

**Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ ΤΗΣ
ΣΕ ΟΓΚΟΥΣ ΤΟΥ ΕΣΩ ΓΕΝΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ
ΤΗΣ ΓΥΝΑΙΚΑΣ**

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Χατζηθεοφίλου Κωνσταντίνος, Πρωτοβαθμιος Καθηγητης Χειουργικης, Τμημα
Ιατρικης Πανεπιστημιου Θεσσαλιας

Μεσσηνης Ιωαννης, Πρωτοβαθμιος Καθηγητης Μαιευτικης και Γυναικολογιας,
Τμημα Ιατρικης Πανεπιστημιου Θεσσαλιας

Κολλία Παναγουλα, Επικουρη Καθηγήτρια Μοριακής γενετικής του Ανθρώπου,
Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Ιστορική αναδρομή

Η λεπτίνη και ο λιπώδης ιστός

2. Φυσιολογία της λεπτίνης

Βιολογικοί ρυθμοί

Αποβολή από τον οργανισμό

3. Ο ευρύτερος ρόλος της λεπτίνης

4. Οι υποδοχείς της λεπτίνης

Οι βραχείς ισότυποι του υποδοχέα. Η δράση της λεπτίνης στην περιφέρεια.

5. Νευροενδοκρινικός άξονας και λεπτίνη

6. Λεπτίνη και ήβη

7. Ο ρόλος της λεπτίνης στην περιφέρεια - η δράση της στην ωοθήκη

8. Η λεπτίνη στα δύο φύλα

9. Αλληλεπίδραση με ορμόνες και φάρμακα

10. Λεπτίνη και παθολογικές καταστάσεις

11. Λεπτίνη και καρκινογένεση

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

12.ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

13.Η ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ :

14.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

15.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

16.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Περίληψη

Summary

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Πρόλογος

Η τύχη έπαιξε πολλές φορές το ρόλο της στην πρόοδο της επιστήμης. Ένα τυχαίο γεγονός σε συνδυασμό με τις προσεκτικές παρατηρήσεις ενός ερευνητή πριν από μισό αιώνα , στάθηκε η αιτία να ανακαλυφθεί μια καινούργια ορμόνη, που ακούει στο όνομα λεπτίνη. Η αρχική διαπίστωση ότι η πλήρης έλλειψή της σχετίζεται με παθολογική παχυσαρκία σε πειραματόζωα, αλλά και στον άνθρωπο δημιούργησε μεγάλο ενθουσιασμό. Η παχυσαρκία ωστόσο αποδείχτηκε πολυσύνθετο φαινόμενο και η λεπτίνη αποτελεί μια από τις βασικές συνιστώσες του. Η έρευνα όμως πάνω στη δομή, τους υποδοχείς και τη φυσιολογία της ορμόνης οδήγησε στην ανακάλυψη και άλλων δράσεων της. Πολλές από αυτές είναι πιθανό να αποκτήσουν στο μέλλον σπουδαία κλινική σημασία και να οδηγήσουν σε ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών. Ένα τέτοιο πεδίο έρευνας αποτελεί και η σχέση της λεπτίνης με την

καρκινογένεση. Η παρούσα εργασία αναφέρεται στο ζήτημα αυτό και εστιάζει στην έκφραση των υποδοχέων της λεπτίνης σε όγκους του εσω γεννητικού συστήματος της γυναίκας.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Ιστορική αναδρομή

Στα 1950, μια γενετική μετάλλαξη εμφανίστηκε αυτόματα στην αποικία ποντικών που βρισκόταν εργαστήριο Jackson, στο Bar Harbor στο Maine. Θεωρήθηκε ότι αυτό το τυχαίο γεγονός ίσως έμελλε να είναι το κλειδί για την κατανόηση και τη θεραπεία ακραίων τύπων παχυσαρκίας. Τα ποντίκια που ήταν ομόζυγα για αυτό το μεταλλαγμένο γονίδιο (ob) ήταν ιδιαίτερα παχύσαρκα, και ζύγιζαν περίπου τρεις φορές το βάρος ενός συνηθισμένου ποντικού. Αυτά τα ομόζυγα ποντίκια να φέρονται συχνά ως ob/ob ποντίκια (1).

Τα ob/ob ποντίκια τρώνε πιο πολύ και μετατρέπουν τις θερμίδες σε λίπος πιο αποτελεσματικά απ' ό,τι τα φυσιολογικά ποντίκια (της ομάδας ελέγχου) και χρησιμοποιούν τις θερμίδες του λίπους τους πιο αποδοτικά. Τα ποντίκια αυτά παρουσίαζαν παχυσαρκίας σε συνδυασμό με διαβήτη και υπερινσουλιναίμια κατά το

πρότυπο του διαβήτη Τύπου 2 που παρατηρείται στον άνθρωπο. Διατυπώθηκε η υπόθεση ότι από τα *ob/ob* ποντίκια. έλειπε μια σημαντική ορμόνη που φυσιολογικά εμποδίζει το σχηματισμό του λίπους.

Πειραματικά δεδομένα «υπαινίχθησαν», ήδη από το 1978, ότι το γονίδιο *ob* κωδικοποιούσε ή ήταν υπεύθυνο για τη γένεση ενός κυκλοφορούντος παράγοντα ο οποίος ρυθμίζει την ενεργειακή ισορροπία και ότι το γονίδιο *db* κωδικοποιούσε τον υποδοχέα αυτού του παράγοντα Υπολειπόμενες μεταλλάξεις στα γονίδια *ob(obese)* και *db(diabetes)* των ποντικών συνεπάγονται την εμφάνιση παχυσαρκίας και διαβήτη σε ένα σύνδρομο που προσομοιάζει στη νοσογόνο παχυσαρκία του ανθρώπινου είδους. Οι μύες *ob/ob* και *db/db* έχουν ταυτόσημους φαινοτύπους, όντας τρεις φορές βαρύτεροι από τους φυσιολογικούς (ακόμα και όταν έχουν την ίδια διαίτα) και επιδεικνύοντας πενταπλάσια αύξηση του περιεχόμενου σωματικού λίπους. Ωστόσο, αυτά τα συμπεράσματα αντιμετωπίστηκαν με ιδιαίτερο σκεπτικισμό από πολλούς επιστήμονες και η επιβεβαίωσή τους έπρεπε να αναμένει την κλωνοποίηση των γονιδίων *ob* και *db*. Πραγματοποιήθηκαν επίσης πειράματα μεταξύ φυσιολογικών και *ob/ob* ποντικών. Σε αυτό το είδος των πειραμάτων, δύο ποντίκια συνδέονται χειρουργικά κατά τέτοιο τρόπο ώστε να έχουν κοινό κυκλοφορικό σύστημα (*ob/ob*-φυσιολογικό) το παχύσαρκο ποντίκι έχασε βάρος, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη κυκλοφορούσας ορμόνης *ob* (2).

Στα 1994, οι Friedman και συν προσδιόρισαν και κλωνοποίησαν το γονίδιο που έχει υποστεί μετάλλαξη στα *ob/ob* ποντίκια.(3). Βρήκαν ότι το γονίδιο αυτό εκφράζεται στα λιποκύτταρα και κωδικοποιεί μια νέα διαλυτή πρωτεΐνη 167 αμινοξέων που ονομάστηκε λεπτίνη. Η λεπτίνη είναι μια πρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους 16-kD, παράγωγο του γονιδίου της παχυσαρκίας (*ob gene*) και εκφράζεται κυρίως στου κυτταρολιπώδη ιστό. Εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7q31.3 του ανθρώπου. Τρωκτικά που

φέρουν μετάλλαξη του συγκεκριμένου γονιδίου εμφανίζουν έντονη παχυσαρκία, σακχαρώδη διαβήτη και υπογονιμότητα (4). Η λεπτίνη εκφράζεται κυρίως στο λιπώδη ιστό και σε χαμηλότερα επίπεδα στο γαστρικό επιθήλιο, στον πλακούντα και αλλού. Τα επίπεδά της στο πλάσμα συσχετίζονται, κατά τρόπο ανάλογο, με τη μάζα του λιπώδους ιστού και μειώνονται μετά την απώλεια σωματικού βάρους

Οι έρευνες έχουν δείξει ότι η λεπτίνη ικανοποιεί τρία κριτήρια ενός λιποσήματος αρνητικής ανάδρασης (5,6):

1. Τα επίπεδα λεπτίνης στο αίμα συσχετίζονται θετικά με τα αποθέματα λίπους στους ανθρώπους και τα άλλα ζώα (7)

2. Ενέσεις με ποσότητες λεπτίνης σε δόσεις που στερούνται παρενεργειών αποδείχτηκε ότι ελαττώνουν τη λήψη τροφής και το σωματικό λίπος στα ob/ob ποντίκια. (8).

3. Υποδοχείς για τη λεπτίνη έχουν βρεθεί στον εγκέφαλο (9).

Παρά την αξιοσημείωτη ιδιότητα της λεπτίνης να αναστρέφει την παχυσαρκία στα ob/ob ποντίκια με ομόζυγη απενεργοποίηση του γονιδίου και να προκαλεί αδυνάτισμα των αγρίου τύπου μυών (wild-type), η λειτουργία της οδού της λεπτίνης δεν περιορίζεται απλά σε έναν άξονα κατά της παχυσαρκίας. Σημαντικά δεδομένα συνηγορούν υπέρ της άποψης ότι τα βασικά επίπεδα της λεπτίνης στην κατάσταση σίτισης χρησιμεύουν ως σήμα της ενεργειακής επάρκειας. Η λεπτίνη προκαλεί καταστολή της όρεξης αλλά και αύξηση της κατανάλωσης ενέργειας λόγω επιτάχυνσης του μεταβολισμού. Όταν δοθεί με ένεση στα ποντίκια ob/ob προκαλεί το αδυνάτισμά τους. Η λεπτίνη ασκεί τη δράση της και στον εγκέφαλο, και συγκεκριμένα στην περιοχή του υποθαλάμου. Η δράση αυτή σχετίζεται τόσο με την πρόσληψη της τροφής (ανορεξιογόνος δράση) όσο και με τη ρύθμιση του ισοζυγίου ενέργειας. Η ανακάλυψη της νέας αυτής ορμόνης προκάλεσε ενθουσιασμό και δημιούργησε αρχικά την αίσθηση

ότι βρισκόμαστε κοντά στη λύση του προβλήματος της παχυσαρκίας. Σύντομα έγινε όμως σαφές ότι η παχυσαρκία του ανθρώπου δεν οφείλεται σε έλλειψη λεπτίνης, κι ότι συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο: οι συγκεντρώσεις της λεπτίνης στο αίμα αυξάνουν ανάλογα προς το βαθμό της παχυσαρκίας (1). Εκείνο που φαίνεται σήμερα πιθανότερο είναι το ότι η παχυσαρκία αποτελεί κατάσταση λεπτινοαντοχής (δηλ. παρά τις υψηλές τιμές της ορμόνης στο αίμα η βιολογική δράση της είναι μικρότερη από την αναμενόμενη). Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι μπορεί να μη φτάνουν επαρκή ποσά λεπτίνης στο κεντρικό νευρικό σύστημα και συγκεκριμένα στον υποθάλαμο όπου ασκείται και η κύρια δράση της ορμόνης.

Θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο της λεπτίνης ευθύνονται για την παχυσαρκία. Ωστόσο, οι γενετικές μεταλλάξεις είναι σπάνιες στους παχύσαρκους ανθρώπους και οι περισσότεροι έχουν υψηλά επίπεδα κυκλοφορούσας λεπτίνης. Ακόμα περισσότερο, οι ενέσεις της λεπτίνης δεν κατέληξαν σε αξιόπιστη μείωση του λίπους σε παχύσαρκα άτομα (10). Παρόλα αυτά, αν και λίγα παχύσαρκα άτομα έχουν μια γενετική μετάλλαξη στο *ob* γονίδιο, η λεπτίνη μπορεί να αποδειχθεί πανάκεια για εκείνους που πράγματι έχουν, όπως φαίνεται στην ακόλουθη περίπτωση.

«.....Η ασθενής είχε κανονικό βάρος γέννησης, αλλά σύντομα άρχισε το βάρος του να αυξάνει με ταχύ ρυθμό. Το κορίτσι ζητούσε να τρωει συνεχώς και γκρίνιαζε όταν δεν το τάιζαν. Ως αποτέλεσμα της μεγάλης παχυσαρκίας, παρουσίασε σκελετικές ανωμαλίες στα κάτω άκρα και χρειάστηκε χειρουργική επέμβαση...». Ήταν εννέα ετών όταν αποτάθηκε σε γιατρό. Τότε ζύγιζε 94.4 κιλά και το βάρος της συνέχιζε να αυξάνει εντυπωσιακά. βρέθηκε να είναι ομόζυγη για το γονίδιο *ob*, και δεν ανιχνεύονταν λεπτίνη στο αίμα. Έτσι, ξεκίνησε θεραπεία με λεπτίνη. Η θεραπεία με λεπτίνη αμέσως ανέστειλε την αύξηση του βάρους. Άρχισε να τρωει λιγότερο, και

έχανε βάρος σταθερά στη διάρκεια των 12 μηνών της μελέτης , σύνολο 16.5 κιλά και σχεδόν όλα από το λίπος , ενώ δεν διαπιστώθηκαν παρενέργειες (11).

Η λεπτίνη και ο λιπώδης ιστός

Η αύξηση της μάζας του λιπώδους ιστού στις περιπτώσεις παχυσαρκίας συνεπάγεται και αύξηση της λεπτίνης. Από την άλλη μεριά η αύξηση της μάζας του λιπώδους ιστού συνεπάγεται αυξημένη απελευθέρωση Ελευθέρων Λιπαρών Οξέων και ενός παράγοντα που λέγεται TNFα (Tumor Necrosis Factor). Αυτές οι ουσίες καθώς και η λεπτίνη ελαττώνουν την ευαισθησία των οργάνων στόχων στην ινσουλίνη (αύξηση της αντίστασης στην ινσουλίνη). Είναι γνωστό ότι ο διαβήτης Τύπου 2 έχει ως κύριο γνώρισμα την αύξηση της ινσουλινοαντίστασης. Γίνεται λοιπόν σαφές ότι η παχυσαρκία προδιαθέτει σε ινσουλινοαντίσταση και μέσω αυτής σε άτομα με γενετική προδιάθεση σε διαβήτη Τύπου 2. Το ερώτημα, λοιπόν το οποίο βασίζεται στη θεαματική βελτίωση της ινσουλινοαντοχής πειραματόζων ob/ob με τη χορήγηση λεπτίνης (12), είναι κατά πόσο ενέχεται η λεπτίνη στην παθογένεση των συνδρόμων ινσουλινοαντοχής στον άνθρωπο (διαβήτης τύπου II, υπέρταση, υπερλιπιδαιμία, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών).

2. Φυσιολογία της λεπτίνης

Βιολογικοί ρυθμοί

Στους ανθρώπους η λεπτίνη εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό κατά ώσεις, με έναν ρυθμό 32 περίπου ώσεων το 24ωρο και ακολουθεί έναν ημερήσιο κύκλο στον άνθρωπο του οποίου τα υψηλότερα επίπεδα παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της νύχτας (13). Τα επίπεδα της λεπτίνης του ορού φτάνουν τη μέγιστη αιχμή τους τις πρώτες πρωινές ώρες και βρίσκονται στο ναδίρ τους κατά το απόγευμα (14,15). Ο ημερήσιος και

«κικάρδιος» ρυθμός έκκρισης είναι χαρακτηριστικό πολλών ορμονών, που βρίσκονται άμεσα ή έμμεσα κάτω από νευροενδοκρινική ρύθμιση. Ο ρυθμός έκκρισης της λεπτίνης είναι παρόμοιος με αυτόν της προλακτίνης, της μελατονίνης (15) και της TSH (16). Από την άλλη, ο ρυθμός έκκρισης της λεπτίνης συσχετίζεται ανάστροφα με αυτόν της αδενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH) και της κορτιζόλης(13). Αυτό είναι υπέρ της άποψης ότι η λεπτίνη στο ΚΝΣ μπορεί να καταστέλλει τον φλοιοεπινεφριδιο-υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα. Επιπρόσθετα, οι ώσεις της λεπτίνης συγχρονίζονται με αυτές της LH και της οιστραδιόλης σε φυσιολογικές γυναίκες (17).

Αποβολή από τον οργανισμό

Η λεπτίνη αποβάλλεται κατά κύριο λόγο από τα νεφρά , τόσο στα ποντίκια όσο και στους ανθρώπους (18). Στα ούρα ανευρίσκονται πολύ μικρές συγκεντρώσεις λεπτίνης, σαν αποτέλεσμα διάσπασης της πρωτεΐνης στους νεφρούς.

