μετά την παρουσίαση αυτοαντιγόνων στα TH-0 βοηθητικά κύτταρα, την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων/μακροφάγων και την έκκριση από αυτά IL-1, IL-6 και TNF (129). Στην συνέχεια τα TH-1 επάγουν τις αυτοάνοσες αποκρίσεις και την καταστροφή των ιστών σε περιπτώσεις όπως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στα ηπατοκύτταρα, στα παγκρεατικά β-κύτταρα, στους χόνδρους και στο γαστρεντερικό βλεννογόνο (164, 184-187).

Πέραν βέβαια των ανωτέρω, χρειάζεται να εξακολουθήσει η ενδελεχής έρευνα που θα πιστοποιήσει τον ρόλο της λεπτίνης ως ισχυρού συνδέσμου μεταξύ του μεταβολισμού και του ανοσολογικού συστήματος.



Εικόνα 8. Σχηματικό διάγραμμα του ρόλου της λεπτίνης στην αυτοανοσία. APC: antigen presenting cell/αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, TNF: tumor necrosis factor/παράγοντας νέκρωσης όγκων, TCR: T-cell receptor/T-κυτταρικός υποδοχέας, IFN-γ: interferon-γ/ιντερφερόνη-γ, H₂O₂: hydrogen peroxide: υπεροξειδίο του υδρογόνου, MHC: major histocompatibility complex/μείζον σύστημα ιστοσυμβατότητας (129).

1.9 Λεπτίνη και Ήπαρ

Η λεπτίνη, ως ένα από τα κύρια μεταβολικά προϊόντα του λιπώδους ιστού, ενέχεται στην παθοφυσιολογία πληθώρας παθήσεων του ανθρώπου. Μιας και η συχνότητα της ηπατικής στεάτωσης είναι υψηλή, υπάρχει τελευταία αυξανόμενο ενδιαφέρον για τον ρόλο της λεπτίνης, αλλά και της αντιπονεκτίνης, στην ανάπτυξη της στεάτωσης, της νέκρωσης, της φλεγμονής και της ίνωσης που οι περισσότεροι ασθενείς με μη αλκοολικής φύσεως λιπώδες ήπαρ ή χρόνια ηπατίτιδα (B και C) παρουσιάζουν. Σύμφωνα με τα ισχύοντα επιστημονικά δεδομένα η μείωση της αντιπονεκτίνης και η αύξηση των επιπέδων λεπτίνης που συνήθως παρατηρούνται σε παχύσαρκους ασθενείς με ή χωρίς μεταβολικό σύνδρομο συνδέονται με την εναπόθεση λίπους στο ήπαρ, την ηπατίτιδα και την ίνωση (188, 189).

Η μη αλκοολικής φύσεως εναπόθεση λίπους στο ήπαρ (NAFLD: Non-alcoholic fatty liver disease) που μπορεί να οδηγήσει σε μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (NASH: non-alcoholic steatohepatitis) συνδέεται ισχυρά με την παχυσαρκία, το διαβήτη τύπου II και την αντίσταση στην ινσουλίνη (189). Η μοριακή παθογένεια της ινσουλινο-αντίστασης αν και πολυπαραγοντική φαίνεται να σχετίζεται

με τα επίπεδα λεπτίνης ανάλογα (188). Έχει βρεθεί επίσης ότι ο υποδοχέας OB-RL της λεπτίνης αυξάνει την έκφρασή του στα ενεργοποιημένα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα όσο προχωράει η διαδικασία της ίνωσης στην NAFLD (190). Εκτός αυτών σε ασθενείς με NASH διαπιστώθηκε πως τα επίπεδα λεπτίνης ορού ήταν σημαντικά υψηλότερα σε προχωρημένα στάδια φλεγμονής (βαθμός 2-3) και ίνωσης (στάδιο 2) παρά σε πρωϊμότερο επίπεδο προσβολής του ηπατικού παρεγχύματος (191). Σε άλλους ασθενείς με NAFLD βρέθηκε πως η λεπτίνη του ορού παρουσίαζε υψηλή συσχέτιση με τα επίπεδα τρανσαμινασών, σε διπλή μέτρηση με μεσοδιάστημα ενός χρόνου, με ή χωρίς αλλαγή του BMI σε αυτό το χρονικό διάστημα, παρέχοντας μια ακόμα ένδειξη για την επίδραση του συστήματος της λεπτίνης στο ήπαρ (192). Αντίθετα ο Canbakan και οι συνεργάτες του υποστηρίζουν πως η λεπτίνη του ορού λειτουργεί προστατευτικά έναντι της προοδευτικής αλλοίωσης του ηπατικού παρεγχύματος στην NAFLD (193).

Η ίνωση αποτελεί σαφώς χαρακτηριστική παθολογοανατομική διαπίστωση κατά την εξέλιξη των χρόνιων φλεγμονωδών παθήσεων του ήπατος. Σε αυτή την διαδικασία η λεπτίνη, τοπικώς ή κεντρικώς παραγόμενη, φαίνεται να έχει κομβικό ρόλο, ιδιαίτερα μέσω της μιτογόνου δράσης της επί των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων (HSC:hepatic stellate cells) και της αναστολής της απόπτωσής τους (194). Η φαγοκυττάρωση αποπτωτικών κυττάρων του ήπατος από τα αστεροειδή κύτταρα φαίνεται να είναι ένας μηχανισμός που τα ενεργοποιεί προς δράσεις που προάγουν την ίνωση (195). Πρόσφατα ο Jiang και οι συνεργάτες του υποστήριξαν ενισχύοντας τα ανωτέρω πως η λεπτίνη δια των υποδοχέων της στα HSCs ευνοεί αυτή τη φαγοκυτταρική δράση τους κυρίως με το μηχανισμό που εξαρτάται από τις Rho GTPάσες (GTPάσες τύπου ras που εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταροσκελετού) (196).

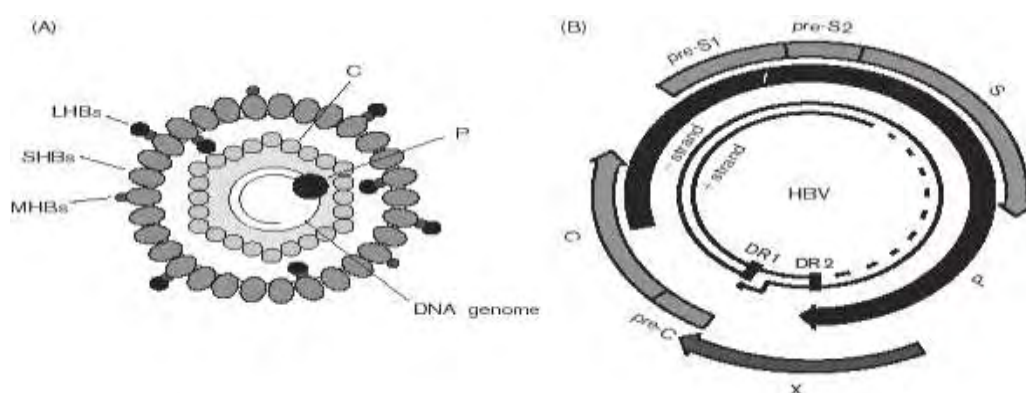
Παράλληλα η λεπτίνη βρέθηκε να επάγει τη δράση των κυτταροκινών που προάγουν την ίνωση στα αστεροειδή κύτταρα, ενώ η έγχυση της σε ποντίκια που λαμβάνουν ηπατοτοξίνες αύξησε την έκφραση του προ-κολλαγόνου 1, του TGF-β1, της ακτίνης, καθώς και την διαδικασία της ίνωσης στο ήπαρ τους (197, 198). Εκτός αυτών η έγχυση λεπτίνης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων TNF-α στον ορό ποντικών αναδεικνύοντας μια ακόμα διάσταση στη δράση της. Αντίθετα, αρουραίοι με αντοχή στην λεπτίνη και ob/ob ποντίκια παρουσίαζαν μειωμένα επίπεδα των αποκρίσεων που εν γένει προάγουν την ίνωση στο ήπαρ (188). Επιπλέον η αναστολή της δράσης της λεπτίνης σε in vivo και in vitro πειράματα κατέδειξε ελάττωση έως και πλήρη αναστροφή της ηπατικής ίνωσης σε ποντίκια, υποδεικνύοντας και σε αυτή την περίπτωση τα HSCs ως κύτταρα ρυθμιστές της δράσης της λεπτίνης στο ήπαρ (199).

Πέραν των αστεροειδών κυττάρων σημαντικό συστατικό στο μηχανισμό που κινητοποιείται από τη λεπτίνη στο ήπαρ φαίνεται να αποτελούν και τα κύτταρα Kupffer πιθανά έμμεσα μέσω της παραγωγής TGF- β 1, σύμφωνα με τον Wang και τους συνεργάτες του (200). Ο TGF- β 1 άλλωστε όπως έχει αποδειχθεί παρουσιάζει υψηλή συσχέτιση με την έκφραση του OB-Rb και την πρόοδο της ίνωσης στο ήπαρ ασθενών με NASH (201). Επίσης η έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης σε κολποειδικά κύτταρα ήπατος αρουραίων (sinusoidal cells) ενισχύει την άποψη πως η δράση της στο ήπαρ μπορεί να έχει και παρακρινή ή αυτοκρινή χαρακτήρα λόγω της τοπικής παραγωγής της (202).

Οι βλάβες που προκαλούνται στο ήπαρ από τους ηπατοτρόπους ιούς όπως ο HBV και ο HCV οδηγούν σε χρόνια ηπατίτιδα σε σημαντικό ποσοστό ασθενών που έρχονται σε επαφή με αυτούς με τελικό αποτέλεσμα τον αυξημένο ρυθμό αναγέννησης, τη χρόνια φλεγμονή και την προοδευτική καταστροφή του ηπατικού παρεγχύματος.

Ο HBV ανήκει στην οικογένεια των *Hepadnaviridae* ιών. Αποτελείται από ένα εν μέρει δίκλωνο και εν μέρει μονόκλωνο κυκλικό μόριο DNA μεγέθους 3,2kb, το οποίο περιβάλλεται από έναν φάκελο (εικόνα 9). Το πλήρες σωματίδιο του HBV είναι σχεδόν σφαιρικό με διάμετρο 42nm και είναι γνωστό ως σωματίδιο του Dane (203).

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV: hepatitis C virus) ανήκει στην οικογένεια των ιών *Flaviviridae*. Είναι ένας RNA ιός διαμέτρου 30-60nm με περίβλημα πλούσιο σε λιπίδια. Το γονιδιώμα του αποτελείται από ένα 9,6 kb ευθύγραμμο μονόκλωνο μόριο RNA (εικόνα 10) θετικής κατεύθυνσης, το οποίο λειτουργεί και ως αγγελιοφόρο RNA. Ο ιός διαθέτει νουκλεοκαψίδιο, το οποίο περιβάλλεται από φάκελο, που προέρχεται από τη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή (203).



Εικόνα 9. Δομή και οργάνωση του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV) (203).



Εικόνα 10. Οργάνωση του γονιδιώματος του ιού της ηπατίτιδας C (HCV) (203).

Εφόσον τα ποσοστά μετάπτωσης σε χρόνια ηπατίτιδα μετά από λοίμωξη με τον HCV είναι μεγαλύτερα σε σχέση με τον HBV, οι μελέτες που συσχετίζουν τη χρόνια ηπατίτιδα C με το σύστημα της λεπτίνης είναι προφανώς πολυπληθέστερες. Η λεπτίνη έχει πιθανά ρόλο στην εξέλιξη της CHC (chronic hepatitis C: χρόνια ηπατίτιδα), αφού και αυτή σχετίζεται με την ινσουλινο-αντίσταση, την στεάτωση και ίνωση του ήπατος όσο εξελίσσεται (188, 189). Ο Liu και οι συνεργάτες του διατύπωσαν την παρατήρηση ότι τα επίπεδα λεπτίνης στον ορό ασθενών με HCV είναι υψηλότερα από ότι σε φυσιολογικά άτομα, ενώ ο Crespo και η ομάδα του διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα λεπτίνης αυξάνονται όσο η διαδικασία της ίνωσης μεταπίπτει σε πιο προχωρημένο στάδιο (204, 205). Σε μια άλλη μελέτη με CHC ασθενείς βρέθηκε ότι τα επίπεδα λεπτίνης σχετίζονται με την πρόοδο της στεάτωσης αλλά μόνο στις περιπτώσεις με γενότυπο 1 και όχι σε αυτές με γενότυπο 3 (206). Ο Giannini και οι συνεργάτες του μελετώντας ασθενείς με CHC χωρίς όμως διαβήτη, παχυσαρκία, υπερλιπιδαιμία και κατανάλωση αλκοόλ διαπίστωσε πως η λεπτίνη δεν σχετίζονταν με την εξέλιξη της στεάτωσης και της ίνωσης που παρουσίασε το ήπαρ τους (207). Υπήρξαν βέβαια και αρκετές μελέτες που απέτυχαν να αναδείξουν την οποιαδήποτε σχέση της λεπτίνης με την χρόνια ηπατίτιδα C και το βαθμό της εξέλιξης των ηπατικών βλαβών (188). Τα αντικρουόμενα αυτά ευρήματα χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης, αλλά αποτελούν ενδείξεις για τον πιθανό ρόλο του συστήματος της λεπτίνης στην εξέλιξη των χρόνιων, ιογενών ηπατοπαθειών.

Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι η λεπτίνη του ορού έχει βρεθεί σε κάποιες μελέτες αυξημένη σε περιπτώσεις κίρρωσης (σε HBV και HCV ασθενείς) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (188, 208, 209). Εκτός της συστηματικώς κυκλοφορούσας λεπτίνης φαίνεται ότι έχουμε αύξηση της παραγωγής λεπτίνης στο κίρρωτικό ήπαρ από τα αστεροειδή κύτταρα που συμβάλλει τόσο στην παθοφυσιολογία όσο και στις μορφολογικές αλλαγές που παρατηρούνται στις χρόνιες ηπατοπάθειες (190). Η κίρρωση ως γνωστόν αποτελεί το τελικό στάδιο διαταραχής της αρχιτεκτονικής του ηπατικού παρεγχύματος και έκπτωσης της ηπατικής λειτουργίας, ως συνέπεια των χρόνιων ηπατοπαθειών. Επιπλέον τα επιμέρους συστατικά του συστήματος της λεπτίνης (ελεύθερη, συνδεδεμένη, διαλυτή μορφή του υποδοχέα) φαίνεται να έχουν

διακριτούς ρόλους στους κίρρωτικούς ασθενείς. Ειδικότερα, η ελεύθερη λεπτίνη σχετίζεται κυρίως με μεταβολικές παραμέτρους (ενεργειακή ομοιόσταση, ινσουλινοαντίσταση, ηπατική γλυκονεογένεση), ενώ το συνδεδεμένο κλάσμα της και ο υποδοχέας με τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτταροκινών και τη συμπαθητική δραστηριότητα (210).

Πρέπει να αναφερθεί πως εφόσον οι χρόνιες ηπατοπάθειες (ιογενείς και μη) προσφέρουν τόσο το μιτογόνο όσο και το μεταλλαξιγόνο περιβάλλον, το οποίο είναι σε θέση να προκαλέσει την τροποποίηση του επιπέδου έκφρασης των διαφόρων γονιδίων στο ηπατοκύτταρο, οι μελέτες του μέλλοντος θα πρέπει να εστιάσουν όχι μόνο στην κεντρικώς παραγόμενη λεπτίνη αλλά και στα επίπεδα τοπικής έκφρασής της στο μικροπεριβάλλον του ήπατος.

1.10 Λεπτίνη και Καρκίνος

1.10.1 Γενικό μέρος

Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά δεδομένα των τελευταίων δύο δεκαετιών, η παχυσαρκία στους ενήλικες σχετίζεται ισχυρά με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτη και κάποια είδη καρκίνου (211). Ενώ όμως η επίδραση της παχυσαρκίας στο καρδιαγγειακό και το διαβήτη έχει επαρκώς στοιχειοθετηθεί, σε ότι αφορά στην καρκινογένεση οι σύνδεσμοι μεταξύ αιτίου-αιτιατού βρίσκονται υπό διερεύνηση. Ισχυρές ενδείξεις υπάρχουν πλέον ότι η λεπτίνη, η οποία είναι αυξημένη σε παχύσαρκα άτομα, αποτελεί κύριο συστατικό στις διαδικασίες καρκινογένεσης διαφόρων τύπων (212, 213).

Υπάρχουν μελέτες οι οποίες αναδεικνύουν τη θετική συσχέτιση τόσο των επιπέδων λεπτίνης ορού όσο και γενικότερα της παχυσαρκίας με τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνων του μαστού (214, 215). Ο Tensitore και οι συνεργάτες του επίσης υποστήριξαν τη θετική συσχέτιση λεπτίνης ορού με τους υποδοχείς οιστρογόνων (ER), καθώς και τους υποδοχείς προγεστερόνης σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού (216). Βέβαια, θα πρέπει να αναφερθεί ότι υπήρξαν και κάποιες δημοσιεύσεις οι οποίες δεν συσχέτισαν την κυκλοφορούσα στη συστηματική κυκλοφορία λεπτίνη με τον καρκίνο του μαστού ή με τον κίνδυνο για εκδήλωσή του στις προ- ή μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (217, 218). Πληθώρα *in vitro* μελετών ανέδειξαν τη λεπτίνη ως μιτογόνο παράγοντα για καρκινικά κύτταρα του μαστού, ενώ πρότειναν και γονίδια στόχους της στο μαστό όπως η σουρβινίνη (survivin), και η κυκλίνη D1 (cyclin D1) (219-221).

Εκτός αυτών μελέτες *in vivo* αλλά και *in vitro* έδειξαν πως η παχυσαρκία και τα υψηλά επίπεδα λεπτίνης που τη συνοδεύουν έχουν σε ποικίλο βαθμό συσχέτιση και με άλλες μορφές καρκίνου όπως του παχέως εντέρου, του προστάτη, του ενδομητρίου, της ωοθήκης, του παγκρέατος και των πνευμόνων (212, 222-227).

1.10.2 Λεπτίνη και ηπατοκυτταρικός καρκίνος

Αυξανόμενο ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης ο ρόλος της λεπτίνης και των υποδοχέων της στην ηπατοκαρκινογένεση και στη μετάπτωση των χρόνιων ηπατοπαθειών σε κακοήθεια. Πολυπληθυσμιακές έρευνες έδειξαν ότι η παχυσαρκία αποτελεί πιθανά ισχυρό αιτιολογικό παράγοντα που προάγει τον ηπατοκυτταρικό καρκίνο (HCC:hepatocellular carcinoma) (228-232). Μια ερευνητική ομάδα από τη Δανία μελέτησε μια σειρά περίπου 44.000 παχύσαρκων ατόμων και κατέληξε στο συμπέρασμα πως ο κίνδυνος ανάπτυξης HCC σε σχέση με το γενικό πληθυσμό είναι αυξημένος κατά 1,9 φορές (230). Σε μια πιο πρόσφατη έρευνα στις Ηνωμένες Πολιτείες η πληθυσμιακή δεξαμενή που μελετήθηκε περιλάμβανε 1.000.000 περίπου άτομα με μεγάλο εύρος BMI (18-35) και είχε αντίστοιχα ευρήματα (233). Ειδικότερα μεταξύ των ανδρών είναι χαρακτηριστικό ότι η παχυσαρκία επιδρούσε στο σχετικό κίνδυνο ανάπτυξης HCC σε υψηλότερο βαθμό από ότι για όλους τους άλλους τύπους καρκίνου (π.χ. προστάτη, νεφρού, χοληδόχου κύστης, παχέως εντέρου, ορθού, οισοφάγου, στομάχου και παγκρέατος (233). Επίσης διαπιστώθηκε πως όχι η γενετική αλλά η διατροφικής αιτιολογίας παχυσαρκία προάγουν την φλεγμονή του ήπατος και τη μετέπειτα καρκινογένεση σε ποντίκια (234). Τέλος, πρόσφατα, η υψηλή έκφραση της λεπτίνης και των υποδοχέων της συσχετιστήκαν με το βαθμό της αγγειογένεσης στον καρκίνο του ήπατος, ενώ η νεοαγγειογένεση που προάγεται από τη λεπτίνη σε ασθενείς με μη-αλκοολική στεατοηπατίτιδα έχει σημαντικό ρόλο στη μετάπτωσή της σε HCC (235, 236).

Πέραν των επιδημιολογικού χαρακτήρα μελετών, τα τελευταία χρόνια υπήρξαν έρευνες που προσπάθησαν να τεκμηριώσουν την σχέση σε μοριακό επίπεδο του συστήματος της λεπτίνης με την ηπατική καρκινογένεση και την εξέλιξη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Ειδικότερα διαπιστώθηκε ότι η λεπτίνη προάγει τη διεισδυτικότητα και το μεταστατικό δυναμικό των ηπατοκαρκινικών κυττάρων (HepG2, Huh7) μέσω της ενεργοποίησης των JAK/STAT, PI3/AKT και ERK μοριακών μονοπατιών (235-237). Επίσης η λεπτίνη βρέθηκε να προάγει τον πολλαπλασιασμό και να αναστέλλει την απόπτωση στα ηπατοκαρκινικά κύτταρα δια της ενεργοποίησης της κυκλίνης D1 και της μείωσης της έκφρασης του αποπτωτικού γονιδίου BAX (238). Εκτός της δράσης της λεπτίνης, ο υποδοχέας αυτής πιθανά έχει

προγνωστική αξία στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο, όπως υποστήριξαν ο Wang και οι συνεργάτες του (239). Τέλος τόσο η λεπτίνη όσο και ο λειτουργικός υποδοχέας της σχετίζονται με το βαθμό της αγγειογένεσης στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο και επομένως με το μεταστατικό δυναμικό του (236).

1.11 Τελομερή, τελομεράση και Ηπατοπάθειες

Η διαφαινόμενη θέση του συστήματος της λεπτίνης τόσο στη φλεγμονή του ήπατος και σε διάφορης αιτιολογίας ηπατίτιδες όσο και στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο, ο ρόλος της τελομεράσης στις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες και στη μετεξέλιξη τους σε κακοήθεια και η πρόσφατη διαπίστωση του ρυθμιστικού ρόλου της λεπτίνης επί των επιπέδων έκφρασης της hTERT στον καρκίνο του μαστού (240) μας ώθησαν στην αναζήτηση της πιθανής συσχέτισης μεταξύ λεπτίνης και τελομεράσης σε μοριακό επίπεδο και του μηχανισμού αλληλεπίδρασής τους εντός του ηπατικού παρεγχύματος.

Ειδικότερα, στα άκρα των χρωμοσωμάτων εδράζουν δομές που αποτελούνται από σύμπλοκα επαναλήψεων DNA και πρωτεϊνών που ονομάζονται τελομερή. Πρόκειται για τα φυσικά άκρα των χρωμοσωμάτων που στον άνθρωπο αποτελούνται από τις εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις με το γενικό τύπο (TTAGGG)_n, το μήκος των οποίων κυμαίνεται από 5-10 kb, με τα μακρύτερα τελομερή να εντοπίζονται στον μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 17 (241).

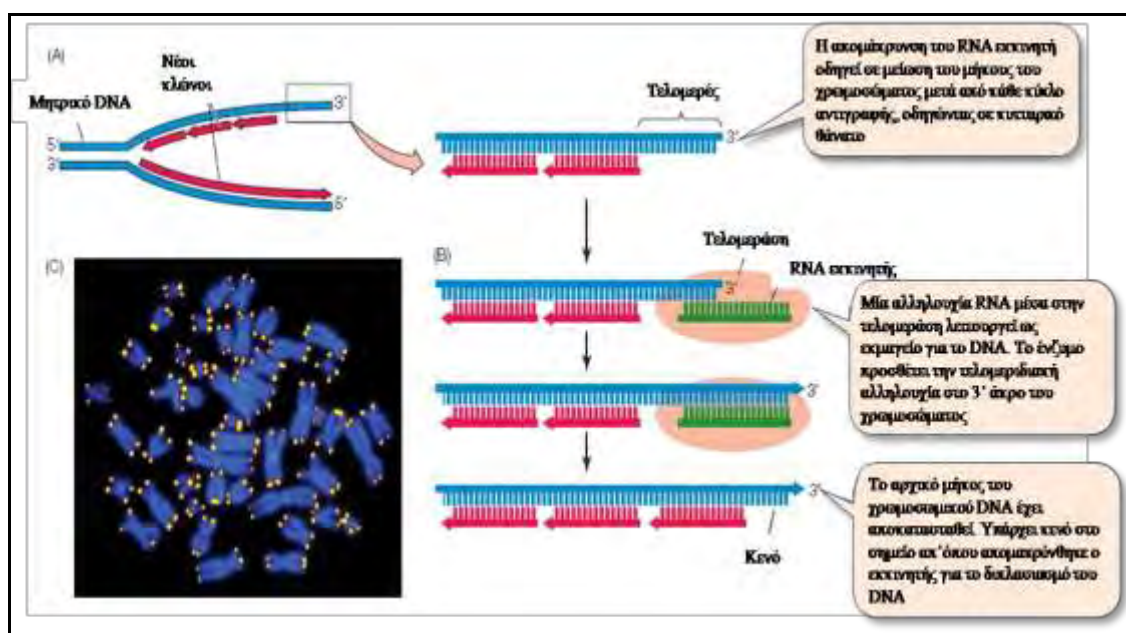
Το κύριο χαρακτηριστικό της δομής των τελομερών είναι ο τελομερικός βρόχος (*t-loop*) που σχηματίζεται στο 5' άκρο κάθε χρωμοσωμικού κλώνου. Αυτή η προεξοχή που έχει μήκος 150-250 περίπου βάσεων και είναι πλούσια σε γουανίνη (G), αναδιπλώνεται συναντώντας το δίκλωνο τμήμα του τελομερούς και σχηματίζοντας μία δομή που θυμίζει βρόχο (242).

Προχωρώντας από τα τελομερή στο "κυρίως σώμα" του χρωμοσώματος εντοπίζονται οι υποτελομερικές περιοχές. Σε αυτές τις περιοχές παρατηρείται εκφυλισμός της αλληλουχίας του DNA, ενώ δεν περιέχονται πολλά γονίδια. Συγκεκριμένα, ανιχνεύεται μια σειρά από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, που ονομάζονται TAS από τα αρχικά των λέξεων *telomeric-associated sequences*. Τέτοιες αλληλουχίες έχουν βρεθεί σε όλα τα είδη από τις ζύμες ως τον άνθρωπο και παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία ως προς την αλληλουχία, το μήκος και την πολυπλοκότητα τους, ακόμη και μεταξύ χρωμοσωμάτων του ίδιου είδους (243).

Τα τελομερή συμβάλλουν στην προστασία των χρωμοσωμικών άκρων με τη διατήρηση της χρωμοσωμικής ακεραιότητας, με την αποτροπή της αποικοδόμησης

των κλώνων του DNA καθώς και της σύντηξης ή αναδιάταξης των χρωμοσωμάτων. Επιπρόσθετα, διαμεσολαβούν στην πρόσδεση των χρωμοσωμάτων στο πυρηνικό στρώμα (*nuclear matrix*) και συμμετέχουν στην στοίχιση και στο διαχωρισμό τους κατά τη μείωση. Επίσης συμβάλλουν στην ολοκληρωμένη αντιγραφή των χρωμοσωμάτων και στη λειτουργική οργάνωσή τους μέσα στον πυρήνα (244).

Η αντιγραφή του DNA είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία που πραγματοποιείται με μεγάλη ταχύτητα και εξαιρετική ακρίβεια. Ξεκινά από καθορισμένα σημεία του μορίου DNA που πρόκειται να αντιγραφεί τα οποία ονομάζονται θέσεις έναρξης της αντιγραφής και προχωρά ταυτόχρονα και προς τις δυο κατευθύνσεις του. Για την έναρξη και ολοκλήρωση της αντιγραφής απαιτείται σημαντικός αριθμός ενζύμων, με κυριότερες τις DNA πολυμεράσες οι οποίες όμως δεν έχουν την ικανότητα αντιγραφής στην άκρη του γραμμικού χρωμοσωμικού DNA με αποτέλεσμα η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα DNA να είναι ελαφρώς κοντύτερη σε σχέση με την μητρική αλυσίδα. Το φαινόμενο αυτό αναφέρεται ως «πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής» (*end replication problem*) (245) (εικόνα 11).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση του προβλήματος ολοκλήρωσης της αντιγραφής (245).

Αποτέλεσμα του προβλήματος ολοκλήρωσης της αντιγραφής είναι, σε κάθε διαίρεση, τα χρωμοσώματα να χάνουν περίπου 20- 200 ζεύγη βάσεων από τα τελομερή τους. Κατ' επέκταση, σε κάθε διαίρεση χάνονται συνεχώς αλληλουχίες τελομερών μέχρι ένα συγκεκριμένο όριο πέραν του οποίου τα χρωμοσώματα αποκτούν κολλώδη άκρα, αναδιατάσσονται και μεταλλάσσονται. Οι αλλαγές που

συμβαίνουν στα χρωμοσώματα δεν επιτρέπουν στα κύτταρα να συνεχίσουν με επιτυχία την κυτταρική διαίρεση, με αποτέλεσμα να εισέρχονται σε διαδικασία απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου. Κάθε τύπος κυττάρου έχει, λοιπόν, ένα περιορισμένο αριθμό διαιρέσεων τις οποίες μπορεί να υποστεί, γνωστό ως όριο Hayflick (246). Τα τελομερή, επομένως, λειτουργούν σαν το ρολόι της ζωής του κυττάρου, εφ' όσον επιτρέπουν στα κύτταρα συγκεκριμένο αριθμό διαιρέσεων αποτρέποντας τη δημιουργία "αθάνατων" κυττάρων.

Το «πρόβλημα ολοκλήρωσης της αντιγραφής» επιλύει μια ειδική αντίστροφη μεταγραφάση, η τελομεράση, η οποία για πρώτη φορά αναγνωρίστηκε στο ακραιόφιλο *Tetrahymena thermophila*. Η τελομεράση είναι μία RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, που συμμετέχει στη διεργασία της αντιγραφής του DNA και έχει την ικανότητα να προσθέτει επαναλήψεις νουκλεοτιδίων στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Η προσθήκη αυτών των επαναλήψεων έχει σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση και σταθεροποίηση του μήκους των τελομερών παρέχοντας στα κύτταρα τη δυνατότητα για απεριόριστο αριθμό διαιρέσεων. Τα κύτταρα με δραστική τελομεράση διατηρούν το μήκος των τελομερών τους και επομένως την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους, ενώ με την απουσία της τελομεράσης τα κύτταρα χάνουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού και οδηγούνται στην κυτταρική γήρανση (243, 245).

Η τελομεράση είναι ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο μεγέθους περίπου 1000kDa. Αποτελείται από δύο υπομονάδες, μία RNA υπομονάδα που λειτουργεί σαν εκμαγείο για την σύνθεση συμπληρωματικού DNA (*human Telomerase RNA*, hTR ή *human Telomerase RNA Component*, hTERC) και μία υπομονάδα με δράση αντίστροφης μεταγραφάσης (*human Telomerase Reverse Transcriptase*, hTERT) (247) (**Εικόνα 12**). Διαφορετικά γονίδια κωδικοποιούν για τις υπομονάδες hTR και hTERT. Η hTR με την hTERT αποτελούν τις κεντρικές υπομονάδες της τελομεράσης ενώ και άλλες πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για την ολοκλήρωση της δραστηριότητας του ενζύμου (248).

Το γονίδιο hTERT, που κωδικοποιεί τη σύνθεση της πρωτεϊνικής υπομονάδας της τελομεράσης εδράζεται στον βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (5p15.33), περίπου 2Mb από το τελομερές και αποτελείται από 16 εξόνια και 15 ιντρόνια. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 127 kDa που περιλαμβάνει 1132 αμινοξέα, αρκετά συντηρημένη και η οποία παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με άλλες ανάστροφες μεταγραφάσες. Ο κύριος ρόλος της hTERT είναι η αύξηση και η διατήρηση του μήκους των τελομερών (249). Επιπλέον, η hTERT αυξάνει τη σταθερότητα του γενετικού υλικού υποβοηθώντας, αν όχι συμμετέχοντας, στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς (250). Η αντιγραφή των τελομερών με το ένζυμο τελομεράση γίνεται με διαφορετικό μηχανισμό από αυτόν της αντιγραφής. Η δράση

1.12 Σκοπός της διατριβής

Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική έρευνα έχει αναδείξει τον ανοσορυθμιστικό ρόλο της λεπτίνης ως σημαντικό μηχανισμό που ενέχεται στις διαδικασίες ίνωσης του ήπατος, καθώς και της συντήρησης της χρόνιας φλεγμονής σε αυτό. Πέραν τούτου ισχυροποιείται η συσχέτιση που φαίνεται να έχει η παχυσαρκία και συνεπώς οι κυτταροκίνες του λιπώδους ιστού, μεταξύ αυτών και η λεπτίνη, με τους μηχανισμούς ογκογένεσης σε πολλούς ιστούς του ανθρώπινου σώματος, όπως και στον ηπατικό ιστό.

Συνυπολογίζοντας τα ανωτέρω, σκοπός της παρούσας διατριβής υπήρξε η διαλεύκανση του ρόλου του συστήματος της λεπτίνης στην πορεία της χρόνιας, ιογενούς αιτιολογίας, φλεγμονής του ήπατος καθώς και της ενδεχόμενης μετεξέλιξης της σε ογκογόνο διαδικασία. Για την επίτευξη αυτού του στόχου η μελέτη περιλαμβάνει αναλυτικότερα :

- Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της στα PBMCs μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ομάδων των ασθενών με HBV, HCV, αλκοολική και αυτοάνοση ηπατίτιδα.
- Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων της λεπτίνης στα PBMCs και των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών.
- Σύγκριση των επιπέδων λεπτίνης ορού μεταξύ των ομάδων μελέτης που προαναφέρθηκαν.
- Σύγκριση της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της σε ηπατικούς ιστούς υγιών, ασθενών με χρόνιες ηπατοπάθειες και ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο.
- Ανάλυση των κυτταρομετρικών ευρημάτων της έκφρασης του υποδοχέα της λεπτίνης στα PBMCs.
- Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της λεπτίνης, των υποδοχέων της, της hTERT και της ενεργότητας της τελομεράσης σε ηπατικό ιστό από υγιείς, ασθενείς με HBV, HCV και HCC μεταξύ τους, καθώς επίσης και με τα κλινικά χαρακτηριστικά τους.
- Αξιολόγηση των επιπέδων έκφρασης της hTERT και της ενεργότητας της τελομεράσης μετά τη χορήγηση λεπτίνης σε HepG2.
- Σύγκριση της έκφρασης της λεπτίνης και της hTERT μετά τη χορήγηση IL-6 και TSA σε HepG2.
- Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου και της βιωσιμότητας των HepG2 μετά τη χορήγηση λεπτίνης ή την αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης.

- Ανάλυση των επιπέδων MMPs και διάφορων προφλεγμονωδών παραγόντων σε HepG2 μετά τη χορήγηση λεπτίνης.

2.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1 Ομάδα μελέτης

Η μελέτη της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της (OB-R1, OB-Rs) σε περιφερικά μονοπύρηνια κύτταρα του αίματος και σε βιοψίες ήπατος ασθενών με χρόνιες ιογενείς (B και C ηπατίτιδα) και μη ηπατοπάθειες (αλκοολική, αυτοάνοση ηπατίτιδα) και ΗΚΚ(Ηπατοκυτταρικό καρκίνο) πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 195 ασθενείς. Αναλυτικότερα:

2.1.1α. Μελέτη στα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs)

Η μελέτη της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της στα PBMCs πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 126 άτομα. Από αυτά:

-65 έπασχαν από χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες B και C και ήταν υπό παρακολούθηση στην ηπατολογική μονάδα της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Από το σύνολο των ασθενών, 31 είχαν μολυνθεί από τον HBV και 34 είχαν μολυνθεί από τον HCV. Η ομάδα ασθενών με HBV λοίμωξη περιελάμβανε 17 άνδρες και 14 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας 51.1 έτη και BMI 26.6, ενώ η ομάδα ασθενών με HCV λοίμωξη περιελάμβανε 13 άνδρες και 21 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας 45.7 έτη και BMI 25.05. 25 συνολικά ασθενείς (15 με αλκοολική ηπατίτιδα και 10 με αυτοάνοση ηπατίτιδα) αποτέλεσαν την ομάδα των ασθενών με μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατίτιδα (disease control group)(συνολικά 14 άνδρες και 11 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας 46.1 έτη και BMI 27.1). Κανένας από τους ασθενείς δεν είχε λάβει αντιική θεραπεία για τουλάχιστον 12 μήνες πριν την είσοδο στη μελέτη. Η μέση τυπική απόκλιση της διάρκειας της ασθένειας στους HBV ασθενείς ήταν 95 ± 73.9 μήνες, ενώ για στους HCV ασθενείς ήταν 125 ± 141.57 μήνες. Κανείς από τους ασθενείς δεν είχε κλινική, εργαστηριακή ή ακτινολογική ένδειξη ΗΚΚ κατά την διάρκεια παρακολούθησης.

-36 υγιή άτομα αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (control group). Αναλυτικότερα, η ομάδα αυτή περιελάμβανε 15 άνδρες και 21 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας 47.5 έτη και BMI 24.52, με φυσιολογικά επίπεδα αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης (ALT: 26.5 ± 5.3 U/l), χωρίς ιστορικό HBV, HCV ή HIV λοίμωξης, αλκοολικής, αυτοάνοσης ή προκαλούμενης από φάρμακα ηπατοπάθειας, όπως αποδείχθηκε με τον κλινικοεργαστηριακό έλεγχο, καθώς και μετά από την χρήση των εμπορικά

διαθέσιμων δοκιμασιών (anti-HCV, Murex Diagnostics, Temple Hill, Dartford, UK και anti-HIV, Abbott Laboratories, Wiesbaden, Γερμανία).

2.1.1β. Μελέτη σε ηπατικό ιστό

Η μελέτη της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της σε ιστούς ήπατος πραγματοποιήθηκε συνολικά σε βιοψίες ήπατος από 79 ασθενείς. Αναλυτικότερα, η μελέτη περιλάμβανε 3 ομάδες:

-33 ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες εκ των οποίων οι 19 έπασχαν από χρόνια ηπατίτιδα Β (12 άνδρες και 7 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 50.06 έτη και BMI 26.3) και οι 14 από ηπατίτιδα C (8 άνδρες και 6 γυναίκες με μέσο όρο ηλικίας 41.6 και BMI 25.07). Οι ασθενείς αυτοί ήταν υπό παρακολούθηση στην Ηπατολογική μονάδα της Παθολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Κανείς από τους ασθενείς δεν είχε κλινική, εργαστηριακή ή ακτινολογική ένδειξη ΗΚΚ κατά την διάρκεια παρακολούθησης.

- 23 ασθενείς χωρίς ηπατοπάθεια αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (13 άνδρες, 10 γυναίκες, μέσος όρος ηλικίας 52.7 έτη και BMI 26.99) στους οποίους πραγματοποιήθηκε βιοψία ήπατος κατά την διάρκεια απλών χειρουργικών επεμβάσεων (π.χ. χολοκυστεκτομή).

-23 ασθενείς έπασχαν από ΗΚΚ (13 άνδρες, 10 γυναίκες, μέσος όρος ηλικίας 59.8 έτη και BMI 30.1) που διαγνώστηκε στο Comprehensive Cancer Center, The Ohio State University, στις ΗΠΑ. Η λήψη της βιοψίας ήπατος στους ασθενείς αυτούς πραγματοποιήθηκε στην διάρκεια χειρουργικής επέμβασης για τον ΗΚΚ και ενώ εμφάνιζαν επαρκή λειτουργία του ήπατος.

2.1.1γ. Διάγνωση χρόνιας λοίμωξης από HBV

Η διάγνωση της χρόνιας λοίμωξης από τον HBV βασίστηκε σε κλινικά, εργαστηριακά και ιστολογικά ευρήματα σύμφωνα με διεθνή κριτήρια (309). Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε 3 ομάδες: χρόνιους ανενεργούς φορείς, ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β και ασθενείς με κίρρωση του ήπατος εξαιτίας της χρόνιας λοίμωξης από τον HBV. Αναλυτικότερα:

Οι ασθενείς που χαρακτηρίστηκαν ως χρόνιοι ανενεργοί φορείς (n=13) HBV παρουσίαζαν:

α) θετικό το αντιγόνο επιφανείας του HBV (HBsAg, Abbott Laboratories, Wiesbaden, Γερμανία) περισσότερο των 6 μηνών

β) φυσιολογικά επίπεδα αμινοτρανσφερασών για διάστημα πέραν των 5 ετών και

γ) χαμηλά ή μη ανιχνεύσιμα επίπεδα HBV-DNA στον ορό ($<10^5$ αντίγραφα/ml), γεγονός που αποδεικνύει την έλλειψη ιϊκού πολλαπλασιασμού. Ο προσδιορισμός του επιπέδου του HBV-DNA πραγματοποιήθηκε με την τεχνική PCR και με εμπορικά διαθέσιμη δοκιμασία. (Cobas Amplicor HBV Monitor, Roche, cut off: 200 αντίγραφα/ml).

Οι ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα Β (n=13) παρουσίαζαν:

α) ορολογικά ευρήματα χρόνιας λοίμωξης από τον HBV για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη (HBsAg θετικό, αντί-HBc θετικό, αντί-HBe θετικό). Ο προσδιορισμός των ορολογικών παραμέτρων του HBV πραγματοποιήθηκε με τυποποιημένη μικροσωματιδιακή ELISA (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Γερμανία)

β) ενεργό ιϊκό πολλαπλασιασμό, όπως τεκμηριώθηκε με την ανίχνευση υψηλών επιπέδων HBV-DNA στον ορό των ασθενών ($>10^5$ αντίγραφα/ml)

γ) αυξημένα επίπεδα ALT (τουλάχιστον 2 φορές πάνω από τις ανώτερες φυσιολογικές τιμές) για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη και

δ) ιστολογικές αλλοιώσεις χρόνιας ηπατίτιδας Β χωρίς ενδείξεις κίρρωσης κατά την εκτίμηση βιοψιών ήπατος.

Οι ασθενείς με κίρρωση εξαιτίας χρόνιας λοίμωξης από τον HBV (n=5) παρουσίαζαν:

α) ορολογικά ευρήματα χρόνιας λοίμωξης από τον HBV για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη, όπως περιγράφηκε παραπάνω.

β) ενεργό ιϊκό πολλαπλασιασμό, όπως τεκμηριώθηκε με την ανίχνευση υψηλών επιπέδων HBV-DNA στον ορό των ασθενών (>200 αντίγραφα/ml)

γ) αυξημένα επίπεδα ALT (τουλάχιστον 2 φορές πάνω από τις ανώτερες φυσιολογικές τιμές) για τουλάχιστον 6 μήνες πριν την είσοδό τους στη μελέτη και

δ) ιστολογικά τεκμηριωμένη παρουσία κίρρωσης του ήπατος

2.1.1δ. Διάγνωση χρόνιας λοίμωξης από τον HCV

Η διάγνωση της χρόνιας λοίμωξης από τον HCV βασίστηκε σε κλινικά, εργαστηριακά και ιστολογικά ευρήματα, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενες μελέτες (N249). Όλοι οι ασθενείς με HCV που μελετήθηκαν παρουσίαζαν:

α) ορολογικά ευρήματα χρόνιας λοίμωξης από τον HCV όπως προέκυψε από την ανίχνευση αντισωμάτων anti-HCV χρησιμοποιώντας μικροσωματιδιακή

ELISA. Η εξέταση ήταν τουλάχιστον δύο φορές θετική μέσα σε έξι μήνες πριν από την είσοδο των ασθενών στη μελέτη,

β) ενεργό ιικό πολλαπλασιασμό όπως τεκμηριώθηκε με την ανίχνευση HCV RNA, με χρήση μιας προτυποποιημένης και εμπορικά διαθέσιμης RT-PCR (HCV Monitoring Cobas Amplicor, Roche, cut off: 50 U/ml).

2.1.1ε. Διάγνωση για ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ):

Τα κριτήρια διάγνωσης για το ΗΚΚ βασίστηκαν στις θέσεις ομοφωνίας του EASL συνεδρίου (256). Η ιστολογική διάγνωση έγινε με βάση το σύστημα κατάταξης AJCC (American Joint Committee of Cancer) (310). Από τα 13 δείγματα των ασθενών που εμφάνισαν ΗΚΚ, τα 9 χαρακτηρίστηκαν ως πλήρως διαφοροποιημένα (στάδιο 1), εκ των οποίων τα 8 η ανάπτυξη ΗΚΚ οφειλόταν σε HCV σχετιζόμενη κίρρωση ενώ στο 1 η ανάπτυξη ΗΚΚ οφειλόταν σε HBV σχετιζόμενη κίρρωση. Τα υπόλοιπα 4 δείγματα των ασθενών που εμφάνισαν ΗΚΚ, χαρακτηρίστηκαν ως μετρίως διαφοροποιημένα (στάδιο 2) και η ανάπτυξη ΗΚΚ οφειλόταν σε HCV σχετιζόμενη κίρρωση.

2.1.2. Απομόνωση κυττάρων

2.1.2.α Απομόνωση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (PBMCs)

Από το κάθε άτομο έγινε λήψη 6 ml περιφερικού αίματος το οποίο τοποθετήθηκε σε σωληνάριο που περιείχε EDTA ως αντιπηκτικό. Χρησιμοποιήθηκαν αποστειρωμένα σωληνάρια και ρύγχη, τα οποία είχαν επεξεργαστεί με διάλυμα DEPC, το οποίο καταστρέφει τις RNάσες, ενώ όλη η επεξεργασία του δείγματος πραγματοποιήθηκε στους 4°C.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Η απομόνωση των μονοπύρηνων κυττάρων από το περιφερικό αίμα έγινε μετά από διαχωρισμό με φυγοκέντρηση με βαθμίδωση φικόλης. Αναλυτικότερα μετά την λήψη του αίματος ακολούθησε αραίωση του αίματος με προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος PBS. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επιστοίβαξη του αραιωμένου αίματος σε σωληνάριο των 15ml στο οποίο είχαν προστεθεί 3ml φικόλης και ακλούθησε φυγοκέντρηση για 15min στις 1900rpm στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση στο σωληνάριο δημιουργούνται τρεις φάσεις: η ανώτερη φάση

περιλαμβάνει το πλάσμα, η μεσαία φάση περιλαμβάνει τα μονοπύρηνια κύτταρα (μεσόφαση) και η κατώτερη φάση περιλαμβάνει ερυθρά αιμοσφαίρια.

Στη συνέχεια έγινε μεταφορά της μεσόφασης σε νέο σωληνάριο των 15 ml, προσθήκη 10 ml PBS και φυγοκέντρηση για 15min στις 1900rpm στους 4°C. Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 10ml PBS και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15min στις 1900rpm στους 4°C. Το ίζημα που σχηματίστηκε περιείχε τα μονοπύρηνια κύτταρα, ενώ ακολουθούσε μέτρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο με την χρήση της πλάκας Neubauer και της χρωστικής Trypan blue.