3. Ο ευρύτερος ρόλος της λεπτίνης

Τα ποντίκια ob/ob παρουσιάζουν πολλές από τις ανωμαλίες των πειραματοζώων που στερούνται τροφής, όπως η μείωση της θερμοκρασίας του σώματος, η υπερφαγία, η μείωση της κατανάλωσης ενέργειας και της φυσικής δραστηριότητας, η μείωση της ανοσολογικής λειτουργίας και η **υπογονιμότητα**. Η θεραπεία υποκατάστασης με λεπτίνη δρα διορθωτικά σε όλες τις προαναφερθείσες ανωμαλίες. Φαίνεται, επομένως, ότι το ποντίκι ob βρίσκεται σε μια κατάσταση «αντιληφθείσας λιμοκτονίας» και ότι η επακόλουθη βιολογική απόκριση στην παρουσία τροφής οδηγεί σε αύξηση του σωματικού βάρους. Η άποψη ότι τα χαμηλά επίπεδα της λεπτίνης στο πλάσμα σηματοδοτούν την αποστέρηση θρεπτικών συστατικών ενισχύεται από την παρατήρηση ότι η εξωγενής χορήγηση λεπτίνης

προκαλεί εξασθένιση της νευροενδοκρινικής απόκρισης στη στέρηση της τροφής. Η αποστέρηση της τροφής έχει συσχετισθεί με μειωμένη ανοσοποιητική λειτουργία. Η λεπτίνη διορθώνει αυτές τις ανωμαλίες, διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό των CD4⁺T κυττάρων και επάγει την παραγωγή κυτταροκινών από τα T-βοηθητικά κύτταρα τύπου 1 (T-helper-1) (19).

Η λεπτίνη λοιπόν, φάνηκε με την πάροδο των ετών ότι ενέχεται και σε μια σειρά από άλλες ενδιαφέρουσες λειτουργίες και ότι έχει ιδιότητες που βρίσκονται σήμερα υπό εντατική έρευνα. Εκτός της συσχέτισης της λεπτίνης με το σωματικό βάρος και το λιπώδη ιστό, το ενδιαφέρον γι' αυτήν τη κυττοκίνη εκδηλώθηκε και προς άλλες κατευθύνσεις, ούτως ώστε σήμερα έχει διαπιστωθεί ότι η λεπτίνη και οι υποδοχείς της ανευρίσκονται σε όλα σχεδόν τα όργανα και ιστούς του ανθρώπου (20). Ενδεικτικά, ο μαστός, ο γαστρικός βλεννογόνο, το αιμοποιητικό και ανοσοποιητικό σύστημα εκφράζουν τη λεπτίνη και τους υποδοχείς της, η δε λειτουργία της ποικίλει από ιστό σε ιστό και αποτελεί πεδίο συνεχούς έρευνας. Χαρακτηριστικά στο μαστό, συμμετέχει στην ανάπτυξη τόσο του λιπώδους όσο και του αδενικού μέρους αυτού. Επίσης η λεπτίνη αυξάνει γενικά την αγγειογένεση, τη χημειοταξία των ουδετερόφιλων, ενεργοποιεί υποομάδες λεμφοκυττάρων (T-helper cells), ενώ έχει καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Εμπλέκεται επίσης τόσο στη φυσιολογική αναπαραγωγική λειτουργία όσο και στην ωρίμανση των λειτουργιών της αναπαραγωγής κατά την εφηβεία. Όσον αφορά συγκεκριμένα στο γεννητικό σύστημα της γυναίκας, η μήτρα και οι ωθήκες παρουσιάζουν έκφραση της λεπτίνης και υποδοχείς της (21). Η δράση της συνίσταται σε αλληλεπιδράσεις με ορμόνες και ρυθμιστική επίδραση στη λειτουργία του γεννητικού συστήματος μέσω του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – ωθήκες (22,23,24). Ακόμη η λεπτίνη φαίνεται να παίζει

ρόλο στην ωρίμανση του ωαρίου και στην εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο, ενώ παράγεται στον πλακούντα κατά την κύηση (4).

4. Οι υποδοχείς της λεπτίνης

Η λεπτίνη, ως ορμόνη, ενεργοποιεί ειδικό υποδοχέα για να ασκήσει τη δράση της. Υπάρχουν ο μακρύς και οι βραχύς ισότυποι του υποδοχέα της λεπτίνης. Αυτοί οι ισότυποι έχουν διαφορετική εντόπιση και λειτουργία(5,25) . Ο μεγαλύτερος από αυτούς τους υποδοχείς είναι παρόμοιος με την $gp130$, την πλέον συνήθη υπομονάδα που εμπλέκεται στη μεταβίβαση σήματος των κυτοκινών, μεταξύ των οποίων είναι η ιντερλευκίνη—6, και ο ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας (LIF). Η λειτουργία των βραχύτερων τύπων υποδοχέων της λεπτίνης δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί. Ο πιο βραχύς από αυτούς ενεργεί ως φορέας της λεπτίνης στο πλάσμα. Στον εγκέφαλο υποδοχείς της λεπτίνης βρίσκονται εκτός από τον υποθάλαμο και σε άλλες θέσεις όπως π.χ. στην παρεγκεφαλίδα, στο φλοιό, στον ιππόκαμπο, στο θάλαμο, στο χοριοειδές πλέγμα, στο ενδοθήλιο των εγκεφαλικών τριχοειδών (26). Επιπρόσθετα, υποδοχείς της λεπτίνης εκφράζονται και σε περιφερικούς ιστούς όπως οι πνεύμονες, οι νεφροί, το πάγκρεας, τα επινεφρίδια, οι ωοθήκες, τα αιμοποιητικά αρχέγονα κύτταρα και οι σκελετικοί μύες (27,28). Η δομή του μακρού υποδοχέα της λεπτίνης (Ob-Rb) είναι ομόλογη με τη δομή των υποδοχέων της οικογένειας των κυτοκινών τάξης I. Περιλαμβάνει μία μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή από 302 αμινοξέα, μία μικρή υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και ένα περιορισμένο ενδοκυττάριο τμήμα . Ο μακρύς ισότυπος του υποδοχέα της λεπτίνης εκφράζεται κυρίως σε δύο υποθαλαμικούς πυρήνες, τον τοξοειδή και τον παρακοιλιακό, όπου η λεπτίνη φαίνεται να ασκεί την πιο γρήγορη και ισχυρή δράση της (29). Η λεπτίνη επηρεάζει την έκφραση πολλών υποθαλαμικών νευροπεπτιδίων, μέσω

μηχανισμών και οδών, που, μέχρι πρόσφατα, δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί(26,30,31). Οι πιο καλά μελετημένοι στόχοι της λεπτίνης είναι το ισχυρά ορεξιογόνο νευροπεπτίδιο Y (NPY) στον τοξοειδή πυρήνα, όπως και ο εκλυτικός παράγοντας της θυρεοτρόπου (TRH) και η κορτικοτρόπος ορμόνη (CRH) στον παρακλιμακώδη πυρήνα του εγκεφάλου. Ειδικότερα, το NPY ρυθμίζεται ανάστροφα από τη λεπτίνη και το ελαττωμένο NPY ίσως μεσολαβεί στη μείωση της πρόσληψης τροφής, στην αύξηση της δραστηριότητας του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, στην αύξηση της ενεργειακής κατανάλωσης και στην άνοδο του περιφερικού μεταβολικού επιπέδου (32).

Άλλοι στόχοι της λεπτίνης στον υποθάλαμο είναι η ορμόνη που διεγείρει τα μελανοκύτταρα (α -MSH) και οι ανταγωνιστές της [agouti-related protein (AGRP)] (33). Πρόσφατα, έχουν αρχίσει να μελετώνται τα νευροπεπτίδια που μεσολαβούν στη δράση της λεπτίνης στον πλάγιο υποθάλαμο [(Galanin peptide I (GLP-1), Melanin Concentrating Hormone (MCH) , χολεκυστοκινίνη (CCK), ορεξίνες και υποκρετίνες] (33), καθώς και η σχέση της λεπτίνης με αυτά. Τελικά, η λεπτίνη στον εγκέφαλο μπορεί να αλληλεπιδρά και με περιφερικά ερεθίσματα, όπως είναι τα κορτικοστεροειδή (34,36),για να ρυθμίζει την έκφραση υποθαλαμικών νευροπεπτιδίων, συμπεριλαμβανομένου του NPY και της CRH (32). Η έρευνα εστιάζεται στη μελέτη των στόχων της λεπτίνης στον υποθάλαμο, όπως και των μηχανισμών, με τους οποίους η λεπτίνη ρυθμίζει τα υποθαλαμικά νευροπεπτίδια, ώστε να δοθούν απαντήσεις στα ερωτήματά μας για την ενεργειακή ομοιόσταση.

Οι βραχείς ισότυποι του υποδοχέα. Η δράση της λεπτίνης στην περιφέρεια.

Οι βραχείς ισότυποι του υποδοχέα της λεπτίνης (Ob-Ra, Ob-Re, Ob-Rd, Ob-Re, Ob-Rf) μπορούν και αυτοί να μεταβιβάσουν σήματα Αφθονη έκφραση αυτών

των ισότυπων και κυρίως ενός από αυτούς, του Ob-Ra, έχει αποδειχθεί στο χοριοειδές πλέγμα (35) και στο ενδοθήλιο των τριχοειδών του εγκεφάλου (36).

Βραχείς ισότυποι (Ob-Re και Ob-Rd) ανευρίσκονται, επίσης στους πνεύμονες και τους νεφρούς, όπου ίσως μεσολαβούν στην κάθαρση της λεπτίνης (37). Επίσης, ο ισότυπος Ob-Rf εκφράζεται, κυρίως, στο σπλήνα και το θύμο αδένα και ερευνάται η συμμετοχή του στην ανοσιακή απάντηση. Ο βραχύτερος όλων των υποδοχέων (Ob-Re), μετά από απώλεια της υδρόφοβης διαμεμβρανικής περιοχής του, αποτελείται μόνο από το εξωκυττάριο τμήμα και, αφού μετατρέπεται σε διαλυτό ισότοπο του υποδοχέα της λεπτίνης (soluble leptin receptor/sOb-R), ενεργεί σαν φορέας της λεπτίνης στο πλάσμα επηρεάζοντας και την διαθεσιμότητα των ιστών σε λεπτίνη (38,39).

Ο διαλυτός υποδοχέας της λεπτίνης (sOb-R) συνδέεται με τη λεπτίνη με ισχυρή συγγένεια παρόμοια με αυτή των διαμεμβρανικών υποδοχέων (40) και αντιπροσωπεύει στον ορό την κύρια δυνατότητα σύνδεσης της λεπτίνης (41). Πρόσφατες μελέτες σε τρωκτικά δείχνουν ότι ο sOb-R ρυθμίζει τα επίπεδα της λεπτίνης του ορού επιβραδύνοντας την κάθαρση της από τους νεφρούς και καθορίζει το ποσοστό της ελεύθερης προς την δεσμευμένη λεπτίνη του ορού (42). Με τα μέχρι στιγμής δεδομένα, φαίνεται ότι ο sOb-R παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία της ενεργειακής ομοιόστασης στα τρωκτικά και τους ανθρώπους (42,43). Εκτός από την παχυσαρκία τα επίπεδα του sOb-R έχουν άμεση συσχέτιση με τις γεννητικές ορμόνες οιστραδιόλη και τεστοστερόνη, ενώ η ελεύθερη κυκλοφορούσα λεπτίνη επηρεάζεται από την ινσουλίνη.

Υπάρχουν ιστοί, όπως οι σκελετικοί μύες, όπου εκφράζονται όλοι υπότυποι του υποδοχέα της λεπτίνης, τόσο ο μακρύς και ο βραχύς ισότυπος. Ο ειδικός ρόλος του καθένα τους στους σκελετικούς μύες δεν έχει ακόμη ξεκαθαριστεί. Όπως,

επίσης, δεν έχει ξεκαθαρίσει ο ρόλος των υποδοχέων της λεπτίνης στην αιμοποίηση και στην ανάπτυξη, παρόλο που υπάρχει η σκέψη ότι η λεπτίνη παίζει ένα σημαντικό ρόλο και στις δύο (28).

5. Νευροενδοκρινικός άξονας και λεπτίνη

Η λεπτίνη έχει σχέση και με τη δραστηριότητα του φλοιοεπινεφριδικού άξονα στον άνθρωπο σε φυσιολογικές καταστάσεις (44). Το εύρημα αυτό, σε συνδυασμό με την αύξηση της λεπτίνης του ορού μετά από τη χορήγηση φαρμακολογικών δόσεων γλυκοκορτικοειδών, υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μηχανισμού αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης μεταξύ του φλοιοεπινεφριδικού άξονα και της λεπτίνης.

Επιπλέον, η λεπτίνη δείχνει να παίζει σημαντικό ρόλο και στη ρύθμιση του υποθαλαμο-υποφυσιακού-γοναδικού άξονα. Στα ποντίκια ob/ob, που φέρουν μία μετάλλαξη στο γονίδιο ob και πάσχουν από παχυσαρκία και στειρότητα (45,46), η χορήγηση λεπτίνης ενεργοποιεί το αναπαραγωγικό σύστημα και αποκαθιστά τη φυσιολογική γονιμότητα.

Η ύπαρξη φυσιολογικού εμμηνορυσιακού κύκλου στις γυναίκες μαρτυρά τη φυσιολογική λειτουργία του υποθαλαμο-υποφυσιακού-γοναδικού άξονα. Μελέτες έχουν δείξει ότι λεπτίνη μπορεί να επηρεάσει την ανθρώπινη αναπαραγωγή με πολλούς τρόπους (47,48,49). Υποδοχείς της λεπτίνης έχουν βρεθεί σε όλο το σώμα συμπεριλαμβανομένου και του υποθαλαμο-υποφυσιακού-γοναδικού άξονα (50). Συγκεκριμένα, mRNA της λεπτίνης και του υποδοχέα Ob-Rb βρέθηκε ότι εκφράζεται στον υποθάλαμο, και μάλιστα σε νευρώνες που διεγείρουν την έκκριση της GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), ορμόνης που απελευθερώνει τις γοναδοτροπίνες (51). Λίγες είναι οι μελέτες που έχουν δείξει την έκφραση υποδοχέων της λεπτίνης σε

νευρώνες που εκκρίνουν GnRH (52). Ωστόσο, η in vitro χορήγηση λεπτίνης σε σειρά νευρικών κυττάρων που εκκρίνουν GnRH οδηγεί σε απελευθέρωση GnRH . Ο μακρύς ισότυπος Ob-Rb του υποδοχέα της λεπτίνης εδράζεται, κυρίως, στον τοξοειδή και στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου, ελέγχοντας ταυτόχρονα τη σεξουαλική συμπεριφορά και την πρόσληψη τροφής (29,53) . Θεωρείται ότι η λεπτίνη μπορεί να διευκολύνει την έκκριση GnRH, κυρίως με τη χρήση έμμεσων μηχανισμών, ενεργώντας μέσω διαμέσων νευρώνων που εκκρίνουν νευροπεπτίδια, όπως είναι το galanin-like peptide (54) και το CART (cocaine and amphetamine regulated transcript peptide) (55,56), καθώς και την υποθαλαμική ορμόνη μελανοκορτίνη (MCH)(57). Επιπρόσθετα, η λεπτίνη μπορεί να αυξάνει την έκκριση του νιτρικού υποξειδίου (NO) από διάμεσους αδρενεργικούς νευρώνες, το οποίο στη συνέχεια απελευθερώνει GnRH από GnRH νευρώνες δρώντας, τόσο στη γουανυλκυκλάση όσο και στηνκυκλοοξυγενάση-1 (58).

6. Λεπτίνη και ήβη

Η λεπτίνη έχει εξίσου σημαντική δράση στη ρύθμιση της **έναρξης της ήβης**. Εξαιρετικά αδύνατες γυναίκες συχνά σταματούν την ωορρηξία και μη φυσιολογικά αδύνατες έφηβες εισέρχονται στην εφηβεία αργότερα από τις σωματικά βαρύτερες συνομήλικές τους, στοιχεία που συνιστούν ενδείξεις ότι ο λιπώδης ιστός μπορεί να παράγει ένα σήμα ρυθμιστικό της αναπαραγωγικής λειτουργίας. Αυτό το σήμα ενδέχεται να είναι η λεπτίνη .Έχει διαπιστωθεί ότι θεραπευτική χορήγησή της σε ποντίκια επιταχύνει την ωρίμανση του αναπαραγωγικού συστήματος του θήλεος και οδηγεί σε πρόωμη έναρξη της αναπαραγωγικής ικανότητας, αλλά πολλά μένουν να διευκρινιστούν ακόμα για το ρόλο της , που μπορεί να είναι μόνον επικουρικός (59).

7. Ο ρόλος της λεπτίνης στην περιφέρεια - η δράση της στην ωοθήκη

Η λεπτίνη δρα επίσης στην ωοθήκη, ενώ τα επίπεδά της παρουσιάζουν διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού εμμηνορυσιακού κύκλου. Υποδοχείς της λεπτίνης έχουν απομονωθεί στην ανθρώπινη ωοθήκη(21,58). Πειράματα δείχνουν ότι η λεπτίνη αναστέλλει τη στεροειδογένεση. Στα βοειδή, η λεπτίνη εξασθενεί την ινσουλινο-προαγόμενη στεροειδογένεση χωρίς να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων(58). Το ίδιο συμβαίνει και για την ινσουλινο-επαγόμενη παραγωγή προγεστερόνης και ανδροστενδιόνης από κοκκώδη κύτταρα και κύτταρα θήκης στα βοειδή. Σ αυτήν την περίπτωση ωστόσο η λεπτίνη ενισχύει τον επαγόμενο από την ινσουλίνη πολλαπλασιασμό αυτών των κυττάρων (60). Η παρουσία της ινσουλίνης φαίνεται να είναι αναγκαία για την εκδήλωση των ρυθμιστικών δράσεων της λεπτίνης, αφού η λεπτίνη αναστέλλει τη διεγερόμενη από τη β -hCG, παραγωγή προγεστερόνης από τα ανθρώπινα ωχρινικά κοκκώδη κύτταρα, μόνο όταν ινσουλίνη είναι παρούσα.(61). Η δράση της λεπτίνης ως τροποποιητικού-ρυθμιστικού παράγοντα επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες. Στους επίμυες, η λεπτίνη εξασθενεί τη συνεργική δράση της FSH και του IGF-1 (insulin like growth factor-1) στην παραγωγή της οιστραδιόλης σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων (62).