2.1.2.β Βιοψίες ήπατος

i) Οι ιστοί ήπατος των ασθενών με χρόνιες ηπατίτιδες B και C ελήφθησαν κατά την διάρκεια διαδερμικής βιοψίας ήπατος και αμέσως γινόταν η μεταφορά τους στους -80°C μέχρι την χρησιμοποίησή τους.

ii) Οι ιστοί ήπατος των ασθενών με ΗΚΚ ελήφθησαν κατά την διάρκεια χειρουργικής επέμβασης, αμέσως τεμαχίστηκαν σε μικρότερα κομμάτια και μεταφέρθηκαν στους -80°C μέχρι την χρησιμοποίησή τους.

iii) Οι ιστοί ήπατος της ομάδας ελέγχου των υγείων ελήφθησαν κατά την διάρκεια εγχειρήσεων κοιλίας για διάφορους λόγους (π.χ χολοκυστεκτομή).

2.1.3 Κυτταρικές σειρές και καλλιέργεια

Στα in vitro πειράματα της μελέτης χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HepG2 του ήπατος (human hepatocellular liver carcinoma cell line). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν με καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Scotland, UK) εμπλουτισμένο με 10% ορό εμβρύων βοός (Gibco, Paisley, Scotland, UK), L-Γλουταμίνη σε συγκέντρωση 2mM (Gibco, Paisley, Scotland, UK), και με αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη σε συγκέντρωση 100 IU/ml και η στρεπτομυκίνη σε συγκέντρωση 100 µg/ml (Gibco, Paisley, Scotland, UK).

Η καλλιέργεια των HepG2 πραγματοποιήθηκε σε φλάσκες των 25 ml, σε κλίβανο με 5% CO₂, υγρασία 100%, στους 37°C. Όταν η περιεκτικότητα της φλάσκας σε κύτταρα φτάσει το 80 με 90% τότε ακολουθείται η εξής διαδικασία:

1. το θρεπτικό υλικό της φλάσκας απομακρύνεται
2. τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με 5 ml PBS (Biochrom)
3. προστίθεται στη φλάσκα 1 ml θρυψίνης (Biochrom) προθερμασμένης στους 37°C. Σε αυτό το στάδιο το πώμα της φλάσκας σφραγίζεται και η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο για 3-5 λεπτά περίπου.

4. η αποκόλληση των κυττάρων από τη φλάσκα ελέγχεται στο μικροσκόπιο

5. στα κύτταρα προστίθενται 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού ώστε να σταματήσει η δράση της θρυψίνης

6. ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων σε σωληνάριο των 15 ml και φυγοκέντρωση στις 800 στροφές για 5 λεπτά

7. μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται με 10 ml PBS. Σε αυτό το στάδιο γίνεται μέτρηση των κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο : 20 μl από το κυτταρικό εναιώρημα αναμιγνύονται με 20 μl Trypan Blue και τοποθετούνται σε αιμοκυτταρόμετρο και προσμετρώνται στο μικροσκόπιο. Το Trypan Blue βάφει μπλε τα κύτταρα των οποίων η κυτταρική μεμβράνη έχει υποστεί αλλοιώσεις, όπως τα αποπτωτικά και νεκρά κύτταρα. Τα υγιή κύτταρα δε βάφονται από το Trypan Blue και μόνο αυτά μετρώνται στο αιμοκυτταρόμετρο. Με τον τρόπο αυτό, υπολογίζεται η συγκέντρωση του κυτταρικού εναιωρήματος.

8. κατά τη διάρκεια της μέτρησης των κυττάρων και του υπολογισμού της συγκέντρωσής τους, το σωληνάριο με τα κύτταρα φυγοκεντρείται στις 800 στροφές για 5 λεπτά.

9. μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού.

10. με βάση τη συγκέντρωση που υπολογίστηκε σε ζωντανά κύτταρα έπειτα από τη μέτρηση στο αιμοκυτταρόμετρο, μία ποσότητα από το εναιώρημα των κυττάρων που να περιέχει 10^5 κύτταρα τοποθετείται σε μία νέα φλάσκα των 25 ml και η ποσότητα αυτή συμπληρώνεται μέχρι τα 10 ml με φρέσκο πλήρες θρεπτικό υλικό.

11. η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο με ελαφρώς ανοιγμένο το πώμα και ελέγχεται τις επόμενες ημέρες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Τα κύτταρα μπορούν να διατηρηθούν μετά από ψύξη στους -150°C . Η διαδικασία της ψύξης των κυττάρων γίνεται ως εξής: όταν μία φλάσκα των 25 ml γεμίσει κατά 90 με 100%, τα κύτταρα αποκολλώνται με θρυψίνη, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η δράση της θρυψίνης σταματά με την προσθήκη 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τα κύτταρα φυγοκεντρούνται. Κατά τη διάρκεια της φυγοκέντρωσης ετοιμάζεται το θρεπτικό της ψύξης των κυττάρων που αποτελείται από 60% θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά, 30% ορό εμβρύου και 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich). Το DMSO συντελεί στην αργή ψύξη των κυττάρων και του θρεπτικού υλικού, αποφεύγοντας τη δημιουργία κρυστάλλων που θα κατέστρεφαν την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων. Μετά από τη φυγοκέντρωση,

τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 2 ml από το θρεπτικό υλικό της ψύξης των κυττάρων και στη συνέχεια τοποθετούνται σε ειδικά κρυοφιαλίδια. Η κατάψυξη των κυττάρων γίνεται διαδοχικά. Τα κρυοφιαλίδια τοποθετούνται αρχικά στους -20°C για 4 ώρες περίπου, κατόπιν στους -80°C για 24 ώρες και στη συνέχεια στους -150°C .

Σε αντίθεση με τη διαδοχική ψύξη των κυττάρων, η απόψυξή τους γίνεται γρήγορα με την τοποθέτηση του κρυοφιαλιδίου σε υδατόλουτρο στους 37°C και άμεση μεταφορά του περιεχομένου του φιαλιδίου σε σωληνάριο των 15 ml που περιέχει 5 ml πλήρους θρεπτικού υλικού. Το σωληνάριο φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 800 στροφές, το υπερκείμενο απομακρύνεται, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τοποθετούνται σε φλάσκα των 25 ml.

Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων χορηγήθηκε λεπτίνη (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) σε συγκεντρώσεις 25, 50, 100, 200 ng/ml για 12, 24, 48 και 72 ώρες, καθώς και για χρονικό διάστημα 2 μηνών (αλλαγή θρεπτικού κάθε 2-3 ημέρες και ανανέωση φλάσκας όταν η πληρότητα τους φτάνει στο 90-95%). Σε άλλο κύκλο πειραμάτων χορηγήθηκε IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) σε συγκεντρώσεις 1, 10, 100 ng/ml για 24 ώρες ή TSA (Trichostatin A, Sigma), ένας αναστολέας της αποακετυλίωσης των ιστονών, σε συγκεντρώσεις 200, 500, 1000 nM για 24 ώρες.

2.1.4 Μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας

Η μελέτη της βιωσιμότητας των κυττάρων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του kit MTT της TACS (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Η δοκιμασία MTT κυτταρικού πολλαπλασιασμού και βιωσιμότητας είναι μία ασφαλής, ευαίσθητη in vitro τεχνική για τη μέτρηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή όταν μεταβολικά γεγονότα οδηγούν σε απόπτωση ή νέκρωση, για τη μέτρηση της μείωσης της κυτταρικής βιωσιμότητας. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες με 96 υποδοχές με επίπεδο πάτο. Το πρώτο στάδιο στη μελέτη της κυτταρικής βιωσιμότητας με το MTT είναι ο προσδιορισμός των χρόνων επώασης με τα αντιδραστήρια του kit για τον κάθε κυτταρικό τύπο και το κάθε σύστημα. Η μέθοδος στηρίζεται στο συστατικό tetrazolium του MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) το οποίο προστίθεται στις ειδικές υποδοχές και τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο στους 37°C . Κατά τη διάρκεια της επώασης, το MTT ανάγεται από τα κύτταρα με ενεργό μεταβολισμό σε αδιάλυτους μωβ κρυστάλλους formazan. Στη συνέχεια, στις υποδοχές προστίθεται ουσία με απορρυπαντική δράση, η οποία διαλυτοποιεί τους κρυστάλλους ώστε η απορρόφηση να μπορεί να μετρηθεί με κατάλληλο

φασματοφωτόμετρο. Η απορρόφηση των δειγμάτων μπορεί να μετρηθεί απευθείας μέσα στις ειδικές υποδοχές. Το ιδανικό μήκος κύματος απορρόφησης είναι τα 570 nm, αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε φίλτρο που απορροφά μεταξύ 550 και 600 nm. Τα δεδομένα αναλύονται σε διάγραμμα που παρουσιάζει τον κυτταρικό αριθμό σε σχέση με την απορρόφηση. Ο ρυθμός της αναγωγής του tetrazolium είναι ανάλογος του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Πιο αναλυτικά, η διαδικασία προσδιορισμού του κυτταρικού αριθμού και της χρησιμοποίησης του MTT για δείγματα είναι οι εξής :

2.1.4α Δοκιμασία MTT για τον προσδιορισμό του αριθμού των κυττάρων που πρέπει να χρησιμοποιηθούν.

1. Τα κύτταρα αποκολλώνται από τις φλάσκες στις οποίες καλλιεργούνται με τη χρησιμοποίηση θρυψίνης. Μετά την αποκόλλησή τους, τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με PBS και μετρώνται σε αιμοκυτταρόμετρο.

2. 5×10^6 κύτταρα /ml επαναδιαλύονται σε πλήρες θρεπτικό καλλιεργητικό υλικό. Προετοιμάζουμε 10 φιαλίδια για σειριακή διάλυση των κυττάρων.

3. Οι συγκεντρώσεις που προτείνονται για τη σειριακή διάλυση των κυττάρων κυμαίνονται από 5×10^6 έως 5×10^3 κύτταρα/ml. 100 μl από την κάθε συγκέντρωση τοποθετούνται σε διαφορετικές υποδοχές. Προκειμένου να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα, προτείνεται να προετοιμαστούν 3 τουλάχιστον υποδοχές για την κάθε συγκέντρωση, ώστε να πραγματοποιηθούν 3 τουλάχιστον μετρήσεις και να υπολογιστεί ο μέσος όρος της απορρόφησης. Σε άλλες 3 τουλάχιστον υποδοχές της πλάκας, τοποθετείται σκέτο θρεπτικό υλικό. Οι υποδοχές αυτές θα αποτελέσουν τα αρνητικά δείγματα ελέγχου.

4. Τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο στους 37°C για 6-48 ώρες. Τα κύτταρα χρειάζονται χρόνο για να προσκολληθούν (εφόσον είναι προσκολλώμενα). Ο χρόνος αυτός είναι διαφορετικός για τον κάθε κυτταρικό τύπο. 12-18 ώρες είναι αρκετές για τους περισσότερους τύπους κυττάρων.

5. Στην κάθε υποδοχή προστίθενται 10 μl από το αντιδραστήριο MTT.

6. Η πλάκα επωάζεται στους 37°C για 2-4 ώρες. Κατά τη διάρκεια της επώασης, ελέγχουμε τα κύτταρα περιοδικά στο ανάστροφο μικροσκόπιο, για να παρακολουθήσουμε την εμφάνιση στικτού ενδοκυτταρικού ιζήματος. Κάποιοι κυτταρικοί τύποι μπορεί να απαιτήσουν μεγαλύτερο χρόνο επώασης, που μπορεί να φτάσει και τις 24 ώρες.

7. Όταν τα μωβ στίγματα διακρίνονται ευκρινώς στο μικροσκόπιο, προστίθενται στα κύτταρα 100 μl του αντιδραστηρίου με την απορροπτική δράση, χωρίς ανάδευση, ακόμη και στις υποδοχές που περιέχουν σκέτο θρεπτικό υλικό.

8. Η πλάκα επωάζεται κλειστή, στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 18-24°C για τουλάχιστον 2 ώρες έως ολονύκτια. Η απορρόφηση των δειγμάτων μπορεί να μετρηθεί μετά από 2 ώρες, αλλά εάν οι μετρήσεις είναι πολύ χαμηλές και παραμένουν κρύσταλλοι στο θρεπτικό, τότε η πλάκα θα πρέπει να επωαστεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η επώαση της πλάκας στους 37°C μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία διαλυτοποίησης των κρυστάλλων.

9. Το κάλυμμα της πλάκας αφαιρείται και μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων και των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου στα 570 nm καθώς και στα 650 nm. Το δεύτερο μήκος κύματος χρησιμοποιείται ως μήκος κύματος αναφοράς. Τα αρνητικά δείγματα θα πρέπει να δίνουν τιμές απορρόφησης μεταξύ 0+/-0.1 μονάδες οπτικής πυκνότητας.

10. Προσδιορίζεται ο μέσος όρος για την κάθε συγκέντρωση και αφαιρείται από τον κάθε ένα, η μέση τιμή που θα έχει προκύψει από τα αρνητικά δείγματα ελέγχου. Σχεδιάζεται διάγραμμα, στον κατακόρυφο άξονα του οποίου τοποθετούνται οι τιμές της απορρόφησης και στον οριζόντιο ο αριθμός των κυττάρων ανά ml. Επιλέγεται ένας αριθμός κυττάρων που δίνει απορρόφηση μεταξύ των τιμών 0.75 και 1.25. Ο κυτταρικός αριθμός που θα επιλεγεί θα πρέπει να βρίσκεται στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

2.1.4β Δοκιμασία MTT για δείγματα

1. Τα κύτταρα τοποθετούνται σε πλάκες στη συγκέντρωση που θα έχει προκύψει από την ανωτέρω διαδικασία. Για την κάθε συνθήκη, πραγματοποιούνται τρεις τουλάχιστον μετρήσεις και στο κάθε υποδοχή τοποθετούνται 100μl κυτταρικού εναιωρήματος. Πάντα συμπεριλαμβάνουμε υποδοχές με σκέτο θρεπτικό υλικό χωρίς κύτταρα.

2. Τα κύτταρα επωάζονται ώστε να προσκολληθούν.

3. Στις χρονικές στιγμές που έχουν επιλεγεί για τη μελέτη και μετά την επίδραση λεπτίνης ή siRNA (small interfering RNA) ενάντια στη λεπτίνη, προστίθενται σε κάθε υποδοχή 10 μl MTT στα 100 μl του θρεπτικού υλικού.

4. Η πλάκα επωάζεται στους 37°C για 2-4 ώρες. Κατά τη διάρκεια της επώασης, ελέγχουμε τα κύτταρα περιοδικά στο ανάστροφο μικροσκόπιο, για να παρακολουθήσουμε την εμφάνιση σικτικού ενδοκυτταρικού ιζήματος.

5. Όταν τα μωβ στίγματα διακρίνονται ευκρινώς στο μικροσκόπιο, προστίθενται στα κύτταρα 100 μl του αντιδραστηρίου με την απορρυπαντική δράση, χωρίς ανάδευση, ακόμη και στις υποδοχές που περιέχουν σκέτο θρεπτικό υλικό.

11. Η πλάκα επωάζεται κλειστή, στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 18-24°C για τουλάχιστον 2 ώρες έως όλο το βράδυ. Η απορρόφηση των δειγμάτων μπορεί να μετρηθεί μετά από 2 ώρες, αλλά εάν οι μετρήσεις είναι πολύ χαμηλές και παραμένουν κρύσταλλοι στο θρεπτικό, τότε η πλάκα θα πρέπει να επωαστεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η επώαση της πλάκας στους 37°C μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία διαλυτοποίησης των κρυστάλλων.

6. Το κάλυμμα της πλάκας αφαιρείται και μετράται η απορρόφηση των δειγμάτων και των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου στα 570 nm καθώς και στα 650 nm, το δεύτερο μήκος κύματος χρησιμοποιείται ως μήκος κύματος αναφοράς. Τα αρνητικά δείγματα θα πρέπει να δίνουν τιμές απορρόφησης μεταξύ 0+/-0.1 μονάδες οπτικής πυκνότητας.

2.1.4γ Ανάλυση αποτελεσμάτων

Το διάγραμμα απορρόφησης-συγκέντρωσης των κυττάρων που σχεδιάζεται μετά από σειριακή διάλυση των κυττάρων δίνει μία καμπύλη που περιέχει ένα ευθύγραμμο τμήμα. Η επιλογή μίας κυτταρικής συγκέντρωσης μέσα στο ευθύγραμμο τμήμα επιτρέπει τη μέτρηση τόσο της διέγερσης όσο και της αναστολής του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Εάν οι τιμές απορρόφησης ενός δείγματος μετά από επίδραση με λεπτίνη ή siRNA είναι μεγαλύτερες από αυτές των δειγμάτων χωρίς επίδραση, αυτό υποδεικνύει αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Αντίθετα, εάν οι τιμές απορρόφησης των δειγμάτων είναι μικρότερες από αυτές των δειγμάτων χωρίς επίδραση, αυτό υποδεικνύει μείωση του ρυθμού του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή μείωση της συνολικής κυτταρικής βιωσιμότητας.

2.1.5 Απομόνωση ολικού κυτταρικού RNA

Η απομόνωση ολικού RNA έγινε με την μέθοδο του ισοθειοκυανικού γουανιδινίου ως εξής:

I. Ομογενοποίηση

Προσθήκη 1-3 ml Trizol (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) και επώαση για 5 λεπτά στους 15-30°C ή φύλαξη στους -80°C. Για κάθε ml Trizol προστίθενται 200 μl

χλωροφόρμιο στα κύτταρα και πραγματοποιούνται διαδοχικές αναρροφήσεις με πιπέτα και χρήση του Vortex με στόχο την λύση των κυττάρων.

II. Διαχωρισμός φάσεων

Μετά την ομογενοποίηση, κάθε δείγμα επωάζεται για 2-3 λεπτά στους 15-30°C, μεταγγίζεται σε σωληνάριο των 2 ml και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 15min στις 3500rpm στους 4°C. Μετά την φυγοκέντρηση σε κάθε σωληνάριο υπάρχουν τρεις φάσεις: η υποκείμενη φάση που περιέχει φαινόλη/χλωροφόρμιο, η μεσόφαση και η ανώτερη υδατική φάση στην οποία έχει απομονωθεί και το RNA.

III. Κατακρήμνιση

Η ανώτερη υδατική φάση που περιέχει το RNA, μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο των 2 ml. Πραγματοποιείται κατακρήμνιση του RNA με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης, καλή ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά στους 15-30°C.

IV. Έκπλυση του RNA

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12000rpm στους 4°C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθεται 1ml κρύας αιθανόλης 70%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 min στις 10000rpm στους 4°C.

V. Επαναδιάλυση του RNA

Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αφού στεγνώσει πολύ καλά διαλυτοποιείται. Η διαλυτοποίηση του ιζήματος γίνεται με προσθήκη 80-100μl ddH₂O και επώαση για 10 λεπτά στους 55-60 °C. Στη συνέχεια, το κάθε δείγμα αποθηκεύεται στους -80°C.

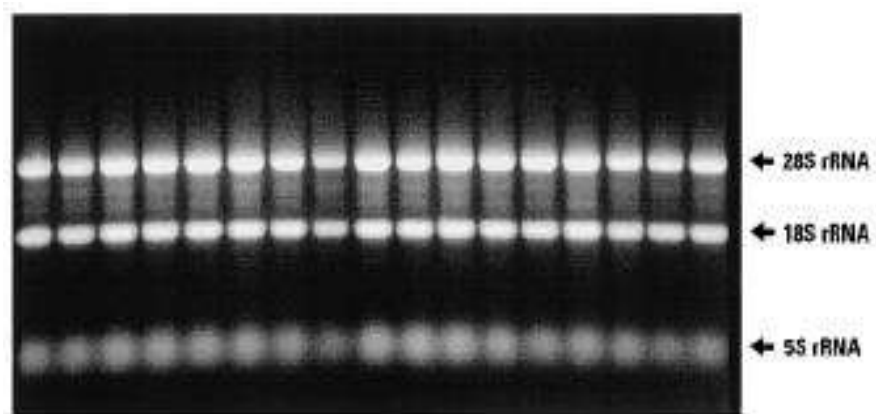
VI. Φωτομέτρηση-Έλεγχος ποσότητας

Για να ελεγχθεί η ποσότητα του RNA πραγματοποιείται φωτομέτρηση σε κάθε δείγμα. Αραιώσεις κάθε δείγματος (1:100) φωτομετρούνται στα 260 και 280 nm. Υπολογίζεται ο λόγος 260/280 καθώς και η συγκέντρωση του RNA ως εξής:

$$\text{συγκέντρωση RNA} = \text{αραίωση} \times \text{OD}_{260} \times 40 \quad (\text{mgr/ml})$$

VII. Ηλεκτροφόρηση-Έλεγχος ποιότητας

Για να ελεγχθεί η ποιότητα του RNA πραγματοποιείται σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 2% (**εικόνα 13**).



Εικόνα 13: Δείγματα RNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%.

2.1.6 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA:complementary DNA)

Η σύνθεση του cDNA πραγματοποιείται με αντίστροφη μεταγραφή (reverse transcription, RT) *in vitro* χρησιμοποιώντας ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers, 500μg/ml). Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφάση MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 200U/μl).

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για τη σύνθεση cDNA για όγκο RNA που αντιστοιχεί σε 1μgr περιέχει:

- | | | |
|-----------------------------------|---|---------------------------|
| ➤ RNA | → | 1 μgr |
| ➤ Ρυθμιστικό διάλυμα 5x | → | 4 μl |
| ➤ Τυχαία εξανουκλεοτίδια(500μg/m) | → | 3 μl |
| ➤ Δεοξυριβονουκλεοτίδια | → | 2 μl |
| ➤ MMLV RT (200U/μl) | → | 1 μl |
| ➤ δισ απεσταγμένο νερό | → | μέχρι τελικού όγκου 20 μl |

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόζονται είναι οι εξής:

- Αρχικά το RNA διαλύεται σε ddH₂O. Το διάλυμα RNA με τα τυχαία εξανουκλεοτίδια θερμάνθηκε στους 65°C επί 5 min για την αποδιάταξη δευτεροταγών δομών του RNA.
- Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά για τη σταθεροποίηση της αποδιάταξης δευτεροταγών δομών του RNA
- Μετά την προσθήκη και των υπολοίπων αντιδραστηρίων ακολουθούν οι παρακάτω συνθήκες

- 37°C , 60 λεπτά
- 65°C , 10 λεπτά
- τελική θερμοκρασία: 4 °C

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην παρούσα μελέτη, ως μετάγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου RARα (retinoic acid receptor α) το οποίο κωδικοποιεί έναν από τους υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος. Έτσι, ως μάρτυρας για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης cDNA, το cDNA ενισχύεται με PCR χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τις αλληλουχίες του RARα cDNA (RAR6/RAR8). Οι εκκινητές για το γονίδιο RARα είναι:

RAR6: 5' GGTGCCTCCCTACGCCTTCT 3'

RAR8: 5' GGCGCTGACCCCATAGTGTT 3'

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση του γονιδίου RARα περιέχει:

- | | | |
|----------------------------|---|---------|
| ➤ cDNA | → | 3 μl |
| ➤ Ρυθμιστικό διάλυμα 10x | → | 5 μl |
| ➤ MgCl ₂ (50mM) | → | 3 μl |
| ➤ Εκκινητής RAR6 (50p/mol) | → | 1.5 μl |
| ➤ Εκκινητής RAR8 (50p/mol) | → | 1.5 μl |
| ➤ Δεοξυριβονουκλεοτίδια | → | 0.5 μl |
| ➤ DNA πολυμεράση | → | 0.4 μl |
| ➤ δις απεσταγμένο νερό | → | 35.1 μl |

- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόζονται είναι οι εξής:
 - αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά
 - 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
 - αποδιάταξη στους 95°C για 1 λεπτό
 - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 53°C για 1 λεπτό
 - επιμήκυνση στους 72°C για 1 λεπτό και τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά.

2.1.7 Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της λεπτίνης, των υποδοχέων της (OB-RI, OB-Rs) και της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT) με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR:Real-time polymerase chain reaction)

Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων συμβάλλει ουσιαστικά στη μελέτη των βιολογικών διεργασιών και στην κατανόηση της παθογένειας των ασθενειών. Για το σκοπό αυτό, πρόσφατα αναπτύχθηκαν μέθοδοι ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR, RQ-PCR) που αντικατέστησαν την πολύπλοκη και χρονοβόρα ημιποσοτική, συναγωνιστική ανάλυση PCR (competitive PCR).

Η ποσοτική αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου συνίσταται σε αξιόπιστη ανίχνευση και μέτρηση των προϊόντων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσό του αρχικού μητρικού μορίου κατά την έναρξη της PCR. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να μετρηθεί η ποσότητα του προϊόντος PCR ενώ η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση. Για να επιτευχθεί αυτό, χρειάζεται να έχουμε μια μέθοδο για την ανίχνευση της ποσότητας του προϊόντος PCR και ένα μηχάνημα στο οποίο να καταγράφονται τα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου PCR. Ένα από τα καταλληλότερα συστήματα καταγραφής αποτελεί το σύστημα LightCycler.

Η ανίχνευση των mRNA μεταγράφων της λεπτίνης, των υποδοχέων της και της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης πραγματοποιήθηκαν στις συμπληρωματικές αλληλουχίες DNA (cDNA). Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης στηρίζεται στην ενζυματική ενίσχυση μιας συγκεκριμένης ακολουθίας DNA in vitro, με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης και των εκκινητών. Η Taq πολυμεράση είναι μια θερμοανθεκτική πολυμεράση η οποία εξάγεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Οι εκκινητές (primers) είναι μονόκλωνες νουκλεοτιδικές ακολουθίες, ολιγονουκλεοτίδια, οι οποίοι υβριδίζονται στις συμπληρωματικές θέσεις των δύο αλυσίδων, στα άκρα του τμήματος του DNA που θέλουμε να ενισχύσουμε. Έτσι, λοιπόν, για να πραγματοποιηθεί ο πολλαπλασιασμός του συγκεκριμένου τμήματος του DNA, το μείγμα αντίδρασης θα πρέπει να περιέχει: τη δίκλωνη ακολουθία DNA που πρόκειται να ενισχυθεί, την Taq πολυμεράση με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα, το ζεύγος των εκκινητών, διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) τα οποία χρησιμοποιεί η πολυμεράση και διάλυμα MgCl₂ που διευκολύνει τη δράση της πολυμεράσης.

Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους θερμοκρασιακούς κύκλους (30-35), καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία στάδια:

- αποδιάταξη του δίκλωνου DNA στους 94°C
- σύνδεση των εκκινητών στα δύο αντίθετα άκρα της μονόκλωνης πια ακολουθίας-στόχου, σε θερμοκρασία που εξαρτάται κάθε φορά από τη σύνθεση των εκκινητών
- θέρμανση του μείγματος στους 72 °C, έτσι ώστε η πολυμεράση να πραγματοποιήσει την αντιγραφή του DNA-στόχου με τη βοήθεια των dNTPs, ξεκινώντας από τους εκκινητές.

Η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου εξαρτάται από το μήκος (σε bp) του υπό ενίσχυση τμήματος DNA και με την παραπάνω διαδικασία επιτυγχάνεται η συλλογή ενός εκατομμυρίου περίπου αντιγράφων της επιθυμητής ακολουθίας, καθώς ο κάθε θερμοκρασιακός κύκλος διπλασιάζει το προϊόν του προηγούμενου κύκλου.

Για την ποσοτικοποίηση των γονιδίων ενδιαφέροντος χρησιμοποιήθηκε η συσκευή iCycler Optical Module (Bio-Rad, Hercules, CA). Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων περιέχει:

➤ cDNA	→	2	μl
➤ SYBR Green	→	12	μl
➤ Εκκινητής Forward (50p/mol)	→	1	μl
➤ Εκκινητής Reverse (50p/mol)	→	1	μl
➤ δις απεσταγμένο νερό	→	4	μl

Οι εκκινητές και οι συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

α) Για την λεπτίνη :

Forward (βάσεις 81-100 στο εξόνιο 2): 5'-TTC TTG TGG CTT TGG CCC TA -3'

Reverse (βάσεις 191-212 στο εξόνιο 2): 5'-GGA GAC TGA CTG CGT GTG TGT GAA -3'

β) Για τον OB-RI :

Forward (βάσεις 288-306 στο εξόνιο 19): 5'-GCT ATT TTG GGA AGA TGT -3'

Reverse (βάσεις 553-570 στο εξόνιο 20): 5'- TGC CTG GGC CTC TAT CTC -3'

γ) Για τον OB-Rs :

Forward (βάσεις 402-421 στο εξόνιο 6): 5'- TGT TGT GAA TGT CTT GTG CC-3'

Reverse (βάσεις 649-668 στο εξόνιο 8): 5'- TGC TCC AGT CAC TCC AGA TTCC -3'

δ) Για την hTERT :

Forward: 5'- CCG TCT GCG TGA GGA GAT -3' και

Reverse: 5'- TGG GGA TGA AGC GGA GTC -3'

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:

- αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 10 λεπτά
- 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
 - αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
 - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 56°C για 30 δευτερόλεπτα
 - επιμήκυνση στους 72°C για 15 δευτερόλεπτα
- τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

Για το PBGD (porphobilinogen deaminase) που χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς:

Forward: 5'- AGA GTG ATT CGC GTG GGT ACC -3' και

Reverse: 5'- GGC TCC GAT GGT GAA GCC -3'

2.1.8 Ανίχνευση της ενεργότητας του ενζύμου της τελομεράσης με τη μέθοδο TRAP (telomeric repeat protocol assay)

Το πρωτόκολλο TRAP θεωρείται ευαίσθητη και ειδική PCR που βασίζεται στην ενζυμική δραστηριότητα. Πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας την δοκιμασία TeloTAGGG telomerase PCR ELISA^{PLUS} (Roche, Indianapolis, USA) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το πρωτόκολλο TRAP δείχνει πολύ μεγάλη ευαισθησία ανιχνεύοντας ένα θετικό κύτταρο για την τελομεράση ανάμεσα σε 10000 αρνητικά για την τελομεράση κύτταρα. Στο σετ αντιδραστηρίων του πρωτοκόλλου συμπεριλαμβάνονται δείγματα τα οποία περιέχουν DNA θετικό για την τελομεράση και διαθέτουν την ίδια αλληλουχία με αυτή ενός προϊόντος τελομεράσης με 8 τελομερικές επαναλήψεις. Αρνητικά δείγματα ελέγχου ετοιμάζονται από κάθε

κυτταρικό εκχύλισμα απενεργοποιώντας την ενεργότητα της τελομεράσης των δειγμάτων με υψηλή θερμοκρασία (10 λεπτά στους 85 °C). Η ανάλυση πραγματοποιείται με ένα μίγμα αντίδρασης 30 μl που περιέχει 3μg πρωτεϊνικού κυτταρικού εκχυλίσματος. Το δείγμα που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της αντίδρασης (internal standard) πολλαπλασιάζεται από ανιχνευτές TS, ώστε να αποφευχθούν τα ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τα θετικά αποτελέσματα για την ενεργότητα της τελομεράσης επιβεβαιώθηκαν με TRAP, μετά από έκθεση των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε υψηλή θερμοκρασία (85°C για 15 λεπτά) για να βρεθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η απορρόφηση των δειγμάτων στα 450 nm, με μήκος κύματος αναφοράς τα 650 nm μετράται χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο και θεωρείται θετική όταν η διαφορά μεταξύ της απορρόφησης του δείγματος και της απορρόφησης του αρνητικού δείγματος ελέγχου είναι 2 φορές μεγαλύτερη από τη μη ειδική ενεργότητα (background). Τα δείγματα διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παράγοντας τη χαρακτηριστική τελομερική κλίμακα-δείκτη (ladder) 6 bp.

2.1.9 Ανίχνευση της λεπτίνης και προ-φλεγμονωδών παραγόντων με ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay :προσδιορισμός ανοσοπροσρόφησης συνδεδεμένης με ένζυμο)

Πρόκειται για πολύ ευαίσθητη τεχνική για την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων μιας πρωτεΐνης ή κάποιας άλλης αντιγονικής ουσίας. Η μέθοδος βασίζεται στην πρόσδεση του αντιγόνου από ένα αντίσωμα συνδεδεμένο στην επιφάνεια μιας πλάκας. Ο σχηματισμός του ανοσοσυμπλέγματος ανιχνεύεται με την υπεροξειδάση που είναι συζευγμένη με το αντίσωμα, η οποία καταλύει μια χρωμογόνο αντίδραση που ενισχύει το σήμα.

Η μέθοδος ELISA χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της λεπτίνης του ορού των ασθενών με χρόνιες ηπατοπάθειες, καθώς και για τον προσδιορισμό των επιπέδων TGF-β1, IL-6, IL-1β και λεπτίνης στο υπερκείμενο υγρό από καλλιέργειες κυττάρων HepG2. Το kit που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της λεπτίνης (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) παρουσιάζει ως κατώτερο επίπεδο ανίχνευσης τα 7.8 pg/ml. Οι συντελεστές μεταβλητότητας μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων και μέσα στο ίδιο πείραμα ήταν 4.4% και 3.2% αντίστοιχα. Το kit που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) παρουσιάζει ως κατώτερο επίπεδο ανίχνευσης τα 0.7 pg/ml. Οι συντελεστές μεταβλητότητας μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων και μέσα στο ίδιο

πείραμα ήταν 2.7% και 3.1% αντίστοιχα. Επίσης το kit που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του TGF-β1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) παρουσιάζει ως κατώτερο επίπεδο ανίχνευσης τα 1.7 pg/ml. Οι συντελεστές μεταβλητότητας μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων και μέσα στο ίδιο πείραμα ήταν 7.5% και 2.8% αντίστοιχα. Τέλος το kit που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της IL-1β (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) παρουσιάζει ως κατώτερο επίπεδο ανίχνευσης το 1pg/ml. Οι συντελεστές μεταβλητότητας μεταξύ διαφορετικών πειραμάτων και μέσα στο ίδιο πείραμα ήταν 5.1% και 2.9% αντίστοιχα.

2.1.10 Ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης (ChIP: Chromatin Immunoprecipitation)

Ο προσδιορισμός των μεταγραφικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με τον υποκινητή του γονιδίου της hTERT καθώς και ο έλεγχος της παρουσίας ακετυλιωμένης ή μη ακετυλιωμένης ιστόνης H3 στον ανωτέρω υποκινητή αλλά και σε αυτόν της λεπτίνης, πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του kit ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης (ChIP: Chromatin Immunoprecipitation assay kit) (Upstate USA, Inc., Charlottesville, VA, USA).

Με τη συγκεκριμένη δοκιμασία, τα κύτταρα μονιμοποιούνται έτσι ώστε οι μεταγραφικοί παράγοντες να παραμείνουν προσκολλημένοι στον υποκινητή. Τα κύτταρα υφίστανται λύση, το DNA τους κόβεται σε τμήματα των 200-1000 βάσεων, στη συνέχεια πραγματοποιείται κατακρήμνιση των μεταγραφικών παραγόντων με τα αντίστοιχα αντισώματα, απομόνωση DNA στα δείγματα και έλεγχος της παρουσίας ή μη του τμήματος του υποκινητή με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και τη χρήση κατάλληλων υποκινητών.

Πιο αναλυτικά, η διαδικασία είναι η εξής:

1. Τα κύτταρα (περίπου 10^6) αποκολλώνται από τη φλάσκα με τη βοήθεια θρυψίνης. Όπως περιγράφηκε πιο πάνω, η δράση της θρυψίνης σταματά με την προσθήκη δεκαπλάσιας ποσότητας πλήρους θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάριο των 15 ml και φυγοκεντρούνται στις 800 στροφές για 5 λεπτά.
2. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10 ml προθερμασμένου στους 37°C πλήρους θρεπτικού υλικού, στο οποίο προστίθενται 270μl φορμαλδεΰδης 37%. Τα σωληνάρια τοποθετούνται στους 37°C για 10 λεπτά. Με τον τρόπο αυτό

επιτυγχάνεται η μονιμοποίηση των κυττάρων και η μονιμοποίηση των ιστονών και των υπόλοιπων μεταγραφικών παραγόντων στο DNA.

3. Τα σωληνάρια φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά στις 800 στροφές.

4. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα ξεπλένονται 2 φορές με παγωμένο PBS που περιέχει αναστολείς πρωτεασών. Οι αναστολείς των πρωτεασών προστίθενται στο PBS λίγο πριν από τη χρησιμοποίηση του διαλύματος για το ξέπλυμα των κυττάρων, καθώς η διάρκεια ημίσειας ζωής τους είναι περίπου 30 λεπτά μέσα σε υδατικά διαλύματα. Ως αναστολείς πρωτεασών χρησιμοποιούνται οι : PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) σε συγκέντρωση 1mM, aprotinin σε συγκέντρωση 1μg/ml και pepstatin A σε συγκέντρωση 1μg/ml. Τα πλυσίματα των κυττάρων συνοδεύονται από φυγοκεντρήσεις των 800 στροφών για 5 λεπτά.

5. Μετά από την τελευταία φυγοκέντρωση, τα κύτταρα διαλύονται σε 200μl ζεστού διαλύματος λύσης των κυττάρων που περιέχει SDS και το οποίο εμπεριέχεται στο kit.

6. Ακολουθεί επώαση στον πάγο για 10 λεπτά. Μετά από το στάδιο αυτό, τα δείγματα μπορούν να τοποθετηθούν στους -80°C και να αποθηκευτούν εκεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.

7. Ακολουθεί κατάτμηση του DNA με τη χρήση υπερήχων. Χρησιμοποιείται για το λόγο αυτό συσκευή παραγωγής υπερήχων (UP50H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Germany). Ανάλογα με τις δυνατότητες της συσκευής, διαφέρει ο αριθμός των επαναλήψεων καθώς και η ένταση των υπερήχων και η διάρκεια της επίδρασης. Αυτό το στάδιο χρήζει ιδιαίτερης προσοχής και πρέπει να επαναπροσδιορίζεται για τον κάθε τύπο κυττάρων. Για το λόγο αυτό, για την κάθε κυτταρική σειρά ή δείγμα, χρειάστηκε να γίνει έλεγχος της αποτελεσματικότητας και επαναληψιμότητας της μεθόδου κατάτμησης του DNA με την εφαρμογή υπερήχων, ώστε μετά από απομόνωση του DNA με τη μέθοδο φαινόλης/χλωροφορμίου (η οποία περιγράφεται πιο κάτω) και μετά από ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτική αгарόζης 1%, το DNA έχει κοπεί σε τμήματα των 200-1000 βάσεων. Η εφαρμογή των υπερήχων στα δείγματα, προκαλεί θέρμανση αυτών, για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η διατήρηση των δειγμάτων στον πάγο καθόλη τη διάρκεια της επίδρασης των υπερήχων. Για τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, ένα σύννηθες πρωτόκολλο υπερήχων που εφαρμόστηκε ήταν 15 επαναλήψεις διάρκειας 15 δευτερολέπτων.

8. Μετά από την εφαρμογή των υπερήχων και την κατάτμηση του DNA, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά, στις 13000 στροφές σε θερμοκρασία 4 °C.
9. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο των 2 ml.
10. Για τη μείωση της μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια, στο υπερκείμενο προστίθενται 75 µl Protein A Agarose/ DNA σπέρματος σολομού (50% Slurry) το οποίο συμπεριλαμβάνεται στο kit, και τα φιαλίδια τοποθετούνται στους 4 °C, με ήπια ανάδευση για 30 λεπτά.
11. Τα φιαλίδια φυγοκεντρούνται στις 1000 στροφές για 1 λεπτό και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο
12. Στο κάθε φιαλίδιο προστίθεται το αντίσωμα που χρησιμοποιείται για την ανοσοκατακρήμνιση. Τα αντισώματα, καθώς και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν από το καθένα ήταν τα εξής :
- Anti-c-myc (N-262X, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA): 2 µl
 - Anti-mad1 (C-19X, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA): 2 µl
 - Anti-max (C-17X, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA): 2 µl
 - Anti-acetylated Histone 3 (06–599) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY): 4 µl
 - Anti-β-galactosidase (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA): 2 µl
13. Τα φιαλίδια επωάζονται ολονύκτια στους 4°C με ήπια ανάδευση. Προκειμένου να υπάρχει αρνητικό δείγμα ελέγχου, σε ένα από τα δείγματα πραγματοποιείται κατακρήμνιση χωρίς προσθήκη αντισώματος. Το υπερκείμενο αυτού του δείγματος επωάζεται μόνο με 60 µl Protein A Agarose/ DNA σπέρματος σολομού (50% Slurry), για μία ώρα στους 4 °C με ήπια ανάδευση και η διαδικασία για το δείγμα αυτό συνεχίζεται στο σημείο 15.
14. Μετά το πέρας της επώασης, στα δείγματα προστίθενται 60 µl Protein A Agarose/ DNA σπέρματος σολομού (50% Slurry), και επακολουθεί επώαση για μία ώρα στους 4 °C με ήπια ανάδευση ώστε να δημιουργηθούν σύμπλοκα αντισωμάτων και πρωτεϊνών.
15. Η αгарόζη κατακρημνίζεται τόσο για τα δείγματα που επωάζονται με αντίσωμα όσο και για το αρνητικό δείγμα ελέγχου, με φυγοκέντρωση στις 1000 στροφές για 1 λεπτό. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει μη συνδεδεμένο, μη ειδικό DNA, απομακρύνεται προσεκτικά. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης A αгарόζης/αντισώματος/μεταγραφικού παράγοντα ξεπλένεται για 3 λεπτά με

ήπια ανάδευση με 1 ml από τα ακόλουθα διαλύματα τα οποία συμπεριλαμβάνονται στο kit:

- Διάλυμα έκπλυσης του συμπλόκου του αντισώματος χαμηλής περιεκτικότητας σε άλατα
- Διάλυμα έκπλυσης του συμπλόκου του αντισώματος υψηλής περιεκτικότητας σε άλατα
- Διάλυμα έκπλυσης του συμπλόκου του αντισώματος LiCl
- Ρυθμιστικό διάλυμα TE, 2 πλυσίματα

Μετά από αυτό το στάδιο, τα δείγματα βρίσκονται στη μορφή πρωτεΐνης A/αντισώματος/μεταγραφικού παράγοντα ή ιστόνης/DNA.

16. Προετοιμάζεται το διάλυμα αποδέσμευσης (1% SDS, 0.1M NaHCO₃).

17. Τα φιαλίδια φυγοκεντρώνονται στις 1000 στροφές για ένα λεπτό, το ρυθμιστικό διάλυμα TE απομακρύνεται προσεκτικά και στα φιαλίδια προστίθενται 250 μl από το διάλυμα αποδέσμευσης. Τα φιαλίδια αναδεύονται για μερικά δευτερόλεπτα σε vortex και επωάζονται για 15 λεπτά με κυκλική ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

18. Επακολουθεί κατακρήμνιση της αгарόζης με φυγοκέντρωση για 1 λεπτό στις 1000 στροφές και το υπερκείμενο του κάθε φιαλιδίου μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο. Η διαδικασία της αποδέσμευσης επαναλαμβάνεται και τα υπερκείμενα ενώνονται σε κοινό φιαλίδιο σε τελικό όγκο 500 μl.

19. Στο κάθε φιαλίδιο προστίθενται 20 μl 5M NaCl και τα φιαλίδια επωάζονται στους 65°C για 4 ώρες με στόχο την αποδέσμευση του DNA από τις ιστόνες ή τους μεταγραφικούς παράγοντες. Σε αυτό το στάδιο, μετά την επώαση, τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C.

20. Στο κάθε δείγμα προστίθενται 10 μl 0.5M EDTA, 20μl 1M Tris-HCl και 2μl πρωτεΐνάσης K με συγκέντρωση 10 mg/ml, τα οποία συμπεριλαμβάνονται στο Kit, και επακολουθεί επώαση για μία ώρα στους 45°C.

21. Επακολουθεί απομόνωση του κατακρημνισμένου DNA με τη μέθοδο φαινόλης χλωροφορμίου, η οποία περιγράφεται στη συνέχεια :

- Στο κάθε φιαλίδιο προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης, ενώ ακολουθεί πολύ καλή ανάδευση σε vortex.
- Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο.
- Προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης-χλωροφορμίου και ακολουθεί καλή ανάδευση σε vortex.

- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο.
- Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου και ακολουθεί καλή ανάδευση σε vortex.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C.
- Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο.
- Στο κάθε φιαλίδιο προστίθεται διπλάσιος όγκος παγωμένης αιθανόλης 100% και 1/10 του όγκου CH₃COONa.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στους -20°C για τουλάχιστον 24 ώρες.
- Την επόμενη ημέρα, τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές σε θερμοκρασία 4°C.
- Αμέσως μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο των φιαλιδίων απομακρύνεται και στα φιαλίδια απομένει μικρό λευκό ίζημα.
- Στα φιαλίδια προστίθεται 1 ml αιθανόλης 70%, για ξέπλυμα του DNA και τα φιαλίδια φυγοκεντρούνται για 30 λεπτά στις 12000 στροφές, σε θερμοκρασία 4°C.
- Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά, τα φιαλίδια καλύπτονται με τρυπημένο parafilm και τοποθετούνται στους 4°C, μέχρι να εξατμιστεί εντελώς η εναπομείνουσα αιθανόλη.
- Στα δείγματα προστίθεται ddH₂O για τη διαλυτοποίηση του DNA, σε ποσότητα ανάλογη με την ποσότητα του ιζήματος.
- Για να ελεγχθεί η ποσότητα του DNA πραγματοποιείται φωτομέτρηση σε κάθε δείγμα. Αραιώσεις κάθε δείγματος (1:100) φωτομετρούνται στα 260 και 280 nm. Υπολογίζεται ο λόγος 260/280 καθώς και η συγκέντρωση του DNA ως εξής:
- συγκέντρωση RNA = αραιώση x OD₂₆₀ x 50 (mgr/ml)
- Για να ελεγχθεί η ποιότητα του DNA πραγματοποιείται σε κάθε δείγμα ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης 1%.

22. Στα δείγματα επακολουθεί αντίδραση PCR για τον υποκινητή του γονιδίου της hTERT. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης επιλέχθηκαν έτσι ώστε να περικλείουν τις περιοχές πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων που μελετήθηκαν.