Ετσι μετά από μελέτες, βρέθηκε ότι ενώ η δράση της λεπτίνης είναι διεγερτική στην έκκριση των γοναδοτροπινών, οι άμεσες δράσεις της στην ωοθηκική στεροειδογένεση μπορεί να είναι, είτε διεγερτικές είτε ανασταλτικές.

Σε πειράματα, που έγιναν *in vitro*, η δράση της λεπτίνης στην ωοθηκική στεροειδογένεση, φαίνεται να εξαρτάται από την παρουσία της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH). Σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων από ανθρώπινα ωοθυλάκια, η λεπτίνη αναστέλλει την έκκριση οιστραδιόλης, που επάγεται από την LH, ενώ δεν εμφανίζει καμία δράση στην έκκριση της οιστραδιόλης, απουσία της LH(50). Αξιόλογη

αναστολή της συνεργικής δράσης επιτυγχάνεται με συγκεντρώσεις της λεπτίνης παρόμοιες με αυτές που παρατηρούνται σε φυσιολογικά άτομα, ενώ για την πλήρη αναστολή απαιτούνται συγκεντρώσεις της τάξης των 100 ng/ml (επίπεδα παχύσαρκων ατόμων). Στην ίδια μελέτη, σε καλλιέργειες κυττάρων της θήκης των ωοθυλακίων (περιοχή παραγωγής των ανδρογόνων), η λεπτίνη ανέστειλε, με δόσοεξαρτώμενο επίσης τρόπο, την ευοδωτική δράση του IGF-1 στην έκκριση της ανδροστενδιόνης, η οποία προηγουμένως είχε διεγερθεί από την LH (63).

Ωστόσο, σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες, πρόσφατα δεδομένα, έχουν δείξει και ένα μάλλον διεγερτικό παρά ανασταλτικό αποτέλεσμα της δράσης της λεπτίνης στην στεροειδογένεση. Σε καλλιέργειες ανθρώπινων ωχρινικών κοκκωδών κυττάρων, η λεπτίνη ήταν ικανή να διεγείρει την παραγωγή οιστραδιόλης, ίσως μέσω αύξησης του mRNA του P450(64) . Συνεπώς οι ερευνητές συμφωνούν ως προς την τροποποιητική δράση της λεπτίνης στην έκκριση των ωοθηκικών στεροειδών , δεν έχει ωστόσο αποσαφηνιστεί , αν ο ρόλος αυτός είναι τελικά ευοδωτικός ή ανασταλτικός, ούτε έχει ακόμα εξακριβωθεί ο ρόλος της στη φυσιολογική λειτουργία της ωοθήκης.

Εκτός από την ωοθήκη, υποδοχείς της λεπτίνης έχουν απομονωθεί και στους όρχεις πειραματόζων (65, όπου η λεπτίνη προκάλεσε παρόμοια δράση με τη δράση της στην ωοθήκη. Η χορήγηση λεπτίνης σε κύτταρα Leydig αρουραίων, σε δόσεις που κυμάνθηκαν από 2-500 ng/ml, προκάλεσε δόσοεξαρτώμενη αναστολή στην έκκριση τεστοστερόνης (επαγόμενης από β-HCG)(65).

In vitro δεδομένα, δείχνουν την ικανότητα της λεπτίνης να διεγείρει την έκκριση GnRH από τον υποθάλαμο και την απελευθέρωση LH και FSH από την πρόσθια υπόφυση, αποτελέσματα στα οποία διαμεσολαβεί το υποξείδιο του αζώτου (NO) (66,67). Κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης, του φυσιολογικού εμμηνορρυσιακού κύκλου, δεν βρέθηκε ξεκάθαρη σχέση ανάμεσα

στη στα βασικά επίπεδα της λεπτίνης και στις συγκεντρώσεις των γοναδοτροπινών (68). Εντούτοις, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα, η λεπτίνη να κατέχει ένα φυσιολογικό ρόλο στην έκκριση των γοναδοτροπινών, από τη στιγμή, που σε φυσιολογικές γυναίκες έχει εξακριβωθεί η ύπαρξη κατά τη νύχτα, ταυτόχρονων εκκριτικών παλμών της λεπτίνης και της LH, κατά τη διάρκεια της μέσης και της όψιμης ωοθυλακικής φάσης του κύκλου(17) .

Σε μια μελέτη των επιπέδων της λεπτίνης του ορού, ωοθηκεκτομηθέντων γυναικών, αυτά μειώθηκαν κατά τη διάρκεια τεσσάρων ημερών, μετά την επέμβαση (69). Αυτή η μείωση ανεστάλη μόνο σε ομάδα γυναικών, που έλαβε αμέσως μετά την επέμβαση, το συνδυασμό οιστραδιόλης μαζί με προγεστερόνη και όχι σε ομάδα γυναικών, που έλαβε μόνο οιστραδιόλη (70) . Σε αυτές τις γυναίκες, παρατηρήθηκε 24 ώρες μετά την ωοθηκεκτομή μία προσωρινή αύξηση των επιπέδων της λεπτίνης, ταυτόχρονα με σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων της προγεστερόνης και της κορτιζόλης και έντονη μείωση της οιστραδιόλης (70). Βέβαια, στις περιπτώσεις που η προγεστερόνη χορηγήθηκε μόνη της, τόσο *in vitro* δεν διεγείρει την έκκριση λεπτίνης από τον λιπώδη ιστό του επιπλόου γυναικών (71), όσο και *in vivo*, δεν κατάφερε να προάγει την έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης στο λιπώδη ιστό ωοθηκεκτομηθέντων αρουραίων (72). Άρα, είναι μάλλον απίθανη, μία αυτόνομη δράση της προγεστερόνης και το πιθανότερο είναι να υπάρχει συνεργική δράση των δύο ορμονών, της προγεστερόνης και της κορτιζόλης, στην έκκριση της λεπτίνης.

Σε πειραματόζωα, η έκφραση του mRNA του γονιδίου *ob* στον υποδόριο και οπισθοπεριτοναϊκό λιπώδη ιστό μειώθηκε αισθητά 8 εβδομάδες μετά ωοθηκεκτομή (73). Την ίδια χρονική στιγμή, οι συγκεντρώσεις της λεπτίνης στον ορό ήταν σημαντικά χαμηλότερες στα ωοθηκεκτομηθέντα ζώα από ότι στα ζώα ελέγχου.

Φαίνεται ότι η παραγωγή της λεπτίνης από τον λιπώδη ιστό διεγείρεται από ένα ωοθηκικό διαμεσολαβητή, αφού η θεραπεία των ωοθηκεκτομήθέντων ζώων με οιστραδιόλη, απέτρεπε τη μείωση τόσο της έκφρασης του mRNA του γονιδίου ob όσο και της συγκέντρωσης της λεπτίνης στον ορό (73). Περαιτέρω μελέτες σε πειραματόζωα κατέδειξαν επίσης την παραπάνω ικανότητα της οιστραδιόλης(74,75,76). Προτείνεται, λοιπόν, η υπόθεση ότι η οιστραδιόλη έχει ένα διεγερτικό αποτέλεσμα στην παραγωγή της λεπτίνης από τα λιπώδη κύτταρα,

Ο ρόλος της οιστραδιόλης στην παραγωγή λεπτίνης έχει εξετασθεί, τόσο σε *in vivo* όσο και σε *in vitro* μελέτες. Η κύρια πηγή λεπτίνης στις γυναίκες βρέθηκε να είναι το υποδόριο λίπος, με μικρή συμβολή και του σπλαχνικού λίπους (77). Οι φυσιολογικές προεμμηνοπαυσιακές και μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές λεπτίνης στον ορό από τους φυσιολογικούς άντρες (73, 78). Αν και, αυτή η διαφορά μπορεί να αποδοθεί στη δράση της οιστραδιόλης πάνω στην παραγωγή λεπτίνης(73), κάποιος μπορεί να διαφωνήσει, υποστηρίζοντας ότι η τεστοστερόνη στους άνδρες προκαλεί τη διαφορά, γιατί αυτή η ορμόνη μπορεί να καταστείλει την παραγωγή της λεπτίνης, όταν δίνεται σε άνδρες, που έχουν υποστεί αλλαγή φύλου (79).

Υπέρ της διεγερτικής δράσης της οιστραδιόλης στην παραγωγή της λεπτίνης, υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι σε καλλιέργειες, δείγματα λιπώδους ιστού προερχόμενου από το επίπλυν γυναικών, παρήγαγαν λεπτίνη σε σημαντικά υψηλότερο ρυθμό από δείγματα λιπώδους ιστού προερχόμενα από το επίπλυν ανδρών(80) . Επιπρόσθετα, η οιστραδιόλη διέγειρε σημαντικά την έκκριση λεπτίνης σε ιστό που ελήφθη από γυναίκες, αλλά δεν επηρέαζε τον ιστό που ελήφθη από άνδρες (80).

8. Η λεπτίνη στα δύο φύλα

Τα επίπεδα της λεπτίνης του ορού είναι πολύ υψηλότερα στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες (81). Διάφορες εξηγήσεις έχουν προταθεί γιαυτό : 1. Οι γυναίκες διαθέτουν ποσοστιαία περισσότερο λίπος σε σχέση με τους άνδρες.

2. Πιθανόν η λεπτίνη να συντίθεται σε περιοχές του λιπώδους ιστού που αντιστοιχούν στη γυναικεία κατανομή (έχουν υψηλότερη αναλογία υποδόριου προς σπλαχνικό λίπος και διαπιστώθηκε ότι ο λόγος του mRNA της λεπτίνης του υποδόριου προς αυτό του σπλαχνικού λίπους είναι πολύ υψηλότερος στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες)(82).

3. Έχει προταθεί ότι οι διαφορές των επιπέδων της λεπτίνης μεταξύ των δύο φύλων πιθανώς να οφείλονται στις διαφορές των επιπέδων των ορμονών των γονάδων, παρότι δεν είναι σαφές αν αυτές οι διαφορές οφείλονται στις υψηλότερες συγκεντρώσεις οιστραδιόλης στις γυναίκες (73) ή στις υψηλότερες συγκεντρώσεις τεστοστερόνης στους άνδρες (83).

4. Οι γυναίκες έχουν υψηλότερα επίπεδα λεπτίνης αλλά χαμηλότερα επίπεδα διαλυτού υποδοχέα της λεπτίνης και, κατά συνέπεια, υψηλότερα επίπεδα ελεύθερης λεπτίνης (84).

5. Ο λιπώδης ιστός στις γυναίκες είναι πιθανόν πιο ευαίσθητος από αυτόν του άρρενος σε ορμόνες όπως η ινσουλίνη και τα γλυκοκορτικοειδή ή σε άλλες ουσίες που διεγείρουν την έκκριση λεπτίνης.

9. Αλληλεπίδραση με ορμόνες και φάρμακα

Ορμόνες και φάρμακα ρυθμίζουν την έκφραση αλλά και την έκκριση της λεπτίνης. Για παράδειγμα, το νέο αντιδιαβητικό φάρμακο τρογλιταζόνη μειώνει την έκφραση της λεπτίνης στα πειραματόζωα (85), αν και στον άνθρωπο η τρογλιταζόνη δεν φαίνεται να επηρεάζει την παραγωγή λεπτίνης *in vivo* (85,86). Η ινσουλίνη είναι μια άλλη ουσία που διεγείρει την έκκριση λεπτίνης στους ανθρώπους τόσο *in vitro* (87) όσο και *in vivo*. Η παρατεταμένη υπερινσουλιναιμία στους ανθρώπους διεγείρει την έκκριση λεπτίνης από απομονωμένα κοιλιακά λιποκύτταρα και αυξάνει τις συγκεντρώσεις της λεπτίνης στην κυκλοφορία (88). Δεν είναι ακόμη απολύτως σαφές κατά πόσο η λεπτίνη είναι αυξημένη σε άτομα με υπερινσουλιναιμία, λόγω ινσουλινοαντοχής (89). Έχει βρεθεί ότι η χορήγηση λεπτίνης βελτιώνει θεαματικά την ινσουλινοαντοχή πειραματόζωων ob/ob, ενώ πειραματικές μελέτες έδειξαν ότι η λεπτίνη μπορεί να μειώσει την παραγωγή, όπως και τη δράση της ινσουλίνης στο ήπαρ, στους μύες και στα λιποκύτταρα (90,91,92,93).

Άλλοι παράγοντες που αυξάνουν την παραγωγή λεπτίνης φαίνεται ότι είναι η ιντερλευκίνη 1 (IL-1), τα γλυκοκορτικοειδή σε φαρμακολογικές δόσεις και ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNFα). Η ιντερλευκίνη 1, όταν δίνεται σε γυναίκες και άνδρες που πάσχουν από καρκίνο, προάγει μια παροδική αύξηση των συγκεντρώσεων της λεπτίνης (94). Αν και υπάρχει μια ανάστροφη συσχέτιση ανάμεσα στον επινεφριδίο-υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα και στις συγκεντρώσεις της λεπτίνης, τα αποτελέσματα χορήγησης των εξωγενών γλυκοκορτικοειδών στην έκκριση της λεπτίνης είναι αντιφατικά, με τις περισσότερες μελέτες να δείχνουν ένα διεγερτικό αποτέλεσμα (95,96). Αντίθετα, το κυκλικό AMP (cAMP) και οι β3-αδρενεργικοί αγωνιστές μειώνουν την έκφραση και τα κυκλοφορούντα επίπεδα λεπτίνης. *In vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση της λεπτίνης μπορεί να μειώνεται μετά από μια αύξηση του ενδοκυττάριου cAMP και αυτό πιθανά εξηγεί τη

μείωση της έκκρισης λεπτίνης στους ανθρώπους μετά από χορήγηση ισοπροτερενόλης (97). Επιπλέον, το κάπνισμα τσιγάρων φαίνεται ότι μειώνει την παραγωγή λεπτίνης, πιθανώς λόγω της ενεργοποίησης του συμπαθητικού νευρικού συστήματος, που συνοδεύει το κάπνισμα (98). Ωστόσο, υπερθυρεοειδικά άτομα που βρίσκονται σε μια λειτουργικά «υπεραδρενεργική» κατάσταση δεν παρουσιάζουν μεταβολές των επιπέδων λεπτίνης του ορού (99) .

Η σωματοστατίνη, επίσης, μειώνει την έκκριση λεπτίνης στους ανθρώπους *in vivo*, πιθανώς μέσω ενός άμεσου αποτελέσματος στα λιποκύτταρα, ενώ το αποτέλεσμα της αυξητικής ορμόνης στην έκκριση της λεπτίνης δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί.

Εντούτοις, η έλλειψη της αυξητικής ορμόνης σε ενήλικες με υποφυσισμό συνδυάζεται με αυξημένες συγκεντρώσεις λεπτίνης, αλλά ο βαθμός της αύξησης είναι μεγαλύτερος από τον αναμενόμενο βαθμό παχυσαρκίας (100). Επίσης, σε φυσιολογικά άτομα μία αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στη λεπτίνη και στην έκκριση της GH έχει βρεθεί, κι έτσι δεν μπορεί να αποκλεισθεί η πιθανότητα η λεπτίνη να προάγει μια σύνδεση μεταξύ λιποκυττάρων και έκκρισης αυξητικής ορμόνης (GH) (101). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, δείχνουν ότι όχι μόνο το αυξημένο πάχος αλλά και η μειωμένη σωματική μάζα οδηγούν στην αύξηση των τιμών της λεπτίνης σε φυσιολογικά άτομα, καθώς και σε άτομα με έλλειψη GH. Είναι λοιπόν πιθανό η λεπτίνη να μεσολαβεί στο κατασταλτικό αποτέλεσμα της σωματικής κατάστασης στην έκκριση της GH σε ηλικιωμένους ασθενείς (101). Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν δεδομένα, από τα οποία μπορούμε να υποθέσουμε ότι και η λεπτίνη ενέχεται στη ρύθμιση της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης (102).

10. Λεπτίνη και παθολογικές καταστάσεις

Πέραν όμως της φυσιολογικής της δράσης, η λεπτίνη εκφράζεται σε παθολογικούς ιστούς όπως της ενδομητρίωσης ενώ συμμετέχει και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η οστεοαρθρίτιδα και η χρόνια νεφρική ανεπάρκεια (103). Στα νεοπλάσματα η έκφραση της λεπτίνης και των υποδοχέων της είναι καθοριστική στην ανάπτυξη τους. Στο αδеноκαρκίνωμα του οισοφάγου αυξάνει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (104). Ομοίως στο μη ανδρογονοεξαρτώμενο καρκίνο του προστάτου αποτελεί αυξητικό παράγοντα (105). Πρόσφατες μελέτες ισχυροποιούν την υπόθεση ότι η λεπτίνη είναι ισχυρός δείκτης κινδύνου για τον ορθοπρωκτικό καρκίνο στους άνδρες (106). Για τους όγκους του γεννητικού συστήματος της γυναίκας δεν υπάρχουν δεδομένα για έκφραση της λεπτίνης ή των υποδοχέων της. Λίγες αναφορές υπάρχουν για τη σχέση μόνο της λεπτίνης στον ορό του αίματος με ορισμένες καλοήθειες κυρίως παθήσεις των έσω γεννητικών οργάνων (107,108,109).

11. Λεπτίνη και καρκινογένεση

Η παχυσαρκία συσχετίζεται με τον καρκίνο του ενδομητρίου, του μαστού, του εντέρου, του προστάτη και της ουροδόχου κύστεως. Το γεγονός αυτό εικάζεται ότι μπορεί να έχει σχέση με την παραγωγή ουσιών από το λιπώδη ιστό όπως είναι τα στεροειδή και η λεπτίνη, ή ο IGF (Insulin Growth Factor). Η αύξηση των παραπάνω παραγόντων διαταράσσει την ισορροπία ανάμεσα στην απόπτωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. υπάρχουν ενδείξεις ότι η λεπτίνη ενέχεται στην καρκινογένεση, όσον αφορά τον καρκίνο του ενδομητρίου. Υποδοχείς της λεπτίνης (βραχείς ισότυποι) εκφράζονται σε καρκινικό ιστό του ενδομητρίου. Η λεπτίνη δρα σαν μιτογόνο και αντιαποπτωτικός παράγοντας σε φυσιολογικά, αλλά και νεοπλαστικά καρκινικά κύτταρα στο παχύ έντερο και στο μαστό. Επίσης η λεπτίνη διαθέτει και αγγειογενετική δράση, παρόμοια με τον αυξητικό παράγοντα του ενδοθηλίου, γεγονός

που μπορεί να ευθύνεται για τη διασπορά του όγκου. Οι υποδοχείς της λεπτίνης διαπιστώθηκε ότι υπερεκφράζονται στον καρκίνο του μαστού και στις λεμφαδενικές του μεταστάσεις (110,111). Σε μελέτη του 2006 δείχτηκε ότι η λεπτίνη επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων από καρκινικό ιστό του ενδομητρίου και αυξάνει την επιθετικότητά τους, όπως προέκυψε από μελέτη αύξησης της διεισδυτικότητας (invasiveness) σε Matrigel στο εργαστήριο. Στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι η φωσφορυλίωση των ERK2 και AKT, απαραίτητη για τη μεταγωγή του ορμονικού μηνύματος εξαρτάτο από την οδό της τυροσινικής κινάσης JAK/STAT. Η αναστολή της παραπάνω οδού ή της φωσφατιδυλ-3 –κινάσης οδηγούσε και σε αναστολή της επαγόμενης από τη λεπτίνη επιθετικότητας των καρκινικών κυττάρων (112). Οι Πετρίδου και συν βρήκαν ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της λεπτίνης ορού και του καρκίνου του ενδομητρίου σε 84 γυναίκες με ιστολογικά βεβαιωμένο καρκίνο του ενδομητρίου (113). Σε μελέτη του 2007 βρέθηκε έκφραση τόσο των υποδοχέων της λεπτίνης (μακρύς ισότυπος), όσο και της ίδιας της ορμόνης σε ποσοστά 30 και 57% αντίστοιχα. Η αποκάλυψη έγινε με ανοσοιστοχημεία, και μπορεί να υποτεθεί μια αυτοκρινής ή παρακρινής δράση της λεπτίνης στους όγκους του ενδομητρίου. Αν και δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το μέγεθος του όγκου, διαπιστώθηκε μία τάση συσχέτισης της λεπτίνης με περισσότερο εκτεταμένους τοπικά και μέτριας διαφοροποίησης όγκους. Στην παραπάνω μελέτη, αλλά και σε άλλες, προγενέστερες, διαπιστώνεται θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση της λεπτίνης και στην ιστική υποξία, η οποία είναι συχνό φαινόμενο στους καρκινικούς όγκους. Και κυρίως στους πιο αγγειοβριθείς και κακοήθης από αυτούς (114,115).

Από τα παραπάνω συνάγεται ότι ο ρόλος της λεπτίνης στην ανάπτυξη και εξέλιξη των όγκων του του γεννητικού συστήματος δεν έχει πλήρως διερευνηθεί.

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν να διερευνηθεί η έκφραση της λεπτίνης και των υποδοχέων της σε όγκους, καλοήθεις και κακοήθεις του γεννητικού συστήματος της γυναίκας και να διερευνηθεί ο ρόλος της ουσίας αυτής στην ανάπτυξη των νεοπλασμάτων αυτών.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

12.ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Από το 2004-2007 ελήφθησαν ιστολογικά δείγματα από 37 ασθενείς. Ο μέσος όρος ηλικίας των γυναικών ήταν τα $54,80 \pm 10,35$ έτη (Ελαχ-μεγ : 32-75 έτη)και ο μέσος όρος του δείκτη μάζα σώματος-BMI- προσδιορίστηκε στο $31,49 \pm 6,43$ Kg/m²(Ελαχ-μεγ : 18,94-50,20 Kg/m²).

Ο τρόπος λήψης των δειγμάτων ήταν ο ακόλουθος:κατά τη διάρκεια προγραμματισμένου χειρουργείου ελαμβάνοντο 2 τεμαχια 1cm έκαστο από παθολογικό και φυσιολογικό ιστό αντιστοίχως.Τα δείγματα αφορούσαν 16 καρκίνους ωοθηκών,15 καρκίνους ενδομητρίου και 2 ινομώματα μήτρας.Εξαιρέθηκαν ασθενείς με προηγούμενη χορήγηση νέο-επικουρικής χημειο-ακτινοθεραπείας Η εξέταση των παρασκευασμάτων για την έκφραση της λεπτίνης και των υποδοχέων της έγινε με τη μέθοδο της RT-PCR. Κατάλληλα κρίθηκαν τελικά 33 δείγματα , τα οποία και τελικά συμπεριελήφθησαν στη μελέτη .

13.Η ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ :

13.1. Απομόνωση RNA από ιστό

Ημέρα πρώτη:

- Λήψη του ιστού και τεμαχισμός
- Προσθήκη RNAsol (με αναλογία 100μl/ 10^6 κυττάρων) και καλή ανάδευση.
- Προσθήκη χλωροφορμίου σε όγκο 1/10 εκείνου του RNAsol και ανάδευση έτσι ώστε το μίγμα να γίνει ομοιογενές.
- Παραμονή στον πάγο για 15 min με περιοδική ανάδευση.
- Φυγοκέντρηση για 15 min στις 1900 rpm σε θερμοκρασία 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση το δείγμα έχει διαχωριστεί στην υποκείμενη φάση που περιέχει φαινόλη-χλωροφόρμιο, στη μεσόφαση και στην υπερκείμενη υδατική φάση. Το RNA έχει απομονωθεί στην υδατική φάση.
- Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε νέο σωληνάριο eppendorf, προσθέτουμε ίσο όγκο ισοπροπυλικής αλκοόλης και φυλάσσουμε overnight στους -20 °C.

Την επόμενη ημέρα:

- Φυγοκέντρηση επί 30' στις 12000 rpm στους 4 °C.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη 1ml αιθανόλης (70%).
- Φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες επί 20'.
- Επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας δύο ακόμη φορές.
- Αφαίρεση του υπερκειμένου.
- Το ίζημα του RNA στεγνώνει και στη συνέχεια διαλύεται σε νερό ελεύθερο από RNάσες.
- Αποθήκευση στους -80°C.
- Για τον έλεγχο της ποιότητας του RNA ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε 2% gel αγαρόζης.
- Ο ποσοτικός έλεγχος του RNA γίνεται με φωτομέτρηση στα 260 και 280nm. Για την φωτομέτρηση αραιώνουμε το RNA. Ο λόγος της απορρόφησης στα 260nm προς την απορρόφηση στα 280 nm πρέπει να κυμαίνεται από 1,7 έως 1,9. Αν είναι μικρότερος τότε έχουμε κακή ποιότητα RNA λόγω προσμίξεων, όπως DNA και πρωτεΐνες. Η συγκέντρωση του RNA (μg/ml) βρίσκεται από τον τύπο $OD_{260} \times 40 \times \text{αραίωση}$.

13.2. Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA με την AMV αντίστροφη μεταγραφάση

- Ανάμειξη του RNA με το ddH₂O
- Επώαση στους 65 °C για 10 min
- Τα δείγματα παραμένουν για 5 λεπτά στον πάγο
- Προσθήκη των υπολοίπων αντιδραστηρίων (παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα).
Οι ποσότητες του υποστρώματος RNA και του νερού υπολογίζονται κατάλληλα ώστε να εξασφαλίζεται 1 µg RNA σε τελικό όγκο cDNA 20 µl.

Συνθήκες της αντίδρασης:

1. 25 °C για 10 λεπτά
2. 42 °C για 60 λεπτά
3. 99°C για 5 λεπτά
4. 4°C

Πίνακας I: Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για τη σύνθεση cDNA μορίων.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ / ΔΕΙΓΜΑ
cDNA	* µl
MgCl ₂ (25 mM)	4.0 µl
ddH ₂ O	* µl
Random Primers	2.0 µl
RNAase inhibitor (50 u/µl)	1.0 µl
AMV (50 u/µl)	0.8 µl
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	20 µl

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, 3μl του προϊόντος cDNA ενισχύθηκαν με PCR (Πίνακας II) χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τις αλληλουχίες του RARα cDNA (RAR6/RAR8, Πίνακας IV).

Συνθήκες αντίδρασης:

-αρχική αποδιάταξη: 94°C, 5 λεπτά

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

φάση αποδιάταξης: 94°C, 1 λεπτό

Πίνακας II . Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την αντίδραση ενίσχυσης RARα.

Αντιδραστήρια	Όγκοι/συγκεντρώσεις
Υπόστρωμα: cDNA	3 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	5 μl
MgCl ₂ (50mM)	2 μl
dNTPs (40mM)	1 μl
RAR6 (10pm/μl)	2 μl
RAR8 (10pm/μl)	2 μl
Taq DNA πολυμεράση (5 units/μl)	0,4 μl
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 50 μl

φάση σύνδεσης εκκινητών: 53°C, 1 λεπτό

φάση επέκτασης μορίων DNA: 72°C, 1 λεπτό

-τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72°C, 10 λεπτά

13.3. Ποιοτική μοριακή ανάλυση της έκφρασης της λεπτίνης και των υποδοχέων *Ra* και *Rb*

Πίνακας III. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την αντίδραση ενίσχυσης των γονιδίων της λεπτίνης και των υποδοχέων *Ra* και *Rb*

	leptin	Ra	Rb
<i>Υπόστρωμα</i>			
<i>Ρυθμιστικό διάλυμα 10x *</i>	5 μ l	5 μ l	5 μ l
<i>DNTPs (40 mM)</i>	1 μ l	1 μ l	1 μ l
<i>Εκκινητές**(10 pm/μl)</i>	Lep1/ Lep2	Ra1/ Ra2	Rb1/ Rb2
<i>Ένζυμο</i>	Taq DNA Πολυμεράση: 2.5 U	Taq Πολυμεράση: 2.5 U	Taq Πολυμεράση: 2.5 U
<i>ddH₂O</i>	μέχρι τελ. όγκου 50 μ l	μέχρι τελ. όγκου 50 μ l	μέχρι τελ. όγκου 50 μ l

* Σύνθεση διαλύματος 10x: 10 mM Tris-HCL pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂

** Αλληλουχίες εκκινητών: βλ. Πίνακα IV

Συνθήκες αντίδρασης:

1. LEPTIN

αρχική αποδιάταξη: 94⁰ C, 5 λεπτά

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 35 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

φάση αποδιάταξης: 94⁰ C, 1 λεπτό

φάση σύνδεσης εκκινητών: 58⁰ C, 1 λεπτό

φάση επέκτασης μορίων DNA: 72⁰ C, 1 λεπτό

-τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72⁰ C, 10 λεπτά

2. Ra

αρχική αποδιάταξη: 94⁰ C, 5 λεπτά

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 30 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

φάση αποδιάταξης: 94⁰ C, 1 λεπτό

φάση σύνδεσης εκκινητών: 57⁰ C, 1 λεπτό

φάση επέκτασης μορίων DNA: 72⁰ C, 1 λεπτό

-τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72⁰ C, 10 λεπτά

3. Rb

αρχική αποδιάταξη: 94⁰ C, 5 λεπτά

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 35 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

φάση αποδιάταξης: 94⁰ C, 1 λεπτό

φάση σύνδεσης εκκινητών: 56⁰ C, 1 λεπτό

φάση επέκτασης μορίων DNA: 72⁰ C, 1 λεπτό

-τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72⁰ C, 10 λεπτά

Για τον έλεγχο της ακρίβειας της αντίδρασης και τον έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων, σε κάθε πείραμα περιλαμβανόταν ένα σωληνάριο που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια εκτός από υπόστρωμα (PCR control), ενώ προκειμένου να διαπιστωθεί η επιτυχής ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου, τα προϊόντα της PCR ελέγχονται με τη διαδικασία τα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης 3%, και τα τμήματα του γονιδίου που ενισχύθηκαν ανιχνεύονται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) αφού προηγουμένως είχαν υποβληθεί σε χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο φάγος φX174 DNA-Hae III Digest (Biolabs). Το μέγεθος του τμήματος του γονιδίου που ενισχύθηκε σε κάθε περίπτωση είναι 499bp για την λεπτίνη, 394 bp για τον Ra και 338 bp για τον Rb.

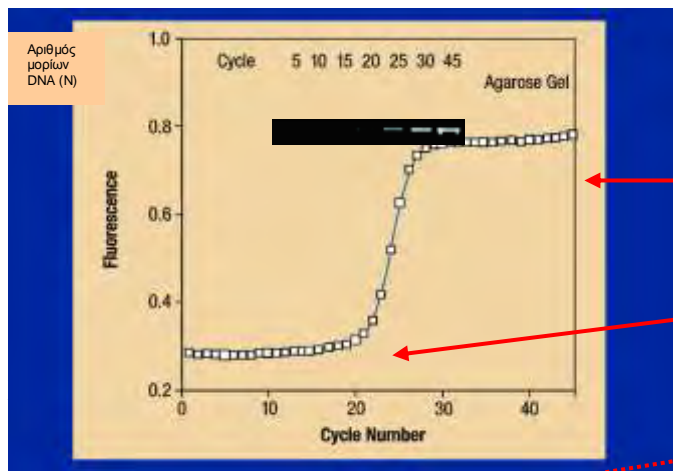
Πίνακας IV. Αλληλουχίες των εκκινητών

Εκκινητής	Αλληλουχία
RAR6	5'-GGTGCCTCCCTACGCCTTCT-3'
RAR8	5'-GGCGCTGACCCCATAGTGGT-3'
Lep1	5'-GCATTGGGGAACCCTGTG-3'
Lep2	5'- AGCACCCAGGGCTGAGGT-3'
Ra1	5'-TGTTGTGAATGTCTTGTGCC-3'
Ra2	5'-TACTCCAGTCACTCCAGATTCC-3'
Rb1	5'-ATAGTTCAGTCACCAAGTGC-3'
Rb2	5'-GTCCTGGAGAACTCTGATGTCC-3'

13.4. Ανάλυση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων του *TfR* με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

4.1. Γενικές αρχές PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

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). Πρόκειται για τη διαδικασία ενίσχυσης μιας DNA αλληλουχίας με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) και ταυτόχρονα της ανίχνευσης του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης Real-time 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. Οι εφαρμογές της RQ-PCR πραγματικού χρόνου είναι πολυάριθμες. Περιλαμβάνουν μελέτες για την έκφραση του mRNA, μετρήσεις αριθμού αντιγράφων σε γενωμικό ή ιϊκό DNA, μετρήσεις αριθμού διαγονιδιακών αντιγράφων, αναφορές για διάκριση αλληλομόρφων και επιβεβαίωση δεδομένων από μικροσυστοιχίες, ποσοτικοποίηση χιμαιρικών μεταγράφων για την ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες και ανάλυση της έκφρασης των κυτταροκινών και πολλών άλλων παραγόντων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ποσοτικοποίηση είναι η ανάλυση γονιδίων αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς δεν πρέπει να διαφέρει ως προς τον αριθμό των αντιγράφων ή το επίπεδο έκφρασης σε σχέση με τα δείγματα υπό μελέτη.



Τελική φάση αντίδρασης

Φάση εκθετικής αύξησης (log

φάσης

Σημείο έναρξης της εκθετικής

Αρχική φάση αύξησης (background)

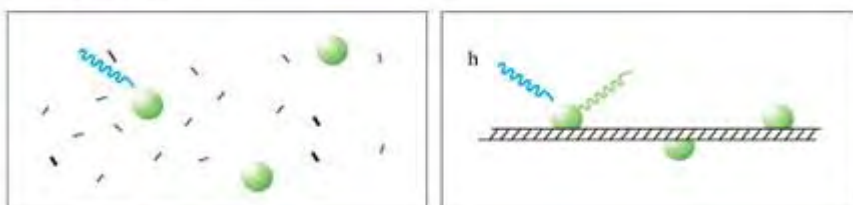
Αριθμός κύκλων
(Cycle number)

Εικ.1: Κινητική της αντίδρασης της PCR.