Για τον υποκινητή του γονιδίου της hTERT, η αλληλουχία είναι αυτή που απεικονίζεται στη συνέχεια. Στην αλληλουχία αυτή, οι περιοχές πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων c-myc, mad1, max, τα λεγόμενα E-boxes (CACGTG), βρίσκονται στις περιοχές -29 και -238 του υποκινητή.

```
ggagcagctg cgctgtcggg gctaggccgg gctcccagtg gattcgcggg cacagacgcc caggaccgcg
ctcccacgtggcgaggga ctggggaccc gggcacccgt cctgcccctt caccttccag ctccgcctcc
tccgcgcgga ccccgccccg tcccgacccc tcccggtcc ccggcccagc cccctccggg ccctcccagc
ccctcccctt ccttccgcg gcccgccct ctctcgcgg cgcgagtgc aggcagcgc ggcgtctgct
gcgcacgtgggaagccctgg ccccgccac ccccgcatg
```

E box

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε E-box του υποκινητή του hTERT ήταν οι εξής :

F1: TGTCGGGGCTAGGCCGGGCTC

R1: AACTCGCGCCGCGAGGAGA

Δίνουν προϊόν μεγέθους 250 βάσεων

F2: TGCCCCCTTCACCTTCCAGCTC

R2: GTGGCCGGGGCCAGGGCTT

Δίνουν προϊόν μεγέθους 208 βάσεων

Για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης, χρησιμοποιήθηκε το kit Hotstar Taq της εταιρείας Qiagen. Συγκεκριμένα για το κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν :

- 12,5 μl Hotstar Taq Master Mix
 - 7,5 μl δις απεσταγμένο νερό
 - 1 μl Forward primer
 - 1 μl Reverse primer
 - 3 μl από το DNA
- Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν ήταν οι εξής:
 - Για το ζευγάρι εκκινητών 1 :
 - Αρχική αποδιάταξη 95°C για 5 λεπτά
 - 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
 - αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
 - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 65°C για 30 δευτερόλεπτα
 - επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα.
 - Για το ζευγάρι εκκινητών 2 :
 - Αρχική αποδιάταξη 95°C για 5 λεπτά

- 40 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
 - αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
 - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 62°C για 30 δευτερόλεπτα
 - επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα.

Τέλος οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον υποκινητή του γονιδίου της λεπτίνης ήταν οι εξής :

F1: CCCTCTAACCCTGGGCTTC

R1: ACTATGGCGCAAGGACCAG

Δίνουν προϊόν μεγέθους 205 βάσεων

F2: TCTGGAGGGACATCAAGGAT

R2: GCATTTCTAGCGCCAGCTC

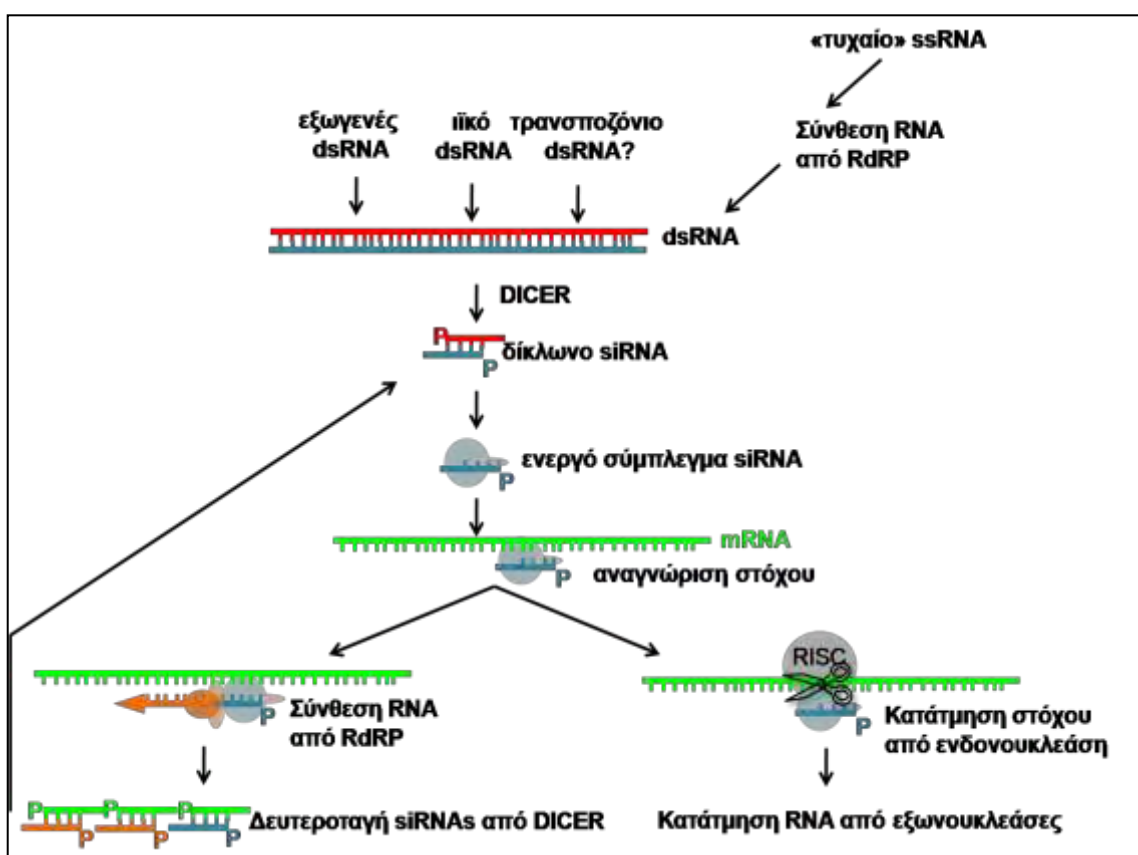
Δίνουν προϊόν μεγέθους 201 βάσεων

2.1.11 Αποσιώπηση του mRNA του γονιδίου της λεπτίνης

Η εξειδικευμένη καταστολή της έκφρασης ενός γονιδίου αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη σύγχρονη έρευνα. Πρόσφατα, αναπτύχθηκαν πειραματικές μεθοδολογίες που στηρίζονται σε βιολογικές διαδικασίες, όπως η μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση (posttranscriptional gene silencing) καθώς και η τεχνολογία παρεμβατικών μορίων RNA (RNA interference) οι οποίες επιτρέπουν την εξειδικευμένη παρεμπόδιση της γονιδιακής έκφρασης. Αν και η φυσιολογική λειτουργία των μηχανισμών αυτών δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, ιδιαίτερα η RNAi χρησιμοποιείται πρόσφατα ευρέως για τη μελέτη της γονιδιακής λειτουργίας (257-259). Ο μηχανισμός της RNAi είναι συντηρημένος μεταξύ των ειδών (φυτά, μύκητες, ζώα) και πιθανολογείται ότι λειτουργεί ως το “ανοσοποιητικό σύστημα” του γονιδιώματος ενάντια στην εισβολή εξωγενούς γενετικού υλικού, εφόσον παρουσιάζει δύο βασικά χαρακτηριστικά του ανοσοποιητικού, δηλαδή την ικανότητα να διακρίνει το δικό του από το ξένο και την υψηλότερη εξειδίκευση (260).

Η διαδικασία της RNAi περιλαμβάνει την παρουσία δίκλωνου RNA (dsRNA) το οποίο τεμαχίζεται ενζυμικά σε μικρότερα κομμάτια μεγέθους 20-25 νουκλεοτιδίων, τα πρωτογενή siRNAs (short interfering RNAs), τα οποία μεσολαβούν στην εξειδικευμένη αναγνώριση του μονόκλωνου RNA στόχου (mRNA). Το ένζυμο που είναι υπεύθυνο για τον τεμαχισμό του αρχικού dsRNA ονομάζεται Dicer και πρόκειται για μια εξειδικευμένη RNAάση III. Τα siRNAs είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλές φορές, ενώ στο 3' άκρο τους έχουν

προεξέχουσες, μονόκλωνες αλληλουχίες (2-3 ουρακίλες). Στη συνέχεια ο μη πληροφοριακός κλώνος των siRNAs συνεργαζόμενος με κυτταρικές πρωτεΐνες σχηματίζει το ενεργό siRNA σύμπλεγμα το οποίο αναγνωρίζει το mRNA στόχο. Με τη βοήθεια του ενεργού συμπλέγματος και με μόριο-εκκινητή το siRNA συντίθεται ο συμπληρωματικός κλώνος (για μερικές εκατοντάδες bp) από μια RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA dependent RNA polymerase). Στο δίκλωνο αυτό κομμάτι RNA επιδρά και πάλι η Dicer και το τεμαχίζει στα δευτερογενή siRNAs (transitive RNA interference). Εκτός όμως από αυτή τη διαδικασία, η σύνδεση του ενεργού συμπλέγματος στο mRNA στόχο μπορεί να προκαλέσει και τη σύνδεση στην περιοχή του υβριδισμού ενός συμπλέγματος RISC (dsRNA induced silencing complex) το οποίο επάγει την κατάτμηση του mRNA από κάποια ενδονουκλεάση και την περαιτέρω αποικοδόμησή του από εξωνουκλεάσες. Οι παραπάνω διαδικασίες μπορούν να επαναληφθούν για πολλούς συνεχόμενους κύκλους (ξεκινώντας ακόμα και από πολύ μικρή ποσότητα dsRNA) με μεγάλη σταθερότητα και γι'αυτό η RNAi χαρακτηρίστηκε και ως “αποικοδομητικό PCR” (257-259). Στην εικόνα 14 παρουσιάζεται το μοντέλο που συνοψίζει τα μοριακά βήματα στο μηχανισμό της RNAi.



Εικόνα 14. Μοντέλο μοριακών βημάτων της RNAi (260).

Ο μηχανισμός που περιγράφηκε έχει παρατηρηθεί σ' ένα ευρύ φάσμα ειδών, η απόδειξη όμως μιας τέτοιου είδους απόκρισης στα κύτταρα των θηλαστικών παρεμποδίζεται από την ύπαρξη επαγόμενων από dsRNA μονοπατιών τα οποία σηματοδοτούν μη ειδικές επιδράσεις στη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων. Τα πιο καλά καθορισμένα μονοπάτια στα θηλαστικά που ενεργοποιούνται από dsRNA είναι: i) η dsRNA εξαρτώμενη κινάση PKR και το μονοπάτι της ιντερφερόνης το οποίο οδηγεί σε γενικευμένη καταστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης και απόπτωση (261), ii) η dsRNA επαγόμενη σύνθεση 2'-5'πολυαδενυλικού οξέος το οποίο οδηγεί σε ενεργοποίηση της μη εξειδικευμένης RNAάσης L (257, 261). Ωστόσο, τα δύο προηγούμενα μονοπάτια δεν ενεργοποιούνται από dsRNA μικρότερο από 30 νουκλεοτίδια και έτσι με βάση αυτό το δεδομένο οι τελευταίες έρευνες στρέφονται στη χρήση μικρών μικρών συνθετικών ssRNAs ή dsRNAs (που είναι πιο αποτελεσματικά και σταθερά), είτε ακόμα στη χρήση πλασμιδίων που εκφράζουν μικρά dsRNA ή shRNA (short hairpin RNA), ώστε να αποφεύγονται τα μη ειδικά μονοπάτια (262).

Η διαδικασία διαμόλυνσης των κυττάρων με si RNAs για το γονίδιο της λεπτίνης έγινε με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Λιποφεκταμίνη (Invitrogen). Η λιποφεκταμίνη είναι μία ουσία που χρησιμοποιείται για τη διαμόλυνση νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) σε ευκαρυωτικά κύτταρα και προσφέρει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα :

- Μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα της διαμόλυνσης σε πολλούς κυτταρικούς τύπους και σε διαφορετικά είδη καλλιέργειας (φλάσκες, πλάκες με ειδικές υποδοχές κ.ο.κ.)
- Τα σύμπλοκα νουκλεϊκών οξέων και λιποφεκταμίνης μπορούν να χορηγηθούν απευθείας στο θρεπτικό υλικό στο οποίο καλλιεργούνται τα κύτταρα, παρουσία ή απουσία ορού.
- Δεν είναι απαραίτητο να απομακρυνθούν τα σύμπλοκα ή να αλλαχθεί το θρεπτικό υλικό μετά από τη διαμόλυνση, πάντως τα σύμπλοκα μπορούν να απομακρυνθούν μετά από 4-6 ώρες.

Το πρώτο στάδιο στην εφαρμογή του πρωτοκόλλου διαμόλυνσης είναι ο προσδιορισμός της ιδανικής συγκέντρωσης του siRNA που πρέπει να χορηγηθεί στον κάθε τύπο κυττάρου, προκειμένου να επιτευχθεί ταυτόχρονα η μέγιστη δυνατή αποσιώπηση και η ελάχιστη δυνατή τοξικότητα για τα κύτταρα. Ο έλεγχος του ποσοστού αποσιώπησης των γονιδίων ενδιαφέροντος γίνεται αφενός με ποσοτικοποίηση των RNA μεταγράφων του γονιδίου μετά από τη χορήγηση siRNA, σε σχέση με κύτταρα στα οποία δεν έχει γίνει χορήγηση, καθώς και με ανοσοαποτύπωση κατά Western της πρωτεΐνης που προκύπτει από το

συγκεκριμένο μετάγραφο mRNA μετά από τη χορήγηση siRNA, σε σχέση με κύτταρα στα οποία δεν έχει γίνει χορήγηση. Και στις δύο περιπτώσεις, η χορήγηση του siRNA πρέπει να συμπίπτει με μείωση των μεταγράφων mRNA καθώς και της πρωτεΐνης. Σε περιπτώσεις όπου ο κύριος τρόπος ρύθμισης της ποσότητας μίας πρωτεΐνης στο κύτταρο είναι η μετα-μεταγραφική ρύθμιση, τότε η διαμόλυνση των κυττάρων με siRNA δεν καθιστά αποτελεσματικό τρόπο αποσιώπησης και ενδείκνυται να χρησιμοποιηθεί η μετα-μεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση PTGS (posttranscriptional gene silencing).

Στις περιπτώσεις του γονιδίου της λεπτίνης που αποσιωπήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη, ο προσδιορισμός της ιδανικής ποσότητας από το κάθε siRNA που θα έπρεπε να χρησιμοποιηθεί στα κύτταρα της μελέτης έγινε μετά από χορήγηση 3 διαφορετικών δόσεων από το κάθε siRNA σε κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε πλάκες με 6 πηγαδάκια. Η επιλογή αυτών των πλακών έγινε με στόχο να διαμολυνθούν αρκετά σε αριθμό κύτταρα, προκειμένου να μπορέσουν να εκχυλισθούν από αυτά αρκετές ποσότητες mRNA και πρωτεϊνών, προς επιβεβαίωση της επιτυχούς διαμόλυνσης. Σε αυτές τις πλάκες οι δόσεις που χορηγήθηκαν στα κύτταρα από το κάθε siRNA ήταν 100, 300 και 500 pmol με συν-χορήγηση 5, 15 και 25 μl λιποφεκταμίνης αντίστοιχα.

Αναλυτικά, η διαδικασία διαμόλυνσης των κυττάρων με si RNA που πραγματοποιήθηκε είναι η εξής:

1. Μία ημέρα πριν από τη διαμόλυνση, τα κύτταρα εμβολιάζονται σε πλάκες ή φλάσκες, ανάλογα με το πείραμα, σε πλήρες θρεπτικό υλικό χωρίς αντιβιοτικά, έτσι ώστε η περιεκτικότητα των πηγαδιών της πλάκας ή των καλλιεργητικών φλασκών να κυμαίνεται μεταξύ 30 και 50% τη στιγμή της διαμόλυνσης. Η χαμηλή συγκέντρωση των κυττάρων κατά τη χρονική στιγμή της διαμόλυνσης επιτρέπει τη μεσολάβηση μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος μεταξύ διαμόλυνσης και συλλογής των κυττάρων. Επιπλέον περιορίζει τη μείωση της κυτταρικής βιωσιμότητας από υπεραύξηση των κυττάρων.
2. Για το κάθε δείγμα, τα σύμπλοκα λιποφεκταμίνης-ολιγομερούς προετοιμάζονται ως εξής:
 - Η ποσότητα από το siRNA που πρόκειται να χορηγηθεί στα κύτταρα διαλύεται σε θρεπτικό υλικό Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Invitrogen) χωρίς προσθήκη ορού εμβρύου. Επακολουθεί ήπια ανάδευση.
 - Η λιποφεκταμίνη αναδεύεται καλά πριν από τη χρήση της και διαλύεται επίσης σε θρεπτικό υλικό Opti-MEM I Reduced Serum Medium.

Επακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Τα δύο ανωτέρω διαλύματα ενώνονται σε κοινό φιαλίδιο, αναδεύονται ήπια και επωάζονται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να σχηματιστούν τα σύμπλοκα λιποφεκταμίνης-ολιγομερούς.
- 3. Τα σύμπλοκα προστίθενται στα κύτταρα και ακολουθεί καλή ανάδευση της πλάκας ή της φλάσκας ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιογενής διασπορά τους.
- 4. Τα κύτταρα επωάζονται σε κλίβανο στους 37°C. Το θρεπτικό τους αλλάζεται 6 ώρες μετά από τη διαμόλυνση, και αντικαθίσταται από πλήρες θρεπτικό υλικό, χωρίς αντιβιοτικά.

Ως αρνητικά δείγματα ελέγχου χρησιμοποιούνται δείγματα στα οποία χορηγούνται ακριβώς οι ίδιες ποσότητες από τα ίδια αντιδραστήρια και υπό τις ίδιες συνθήκες, με μόνη εξαίρεση την αντικατάσταση του siRNA από Stealth RNAi Negative Control Duplex. Το RNA αυτό είναι έτσι σχεδιασμένο ώστε να έχει παρόμοιο περιεχόμενο σε βάσεις GC με το siRNA που χρησιμοποιούμε. Η οποιαδήποτε μείωση σε ποσοστά έκφρασης mRNA και πρωτεϊνών, καθώς και οι αλλαγές στη βιωσιμότητα των κυττάρων, στα δείγματα στα οποία έχει χορηγηθεί siRNA, γίνονται σε σύγκριση με το αρνητικό δείγμα ελέγχου, το οποίο με τη σειρά του, δε θα πρέπει να έχει μεγάλες έως και καθόλου διαφορές στα επίπεδα έκφρασης και βιωσιμότητας σε σχέση με κύτταρα στα οποία δεν έχει χορηγηθεί τίποτα. Υπό αυτές τις συνθήκες και εφόσον τα ποσοστά αποσιώπησης των γονιδίων ενδιαφέροντος είναι υψηλά μετά από τη χορήγηση συγκεκριμένης δόσης siRNA, η μέθοδος θεωρείται επιτυχής.

Οι ποσότητες siRNA, λιποφεκταμίνης και θρεπτικού υλικού που χορηγούνται στα κύτταρα, ανάλογα με το μέγεθος των πηγαδιών της πλάκας ή της φλάσκας, ενδεικτικά για τη συγκέντρωση των 100 pmol είναι οι εξής:

Καλλιεργητικό μέσο	Επιφάνεια καλλιεργητικού μέσου	Όγκος Θρεπτικού υλικού	Όγκος θρεπτικού υλικού για διάλυση αντιδραστηρίων	siRNA	Λιποφεκταμίνη
96-well	0,3 cm ²	100 μl	2x25 μl	5 pmol	0,25 μl
24-well	2 cm ²	500 μl	2x50 μl	20 pmol	1,0 μl
12-well	4 cm ²	1 ml	2x100 μl	40 pmol	2,0 μl
6-well	10 cm ²	2 ml	2x250 μl	100 pmol	5 μl
60-mm	20 cm ²	5 ml	2x0,5 ml	200 pmol	10 μl

10-cm	60 cm ²	15 ml	2x1,5 ml	600 pmol	30 μl
-------	--------------------	-------	----------	----------	-------

2.1.12 Μελέτη του κυτταρικού κύκλου και της έκφρασης των πρωτεϊνών με κυτταρομετρία ροής (Flow cytometry)

Η μελέτη του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων HepG2 τόσο μετά την χορήγηση λεπτίνης όσο και μετά την αποσιώπηση του γονιδίου της πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του κυτταρομέτρου ροής FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Μετά την αποκόλλησή τους από τις καλλιεργητικές φλάσκες, τα κύτταρα ξεπλύθηκαν με 5ml PBS και φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 800 rpm. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το πλεονάζον PBS απομακρύνθηκε και τα κύτταρα παρέμειναν σε 100μl PBS. Στο κυτταρικό εναιώρημα προστέθηκαν 100 μl DNA PREP LPR (Beckman Coulter, Inc. Fulerton, CA, USA) το οποίο επιτρέπει την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης και 2ml DNA PREP Stain (Propidium Iodide) (Beckman Coulter, Inc. Fulerton, CA, USA). Τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος για 15 min, ώσπου το Propidium Iodide να εισχωρήσει στα κύτταρα και να επισημάνει το γενετικό τους υλικό και στη συνέχεια η φάση του κυτταρικού κύκλου του κάθε κυττάρου προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του κυτταρόμετρου. Η φάση του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκεται το κάθε κύτταρο προσδιορίζεται από την ποσότητα γενετικού υλικού του κάθε κυττάρου, καθώς τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση μίτωσης (G2/M) περιέχουν διπλάσιο γενετικό υλικό σε σχέση με τα κύτταρα που βρίσκονται στη μεσόφαση (G1) ή σε φάση ηρεμίας (G0). Τα κύτταρα σε φάση διπλασιασμού του DNA (S) περιέχουν ενδιάμεση ποσότητα γενετικού υλικού, σχηματίζοντας μία «κοιλιάδα» κυττάρων ανάμεσα στις δύο κορυφές G0/G1 και G2/M, που σχηματίζονται στο ιστογράμμο που προκύπτει μετά από ανάλυση του κυτταρικού κύκλου ενός κυτταρικού εναιωρήματος. Εφόσον στην καλλιέργεια υπάρχουν και αποπτωτικά κύτταρα, τα οποία έχουν μπει σε διαδικασία απώλειας γενετικού υλικού, τότε στην ανάλυση απεικονίζονται ως subG0 κύτταρα, στην αρχή του ιστογράμματος. Για την ανάλυση του κυτταρικού κύκλου του κάθε δείγματος, συγκεντρώθηκαν τουλάχιστον 10000 κύτταρα, ώστε να γίνεται αποδεκτό το στατιστικό αποτέλεσμα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού WinMDI (Salt Institute, La Jolla, CA, USA).

Εκτός του κυτταρικού κύκλου η τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιήθηκε και για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών -1, -9, -13 (MMPs:metalloproteinases) στα HepG2, μετά την

χορήγηση λεπτίνης ή την αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης. Μετά την αποκόλληση των κυττάρων από τις καλλιεργητικές φλάσκες προσθέτουμε 2ml 70% αιθανόλη σταγόνα-σταγόνα με ταυτόχρονη χρήση του vortex (κάτω από 1000 rpm για να μην καταστραφούν τα κύτταρα). Στην αιθανόλη τα κύτταρα μπορούν να παραμείνουν στους -20°C για όσο διάστημα επιθυμούμε. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2000 στροφές για 10 λεπτά. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και βάζουμε 200μl PBS για κάθε μέτρηση. Προσθέτουμε 10 μl από το μονοκλωνικό αντίσωμα για την MMP-1 (R&D, IC9011P), την MMP-9 (R&D, IC911F) και την MMP-13 (R&D, clone 87518) ή το αντίστοιχο αρνητικό control που είναι αντίσωμα IgG2b ποντικού (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Πριν τη μέτρηση βάζουμε άλλα 600 μl PBS στο φιαλίδιο.

Τέλος χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης του υποδοχέα της λεπτίνης στα PBMCs ασθενών με HBV, HCV, αυτοάνοση και αλκοολική ηπατίτιδα, καθώς και της ομάδας ελέγχου. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντι-ανθρώπινο OB-R αντίσωμα (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) ή αρνητικό control IgG2a ποντικού (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.1.13 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 10 και αναλυτικότερα:

- Student's t-test,
- Mann-Whitney U (MWU),
- Kruskal – Wallis,
- χ^2 test
- Pearson correlation
- analysis of variance (ANOVA) με διόρθωση Bonferroni σε πολλαπλές συγκρίσεις
- the post-hoc test

Οι τιμές του $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

Αναλυτικότερα, προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα έγινε στατιστική επεξεργασία για την αποσαφήνιση των ακόλουθων ευρημάτων:

- Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της στα PBMCs μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ομάδων των ασθενών με HBV, HCV, αλκοολική και αυτοάνοση ηπατίτιδα.

- Σύγκριση της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της σε ηπατικούς ιστούς υγιών, ασθενών με χρόνιες ηπατοπάθειες και ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο.
- Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων της λεπτίνης στα PBMCs και των κλινικών χαρακτηριστικών των ασθενών.
- Σύγκριση των επιπέδων λεπτίνης ορού μεταξύ των ομάδων μελέτης που προαναφέρθηκαν.
- Ανάλυση των κυτταρομετρικών ευρημάτων της έκφρασης του OB-R στα PBMCs.
- Συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης της λεπτίνης, των υποδοχέων της, της hTERT και της ενεργότητας της τελομεράσης σε ηπατικό ιστό από υγιείς, ασθενείς με HBV, HCV και HCC μεταξύ τους, καθώς επίσης και με τα κλινικά χαρακτηριστικά τους.
- Αξιολόγηση των επιπέδων έκφρασης της hTERT και της ενεργότητας της τελομεράσης μετά τη χορήγηση λεπτίνης σε HepG2.
- Σύγκριση της έκφρασης της λεπτίνης και της hTERT μετά τη χορήγηση IL-6 και TSA σε HepG2.
- Ανάλυση του κυτταρικού κύκλου και της βιωσιμότητας των HepG2 μετά τη χορήγηση λεπτίνης ή την αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης.
- Ανάλυση των επιπέδων MMPs και διάφορων προφλεγμονωδών παραγόντων σε HepG2 μετά τη χορήγηση λεπτίνης.
- Ανάλυση της επίδρασης της πρόσδεσης της ακετυλιωμένης H3 στον υποκινητή της λεπτίνης στην έκφραση της.

2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.2.A Μελέτη της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (PBMCs) και τον ορό ασθενών με HBV, HCV

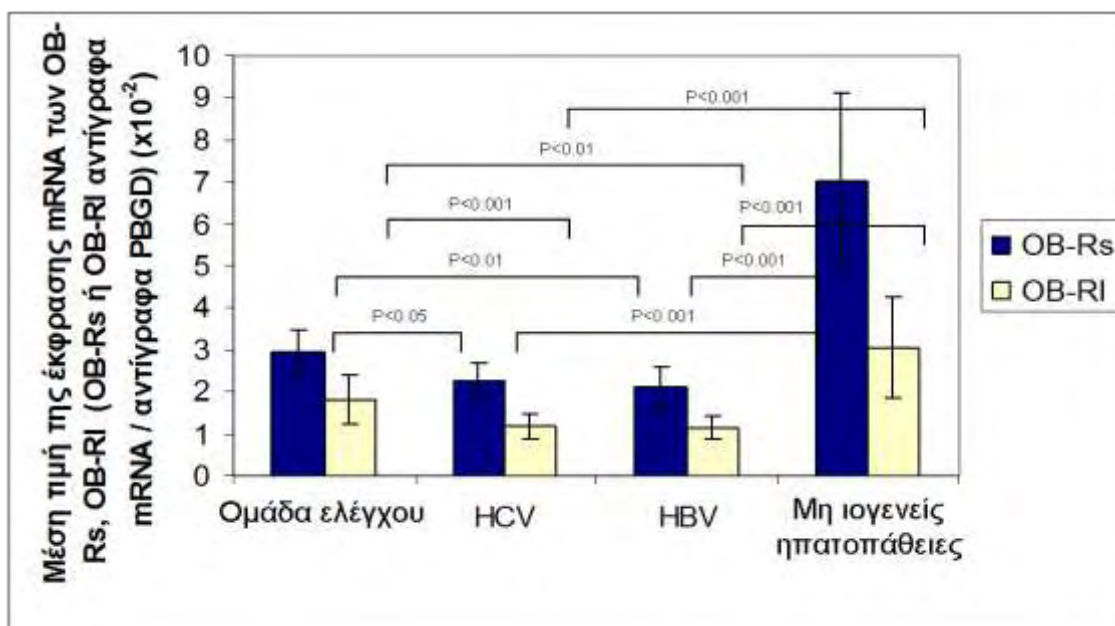
2.2.A.1 Ποσοτικοποίηση των υποδοχέων (OB-RI, OB-Rs) της λεπτίνης στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος

Στοχεύοντας στη διερεύνηση του ανοσορυθμιστικού ρόλου των δύο κύριων ισομορφών του υποδοχέα της λεπτίνης στις χρόνιες ιογενείς (HBV, HCV) ηπατοπάθειες ποσοτικοποιήσαμε, με τη χρήση της RT-PCR, τα επίπεδα mRNA των OB-RI, OB-Rs ισομορφών στα PBMCs ασθενών με HBV, HCV λοιμώξεις, σε αντιδιαστολή με ασθενείς με ηπατική νόσο χωρίς ιογενές υπόβαθρο (αλκοολική και αυτοάνοση ηπατίτιδα), καθώς και με υγιή άτομα.

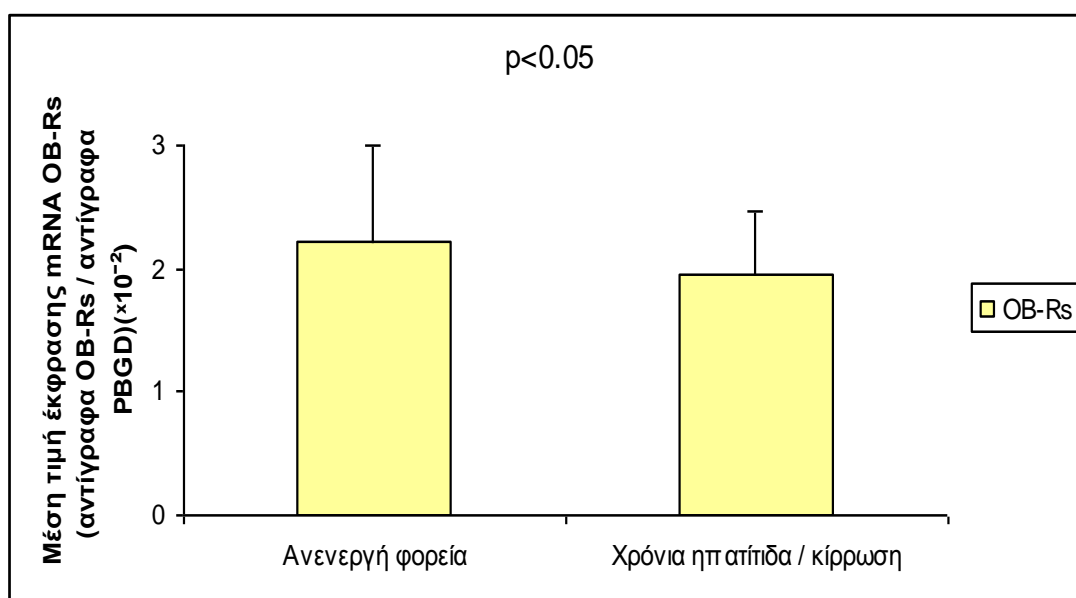
Ο μέσος όρος των επιπέδων έκφρασης των OB-RI, OB-Rs διέφερε σημαντικά μεταξύ των τεσσάρων ομάδων ενδιαφέροντος (HBV, HCV, μη ιογενής ηπατική νόσος και υγιή άτομα). Ειδικότερα, μετά από post-hoc ανάλυση με το Fisher PLSD τεστ παρατηρήθηκαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές των επιπέδων mRNA των OB-RI, OB-Rs υποδοχέων στους ασθενείς με χρόνιες HBV ($1.133 \pm 0.361 \times 10^{-2}$ και $2.086 \pm 0.55 \times 10^{-2}$, αντίστοιχα) και HCV ($1.167 \pm 0.469 \times 10^{-2}$ και $2.267 \pm 0.648 \times 10^{-2}$, αντίστοιχα) λοιμώξεις συγκριτικά με τα υγιή άτομα ($1.804 \pm 0.629 \times 10^{-2}$ και $2.953 \pm 0.562 \times 10^{-2}$, αντίστοιχα) και τους ασθενείς με μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατική νόσο ($3.05 \pm 1.292 \times 10^{-2}$ και $7.02 \pm 2.092 \times 10^{-2}$, αντίστοιχα) ($p < 0.05$, διάγραμμα 1). Αντιπροσωπευτική εικόνα γέλης που απεικονίζει την έκφραση των υποδοχέων της λεπτίνης σε όλες τις ομάδες μελέτης παρουσιάζεται στην εικόνα 15.

Τα επίπεδα έκφρασης των OB-RI, OB-Rs δεν διέφεραν ούτε μεταξύ των ασθενών με HBV και HCV ούτε μεταξύ των ασθενών με αλκοολική και αυτοάνοση ηπατίτιδα. Επιπλέον η μέση τιμή της έκφρασης του OB-Rs ήταν περίπου διπλάσια από αυτή του OB-RI σε ολική θεώρηση των δειγμάτων (HBV, HCV, μη ιογενής ηπατική νόσος και υγιή άτομα, $p < 0.001$).

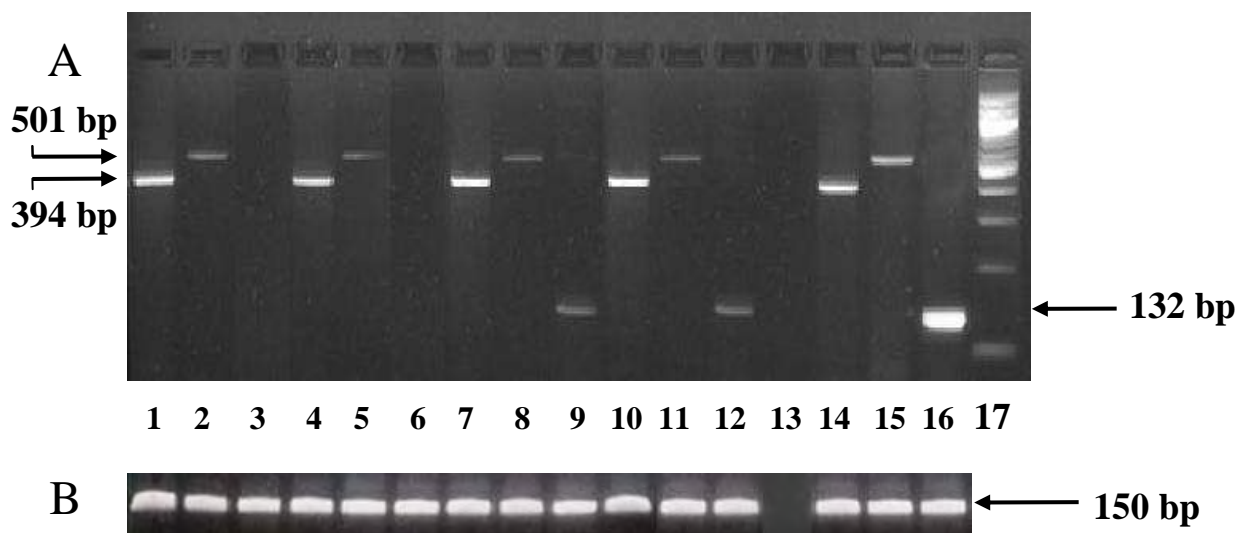
Σε ότι αφορά στη μέση τιμή της έκφρασης mRNA του OB-RI στα PBMCs δεν υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των κλινικών υποομάδων των ασθενών (ανενεργός φορέας, χρόνια HBV, HCV λοίμωξη, κίρρωση) (ANOVA, $p < 0.05$), ακόμα και όταν διαχωρίστηκαν σύμφωνα με τον τύπο της ιογενούς λοίμωξης (Student's t-test, $p < 0.05$). Η ίδια προσέγγιση των δειγμάτων σε σχέση με τον OB-Rs ανέδειξε σημαντικά υψηλότερη έκφρασή του στους ανενεργούς HBV φορείς (N=14) σε σύγκριση με τους ασθενείς με χρόνια HBV λοίμωξη και HBV σχετιζόμενη κίρρωση (N=17) ($2.228 \pm 0.764 \times 10^{-2}$ και $1.944 \pm 0.516 \times 10^{-2}$, αντίστοιχα, $p < 0.05$) (διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 1. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του mRNA των OB-RI και OB-Rs υποδοχών της λεπτίνης στα PBMCs από υγιή άτομα (ομάδα ελέγχου), από ασθενείς με μη ιογενείς ηπατοπάθειες (disease control group) και ασθενείς με HBV, HCV λοίμωξη με τη χρήση real-time RT-PCR. Τα ραβδογράμματα παρουσιάζουν τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση. Τα (p) εξηγούν τα επίπεδα στατιστικής σημασίας των διαφορών μεταξύ των ομάδων.



Διάγραμμα 2. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης του mRNA του OB-Rs υποδοχέα της λεπτίνης στα PBMCs μεταξύ ανενεργών φορέων και ασθενών με χρόνια ηπατίτιδα και κίρρωση εντός της ομάδας των ασθενών με HBV λοίμωξη. Τα ραβδογράμματα παρουσιάζουν τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση. Τα (p) εξηγούν τα επίπεδα στατιστικής σημασίας των διαφορών μεταξύ των ομάδων.



Εικόνα 15. Αντιπροσωπευτική γέλη που απεικονίζει τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των OB-Rl, OB-Rs και της λεπτίνης στα PBMCs από HBV, HCV ασθενείς, από ασθενείς με μη ιογενείς ηπατοπάθειες και υγιή άτομα. (Α) στήλη 1: OB-Rs/υγιείς, στήλη 2: OB-Rl/υγιείς, στήλη 3: λεπτίνη/υγιείς, στήλη 4: OB-Rs/ HBV, στήλη 5: OB-Rl/ HBV, στήλη 6: λεπτίνη/ HBV, στήλη 7: OB-Rs/HCV, στήλη 8: OB-Rl/ HCV, , στήλη 9: λεπτίνη/ HCV, στήλη 10: OB-Rs/ μη ιογενείς ηπατοπάθειες, στήλη 11: OB-Rl/ μη ιογενείς ηπατοπάθειες, στήλη 12: λεπτίνη/ μη ιογενείς ηπατοπάθειες, στήλη 13: αρνητικό control, στήλη 14: OB-Rs/θετικό control, στήλη 15: OB-Rl/θετικό control, στήλη 16: λεπτίνη/θετικό control, στήλη 17: μάρτυρας (100bp ladder. (Β) Αντίστοιχα mRNA επίπεδα του PBGD.

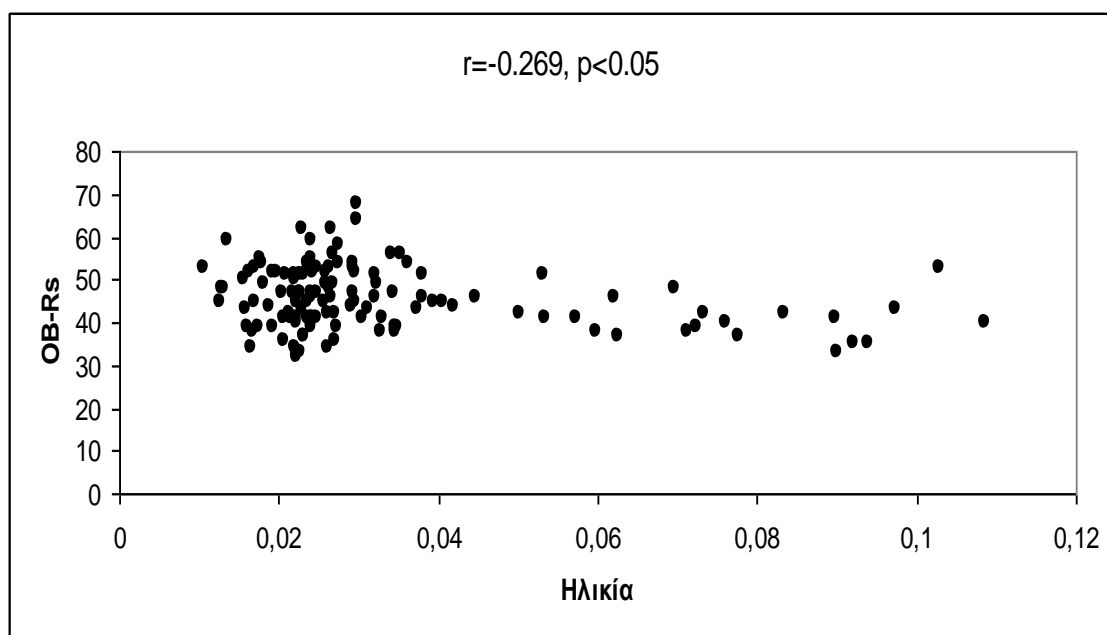
Τέλος η μέση τιμή των OB-Rl και OB-Rs δεν διέφερε μεταξύ ανδρών και γυναικών στους HBV ασθενείς ($1.159 \pm 0.86 \times 10^{-2}$ vs $2.06 \pm 0.618 \times 10^{-2}$ και $1.107 \pm 0.491 \times 10^{-2}$ vs $2.114 \pm 0.731 \times 10^{-2}$, αντίστοιχα), στους HCV ασθενείς ($1.194 \pm 0.393 \times 10^{-2}$ vs $2.311 \pm 0.521 \times 10^{-2}$ και $1.149 \pm 0.713 \times 10^{-2}$ vs $2.226 \pm 0.1.027 \times 10^{-2}$, αντίστοιχα), στους μη ιογενούς αιτιολογίας ασθενείς ($3.17 \pm 1.11 \times 10^{-2}$ vs $2.90 \pm 0.1.536 \times 10^{-2}$ και $7.16 \pm 2.013 \times 10^{-2}$ vs $6.85 \pm 2.275 \times 10^{-2}$, αντίστοιχα) και στους υγιείς ($1.787 \pm 0.711 \times 10^{-2}$ vs $3.026 \pm 0.619 \times 10^{-2}$ και $1.823 \pm 0.557 \times 10^{-2}$ vs $2.881 \pm 0.441 \times 10^{-2}$, αντίστοιχα).

Η μείωση της έκφρασης των υποδοχέων της λεπτίνης στα PBMCs των ασθενών με HBV, HCV λοίμωξη σε σχέση με τις δύο ομάδες ελέγχου αντικατοπτρίζει πιθανά την επαγόμενη από τους ηπατοτρόπους ιούς αποδιοργάνωση των ενδοκυττάρων μοριακών μονοπατιών, η οποία εκδηλώνεται με μείωση ή απουσία της μετάφρασης και συνέπεια της οποίας αποτελεί η αυξημένη ευαισθησία των PBMCs στους μηχανισμούς της απόπτωσης κατά την εκδήλωση της λοίμωξης.

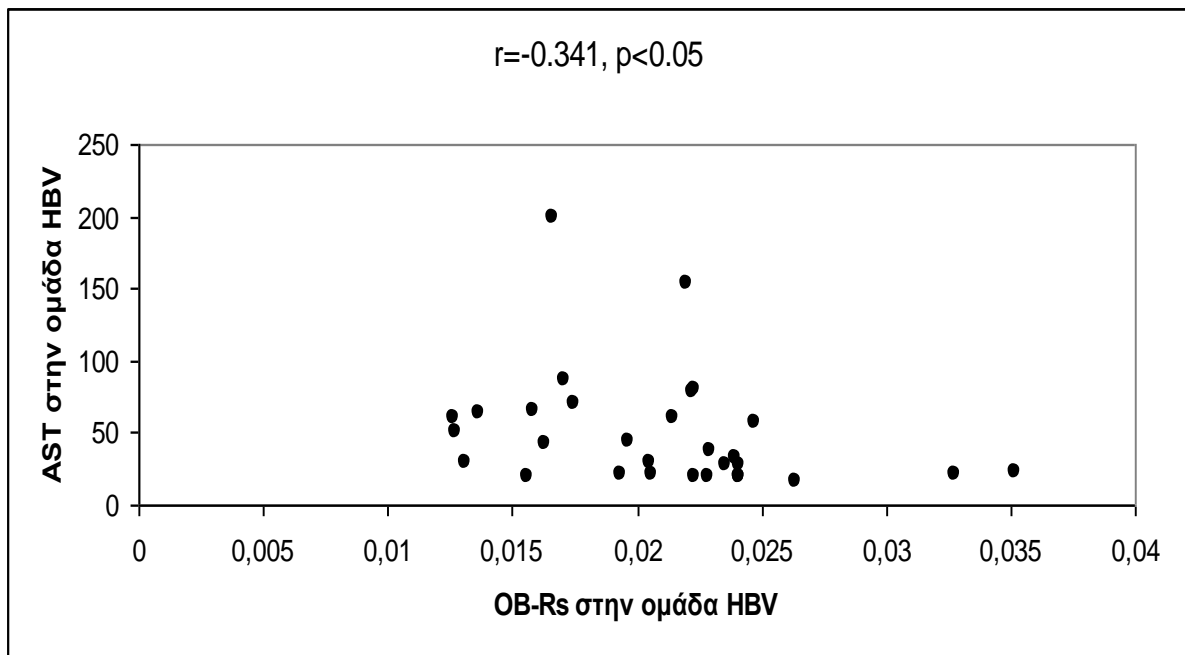
2.2.A.2 Συσχέτιση των επιπέδων mRNA των OB-Rl, OB-Rs στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Οι OB-Rl και OB-Rs υποδοχείς δεν παρουσίασαν στατιστική συσχέτιση με την ηλικία, το BMI, το φύλο, τη διάρκεια της ασθένειας ή τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών όταν οι ασθενείς εξετάστηκαν ως ενιαίο σύνολο. Παρόμοια ευρήματα, πλην μερικών εξαιρέσεων που θα αναφερθούν παρακάτω, παρατηρήθηκαν και όταν οι ασθενείς χωρίστηκαν σε ομάδες ανάλογα με την αιτία της ηπατικής νόσου ή εντός των κλινικών υποομάδων των ιογενών ηπατοπαθειών (HBV, HCV).