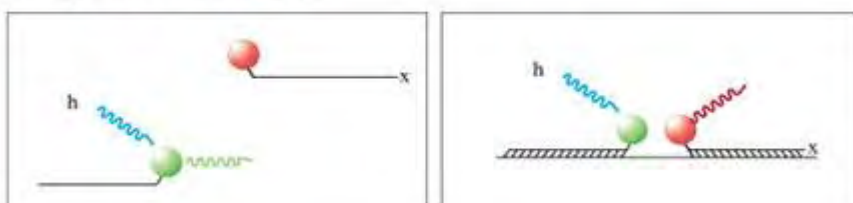
Σήμερα, είναι διαθέσιμες τρεις κύριες παραλλαγές τεχνικών PCR πραγματικού χρόνου (RQ-PCR):

- Ανάλυση με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I
- Ανάλυση με ανιχνευτές υδρόλυσης
- Ανάλυση με ανιχνευτές υβριδισμού (Hybprobes)

I. SYBR Green



II. Hybridization Probes



III. TaqMan Probes



Εικ.2: Παραλλαγές PCR πραγματικού χρόνου. I. Χρωστική SYBR Green. II. Ανιχνευτές υβριδισμού. III. Ανιχνευτές υδρόλυσης.

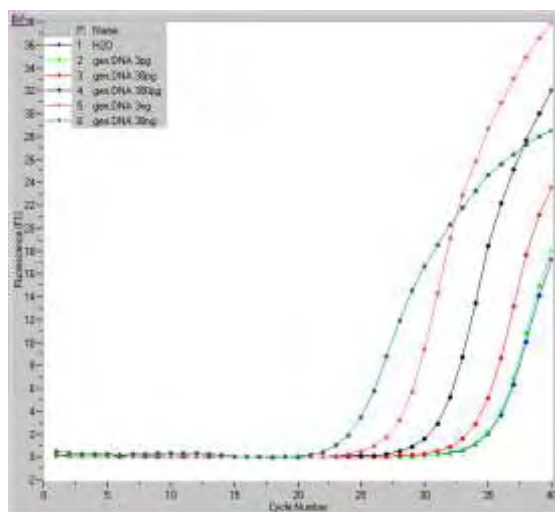
A. Ανάλυση RQ-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I

Η απλούστερη τεχνική RQ-PCR βασίζεται στην ανίχνευση των προϊόντων της PCR μετά την ενσωμάτωση της χρωστικής SYBR Green I στο DNA. Η χρωστική αυτή μπορεί να προσδένεται στη μικρή αλυσίδα του δίκλωνου DNA, όπου ενισχύει σημαντικά τον φθορισμό του. Το σήμα φθορισμού αυξάνει σταδιακά κατά τη διάρκεια της φάσης επιμήκυνσης, γίνεται μέγιστο στο τέλος κάθε αντίστοιχης φάσης και μειώνεται ή εκλείπει κατά τη φάση αποδιάταξης. Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η τεχνική δεν παρουσιάζει απόλυτη εξειδίκευση και ότι ταυτόχρονα μπορεί να ανιχνευθούν διμερή των εκκινητών και μη ειδικά προϊόντα PCR. Προκειμένου να εκτιμηθεί αν έχουν σχηματιστεί ειδικά προϊόντα PCR, πραγματοποιείται ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve). Αν έχει σχηματιστεί μόνο το ειδικό προϊόν PCR, θα είναι ορατή μόνο μια κορυφή στην εικόνα ενδείξεων των σημείων τήξης.

Μόρια SYBR Green I
χρωστικής

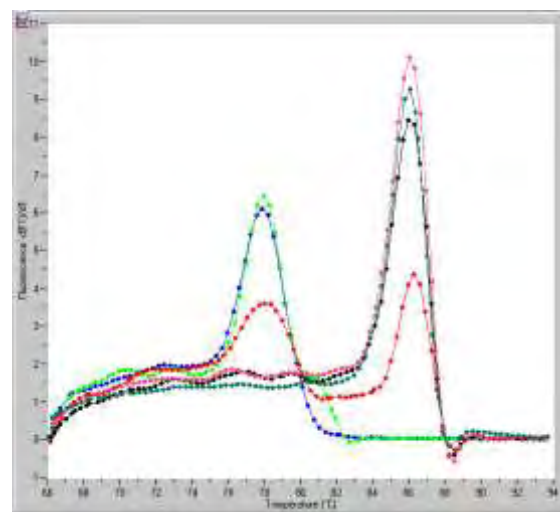


Εικ.3: Η χρωστική SYBR Green I παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και εκπέμπει φθορισμό που ανιχνεύεται από το μηχάνημα.



Ποσοτικοποίηση

PCR



Καμπύλη τήξης των προϊόντων

Εικ.4: Παρακολούθηση της PCR με τη χρήση της SYBR Green I χρωστικής.

B. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης

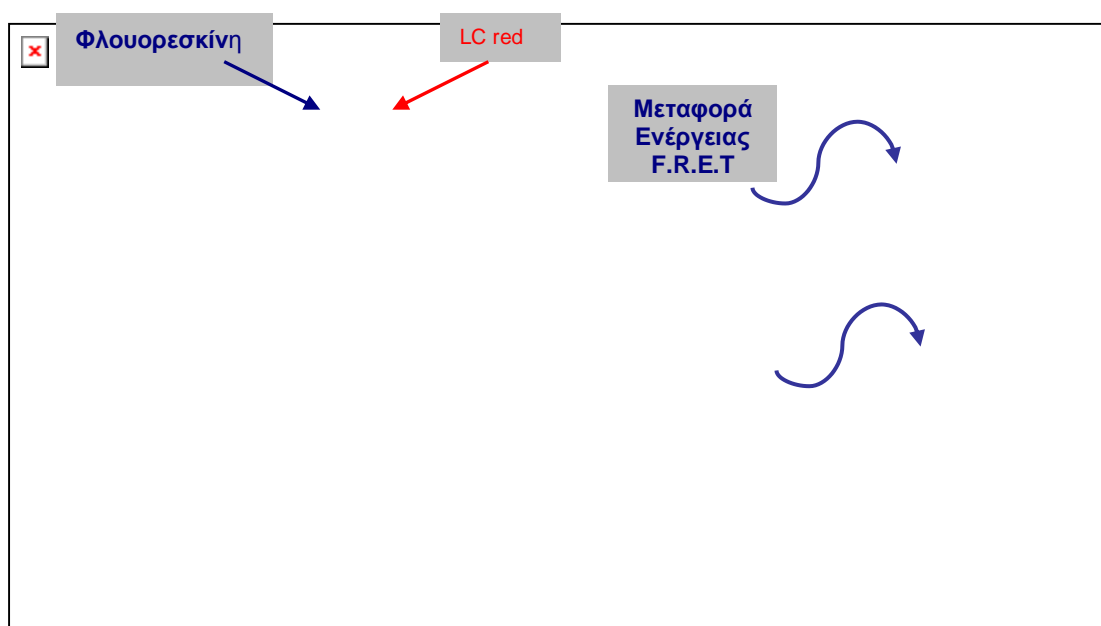
Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης (hydrolysis probes) εκμεταλλεύεται την 5'-3' ενεργότητα εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης για να ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει τα ειδικά προϊόντα PCR που παράγονται καθώς εξελίσσεται η αντίδραση. Ο ανιχνευτής υδρόλυσης είναι συζευγμένος με ένα φθορισμόχρωμα αναφοράς (π.χ. FAM, VIC ή JOE) και με έναν καταστολέα φθορισμοχρώματος (π.χ. TAMRA), ο οποίος θα βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία-στόχο. Καθώς τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται σε μικρή απόσταση, όσο ο ανιχνευτής είναι άθικτος, ο φθορισμός που εκπέμπεται από το φθορισμόχρωμα αναφοράς απορροφάται από τον καταστολέα φθορισμού. Για το λόγο αυτό, κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου, ο ανιχνευτής υδρόλυσης αντικαθίσταται αρχικά από την αλυσίδα DNA μέσω της Taq πολυμεράσης και σταδιακά υδρολύεται από αυτή λόγω της ενεργότητας εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό του φθορισμοχρώματος αναφοράς και του καταστολέα του και επιτρέπει τη σταδιακή ανίχνευση του φθορισμού που επέμπε το φθορισμόχρωμα αναφοράς.



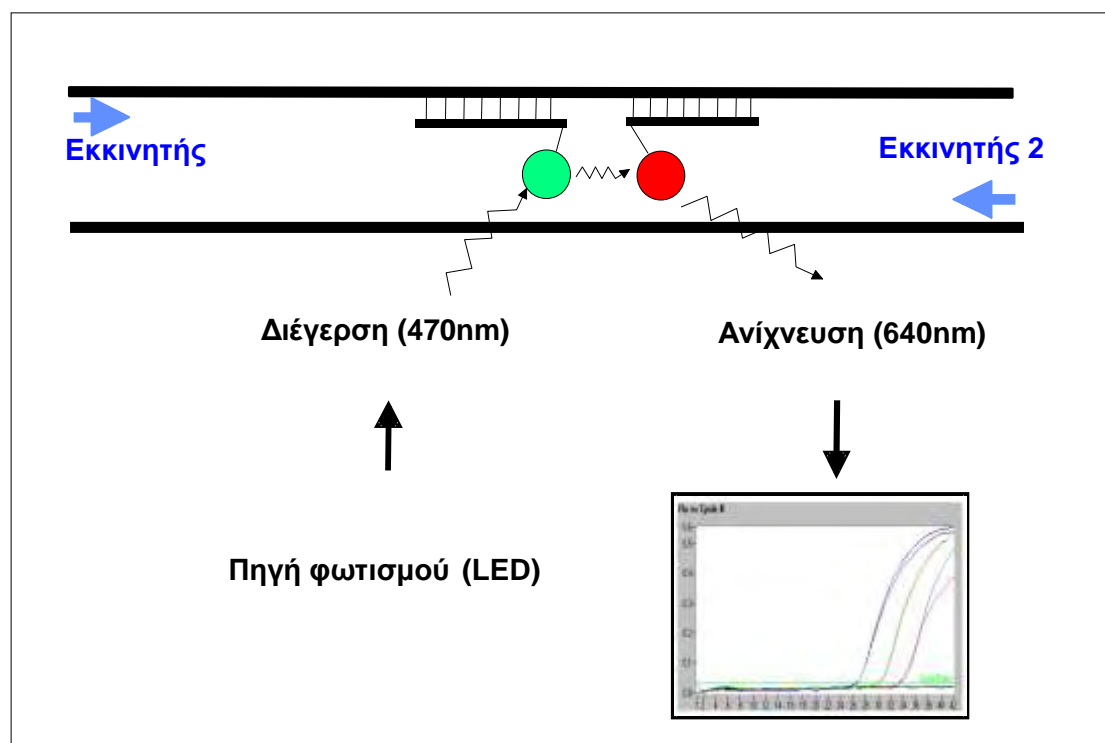
Εικ.5: Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υδρόλυσης.

Γ. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού

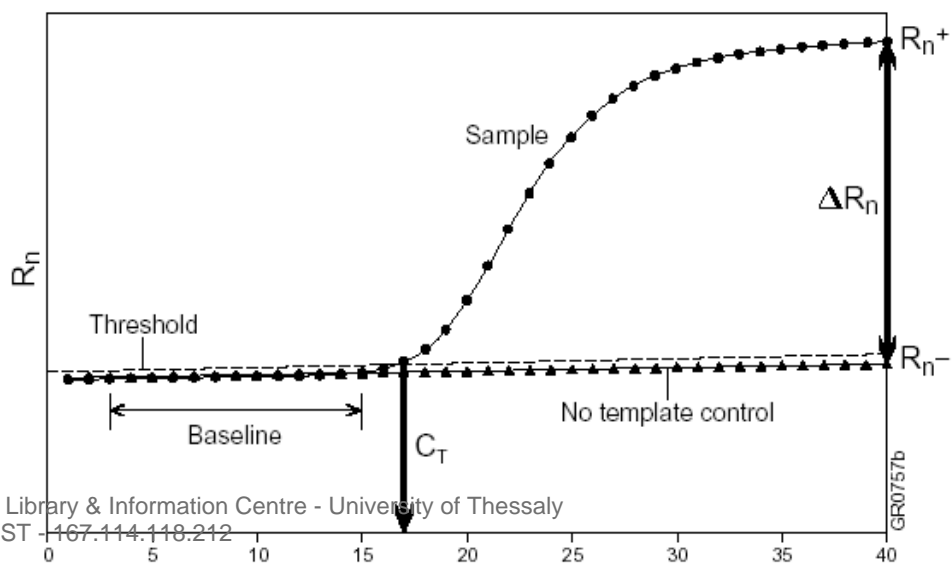
Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτή υβριδισμού χρησιμοποιεί δύο αλληλοεπικαλυπτόμενους ανιχνευτές συγκεκριμένης αλληλουχίας, ο ένας σημασμένος στο 3' άκρο μ' ένα φθορισμόχρωμα-δότη (π.χ. FAM) και ο άλλος σημασμένος στο 5' άκρο μ' ένα φθορισμόχρωμα-δέκτη (π.χ. LC Red 640, LC Red 705). Οι δύο ανιχνευτές υβριδίζονται σε γειτονικές αλληλουχίες-στόχους στο πολυμερισμένο τμήμα DNA: έτσι τα δύο φθορισμοχρώματα συμπλησιάζουν (η απόσταση μεταξύ τους κυμαίνεται από 1-5 νουκλεοτίδια). Κατά τη διέγερση του φθορισμοχρώματος-δότη, εκπέμπεται ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος. Όταν τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται κοντά, το φως που εκπέμπεται από τον δότη θα διεγείρει το φθορισμόχρωμα-δέκτη, διαδικασία που αναφέρεται και ως μεταφορά συντονισμένης ενέργειας φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Αυτό οδηγεί σε εκπομπή του φθορισμού, ο οποίος ανιχνεύεται κατά το στάδιο υβριδοποίησης και στο πρώτο μέρος του σταδίου επιμήκυνσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).



Εικ.6: Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υβριδισμού.



διαχωριστικό σημείο ή ουδός (cut-off level) για τον ειδικό φθορισμό. Αυτό το όριο (ή γραμμή μετάπτωσης) χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο κύκλος μετάπτωσης (C_t) κάθε δείγματος, που είναι ο κύκλος της αντίδρασης PCR στον οποίο ο φθορισμός υπερβαίνει για πρώτη φορά τον ουδό μετάβασης. Η τιμή μετάπτωσης είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό της αλληλουχίας-στόχου που περιέχεται στο δείγμα.

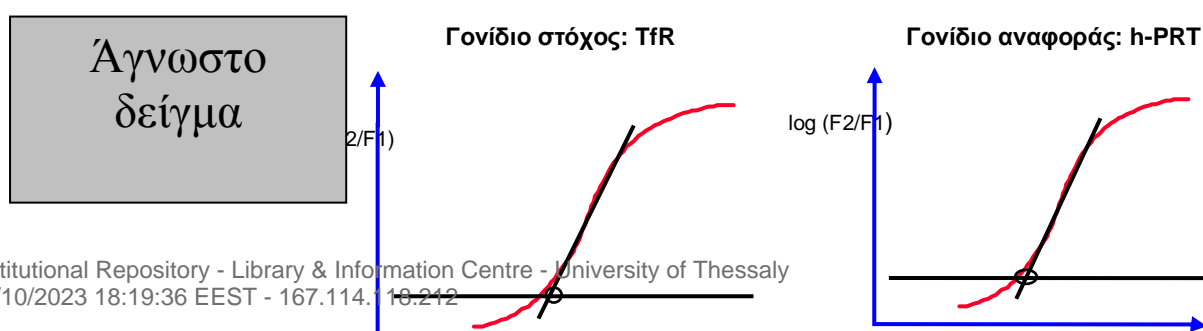


Εικ.8: Ανίχνευση του σήματος φθορισμού. Το σημείο κατά το οποίο το κάθε δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης ορίζεται ως το “κατώφλι” μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (Threshold Cycle ή C_t), είναι στατιστικά σημαντικό και αποτυπώνεται (μετράται) ως σήμα φθορισμού. Η μεταβολή αυτή της συγκέντρωσης γίνεται σε συγκεκριμένο κύκλο και εξαρτάται απόλυτα από την αρχική συγκέντρωση του κάθε δείγματος.

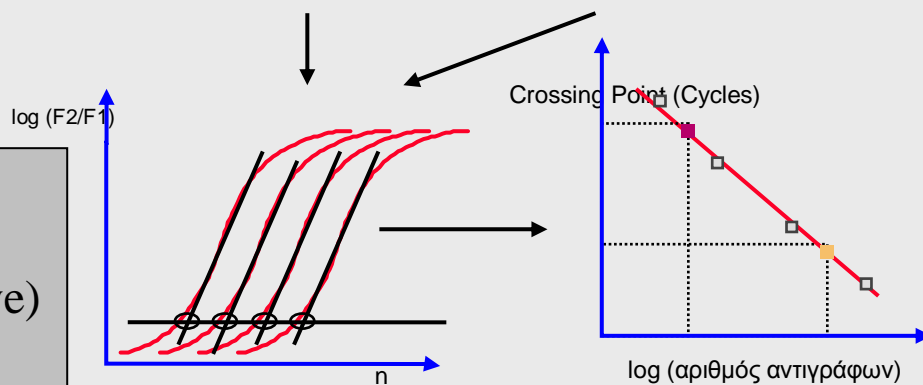
Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί θετικό, εάν η ελάχιστη τιμή μετάπτωσης ενός ή περισσότερων αντιγράφων του δείγματος αυτού είναι καθαρά εκτός κλίμακας των τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων (π.χ. τουλάχιστον κατά έναν κύκλο χαμηλότερα από την κατώτερη ένδειξη που παρουσιάζει ένα μη ειδικά πολυμερισμένο δείγμα) και σε ορισμένη απόσταση (π.χ. τέσσερις κύκλοι) από το τελικό στάδιο διάλυσης που χρησιμοποιείται για να εξασφαλίσει μέγιστη ευαισθησία.

Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό, εφόσον δεν παρατηρείται καθόλου ενίσχυση και όταν η κατώτερη τιμή μετάπτωσης του συγκεκριμένου δείγματος βρίσκεται εντός ή κοντά στην κλίμακα τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι ανάλυσης με την RQ-PCR: η «σχετική» ποσοτικοποίηση και η ποσοτικοποίηση μέσω «πρότυπης καμπύλης» που καλείται επίσης και «απόλυτη» ποσοτικοποίηση.

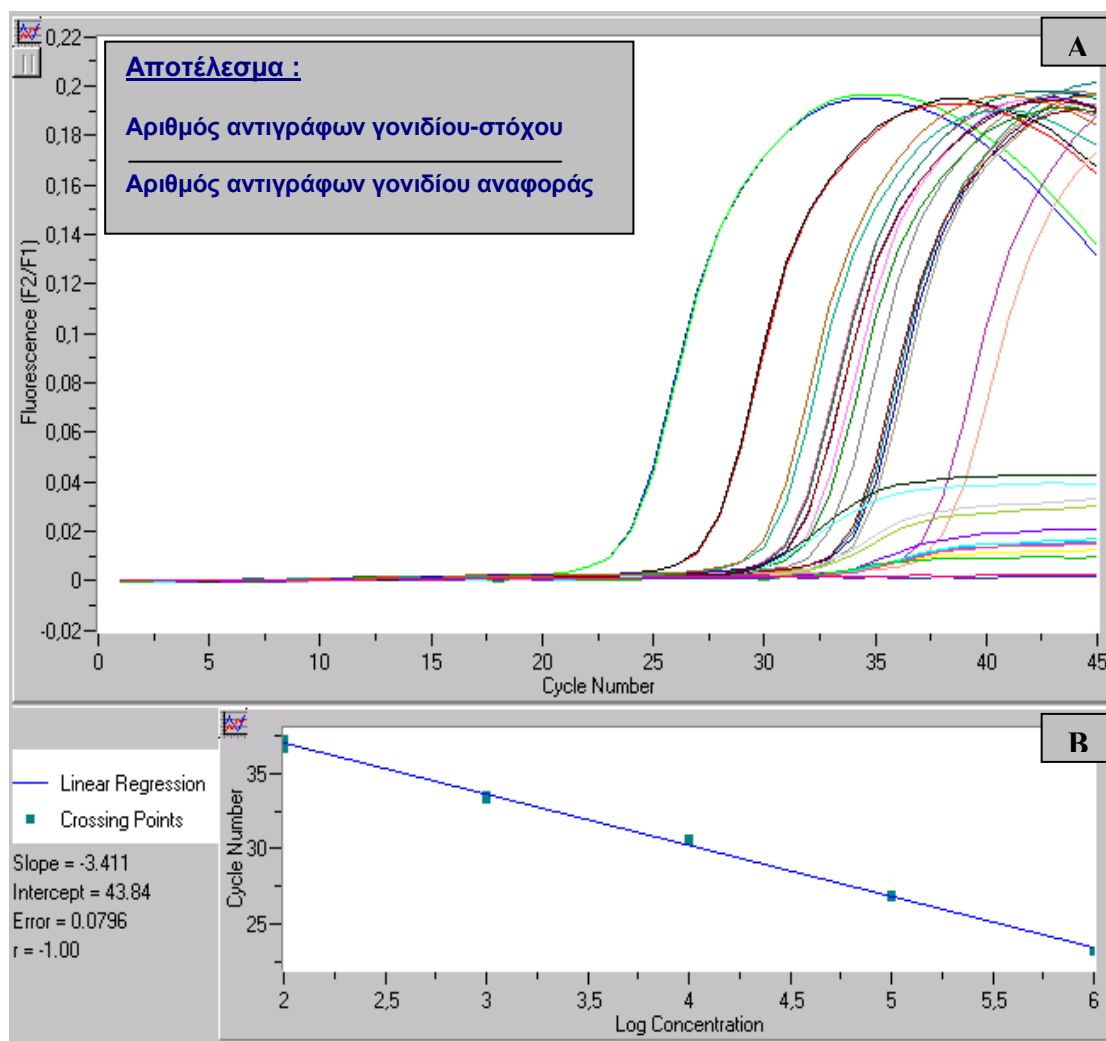
Στη σχετική ποσοτικοποίηση γίνεται σύγκριση ανάμεσα στο δείγμα (DNA ή cDNA) που αφορά το γονίδιο που μας ενδιαφέρει και στο αντίστοιχο δείγμα που χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς. Για να ληφθεί μια στρογγυλοποιημένη τιμή για κάθε δείγμα, διαιρείται η συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου που μας ενδιαφέρει προς τη συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς. Ο λόγος που προκύπτει είναι ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου προς μελέτη ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς.



Καμπύλη
αναφοράς
(standard curve)
h-PRT



Η μέθοδος ποσοτικοποίησης με χρήση πρότυπης καμπύλης εφαρμόζεται επιτυχώς για να μετρηθεί μικρός αριθμός γονιδίων σε λίγα ή πολλά δείγματα καθώς και για να μετρηθεί ο αριθμός των ιικών αντιγράφων σ' ένα δεδομένο δείγμα. Για να ποσοτικοποιηθούν οι στόχοι στα δείγματα υπό μελέτη, κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη (standard curve) με αραιώσεις (πενταπλάσια ή δεκαπλάσια διαδοχική αραιώση) γνωστών δειγμάτων, συνήθως πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει.



Εικ.10: Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού στο μηχάνημα LightCycler (Roche).

Α. Κάθε καμπύλη αντιστοιχεί σε διαφορετικό δείγμα και αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση των mRNA μεταγράφων στο συγκεκριμένο δείγμα. Η σχετική ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται με το λόγο του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου στόχου που μελετάται προς τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου αναφοράς. **Β.** Η πρότυπη καμπύλη (standard curve) του γονιδίου αναφοράς που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.

4.2. Ανάλυση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων της λεπτίνης και των δύο υποδοχέων της (Ra και Rb) την τεχνική RQ-PCR και ανιχνευτές υβριδοποίησης.

A. Απομόνωση RNA και προετοιμασία cDNA

Για την απομόνωση του RNA και την προετοιμασία του cDNA ακολουθήθηκε η μέθοδος που αναφέρθηκε και παραπάνω με την AMV αντίστροφη μεταγραφάση.

B. Πρωτόκολλο αντίδρασης RQ-PCR

Για την εκτίμηση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων της λεπτίνης και των δύο υποδοχέων της, Ra και Rb, χρησιμοποιήθηκε το kit “Light Cyclers FastStart DNA Master Hybridization Probes” ενώ όλα τα πειράματα επιτεύχθηκαν στο μηχάνημα Light Cyclers (Roche). (Εικ.11)



Εικ.11: **A.** Μηχάνημα Light Cyclers ((Roche). **B.** Δίσκος τοποθέτησης τριχοειδών (carousel) **Γ.** Υάλινα τριχοειδή (Glass capillaries)

Το συγκεκριμένο kit προσφέρεται ιδιαίτερα για εφαρμογές PCR με “εκκίνηση σε υψηλή θερμοκρασία”. Η έναρξη της PCR σε υψηλές θερμοκρασίες συμβάλλει στην εξειδίκευση και ευαισθησία της μεθόδου. Κάθε δείγμα αναλύεται τόσο ως προς το γονίδιο που μας ενδιαφέρει όσο και ως προς το γονίδιο αναφοράς (στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο HPRT. Στο πρωτόκολλο περιλαμβάνεται και η ενίσχυση προτύπων δειγμάτων RNA του γονιδίου h-HPRT που περιέχουν καθορισμένο αριθμό αντιγράφων (5×10^{-6} – 5×10^{-2} ανά 5 μl δείγματος).

□ Διάλυμα αντίδρασης (mix) για το γονίδιο αναφοράς (***h-HPRT***):

- Δις απεσταγμένο νερό	: 7.6 μl
- MgCl ₂ 25 mM	: 2.4 μl
-Διάλυμα ανίχνευσης h-HPRT (10X)	: 2.0 μl
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 μl
-Γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μl

Στον τελικό όγκο του κυρίου διαλύματος της αντίδρασης που είναι 15 μl προστίθενται 5 μl cDNA του δείγματος.

□ Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο-στόχο (***Leptin***):

-Δις απεσταγμένο νερό	: 9.4 μl
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 μl
-Εκκινητής Lep1 (Πίνακας V)	: 1.0 μl
-Εκκινητής Lep2 (Πίνακας V)	: 1.0 μl
-MgCl ₂ 25 mM	: 1.6 μl
-Ανιχνευτής Lep FL (Πίνακας V)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής Lep LC (Πίνακας V)	: 1.0 μl
-Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μl

□ Στον Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο-στόχο (***Ra***):

-Δις απεσταγμένο νερό	: 9.4 μl
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 μl
-Εκκινητής Ra1 (Πίνακας V)	: 1.0 μl
-Εκκινητής Ra2 (Πίνακας V)	: 1.0 μl
-MgCl ₂ 25 mM	: 1.6 μl
-Ανιχνευτής RaFL (Πίνακας V)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής Ra LC (Πίνακας V)	: 1.0 μl
-Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μl

□ Διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο-στόχο (***Rb***):

-Δις απεσταγμένο νερό	: 10.2 μl
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 μl
-Εκκινητής Rb1 (Πίνακας V)	: 1.0 μl
-Εκκινητής Rb2 (Πίνακας V)	: 1.0 μl
-MgCl ₂ 25 mM	: 0.8 μl
-Ανιχνευτής Rb FL (Πίνακας V)	: 1.0 μl
-Ανιχνευτής Rb LC (Πίνακας V)	: 1.0 μl
-Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μl

Στον τελικό όγκο του κυρίου διαλύματος της αντίδρασης που είναι 18 μl προστίθενται 2 μl cDNA του δείγματος (αραίωση 1:10).

□ Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης

Το πρωτόκολλο αποτελείται από τρία προγράμματα :

Πρόγραμμα 1:

Προ-επώαση (ενεργοποίηση του ενζύμου) επί 10 λεπτά και αποδιάταξη του cDNA στους 95°C επί 10 λεπτά, για έναν κύκλο.

Πρόγραμμα 2:

Η ενίσχυση της cDNA αλληλουχίας-στόχου πραγματοποιείται σε τρία στάδια επί 45 κύκλους :

- Αποδιάταξη στους 95°C επί 5 δευτερόλεπτα ανά κύκλο
- Σύνδεση με τον εκκινητή (διαφορετική θερμοκρασία ανάλογα με το είδος του εκκινητή και του ανιχνευτή που χρησιμοποιούνται)
 - Leptin : 55°C επί 5 δευτερόλεπτα
 - Ra : 57°C επί 10 δευτερόλεπτα
 - Rb : 55°C επί 7 δευτερόλεπτα
- Επιμήκυνση στους 72°C επί 20 δευτερόλεπτα

Πρόγραμμα 3:

Ψύξη στους 40°C επί 30 δευτερόλεπτα για ένα κύκλο.

Τα αποτελέσματα περιγράφονται ως στρογγυλοποιημένες τιμές σε σχέση με το ενδογενώς εκφραζόμενο γονίδιο αναφοράς h-HPRT. Τα ποσά των μεταγράφων του γονιδίου-στόχου και των αντίστοιχων του γονιδίου h-HPRT καθορίζονται για κάθε δείγμα με εκτίμηση του μέσου όρου των τιμών των δύο αντιγράφων του κάθε δείγματος. Στη συνέχεια, το ποσό των μεταγράφων που μας ενδιαφέρουν (γονίδιο-στόχος) διαιρείται με το ποσό των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς και ο λόγος που προκύπτει είναι μια στρογγυλοποιημένη τιμή μεταγράφων του γονιδίου-στόχου ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς h-HPRT.

Πίνακας V. Αλληλουχίες εκκινητών για την αντίδραση της RQ-PCR

Εκκινητής	Αλληλουχία
Lep 1	5'-TTCTTGTGGCTTTGGCCCTA-3'
Lep 2	5'-GGAGACTGACTGCGTGTGTGAA-3'
Lep FL	5'-GAT GAGGGTTTTGGTGTTCATCTTGGACT—FL
Lep LC	LC Red640- TTGGATGGGCACAGCTTGGACATAGA—PH
Ra 1	5'-TGTTGTGAATGTCTTGTGCC-3'
Ra 2	5'- TACTCCAGTCACTCCAGATTCC-3'
Ra FL	5'- GACAGTATACTTCCTGGGTCTTCGTATGAGG—FL
Ra LC	LC Red640-TCAGGTGAGGGGCAAGAGACTGGAT—PH
Rb 1	5'-GCTATTTTGGGAAGATGT-3'
Rb2	5'-TGCCTGGGCCTCTATCTC-3'
Rb FL	5'- GGTACTGAGGTAACCTATGAGGCCGAA—FL
RbLC	LC Red640-GCCAGAGACAACCCTTTGTTAAATACGC—PH

14.ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Κωδικοποίηση και Επεξεργασία: Αρχικά οι μεταβλητές κωδικοποιήθηκαν και αναλόγως των αναγκών δημιουργήθηκαν και παράγωγες μεταβλητές με αντίστοιχη κωδικοποίηση, π.χ κατηγοριοποίηση και διχοτόμηση του BMI στην τιμή 30. Εφαρμόστηκε η περιγραφική στατιστική και κατασκευάστηκαν πίνακες συχνοτήτων για τα γενικά επιδημιολογικά χαρακτηριστικά του δείγματος και για τα επιμέρους χαρακτηριστικά των ιστολογικών δειγμάτων που εξετάστηκαν, καθώς και τους ορολογικούς δείκτες . Οι συγκρίσεις έγιναν με τις δοκιμασίες t-test για τις ποσοτικές

μεταβλητές και με τη δοκιμασία Mann –Whitney-U test για τις τακτικές. Ο έλεγχος της κανονικότητας των κατανομών πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία Smirnov-Kolmogorov. Για την παρουσίαση της κατανομής των μη ποσοτικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκαν οι εκατοστιαίες θέσεις. Το επίπεδο σημαντικότητας ήταν το 0,05. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με το πρόγραμμα SPSS for Windows, 13.0 έκδοση.

15.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μελετήθηκαν υποομάδες ασθενών βάσει του B.M.I.,τον ιστολογικό τύπο, το CA- 125 την ηλικία καθώς και το στάδιο και βαθμό διαφοροποίησης του νεοπλασματος.. Τα αποτελέσματα δείχνουν καταρχήν έκφραση(έστω και σε χαμηλά επίπεδα) τόσο της λεπτίνης, όσο και των υποδοχέων της (κυρίωςRa>Rb) στα εξετασθέντα παρασκευάσματα.. Παρατίθενται πίνακες συσχέτισης των διαφόρων παραμέτρων, προς εξαγωγή συμπερασμάτων. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 που

ακολουθεί, η πλειοψηφία των νεοπλασμάτων αφορούσε τα αδενοκαρκινώματα και τα ορώδη. Τα αδενοκαρκινώματα προέρχονταν όλα από το ενδομήτριο, ενώ τα ορώδη εντοπίστηκαν κυρίως στην ωοθήκη.

Πίνακας 1. Ιστολογική Ταξινόμηση των νεοπλασμάτων

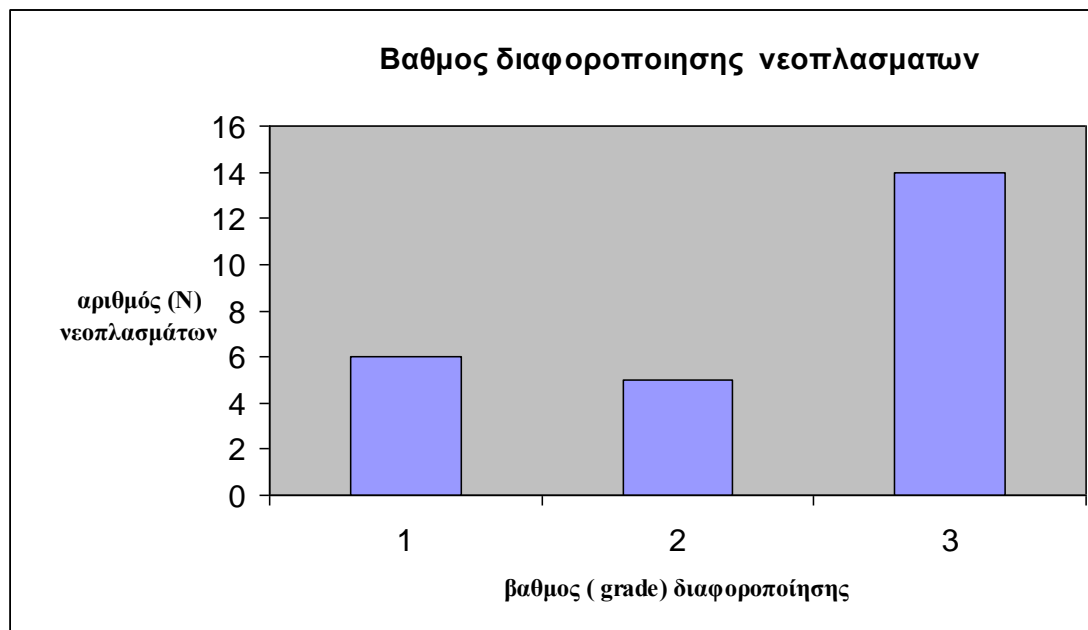
Ιστολογική Ταξινόμηση	Προέλευση		ΣΥΝΟΛΟ (N=33)
	Μήτρα	Ωοθήκη	
Ορώδες	1	9	10
	9	0	9
Αδενοκαρκίνωμα			
Ενδομητριοειδές	2	2	4
Ινομύωμα	2	0	2
borderline	0	5	5
Άλλο	3	0	3

Τα περισσότερα νεοπλάσματα ήταν χαμηλής διαφοροποίησης (grade 3)(Πίνακας 2 & Γράφημα 1.)