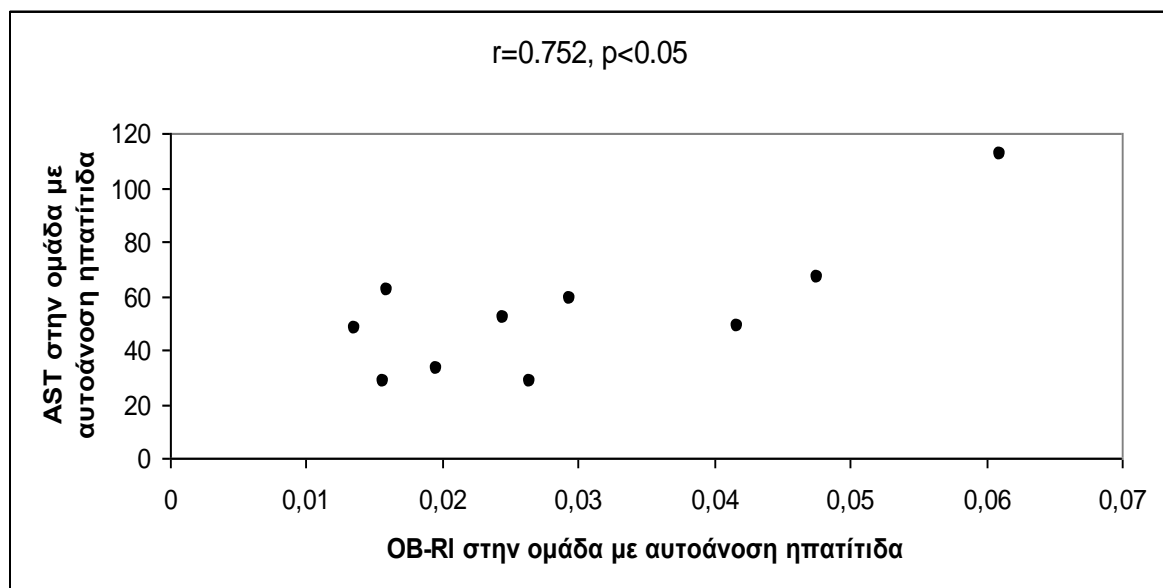
Ως εξαίρεση στο προαναφερθέν πρότυπο, στο σύνολο των δειγμάτων διαπιστώσαμε σημαντική συσχέτιση μεταξύ του OB-Rs και της ηλικίας των ασθενών (Pearson rank correlation, $r=-0.269$, $p<0.05$) (διάγραμμα 3). Επιπλέον ο OB-Rs παρουσίαζε αξιοσημείωτη αρνητική συσχέτιση με τα επίπεδα ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST) στην ομάδα με HBV λοίμωξη ($r=-0.341$, $p<0.05$), ενώ ο OB-Rl θετική συσχέτιση με τα επίπεδα AST στην ομάδα με αυτοάνοση ηπατίτιδα ($r=0.752$, $p<0.05$) (διάγραμμα 4, 5, αντίστοιχα).



Διάγραμμα 3. Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του mRNA του υποδοχέα OB-Rs (OB-Rs mRNA αντίγραφα /PBGD mRNA αντίγραφα) με την ηλικία στο σύνολο των δειγμάτων.



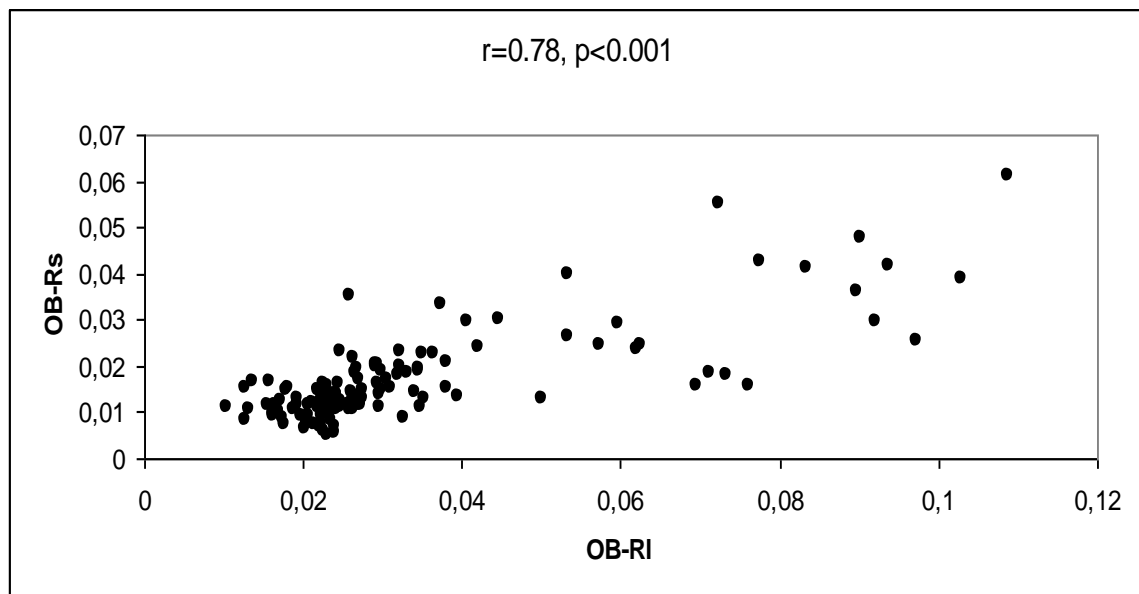
Διάγραμμα 4. Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του mRNA του υποδοχέα OB-Rs (OB-Rs mRNA αντίγραφα /PBGD mRNA αντίγραφα) με τα επίπεδα ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST) στην ομάδα με HBV λοίμωξη.



Διάγραμμα 5. Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του mRNA του υποδοχέα OB-RI (OB-RI mRNA αντίγραφα /PBGD mRNA αντίγραφα) με τα επίπεδα ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης (AST) στην ομάδα με αυτοάνοση ηπατίτιδα.

Η έκφραση του mRNA και των δύο υποδοχέων της λεπτίνης δεν βρέθηκε να σχετίζεται με τα ιικά φορτία από τον HBV ή τον HCV ούτε και με τον γενότυπο του HCV. Αντίθετα όταν θεωρήθηκαν όλα τα δείγματα ως ενιαίο σύνολο υπήρξε

θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του OB-RI και του OB-Rs (N=126, Pearson rank correlation, $r=0.78$, $p<0.001$) (διάγραμμα 6). Η υψηλή συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων της λεπτίνης αποτελεί ένδειξη ότι ο λιγότερο λειτουργικός υποδοχέας OB-Rs με κάποιο τρόπο συνεπικουρεί τη δράση του λειτουργικού υποδοχέα OB-RI ή εναλλακτικά ρυθμίζει τα επίπεδα της κυκλοφορούσας στον ορό λεπτίνης, εφόσον συνδέεται με κλάσμα αυτής χωρίς να κινητοποιεί τα ίδια μοριακά μονοπάτια με την τον λειτουργικό OB-RI.

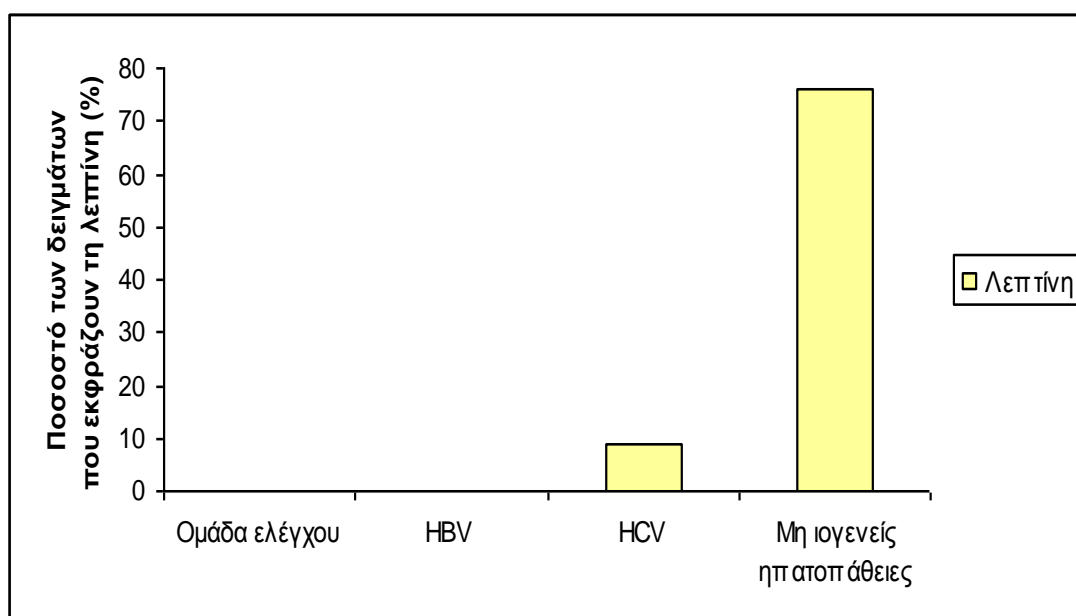


Διάγραμμα 6. Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του mRNA των υποδοχέων OB-RI και OB-Rs (OB-RI, OB-Rs mRNA αντίγραφα /PBGD mRNA αντίγραφα) στα PBMCs του συνόλου των ασθενών που καταγράφηκαν με τη χρήση real-time RT-PCR.

2.2.A.3 Έκφραση της λεπτίνης στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος

Παρατηρήσαμε ότι τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της λεπτίνης στα PBMCs ήταν μηδενικά μεταξύ των υγιών ατόμων (N=36) ή των ασθενών με HBV λοίμωξη (N=31), αλλά αντίθετα είχαμε έκφραση της σε 3 από τα 34 δείγματα ασθενών με HCV (8.8%) και σε 19 από 25 δείγματα ασθενών με αλκοολική και αυτοάνοση ηπατίτιδα (76%) (διάγραμμα 7). Αν και δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της λεπτίνης και του τύπου ιογενούς ηπατίτιδας ($\chi^2=2.868$, $p>0.05$), υπήρξε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της λεπτίνης και της παρουσίας μη ιογενούς ηπατοπάθειας ($\chi^2=39.7$, $p<0.001$).

Η αυξημένη έκφραση της λεπτίνης στα PBMCs των ασθενών με μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατίτιδα η οποία συνοδεύεται και από αντίστοιχη αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων της, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεϊνικό, υποδεικνύει πως η λεπτίνη θα μπορούσε να έχει αυτοκρινή δράση στα PBMCs. Πρόκειται για ένα σενάριο που συμφωνεί παθοφυσιολογικά με την διέγερση του ανοσολογικού συστήματος που μπορεί να είναι υπεύθυνη για την τοξικότητα του έναντι των ηπατοκυττάρων που παρατηρείται τόσο στην αυτοάνοση όσο και στην αλκοολική ηπατίτιδα.

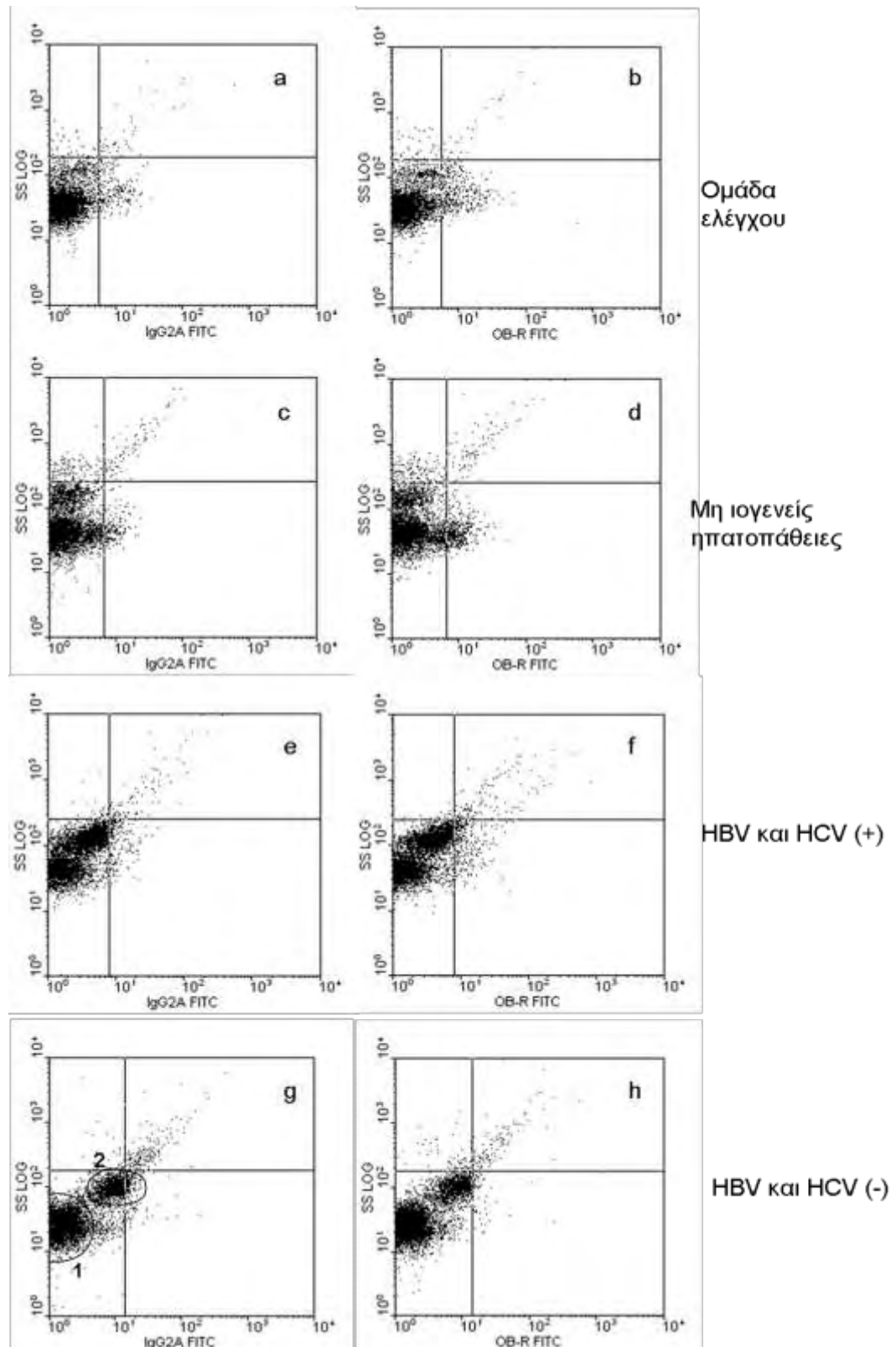


Διάγραμμα 7. Απόδοση των ποσοστών έκφρασης της λεπτίνης στις διάφορες ομάδες της μελέτης (υγιείς ως ομάδα ελέγχου, HBV, HCV και μη ιογενείς ηπατοπάθειες ως disease control group).

2.2.A.4 Κυτταρομετρική ανάλυση της έκφρασης του υποδοχέων της λεπτίνης στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος

Μια διαφορετική προσέγγιση στον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων της λεπτίνης στα PBMCs είναι ο έλεγχος με κυτταρομετρία ροής του ποσοστού των κυττάρων που εκφράζουν τους υποδοχείς (χωρίς διαχωρισμό υποτύπου υποδοχέα) μέσα στο ίδιο δείγμα. Πρόκειται για μια μέτρηση σε πρωτεϊνικό επίπεδο η οποία εμβαθύνει πέραν της ποσοτικοποίησης με την RT-PCR, διακρίνοντας το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα της λεπτίνης μέσα σε δεδομένη κυτταρική δεξαμενή και για δεδομένα επίπεδα έκφρασης.

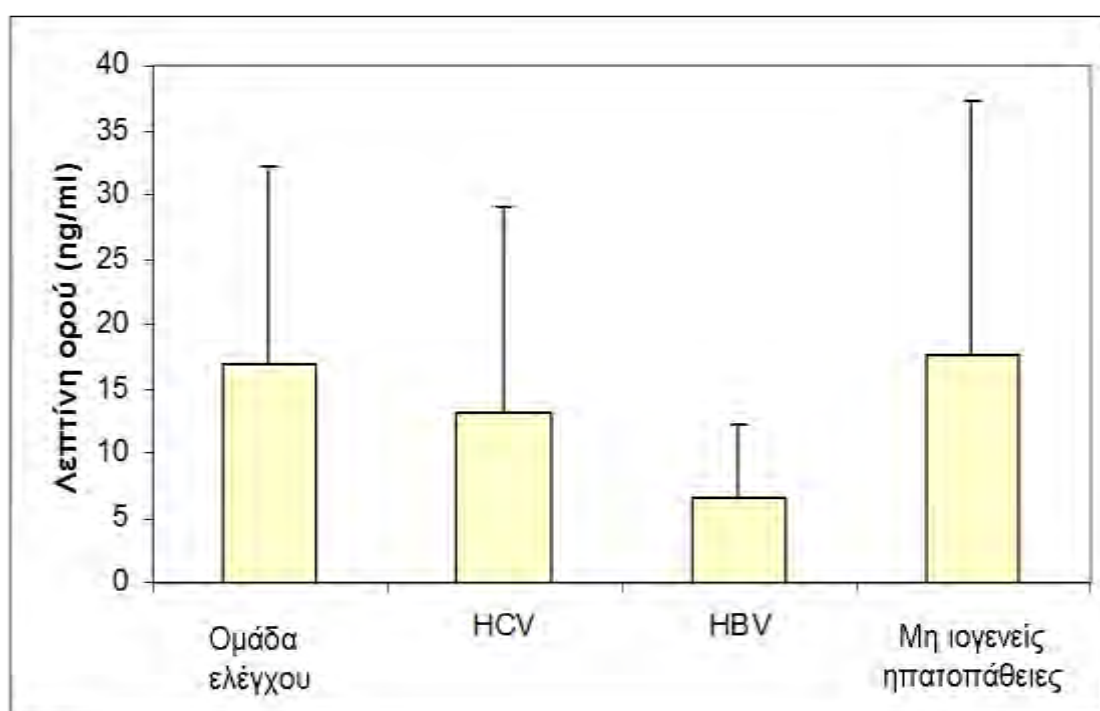
Ειδικότερα η κυτταρομετρική ανάλυση αποκάλυψε την παρουσία του OB-R σε ένα μέσο ποσοστό της τάξης του $2.32 \pm 0.8\%$ των PBMCs σε 10 από 65 (15.3%) δείγματα στους ασθενείς με HBV και HCV λοίμωξη, $3.1 \pm 0.9\%$ των PBMCs από την ομάδα των υγιών και $4.57 \pm 0.9\%$ των PBMCs από τους ασθενείς με αλκοολική και αυτοάνοση ηπατίτιδα (διάγραμμα 8). Υπήρξε ταυτόσημο προτυπο έκφρασης μεταξύ του mRNA και των αντίστοιχων πρωτεϊνών που αυτό κωδικοποιεί στα PBMCs των ομάδων της μελέτης, καταδεικνύοντας έτσι την αντιστοιχία σε αυτή την περίπτωση των μηχανισμών μεταγραφής και μετάφρασης. Η κυτταρομετρική ανάλυση των δύο ομάδων με ιογενή ηπατίτιδα αποκάλυψε αυξημένο πληθυσμό μονοκυττάρων, εύρημα το οποίο είναι συνακόλουθο με το φαινόμενο της μονοκύττωσης που είναι παρόν στις χρόνιες ιογενείς παθήσεις (διάγραμμα 8 e-h).



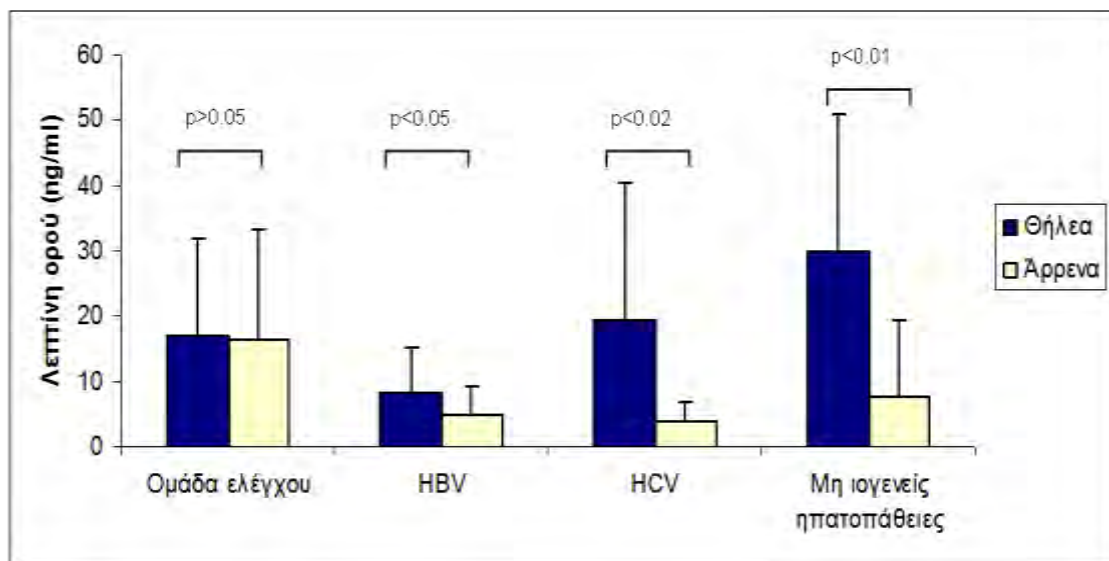
Διάγραμμα 8. Κυτταρομετρική ανάλυση της πρωτεΐνης του υποδοχέα της λεπτίνης (OB-R) στην επιφάνεια των PBMCs από την ομάδα ελέγχου των υγιών (a, b), την ομάδα με τις μη ιογενείς ηπατοπάθειες (c, d), τους ασθενείς με HBV και HCV λοίμωξη (e, f: OB-R θετικοί / g, h: OB-R αρνητικοί). Οι διακριτικοί κύκλοι στο εικονίδιο g επισημαίνουν τους πληθυσμούς των λεμφοκυττάρων (1) και των μονοκυττάρων (2).

2.2.A.5 Μέτρηση των επιπέδων λεπτίνης του ορού και συσχέτισή τους με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών

Η λεπτίνη στον ορό των ασθενών με HBV (6.522 ± 5.659 ng/ml) και HCV (13.175 ± 17.856 ng/ml) βρέθηκε να κυμαίνεται σε χαμηλότερα επίπεδα συγκρινόμενη με τα υγιή άτομα (16.822 ± 15.45 ng/ml) και την ομάδα με μη ιογενή ηπατοπάθεια (17.632 ± 19.629 ng/ml) (διάγραμμα 9). Επιπλέον τα θηλυκά άτομα είχαν υψηλότερα επίπεδα λεπτίνης ορού από τα αρσενικά στην ομάδα με HBV λοίμωξη (8.412 ± 6.89 ng/ml vs 5.077 ± 4.154 ng/ml, Student's t-test, $p < 0.05$), σε αυτή με HCV (19.582 ± 21.06 ng/ml vs 4.024 ± 2.709 ng/ml, Student's t-test, $p < 0.02$), στην ομάδα των υγιών (17.122 ± 14.67 ng/ml vs 16.403 ± 17.019 ng/ml, Student's t-test, $p > 0.05$) και στην ομάδα των μη ιογενών ηπατοπαθειών (30.12 ± 21.031 ng/ml vs 7.82 ± 11.641 ng/ml, Student's t-test, $p < 0.01$) με άλλοτε άλλο βαθμό στατιστικής σημασίας (διάγραμμα 10).



Διάγραμμα 9. Σύγκριση των επιπέδων της λεπτίνης του ορού μεταξύ των ομάδων της μελέτης (υγιείς, μη ιογενείς ηπατοπάθειες, HBV, HCV). Τα ραβδογράμματα παρουσιάζουν τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση. Η απουσία των p οφείλεται στο ότι οι διαφορές μεταξύ των ομάδων είχαν επίπεδο σημαντικότητας υψηλότερο από 0.05.

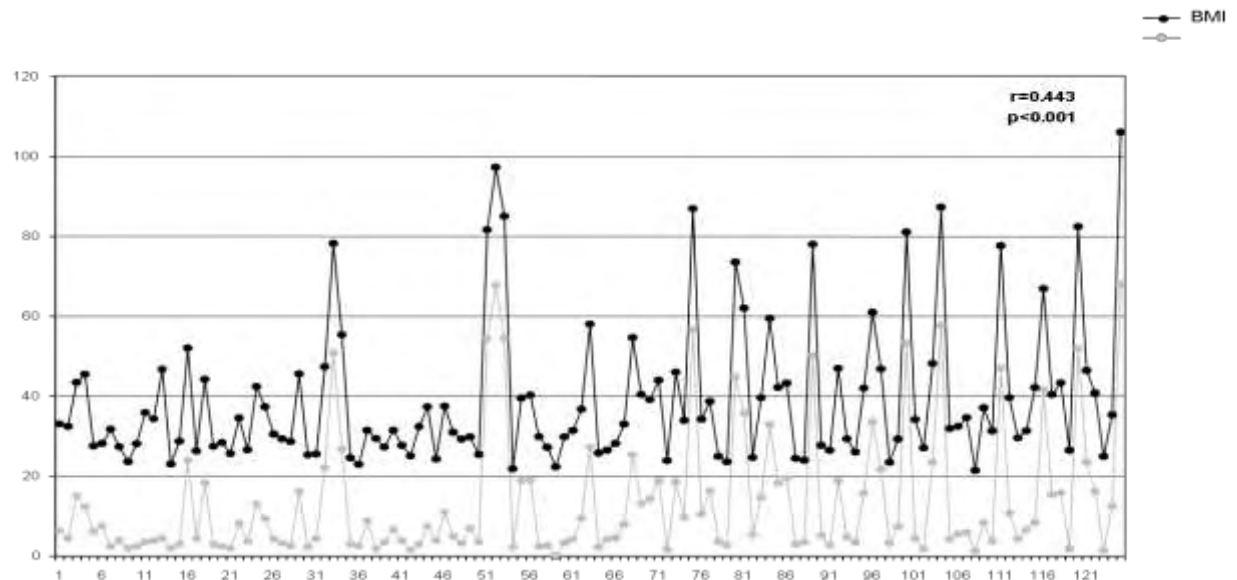


Διάγραμμα 10. Σύγκριση των επιπέδων της λεπτίνης του ορού μεταξύ αρρένων και θηλέων ατόμων εντός των ομάδων της μελέτης (υγιείς, μη ιογενείς ηπατοπάθειες, HBV, HCV). Τα ραβδογράμματα παρουσιάζουν τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση. Τα (p) εξηγούν τα επίπεδα στατιστικής σημασίας των διαφορών μεταξύ των ομάδων.

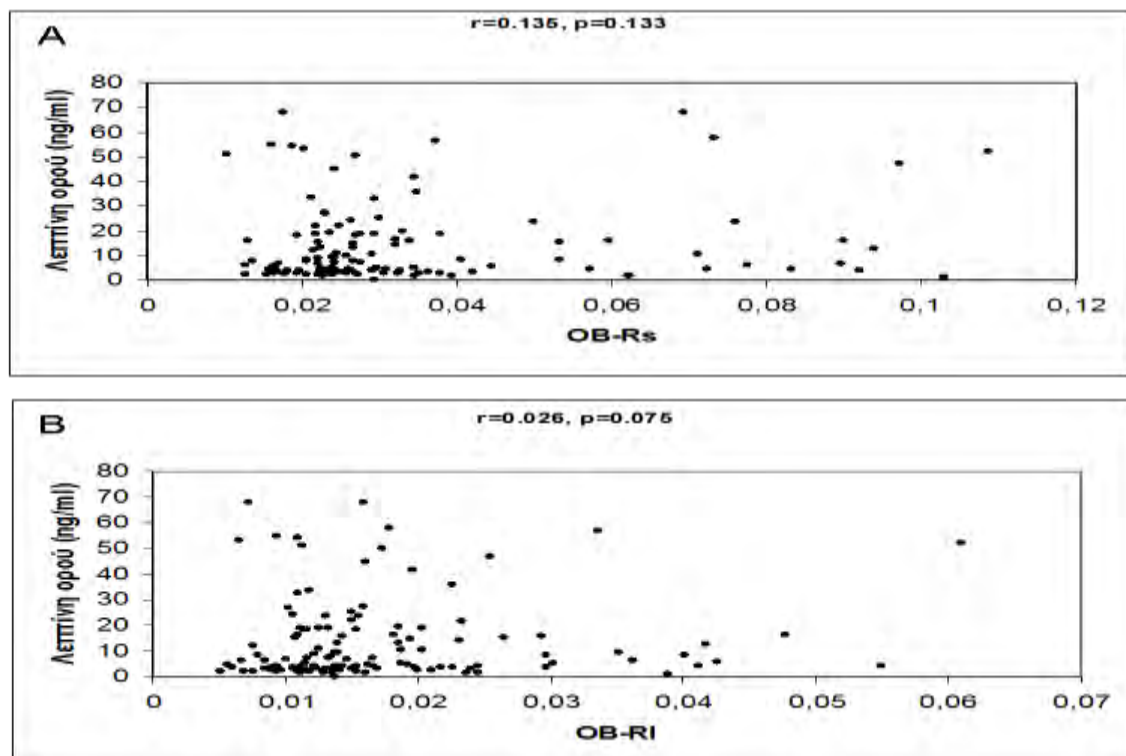
Η λεπτίνη του ορού βρέθηκε επίσης να σχετίζεται σημαντικά με το BMI (Spearman rank correlation, $r=0.443$, $p<0.001$) όταν τα δείγματα ελήφθησαν ως ενιαίο σύνολο ($N=126$) (διάγραμμα 11). Ωστόσο, καμία συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της λεπτίνης του ορού και της ηλικίας, της διάρκειας της ασθένειας ή των αμινοτρανσφερασών. Εκτός των ανωτέρω, δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ της λεπτίνης του ορού και των επιπέδων mRNA των OB-RI, OB-Rs στα PBMCs των ασθενών με HBV ($r=-0.052$, $p>0.05$ και $r=0.002$, $p>0.05$, αντίστοιχα), με HCV ($r=-0.172$, $p>0.05$ και $r=-0.399$, $p<0.05$, αντίστοιχα), με αλκοολική και αυτοάνοση ηπατίτιδα ($r=-0.195$, $p>0.05$ και $r=0.071$, $p>0.05$, αντίστοιχα) και των υγιών ($r=-0.168$, $p>0.05$ και $r=-0.228$, $p>0.05$, αντίστοιχα), εκτός της αρνητικής συσχέτισης με τον OB-Rs στην ομάδα με HCV. Ομοίως, όταν όλες οι υποομάδες ελέγχου θεωρήθηκαν ως μία ενιαία δεν αναδείχθηκε συσχέτιση μεταξύ της λεπτίνης του ορού και του OB-RI ($r=0.026$, $p>0.05$) ή του OB-Rs ($r=0.135$, $p>0.05$) (διάγραμμα 12 α, β).

Συνοπτικά, η μικρή μείωση των επιπέδων της λεπτίνης του ορού στους ασθενείς με ιογενείς ηπατοπάθειες σε αντίθεση με την αύξηση που παρατηρείται στις μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθειες εξηγεί πιθανώς τον ανοσοδιεγερτικό ρόλο της κυκλοφορούσας λεπτίνης στον ανθρώπινο οργανισμό. Η αντιστοιχία επίσης των

επιπέδων της λεπτίνης του ορού με το BMI στο σύνολο των ασθενών ενισχύει τον πρωτεύοντα ρόλο των αποθεμάτων λίπους του σώματος στον καθορισμό των επιπέδων της λεπτίνης της κυκλοφορίας. Σύννομη με αυτή την διατύπωση είναι και η παρατηρούμενη αύξηση της λεπτίνης του ορού των θήλεων ατόμων σε σύγκριση με τα άρρενα.



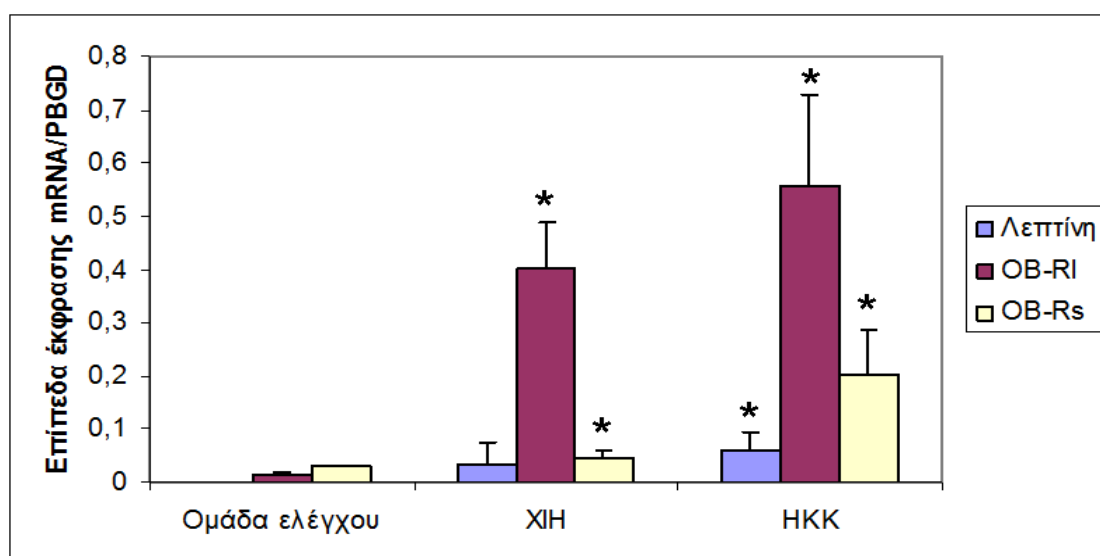
Διάγραμμα 11. Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της λεπτίνης του ορού (ng/ml) και του δείκτη μάζας σώματος (BMI) στο σύνολο των δειγμάτων (N=126).



Διάγραμμα 12. Συσχέτιση της λεπτίνης του ορού με τον OB-Rs (A) και τον OB-RI (B) των PBMCs.

2.2.B Ποσοτικοποίηση της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της σε βιοψίες ηπατικού ιστού (καρκινικού και φυσιολογικού)

Η λεπτίνη βρέθηκε να εκφράζεται σε 18/23 (78.2%) δείγματα με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα (ΗΚΚ), ενώ αντίστοιχα τα δείγματα με χρόνια ηπατίτιδα Β ή C (ΧΙΗ) παρουσίαζαν έκφρασή της σε ποσοστό 60.6% (20/33). Αντίθετα, σε όλα τα δείγματα (23) των ιστών που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου η έκφραση της λεπτίνης ήταν μηδενική. Αναλυτικότερα, ο μέσος όρος των επιπέδων έκφρασης της λεπτίνης στους ιστούς με ΗΚΚ ήταν υψηλότερος ($5.9 \pm 3.44 \times 10^{-2}$) σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές των δειγμάτων με χρόνια ηπατίτιδα ($3.21 \pm 4.426 \times 10^{-2}$, $p > 0.05$) και πολύ υψηλότερος από αυτές της ομάδας ελέγχου ($p < 0.001$) (διάγραμμα 13). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση της λεπτίνης μεταξύ των δύο υποομάδων (Β ή C) των χρόνιων ιογενών ηπατοπαθειών και του ΗΚΚ.



Διάγραμμα 13. Σύγκριση των δειγμάτων ηπατικού ιστού από την ομάδα ελέγχου των υγιών, τους πάσχοντες από χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες (HBV, HCV) και τους ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνο (ΗΚΚ) σε σχέση με τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της λεπτίνης, του OB-R1 και του OB-Rs (λεπτίνη/OB-R1/OB-Rs mRNA αντίγραφα/PBGD mRNA αντίγραφα). Τα ραβδογράμματα παρουσιάζουν τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση. Οι αστερίσκοι (*) επισημαίνουν τα επίπεδα στατιστικής σημασίας ($p < 0.05$) των διαφορών της κάθε ομάδας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

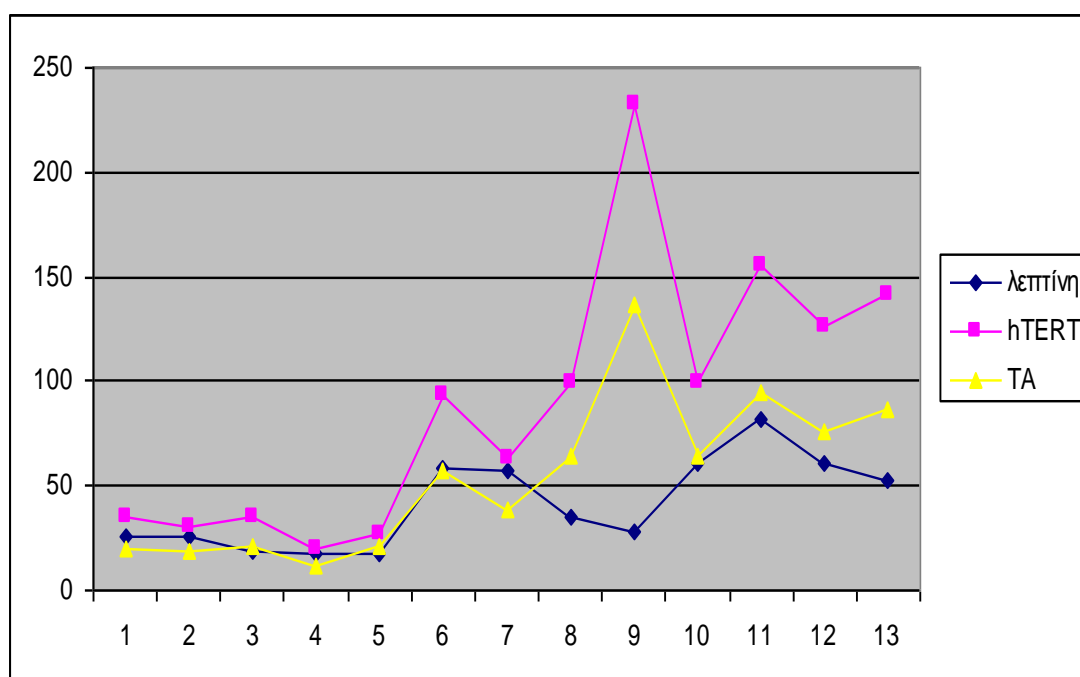
Σε ότι αφορά στους OB-RI και OB-Rs βρέθηκαν να εκφράζονται και αυτοί σε στατιστικώς σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στα δείγματα με ΗΚΚ (0.556 ± 0.172 και 0.201 ± 0.084 , αντίστοιχα), από ότι στις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες (0.401 ± 0.186 και $4.47 \pm 1.695 \times 10^{-2}$, αντίστοιχα, $p < 0.001$) και την ομάδα ελέγχου των υγιών ($1.65 \pm 0.313 \times 10^{-2}$ και $2.92 \pm 0.194 \times 10^{-2}$, αντίστοιχα, $p < 0.001$) (διάγραμμα 13). Στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των υποομάδων των ΧΙΗ και ΗΚΚ υπήρξε μόνο για τον OB-RI στην ομάδα με τις ΧΙΗ (HCV : 0.554 ± 0.158 HBV : 0.289 ± 0.095 , $p < 0.001$). Η αυξημένη έκφραση τόσο της λεπτίνης όσο και των υποδοχέων της σε ιστούς από βιοψίες ασθενών με ΗΚΚ σε σχέση με αυτούς των ασθενών με ΧΙΗ και την ομάδα ελέγχου των υγιών υποδηλώνει το ρόλο της τοπικής παραγωγής της στο ήπαρ κατά την εξέλιξη της ογκογενετικής διαδικασίας, ανεξάρτητα από την κεντρική παραγωγή της στο λιπώδη ιστό.

Σε καμία από τις ομάδες ενδιαφέροντος τα επίπεδα έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της στους ιστούς δεν συσχετίστηκαν με την ηλικία, το φύλο, το BMI, τη λεπτίνη ορού, τα επίπεδα των αμινοτρανσφερασών, το στάδιο του ΗΚΚ και το ιικό φορτίο με HCV, HBV (Spearman rank correlation, $p = \text{NS}$).

2.2.Γ Διερεύνηση των μοριακών μηχανισμών δράσης της λεπτίνης σε ηπατοκαρκινικά κύτταρα (HepG2)

2.2.Γ.1 Μελέτη της έκφρασης της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης και της δραστικότητας της τελομεράσης σε HepG2 κύτταρα μετά τη χορήγηση λεπτίνης ή την αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης

Ένα από τα μοριακά γεγονότα που χαρακτηρίζει την πολυδιάστατη διεργασία της ηπατοκαρκινογένεσης είναι η ενεργοποίηση της τελομεράσης, η οποία φυσιολογικά είναι κατεσταλμένη στα περισσότερα σωματικά κύτταρα μετά τη γέννηση του ανθρώπου. Ενδιαφέρον εύρημα, το οποίο αποτέλεσε και εφαλτήριο για την σε βάθος έρευνα μας σε σχέση με το μοριακό ρόλο της λεπτίνης στην ηπατοκαρκινογένεση, ήταν η υψηλή συσχέτιση της λεπτίνης τόσο με την hTERT (Pearson rank correlation, $r=0.85$, $p<0.05$) όσο και με την δραστικότητα της τελομεράσης (Pearson rank correlation, $r=0.75$, $p<0.05$) μόνο στα δείγματα ήπατος με ΗΚΚ (διάγραμμα 14).



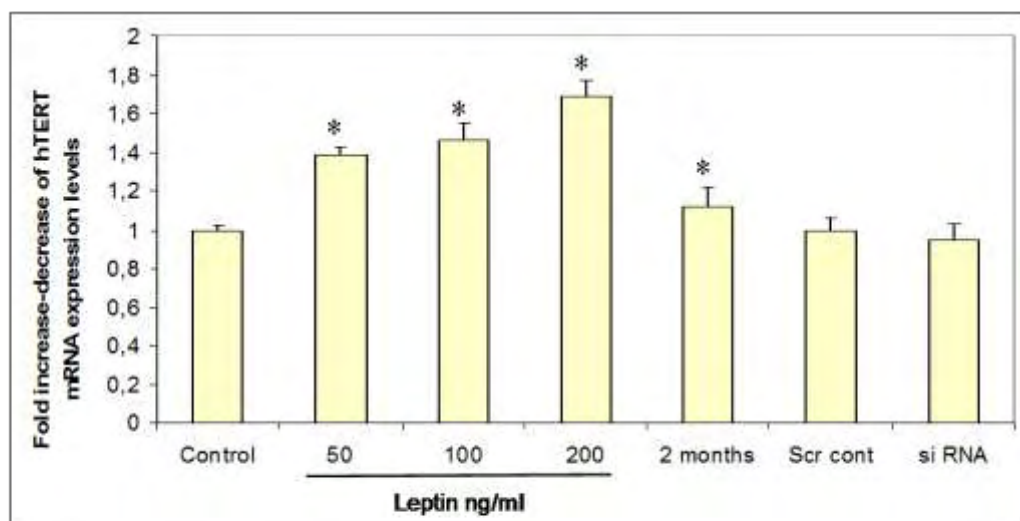
Διάγραμμα 14. Συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης της λεπτίνης (mRNA αντίγραφα/PBGD αντίγραφα x1000), της hTERT (mRNA αντίγραφα/ PBGD αντίγραφα x 10000) και της ενεργότητας της τελομεράσης (TA) που ποσοτικοποιήθηκαν με real- time RT-PCR και TRAP στα δείγματα με ΗΚΚ. Η συσχέτιση της λεπτίνης με την hTERT ήταν $r=0.85$ (Pearson rank correlation, $p<0.05$) και με την δραστικότητα της τελομεράσης $r=0.75$ (Pearson rank correlation, $p<0.05$).

Η πρόσφατη διαπίστωση της θετικής δράσης της λεπτίνης επί της έκφρασης της hTERT σε καρκινικά κύτταρα μαστού (N278), καθώς και τα ανωτέρω ευρήματα που αναδεικνύουν την υψηλή θετική συσχέτιση της λεπτίνης με την έκφραση της hTERT και την ενεργότητα της τελομεράσης σε ηπατικό ιστό, μας οδήγησαν στον σχεδιασμό ενός πειράματος για την αποσαφήνιση του ειδικού βάρους του ρόλου της λεπτίνης στην ρύθμιση της hTERT και της TA σε HepG2 κύτταρα.

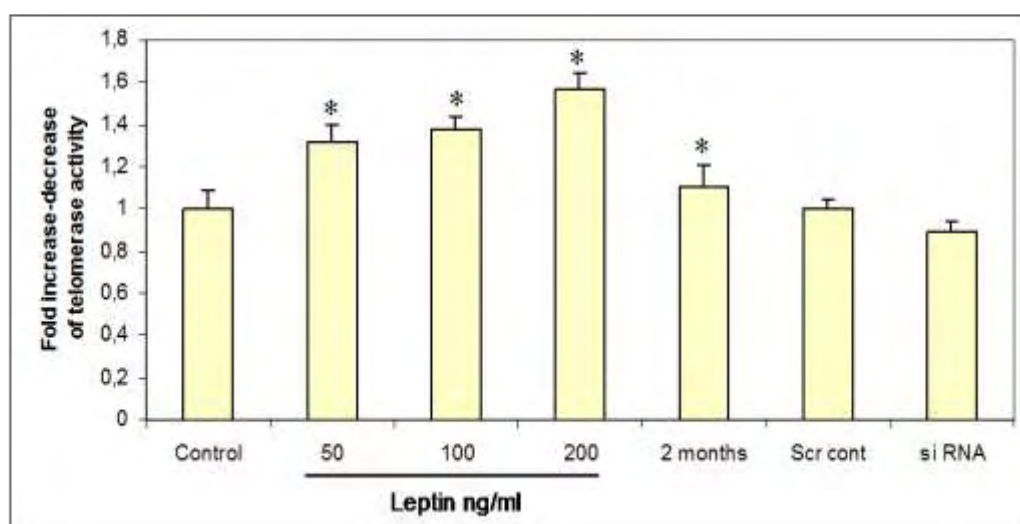
Τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT), καθώς και η δραστικότητα του ενζύμου της τελομεράσης (TA), μελετήθηκαν στην κυτταρική σειρά HepG2 μετά τη χορήγηση λεπτίνης ή την αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης με τη χρήση siRNA, ώστε να διαπιστωθεί εάν η λεπτίνη έχει την hTERT ως γονίδιο στόχο στα ηπατικά κύτταρα. Η σειρά αυτή πειραμάτων ανέδειξε μια δόσοεξαρτημένη αύξηση τόσο του mRNA της hTERT όσο και της TA μετά τη χορήγηση λεπτίνης για 48 ώρες σε HepG2 και σε συγκεντρώσεις 50-100-200 ng/ml, ενώ μικρότερη ήταν η αύξηση, και στατιστικώς μη σημαντική, μετά τη συνεχή χορήγηση λεπτίνης επί 2 μήνες (διάγραμμα 15 A, B). Από την άλλη πλευρά η αποσιώπηση του mRNA της λεπτίνης δεν οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική μείωση του hTERT και της TA στα HepG2 (διάγραμμα 15 A, B).

Τα ανωτέρω ευρήματα καθιστούν την hTERT γονίδιο στόχο για την λεπτίνη στα ηπατοκαρκινικά κύτταρα και ισχυροποιούν περαιτέρω τον κομβικό ρόλο του συστήματος της λεπτίνης στην μακρόχρονη και πολυσχιδή διαδικασία της ογκογένεσης στο ήπαρ.

A



B



Διάγραμμα 15. Επίδραση επί της hTERT(A) και της TA(B) της χορήγησης (50, 100, 200 ng/ml για 48 ώρες ή 100 ng/ml για 2 μήνες) λεπτίνης ή της αποσιώπησης της (siRNA) σε HepG2 κύτταρα. Τα ραβδογράμματα παρουσιάζουν τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση. Οι αστερίσκοι (*) επισημαίνουν τα επίπεδα στατιστικής σημασίας ($p < 0.05$) των διαφορών των συνθηκών από την συνθήκη ελέγχου (control).

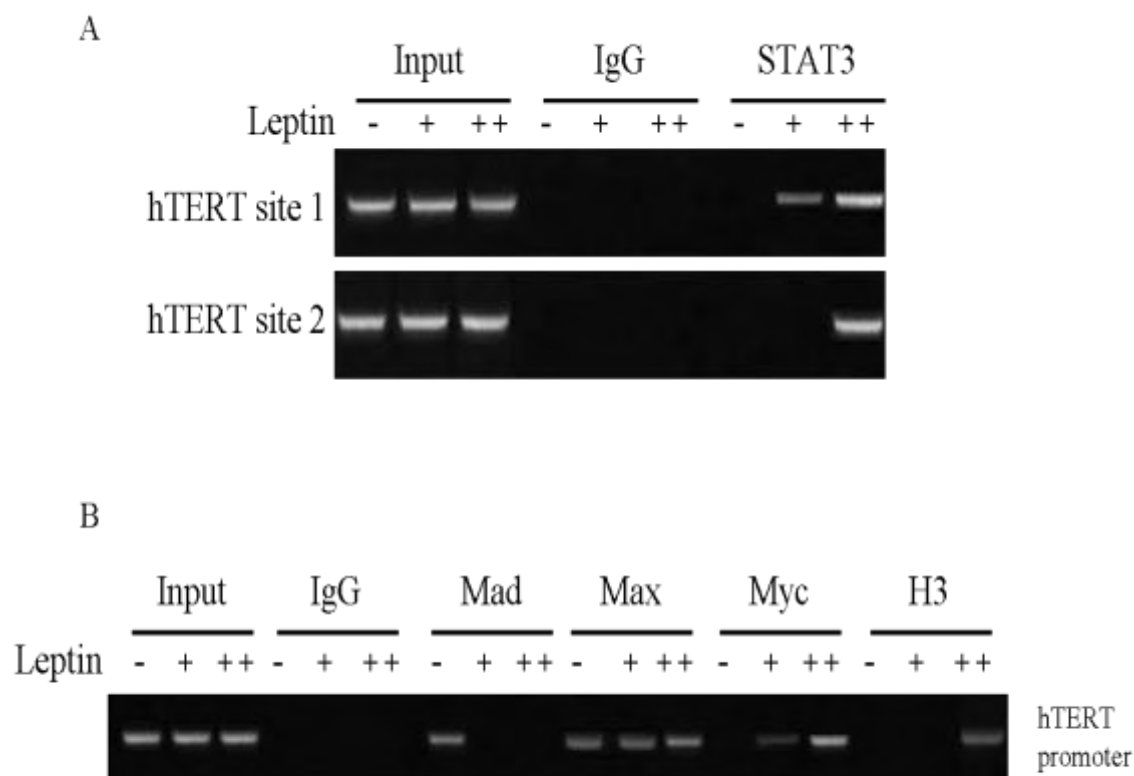
2.2.Γ.2 Διερεύνηση της συμμετοχής του μοριακού μονοπατιού JAK/STAT3, του δικτύου MYC/MAX/MAD και της ακετυλιωμένης H3 ιστόνης στην επαγόμενη από τη λεπτίνη ενεργοποίηση της έκφρασης της hTERT, με τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης

Για να εμβαθύνουμε σε ό,τι αφορά στο μηχανισμό που ελέγχει την εξαρτημένη από την λεπτίνη ενεργοποίηση του υποκινητή του hTERT των ηπατοκαρκινικών κυττάρων, στη συνέχεια εξετάσαμε μοριακά μονοπάτια ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος που κινητοποιούνται από την λεπτίνη. Πρόσφατα ο μεταγραφικός παράγοντας STAT3 αναγνωρίστηκε ως ένας σημαντικός ρυθμιστής της έκφρασης του hTERT στα καρκινικά κύτταρα (263). Εκτός της αποδεδειγμένης πλέον γνώσης μας για το ότι η λεπτίνη δρα μέσω του μοριακού μονοπατιού JAK2/STAT3, έχει τελευταία προταθεί πως η λεπτίνη ελέγχει, δια του STAT3, την έκφραση της τελομεράσης καθώς και την ενεργότητά της σε καρκινικά κύτταρα μαστού (MCF-7) (237, 240).

Συνυπολογίζοντας τα ανωτέρω εφαρμόσαμε την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης ώστε να ερευνήσουμε το κατά πόσο η λεπτίνη ευοδώνει την πρόσδεση του STAT3 στις διάφορες θέσεις πρόσδεσής του στον υποκινητή του hTERT. Στα HepG2 κύτταρα δείχθηκε ότι η πρόσδεση του STAT3 και στις δύο υποψήφιες περιοχές πρόσδεσης (sites 1 και 2) στον υποκινητή του hTERT αυξάνεται τόσο κατά τη χορήγηση λεπτίνης (200 ng/ml) για 48 ώρες (site 1) όσο και κατά τη μακροχρόνια (2 μήνες) χορήγηση της σε συγκέντρωση 100 ng/ml (sites 1 και 2) (διάγραμμα 16Α).

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον και οι ισχυρές ενδείξεις για το σημαντικό ρόλο διάφορων επιγενετικών μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης του hTERT στα κύτταρα, μας οδήγησε σε περαιτέρω μελέτη με την τεχνική ChIP και αξιολόγηση του βαθμού πρόσδεσης των Myc, Max, Mad και της ακετυλιωμένης H3 ιστόνης στον υποκινητή του hTERT μετά τη χορήγηση λεπτίνης (264). Ειδικότερα, στα HepG2 κύτταρα στα οποία δεν χορηγήθηκε λεπτίνη, παρατηρήθηκε ο συνδυασμός πρόσδεσης των Mad/ Max παραγόντων, ενώ στα κύτταρα στα οποία επιδράσαμε με λεπτίνη (200 ng/ml για 48 ώρες) είχαμε μετάπτωση προς το πρότυπο σύνδεσης Myc/Max και μηδενισμό της πρόσδεσης του παράγοντα Mad. Ενδιαφέρον υπήρξε το εύρημα μας της περαιτέρω ενίσχυσης της πρόσδεσης των Myc/Max στον υποκινητή της hTERT μετά από μακροχρόνια επίδραση με λεπτίνη (2 μήνες με συγκέντρωση 100 ng/ml) (διάγραμμα 16Β). Τέλος η πρόσδεση της ακετυλιωμένης H3 ιστόνης ήταν μηδενική σε συνθήκες μη επίδρασης με λεπτίνη και κατά την επίδραση για 48 ώρες,

ενώ παρατηρήθηκε μόνο κατά το σκέλος του πειράματος με τη μακροχρόνια επίδραση με λεπτίνη (2 μήνες) (διάγραμμα 16B).



Διάγραμμα 16. Η λεπτίνη προάγει την πρόσδεση των STAT3 (A), Myc (B) και της ακετυλιωμένης H3 (B) στον υποκινητή της hTERT. Η κατακερματισμένη μετά από επίδραση υπερήχων χρωματίνη, κατακρημνίστηκε μετά από τη χορήγηση αντισωμάτων ειδικών για τους μεταγραφικούς παράγοντες STAT3, myc, mad, max και την ακετυλιωμένη ιστόνη H3, στη συνέχεια ακολούθησε PCR με εκκινητές ειδικούς για τον υποκινητή της hTERT. Leptin

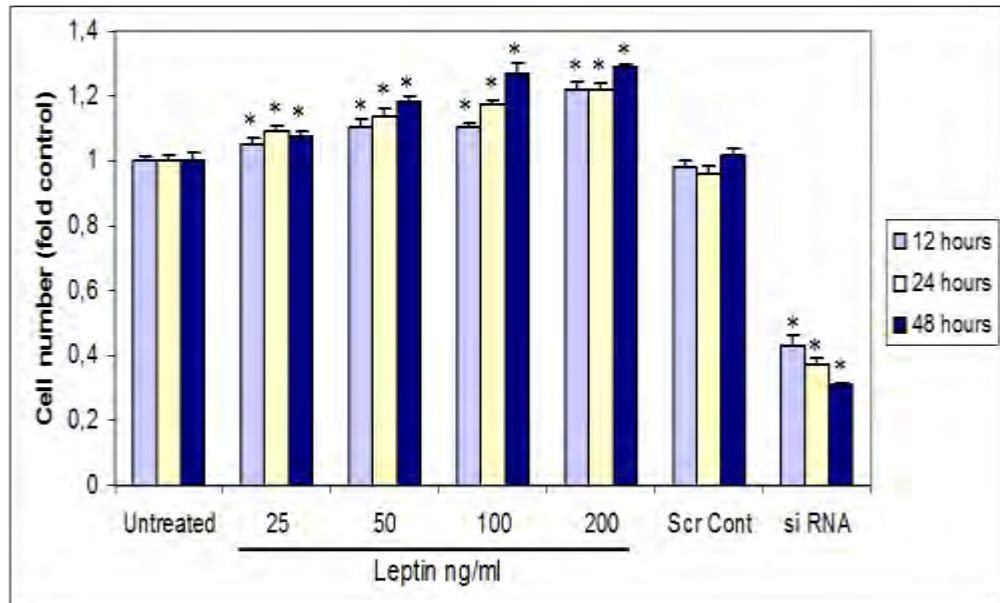
(-): κύτταρα χωρίς την επίδραση λεπτίνης ως κύτταρα ελέγχου, Leptin (+): 200 ng/ml για 48 ώρες, Leptin (++) : 100 ng/ml για 2 μήνες, Input: ολικό γενωμικό DNA που χρησιμοποιήθηκε ως control για την PCR, IgG (anti-immunoglobulin G): μη ειδικό αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control.

2.2.Γ.3 Μελέτη της επίδρασης ή της αποσιώπησης του γονιδίου της λεπτίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό κύκλο των ηπατοκαρκινικών κυττάρων

Καθώς η λεπτίνο-εξαρτημένη υπερέκφραση της hTERT μπορεί να οδηγήσει σε ογκογόνο ανάπτυξη και απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου μελετήσαμε στη συνέχεια την επίδραση της λεπτίνης στον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των HepG2 κυττάρων με τη βοήθεια της δοκιμασίας του MTT. Λεπτομερέστερα, η λεπτίνη διεγείρει την ανάπτυξη των HepG2 κυττάρων σύμφωνα με ένα χρόνο-(12, 24, 48 ώρες) και δόσο-(25, 50, 100, 200 ng/ml) εξαρτημένο πρότυπο. Παρατηρήθηκε ότι όσο αυξάνεται η δόση της λεπτίνης και ο χρόνος επίδρασης της στα HepG2 τόσο αυξάνεται, σε στατιστικώς σημαντικά επίπεδα, και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός τους (διάγραμμα 17A). Επιπλέον η συμβολή της λεπτίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την βιωσιμότητα των κυττάρων αναδεικνύεται από το γεγονός της αναστολής του ρυθμού πολλαπλασιασμού των HepG2 μετά την αποσιώπηση του mRNA της με τη χρήση siRNA (διάγραμμα 17A). Τα δύο αυτά πειράματα αποδεικνύουν διφυώς την επίδραση της λεπτίνης στον πολλαπλασιασμό των ηπατοκαρκινικών κυττάρων.

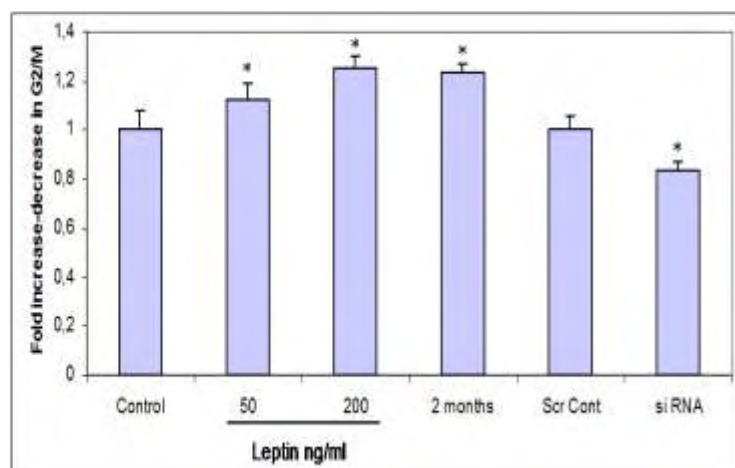
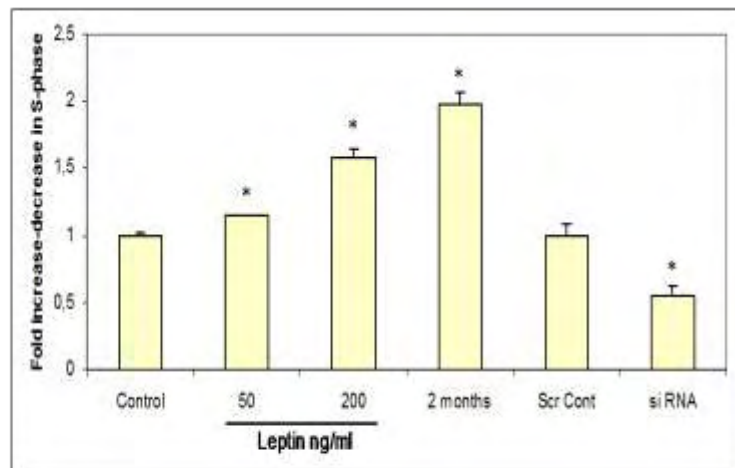
Για να πολλαπλασιαστεί ένα κύτταρο, πέραν των θρεπτικών ουσιών, απαιτούνται και κάποια χημικά διεγερτικά σήματα τα οποία χρησιμοποιούνται για να αρθούν οι εγγενείς περιορισμοί της αύξησης του κυττάρου και της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Αφού διαπιστώσαμε το ρόλο της λεπτίνης ως χημικού διεγέρτη επί των HepG2 στον προηγούμενο κύκλο πειραμάτων, προχωρήσαμε σε πιο ενδελεχή αναζήτηση της επιρροής της στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, οι οποίες φυσιολογικά ελέγχονται από διάφορα <<μοριακά φρένα>>. Η συμβολή της λεπτίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μεταφράστηκε εδώ σε αύξηση του αριθμού των HepG2 κυττάρων που βρίσκονται στη φάση αντιγραφής του DNA (S) και τις φάσεις μίτωσης και κυτταροκίνησης (G2/M), μετά τη χορήγηση της (50, 200 ng/ml για 48 ώρες και 100 ng/ml για 2 μήνες). Αντίθετα, η αποσιώπηση της λεπτίνης με τη χρήση siRNA οδήγησε σε μείωση των φάσεων S, G2/M και αύξηση της φάσης ηρεμίας ή απόσυρσης από τον κυτταρικό κύκλο (Go/G1), σε σχέση με τα κύτταρα των καλλιιεργειών ελέγχου (χωρίς επίδραση) (διάγραμμα 17B).

A



B

	S-Phase	G2/M	G0/G1
Control	9,1 ± 1,6	23,7 ± 2,9	67,2 ± 2,6
50	10,4 ± 1,2	26,5 ± 2,1	62,2 ± 3,1
200	14,4 ± 0,9	29,7 ± 1,6	55,9 ± 2,1
2 months	16,4 ± 2,1	37,9 ± 1,3	45,6 ± 2,6
Scr Cont	11,6 ± 1,1	37,7 ± 2,5	50,7 ± 3,1
si RNA	6,5 ± 1,2	31,6 ± 1,2	61,3 ± 2,3



Διάγραμμα 17. Η λεπτίνη είναι μιτογόνος για τα ηπατοκαρκινικά κύτταρα. (Α) Επίδραση της λεπτίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των HepG2. Ο κυτταρικός αριθμός

(Cell number) εκφράζεται ως ποσοστό των κυττάρων ελέγχου (χωρίς επίδραση). Τα ραβδογράμματα παρουσιάζουν τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα που αξιολογήθηκαν εις τριπλούν το καθένα. Οι αστερίσκοι (*) επισημαίνουν τα επίπεδα στατιστικής σημασίας ($p < 0.001$) των διαφορών των συνθηκών από την συνθήκη ελέγχου (control). (B) Η λεπτίνη (50, 200 ng/ml για 48 ώρες και 100 ng/ml για 2 μήνες) αύξησε το κλάσμα των HepG2 κυττάρων στις φάσεις S και G2/M του κυτταρικού κύκλου, ενώ το siRNA το μείωσε. Τα ραβδογράμματα παρουσιάζουν τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα που αξιολογήθηκαν εις τριπλούν το καθένα. Οι αστερίσκοι (*) επισημαίνουν τα επίπεδα στατιστικής σημασίας ($p < 0.05$) των διαφορών των συνθηκών από την συνθήκη ελέγχου (για τα πειράματα με siRNA η σύγκριση έγινε με το Scr control).

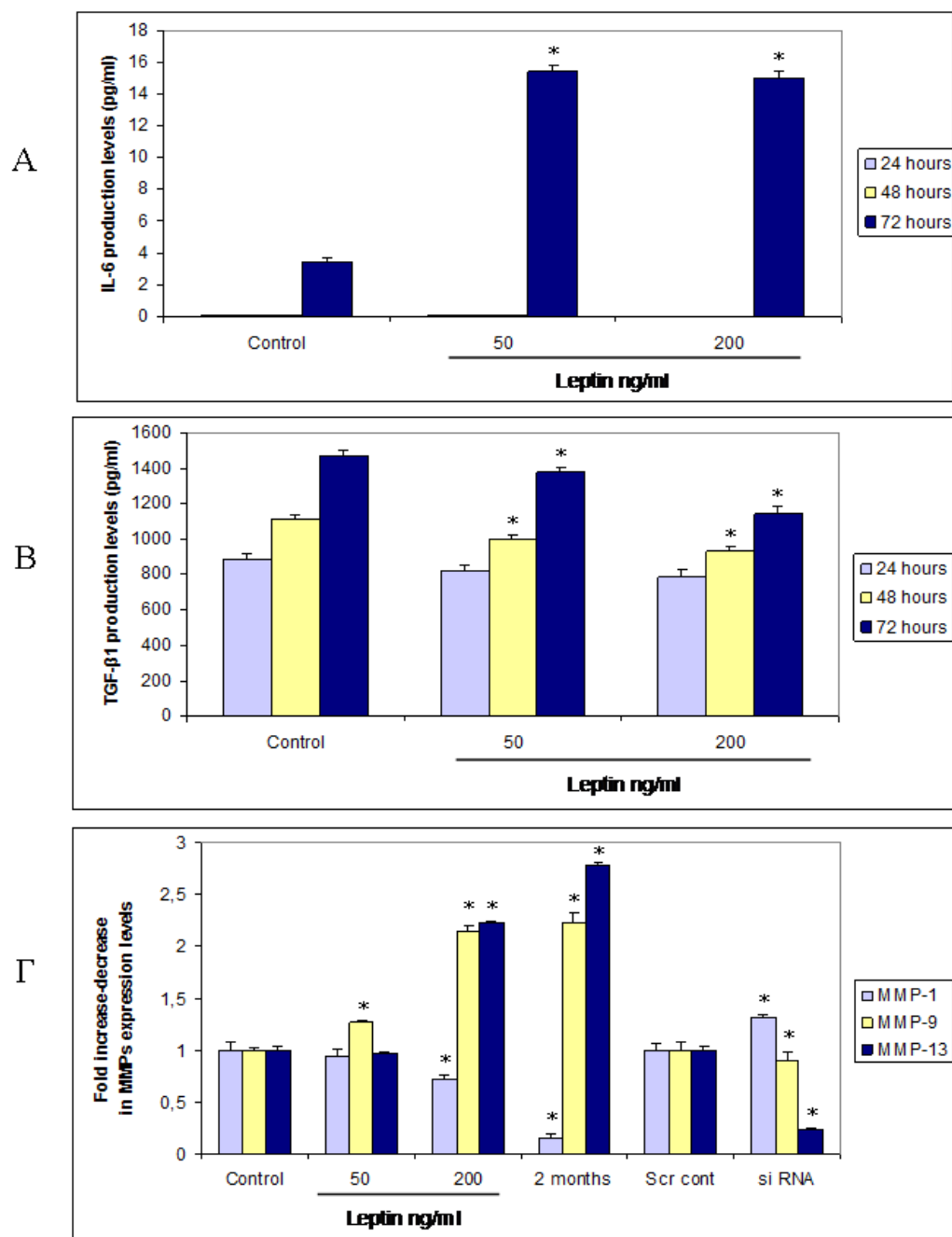
2.2.Γ.4 Μελέτη της επίδρασης της λεπτίνης στην ανάπτυξη και εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων δια του ελέγχου της παραγωγής φλεγμονωδών κυτταροκινών και μεταλλοπρωτεϊνών

Ο πιθανός ρόλος των φλεγμονωδών κυτταροκινών στην ανάπτυξη και εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων μας οδήγησε στη μελέτη της επίδρασης της λεπτίνης στην παραγωγή IL-1a, IL-1b, IL-6 και TGF-β1 από τα ανθρώπινα ηπατοκαρκινικά κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση λεπτίνης (50, 200 ng/ml) αύξησε την παραγωγή της IL-6 μόνο μετά τις 72 ώρες επίδρασης (και όχι στις 24, 48 ώρες) και κατέστειλε την παραγωγή του TGF-β1 με ένα χρόνο-(24, 48, 72 ώρες) και δόσο-(50, 200 ng/ml) εξαρτημένο πρότυπο (διάγραμμα 18Α, Β). Αντίθετα σε ότι αφορά στις IL-1a, IL-1β δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ των κυττάρων στα οποία επιδράσαμε με λεπτίνη και αυτών που δεν επιδράσαμε. Επιπλέον η χρήση siRNA έναντι της λεπτίνης δεν είχε καμία επίδραση στην παραγωγή των ανωτέρω κυτταροκινών από τα HepG2.

Καθώς οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) έχουν συνδεθεί με την προαγωγή της διεισδυτικότητας και εξάπλωσης των όγκων, εξετάσαμε στη συνέχεια την επιρροή της λεπτίνης στην παραγωγή των MMP-1, -9 και -13 από τα HepG2 κύτταρα, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής. Διαπιστώσαμε ότι η λεπτίνη μείωσε τα επίπεδα της πρωτεΐνης της MMP-1, ενώ αντίθετα προκάλεσε αύξηση των MMP-13 και MMP-9, με τρόπο δόσο-(50, 200 ng/ml) και χρόνο-(48 ώρες και 2 μήνες) εξαρτημένο (Student's t-test, $p < 0.001$) (διάγραμμα 18Γ). Η αποσιώπηση της λεπτίνης με siRNA αντιθέτως είχε ως αποτέλεσμα μια στατιστικώς σημαντική αύξηση της MMP-1 και αντίστοιχα μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων των MMP-9 και -13 (Student's t-test, $p < 0.001$) (διάγραμμα 18Γ).

Συνοπτικά, με αυτό τον κύκλο πειραμάτων αναδείξαμε την πολυδιάστατη δράση της λεπτίνης απευθείας επί της hTERT μέσω της κινητοποίησης του μοριακού μονοπατιού JAK/STAT3, του δικτύου Myc/Max/Mad και της ακετυλιωμένης ιστόνης H3 και της αλληλεπίδρασης τους με τον υποκινητή της. Παράλληλα επιχειρήσαμε να τεκμηριώσουμε το τελικό αποτέλεσμα των ανωτέρω μοριακών διεργασιών που εκπορεύονται από την αύξηση της λεπτίνης στο μικροπεριβάλλον του ήπατος, που δεν είναι άλλο από την αύξηση της βιωσιμότητας του ηπατικού κυττάρου. Τέλος μετά την συμβολή της λεπτίνης στην ογκογένεση στον ηπατικό ιστό την οποία προσπαθήσαμε να καταδείξουμε, επεκτείναμε την υπόθεση εργασίας μας συμπεριλαμβάνοντας τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και τις μεταλλοπρωτεϊνάσες στους στόχους της εντός του ηπατικού κυττάρου. Πρόκειται για παράγοντες δια μέσω των οποίων η λεπτίνη συμβάλλει τόσο στην ανάπτυξη όσο και

στην εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων.



Διάγραμμα 18. Η λεπτίνη ρυθμίζει την παραγωγή των φλεγμονωδών κυταροκινών και των MMPs στα HepG2 κύτταρα. (Α, Β) Επίδραση της λεπτίνης (200 ng/ml για 24, 48, 72 ώρες) στην παραγωγή IL-6 και TGF-β1. (Γ) Επίδραση της λεπτίνης (50, 200 ng/ml για 48 ώρες και 100 ng/ml για 2 μήνες) και του siRNA έναντι της λεπτίνης στα επίπεδα των MMP-1, -9 και -13. Τα ραβδογράμματα παρουσιάζουν τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα που αξιολογήθηκαν εις τριπλούν το καθένα. Οι αστερίσκοι (*) επισημαίνουν τα επίπεδα στατιστικής σημασίας ($p < 0.05$) των διαφορών των

συνθηκών από την συνθήκη ελέγχου (για τα πειράματα με siRNA η σύγκριση έγινε με το Scr control).

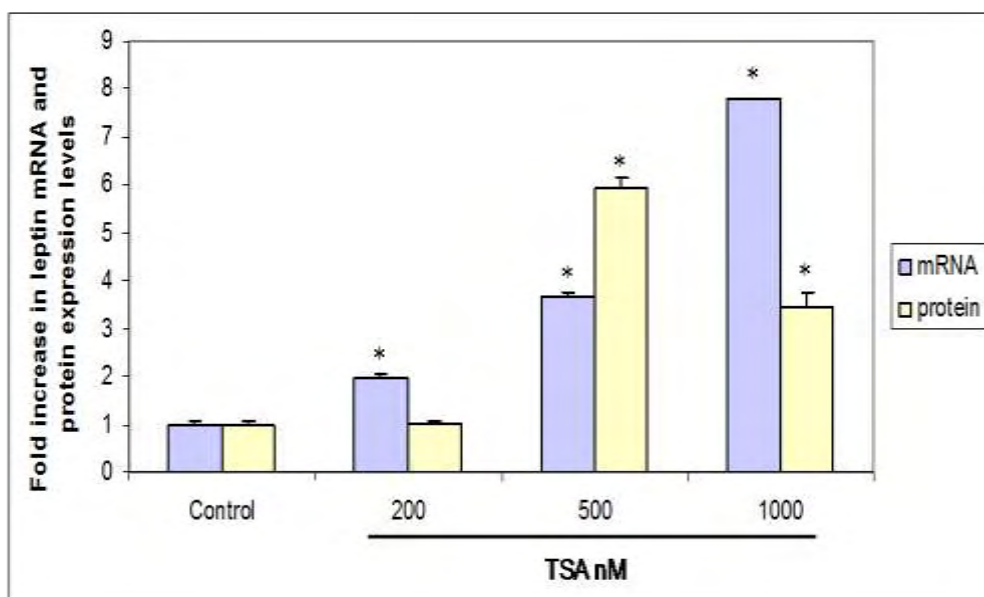
2.2.Δ Διερεύνηση των μηχανισμών ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της λεπτίνης σε HepG2 κύτταρα

2.2.Δ.1 Μελέτη της ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης της λεπτίνης στα HCC κύτταρα από την ακετυλιωμένη H3 ιστόνη

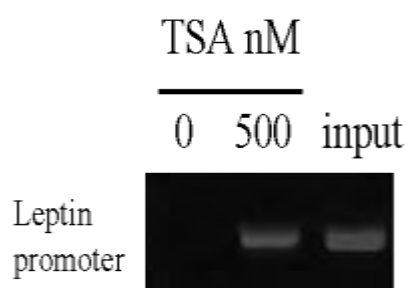
Η αποακετυλίωση των ιστονών αποτελεί έναν από τους κύριους επιγενετικούς μηχανισμούς ρύθμισης των γονιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Έτσι, μετά από ένα κύκλο πειραμάτων που μας βοήθησαν να διακρίνουμε τους μοριακούς μηχανισμούς που επάγονται ή αναστέλλονται από την λεπτίνη στο ηπατοκαρκινικό κύτταρο, στη συνέχεια επιδιώξαμε να αποσαφηνίσουμε αν η έκφραση της λεπτίνης ελέγχεται από την πρόσδεση της ακετυλιωμένης H3 ιστόνης στο δικό της υποκινητή. Σε αυτό μας το εγχείρημα χρησιμοποιήθηκε η τριχοστατίνη A (TSA), ένας αναστολέας της αποακετυλίωσης των ιστονών.

Η επεξεργασία των HepG2 με την TSA (200, 500, 1000 nM) αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της λεπτίνης με ένα δόσοεξαρτημένο πρότυπο (~2, ~3.5, ~8 φορές αύξηση της έκφρασης του mRNA, αντίστοιχα). Τα επίπεδα πρωτεΐνης της λεπτίνης επίσης αυξήθηκαν υπό την επίδραση της TSA αλλά όχι με τον ίδιο δόσοεξαρτημένο τρόπο (διάγραμμα 19A). Επειδή η TSA δεν επιδρά στοχευμένα μόνο στην H3 ιστόνη που σχετίζεται με τον υποκινητή της λεπτίνης προχωρήσαμε και σε ChIP ώστε να πιστοποιήσουμε την επίδρασή της ειδικότερα στα επίπεδα της ακετυλιωμένης H3 που προσδένονται σε αυτόν. Βρέθηκε έτσι, πως ενώ πριν τη χορήγηση TSA στα HepG2 η πρόσδεση της ακετυλιωμένης H3 στον υποκινητή της λεπτίνης ήταν μηδενική, μετά την προσθήκη της TSA (500 nM) παρατηρήθηκε ισχυρό σήμα των ανοσοκατακρημνισμάτων της (διάγραμμα 19B).

A



B



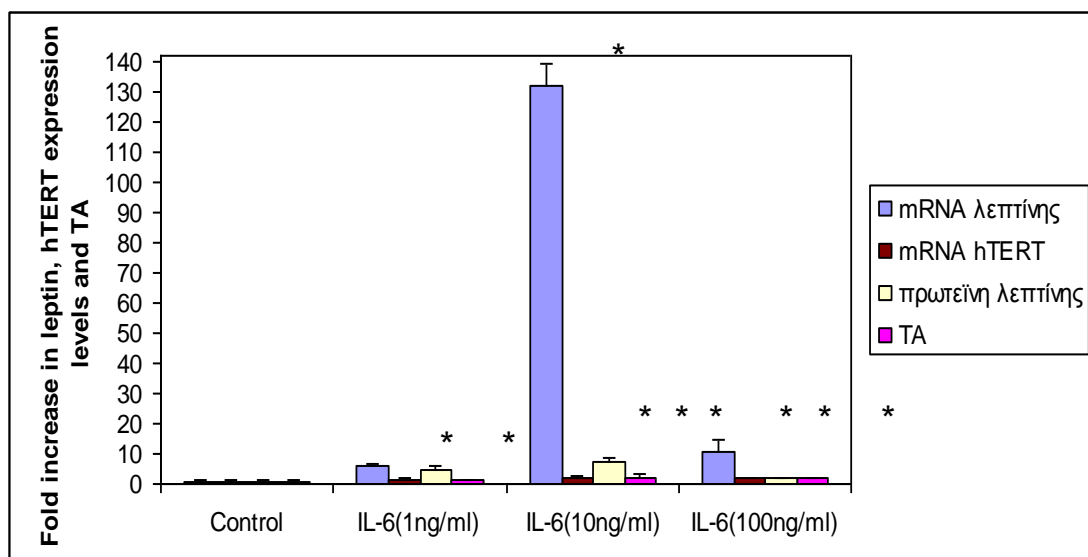
Διάγραμμα 19. Η ακετυλίωση της ιστόνης H3 ρυθμίζει την έκφραση της λεπτίνης στα HepG2 κύτταρα. (A) Επίδραση με TSA (200, 500, 1000 nM) στα HepG2 κύτταρα για 24 ώρες αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του mRNA και της πρωτεΐνης της λεπτίνης στο υπερκείμενο. Τα ραβδογράμματα παρουσιάζουν τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα που αξιολογήθηκαν εις τριπλούν το καθένα. Οι αστερίσκοι (*) επισημαίνουν τα επίπεδα στατιστικής σημασίας ($p < 0.001$) των διαφορών των συνθηκών από την συνθήκη ελέγχου (control). (B) Μετά την επίδραση με TSA παρουσιάστηκε πρόσδεση της ακετυλιωμένης H3 στον υποκινητή της λεπτίνης, Input: ολικό γενωμικό DNA που χρησιμοποιήθηκε ως control για την PCR.

2.2.Δ.2 Μελέτη της ρύθμισης των επιπέδων έκφρασης της λεπτίνης στα HCC κύτταρα από την IL-6

Το ΗΚΚ είναι γνωστό ότι συνδέεται με τη χρόνια φλεγμονή του ήπατος και η IL-6 είναι μια τυπική προφλεγμονώδης κυτταροκίνη που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις οξείας φάσης, καθώς και στη χρόνια ηπατίτιδα. Το γεγονός ότι η IL-6 προάγει πιθανά την ογκογόνο διαδικασία στο μικροπεριβάλλον του ήπατος όσο και σε άλλους ιστούς μας ώθησε στο να εξετάσουμε αν πρόκειται ή όχι για έναν από τους χημικούς διεγέρτες της τοπικής παραγωγής λεπτίνης στο ήπαρ (265, 266). Η IL-6 έχει ήδη συνδεθεί με τη διέγερση παραγωγής λεπτίνης σε άλλους τύπους ιστών (266).

Χορηγήθηκε IL-6 σε HepG2 κύτταρα για 48 ώρες σε συγκεντρώσεις 1, 10, 100 ng/ml και στη συνέχεια έγινε ποσοτικοποίηση τόσο στα επίπεδα mRNA όσο και στα επίπεδα της πρωτεΐνης της λεπτίνης με την τεχνική της ELISA στο υπερκείμενο των καλλιιεργειών από HepG2 κύτταρα. Βρέθηκε ότι η IL-6 προκαλεί αύξηση στην παραγωγή της λεπτίνης με συγκέντρωση μέγιστης επίδρασης αυτή των 10 ng/ml (Student's t-test, $p < 0.001$) (διάγραμμα 20A). Συνακόλουθα με τα ανωτέρω ευρήματα η IL-6 προκάλεσε με το ίδιο πρότυπο αύξηση και στην έκφραση του mRNA της hTERT, καθώς και στην ενεργότητα της τελομεράσης (Student's t-test, $p < 0.05$) (διάγραμμα 20B).

Στη συνέχεια έγινε έλεγχος με ChIP για την πιθανή αλλαγή του προτύπου σύνδεσης των STAT3 και H3 στον υποκινητή της λεπτίνης και έδειξε ότι τόσο στα HepG2 κύτταρα χωρίς επίδραση όσο και σε αυτά που χορηγήθηκε IL-6, η πρόσδεση του STAT3 και της H3 στον υποκινητή της λεπτίνης υπήρξε μηδενική. Συνεπώς η όποια επίδραση της IL-6 στην έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης στα HepG2, προφανώς δεν διαμεσολαβείται από τον STAT3 και την H3.



Διάγραμμα 20. Επίδραση της IL-6 στα επίπεδα έκφρασης της λεπτίνης (mRNA

και πρωτεΐνης) και της hTERT (mRNA και TA) στα HepG2 κύτταρα. Τα ραβδογράμματα παρουσιάζουν τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση από τρία ανεξάρτητα πειράματα που αξιολογήθηκαν εις τριπλούν το καθένα. Οι αστερίσκοι (*) επισημαίνουν τα επίπεδα στατιστικής σημασίας ($p < 0.001$ για τη λεπτίνη και $p < 0.05$ για την hTERT) των διαφορών των συνθηκών από την συνθήκη ελέγχου (control).

2.3 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά την ανακάλυψή της το 1994 από τον Zhang και τους συνεργάτες του, η λεπτίνη, το πρωτεϊνικό προϊόν του ob γονιδίου, συσχετίστηκε αποκλειστικά με τη ρύθμιση του μεταβολισμού και του ενεργειακού ισοζυγίου του οργανισμού, πράγμα που προδίδει και η ετυμολογία του όρου (6). Με την πάροδο όμως των ετών και ενώ το ενδιαφέρον για αυτή έβαινε αυξανόμενο πλήθος μελετών της απέδωσαν, πλην του ρόλου της ως ορμόνη, χαρακτήρα κυτταροκίνης που ενέχεται σε ένα μεγάλο αριθμό δράσεων που χαρακτηρίζουν τις κυτταροκίνες που επάγουν τη φλεγμονή και διαμεσολαβούν τις ανοσολογικές αποκρίσεις (85, 129). Στην συνέχεια εφόσον η παχυσαρκία φαίνεται να αποτελεί, χωρίς εμπεριστατωμένη αιτιολόγηση πάντα, κατάσταση που συνδέεται με διάφορες μορφές καρκίνου οι επιστημονικές μελέτες διερεύνησαν και ανέδειξαν την υψηλή συσχέτιση της λεπτίνης με τους καρκινογενετικούς μηχανισμούς σε διάφορα όργανα όπως ο μαστός, το παχύ έντερο, ο προστάτης, το ενδομήτριο, η ωοθήκη, το ήπαρ κ.α (106, 212).

Οι ανωτέρω βιβλιογραφικές ενδείξεις για τον πολυσχιδή ρόλο της λεπτίνης μας ώθησαν στην αναζήτηση στοιχείων που πιστοποιούν τον ανοσορυθμιστικό και καρκινογενετικό ρόλο της στις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες και την αποσαφήνιση των μοριακών εκείνων μηχανισμών που διεκπεραιώνουν τις δράσεις της στο ήπαρ. Κομβικό σημείο της παρούσας έρευνας αποτέλεσε η στοιχειοθέτηση της καταλυτικής υπομονάδας του ενζύμου της τελομεράσης (hTERT) ως στόχου της λεπτίνης στον ηπατικό ιστό.

Ο πολυδιάστατος χαρακτήρας της λεπτίνης αποδεικνύεται, εκτός των άλλων, από το γεγονός ότι οι υποδοχείς της λεπτίνης εκφράζονται σε μια πληθώρα ιστών του ανθρωπίνου σώματος όπως ο εγκέφαλος, το ήπαρ, το πάγκρεας, ο πνεύμονας, οι σκελετικοί μύες, η καρδιά, τα αιμοποιητικά κύτταρα και τα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος (PBMCs: λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, κύτταρα φυσικοί φονείς) (45). Στην παρούσα μελέτη διερευνήσαμε, χρησιμοποιώντας την ποσοτική σε πραγματικό χρόνο PCR, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των OB-RI και OB-Rs ισομορφών του υποδοχέα της λεπτίνης στα PBMCs ασθενών με HBV, HCV λοίμωξη και μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατίτιδα (αυτοάνοση – αλκοολική), με κύριο στόχο τον έλεγχο του πιθανού ανοσορυθμιστικού ρόλου του συστήματος της λεπτίνης στις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες.

Ειδικότερα παρατηρήσαμε, για πρώτη φορά, σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των OB-RI και OB-Rs στους ασθενείς με HBV και HCV λοίμωξη συγκριτικά με τους υγιείς και τους ασθενείς με μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθεια. Η κυτταρομετρική ανάλυση που πραγματοποιήσαμε επιβεβαίωσε τα ευρήματά μας

αυτά και σε πρωτεϊνικό επίπεδο, αποκαλύπτοντας ένα πρότυπο υψηλής έκφρασης των υποδοχέων της λεπτίνης στην ομάδα με τους μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπαθείς τόσο σε σχέση με τους υγιείς όσο και με τους ασθενείς με HBV, HCV λοίμωξη. Η παρατηρούμενη αυτή μείωση της επιφανειακής πρωτεΐνης του OB-R στα δείγματα των ασθενών με HBV, HCV λοίμωξη θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει μια επαγόμενη από τους ιούς μοριακή δυσλειτουργία ή αυξημένη ευαισθησία στις διαδικασίες απόπτωσης των PBMCs, που ως τελικό αποτέλεσμα θα έχει την μείωση ή την πλήρη καταστολή της μετάφρασης (267-269).

Έχει προταθεί ότι η λεπτίνη, δρώντας μέσω του υποδοχέα της OB-R, ενεργοποιεί στα PBMCs τα μοριακά μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν οι παράγοντες JAK-STAT, PI3K και MAPK και διεγείρει την παραγωγή κυταροκινών από τα μονοκύτταρα και μακροφάγα, τον πολλαπλασιασμό των T – κυττάρων που δεν έχουν έρθει σε επαφή με αντιγόνα, τις TH-1 ανοσολογικές αποκρίσεις, την κυταροτοξικότητα των NK-κυττάρων, τις αντιαποπτωτικές δράσεις των T-κυττάρων και τέλος την αναστολή των TH-2 ανοσολογικών αποκρίσεων (129, 177). Φαίνεται επίσης ότι η λεπτίνη προάγει την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και μακροφάγων κυττάρων και διεγείρει την έκκριση από αυτά προφλεγμονωδών παραγόντων όπως τα λευκοτριένια, η κυκλοοξυγενάση-2 (COX-2) και το οξείδιο του αζώτου (NO) (171, 172). Προτείνεται επιπλέον για τη λεπτίνη μια ευρεία ρυθμιστική δράση της επί των NK-κυττάρων και ειδικότερα σε σχέση με τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, την ενεργοποίηση και την κυταροτοξικότητά τους (175). Στον αντίποδα όλων αυτών έχει παρατηρηθεί ότι ποντικοί με ανεπάρκεια στη λεπτίνη (ob/ob) ή στον υποδοχέα της λεπτίνης (db/db) παρουσιάζουν ένα σύνθετο σύνδρομο που περιλαμβάνει αναπαραγωγική δυσλειτουργία, ορμονικές διαταραχές, ανοσολογική απορρύθμιση και μειωμένα επίπεδα περιφερικών B και T λεμφοκυττάρων (164-166, 182). Στον άνθρωπο η ανεπάρκεια της λεπτίνης που οφείλεται σε μετάλλαξη του ob γονιδίου μπορεί να προκαλέσει ανοσολογικές διαταραχές που εκφράζονται με μειωμένες TH-1 και αυξημένες TH-2 ανοσοαποκρίσεις (270). Αντίθετα χορήγηση λεπτίνης σε περιφερικά κύτταρα ασθενών με κοινή πολλαπλή ανοσοανεπάρκεια προκάλεσε αύξηση του πολλαπλασιασμού τους και κατέστειλε τις διαδικασίες απόπτωσης (271).

Βάση των ανωτέρω, τα ευρήματά μας προτείνουν τη συμμετοχή των OB-R, OB-Rs στην ανοσολογική δυσλειτουργία που παρατηρείται στους ασθενείς με χρόνιες HBV, HCV λοιμώξεις, αφού μειωμένη έκφραση των υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια των περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος αφαιρεί από τη λεπτίνη την δυνατότητα διέγερσης των PBMCs, μειώνει τον αριθμό των ανοσολογικών κυττάρων και πιθανά αυξάνει το κλάσμα των ανοσοκυττάρων που περιέρχονται σε φάση απόπτωσης. Τα αποτελέσματά μας παρέχουν ένα

ικανοποιητικό μοντέλο καταστολής του ανοσολογικού συστήματος προερχόμενης από τους ηπατοτρόπους ιούς (HBV, HCV) το οποίο συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που αναφέρουν απευθείας από τα αντιγόνα των ιών HBV, HCV επαγωγή της απόπτωσης στα PBMCs και συνεπώς μειωμένες ανοσολογικές αποκρίσεις (267, 268). Εναλλακτικά μια πρόσφατη μελέτη της επιστημονικής ομάδας του εργαστηρίου μας έχει προτείνει τα μειωμένα ποσοστά έκφρασης της hTERT στα PBMCs ως αιτία της ανοσοκαταστολής που παρατηρείται στους ασθενείς με HBV, HCV λοιμώξεις (272).

Ένα ακόμα εύρημα του πρώτου κύκλου της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η θετική συσχέτιση στην έκφραση μεταξύ του OB-RI και OB-Rs (ο OB-Rs εκφράζεται σταθερά σε περίπου διπλάσιο ποσό σε σχέση με τον OB-RI) στο σύνολο των δειγμάτων της μελέτης που αφορούσε στα PBMCs. Πρόκειται για ένα στοιχείο που αναδεικνύει ένα σταθερό και παράλληλο πρότυπο έκφρασης των δύο υποδοχέων και πιθανά αποτελεί ένδειξη ότι ο λιγότερο λειτουργικός OB-Rs ευοδώνει τη δράση του λειτουργικού OB-RI ή ρυθμίζει τα επίπεδα της κυκλοφορούσας στον ορό λεπτίνης ή συμβάλλει στη μεταφορά της λεπτίνης σε ενδοκυτάρια διαμερίσματα (45, 273). Βασιζόμενοι στο τελευταίο αυτό σενάριο πιθανολογούμε ότι η παρατηρούμενη μείωση της λεπτίνης του ορού στους ασθενείς με HBV και HCV λοιμώξεις θα μπορούσε να οδηγήσει και σε μείωση της έκφρασης του OB-Rs στα PBMCs μέσω ενός μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης. Η υψηλή θετική συσχέτιση του OB-Rs με την ηλικία στο σύνολο των δειγμάτων μας κατευθύνει υπέρ της ισχυρής εξάρτησης που μπορεί να υπάρχει μεταξύ της ικανότητας ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού και της ηλικίας. Πρόσφατα άλλωστε προτάθηκε η σχετιζόμενη με την ηλικία λειτουργικότητα του υποδοχέα της λεπτίνης με κομβικό ρόλο σε αυτή τη διατύπωση αυτόν της Tyr 985 (274).

Η αρνητική συσχέτιση του OB-Rs με τα επίπεδα ασπαρτικής αμινοτρανσφεράσης στην ομάδα με HBV λοίμωξη και η θετική συσχέτιση του OB-RI με τα επίπεδα AST στην ομάδα με αυτοάνοση ηπατίτιδα συνάδουν με την προηγούμενη διατύπωσή μας περί ευθέως ανάλογης σχέσης των επιπέδων έκφρασης των υποδοχέων της λεπτίνης στα PBMCs και του επιπέδου ανοσολογικής εγρήγορσης που χαρακτηρίζει τις ανωτέρω νοσολογικές οντότητες κατά την εξέλιξή τους.

Τέλος η έκφραση του mRNA των υποδοχέων της λεπτίνης δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με το BMI, το φύλο, τη διάρκεια της ασθένειας ή τα ιικά φορτία των HBV και HCV. Η ακριβέστερη αξιολόγηση, ερμηνεία της συσχέτισης ή μη της έκφρασης των υποδοχέων της λεπτίνης με τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών απαιτεί ίσως μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων ανά κατηγορία.