Πίνακας 2. Βαθμός διαφοροποίησης (grade) (N= 25)

Grade	N
1	6
2	5
3	14

Γραφημα 1. Βαθμός διαφοροποίησης νεοπλασμάτων



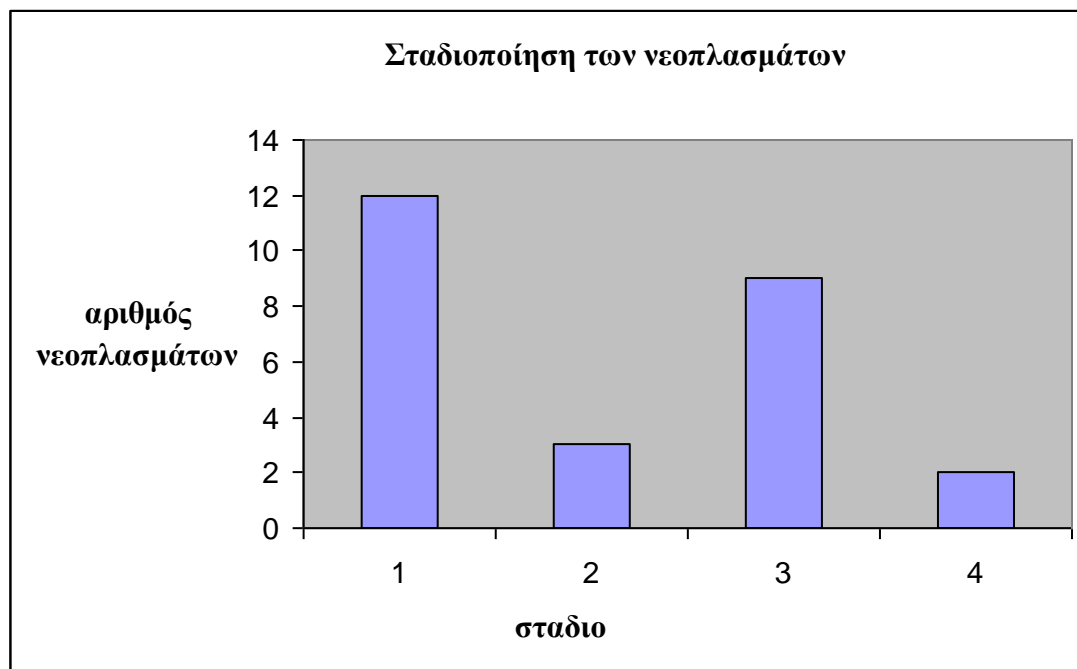
Τα περισσότερα νεοπλάσματα εντοπίστηκαν σε αρχικά στάδια και μόνο 2 ήταν σταδίου 4 (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Σταδιοποίηση του συνόλου των νεοπλασμάτων (N= 26)

Σταδιο	N
1	12
2	3

3	9
4	2

Γράφημα 2. Σταδιοποίηση νεοπλασμάτων.



Τα νεοπλάσματα της μήτρας συσχετίστηκαν με υψηλότερες τιμές BMI, με στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σχέση με τα νεοπλάσματα της ωοθήκης(Πίνακας 4).Όπως προκύπτει και από τις τυπικές αποκλίσεις το 66 % των γυναικών με νεοπλασία της μήτρας είχαν τιμές BMI ανώτερες των φυσιολογικών, ενώ το 66 % των γυναικών με νεοπλασία της ωοθήκης δεν ξεπερνούσε την τιμή 34 , που ήταν ο μέσος όρος των γυναικών με νεοπλασία μήτρας. Κάποιες μάλιστα είχαν φυσιολογικό δείκτη BMI.

**Πίνακας 4. Δείκτης μάζας σώματος (BMI)
σε νεοπλάσματα ωοθήκης και μήτρας**

Μεταβλητές	Μέσος όρος \pm SD
BMI –Ωοθήκη (N=13)	28,73 \pm 4,90
BMI –Μήτρα (N=14)	33,98 \pm 7,03
p	0,035
t- test	

Η έκφραση του δείκτη Ca 125 στον ορό διέφερε, ανάλογα με το είδος του νεοπλασματος. Οι τιμές του Ca 125 ήταν υψηλότερες στις περιπτώσεις με ορώδη, σε σχέση με τα τυπικά αδενοκαρκινώματα (από 5 έως 50 σχεδόν φορές υψηλότερες)(Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Διαφορά στις τιμές του Ca 125 ανάμεσα στα αδενοκαρκινώματα και τα ορώδη.

Ιστολογική ταξινόμηση	Αριθμός νεοπλασμάτων (N)	Δείκτης Ca 125 (ng/ml) 25 ^ο - 50 ^ο - 75 ^ο εκ	p
Ορώδη	8	68,97-367,30-1435	0,009
Αδενοκαρκινώματα	8	11,22-13,75-37,62	

Mann –Whitney –U- test

Οι τιμές του δείκτη Ca 125 ήταν, με στατιστικά σημαντική διαφορά, υψηλότερες στα νεοπλάσματα της ωοθήκης (μέχρι και 40 φορές περίπου υψηλότερες)(Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Διαφορές στις τιμές του Ca 125 σε νεοπλάσματα ωοθήκης και μήτρας.

Δείκτης	Ωοθήκης N	Ωοθήκης 25 ^ο - 50 ^ο - 75 ^ο εκ	Μήτρας N	Μήτρας 25 ^ο -50 ^ο -75 ^ο εκ	p
Ca 125	13	82,45-228-1266	14	11,45-22,40-35,70	0.000

Mann –Whitney –U- test

Ο μέσος όρος των τιμών της λεπτίνης στον ιστό ήταν 0,2ng/ml. Όσον αφορά τους υποδοχείς της λεπτίνης, ο ισότυπος Ra παρουσίαζε πολλαπλάσια συγκέντρωση (αριθμός αντιγράφων / 5ml) του Rb στο σύνολο των παθολογικών ιστών. Ευρεία διασπορά τιμών παρατηρήθηκε στο Ca 125 με το μέσο όρο να βρίσκεται στο 305 (ελαχ 3 , μεγ 2071).

Πίνακας 7. Τιμές λεπτίνης ,υποδοχέων της και Ca 125

Λεπτίνη (N=32)	0,02 ±0,1 ng/ml	0,00- 0,76 ng/ml
Ra (N= 22)	0,98± 0,72	0,05-2,50
Rb (N=19)	0,02 ± 0,03	0,00-0,43
Ca 125 (N= 27)	304,91 ±560,00	3- 2071

Δείκτης μάζας σώματος άνω του 30 συσχετίστηκε με αυξημένη έκφραση υποδοχέων της λεπτίνης(Πίνακας 8). Βρέθηκε διαφορά μιας τάξης μεγέθους (δεκαπλάσια), τόσο στους φυσιολογικούς, όσο και στους παθολογικούς ιστούς. Η στατιστικά σημαντική διαφορά αφορούσε στους Rb υποδοχείς των φυσιολογικών ιστών, ενώ δεν παρουσιάστηκαν διαφορές ως προς τους Ra υποδοχείς.

Πίνακας 8. Διαφορές στην έκφραση των υποδοχέων της λεπτίνης (Ob-Rb), ανάλογα με το μέγεθος της παχυσαρκίας

Υποδοχέας		p	
BMI>30		BMI ≤ 30	
N	25° - 50° - 75° εκ	N	25° - 50° - 75° εκ

Rb	11	0,01-0,06-0,15	5	0,002-0,004-0,009	0.052
Rbn	14	0,00-0,01-0,04	7	0,000-0,001-0,004	0,007

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 9, διαφορές παρουσιάστηκαν και στους δύο ισότυπους των υποδοχέων, των οποίων οι συγκεντρώσεις στους παθολογικούς ιστούς ήταν τετραπλάσιες περίπου των συγκεντρώσεων στους φυσιολογικούς ιστούς.

Πίνακας 9. Διαφορές στην έκφραση των υποδοχέων της λεπτίνης , στους φυσιολογικούς και παθολογικούς ιστούς

Υποδοχέας	Παθολογικός ιστός			Φυσιολογικός ιστός			p
	N	25° - 50° - 75° εκ		N	25° - 50° - 75° εκ		
Rb	19	0,004-0,024-0,083		26	0,001-0,008-0,022		0.044
Rα	22	0,36-0,97-1,25		29	0,06-0,17-0,44		0,001

Πίνακας 10. Αναλυτικά οι διαφορές στην έκφραση των υποδοχέων της λεπτίνης , στους φυσιολογικούς και παθολογικούς ιστούς του ενδομητρίου και της ωοθήκης

Υποδοχέας	p									
	Παθολογικός ωοθηκικός ιστός					Παθολογικός ιστός ενδομητρίου				

	N	25° - 50° - 75° εκ	N	25° - 50° - 75° εκ	
Rb	9	0,005-0,02-0,05	10	0,008-0,07-0,35	>0,05
Ra	10	0,66-1,06-1,45	12	0,29-0,53-1,45	>0,05
					p
	Φυσιολογικός ωοθηκικός ιστός		Φυσιολογικός ιστός ενδομητρίου		
	N	25° - 50° - 75° εκ	N	25° - 50° - 75° εκ	
Rb	13	0,003-0,006- 0,02	13	0,002-0,01- 0,03	>0,05
Ra	15	0,10-0,19- 0,40	12	0,06-0,16- 1,05	>0,05

Παρατηρούμε (Πίνακας 10) ότι στον παθολογικό ιστό του ενδομητρίου και καθώς πλησιάζουμε στο 75ο εκατοστημόριο η έκφραση των Rb υποδοχέων αποκτά την ίδια τάξη μεγέθους με τους Ra και η « ψαλίδα» της διαφοράς μικραίνει. Από 35 φορές παραπάνω στο φυσιολογικό ιστό φθάνει τις 4 φορές στο παθολογικό ενδομήτριο. Η αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων Rb φαίνεται να είναι μεγαλύτερη της αύξησης των υποδοχέων Ra. Όπως σχολιάζεται στη συζήτηση το γεγονός αυτό πιθανόν να ενέχει κλινική σημασία, λόγω τους διαφορετικού ρόλου που παίζουν οι δύο τύποι των υποδοχέων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Σημειώνεται ότι δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση της λεπτίνης ανάμεσα στις διάφορες επιμέρους ομάδες .

Οι διαφορές ανάμεσα στον παθολογικό και τον φυσιολογικό ιστό των ωοθηκών ανά ισότυπο υποδοχέα φαίνονται στους επόμενους πίνακες (Πίνακας 11, Πίνακας 12). Στατιστικά σημαντική διαφορά προέκυψε όσον αφορά την έκφραση του υποδοχέα Ra στον φυσιολογικό ωοθηκικό ιστό (χαμηλή).

Πίνακας 11. Διαφορά στην εκφραση των ισοτύπων υποδοχέων της λεπτίνης αναμεσα στο φυσιολογικό και παθολογικό ιστό του ενδομητρίου

Υποδοχέας					p
Παθολογικός ιστός ενδομητρίου			Φυσιολογικός ιστός ενδομητρίου		
	N	25 ^ο - 50 ^ο - 75 ^ο εκ	N	25 ^ο - 50 ^ο - 75 ^ο εκ	
Rb	10	0,008-0,07-0,35	10	0,002-0,01-0,03	0,093
Rα	12	0,29-0,53-1,45	13	0,06-0,16-1,15	0,152

Πίνακας 12. Διαφορά στην έκφραση των ισοτύπων υποδοχέων της λεπτίνης ανάμεσα στο φυσιολογικό και παθολογικό ωοθηκικό ιστο.

Υποδοχέας					p
	Παθολογικός ωοθηκικός ιστός		Φυσιολογικός ωοθηκικός ιστός		
	N	25° - 50° - 75° εκ	N	25° - 50° - 75° εκ	
Rb	9	0,005-0,02-0,05	14	0,001-0,006-0,04	0.259
Rα	10	0,66-1,06-1,45	15	0,10-0,19-0,40	<0,000

16.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης, η έκφραση των υποδοχέων της λεπτίνης παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις ανάμεσα στους φυσιολογικούς και τους παθολογικούς ιστούς του ενδομήτριου και των ωοθηκών. Διαφορές παρατηρούνται επίσης στην τιμή ορού του καρκινικού δείκτη Ca 125. Είναι υψηλότερες στον ωοθηκικό καρκίνο και ειδικά στα ορώδη νεοπλάσματα. Οι νεοπλασίες επίσης του ενδομητρίου συσχετίστηκαν με υψηλό δείκτη μάζας σώματος.

Πιο συγκεκριμένα , βρέθηκε ότι το Ca 125 είχε υψηλότερες τιμές στις ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών. Πράγματι , και σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, το Ca 125 εκφράζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον ορό των πασχόντων από ωοθηκικό καρκίνο (συχνά χιλιάδες μονάδες –ng ανά ml)(116-119). Ωστόσο, και συνήθως σε μικρότερες συγκεντρώσεις εμφανίζεται και σε άλλους γυναικολογικούς καρκίνους, μεταξύ αυτών και ο καρκίνος του ενδομητρίου, χωρίς τις περισσότερες φορές η συγκέντρωσή του να φθάνει τετραψήφιο νούμερο (120,121). Χρησιμοποιείται ωστόσο και ως προγνωστικός δείκτης μετά τη χειρουργική εξαίρεση του όγκου. Η συγκέντρωσή του ωστόσο στο νεοπλασματικό ιστό μπορεί να είναι υψηλότερη. Πιθανολογείται ότι η αύξησή του στον ορό οφείλεται σε διασπορά της πρωτοπαθούς εστίας και ότι το ενδομήτριο δεν είναι η κύρια πηγή παραγωγής του Ca125. Από την άλλη πλευρά πιθανόν να υπάρχει κάποιος μηχανισμός που να αποτρέπει την είσοδο του καρκινικού δείκτη στην κυκλοφορία, ο οποίος όμως να λειτουργεί λιγότερο αποτελεσματικά σε προχωρημένου σταδίου νεοπλάσματα. (122).

Όσον αφορά το είδος των νεοπλασμάτων σε ωοθήκη και μήτρα , το αποτέλεσμα της μελέτης είναι σύμφωνο με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Πράγματι, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, ο συχνότερος επιθηλιακός όγκος της ωοθήκης είναι το ορώδες αδενοκαρκίνωμα . Αντίστοιχα στο ενδομήτριο, η πιο συχνή νεοπλασία είναι το τυπικό αδενοκαρκίνωμα, ή αδενοκαρκίνωμα με κάποια πλακώδη στοιχεία , ενώ τα θηλώδη-ορώδη αδενοκαρκινώματα είναι σπάνια. (123). Επίσης υπάρχει πράγματι, η τάση το Ca 125 να εκφράζεται περισσότερο στα ορώδη αδενοκαρκινώματα και στους μεγάλου μεγέθους όγκους (124).

Τα νεοπλάσματα της μήτρας συσχετίστηκαν με υψηλότερες τιμές BMI, με στατιστικά σημαντική διαφορά, σε σχέση με τα νεοπλάσματα της ωοθήκης. Έχει καθιερωθεί η γνώση ότι παχυσαρκία συνδυάζεται με αυξημένο κίνδυνο καρκινογένεσης στο ενδομήτριο, ενώ τα δεδομένα για τον ωοθηκικό καρκίνο δεν είναι σαφή. Πάντως πρόσφατες μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι και οι νεοπλασίες της ωοθήκης συσχετίζονται με την παχυσαρκία. Ωστόσο συγκρινόμενος με τα νεοπλάσματα της μήτρας, ο σχετικός κίνδυνος είναι μικρότερος (125,126).