Επίσης, ανιχνεύσαμε έκφραση του mRNA της λεπτίνης στα PBMCs μικρού αριθμού δειγμάτων (8.8%) από την ομάδα με HCV λοίμωξη και μεγάλου αριθμού από τα δείγματα των ασθενών με μη ιογενείς ηπατοπάθειες (76%). Η αύξηση αυτή της έκφρασης της λεπτίνης συνδυαζόμενη με την αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων της, σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, στους ασθενείς με μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθειες υποστηρίζει την ύπαρξη ενός μηχανισμού αυτοκρινούς ανατροφοδότησης που εκπορεύεται από τη λεπτίνη στα PBMCs. Αυτός ο μηχανισμός εξηγεί επίσης και την ανοσοδιέγερση, απόρροια της οποίας είναι η ηπατική κυτταροτοξικότητα, που παρατηρείται στην αυτοάνοση και αλκοολική ηπατίτιδα (275). Επίσης η αυξημένη έκκριση λεπτίνης από τα PBMCs των ασθενών με αλκοολική και αυτοάνοση ηπατίτιδα μπορεί να αποτελεί εν μέρει αιτία και των αυξημένων ποσών της λεπτίνης ορού που παρατηρείται στους ασθενείς αυτούς. Ομοίως, σε άλλη μία εργασία αναφέρθηκε έκφραση της λεπτίνης σε ενεργοποιημένα TH-1 λεμφοκύτταρα κατά τη διάρκεια πειραμάτων σε πειραματόζωα με πολλαπλή σκλήρυνση στα οποία προκλήθηκε αυτοάνοση εγκεφαλομυελίτιδα (183).

Σε ό,τι αφορά στα επίπεδα της λεπτίνης του ορού των ασθενών με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα στη διεθνή βιβλιογραφία. Τα ευρήματα της παρούσας διατριβής συμφωνούν με αυτά των Testa και Greco που υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα της λεπτίνης του ορού των ασθενών με ιογενείς ηπατίτιδες (B και C) ή ηπατική κίρρωση είναι χαμηλότερα σε σχέση με αυτά των υγιών (276, 277). Αντίθετα πλήθος άλλων εργασιών υποστηρίζουν ακριβώς το αντίθετο, ότι δηλαδή η λεπτίνη παρουσιάζεται αυξημένη στον ορό των ασθενών με ηπατίτιδα B και C σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (189, 204, 205). Επιχειρώντας να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματά μας οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι η μείωση της έκκρισης της λεπτίνης από το λιπώδη ιστό αποτελεί μέρος ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης που επιχειρεί να απαντήσει στο αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο που χαρακτηρίζει την πορεία των χρόνιων ιογενών ηπατοπαθειών. Παρόλα αυτά η θετική συσχέτιση της λεπτίνης του ορού και του BMI σε συνδυασμό με τα υψηλότερα επίπεδα λεπτίνης που παρατηρήθηκαν στα θήλεα άτομα σε σχέση με τα άρρενα, σε όλες τις υποκατηγορίες ασθενών, υποστηρίζουν ότι η κύρια δεξαμενή που τροφοδοτεί την κυκλοφορία με λεπτίνη είναι τα αποθέματα λίπους στον οργανισμό.

Με την πάροδο των ετών καθίσταται σαφές ότι η μόλυνση από τους HBV, HCV χαρακτηρίζεται από μια πολύπλοκη παθοφυσιολογία που εκφράζεται, εκτός των άλλων, από δυσλειτουργία των ανοσολογικών κυττάρων και ανοσοκαταστολή που επάγουν με τη σειρά τους τη χρονιότητα, επιταχύνουν τις ηπατικές βλάβες και αυξάνουν τη θνητότητα. Ο πρώτος αυτός κύκλος των πειραμάτων μας ισχυροποιεί την υπόθεση ότι το σύστημα της λεπτίνης ενέχεται πιθανά ως ρυθμιστής του

ανοσολογικού συστήματος στις ανοσοπαθολογικές διαδικασίες εγκαθίδρυσης της χρονιότητας μετά τη λοίμωξη από τους HBV και HCV (268, 278).

Αποδεδειγμένα η χρόνια ηπατίτιδα μετά από HBV και HCV λοίμωξη, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ και οι αφλατοξίνες αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου (279). Υπάρχει όμως ένα ποσοστό 5%-30% ασθενών με ΗΚΚ στους οποίους δεν διακρίνεται ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου. Η πλειοψηφία των περιπτώσεων του «κρυπτογενούς» ΗΚΚ στις Ηνωμένες Πολιτείες έχει αποδοθεί στο μη αλκοολικής αιτιολογίας ήπαρ (NAFLD) το οποίο αποτελεί την ηπατική έκφραση του μεταβολικού συνδρόμου (280).

Η NAFLD είναι μια νοσολογική οντότητα στην εξέλιξη της οποίας φαίνεται να συμμετέχει ενεργά το σύστημα της λεπτίνης εδραιώνοντας την αντίσταση στην ινσουλίνη και προωθώντας τη στεάτωση (69, 279). Επιπλέον ο προφλεγμονώδης χαρακτήρας της λεπτίνης θεωρείται πως συμβάλλει αποφασιστικά στη μετάπτωση του λιπώδους ήπατος σε στεατοηπατίτιδα (NASH) και ίνωση (189). Σε αυτή τη διαδικασία η λεπτίνη, τοπικώς ή κεντρικώς παραγόμενη, φαίνεται να έχει κομβικό ρόλο, ιδιαίτερα μέσω της μιτογόνου δράσης της επί των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων και της αναστολής της απόπτωσής τους (194). Η φαγοκυττάρωση αποπτωτικών κυττάρων του ήπατος από τα αστεροειδή κύτταρα φαίνεται να είναι ένας μηχανισμός που ευοδώνει τις διαδικασίες ίνωσης και προάγεται από την παρουσία της λεπτίνης (195, 196). Γενικότερα η λεπτίνη φέρεται να επιδρά ποικιλοτρόπως στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό τους, αυξάνοντας την έκφραση του προκολλαγόνου τύπου-1, την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών από αυτά, την ενεργοποίηση της οξειδάσης του NADPH και την παραγωγή του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) (188). Πολύ πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι η λεπτίνη προάγει τον μυοϊνοβλαστικό φαινότυπο στα ηπατικά αστεροειδή κύτταρα (HSCs) ενεργοποιώντας το hedgehog μοριακό μονοπάτι, ενώ ταυτόχρονα αναστέλλει τη δράση του PPAR γ (peroxisome proliferators-activated receptors: υποδοχέας υπεροξεισωματίων ενεργοποιούμενος από «πολλαπλασιαστές»), γνωστού παράγοντα που αντιμάχεται την ενεργοποίηση των αστεροειδών κυττάρων (281, 282).

Πέραν των αστεροειδών κυττάρων σημαντικό συστατικό στους μηχανισμούς φλεγμονής και ίνωσης που κινητοποιούνται από τη λεπτίνη στο ήπαρ φαίνεται να αποτελούν και τα κύτταρα Kupffer, πιθανά μέσω της παραγωγής του TGF- β 1 (200). Ο TGF- β 1 άλλωστε, όπως έχει αποδειχθεί παρουσιάζει υψηλή συσχέτιση με την έκφραση του OB-Rb και την πρόοδο της ίνωσης στο ήπαρ ασθενών με NASH (201). Επίσης η έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης σε

κολποειδικά κύτταρα ήπατος αρουραίων ενισχύει την άποψη πως η δράση της στο ήπαρ μπορεί να έχει και παρακρινή ή αυτοκρινή χαρακτήρα λόγω της τοπικής παραγωγής της (202). Ο διευρυμένος φλεγμονώδης ρόλος της λεπτίνης στον ηπατικό ιστό πιστοποιείται επίσης με πειράματα σε ποντίκια με ανεπάρκεια λεπτίνης (ob/ob) τα οποία παρουσιάζουν μειωμένα ποσοστά ηπατίτιδας επαγόμενης με κονκαβαλίνη-A (ConA), μειωμένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών, αυξημένα επίπεδα IL-10 και μειωμένους αριθμούς ηπατικών NK κυττάρων (164, 173).

Επειδή οι χρόνιες ηπατοπάθειες προσφέρουν ένα περιβάλλον μιτογόνο αλλά και μεταλλαξιγόνο, το οποίο είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει και να διαφοροποιήσει το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στο ηπατοκύτταρο αποφασίσαμε να υπερσκελίσουμε την κεντρικώς παραγόμενη λεπτίνη και να εστιάσουμε στην τοπική έκφρασή της στο μικροπεριβάλλον του ήπατος. Παρατηρήσαμε, για πρώτη φορά, ότι τόσο η παραγωγή της λεπτίνης όσο και η έκφραση των υποδοχέων της (OB-R1, OB-Rs) έβαιναν αυξανόμενες κατά τη μετάπτωση από το υγιές ήπαρ αρχικά σε φλεγμαίνον, υπό το καθεστώς χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας, και τελικά σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Τα ανωτέρω ευρήματα συνηγορούν υπέρ του ρόλου του συστήματος της λεπτίνης στην παθοφυσιολογία που χαρακτηρίζει την επιδείνωση της λειτουργικότητας του ήπατος κατά την εξέλιξη των χρόνιων ιογενών ηπατοπαθειών σε ΗΚΚ. Φαίνεται ότι η λεπτίνη όχι μόνο ευνοεί τις διαδικασίες ίνωσης και φλεγμονής, αλλά συμβάλλει αποφασιστικά στην εγκαθίδρυση ενός μεταλλαξιγόνου περιβάλλοντος στο ήπαρ ασθενών με HBV και HCV λοίμωξη.

Στην ίδια κατεύθυνση, πρόσφατα, υψηλά επίπεδα έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της συσχετίστηκαν με τον αυξημένο βαθμό αγγειογένεσης στο ΗΚΚ (236). Σε άλλη έρευνα διαπιστώθηκε ότι η νεοαγγειογένεση που προάγεται από τη λεπτίνη σε ασθενείς με μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα έχει σημαντικό ρόλο στη μετάπτωσή της σε ΗΚΚ (235). Υπήρξαν επίσης μελέτες που προσπάθησαν να τεκμηριώσουν τη σχέση σε μοριακό επίπεδο του συστήματος της λεπτίνης με την καρκινογένεση στο ήπαρ και την εξέλιξη της νόσου. Ειδικότερα διαπιστώθηκε ότι η λεπτίνη προάγει τη διεισδυτικότητα και το μεταστατικό δυναμικό των ηπατοκαρκινικών κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης των JAK/STAT, PI3/AKT και ERK μοριακών μονοπατιών (236, 237). Επίσης η λεπτίνη βρέθηκε να προάγει τον πολλαπλασιασμό και να αναστέλλει την απόπτωση στα ηπατοκαρκινικά κύτταρα δια της ενεργοποίησης της κυκλίνης D1 και της μείωσης της έκφρασης του αποπτωτικού γονιδίου BAX (238). Εκτός της δράσης της λεπτίνης, ο υποδοχέας αυτής πιθανά έχει προγνωστική αξία στο ΗΚΚ, όπως υποστήριξαν ο Wang και οι συνεργάτες του (239).

Ένα πλήθος επιδημιολογικών ερευνών έχουν αναδείξει την υψηλή συσχέτιση της παχυσαρκίας με ένα μεγάλο αριθμό νοσολογικών οντοτήτων μεταξύ των οποίων είναι και ο καρκίνος. Η παχυσαρκία έχει προταθεί ως σημαντικός παράγοντας κινδύνου τόσο για το κίρρωτικό όσο και για το μη κίρρωτικό ΗΚΚ, το οποίο αποτελεί την τρίτη αιτία από καρκίνο παγκόσμια (228-233). Εκτός αυτών μελέτες *in vivo* και *in vitro* έδειξαν ότι η παχυσαρκία και τα υψηλά επίπεδα λεπτίνης που τη συνοδεύουν έχουν σε ποικίλο βαθμό συσχέτιση και με άλλες μορφές καρκίνου όπως του παχέως εντέρου, του προστάτη, του ενδομητρίου, της ωοθήκης, του παγκρέατος και των πνευμόνων (222-227). Το γεγονός όμως ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της σε ηπατικό ιστό από ΗΚΚ δε διαπιστώσαμε να συσχετίζονται με το BMI των ασθενών, μας οδήγησε στην υπόθεση ότι η παραγωγή λεπτίνης στο ήπαρ αυτών των ασθενών δε ρυθμίζεται απευθείας από τα αποθέματα λίπους του οργανισμού, αλλά αντικατοπτρίζει και καθορίζεται από τις μοριακές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο ογκογενετικό μικροπεριβάλλον του ήπατος. Μπορεί, λοιπόν, η κυκλοφορούσα λεπτίνη, το ποσό της οποίας καθορίζεται από το BMI, να ευοδώνει τη φλεγμονώδη διήθηση και ίνωση του ήπατος κατά τις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες, αλλά κομβικό σημείο που προάγει τη μεταλλαξιγόνο διαδικασία και καθορίζει την εδραίωση του ΗΚΚ φαίνεται να είναι η τοπική παραγωγή λεπτίνης στο ηπατοκύτταρο.

Στον άνθρωπο η γένεση του ΗΚΚ είναι αποτέλεσμα μιας πολυπαραγοντικής διαδικασίας που περιλαμβάνει γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα σε πληθώρα γονιδίων στα ηπατοκύτταρα (283). Μεταξύ των παραπάνω γονιδίων είναι και το γονίδιο που κωδικοποιεί τη σύνθεση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT), το οποίο μάλιστα είναι το μόνο εξ αυτών που παρουσιάζει μηδενική έκφραση στα φυσιολογικά ηπατοκύτταρα (N244). Επανενεργοποίηση της τελομεράσης έχει αναφερθεί σε διάφορες περιπτώσεις ηπατοπαθειών. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι 5%-30% των ηπατικών ιστών από ασθενείς με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες εμφανίζουν χαμηλή αλλά σημαντική δραστικότητα της τελομεράσης καθώς και έκφραση της καταλυτικής υπομονάδας hTERT (253-255). Δραστικότητα της τελομεράσης και έκφραση του γονιδίου της hTERT έχει παρατηρηθεί στο 90% περίπου των βιοψιών ασθενών με ΗΚΚ (254, 255).

Η έκφραση της hTERT στον ηπατικό ιστό μπορεί να οφείλεται στα λεμφοκύτταρα, τα αναγεννώμενα ηπατοκύτταρα ή ακόμα και μικρομεταστάσεις με ΗΚΚ. Όταν το ήπαρ μολύνεται από τους HBV και HCV τα ηπατοκύτταρα υφίστανται φλεγμονή και έντονη τάση αναγέννησης. Για την αναγέννηση των κυττάρων επάγεται η έκφραση της hTERT και η δραστικότητα της τελομεράσης με στόχο τα

ηπατοκύτταρα να προστατέψουν τη χρωμοσωμική σταθερότητά τους (284). Η επανενεργοποίηση της τελομεράσης επιτρέπει στο ηπατοκύτταρο απεριόριστο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων, ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό και φαίνεται να είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που οδηγούν στην ανάπτυξη του ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Επιπλέον η σημαντική συσχέτιση της έκφρασης του mRNA της hTERT με τη δραστικότητα της τελομεράσης στους ασθενείς με ΗΚΚ ενισχύει την άποψη ότι η καταλυτική υπομονάδα της τελομεράσης αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα ρύθμισης της δραστικότητας του ολοενζύμου, αντίθετα από την RNA υπομονάδα της τελομεράσης (hTR) η οποία εκφράζεται ανεξάρτητα από τη δραστικότητα του ολοενζύμου.

Ο ρόλος της τελομεράσης στις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες και στη μετεξέλιξή τους σε κακοήθεια, καθώς και η διαφαινόμενη θέση του συστήματος της λεπτίνης στη φλεγμονή του ήπατος και το ΗΚΚ, μας ώθησαν στην αναζήτηση της πιθανής συσχέτισης μεταξύ τους σε μοριακό επίπεδο, όπως και του μηχανισμού αλληλεπίδρασης τους εντός του ηπατικού παρεγχύματος. Σε αυτή την κατεύθυνση ενδιαφέρον εύρημά μας υπήρξε η υψηλή συσχέτιση της λεπτίνης, για πρώτη φορά, τόσο με την hTERT όσο και με την δραστικότητα της τελομεράσης μόνο στα δείγματα ηπατικού ιστού με ΗΚΚ (285). Επιπλέον, διαπιστώσαμε ότι η λεπτίνη ήταν ικανή για απευθείας θετική επίδραση στην έκφραση του mRNA της hTERT και τη δραστικότητα της τελομεράσης στα HepG2 κύτταρα (285). Το γεγονός όμως ότι η αποσιώπηση του γονιδίου της λεπτίνης με τη χρήση siRNA δεν είχε αρνητική επίδραση στην έκφραση της hTERT και στην TA μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως το βασικό επίπεδο έκφρασης της hTERT δεν έχει ως κύριο ρυθμιστή το σύστημα της λεπτίνης σε αυτό το είδος κυττάρων. Σε πλήρη συμφωνία με τα ανωτέρω ευρήματα υπήρξε και η μελέτη του Ren και των συνεργατών του, οι οποίοι υπέδειξαν την hTERT ως γονίδιο στόχο της λεπτίνης σε MCF-7 κύτταρα, ενισχύοντας το ρόλο της ως ογκογενετικού παράγοντα (240). Η αρχική μας διαπίστωση ότι η λεπτίνη αποτελεί ρυθμιστή της έκφρασης της hTERT και στον ηπατικό ιστό, μας ώθησε στο να εμβαθύνουμε σε ό,τι αφορά στο μοριακό μηχανισμό ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος που κινητοποιείται από τη λεπτίνη και ενεργοποιεί ή αναστέλλει τη γονιδιακή έκφραση της hTERT. Γενικά έχουν αναφερθεί πολλοί μηχανισμοί σε υποκυτταρικό επίπεδο που εμπλέκονται στη ρύθμιση της hTERT. Ο υποκινητής της hTERT περιέχει πληθώρα περιοχών πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες μεταξύ των οποίων είναι διάφοροι ενεργοποιητές, όπως οι c-myc, Sp1 και STAT3 και καταστολείς, όπως οι mad1 και p53 που καθορίζουν την έκφρασή της σε μεταγραφικό επίπεδο (286).

Οι μεταβιβαστές σήματος και ενεργοποιητές της μεταγραφής (STATs) ανήκουν σε μια οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων που άγουν τη μοριακή σηματοδότηση απευθείας από την κυτταρική μεμβράνη στον πυρήνα του κυττάρου. Μετά τη διέγερση από αυξητικούς παράγοντες και κυταροκίνες οι STATs φωσφορυλιώνονται από διάφορες κινάσες και στη συνέχεια μεταφέρονται στον πυρήνα όπου και ρυθμίζουν τη μεταγραφή πολλών γονιδίων στόχων (287). Από τα επτά γονίδια που υπάρχουν για τους STATs το γονίδιο για τον STAT3 φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με τις καρκινογενετικές διαδικασίες σε διάφορους κυτταρικούς τύπους (263). Σε προηγούμενες εργασίες έχειδειχθεί ότι ο STAT3 δύναται να ρυθμίσει γονίδια που σχετίζονται με την προαγωγή της ανάπτυξης όπως η κυκλίνη D και το c-myc, γονίδια που προάγουν την αγγειογένεση και τέλος γονίδια που σχετίζονται με τη διεισδυτικότητα των όγκων όπως το LIV-1 (μεταφορέας ψευδαργύρου) (263). Πρόκειται για ένα μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση πολλών νεοπλασμάτων προωθώντας την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση, διεγείροντας την αγγειογένεση και εξασθενίζοντας τις ανοσολογικές αποκρίσεις που ελέγχουν τις διαδικασίες επιτήρησης των όγκων (288).

Η Konnikova και οι συνεργάτες της το 2005, διαπίστωσαν ότι ο STAT3 μπορεί να ρυθμίσει τα επίπεδα έκφρασης της hTERT σε μια πληθώρα κυτταρικών σειρών (A172, 487, AGS, H527, MDA-4355, HASMC), ενώ σε μια κυτταρική σειρά αστροκυττώματος, που ο STAT3 έχει αποδεδειγμένα ενεργό ρόλο, παρατήρησαν πως η αναστολή της έκφρασης της hTERT με siRNA προώθησε τις αποπτωτικές διαδικασίες (263). Τα ευρήματα αυτά φανερώνουν πως η STAT3 ελεγχόμενη επιβίωση των καρκινικών κυττάρων μάλλον επισυμβαίνει δια της επίδρασής του στο γονίδιο της hTERT. Εκτός των ανωτέρω ο Ren έδειξε πως ο STAT3 που ενεργοποιείται από την πρόσδεση της λεπτίνης στο υποδοχέα της σε MCF-7 κύτταρα καταλήγει να προσδένεται στον υποκινητή της hTERT και να διεγείρει έτσι την έκφρασή της (240). Πληθώρα in vitro μελετών ανέδειξαν τη λεπτίνη ως μιτογόνο παράγοντα για καρκινικά κύτταρα μαστού δια της επίδρασής της στον STAT3 (219-221).

Ο Basu και οι συνεργάτες του το 2006, εμπλέκοντας τον HCV, έδειξαν ότι η πυρηνική του πρωτεΐνη προκαλεί αύξηση των επιπέδων STAT3 στα προσβεβλημένα ηπατοκύτταρα όπως και στον υποδοχέα της λεπτίνης (289). Σε πιο πρόσφατη μελέτη αποδόθηκε στην επαγόμενη από την ενεργοποίηση του υποδοχέα της λεπτίνης αύξηση του STAT3 καθοριστικός ρόλος κατά την εξέλιξη της ηπατικής φλεγμονής σε επίμυες (290).

Συνυπολογίζοντας τα ανωτέρω βιβλιογραφικά στοιχεία, εφαρμόσαμε της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης ώστε να ερευνήσουμε το κατά πόσο η λεπτίνη ευοδώνει την πρόσδεση του STAT3 στον υποκινητή της hTERT και στα HepG2 κύτταρα. Βρήκαμε ότι η χορήγηση λεπτίνης, βραχυπρόθεσμα (48 ώρες) ή μακροχρόνια (2 μήνες), αυξάνει την πρόσδεση του STAT3 σε δύο θέσεις του υποκινητή της hTERT. Αυτό μας το εύρημα αποσαφηνίζει, για πρώτη φορά σε ηπατοκαρκινικά κύτταρα, ότι ο άξονας λεπτίνη-υποδοχέας λεπτίνης-STAT3-hTERT έχει ρόλο στις διαδικασίες εγκαθίδρυσης και εδραίωσης της καρκινικής μεταλλαγής στο ηπατοκύτταρο. Το γεγονός ότι το πρότυπο επιρροής της λεπτίνης στην hTERT που προαναφέρθηκε διατηρήθηκε και μετά τη χορήγησή της για 2 μήνες μας οδηγεί στην υπόθεση ότι ο άξονας αυτός λειτουργεί χωρίς να υπόκειται σε μηχανισμούς αρνητικής ανατροφοδότησης.

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον και οι ισχυρές ενδείξεις για το σημαντικό ρόλο διάφορων γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης της hTERT στα κύτταρα, μας οδήγησαν σε πιο ενδελεχή έλεγχο και αξιολόγηση του βαθμού πρόσδεσης των Myc, Max, Mad και της ακετυλιωμένης H3 ιστόνης στον υποκινητή της hTERT μετά τη χορήγηση λεπτίνης (264). Ένας αριθμός από ενδιαφέρουσες μελέτες αναφέρουν ότι το δίκτυο Myc/Max/Mad αποτελεί ένα μοριακό διακόπτη που αλληλεπιδρά με τον υποκινητή του γονιδίου της hTERT είτε για να ενεργοποιήσει τους μηχανισμούς μεταγραφής (Myc/Max) είτε για να μπλοκάρει την παραγωγή του mRNA της hTERT (Max/Mad) (264, 291). Ο Ηλιόπουλος και οι συνεργάτες του έδειξαν πως το c-myc αυξάνεται, εκτός των άλλων τύπων καρκίνου, και στο ΗΚΚ και προσδένεται σε E-box περιοχές του υποκινητή του hTERT γονιδίου ενεργοποιώντας την έκφρασή του (292). Για να έχει όμως το ογκογονίδιο c-myc πρόσβαση σε αυτές τις περιοχές του hTERT γονιδίου θα πρέπει οι διάφοροι επιγενετικοί μηχανισμοί ρύθμισης της μεταγραφής να επιτρέπουν στη χρωματίνη να διατηρεί ανοιχτό πρότυπο στερεοδομής. Κάτι τέτοιο παρατηρείται μόνο όταν στα ηπατοκαρκινικά κύτταρα υπάρχει καθεστώς χαμηλού βαθμού μεθυλίωσης του DNA και οι ιστόνες είναι ακετυλιωμένες.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή δείξαμε για πρώτη φορά υψηλή συσχέτιση της μετάπτωσης από το Mad1/Max πρότυπο πρόσδεσης σε Myc/Max πρότυπο με την ενεργοποίηση της μεταγραφής του hTERT γονιδίου μετά τη χορήγηση λεπτίνης στα HepG2 κύτταρα. Επιπλέον μετά από μακροχρόνια χορήγηση λεπτίνης για διάστημα 2 μηνών διαπιστώσαμε ακόμα μεγαλύτερα επίπεδα πρόσδεσης του Myc/Max συμπλόκου στον υποκινητή του hTERT, τα οποία αυτή τη φορά συνοδεύονταν από αύξηση της ακετυλίωσης της ιστόνης H3. Εφόσον όμως η μακροχρόνια χορήγηση λεπτίνης δεν πέτυχε να αυξήσει τα επίπεδα mRNA της

hTERT ούτε την TA υποθέτουμε ότι η λεπτίνωξη εξαρτημένη υπερέκφραση της hTERT βρίσκεται υπό ένα διαρκή έλεγχο από διάφορους μετα-μεταγραφικούς μοριακούς ρυθμιστές. Καταλήξαμε επίσης στο συμπέρασμα ότι η αλληλουχία δράσης των διάφορων μεταγραφικών παραγόντων και επιγενετικών μηχανισμών έχει ισχυρή εξάρτηση από το χρόνο δράσης της λεπτίνης στο ηπατοκύτταρο.

Έχει βρεθεί ότι η λεπτίνη μπορεί να προάγει τον πολλαπλασιασμό και να αναστέλλει την απόπτωση στα ηπατοκαρκινικά κύτταρα δια της ενεργοποίησης της κυκλίνης D1 και της μείωσης της έκφρασης του αποπτωτικού γονιδίου BAX (238). Καθώς η λεπτίνωξη εξαρτημένη υπερέκφραση της hTERT μπορεί να οδηγήσει σε ογκογόνο ανάπτυξη και απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ερευνήσαμε στη συνέχεια την επίδραση της λεπτίνης στον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των HepG2 κυττάρων. Λεπτομερέστερα, η λεπτίνη διέγειρε την ανάπτυξη των HepG2 κυττάρων σύμφωνα με ένα χρόνο- και δόσο-εξαρτημένο πρότυπο. Παρατηρήσαμε ότι όσο αυξάνεται η δόση της λεπτίνης και ο χρόνος επίδρασης της στα HepG2 τόσο αυξάνεται, σε στατιστικώς σημαντικά επίπεδα, και ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός τους. Επιπλέον η συμβολή της λεπτίνης στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την βιωσιμότητα των κυττάρων αναδεικνύεται από το γεγονός της αναστολής του ρυθμού πολλαπλασιασμού των HepG2 μετά την αποσιώπηση του mRNA της με τη χρήση siRNA. Τα δύο αυτά πειράματα αποδεικνύουν ότι το τελικό αποτέλεσμα των διάφορων μοριακών διεργασιών που εκπορεύονται από τη λεπτίνη στο μικροπεριβάλλον του ήπατος δεν είναι άλλο από την αύξηση της βιωσιμότητας και τον πολλαπλασιασμό του ηπατοκαρκινικού κυττάρου.

Για να πολλαπλασιαστεί ένα κύτταρο, πέραν των θρεπτικών ουσιών, απαιτούνται και κάποια χημικά διεγερτικά σήματα τα οποία χρησιμοποιούνται για να αρθούν οι εγγενείς περιορισμοί της αύξησης του κυττάρου και της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Αφού διαπιστώσαμε το ρόλο της λεπτίνης ως χημικού διεγέρτη επί των HepG2 στον προηγούμενο κύκλο πειραμάτων, προχωρήσαμε σε πιο ενδελεχή αναζήτηση της επιρροής της στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου, οι οποίες φυσιολογικά ελέγχονται από διάφορα <<μοριακά φρένα>>. Η συμβολή της λεπτίνης λοιπόν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μεταφράστηκε εδώ σε αύξηση του αριθμού των HepG2 κυττάρων που βρίσκονται στη φάση αντιγραφής του DNA (S) και τις φάσεις μίτωσης και κυτταροκίνησης (G2/M), μετά τη χορήγηση της. Αντίθετα, η αποσιώπηση της λεπτίνης με τη χρήση siRNA οδήγησε σε μείωση των φάσεων S, G2/M και αύξηση της φάσης ηρεμίας ή απόσυρσης από τον κυτταρικό κύκλο (Go/G1), σε σχέση με τα κύτταρα των καλλιιεργειών ελέγχου (χωρίς επίδραση).

Το ΗΚΚ είναι μια κατάσταση που συνήθως εγκαθίσταται με την πάροδο του χρόνου σε ένα χρονίως φλεγμαίνον ήπαρ εξαιτίας ιογενούς λοίμωξης, μεταβολικού

νοσήματος, τοξικότητας χημικών ουσιών ή αυτοάνοσων αντιδράσεων (293). Η ηπατική κίρρωση επίσης η οποία αποτελεί μια προνεοπλασματική κατάσταση θεωρείται ότι αποτελεί συνέπεια επίμονης ηπατικής βλάβης και χρόνιας φλεγμονής. Τα τελευταία χρόνια ισχυροποιούνται συνεχώς οι ενδείξεις ότι η φλεγμονή αποτελεί σημαντική προϋπόθεση για την έναρξη, εγκατάσταση και πρόοδο των όγκων στο ήπαρ. Ο πιθανός ρόλος των φλεγμονωδών κυτταροκινών στην ανάπτυξη και εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων μας οδήγησε στη μελέτη της επίδρασης της λεπτίνης στην παραγωγή IL-1, IL-6 και TGF- β 1 από τα ανθρώπινα ηπατοκαρκινικά κύτταρα (HepG2).

Η IL-6 είναι μια τυπική προφλεγμονώδης κυτταροκίνη η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στις ανοσοαποκρίσεις οξείας φάσης και τη χρόνια ηπατίτιδα (294). Δευτερευόντως η IL-6 διαμεσολαβεί σημαντικές λειτουργίες για τον πολλαπλασιασμό των ηπατοκυττάρων που είναι καίριες για την μετάπτωση σε ΗΚΚ. Κατά την εγκατάσταση του ΗΚΚ διάφορα ανοσοκύτταρα διεισδύουν στο ογκογενετικό μικροπεριβάλλον του ήπατος όπου και ενεργοποιούν κύτταρα όπως τα κύτταρα Kupffer (265). Πρωτεϊνικοί παράγοντες όπως ο MyD88 και ο μεταγραφικός παράγοντας NF- κ B προκαλούν την έκκριση IL-6 από τα κύτταρα Kupffer. Η ανωτέρω διαπλοκή αλληλεπιδράσεων υποβοηθάται από την έκκριση της IL-1 β από τα αποπτωτικά ηπατοκύτταρα (294). Η IL-6 ενέχεται και στην πρόοδο και διάφορων άλλων μορφών καρκίνου όπως το πολλαπλό μυέλωμα, ο καρκίνος του προστάτη και ο καρκίνος των ωοθηκών (294). Ειδικότερα στον καρκίνο των ωοθηκών η IL-6 μαζί με τη λεπτίνη προτείνεται πως αποτελούν πρώιμους δείκτες της μεταβολικής δυσλειτουργίας που χαρακτηρίζει την πρόοδο της νόσου (295). Επιπλέον η παραγωγή της IL-6 φαίνεται να διεγείρεται μετά τη χορήγηση λεπτίνης σε προνεοπλασματικά κύτταρα επιθηλίου παχέως εντέρου (296). Τέλος ο Mantovanni και οι συνεργάτες του προτείνουν την κυκλοφορούσα IL-6 ως αξιόπιστο καρκινικό δείκτη για το ΗΚΚ (297).

Σε αυτό τον κύκλο πειραμάτων βρέθηκε ότι η χορήγηση λεπτίνης σε HepG2 κύτταρα αύξησε την παραγωγή της IL-6 και κατέστειλε την παραγωγή του TGF- β 1 με ένα χρόνο- και δόσο-εξαρτημένο πρότυπο, ενώ αντίθετα δεν επηρέασε καθόλου τις IL-1 α και IL-1 β . Προτείνεται έτσι μια επιπλέον εναλλακτική οδός επιρροής της λεπτίνης επί της hTERT που δεν περιλαμβάνει την διαμεσολάβηση του OB-R και του JAK/STAT3 μοριακού μονοπατιού, αλλά της IL-6 και του μοριακού μονοπατιού PI3K/AKT (298). Είναι εμφανές ότι η καταστολή της παραγωγής του TGF- β 1, ενός γνωστού αρνητικού ρυθμιστή της έκφρασης της hTERT, από τη λεπτίνη μας παρέχει ένα ακόμα στοιχείο για την κατανόηση της δράσης της λεπτίνης στο ΗΚΚ και μια

ακόμα απόδειξη της ισχύος του άξονα λεπτίνη- hTERT κατά την ογκογενετική διαδικασία στο ήπαρ (299).

Οι μοριακοί μηχανισμοί που καθορίζουν την κλινική συμπεριφορά του ηπατοκυτταρικού καρκίνου είναι ακόμα ελάχιστα κατανοητοί. Οι γνώσεις μας για την παθογένεια της εξέλιξης και μετάστασης του ΗΚΚ θα μας βοηθήσουν να εκτιμήσουμε ακριβέστερα την πρόγνωση και να πάρουμε ορθότερες αποφάσεις για τη θεραπεία των πασχόντων.

Το ΗΚΚ είναι γνωστό πως έχει την τάση να εισβάλλει ταχέως στην πυλαία φλέβα και λιγότερο συχνά στην κοινή ηπατική φλέβα και την κάτω κοίλη φλέβα (300). Η διεισδυτικότητα του όγκου δια της βασικής μεμβράνης και του εξωκυττάριου υλικού (στρώμα) αποτελεί κομβικό σημείο για πιθανές μεταστάσεις και προϋποθέτει τη συμμετοχή πρωτεολυτικών ενζύμων γνωστών ως μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs). Οι MMPs είναι μια ομάδα ενδοπεπτιδασών που εξαρτώνται από τον ψευδάργυρο και έχουν πολλές δομικές ομοιότητες. Ανάλογα με τον τύπο του εξωκυττάριου συνδετικού ιστού που καταβολίζουν διακρίνονται σε κολλαγονάσες (MMP-1, -2, -9, -13), ζελατινάσες (MMP-2, -3, -9), στρομελυσίνες (MMP-3, -10, -11) και ματριλυσίνη (MMP-7).

Ο Gao και οι συνεργάτες του ανέδειξαν την υψηλή συσχέτιση της έκφρασης των μεταλλοπρωτεϊνών και των αναστολέων τους (TIMPs) με την πρόοδο και το μεταστατικό δυναμικό του ΗΚΚ (301). Μια άλλη ερευνητική ομάδα εξέτασε τα επίπεδα έκφρασης διάφορων MMPs και TIMPs σε οχτώ διαφορετικές καρκινικές σειρές ηπατοκυτταρικού καρκίνου. Οι MMPs με τα υψηλότερα ποσοστά έκφρασης ήταν οι MMP-1, -2, -3, -13, -14, -15. Ειδικότερα στα HepG2 κύτταρα διέκριναν ένα βασικό επίπεδο έκφρασης για την MMP-1 και μηδενική έκφραση για τις MMP-9, -13 (300). Σε άλλη μελέτη υποδείχτηκαν οι MMP-2 και -9 ως οι μεταλλοπρωτεϊνάσες που σε υψηλότερα ποσά εκφράζονται σε χειρουργικά εξαιρεθείσες περιοχές με ΗΚΚ (302). Επίσης η υπερέκφραση της MMP-9 από διάφορους τύπους ηπατικών κυττάρων, καρκινικών και μη, συνδέθηκε με την μόλυνση από τον HBV, έναν ηπατοτρόπο ιό που σχετίζεται άρρηκτα με το ΗΚΚ (303). Πολλές MMPs είναι σχεδόν απύσες σε υγιείς, εν «ηρεμία», ιστούς αν και η απορρύθμιση των κυτταρικών συστημάτων τις αναδεικνύει τελικά σε κύρια συστατικά των διεργασιών που εξελίσσονται σε συστήματα όπως το κίρρωτικό ήπαρ ή το ΗΚΚ (304).

Έως τώρα δεν υπήρξε συσχέτιση του συστήματος της λεπτίνης και των MMPs σε κάποιο καρκινικό μοντέλο. Παρόλα αυτά υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές ιδιαίτερα σε χονδροκύτταρα που αποδίδουν στη λεπτίνη ρόλο ρυθμιστή της έκφρασης των MMP-9 και MMP-13 (305). Ο Cao και οι συνεργάτες του ισχυρίζονται ότι η λεπτίνη καταστέλλει την MMP-1 στα ανθρώπινα ηπατικά

αστεροειδή κύτταρα δια των μοριακών μονοπατιών JAK/STAT, ERK1/2 και p38 (306). Στην παρούσα διατριβή εξετάσαμε την επιρροή της λεπτίνης στην παραγωγή των MMP-1, -9, -13 από τα HepG2 κύτταρα, χρησιμοποιώντας την τεχνολογία της κυτταρομετρίας ροής. Παρατηρήσαμε ότι η λεπτίνη ήταν ικανή να καταστείλει την έκφραση της MMP-1 και να διεγείρει περαιτέρω την έκφραση των MMP-9 και -13, ενώ η χρήση siRNA για την λεπτίνη είχε ακριβώς τα αντίθετα αποτελέσματα, πράγμα που την καθιστά ρυθμιστή της δημιουργίας ενός μικροπεριβάλλοντος που ευνοεί τη δειξίωση και μετάσταση του ΗΚΚ στο κίρρωτικό ήπαρ.

Η αποακετυλίωση και η ακετυλίωση των ιστονών οι οποίες ακολουθούνται από αλλαγή της στερεοδομής της χρωματίνης αποτελούν μηχανισμούς επιγενετικής ρύθμισης της έκφρασης των γονιδίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα (292, 307). Η ακετυλίωση των ιστονών καθιστά το νουκλεοσωμικό DNA πιο δεκτικό στην επίδραση μεταγραφικών παραγόντων και άλλων ρυθμιστικών μορίων (307). Οι εναλλαγές αυτές ακετυλίωσης-αποακετυλίωσης επισυμβαίνουν πολύ γρήγορα στο κύτταρο (ο χρόνος ημιζωής των ακετυλιωμένων στις λυσίνες ιστονών είναι 10 λεπτά) και ελέγχονται από ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών και αποακετυλάσες (308). Έτσι, μετά από ένα κύκλο πειραμάτων που μας βοήθησαν να διακρίνουμε τους μοριακούς μηχανισμούς που επάγονται ή αναστέλλονται από την λεπτίνη στο ηπατοκαρκινικό κύτταρο, στη συνέχεια επιδιώξαμε να αποσαφηνίσουμε αν η έκφραση της λεπτίνης ελέγχεται από την πρόσδεση της ακετυλιωμένης H3 ιστόνης στο δικό της υποκινητή. Σε αυτό μας το εγχείρημα μας βοήθησε η τριχοστατίνη A (TSA), ένας αναστολέας της αποακετυλίωσης των ιστονών.

Η επίδραση της TSA στα HepG2 κύτταρα αύξησε τα επίπεδα έκφρασης του mRNA της λεπτίνης με ένα δόσοεξαρτημένο πρότυπο. Τα επίπεδα της πρωτεΐνης της λεπτίνης επίσης αυξήθηκαν υπό την επίδραση της TSA αλλά όχι με τον ίδιο δόσοεξαρτημένο τρόπο. Επειδή η TSA δεν επιδρά στοχευμένα μόνο στην H3 ιστόνη που σχετίζεται με τον υποκινητή της λεπτίνης προχωρήσαμε και σε ChIP ώστε να πιστοποιήσουμε την επίδρασή της ειδικότερα στα επίπεδα της ακετυλιωμένης H3 που προσδένονται σε αυτόν. Βρέθηκε έτσι, ότι ενώ πριν τη χορήγηση TSA στα HepG2 η πρόσδεση της ακετυλιωμένης H3 στον υποκινητή της λεπτίνης ήταν μηδενική, μετά την προσθήκη της TSA παρατηρήθηκε ισχυρό σήμα των ανοσοκατακρημνισμάτων της.

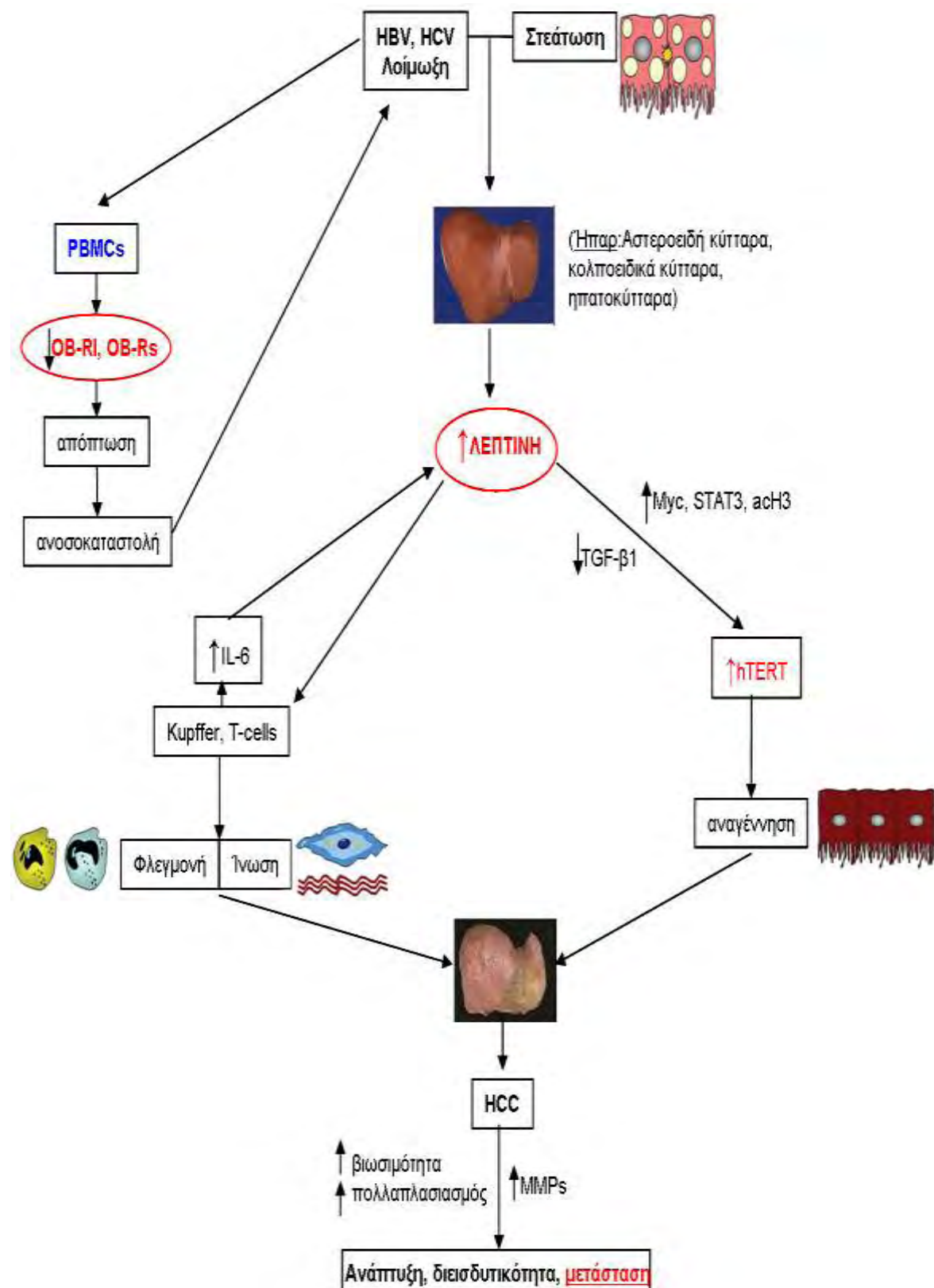
Τα ανωτέρω ευρήματα ανάγουν, για πρώτη φορά, την ακετυλιωμένη H3 ιστόνη σε κύριο ρυθμιστή της έκφρασης της λεπτίνης στο ηπατοκαρκινικό κύτταρο και προσφέρουν μια ερμηνεία των ευρημάτων μας περί αυξημένης έκφρασης της λεπτίνης σε δείγματα ΗΚΚ σε αντίθεση με την απουσία της σε υγιή ηπατικό ιστό. Το μεγάλο ειδικό βάρος αυτής της διαπίστωσης έγκειται στο ότι η ακετυλίωση των

ιστονών είναι ένα αντιστρεπτό γεγονός πράγμα που σημαίνει πως θα μπορούσε να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο για το μέλλον. Παρατηρήσαμε επίσης πως η χρήση της TSA επηρέασε με διαφορετικό τρόπο την έκφραση του mRNA της λεπτίνης σε σχέση με την πρωτεΐνη της . Αυτό αποδεικνύει ότι το κεντρικό δόγμα για τη μετάπτωση DNA-RNA-πρωτεΐνη υφίσταται συνεχή υποκυτταρικό έλεγχο σε πολλά επίπεδα ώστε να ρυθμιστεί το τελικό ποσό των πρωτεϊνών στο κύτταρο.

Επιχειρήσαμε στη συνέχεια να διακρίνουμε μια ακόμα από τις αιτίες της αύξησης της λεπτίνης στο ηπατοκαρκινικό κύτταρο και της διατήρησης των υψηλών επιπέδων της σε αυτό κατά την ογκογόνο διαδικασία. Είναι άλλωστε γνωστό ότι υπάρχει μια αμφίδρομη σχέση και επίδραση μεταξύ των μοριακών και ορμονικών ρυθμιστών που πυροδοτούν την αλληλουχία γεγονότων που οδηγούν στην ογκογένεση. Έχουμε ήδη δείξει ότι η λεπτίνη προάγει την παραγωγή IL-6 στα HepG2 κύτταρα, μιας τυπικής προφλεγμονώδους κυτταροκίνης που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις αντιδράσεις οξείας φάσης, καθώς και στη χρόνια ηπατίτιδα. Το γεγονός ότι η IL-6 προάγει πιθανά την ογκογόνο διαδικασία στο μικροπεριβάλλον του ήπατος όσο και σε άλλους ιστούς μας ώθησε στο να εξετάσουμε αν πρόκειται ή όχι για έναν από τους χημικούς διεγέρτες της τοπικής παραγωγής λεπτίνης στο ήπαρ (265). Η IL-6 έχει ήδη συνδεθεί με τη διέγερση παραγωγής λεπτίνης σε άλλους τύπους ιστών (266).

Χορηγήθηκε IL-6 σε HepG2 κύτταρα για 48 ώρες και στη συνέχεια έγινε ποσοτικοποίηση τόσο στα επίπεδα mRNA όσο και στα επίπεδα της πρωτεΐνης της λεπτίνης. Βρέθηκε ότι η IL-6 προκαλεί αύξηση στην παραγωγή της λεπτίνης και με το ίδιο πρότυπο αύξηση και στην έκφραση του mRNA της hTERT, καθώς και στην ενεργότητα της τελομεράσης. Καθίσταται σαφής έτσι ο διαδραστικός χαρακτήρας της σχέσης μεταξύ λεπτίνης και IL-6 στο ογκογόνο μικροπεριβάλλον του ήπατος με τελική κατάληξη την ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης.

Έλεγχος με ανοσοκατακρήμνιση της χρωματίνης (ChIP) για την πιθανή αλλαγή του προτύπου σύνδεσης των STAT3 και H3 στον υποκινητή της λεπτίνης έδειξε πως τόσο στα HepG2 κύτταρα χωρίς επίδραση όσο και σε αυτά που χορηγήθηκε IL-6, η πρόσδεση του STAT3 και της H3 στον υποκινητή της λεπτίνης υπήρξε μηδενική. Συνεπώς η όποια επίδραση της IL-6 στην έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης στα HepG2, προφανώς δεν διαμεσολαβείται από τον STAT3 και την H3.



Διάγραμμα 21. Διαγραμματική απόδοση των μηχανισμών που κινητοποιεί το σύστημα της λεπτίνης με τελικό αποτέλεσμα την καρκινογένεση στο ήπαρ.

Συμπερασματικά, όπως συνοπτικά αποδίδεται στο διάγραμμα 21, η λοίμωξη από τους ηπατοτρόπους ιούς HBV και HCV οδηγεί σε μείωση της έκφρασης των υποδοχέων της λεπτίνης στα PBMCs αναχαιτίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη δράση της, εδραιώνοντας ένα αυξημένο κλάσμα αποπτωτικών κυττάρων και ευνοώντας ένα καθεστώς ανοσοκαταστολής. Η ανοσοκαταστολή που παρατηρείται στις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες δημιουργεί πρόσφορο έδαφος για την επίδραση των HBV και HCV στο όργανο στόχο που είναι το ήπαρ. Μία από τις συνέπειες της επίμονης επίδρασης των HBV και HCV στο ήπαρ είναι η παραγωγή της λεπτίνης και η αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων της, γεγονότα που όπως τεκμηριώθηκε ανωτέρω προάγουν, δια της IL-6 και της υπερέκφρασης της hTERT, τη χρόνια φλεγμονή, την ίνωση και αναγέννηση του ηπατικού ιστού. Η επανενεργοποίηση ογκογενετικών γονιδίων, όπως η hTERT, και η συντήρηση της φλεγμονής επί μακρών καθιστούν το μικροπεριβάλλον του ήπατος ιδανικό για τις διαδικασίες μετάλλαξης και καρκινογένεσης.

Η παραπάνω διατυπωθείσα πρόταση μας, υποστηρίζει την hTERT ως γονίδιο στόχο για τη λεπτίνη στα ηπατοκαρκινικά κύτταρα και ισχυροποιεί περαιτέρω τον κομβικό ρόλο του συστήματος της λεπτίνης στην μακρόχρονη και πολυσχιδή διαδικασία της ογκογένεσης στο ήπαρ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κατά την ανακάλυψή της το 1994 από τον Zhang και τους συνεργάτες του, η λεπτίνη, το πρωτεϊνικό προϊόν του ob γονιδίου, συσχετίστηκε αποκλειστικά με τη ρύθμιση του μεταβολισμού και του ενεργειακού ισοζυγίου του οργανισμού, πράγμα που προδίδει και η ετυμολογία του όρου. Πέραν της κεντρικής δράσης της όμως, με την πάροδο των ετών αποδείχτηκε πως έχει ένα ευρύτατο φάσμα ρυθμιστικών ρόλων με πολλούς ιστούς αποδέκτες μιας και έχει διαπιστωθεί η συμμετοχή της στην ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση, στην ενεργοποίηση του συμπαθητικού συστήματος, στην οξειδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στους σκελετικούς μύες, στην ανάπτυξη και αναμόρφωση των οστών, στην αναπαραγωγή, στην αιμοποίηση, καθώς και στην ανοσολογική απόκριση και φλεγμονή.

Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική έρευνα έχει αναδείξει τον ανοσορρυθμιστικό ρόλο της λεπτίνης ως σημαντικό μηχανισμό που ενέχεται στις διαδικασίες ίνωσης του ήπατος, καθώς και της συντήρησης της χρόνιας φλεγμονής σε αυτό. Πέραν τούτου ισχυροποιείται η συσχέτιση που φαίνεται να έχει η παχυσαρκία και συνεπώς οι κυτταροκίνες του λιπώδους ιστού, μεταξύ αυτών και η λεπτίνη, με τους μηχανισμούς ογκογένεσης σε πολλούς ιστούς του ανθρώπινου σώματος, όπως ο μαστός, το παχύ έντερο, ο προστάτης, το ενδομήτριο, η ωοθήκη, το ήπαρ κ.α.

Οι ισχυρές βιβλιογραφικές ενδείξεις για τον πολυσχιδή ρόλο της λεπτίνης μας ώθησαν στην αναζήτηση στοιχείων που πιστοποιούν τον ανοσορρυθμιστικό και καρκινογενετικό ρόλο της στις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες και την αποσαφήνιση των μοριακών εκείνων μηχανισμών που διεκπεραιώνουν τις δράσεις της στο ήπαρ. Κομβικό σημείο της παρούσας έρευνας αποτέλεσε η στοιχειοθέτηση της καταλυτικής υπομονάδας του ενζύμου της τελομεράσης (hTERT) ως στόχου της λεπτίνης στον ηπατικό ιστό.

Ειδικότερα παρατηρήσαμε, σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης των OB-RI και OB-Rs στα περιφερικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος ασθενών με HBV και HCV λοίμωξη συγκριτικά με τους υγιείς και τους ασθενείς με μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθεια. Η παρατηρούμενη αυτή μείωση της επιφανειακής πρωτεΐνης του OB-R στα δείγματα των ασθενών με HBV, HCV λοίμωξη θα μπορούσε να αντικατοπτρίζει μια επαγόμενη από τους ιούς μοριακή δυσλειτουργία ή αυξημένη ευαισθησία στις διαδικασίες απόπτωσης των PBMCs, που ως τελικό αποτέλεσμα θα έχει την μείωση ή την πλήρη καταστολή της μετάφρασης. Προτείνουμε τη συμμετοχή των OB-RI, OB-Rs στην ανοσολογική δυσλειτουργία που παρατηρείται στους ασθενείς με χρόνιες HBV, HCV λοιμώξεις,

αφού μειωμένη έκφραση των υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια των περιφερικών μονοπύρηνων κυττάρων του αίματος αφαιρεί από τη λεπτίνη την δυνατότητα διέγερσης των PBMCs, μειώνει τον αριθμό των ανοσολογικών κυττάρων και πιθανά αυξάνει το κλάσμα των ανοσοκυττάρων που περιέρχονται σε φάση απόπτωσης.

Ένα ακόμα εύρημα του πρώτου κύκλου της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η θετική συσχέτιση στην έκφραση μεταξύ του OB-RI και OB-Rs (ο OB-Rs εκφράζεται σταθερά σε περίπου διπλάσιο ποσό σε σχέση με τον OB-RI) στο σύνολο των δειγμάτων της μελέτης που αφορούσε στα PBMCs. Πρόκειται για ένα στοιχείο που αναδεικνύει ένα σταθερό και παράλληλο πρότυπο έκφρασης των δύο υποδοχέων και πιθανά αποτελεί ένδειξη ότι ο λιγότερο λειτουργικός OB-Rs ευοδώνει τη δράση του λειτουργικού OB-RI ή ρυθμίζει τα επίπεδα της κυκλοφορούσας στον ορό λεπτίνης ή συμβάλλει στη μεταφορά της λεπτίνης σε ενδοκυττάρια διαμερίσματα. Η υψηλή θετική συσχέτιση του OB-Rs με την ηλικία στο σύνολο των δειγμάτων μας κατευθύνει υπέρ της ισχυρής εξάρτησης που μπορεί να υπάρχει μεταξύ της ικανότητας ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού και της ηλικίας.

Επίσης, ανιχνεύσαμε έκφραση του mRNA της λεπτίνης στα PBMCs μικρού αριθμού δειγμάτων από την ομάδα με HCV λοίμωξη και μεγάλου αριθμού από τα δείγματα των ασθενών με μη ιογενείς ηπατοπάθειες. Η αύξηση αυτή της έκφρασης της λεπτίνης συνδυαζόμενη με την αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων της, σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης, στους ασθενείς με μη ιογενούς αιτιολογίας ηπατοπάθειες υποστηρίζει την ύπαρξη ενός μηχανισμού αυτοκρινούς ανατροφοδότησης που εκπορεύεται από τη λεπτίνη στα PBMCs. Αυτός ο μηχανισμός εξηγεί επίσης και την ανοσοδιέγερση, απόρροια της οποίας είναι η ηπατική κυτταροτοξικότητα, που παρατηρείται στην αυτοάνοση και αλκοολική ηπατίτιδα.

Σε ό,τι αφορά στα επίπεδα της λεπτίνης του ορού των ασθενών με χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες υπάρχουν αντικρουόμενα ευρήματα στη διεθνή βιβλιογραφία. Τα ευρήματα της παρούσας διατριβής υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα της λεπτίνης του ορού των ασθενών με ιογενείς ηπατίτιδες (B και C) ή ηπατική κίρρωση είναι χαμηλότερα σε σχέση με αυτά των υγείων. Επιχειρώντας να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματά μας οδηγηθήκαμε στο συμπέρασμα ότι η μείωση της έκκρισης της λεπτίνης από το λιπώδη ιστό αποτελεί μέρος ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης που επιχειρεί να απαντήσει στο αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο που χαρακτηρίζει την πορεία των χρόνιων ιογενών ηπατοπαθειών.

Επειδή οι χρόνιες ηπατοπάθειες προσφέρουν ένα περιβάλλον μιτογόνο αλλά και μεταλλαξιγόνο, το οποίο είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει και να

διαφοροποιήσει το επίπεδο έκφρασης των γονιδίων στο ηπατοκύτταρο αποφασίσαμε να υπερσκελίσουμε την κεντρικώς παραγόμενη λεπτίνη και να εστιάσουμε στην τοπική έκφρασή της στο μικροπεριβάλλον του ήπατος. Παρατηρήσαμε ότι τόσο η παραγωγή της λεπτίνης όσο και η έκφραση των υποδοχέων της (OB-RI, OB-Rs) έβαιναν αυξανόμενες κατά τη μετάπτωση από το υγιές ήπαρ αρχικά σε φλεγμαίνον, υπό το καθεστώς χρόνιας ιογενούς ηπατίτιδας, και τελικά σε ηπατοκυτταρικό καρκίνο. Φαίνεται ότι η λεπτίνη όχι μόνο ευνοεί τις διαδικασίες ίνωσης και φλεγμονής, αλλά συμβάλλει αποφασιστικά στην εγκαθίδρυση ενός μεταλλαξιόνου περιβάλλοντος στο ήπαρ ασθενών με HBV και HCV λοίμωξη.

Το γεγονός όμως ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων της σε ηπατικό ιστό από ΗΚΚ δε διαπιστώσαμε να συσχετίζονται με το BMI των ασθενών, μας οδήγησε στην υπόθεση ότι η παραγωγή λεπτίνης στο ήπαρ αυτών των ασθενών δε ρυθμίζεται απευθείας από τα αποθέματα λίπους του οργανισμού, αλλά αντικατοπτρίζει και καθορίζεται από τις μοριακές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο ογκογενετικό μικροπεριβάλλον του ήπατος. Μπορεί, λοιπόν, η κυκλοφορούσα λεπτίνη, το ποσό της οποίας καθορίζεται από το BMI, να ευοδώνει τη φλεγμονώδη διήθηση και ίνωση του ήπατος κατά τις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες, αλλά κομβικό σημείο που προάγει τη μεταλλαξιγόνο διαδικασία και καθορίζει την εδραίωση του ΗΚΚ φαίνεται να είναι η τοπική παραγωγή λεπτίνης στο ηπατοκύτταρο.

Στον άνθρωπο η γένεση του ΗΚΚ είναι αποτέλεσμα μιας πολυπαραγοντικής διαδικασίας που περιλαμβάνει γενετικές και επιγενετικές τροποποιήσεις οι οποίες λαμβάνουν χώρα σε πληθώρα γονιδίων στα ηπατοκύτταρα. Μεταξύ των παραπάνω γονιδίων είναι και το γονίδιο που κωδικοποιεί τη σύνθεση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης (hTERT), το οποίο μάλιστα είναι το μόνο εξ αυτών που παρουσιάζει μηδενική έκφραση στα φυσιολογικά ηπατοκύτταρα. Ο ρόλος της τελομεράσης στις χρόνιες ιογενείς ηπατοπάθειες και στη μετεξέλιξή τους σε κακοήθεια, καθώς και η διαφαινόμενη θέση του συστήματος της λεπτίνης στη φλεγμονή του ήπατος και το ΗΚΚ, μας ώθησαν στην αναζήτηση της πιθανής συσχέτισης μεταξύ τους σε μοριακό επίπεδο, όπως και του μηχανισμού αλληλεπίδρασης τους εντός του ηπατικού παρεγχύματος. Σε αυτή την κατεύθυνση ενδιαφέρον εύρημά μας υπήρξε η υψηλή συσχέτιση της λεπτίνης τόσο με την hTERT όσο και με την δραστικότητα της τελομεράσης μόνο στα δείγματα ηπατικού ιστού με ΗΚΚ. Επιπλέον, διαπιστώσαμε ότι η λεπτίνη ήταν ικανή για απευθείας θετική επίδραση στην έκφραση του mRNA της hTERT και τη δραστικότητα της τελομεράσης στα HepG2 κύτταρα.

Η αρχική μας διαπίστωση ότι η λεπτίνη αποτελεί ρυθμιστή της έκφρασης της hTERT και στον ηπατικό ιστό, μας ώθησε στο να εμβαθύνουμε σε ό,τι αφορά στο μοριακό μηχανισμό ενδοκυττάριας μεταγωγής σήματος που κινητοποιείται από τη λεπτίνη και ενεργοποιεί ή αναστέλλει τη γονιδιακή έκφραση της hTERT. Ο υποκινητής της hTERT περιέχει πληθώρα περιοχών πρόσδεσης για μεταγραφικούς παράγοντες μεταξύ των οποίων είναι διάφοροι ενεργοποιητές, όπως οι c-myc, Sp1 και STAT3 και καταστολείς, όπως οι mad1 και p53 που καθορίζουν την έκφρασή της σε μεταγραφικό επίπεδο.

Συνυπολογίζοντας τα ανωτέρω, εφαρμόσαμε τη μέθοδο της ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης ώστε να ερευνήσουμε το κατά πόσο η λεπτίνη ευοδώνει την πρόσδεση του STAT3 στον υποκινητή της hTERT και στα HepG2 κύτταρα. Βρήκαμε ότι η χορήγηση λεπτίνης, βραχυπρόθεσμα ή μακροχρόνια, αυξάνει την πρόσδεση του STAT3 σε δύο θέσεις του υποκινητή της hTERT. Αυτό μας το εύρημα αποσαφηνίζει ότι ο άξονας λεπτίνη-υποδοχέας λεπτίνης-STAT3-hTERT έχει ρόλο στις διαδικασίες εγκαθίδρυσης και εδραίωσης της καρκινικής μεταλλαγής στο ηπατοκύτταρο..

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον και οι ισχυρές ενδείξεις για το σημαντικό ρόλο διάφορων γενετικών και επιγενετικών μηχανισμών ρύθμισης της έκφρασης της hTERT στα κύτταρα, μας οδήγησαν σε πιο ενδελεχή έλεγχο και αξιολόγηση του βαθμού πρόσδεσης των Myc, Max, Mad και της ακετυλιωμένης H3 ιστόνης στον υποκινητή της hTERT μετά τη χορήγηση λεπτίνης. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή δείξαμε για πρώτη φορά υψηλή συσχέτιση της μετάπτωσης από το Mad1/Max πρότυπο πρόσδεσης σε Myc/Max πρότυπο με την ενεργοποίηση της μεταγραφής του hTERT γονιδίου μετά τη χορήγηση λεπτίνης στα HepG2 κύτταρα. Επιπλέον μετά από μακροχρόνια χορήγηση λεπτίνης για διάστημα 2 μηνών διαπιστώσαμε ακόμα μεγαλύτερα επίπεδα πρόσδεσης του Myc/Max συμπλόκου στον υποκινητή του hTERT, τα οποία αυτή τη φορά συνοδεύονταν από αύξηση της ακετυλίωσης της ιστόνης H3. Εφόσον όμως η μακροχρόνια χορήγηση λεπτίνης δεν πέτυχε να αυξήσει τα επίπεδα mRNA της hTERT ούτε την TA υποθέτουμε ότι η λεπτινοεξαρτημένη υπερέκφραση της hTERT βρίσκεται υπό ένα διαρκή έλεγχο από διάφορους μετα-μεταγραφικούς μοριακούς ρυθμιστές. Καταλήξαμε επίσης στο συμπέρασμα ότι η αλληλουχία δράσης των διάφορων μεταγραφικών παραγόντων και επιγενετικών μηχανισμών έχει ισχυρή εξάρτηση από το χρόνο δράσης της λεπτίνης στο ηπατοκύτταρο.

Καθώς η λεπτινο-εξαρτημένη υπερέκφραση της hTERT μπορεί να οδηγήσει σε ογκογόνο ανάπτυξη και απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου ερευνήσαμε στη συνέχεια την επίδραση της λεπτίνης στον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των

HepG2 κυττάρων. Λεπτομερέστερα, η λεπτίνη διέγειρε την ανάπτυξη των HepG2 κυττάρων σύμφωνα με ένα χρόνο- και δόσο-εξαρτημένο πρότυπο.

Τα τελευταία χρόνια ισχυροποιούνται συνεχώς οι ενδείξεις ότι η φλεγμονή αποτελεί σημαντική προϋπόθεση για την έναρξη, εγκατάσταση και πρόοδο των όγκων στο ήπαρ. Ο πιθανός ρόλος των φλεγμονωδών κυτταροκινών στην ανάπτυξη και εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων μας οδήγησε στη μελέτη της επίδρασης της λεπτίνης στην παραγωγή IL-1, IL-6 και TGF-β1 από τα ανθρώπινα ηπατοκαρκινικά κύτταρα. Σε αυτό τον κύκλο πειραμάτων βρέθηκε ότι η χορήγηση λεπτίνης σε HepG2 κύτταρα αύξησε την παραγωγή της IL-6 και κατέστειλε την παραγωγή του TGF-β1 με ένα χρόνο- και δόσο-εξαρτημένο πρότυπο, ενώ αντίθετα δεν επηρέασε καθόλου τις IL-1α και IL-1β. Προτείνεται έτσι μια επιπλέον εναλλακτική οδός επιρροής της λεπτίνης επί της hTERT που δεν περιλαμβάνει την διαμεσολάβηση του OB-R και του JAK/STAT3 μοριακού μονοπατιού, αλλά της IL-6 και του μοριακού μονοπατιού PI3K/AKT.

Παρατηρήσαμε επίσης ότι η λεπτίνη ήταν ικανή να καταστείλει την έκφραση της MMP-1 και να διεγείρει περαιτέρω την έκφραση των MMP-9 και -13, ενώ η χρήση siRNA για την λεπτίνη είχε ακριβώς τα αντίθετα αποτελέσματα, πράγμα που την καθιστά ρυθμιστή της δημιουργίας ενός μικροπεριβάλλοντος που ευνοεί τη διείσδυση και μετάσταση του ΗΚΚ στο κίρρωτικό ήπαρ.

Έτσι, μετά από ένα κύκλο πειραμάτων που μας βοήθησαν να διακρίνουμε τους μοριακούς μηχανισμούς που επάγονται ή αναστέλλονται από την λεπτίνη στο ηπατοκαρκινικό κύτταρο, στη συνέχεια επιδιώξαμε να αποσαφηνίσουμε αν η έκφραση της λεπτίνης ελέγχεται από την πρόσδεση της ακετυλιωμένης H3 ιστόνης στο δικό της υποκινητή. Σε αυτό μας το εγχείρημα μας βοήθησε η τριχοστατίνη Α (TSA), ένας αναστολέας της αποακετυλίωσης των ιστονών. Βρέθηκε έτσι, ότι ενώ πριν τη χορήγηση TSA στα HepG2 η πρόσδεση της ακετυλιωμένης H3 στον υποκινητή της λεπτίνης ήταν μηδενική, μετά την προσθήκη της TSA παρατηρήθηκε ισχυρό σήμα των ανοσοκατακρημνισμάτων της.

Τέλος βρέθηκε ότι η IL-6 προκαλεί αύξηση στην παραγωγή της λεπτίνης και με το ίδιο πρότυπο αύξηση και στην έκφραση του mRNA της hTERT, καθώς και στην ενεργότητα της τελομεράσης. Καθίσταται σαφές έτσι ο διαδραστικός χαρακτήρας της σχέσης μεταξύ λεπτίνης και IL-6 στο ογκογόνο μικροπεριβάλλον του ήπατος με τελική κατάληξη την ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας της τελομεράσης.

Τα ανωτέρω ευρήματα καθιστούν την hTERT γονίδιο στόχο για την λεπτίνη στα ηπατοκαρκινικά κύτταρα και ισχυροποιούν περαιτέρω τον κομβικό ρόλο του συστήματος της λεπτίνης στην μακρόχρονη και πολυσχιδή διαδικασία της

ογκογένεσης στο χρονίως φλεγμαίνον ήπαρ. Επιπλέον συμβάλλουν σημαντικά στη διαλεύκανση των μοριακών εκείνων μηχανισμών που κινητοποιούν γενετικές και επιγενετικές αλληλεπιδράσεις και διαμεσολαβούν τον ανοσολογικό και καρκινογενετικό ρόλο της λεπτίνης στο μικροπεριβάλλον του ήπατος.

SUMMARY

When leptin, the protein product of ob gene, was discovered in 1994 by Zhang and colleagues, it was exclusively associated with metabolism regulation and the organism energy balance. Beyond this central action of leptin, however, it has been proven over the years that leptin possesses a wide range of regulatory roles in many different tissues since leptin has been found to be implicated in the development of endothelial cells and angiogenesis, activation of the sympathetic nervous system, free fatty acids oxidation in the skeletal muscles, bone development and remodeling, reproduction, hematopoiesis as well as the immune response and inflammation.

In the past years, scientific research has highlighted leptin's immunoregulatory role as an important mechanism implicated in liver fibrosis and in the maintenance of chronic inflammation in the liver. Moreover, it seems that there is a strong correlation between obesity, and therefore the cytokines of the adipose tissue, such as leptin, and the mechanisms of carcinogenesis in many human tissues such as breast, colon, prostate, endometrium, ovary, liver, etc.

Multiple studies focus on the multifaceted role of leptin, prompted us to investigate the validation of the immunoregulatory and carcinogenic role of leptin in chronic viral liver diseases and the decipherment of the molecular mechanisms carrying out leptin's action in the liver. A focal point of the present research has been the characterization of the catalytic subunit of telomerase (hTERT), as a molecular target of leptin in liver tissue.

More specifically, we observed lower expression levels for OB-RI and OB-Rs mRNA and protein in peripheral blood mononuclear cells in patients with HBV and HCV infections, compared to healthy subjects and patients with non-viral liver disease. The observed reduction of the membrane OB-R protein in the samples of HBV and HCV infected patients could reflect a virus-induced molecular dysfunction, or an increased susceptibility of PBMCs to apoptosis, which will ultimately result in the reduction or complete suppression of translation. We suggest the involvement of OB-RI, OB-Rs in the immune dysfunction observed in patients with chronic HBV, HCV infections, since decreased expression of peripheral blood mononuclear cells membrane receptors removes leptin's possibility to stimulate PBMCs, reduces the number of immune cells and possibly increases the fraction of immune cells entering apoptosis.

Another finding of the first part of the present thesis has been the positive correlation between the expression of OB-RI and OB-Rs (OB-Rs expression is consistently two fold-increased compared to OB-RI expression) in PBMCs in all of

the samples of the study. This points to a steady and parallel expression pattern of both receptors and probably indicates that the less functional OB-Rs favors the action of the more functional OB-RI or regulates circulating serum leptin levels or contributes to the transportation of leptin in intracellular compartments. The high correlation of OB-Rs with age in all samples tested, leads us towards the strong correlation (dependence) that could exist between the body's immune response capacity and age.

Moreover, we detected leptin mRNA expression in PBMCs in a small number of samples within the HCV infected group and in a large number of samples within the non-viral liver diseased group. This increase in leptin expression combined with the increased mRNA and protein expression of its receptors in patients with non-viral liver diseases supports the existence of an autocrine feedback mechanism stemming from leptin to PBMCs. This mechanism also gives an explanation for the immune stimulation observed in autoimmune and alcoholic hepatitis, giving rise to hepatic cytotoxicity.

In terms of serum leptin levels in patients with chronic viral liver diseases, there are conflicting findings in literature. The findings of the present study suggest that serum leptin levels in patients with viral hepatitis (B and C) or liver cirrhosis are lower compared to those of healthy subjects. In order to explain our findings, we concluded that the reduction of leptin secretion from adipose tissue is part of a feedback mechanism attempting to respond to the negative energy balance characterizing the course of chronic viral liver diseases.

Since chronic liver diseases provide a mitogenic and mutagenic environment, able to interact and alter gene expression levels within the hepatocyte, we decided to outweigh the centrally produced leptin and focus on its local expression within the liver microenvironment. We observed that both the production of leptin and the expression of its receptors (OB-RI, OB-Rs) were continuously increased during the transition from healthy to inflamed liver, initially on chronic viral hepatitis and finally to hepatocellular carcinoma. It seems that leptin not only promotes the processes of fibrosis and inflammation, but also contributes decisively to the establishment of a mutagenic environment in the liver of patients with HBV and HCV infections.

The fact that high expression levels of leptin and its receptors in liver tissue of HCC were not found to correlate with the patients BMI, led us to the assumption that leptin production in the patients' liver is not directly regulated by the organism fat deposits, but rather reflects and is determined by the molecular interactions taking place within the oncogenic microenvironment of the liver. It is possible, therefore,

that circulating leptin, whose amount is determined by the BMI, favours inflammatory infiltration and liver fibrosis during chronic liver diseases, but the local leptin production in the hepatocyte would rather seem to promote the mutational processes and the establishment of HCC.

In humans, HCC initiation is the result of a multifactorial process involving genetic and epigenetic modifications occurring in many genes in the hepatocyte. Among these genes, the gene encoding for the catalytic subunit of telomerase (hTERT), is the only one that is not expressed in normal hepatocytes. The role of telomerase in chronic viral liver diseases and their evolution into malignancy, as well as the apparent role of leptin in liver inflammation and HCC, prompted us to search for a possible correlation between them at a molecular level and also for a possible mechanism regarding their interaction within the hepatic parenchyma. In this direction, we found an interesting correlation between leptin and hTERT expression as well as telomerase activity in the HCC liver tissue samples only. Furthermore, we found that leptin was able to have a direct positive effect on hTERT mRNA expression and on telomerase activity in HepG2 cells.

Our initial finding that leptin is a regulator of hTERT expression in liver tissue prompted us to further investigate the molecular mechanism of intracellular signal transduction driven by leptin and leading to the activation or inhibition of hTERT gene expression. *hTERT* promoter contains a multitude of binding sites for transcription factors, either activators such as c-myc, Sp1 and STAT3, or suppressors such as mad1 and p53, regulating its transcription.

Taking into account the above, we used chromatin immunoprecipitation in order to investigate whether leptin favours STAT3 binding on *hTERT* promoter in HepG2 cells. We found that short or long term leptin administration, increases STAT3 binding on two binding sites of the *hTERT* promoter. This finding clarifies that the axis leptin-leptin receptor-STAT3-hTERT has a role in the processes of tumorigenic mutation initiation and establishment in the hepatocyte.

The growing interest and the strong evidence concerning the important role of several genetic and epigenetic mechanisms of regulation of hTERT expression, led us to a more profound review and evaluation of the degree of Myc, Mad, Max and acetylated H3 binding on hTERT promoter after leptin administration. In the present thesis, we demonstrated, for the first time, that leptin administration in HepG2 cells led to a switch of Mad1/Max to Myc/Max binding to *hTERT* promoter and a subsequent activation of hTERT gene transcription. Furthermore, long-term (two month) leptin administration led to further increase of Myc/Max complex binding to hTERT promoter and a concomitant increase of the acetylation status of H3 histone.

However, as long-term leptin administration did not succeed to increase hTERT mRNA levels, neither TA, we hypothesized that leptin-dependent overexpression of hTERT is under constant control by numerous post-transcriptional regulators. We also concluded that the sequential action of several transcription factors and epigenetic mechanisms strongly depends on the time of action of leptin on the hepatocyte.

As the leptin-dependent overexpression of hTERT may lead to oncogenic growth and cell cycle deregulation, we investigated leptin's effect on HepG2 cell proliferation and viability. In detail, leptin stimulated HepG2 cell growth in a time- and dose-dependent manner.

In recent years, increasing evidence suggests that inflammation is an important prerequisite for the liver tumor initiation, establishment and progress. The possible role of inflammatory cytokines in the development and spread of tumor cells, led us to the investigation of leptin effect on the production of IL-1, IL-6 and TGF- β 1 by human hepatocarcinoma cells. In this series of tests, we found that leptin administration in HepG2 cells increased IL-6 production and suppressed TGF- β 1 production in a time- and dose-dependent manner, while no effect was observed on IL-1 α and IL-1 β production. Therefore, we propose an additional alternative pathway of leptin effect on hTERT which does not include OB-R and JAK/STAT3 molecular pathway mediation, but IL-6 and the PI3K/AKT molecular pathway.

We also observed that leptin was able to suppress MMP-1 expression and further stimulate MMP-9 and -13 expression, while the use of siRNA against leptin had the exact opposite effect, which establishes leptin as a regulator of a microenvironment facilitating the infiltration and metastasis of HCC in cirrhotic liver.

Therefore, after a round of tests that helped us distinguish the molecular mechanisms induced or inhibited by leptin in hepatocarcinoma cells, we sought to decipher whether leptin expression is controlled by the binding of acetylated H3 histone on its own promoter. We used trichostatin A (TSA), an inhibitor of histone deacetylation and found that while no binding of acetylated H3 on leptin promoter was observed, before TSA administration in HepG2 cells, TSA caused a strong binding of acH3 on the promoter.

Finally, we found that IL-6 increases leptin production and similarly hTERT mRNA expression and telomerase activity. Therefore, the interactive nature in the relationship between leptin and IL-6 in the oncogenic microenvironment of the liver becomes clear, leading to the activation of telomerase catalytic subunit.

The above findings make hTERT a target gene for leptin in hepatocellular cells and further strengthen the focal role of the leptin system in the long and

multifaceted process of oncogenesis in the chronically inflamed liver. In addition, they contribute significantly to the elucidation of the molecular mechanisms that motivate genetic and epigenetic interactions and mediate the immune and carcinogenic role of leptin in the liver microenvironment.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ingalls, A. M., Dickie, M. M., and Snell, G. D. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered*, 41: 317-318, 1950.
2. Coleman, D. L. Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia*, 9: 294-298, 1973.
3. Coleman, D. L. and Hummel, K. P. Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am J Physiol*, 217: 1298-1304, 1969.
4. Coleman, D. L. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*, 14: 141-148, 1978.
5. Friedman, J. M., Leibel, R. L., Siegel, D. S., Walsh, J., and Bahary, N. Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics*, 11: 1054-1062, 1991.
6. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372: 425-432, 1994.
7. Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K. J., Smutko, J. S., Mays, G. G., Wool, E. A., Monroe, C. A., and Tepper, R. I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83: 1263-1271, 1995.
8. Geffroy, S., De Vos, P., Staels, B., Duban, B., Auwerx, J., and de Martinville, B. Localization of the human OB gene (OBS) to chromosome 7q32 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 28: 603-604, 1995.
9. Isse, N., Ogawa, Y., Tamura, N., Masuzaki, H., Mori, K., Okazaki, T., Satoh, N., Shigemoto, M., Yoshimasa, Y., Nishi, S., and et al. Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem*, 270: 27728-27733, 1995.
10. Carlsson, B., Lindell, K., Gabrielsson, B., Karlsson, C., Bjarnason, R., Westphal, O., Karlsson, U., Sjostrom, L., and Carlsson, L. M. Obese (ob) gene defects are rare in human obesity. *Obes Res*, 5: 30-35, 1997.
11. Considine, R. V., Nyce, M. R., Allen, L. E., Morales, L. M., Triester, S., Serrano, J., Colberg, J., Lanza-Jacoby, S., and Caro, J. F. Protein kinase C is increased in the liver of humans and rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus: an alteration not due to hyperglycemia. *J Clin Invest*, 95: 2938-2944, 1995.
12. Hamilton, B. S., Paglia, D., Kwan, A. Y., and Deitel, M. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med*, 1: 953-956, 1995.
13. Lonqvist, F., Arner, P., Nordfors, L., and Schalling, M. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med*, 1: 950-953, 1995.
14. Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., Sewter, C. P., Digby, J. E., Mohammed, S. N., Hurst, J. A., Cheetham, C. H., Earley, A. R., Barnett, A. H., Prins, J. B., and O'Rahilly, S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387: 903-908, 1997.
15. Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M., and Strosberg, A. D. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet*, 18: 213-215, 1998.
16. Hager, J., Clement, K., Francke, S., Dina, C., Raison, J., Lahlou, N., Rich, N., Pelloux, V., Basdevant, A., Guy-Grand, B., North, M., and Froguel, P. A polymorphism in the 5' untranslated region of the human ob gene is

- associated with low leptin levels. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 22: 200-205, 1998.
17. Mizuta, E., Kokubo, Y., Yamanaka, I., Miyamoto, Y., Okayama, A., Yoshimasa, Y., Tomoike, H., Morisaki, H., and Morisaki, T. Leptin gene and leptin receptor gene polymorphisms are associated with sweet preference and obesity. *Hypertens Res*, 31: 1069-1077, 2008.
 18. Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gourmelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J. M., Basdevant, A., Bougneres, P., Lebouc, Y., Froguel, P., and Guy-Grand, B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, 392: 398-401, 1998.
 19. Considine, R. V. and Caro, J. F. Leptin and the regulation of body weight. *Int J Biochem Cell Biol*, 29: 1255-1272, 1997.
 20. Gong, D. W., Bi, S., Pratley, R. E., and Weintraub, B. D. Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J Biol Chem*, 271: 3971-3974, 1996.
 21. Imagawa, K., Numata, Y., Katsuura, G., Sakaguchi, I., Morita, A., Kikuoka, S., Matumoto, Y., Tsuji, T., Tamaki, M., Sasakura, K., Teraoka, H., Hosoda, K., Ogawa, Y., and Nakao, K. Structure-function studies of human leptin. *J Biol Chem*, 273: 35245-35249, 1998.
 22. Kline, A. D., Becker, G. W., Churgay, L. M., Landen, B. E., Martin, D. K., Muth, W. L., Rathnachalam, R., Richardson, J. M., Schoner, B., Ulmer, M., and Hale, J. E. Leptin is a four-helix bundle: secondary structure by NMR. *FEBS Lett*, 407: 239-242, 1997.
 23. Zhang, F., Basinski, M. B., Beals, J. M., Briggs, S. L., Churgay, L. M., Clawson, D. K., DiMarchi, R. D., Furman, T. C., Hale, J. E., Hsiung, H. M., Schoner, B. E., Smith, D. P., Zhang, X. Y., Wery, J. P., and Schevitz, R. W. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*, 387: 206-209, 1997.
 24. Licinio, J., Mantzoros, C., Negrao, A. B., Cizza, G., Wong, M. L., Bongiorno, P. B., Chrousos, G. P., Karp, B., Allen, C., Flier, J. S., and Gold, P. W. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med*, 3: 575-579, 1997.
 25. Klein, S., Coppack, S. W., Mohamed-Ali, V., and Landt, M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes*, 45: 984-987, 1996.
 26. Houseknecht, K. L., Mantzoros, C. S., Kuliawat, R., Hadro, E., Flier, J. S., and Kahn, B. B. Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes*, 45: 1638-1643, 1996.
 27. Sinha, M. K., Ohannesian, J. P., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Magosin, S., Marco, C., and Caro, J. F. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest*, 97: 1344-1347, 1996.
 28. Sinha, M. K., Opentanova, I., Ohannesian, J. P., Kolaczynski, J. W., Heiman, M. L., Hale, J., Becker, G. W., Bowsher, R. R., Stephens, T. W., and Caro, J. F. Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J Clin Invest*, 98: 1277-1282, 1996.
 29. Winick, J. D., Stoffel, M., and Friedman, J. M. Identification of microsatellite markers linked to the human leptin receptor gene on chromosome 1. *Genomics*, 36: 221-222, 1996.
 30. Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I., and Friedman, J. M. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, 379: 632-635, 1996.

31. Cioffi, J. A., Shafer, A. W., Zupancic, T. J., Smith-Gbur, J., Mikhail, A., Platika, D., and Snodgrass, H. R. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med*, 2: 585-589, 1996.
32. Tartaglia, L. A. The leptin receptor. *J Biol Chem*, 272: 6093-6096, 1997.
33. Wang, M. Y., Zhou, Y. T., Newgard, C. B., and Unger, R. H. A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Lett*, 392: 87-90, 1996.
34. Hegyi, K., Fulop, K., Kovacs, K., Toth, S., and Falus, A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int*, 28: 159-169, 2004.
35. Myers, M. G., Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res*, 59: 287-304, 2004.
36. Chua, S. C., Jr., Chung, W. K., Wu-Peng, X. S., Zhang, Y., Liu, S. M., Tartaglia, L., and Leibel, R. L. Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science*, 271: 994-996, 1996.
37. Agarwal, S. K., Vogel, K., Weitsman, S. R., and Magoffin, D. A. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 1072-1076, 1999.
38. Bjorbaek, C., Uotani, S., da Silva, B., and Flier, J. S. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J Biol Chem*, 272: 32686-32695, 1997.
39. Ebenbichler, C. F., Kaser, S., Laimer, M., Wolf, H. J., Patsch, J. R., and Illsley, N. P. Polar expression and phosphorylation of human leptin receptor isoforms in paired, syncytial, microvillous and basal membranes from human term placenta. *Placenta*, 23: 516-521, 2002.
40. Elmquist, J. K., Bjorbaek, C., Ahima, R. S., Flier, J. S., and Saper, C. B. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*, 395: 535-547, 1998.
41. Frank, S., Stallmeyer, B., Kampfer, H., Kolb, N., and Pfeilschifter, J. Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J Clin Invest*, 106: 501-509, 2000.
42. Goiot, H., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J. P., Lardeux, B., Lehy, T., Lewin, M. J., and Bado, A. Antral mucosa expresses functional leptin receptors coupled to STAT-3 signaling, which is involved in the control of gastric secretions in the rat. *Gastroenterology*, 121: 1417-1427, 2001.
43. Kitawaki, J., Koshiba, H., Ishihara, H., Kusuki, I., Tsukamoto, K., and Honjo, H. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 1946-1950, 2000.
44. Lee, Y. J., Park, J. H., Ju, S. K., You, K. H., Ko, J. S., and Kim, H. M. Leptin receptor isoform expression in rat osteoblasts and their functional analysis. *FEBS Lett*, 528: 43-47, 2002.
45. Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G. G., and Hill, R. A. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 26: 1407-1433, 2002.
46. Morton, N. M., Emilsson, V., de Groot, P., Pallett, A. L., and Cawthorne, M. A. Leptin signalling in pancreatic islets and clonal insulin-secreting cells. *J Mol Endocrinol*, 22: 173-184, 1999.
47. Lammert, A., Kiess, W., Bottner, A., Glasow, A., and Kratzsch, J. Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun*, 283: 982-988, 2001.
48. Uotani, S., Bjorbaek, C., Tornoe, J., and Flier, J. S. Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes*, 48: 279-286, 1999.
49. Bjorbaek, C., Elmquist, J. K., Michl, P., Ahima, R. S., van Bueren, A., McCall, A. L., and Flier, J. S. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology*, 139: 3485-3491, 1998.

50. Bjorbaek, C. and Kahn, B. B. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res*, 59: 305-331, 2004.
51. Sweeney, G. Leptin signalling. *Cell Signal*, 14: 655-663, 2002.
52. Barr, V. A., Lane, K., and Taylor, S. I. Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J Biol Chem*, 274: 21416-21424, 1999.
53. Fruhbeck, G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J*, 393: 7-20, 2006.
54. Nakashima, K., Narazaki, M., and Taga, T. Leptin receptor (OB-R) oligomerizes with itself but not with its closely related cytokine signal transducer gp130. *FEBS Lett*, 403: 79-82, 1997.
55. Devos, R., Guisez, Y., Van der Heyden, J., White, D. W., Kalai, M., Fountoulakis, M., and Plaetinck, G. Ligand-independent dimerization of the extracellular domain of the leptin receptor and determination of the stoichiometry of leptin binding. *J Biol Chem*, 272: 18304-18310, 1997.
56. White, D. W. and Tartaglia, L. A. Evidence for ligand-independent homo-oligomerization of leptin receptor (OB-R) isoforms: a proposed mechanism permitting productive long-form signaling in the presence of excess short-form expression. *J Cell Biochem*, 73: 278-288, 1999.
57. Ghilardi, N. and Skoda, R. C. The leptin receptor activates janus kinase 2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line. *Mol Endocrinol*, 11: 393-399, 1997.
58. Kloeck, C., Haq, A. K., Dunn, S. L., Lavery, H. J., Banks, A. S., and Myers, M. G., Jr. Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences. *J Biol Chem*, 277: 41547-41555, 2002.
59. Bahrenberg, G., Behrmann, I., Barthel, A., Hekerman, P., Heinrich, P. C., Joost, H. G., and Becker, W. Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. *Mol Endocrinol*, 16: 859-872, 2002.
60. Murakami, T., Yamashita, T., Iida, M., Kuwajima, M., and Shima, K. A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun*, 231: 26-29, 1997.
61. Shepherd, P. R., Withers, D. J., and Siddle, K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J*, 333 (Pt 3): 471-490, 1998.
62. Fujita, Y., Murakami, M., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Tanaka, M., Ozaki, S., Nakao, K., and Mimori, T. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. *Clin Exp Immunol*, 128: 21-26, 2002.
63. Shimabukuro, M., Wang, M. Y., Zhou, Y. T., Newgard, C. B., and Unger, R. H. Protection against lipoapoptosis of beta cells through leptin-dependent maintenance of Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 9558-9561, 1998.
64. Baumann, H., Morella, K. K., White, D. W., Dembski, M., Bailon, P. S., Kim, H., Lai, C. F., and Tartaglia, L. A. The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 8374-8378, 1996.
65. Bendinelli, P., Maroni, P., Pecori Giraldi, F., and Piccoletti, R. Leptin activates Stat3, Stat1 and AP-1 in mouse adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*, 168: 11-20, 2000.
66. Briscoe, C. P., Hanif, S., Arch, J. R., and Tadayyon, M. Leptin receptor long-form signalling in a human liver cell line. *Cytokine*, 14: 225-229, 2001.
67. Bjorbak, C., Lavery, H. J., Bates, S. H., Olson, R. K., Davis, S. M., Flier, J. S., and Myers, M. G., Jr. SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985. *J Biol Chem*, 275: 40649-40657, 2000.

68. Muller, P., Kutteneuler, D., Gesellchen, V., Zeidler, M. P., and Boutros, M. Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature*, 436: 871-875, 2005.
69. Procaccini, C., Galgani, M., De Rosa, V., Carbone, F., La Rocca, C., Ranucci, G., Iorio, R., and Matarese, G. Leptin: the prototypic adipocytokine and its role in NAFLD. *Curr Pharm Des*, 16: 1902-1912.
70. Banks, A. S., Davis, S. M., Bates, S. H., and Myers, M. G., Jr. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem*, 275: 14563-14572, 2000.
71. Bjorbaek, C., Buchholz, R. M., Davis, S. M., Bates, S. H., Pierroz, D. D., Gu, H., Neel, B. G., Myers, M. G., Jr., and Flier, J. S. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J Biol Chem*, 276: 4747-4755, 2001.
72. Machinal-Quelin, F., Dieudonne, M. N., Leneuve, M. C., Pecquery, R., and Giudicelli, Y. Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282: C853-863, 2002.
73. Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J. P., Bortoluzzi, M. N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y., and Lewin, M. J. The stomach is a source of leptin. *Nature*, 394: 790-793, 1998.
74. Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J. S., Williams, L. M., Trayhurn, P., and Mercer, J. G. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 11073-11078, 1997.
75. Jin, L., Zhang, S., Burguera, B. G., Couce, M. E., Osamura, R. Y., Kulig, E., and Lloyd, R. V. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology*, 141: 333-339, 2000.
76. Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., and et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*, 1: 1155-1161, 1995.
77. Masuzaki, H., Hosoda, K., Ogawa, Y., Shigemoto, M., Satoh, N., Mori, K., Tamura, N., Nishi, S., Yoshimasa, Y., Yamori, Y., and Nakao, K. Augmented expression of obese (ob) gene during the process of obesity in genetically obese-hyperglycemic Wistar fatty (fa/fa) rats. *FEBS Lett*, 378: 267-271, 1996.
78. Smith-Kirwin, S. M., O'Connor, D. M., De Johnston, J., Lancey, E. D., Hassink, S. G., and Funanage, V. L. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 1810-1813, 1998.
79. Spicer, L. J. and Francisco, C. C. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology*, 138: 3374-3379, 1997.
80. Hoggard, N., Hunter, L., Trayhurn, P., Williams, L. M., and Mercer, J. G. Leptin and reproduction. *Proc Nutr Soc*, 57: 421-427, 1998.
81. Siegrist-Kaiser, C. A., Pauli, V., Juge-Aubry, C. E., Boss, O., Pernin, A., Chin, W. W., Cusin, I., Rohner-Jeanrenaud, F., Burger, A. G., Zapf, J., and Meier, C. A. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest*, 100: 2858-2864, 1997.
82. Van Harmelen, V., Reynisdottir, S., Eriksson, P., Thorne, A., Hoffstedt, J., Lonnqvist, F., and Arner, P. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes*, 47: 913-917, 1998.
83. Cinti, S., Matteis, R. D., Pico, C., Ceresi, E., Obrador, A., Maffei, C., Oliver, J., and Palou, A. Secretory granules of endocrine and chief cells of human stomach mucosa contain leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24: 789-793, 2000.

84. Mix, H., Manns, M. P., Wagner, S., Widjaja, A., and Brabant, G. Expression of leptin and its receptor in the human stomach. *Gastroenterology*, 117: 509, 1999.
85. Stefanou, N., Satra, M., Papanikolaou, V., Kalala, F., Gatselis, N., Germanis, A., Dalekos, G. N., and Tsezou, A. Leptin receptor isoforms mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic viral hepatitis. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231: 1653-1663, 2006.
86. Wiesner, G., Vaz, M., Collier, G., Seals, D., Kaye, D., Jennings, G., Lambert, G., Wilkinson, D., and Esler, M. Leptin is released from the human brain: influence of adiposity and gender. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 2270-2274, 1999.
87. Camina, J. P., Lage, M., Menendez, C., Grana, M., Garcia-Devesa, J., Dieguez, C., and Casanueva, F. F. Evidence of free leptin in human seminal plasma. *Endocrine*, 17: 169-174, 2002.
88. Cioffi, J. A., Van Blerkom, J., Antczak, M., Shafer, A., Wittmer, S., and Snodgrass, H. R. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod*, 3: 467-472, 1997.
89. Loffler, S., Aust, G., Kohler, U., and Spaniel-Borowski, K. Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries. *Mol Hum Reprod*, 7: 1143-1149, 2001.
90. Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., Bauer, T. L., and et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*, 334: 292-295, 1996.
91. Prolo, P., Wong, M. L., and Licinio, J. Leptin. *Int J Biochem Cell Biol*, 30: 1285-1290, 1998.
92. Sinha, M. K., Sturis, J., Ohannesian, J., Magosin, S., Stephens, T., Heiman, M. L., Polonsky, K. S., and Caro, J. F. Ultradian oscillations of leptin secretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun*, 228: 733-738, 1996.
93. Saad, M. F., Riad-Gabriel, M. G., Khan, A., Sharma, A., Michael, R., Jinagouda, S. D., Boyadjian, R., and Steil, G. M. Diurnal and ultradian rhythmicity of plasma leptin: effects of gender and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 453-459, 1998.
94. Licinio, J., Negrao, A. B., Mantzoros, C., Kaklamani, V., Wong, M. L., Bongiorno, P. B., Negro, P. P., Mulla, A., Veldhuis, J. D., Cernal, L., Flier, J. S., and Gold, P. W. Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 4140-4147, 1998.
95. Caro, J. F., Sinha, M. K., Kolaczynski, J. W., Zhang, P. L., and Considine, R. V. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes*, 45: 1455-1462, 1996.
96. Tai, E. S., Lau, T. N., Ho, S. C., Fok, A. C., and Tan, C. E. Body fat distribution and cardiovascular risk in normal weight women. Associations with insulin resistance, lipids and plasma leptin. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24: 751-757, 2000.
97. Kiess, W., Englaro, P., Hanitsch, S., Rascher, W., Attanasio, A., and Blum, W. F. High leptin concentrations in serum of very obese children are further stimulated by dexamethasone. *Horm Metab Res*, 28: 708-710, 1996.
98. Larsson, H. and Ahren, B. Short-term dexamethasone treatment increases plasma leptin independently of changes in insulin sensitivity in healthy women. *J Clin Endocrinol Metab*, 81: 4428-4432, 1996.
99. Papaspyrou-Rao, S., Schneider, S. H., Petersen, R. N., and Fried, S. K. Dexamethasone increases leptin expression in humans in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 1635-1637, 1997.

100. Dagogo-Jack, S., Selke, G., Melson, A. K., and Newcomer, J. W. Robust leptin secretory responses to dexamethasone in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 3230-3233, 1997.
101. Rentsch, J. and Chiesi, M. Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes. *FEBS Lett*, 379: 55-59, 1996.
102. Wabitsch, M., Jensen, P. B., Blum, W. F., Christoffersen, C. T., Englaro, P., Heinze, E., Rascher, W., Teller, W., Tornqvist, H., and Hauner, H. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes*, 45: 1435-1438, 1996.
103. Mantzoros, C. S. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med*, 130: 671-680, 1999.
104. Kolaczynski, J. W., Nyce, M. R., Considine, R. V., Boden, G., Nolan, J. J., Henry, R., Mudaliar, S. R., Olefsky, J., and Caro, J. F. Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro. *Diabetes*, 45: 699-701, 1996.
105. Donahoo, W. T., Jensen, D. R., Yost, T. J., and Eckel, R. H. Isoproterenol and somatostatin decrease plasma leptin in humans: a novel mechanism regulating leptin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 4139-4143, 1997.
106. Slieker, L. J., Sloop, K. W., Surface, P. L., Kriauciunas, A., LaQuier, F., Manetta, J., Bue-Valleskey, J., and Stephens, T. W. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem*, 271: 5301-5304, 1996.
107. Collins, S., Kuhn, C. M., Petro, A. E., Swick, A. G., Chrnyk, B. A., and Surwit, R. S. Role of leptin in fat regulation. *Nature*, 380: 677, 1996.
108. Deng, C., Moinat, M., Curtis, L., Nadakal, A., Preitner, F., Boss, O., Assimacopoulos-Jeannet, F., Seydoux, J., and Jacobino, J. P. Effects of beta-adrenoceptor subtype stimulation on obese gene messenger ribonucleic acid and on leptin secretion in mouse brown adipocytes differentiated in culture. *Endocrinology*, 138: 548-552, 1997.
109. Hodge, A. M., Westerman, R. A., de Courten, M. P., Collier, G. R., Zimmet, P. Z., and Alberti, K. G. Is leptin sensitivity the link between smoking cessation and weight gain? *Int J Obes Relat Metab Disord*, 21: 50-53, 1997.
110. Peino, R., Pineiro, V., Gualillo, O., Menendez, C., Brenlla, J., Casabiell, X., Dieguez, C., and Casanueva, F. F. Cold exposure inhibits leptin secretion in vitro by a direct and non-specific action on adipose tissue. *Eur J Endocrinol*, 142: 195-199, 2000.
111. Saladin, R., De Vos, P., Guerre-Millo, M., Leturque, A., Girard, J., Staels, B., and Auwerx, J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*, 377: 527-529, 1995.
112. Trayhurn, P., Duncan, J. S., and Rayner, D. V. Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system. *Biochem J*, 311 (Pt 3): 729-733, 1995.
113. Wabitsch, M., Blum, W. F., Muehe, R., Braun, M., Hube, F., Rascher, W., Heinze, E., Teller, W., and Hauner, H. Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest*, 100: 808-813, 1997.
114. Mantzoros, C. S., Moschos, S., Avramopoulos, I., Kaklamani, V., Liolios, A., Doulgerakis, D. E., Griveas, I., Katsilambros, N., and Flier, J. S. Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor-alpha system in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 3408-3413, 1997.
115. Janik, J. E., Curti, B. D., Considine, R. V., Rager, H. C., Powers, G. C., Alvord, W. G., Smith, J. W., 2nd, Gause, B. L., and Kopp, W. C. Interleukin 1 alpha increases serum leptin concentrations in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 3084-3086, 1997.

116. Dallongeville, J., Fruchart, J. C., and Auwerx, J. Leptin, a pleiotropic hormone: physiology, pharmacology, and strategies for discovery of leptin modulators. *J Med Chem*, 41: 5337-5352, 1998.
117. Schwartz, M. W., Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E. J., and Porte, D., Jr. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med*, 2: 589-593, 1996.
118. Caro, J. F., Kolaczynski, J. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Opentanova, I., Goldman, W. H., Lynn, R. B., Zhang, P. L., Sinha, M. K., and Considine, R. V. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*, 348: 159-161, 1996.
119. Glaum, S. R., Hara, M., Bindokas, V. P., Lee, C. C., Polonsky, K. S., Bell, G. I., and Miller, R. J. Leptin, the obese gene product, rapidly modulates synaptic transmission in the hypothalamus. *Mol Pharmacol*, 50: 230-235, 1996.
120. Elmquist, J. K., Ahima, R. S., Maratos-Flier, E., Flier, J. S., and Saper, C. B. Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology*, 138: 839-842, 1997.
121. Stephens, T. W., Basinski, M., Bristow, P. K., Bue-Valleskey, J. M., Burgett, S. G., Craft, L., Hale, J., Hoffmann, J., Hsiung, H. M., Kriauciunas, A., and et al. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*, 377: 530-532, 1995.
122. Erickson, J. C., Hollopeter, G., and Palmiter, R. D. Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science*, 274: 1704-1707, 1996.
123. Wang, Q., Bing, C., Al-Barazanji, K., Mossakowaska, D. E., Wang, X. M., McBay, D. L., Neville, W. A., Taddayon, M., Pickavance, L., Dryden, S., Thomas, M. E., McHale, M. T., Gloyer, I. S., Wilson, S., Buckingham, R., Arch, J. R., Trayhurn, P., and Williams, G. Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes*, 46: 335-341, 1997.
124. Elmquist, J. K., Elias, C. F., and Saper, C. B. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*, 22: 221-232, 1999.
125. Flier, J. S. and Maratos-Flier, E. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell*, 92: 437-440, 1998.
126. Qu, D., Ludwig, D. S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J., Mathes, W. F., Przypek, R., Kanarek, R., and Maratos-Flier, E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature*, 380: 243-247, 1996.
127. Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, G. P., Wilson, S., Arch, J. R., Buckingham, R. E., Haynes, A. C., Carr, S. A., Annan, R. S., McNulty, D. E., Liu, W. S., Terrett, J. A., Elshourbagy, N. A., Bergsma, D. J., and Yanagisawa, M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92: 573-585, 1998.
128. Turton, M. D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S. A., Edwards, C. M., Meeran, K., Choi, S. J., Taylor, G. M., Heath, M. M., Lambert, P. D., Wilding, J. P., Smith, D. M., Ghatei, M. A., Herbert, J., and Bloom, S. R. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 379: 69-72, 1996.
129. La Cava, A. and Matarese, G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol*, 4: 371-379, 2004.
130. Barash, I. A., Cheung, C. C., Weigle, D. S., Ren, H., Kabigting, E. B., Kuijper, J. L., Clifton, D. K., and Steiner, R. A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*, 137: 3144-3147, 1996.

131. Mounzih, K., Lu, R., and Chehab, F. F. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology*, 138: 1190-1193, 1997.
132. Swerdloff, R. S., Batt, R. A., and Bray, G. A. Reproductive hormonal function in the genetically obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology*, 98: 1359-1364, 1976.
133. Jenkins, P. J. and Grossman, A. The control of the gonadotrophin releasing hormone pulse generator in relation to opioid and nutritional cues. *Hum Reprod*, 8 Suppl 2: 154-161, 1993.
134. Phillips, L. S. Nutrition, somatomedins, and the brain. *Metabolism*, 35: 78-87, 1986.
135. Balligand, J. L., Brichard, S. M., Brichard, V., Desager, J. P., and Lambert, M. Hypoleptinemia in patients with anorexia nervosa: loss of circadian rhythm and unresponsiveness to short-term refeeding. *Eur J Endocrinol*, 138: 415-420, 1998.
136. Casanueva, F. F., Dieguez, C., Popovic, V., Peino, R., Considine, R. V., and Caro, J. F. Serum immunoreactive leptin concentrations in patients with anorexia nervosa before and after partial weight recovery. *Biochem Mol Med*, 60: 116-120, 1997.
137. Mantzoros, C. S., Flier, J. S., and Rogol, A. D. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 1066-1070, 1997.
138. Schubring, C., Kiess, W., Englard, P., Rascher, W., Dotsch, J., Hanitsch, S., Attanasio, A., and Blum, W. F. Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 1480-1483, 1997.
139. Harigaya, A., Nagashima, K., Nako, Y., and Morikawa, A. Relationship between concentration of serum leptin and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 3281-3284, 1997.
140. Hassink, S. G., de Lancey, E., Sheslow, D. V., Smith-Kirwin, S. M., O'Connor, D. M., Considine, R. V., Opentanova, I., Dostal, K., Spear, M. L., Leef, K., Ash, M., Spitzer, A. R., and Funanage, V. L. Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? *Pediatrics*, 100: E1, 1997.
141. Jaquet, D., Leger, J., Levy-Marchal, C., Oury, J. F., and Czernichow, P. Ontogeny of leptin in human fetuses and newborns: effect of intrauterine growth retardation on serum leptin concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 1243-1246, 1998.
142. Gimble, J. M., Robinson, C. E., Wu, X., and Kelly, K. A. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone*, 19: 421-428, 1996.
143. Bennett, B. D., Solar, G. P., Yuan, J. Q., Mathias, J., Thomas, G. R., and Matthews, W. A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr Biol*, 6: 1170-1180, 1996.
144. Gainsford, T., Willson, T. A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., Nicola, N. A., Alexander, W. S., and Hilton, D. J. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 14564-14568, 1996.
145. Campfield, L. A., Smith, F. J., and Burn, P. Strategies and potential molecular targets for obesity treatment. *Science*, 280: 1383-1387, 1998.
146. Halaas, J. L., Gajiwala, K. S., Maffei, M., Cohen, S. L., Chait, B. T., Rabinowitz, D., Lallone, R. L., Burley, S. K., and Friedman, J. M. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*, 269: 543-546, 1995.
147. Chen, N. G., Swick, A. G., and Romsos, D. R. Leptin constrains acetylcholine-induced insulin secretion from pancreatic islets of ob/ob mice. *J Clin Invest*, 100: 1174-1179, 1997.

148. Fehmann, H. C., Berghofer, P., Brandhorst, D., Brandhorst, H., Hering, B., Bretzel, R. G., and Goke, B. Leptin inhibition of insulin secretion from isolated human islets. *Acta Diabetol*, **34**: 249-252, 1997.
149. Poitout, V., Rouault, C., Guerre-Millo, M., Briaud, I., and Reach, G. Inhibition of insulin secretion by leptin in normal rodent islets of Langerhans. *Endocrinology*, **139**: 822-826, 1998.
150. Roduit, R. and Thorens, B. Inhibition of glucose-induced insulin secretion by long-term preexposure of pancreatic islets to leptin. *FEBS Lett*, **415**: 179-182, 1997.
151. Shimizu, H., Ohtani, K., Tsuchiya, T., Takahashi, H., Uehara, Y., Sato, N., and Mori, M. Leptin stimulates insulin secretion and synthesis in HIT-T 15 cells. *Peptides*, **18**: 1263-1266, 1997.
152. Tanizawa, Y., Okuya, S., Ishihara, H., Asano, T., Yada, T., and Oka, Y. Direct stimulation of basal insulin secretion by physiological concentrations of leptin in pancreatic beta cells. *Endocrinology*, **138**: 4513-4516, 1997.
153. Bouloumie, A., Drexler, H. C., Lafontan, M., and Busse, R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res*, **83**: 1059-1066, 1998.
154. Sierra-Honigmann, M. R., Nath, A. K., Murakami, C., Garcia-Cardena, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W. C., Madge, L. A., Schechner, J. S., Schwabb, M. B., Polverini, P. J., and Flores-Riveros, J. R. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*, **281**: 1683-1686, 1998.
155. Haynes, W. G., Morgan, D. A., Walsh, S. A., Mark, A. L., and Sivitz, W. I. Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest*, **100**: 270-278, 1997.
156. Muoio, D. M., Dohm, G. L., Fiedorek, F. T., Jr., Tapscott, E. B., and Coleman, R. A. Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes*, **46**: 1360-1363, 1997.
157. Elmquist, J. K. and Strewler, G. J. Physiology: do neural signals remodel bone? *Nature*, **434**: 447-448, 2005.
158. Steppan, C. M., Crawford, D. T., Chidsey-Frink, K. L., Ke, H., and Swick, A. G. Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice. *Regul Pept*, **92**: 73-78, 2000.
159. Lord, G. M., Matarese, G., Howard, J. K., and Lechler, R. I. The bioenergetics of the immune system. *Science*, **292**: 855-856, 2001.
160. Friedman, J. M. and Halaas, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, **395**: 763-770, 1998.
161. Matarese, G., La Cava, A., Sanna, V., Lord, G. M., Lechler, R. I., Fontana, S., and Zappacosta, S. Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin? *Trends Immunol*, **23**: 182-187, 2002.
162. Bruun, J. M., Pedersen, S. B., Kristensen, K., and Richelsen, B. Effects of pro-inflammatory cytokines and chemokines on leptin production in human adipose tissue in vitro. *Mol Cell Endocrinol*, **190**: 91-99, 2002.
163. Gerhardt, C. C., Romero, I. A., Cancelllo, R., Camoin, L., and Strosberg, A. D. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*, **175**: 81-92, 2001.
164. Faggioni, R., Jones-Carson, J., Reed, D. A., Dinarello, C. A., Feingold, K. R., Grunfeld, C., and Fantuzzi, G. Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**: 2367-2372, 2000.
165. Lam, Q. L. and Lu, L. Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol*, **4**: 1-13, 2007.
166. Palmer, G., Aurrand-Lions, M., Contassot, E., Talabot-Ayer, D., Ducrest-Gay, D., Vesin, C., Chobaz-Peclat, V., Busso, N., and Gabay, C. Indirect effects of leptin receptor deficiency on lymphocyte populations and immune response in db/db mice. *J Immunol*, **177**: 2899-2907, 2006.

167. Caldefie-Chezet, F., Poulin, A., Tridon, A., Sion, B., and Vasson, M. P. Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action? *J Leukoc Biol*, 69: 414-418, 2001.
168. Caldefie-Chezet, F., Poulin, A., and Vasson, M. P. Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. *Free Radic Res*, 37: 809-814, 2003.
169. Mancuso, P., Gottschalk, A., Phare, S. M., Peters-Golden, M., Lukacs, N. W., and Huffnagle, G. B. Leptin-deficient mice exhibit impaired host defense in Gram-negative pneumonia. *J Immunol*, 168: 4018-4024, 2002.
170. Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, A. G., Wu, Z., Hellewell, P. G., Weetman, A. P., and Ross, R. J. Leptin indirectly activates human neutrophils via induction of TNF-alpha. *J Immunol*, 172: 1809-1814, 2004.
171. Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, G., Metcalfe, R. A., Bidlingmaier, M., Wu, Z., Ajami, A., Weetman, A. P., Strasburger, C. J., and Ross, R. J. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J Immunol*, 167: 4593-4599, 2001.
172. Dixit, V. D., Mielenz, M., Taub, D. D., and Parvizi, N. Leptin induces growth hormone secretion from peripheral blood mononuclear cells via a protein kinase C- and nitric oxide-dependent mechanism. *Endocrinology*, 144: 5595-5603, 2003.
173. Siegmund, B., Lear-Kaul, K. C., Faggioni, R., and Fantuzzi, G. Leptin deficiency, not obesity, protects mice from Con A-induced hepatitis. *Eur J Immunol*, 32: 552-560, 2002.
174. Zhao, Y., Sun, R., You, L., Gao, C., and Tian, Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 300: 247-252, 2003.
175. Tian, Z., Sun, R., Wei, H., and Gao, B. Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 298: 297-302, 2002.
176. Juge-Aubry, C. E. and Meier, C. A. Immunomodulatory actions of leptin. *Mol Cell Endocrinol*, 194: 1-7, 2002.
177. Sanchez-Margalet, V., Martin-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R., Najib, S., and Gonzalez-Yanes, C. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp Immunol*, 133: 11-19, 2003.
178. Najib, S. and Sanchez-Margalet, V. Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of p42/44 MAPK pathway. *Cell Immunol*, 220: 143-149, 2002.
179. van den Brink, G. R., O'Toole, T., Hardwick, J. C., van den Boogaardt, D. E., Versteeg, H. H., van Deventer, S. J., and Peppelenbosch, M. P. Leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells, activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein (MAP) kinase and p70 S6 kinase. *Mol Cell Biol Res Commun*, 4: 144-150, 2000.
180. Howard, J. K., Lord, G. M., Matarese, G., Vendetti, S., Ghatei, M. A., Ritter, M. A., Lechler, R. I., and Bloom, S. R. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J Clin Invest*, 104: 1051-1059, 1999.
181. Martin-Romero, C. and Sanchez-Margalet, V. Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68. *Cell Immunol*, 212: 83-91, 2001.
182. Lord, G. M., Matarese, G., Howard, J. K., Baker, R. J., Bloom, S. R., and Lechler, R. I. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*, 394: 897-901, 1998.

183. Sanna, V., Di Giacomo, A., La Cava, A., Lechler, R. I., Fontana, S., Zappacosta, S., and Matarese, G. Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. *J Clin Invest*, 111: 241-250, 2003.
184. Busso, N., So, A., Chobaz-Peclat, V., Morard, C., Martinez-Soria, E., Talabot-Ayer, D., and Gabay, C. Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. *J Immunol*, 168: 875-882, 2002.
185. Matarese, G., Sanna, V., Di Giacomo, A., Lord, G. M., Howard, J. K., Bloom, S. R., Lechler, R. I., Fontana, S., and Zappacosta, S. Leptin potentiates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL female mice and confers susceptibility to males. *Eur J Immunol*, 31: 1324-1332, 2001.
186. Matarese, G., Sanna, V., Lechler, R. I., Sarvetnick, N., Fontana, S., Zappacosta, S., and La Cava, A. Leptin accelerates autoimmune diabetes in female NOD mice. *Diabetes*, 51: 1356-1361, 2002.
187. Siegmund, B., Lehr, H. A., and Fantuzzi, G. Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology*, 122: 2011-2025, 2002.
188. Marra, F. and Bertolani, C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*, 50: 957-969, 2009.
189. Tsochatzis, E., Papatheodoridis, G. V., and Archimandritis, A. J. The evolving role of leptin and adiponectin in chronic liver diseases. *Am J Gastroenterol*, 101: 2629-2640, 2006.
190. Otte, C., Otte, J. M., Strodthoff, D., Bornstein, S. R., Folsch, U. R., Monig, H., and Kloehn, S. Expression of leptin and leptin receptor during the development of liver fibrosis and cirrhosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 112: 10-17, 2004.
191. Krawczyk, K., Szczesniak, P., Kumor, A., Jasinska, A., Omulecka, A., Pietruczuk, M., Orszulak-Michalak, D., Sporny, S., and Malecka-Panas, E. Adipohormones as prognostic markers in patients with nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *J Physiol Pharmacol*, 60 Suppl 3: 71-75, 2009.
192. Reinehr, T., Schmidt, C., de Sousa, G., and Andler, W. Association between leptin and transaminases: 1-year follow-up study in 180 overweight children. *Metabolism*, 58: 497-503, 2009.
193. Canbakan, B., Tahan, V., Balci, H., Hatemi, I., Erer, B., Ozbay, G., Sut, N., Hacibekiroglu, M., Imeryuz, N., and Senturk, H. Leptin in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol*, 7: 249-254, 2008.
194. Saxena, N. K., Titus, M. A., Ding, X., Floyd, J., Srinivasan, S., Sitaraman, S. V., and Anania, F. A. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *Faseb J*, 18: 1612-1614, 2004.
195. Zhan, S. S., Jiang, J. X., Wu, J., Halsted, C., Friedman, S. L., Zern, M. A., and Torok, N. J. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology*, 43: 435-443, 2006.
196. Jiang, J. X., Mikami, K., Shah, V. H., and Torok, N. J. Leptin induces phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells via a Rho guanosine triphosphatase-dependent mechanism. *Hepatology*, 48: 1497-1505, 2008.
197. Aleffi, S., Petrai, I., Bertolani, C., Parola, M., Colombatto, S., Novo, E., Vizzutti, F., Anania, F. A., Milani, S., Rombouts, K., Laffi, G., Pinzani, M., and Marra, F. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 42: 1339-1348, 2005.
198. Ikejima, K., Honda, H., Yoshikawa, M., Hirose, M., Kitamura, T., Takei, Y., and Sato, N. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in

- the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology*, 34: 288-297, 2001.
199. Elinav, E., Ali, M., Bruck, R., Brazowski, E., Phillips, A., Shapira, Y., Katz, M., Solomon, G., Halpern, Z., and Gertler, A. Competitive inhibition of leptin signaling results in amelioration of liver fibrosis through modulation of stellate cell function. *Hepatology*, 49: 278-286, 2009.
 200. Wang, J., Leclercq, I., Brymora, J. M., Xu, N., Ramezani-Moghadam, M., London, R. M., Brigstock, D., and George, J. Kupffer cells mediate leptin-induced liver fibrosis. *Gastroenterology*, 137: 713-723, 2009.
 201. Cayon, A., Crespo, J., Mayorga, M., Guerra, A., and Pons-Romero, F. Increased expression of Ob-Rb and its relationship with the overexpression of TGF-beta1 and the stage of fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int*, 26: 1065-1071, 2006.
 202. Reyes, M. R., Lazalde, B., Posadas del Rio, F. A., and Escalante, B. Identification of leptin gene expression in sinusoidal endothelial rat liver cells. *Endothelium*, 15: 121-125, 2008.
 203. Waris, G. and Siddiqui, A. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J Biosci*, 28: 311-321, 2003.
 204. Crespo, J., Rivero, M., Fabrega, E., Cayon, A., Amado, J. A., Garcia-Unzeta, M. T., and Pons-Romero, F. Plasma leptin and TNF-alpha levels in chronic hepatitis C patients and their relationship to hepatic fibrosis. *Dig Dis Sci*, 47: 1604-1610, 2002.
 205. Liu, Z. W., Zhang, N., Han, Q. Y., Zeng, J. T., Chu, Y. L., Qiu, J. M., Wang, Y. W., Ma, L. T., and Wang, X. Q. Correlation of serum leptin levels with anthropometric and metabolic parameters and biochemical liver function in Chinese patients with chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*, 11: 3357-3362, 2005.
 206. Romero-Gomez, M., Castellano-Megias, V. M., Grande, L., Irlles, J. A., Cruz, M., Nogales, M. C., Alcon, J. C., and Robles, A. Serum leptin levels correlate with hepatic steatosis in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*, 98: 1135-1141, 2003.
 207. Giannini, E., Ceppa, P., Botta, F., Mastracci, L., Romagnoli, P., Comino, I., Pasini, A., Risso, D., Lantieri, P. B., Icardi, G., Barreca, T., and Testa, R. Leptin has no role in determining severity of steatosis and fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*, 95: 3211-3217, 2000.
 208. Lin, S. Y., Wang, Y. Y., and Sheu, W. H. Increased serum leptin concentrations correlate with soluble tumour necrosis factor receptor levels in patients with cirrhosis. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 57: 805-811, 2002.
 209. Manolakopoulos, S., Bethanis, S., Liapi, C., Stripeli, F., Sklavos, P., Margeli, A., Christidou, A., Katsanika, A., Vogiatazakis, E., Tzourmakliotis, D., and Theocharis, S. An assessment of serum leptin levels in patients with chronic viral hepatitis: a prospective study. *BMC Gastroenterol*, 7: 17, 2007.
 210. Ockenga, J., Tietge, U. J., Boker, K. H., Manns, M. P., Brabant, G., and Bahr, M. J. Distinct roles of free leptin, bound leptin and soluble leptin receptor during the metabolic-inflammatory response in patients with liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*, 25: 1301-1309, 2007.
 211. Klein, S., Wadden, T., and Sugerman, H. J. AGA technical review on obesity. *Gastroenterology*, 123: 882-932, 2002.
 212. Garofalo, C. and Surmacz, E. Leptin and cancer. *J Cell Physiol*, 207: 12-22, 2006.
 213. Somasundar, P., Yu, A. K., Vona-Davis, L., and McFadden, D. W. Differential effects of leptin on cancer in vitro. *J Surg Res*, 113: 50-55, 2003.
 214. Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., and Thun, M. J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*, 348: 1625-1638, 2003.

215. Han, C., Zhang, H. T., Du, L., Liu, X., Jing, J., Zhao, X., Yang, X., and Tian, B. Serum levels of leptin, insulin, and lipids in relation to breast cancer in china. *Endocrine*, 26: 19-24, 2005.
216. Tessitore, L., Vizio, B., Jenkins, O., De Stefano, I., Ritossa, C., Argiles, J. M., Benedetto, C., and Mussa, A. Leptin expression in colorectal and breast cancer patients. *Int J Mol Med*, 5: 421-426, 2000.
217. Sauter, E. R., Garofalo, C., Hewett, J., Hewett, J. E., Morelli, C., and Surmacz, E. Leptin expression in breast nipple aspirate fluid (NAF) and serum is influenced by body mass index (BMI) but not by the presence of breast cancer. *Horm Metab Res*, 36: 336-340, 2004.
218. Stattin, P., Soderberg, S., Biessy, C., Lenner, P., Hallmans, G., Kaaks, R., and Olsson, T. Plasma leptin and breast cancer risk: a prospective study in northern Sweden. *Breast Cancer Res Treat*, 86: 191-196, 2004.
219. Jiang, H., Yu, J., Guo, H., Song, H., and Chen, S. Upregulation of survivin by leptin/STAT3 signaling in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 368: 1-5, 2008.
220. Saxena, N. K., Vertino, P. M., Anania, F. A., and Sharma, D. leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *J Biol Chem*, 282: 13316-13325, 2007.
221. Yin, N., Wang, D., Zhang, H., Yi, X., Sun, X., Shi, B., Wu, H., Wu, G., Wang, X., and Shang, Y. Molecular mechanisms involved in the growth stimulation of breast cancer cells by leptin. *Cancer Res*, 64: 5870-5875, 2004.
222. Calle, E. E. and Thun, M. J. Obesity and cancer. *Oncogene*, 23: 6365-6378, 2004.
223. Petridou, E., Belehri, M., Dessypris, N., Koukoulomatis, P., Diakomanolis, E., Spanos, E., and Trichopoulos, D. Leptin and body mass index in relation to endometrial cancer risk. *Ann Nutr Metab*, 46: 147-151, 2002.
224. Popovic, V., Micic, D., Danjanovic, S., Zoric, S., Djurovic, M., Obradovic, S., Petakov, M., Dieguez, C., and Casanueva, F. F. Serum leptin and insulin concentrations in patients with insulinoma before and after surgery. *Eur J Endocrinol*, 138: 86-88, 1998.
225. Stattin, P., Kaaks, R., Johansson, R., Gislefoss, R., Soderberg, S., Alfthan, H., Stenman, U. H., Jellum, E., and Olsson, T. Plasma leptin is not associated with prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12: 474-475, 2003.
226. Stattin, P., Palmqvist, R., Soderberg, S., Biessy, C., Ardnor, B., Hallmans, G., Kaaks, R., and Olsson, T. Plasma leptin and colorectal cancer risk: a prospective study in Northern Sweden. *Oncol Rep*, 10: 2015-2021, 2003.
227. Yuan, S. S., Tsai, K. B., Chung, Y. F., Chan, T. F., Yeh, Y. T., Tsai, L. Y., and Su, J. H. Aberrant expression and possible involvement of the leptin receptor in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 92: 769-775, 2004.
228. Caldwell, S. H., Crespo, D. M., Kang, H. S., and Al-Osaimi, A. M. Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127: S97-103, 2004.
229. El-Serag, H. B. Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States. *Gastroenterology*, 127: S27-34, 2004.
230. Moller, H., Mellemgaard, A., Lindvig, K., and Olsen, J. H. Obesity and cancer risk: a Danish record-linkage study. *Eur J Cancer*, 30A: 344-350, 1994.
231. Qian, Y. and Fan, J. G. Obesity, fatty liver and liver cancer. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 4: 173-177, 2005.
232. Regimbeau, J. M., Colombat, M., Mognol, P., Durand, F., Abdalla, E., Degott, C., Degos, F., Farges, O., and Belghiti, J. Obesity and diabetes as a risk factor for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl*, 10: S69-73, 2004.

233. Nair, S., Mason, A., Eason, J., Loss, G., and Perrillo, R. P. Is obesity an independent risk factor for hepatocellular carcinoma in cirrhosis? *Hepatology*, 36: 150-155, 2002.
234. Park, E. J., Lee, J. H., Yu, G. Y., He, G., Ali, S. R., Holzer, R. G., Osterreicher, C. H., Takahashi, H., and Karin, M. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*, 140: 197-208.
235. Kitade, M., Yoshiji, H., Kojima, H., Ikenaka, Y., Noguchi, R., Kaji, K., Yoshii, J., Yanase, K., Namisaki, T., Asada, K., Yamazaki, M., Tsujimoto, T., Akahane, T., Uemura, M., and Fukui, H. Leptin-mediated neovascularization is a prerequisite for progression of nonalcoholic steatohepatitis in rats. *Hepatology*, 44: 983-991, 2006.
236. Ribatti, D., Belloni, A. S., Nico, B., Di Comite, M., Crivellato, E., and Vacca, A. Leptin-leptin receptor are involved in angiogenesis in human hepatocellular carcinoma. *Peptides*, 29: 1596-1602, 2008.
237. Saxena, N. K., Sharma, D., Ding, X., Lin, S., Marra, F., Merlin, D., and Anania, F. A. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*, 67: 2497-2507, 2007.
238. Chen, C., Chang, Y. C., Liu, C. L., Liu, T. P., Chang, K. J., and Guo, I. C. Leptin induces proliferation and anti-apoptosis in human hepatocarcinoma cells by up-regulating cyclin D1 and down-regulating Bax via a Janus kinase 2-linked pathway. *Endocr Relat Cancer*, 14: 513-529, 2007.
239. Wang, S. N., Chuang, S. C., Yeh, Y. T., Yang, S. F., Chai, C. Y., Chen, W. T., Kuo, K. K., Chen, J. S., and Lee, K. T. Potential prognostic value of leptin receptor in hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol*, 59: 1267-1271, 2006.
240. Ren, H., Zhao, T., Wang, X., Gao, C., Wang, J., Yu, M., and Hao, J. Leptin upregulates telomerase activity and transcription of human telomerase reverse transcriptase in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 394: 59-63.
241. Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., and Wu, J. R. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 6622-6626, 1988.
242. Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 97: 503-514, 1999.
243. Blackburn, E. H. Structure and function of telomeres. *Nature*, 350: 569-573, 1991.
244. Kirk, K. E., Harmon, B. P., Reichardt, I. K., Sedat, J. W., and Blackburn, E. H. Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation. *Science*, 275: 1478-1481, 1997.
245. Meyerson, M. Role of telomerase in normal and cancer cells. *J Clin Oncol*, 18: 2626-2634, 2000.
246. Shay, J. W. and Wright, W. E. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1: 72-76, 2000.
247. Greider, C. W. and Blackburn, E. H. Tracking telomerase. *Cell*, 116: S83-86, 81 p following S86, 2004.
248. Beattie, T. L., Zhou, W., Robinson, M. O., and Harrington, L. Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol*, 8: 177-180, 1998.
249. Chan, S. R. and Blackburn, E. H. Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 359: 109-121, 2004.
250. Sharma, G. G., Gupta, A., Wang, H., Scherthan, H., Dhar, S., Gandhi, V., Iliakis, G., Shay, J. W., Young, C. S., and Pandita, T. K. hTERT associates

- with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene*, 22: 131-146, 2003.
251. Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T. R. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, 276: 561-567, 1997.
 252. Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., and Shay, J. W. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*, 18: 173-179, 1996.
 253. Harada, K., Yasoshima, M., Ozaki, S., Sanzen, T., and Nakanuma, Y. PCR and in situ hybridization studies of telomerase subunits in human non-neoplastic livers. *J Pathol*, 193: 210-217, 2001.
 254. Nakashio, R., Kitamoto, M., Tahara, H., Nakanishi, T., Ide, T., and Kajiyama, G. Significance of telomerase activity in the diagnosis of small differentiated hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 74: 141-147, 1997.
 255. Tahara, H., Nakanishi, T., Kitamoto, M., Nakashio, R., Shay, J. W., Tahara, E., Kajiyama, G., and Ide, T. Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res*, 55: 2734-2736, 1995.
 256. Bruix, J., Sherman, M., Llovet, J. M., Beaugrand, M., Lencioni, R., Burroughs, A. K., Christensen, E., Pagliaro, L., Colombo, M., and Rodes, J. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol*, 35: 421-430, 2001.
 257. Caplen, N. J. A new approach to the inhibition of gene expression. *Trends Biotechnol*, 20: 49-51, 2002.
 258. Hannon, G. J. RNA interference. *Nature*, 418: 244-251, 2002.
 259. Sullenger, B. A. and Gilboa, E. Emerging clinical applications of RNA. *Nature*, 418: 252-258, 2002.
 260. Plasterk, R. H. RNA silencing: the genome's immune system. *Science*, 296: 1263-1265, 2002.
 261. Jagus, R., Joshi, B., and Barber, G. N. PKR, apoptosis and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 31: 123-138, 1999.
 262. Brummelkamp, T. R., Bernards, R., and Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296: 550-553, 2002.
 263. Konnikova, L., Simeone, M. C., Kruger, M. M., Kotecki, M., and Cochran, B. H. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells. *Cancer Res*, 65: 6516-6520, 2005.
 264. Xu, D., Popov, N., Hou, M., Wang, Q., Bjorkholm, M., Gruber, A., Menkel, A. R., and Henriksson, M. Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 3826-3831, 2001.
 265. Lawrence, T., Hageman, T., and Balkwill, F. Cancer. Sex, cytokines, and cancer. *Science*, 317: 51-52, 2007.
 266. Meisser, A., Cameo, P., Islami, D., Campana, A., and Bischof, P. Effects of interleukin-6 (IL-6) on cytotrophoblastic cells. *Mol Hum Reprod*, 5: 1055-1058, 1999.
 267. Nakamura, K., Yuh, K., Sugyo, S., Shijo, H., Kimura, N., and Okumura, M. Apoptosis observed in peripheral T lymphocytes from patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 111: 156-164, 1996.
 268. Soguero, C., Joo, M., Chianese-Bullock, K. A., Nguyen, D. T., Tung, K., and Hahn, Y. S. Hepatitis C virus core protein leads to immune suppression and liver damage in a transgenic murine model. *J Virol*, 76: 9345-9354, 2002.

269. Taya, N., Torimoto, Y., Shindo, M., Hirai, K., Hasebe, C., and Kohgo, Y. Fas-mediated apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in patients with hepatitis C. *Br J Haematol*, 110: 89-97, 2000.
270. Ozata, M., Ozdemir, I. C., and Licinio, J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab*, 84: 3686-3695, 1999.
271. Goldberg, A. C., Goldberg-Eliaschewitz, F., Sogayar, M. C., Genre, J., and Rizzo, L. V. Leptin and the immune response: an active player or an innocent bystander? *Ann N Y Acad Sci*, 1153: 184-192, 2009.
272. Satra, M., Dalekos, G. N., Kollia, P., Vamvakopoulos, N., and Tsezou, A. Telomerase reverse transcriptase mRNA expression in peripheral lymphocytes of patients with chronic HBV and HCV infections. *J Viral Hepat*, 12: 488-493, 2005.
273. Tu, H., Pan, W., Feucht, L., and Kastin, A. J. Convergent trafficking pattern of leptin after endocytosis mediated by ObRa-ObRd. *J Cell Physiol*, 212: 215-222, 2007.
274. You, J., Yu, Y., Jiang, L., Li, W., Yu, X., Gonzalez, L., Yang, G., Ke, Z., Li, W., Li, C., and Liu, Y. Signaling through Tyr985 of leptin receptor as an age/diet-dependent switch in the regulation of energy balance. *Mol Cell Biol*, 30: 1650-1659.
275. Ichiki, Y., Aoki, C. A., Bowlus, C. L., Shimoda, S., Ishibashi, H., and Gershwin, M. E. T cell immunity in autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev*, 4: 315-321, 2005.
276. Greco, A. V., Mingrone, G., Favuzzi, A., Capristo, E., Gniuli, D., Addolorato, G., Brunani, A., Cavagnin, F., and Gasbarrini, G. Serum leptin levels in post-hepatitis liver cirrhosis. *J Hepatol*, 33: 38-42, 2000.
277. Testa, R., Franceschini, R., Giannini, E., Cataldi, A., Botta, F., Fasoli, A., Tenerelli, P., Rolandi, E., and Barreca, T. Serum leptin levels in patients with viral chronic hepatitis or liver cirrhosis. *J Hepatol*, 33: 33-37, 2000.
278. Fan, X. G., Huang, Y., Tang, F. Q., and Yi, H. Telomerase activity of peripheral blood lymphocytes in patients with chronic hepatitis B. *Immunol Lett*, 73: 7-11, 2000.
279. Wang, S. N., Lee, K. T., and Ker, C. G. Leptin in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 16: 5801-5809.
280. Adams, L. A. and Lindor, K. D. Nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Epidemiol*, 17: 863-869, 2007.
281. Choi, S. S., Syn, W. K., Karaca, G. F., Omenetti, A., Moylan, C. A., Witek, R. P., Agboola, K. M., Jung, Y., Michelotti, G. A., and Diehl, A. M. Leptin promotes the myofibroblastic phenotype in hepatic stellate cells by activating the hedgehog pathway. *J Biol Chem*, 285: 36551-36560.
282. Zhou, Y., Jia, X., Qin, J., Lu, C., Zhu, H., Li, X., Han, X., and Sun, X. Leptin inhibits PPARgamma gene expression in hepatic stellate cells in the mouse model of liver damage. *Mol Cell Endocrinol*, 323: 193-200.
283. Fujimoto, Y., Hampton, L. L., Wirth, P. J., Wang, N. J., Xie, J. P., and Thorgeirsson, S. S. Alterations of tumor suppressor genes and allelic losses in human hepatocellular carcinomas in China. *Cancer Res*, 54: 281-285, 1994.
284. Rudolph, K. L., Chang, S., Millard, M., Schreiber-Agus, N., and DePinho, R. A. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science*, 287: 1253-1258, 2000.
285. Stefanou, N., Papanikolaou, V., Furukawa, Y., Nakamura, Y., and Tsezou, A. Leptin as a critical regulator of hepatocellular carcinoma development

- through modulation of human telomerase reverse transcriptase. *BMC Cancer*, 10: 442.
286. Nakatake, M., Kakiuchi, Y., Sasaki, N., Murakami-Murofushi, K., and Yamada, O. STAT3 and PKC differentially regulate telomerase activity during megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Cell Cycle*, 6: 1496-1501, 2007.
 287. Levy, D. E. and Darnell, J. E., Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 651-662, 2002.
 288. Inghirami, G., Chiarle, R., Simmons, W. J., Piva, R., Schlessinger, K., and Levy, D. E. New and old functions of STAT3: a pivotal target for individualized treatment of cancer. *Cell Cycle*, 4: 1131-1133, 2005.
 289. Basu, A., Meyer, K., Lai, K. K., Saito, K., Di Bisceglie, A. M., Grosso, L. E., Ray, R. B., and Ray, R. Microarray analyses and molecular profiling of Stat3 signaling pathway induced by hepatitis C virus core protein in human hepatocytes. *Virology*, 349: 347-358, 2006.
 290. Gove, M. E., Rhodes, D. H., Pini, M., van Baal, J. W., Sennello, J. A., Fayad, R., Cabay, R. J., Myers, M. G., Jr., and Fantuzzi, G. Role of leptin receptor-induced STAT3 signaling in modulation of intestinal and hepatic inflammation in mice. *J Leukoc Biol*, 85: 491-496, 2009.
 291. Liu, L., Lai, S., Andrews, L. G., and Tollefsbol, T. O. Genetic and epigenetic modulation of telomerase activity in development and disease. *Gene*, 340: 1-10, 2004.
 292. Iliopoulos, D., Satra, M., Drakaki, A., Poultides, G. A., and Tsezou, A. Epigenetic regulation of hTERT promoter in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol*, 34: 391-399, 2009.
 293. Prieto, J. Inflammation, HCC and sex: IL-6 in the centre of the triangle. *J Hepatol*, 48: 380-381, 2008.
 294. Naugler, W. E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A. M., and Karin, M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science*, 317: 121-124, 2007.
 295. Maccio, A., Madeddu, C., Massa, D., Astara, G., Farci, D., Melis, G. B., and Mantovani, G. Interleukin-6 and leptin as markers of energy metabolic changes in advanced ovarian cancer patients. *J Cell Mol Med*, 13: 3951-3959, 2009.
 296. Fenton, J. I., Hursting, S. D., Perkins, S. N., and Hord, N. G. Interleukin-6 production induced by leptin treatment promotes cell proliferation in an Apc (Min/+) colon epithelial cell line. *Carcinogenesis*, 27: 1507-1515, 2006.
 297. Mantovani, G. Circulating interleukin-6 as a tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Ann Oncol*, 19: 1355, 2008.
 298. Akiyama, M., Hideshima, T., Hayashi, T., Tai, Y. T., Mitsiades, C. S., Mitsiades, N., Chauhan, D., Richardson, P., Munshi, N. C., and Anderson, K. C. Cytokines modulate telomerase activity in a human multiple myeloma cell line. *Cancer Res*, 62: 3876-3882, 2002.
 299. Li, H. and Liu, J. P. Mechanisms of action of TGF-beta in cancer: evidence for Smad3 as a repressor of the hTERT gene. *Ann N Y Acad Sci*, 1114: 56-68, 2007.
 300. Kim, J. H., Kim, T. H., Jang, J. W., Jang, Y. J., Lee, K. H., and Lee, S. T. Analysis of matrix metalloproteinase mRNAs expressed in hepatocellular carcinoma cell lines. *Mol Cells*, 12: 32-40, 2001.
 301. Gao, Z. H., Tretiakova, M. S., Liu, W. H., Gong, C., Farris, P. D., and Hart, J. Association of E-cadherin, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of metalloproteinases with the progression and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol*, 19: 533-540, 2006.
 302. Ogasawara, S., Yano, H., Momosaki, S., Nishida, N., Takemoto, Y., Kojiro, S., and Kojiro, M. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in cultured

- hepatocellular carcinoma (HCC) cells and surgically resected HCC tissues. *Oncol Rep*, 13: 1043-1048, 2005.
303. Chung, T. W., Moon, S. K., Lee, Y. C., Kim, J. G., Ko, J. H., and Kim, C. H. Enhanced expression of matrix metalloproteinase-9 by hepatitis B virus infection in liver cells. *Arch Biochem Biophys*, 408: 147-154, 2002.
 304. Ishii, Y., Nakasato, Y., Kobayashi, S., Yamazaki, Y., and Aoki, T. A study on angiogenesis-related matrix metalloproteinase networks in primary hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 22: 461-470, 2003.
 305. Simopoulou, T., Malizos, K. N., Iliopoulos, D., Stefanou, N., Papatheodorou, L., Ioannou, M., and Tsezou, A. Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthritis Cartilage*, 15: 872-883, 2007.
 306. Cao, Q., Mak, K. M., and Lieber, C. S. Leptin represses matrix metalloproteinase-1 gene expression in LX2 human hepatic stellate cells. *J Hepatol*, 46: 124-133, 2007.
 307. Dannenberg, L. O. and Edenberg, H. J. Epigenetics of gene expression in human hepatoma cells: expression profiling the response to inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *BMC Genomics*, 7: 181, 2006.
 308. Csordas, A. On the biological role of histone acetylation. *Biochem J*, 265: 23-38, 1990.
 309. The EASL jury : EASL International Consensus Conference on Hepatitis B, 13-14 September 2002, Geneva, Switzerland. Consensus statement (short version). *J. Hepatol*, 38: 533-540, 2003.
 310. Green, FL., Page, DL., Flemming, ID. Liver. *AJCC cancer staging handbook*. American Joint Committee on Cancer (including intrahepatic bile ducts), 6th ed, NY Springer, 121-144, 2002.