Οι υποδοχείς της λεπτίνης παρουσίασαν διαφορές στην έκφρασή τους, ανάλογα με το είδος του ιστού (ενδομήτριο ή ωοθήκη). Παράλληλα, ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένη η έκφρασή τους στις παχύσαρκες γυναίκες. Μελέτες συσχετίζουν τη λεπτίνη και τους υποδοχείς της με την καρκινογένεση, επιχειρώντας να θεμελιώσουν μια αιτιοπαθογενετική σχέση, με αβέβαια ακόμα αποτελέσματα. (112,

127). Η λεπτίνη έχει κατά καιρούς εμπλακεί στην παθοφυσιολογία της καρκινογένεσης σε πολλά όργανα. Η λεπτίνη δρα ως μιτογόνος παράγοντας στους περισσότερους ιστούς τα υψηλά επίπεδα λεπτίνης στην κυκλοφορία μπορούν να έχουν ρόλο αυξητικού παράγοντα σε πλειάδα καρκίνων. Η ρύθμιση της έκκρισης λεπτίνης σχετίζεται πρωταρχικά με τη μάζα του λιπώδους ιστού. Συνεπώς, ο δείκτης μάζας σώματος, μαζί με προσδιορισμό ίσως του ποσοστού λίπους, να αποτελεί μια αξιολογήσιμη παράμετρο για την επικινδυνότητα της καρκινογένεσης. Σύμφωνα με τα πλέον πρόσφατα ερευνητικά δεδομένα από επιδημιολογικές μελέτες το αυξημένο βάρος σώματος σχετίζεται με αυξημένη θνητότητα από όλους τους καρκίνους και οι παχύσαρκες γυναίκες έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο θανάτου από καρκίνο σε σύγκριση με τους παχύσαρκους άνδρες (112,113,127).

Οι γυναίκες επίσης έχουν μεγαλύτερα επίπεδα λεπτίνης ορού συγκρινόμενες με άνδρες ισοδύναμης μάζας σώματος, παρατήρηση που μάλλον έχει να κάνει με τις διαφορετικές δράσεις των οιστρογόνων και των ανδρογόνων στην παραγωγή της λεπτίνης. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι η διαδερμική χορήγηση οιστρογόνων σε συνδυασμό με προγεστερόνη αυξάνει τα επίπεδα της λεπτίνης στο αίμα, γεγονός που πιθανόν εξηγεί τις αυξημένες συγκεντρώσεις λεπτίνης στο αίμα κατά τη διάρκεια της ωχρινοποιητικής φάσης του καταμήνιου κύκλου (23). Επίσης, η θεραπεία φυσιολογικών γυναικών, μετά ωοθηκεκτομή με συνδυασμό οιστρογόνων και προγεστερόνης αναστέλλει την πτώση των επιπέδων της λεπτίνης που προκαλείται μετά την επέμβαση (23,24). Έχει βρεθεί επίσης, ότι, τόσο σε φυσιολογικά, όσο και σε καρκινικά κύτταρα η λεπτίνη προάγει την ανάπτυξη, τη μετανάστευση και τη διηθητική ικανότητα ενώ ενισχύει την αγγειογένεση. Παραμένει λοιπόν το ενδεχόμενο η λεπτίνη να σχετίζεται με επιθετικότερη μορφή όγκων (108).

Η παραπάνω συλλογιστική, και παρά τον κίνδυνο υπεραπλούστευσης, μια και σαφείς αιτιοπαθογενετικές σχέσεις είναι δύσκολο να αποδειχθούν ακόμα, έχει εφαρμογή στους καρκίνους του γαστρεντερολογικού συστήματος αλλά και άλλους, όπως είναι ο καρκίνος του μαστού, του προστάτη, τα λεμφώματα. Φαίνεται πως η λεπτίνη επάγει υπό προϋποθέσεις την παραγωγή ενζύμων, όπως τα MMPs τα οποία έχουν πρωτεολυτική δράση. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται π.χ και στον καρκίνο του προστάτη. Ωστόσο, υπάρχουν και αντιφατικά αποτελέσματα. Στα κύτταρα από καρκινικό παγκρεατικό ιστό η λεπτίνη ανέστειλε την ανάπτυξη (104,127,128).

Όσον αφορά στους γυναικολογικούς καρκίνους και αυτοί έχουν συσχετιστεί με τα επίπεδα λεπτίνης στο αίμα και την πυκνότητα των υποδοχέων της στους ιστούς.

.Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν πείθουν για το ρόλο της λεπτίνης του ορού στην ανάπτυξη των γυναικολογικών καρκίνων, ενώ και ο ρόλος των υποδοχέων της λεπτίνης δεν είναι σαφής. Σε μελέτη για την επίπτωση του καρκίνου του ενδομητρίου στην Ελλάδα βρέθηκε ισχυρή συσχέτιση ανάμεσα στη λεπτίνη του ορού και στον καρκίνο του ενδομητρίου. Δεν μπορεί ωστόσο να αποκλειστεί το ενδεχόμενο, η συσχέτιση αυτή να είναι απότοκος της παχυσαρκίας αντικατοπτρίζει απλά μια παράλληλη σχέση παχυσαρκίας –λεπτίνης –καρκίνου, χωρίς να μπορούν να εξαχθούν τελικά συμπεράσματα για τον αιτιοπαθογενετικό ρόλο της λεπτίνης στην καρκινογένεση (113). Παρόλα αυτά τα τελευταία χρόνια παρουσιάζονται ενδείξεις για έναν άμεσο ρόλο της λεπτίνης στους γυναικολογικούς καρκίνους, αν και τα ευρήματα είναι μάλλον αντιφατικά. Σε μελέτη του Yuan και συν (129) βρέθηκε ότι ναι μεν τα επίπεδα λεπτίνης είναι αυξημένα σε ασθενείς με καρκίνο του ενδομητρίου, αλλά όχι περισσότερο όταν γίνεται σύγκριση με υγιείς που έχουν τον ίδιο δείκτη μάζας σώματος επίσης, παρατηρήθηκε ελάττωση του υποδοχέα βραχέος τύπου της λεπτίνης (Ob-Ra) στους περισσότερα καρκινικά δείγματα ενδομητρίου. Επαγωγή μάλιστα των υποδοχέων εμποδίζει τα κύτταρα να εισέλθουν στη φάση S (αντιγραφής) του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο στη μελέτη των Sharma και συν (112) βρέθηκε ότι η λεπτίνη επάγει τη φωσφορυλίωση ενζύμων που παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταβίβαση μηνυμάτων πολλαπλασιασμού στο εσωτερικό του κυττάρου, αυξάνοντας παράλληλα και τη διηθητική ικανότητα του κυττάρου (οδοί JAK/STAT και AKT). Μετά από φαρμακευτική αναστολή των παραπάνω οδών κατέστη δυνατή η αναστολή της διηθητικής επέκτασης των κυττάρων που επαγόταν από τη λεπτίνη, γεγονός που στο μέλλον πιθανόν να αποκτήσει και κλινική σημασία. Η έκφραση ισοτύπων της λεπτίνης έχει διαπιστωθεί και στον καρκίνο του μαστού ενώ έχει συσχετιστεί με ανοσολογική δυσλειτουργία στα NHL –Λεμφώματα (104,112). Σημειώνεται ωστόσο πως ο ισότυπος Ob- Rb, ο οποίος και έχει συσχετιστεί θετικά με την καρκινογένεση βρίσκεται κυρίως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ενώ ο ισότυπος Ob-Ra, του οποίου ο ρόλος φαίνεται να είναι αντίθετος αφθονεί στους περιφερικούς ιστούς (130).

Η μελέτη των Carino και συν(131), έδειξε ότι οι επιδράσεις της λεπτίνης είναι κυτταρο-ειδικές και θα μπορούσαν να οδηγήσουν στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και να τους προσδώσουν ένα πλεονέκτημα επιβίωσης έναντι των υπολοίπων κυττάρων. Πιθανόν δε η λεπτίνη να ευνοεί την πάχυνση του ενδομητρίου. Οι επιδράσεις της λεπτίνης ήταν περισσότερο έκδηλες στα καρκινικά κύτταρα του ενδομητρίου (131).

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε τόσο η συγκέντρωση του βραχεος, όσο και του μακρού υπότυπου, τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε παθολογικούς ιστούς, στο σύνολο των δειγμάτων, αλλά και ξεχωριστά σε μήτρα και ωοθήκη. Στην ωοθήκη εκφράζονται τόσο ο βραχύς (Ob-Ra) ισότυπος, όσο και ο μακρός ισότυπος του (ObRb). Επιπρόσθετα σε ωοθηκικές καρκινικές σειρές φάνηκε ότι η λεπτίνη προήγαγε την ανάπτυξη των κυττάρων. Υποδοχείς εκφράζονται επίσης και στο ενδομήτριο. Ωστόσο δεν αναφέρονται στη βιβλιογραφία ακριβείς πληροφορίες για την ποσοτική έκφραση των ισότυπων των υποδοχέων της λεπτίνης και ο ακριβής μηχανισμός δράσης της ορμόνης παραμένει σε πολλά σημεία του αδιευκρίνιστος. Υπάρχουν ενδείξεις για υπερέκφραση των υποδοχέων σε ποσοστό των καρκίνων του ενδομητρίου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η διακυμανση στην έκφραση του Ob-Rb υποδοχέα κατά τον καταμήνιο κύκλο. Στην πρώιμη φάση παραγωγής του ενδομητρίου εκφράζεται ελάχιστα, στη συνέχεια αυξάνεται πιο έντονα και η έκφρασή του κορυφώνεται στην πρώιμη εκκριτική φάση, για να μειωθεί κατά την εμμηνορρυσία. Στα δείγματα του ενδομητρίου στην μελέτη των Kitawaki και συν ο Ob-Rb ήταν ο επικρατέστερος υποδοχέας (132). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η προσφατη μελέτη των Koda και συν(114). Στην εργασία αυτή μελετηθηκε η έκφραση της λεπτίνης, των υποδοχέων της του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1^α (HIF-1a) σε 60 περιπτώσεις ασθενών με καρκίνο του ενδομητρίου, καθώς και σε 25 δείγματα ιστών από φυσιολογικό ενδομήτριο με τη βοήθεια ανοσοιστοχημικών μεθόδων. Η υπερέκφραση της λεπτίνης και των υποδοχέων της που παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία αποδοθηκε στη μεσολάβηση του HIF-1a με τον οποίο και συσχετίστηκαν θετικά οι υψηλές τιμές λεπτίνης και των υποδοχέων της, ενώ εντοπίστηκε και ο ισότυπος Ob-Rb του υποδοχέα της λεπτίνης σε αρκετές περιπτώσεις καρκινικού ιστού. Συγκεκριμένα, οι Koda και συν δεν ανίχνευσαν με την ανοσοιστοχημική μέθοδο υποδοχείς σε φυσιολογικό αδενικό ιστό του ενδομητρίου, ενώ εντόπισαν την παρουσία του Ob-Rb στο 30 % των παθολογικών ιστών, αν και δεν επιχειρήθηκε ο ποσοτικός του προσδιορισμός. Το γεγονός θα μπορούσε να σημαίνει, παράλληλα με τη διαπίστωση της παρουσίας λεπτίνης στους ιστούς, μια αυτοκρινή ή παρακρινή δράση της λεπτίνης στους καρκινικούς ιστούς.(114) Στη μελέτη του Yuan , δε βρέθηκε διαφορά στις συγκεντρώσεις του μακρού υπότυπου ανάμεσα σε φυσιολογικούς και παθολογικούς ιστούς, ενώ υπήρξε μείωση της συγκέντρωσης του βραχέος υπότυπου (129).

Στην παρούσα εργασία έγινε όχι μόνο ποιοτικός, αλλά και ποσοτικός προσδιορισμός των υποδοχέων της λεπτίνης, τόσο του Ob-Rb, όσο και του Ob-Ra ισότυπου, τόσο σε παθολογικούς (καρκινικούς) όσο και σε φυσιολογικούς ιστούς. Επίσης, και κατά τη σύγκριση παθολογικών και φυσιολογικών ιστών διαπιστώθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση υποδοχέων στους παθολογικούς ιστούς. Επιμέρους ανάλυση ανάλογα με την προέλευση του ιστού (ωοθηκικός ή ενδομητρίου) έδειξε ότι η διαφορά παρατηρείται στην έκφραση του Ob-Ra ισότυπου στον παθολογικό ωοθηκικό ιστό σε συγκέντρωση πολλαπλάσια εκείνης του αντίστοιχου φυσιολογικού ιστού. Διαφορές δεν παρατηρήθηκαν ανάμεσα στους παθολογικούς και φυσιολογικούς ιστούς του ενδομητρίου. Επίσης, όπως αναφέρθηκε στα αποτελέσματα, στον παθολογικό ιστό του ενδομητρίου και καθώς πλησιάζουμε στο 75ο εκατοστημόριο η έκφραση των Rb υποδοχέων αποκτά την ίδια τάξη μεγέθους με τους Ra και η «ψαλίδα» της διαφοράς μικραίνει. Από 35 φορές παραπάνω στο φυσιολογικό ιστό κατέρχεται στις 4 φορές στο παθολογικό ενδομήτριο. Ενώ όμως δεν παρουσιάστηκε διαφορά ανάμεσα στις παχύσαρκες και μη γυναίκες, όσον αφορά τους Ob-Ra υποδοχείς, η συγκέντρωση των Ob-Rb υποδοχέων ανέβηκε αλματώδως στις παχύσαρκες γυναίκες. Στηριζόμενος κανείς στα ευρήματα της μελέτης των Sharma και συν (112), στην οποία βρέθηκε ότι η λεπτίνη προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διηθητική ικανότητα των καρκινικών κυττάρων, θα μπορούσε να υποθέσει κανείς ότι η διαφορά αυτή στην έκφραση των ισοτύπων πιθανόν να ευθύνεται σε ένα βαθμό για την καρκινογένεση του ενδομητρίου στις παχύσαρκες γυναίκες. Ακόμα και στην περίπτωση που υποθέσουμε πως οι Ob-Ra υποδοχείς έχουν κάποιο προστατευτικό ρόλο, αυτός υπερνικάται από την επίδραση των Ob-Rb, λόγω της μεγάλης αύξησης στη συγκέντρωσή τους. Επιπλέον, η συγκέντρωση των υποδοχέων με ισότυπο Ob-Ra δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε παχύσαρκους και μη, με τη σημείωση ότι ο μέσος όρος στους παχύσαρκους είναι περίπου 25 % ελαττωμένος. Συνεπώς, η αλματώδης αύξηση της συγκέντρωσης των Ob-Rb σε συνδυασμό με μια κάποια ελάττωση των Ob-Ra μπορεί να παίζει ρόλο στην καρκινογένεση.

Συμπεράσματα

1. Τα νεοπλάσματα της μήτρας συσχετίστηκαν με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος.

2. Τα επίπεδα του Ca 125 ήταν υψηλότερα στις νεοπλασίες της ωοθήκης.
3. Συχνότερο νεόπλασμα των ωοθηκών στο υλικό μας ήταν το ορώδες αδενοκαρκίνωμα.
4. Η παχυσαρκία συσχετίστηκε με αυξημένη έκφραση του μακρού ισότυπου του υποδοχέα της λεπτίνης στους φυσιολογικούς ιστούς, ενώ υπήρξε οριακή στατιστική σημαντικότητα όσον αφορά την διαφορά στους παθολογικούς ιστούς.
5. Τόσο στους παθολογικούς, όσο και στους φυσιολογικούς ιστούς εκφράζεται καθ'υπεροχήν ο βραχύς ισότυπος του υποδοχέα της λεπτίνης.
6. Η έκφραση του ObR-α υπότυπου στον παθολογικό ωοθηκικό ιστό είναι πολλαπλάσια εκείνης του αντίστοιχου φυσιολογικού ιστού.
7. Στον παθολογικό ιστό του ενδομητρίου η έκφραση των Rb (μακρού ισότυπου) υποδοχέων αυξάνεται και αποκτά την ίδια τάξη μεγέθους με τους Ra (βραχείς) και μικραίνει το μέγεθος της μεταξύ τους διαφοράς.

Τα αποτελέσματα αυτά πιθανόν στοιχειοθετούν ένα σημαντικό ρόλο του μακρού ισότυπου στην παθοφυσιολογία της καρκινογένεσης στο ενδομήτριο. Παράλληλα επιβεβαιώνονται τα πορίσματα προγενέστερων μελετών σχετικά με την έκφραση του δείκτη Ca 125 και τη σχέση της παχυσαρκίας με τον καρκίνο του ενδομητρίου.

Περίληψη

Σκοπός : Ήταν να διερευνηθεί η έκφραση των υποδοχέων της λεπτίνης σε καλοήθεις και καοήθεις όγκους των ωοθηκών και του ενδομητρίου, καθώς και η τυχόν συσχέτισή της με το δείκτη μάζας σώματος.

Μέθοδοι : Δείγματα από φυσιολογικό και νεοπλασματικό ιστό ενδομητρίου από 33 ασθενείς ηλικίας 32-75 ετών εξετάστηκαν για την έκφραση των υποδοχέων της λεπτίνης με τη μέθοδο RT-PCR.

Αποτελέσματα : Δείκτης μάζας σώματος >30 συσχετίστηκε με αυξημένη έκφραση των υποδοχέων. Τόσο οι Ra, όσο και οι Rb υποδοχείς εκφράστηκαν και στο φυσιολογικό και το νεοπλασματικό ενδομήτριο. Στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε ανάμεσα στο φυσιολογικό και το νεοπλασματικό ιστό, με την έκφραση να είναι περίπου 5 φορές μεγαλύτερη στο νεοπλασματικό ιστό.

Συμπεράσματα : Τα νεοπλάσματα του ενδομητρίου και η έκφραση του μακρού ισότυπου της λεπτίνης συσχετίστηκαν με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος . Πιθανολογείται ότι ο μακρός ισότυπος ενέχει ρόλο στην καρκινογένεση του ενδομητρίου.

Λέξεις κλειδιά : Λεπτίνη , υποδοχέας , ενδομήτριο , ωοθήκη

Summary

Purpose: The objective of this study was to investigate the expression of leptin receptors in benign and malignant tumours of the ovaries and the endometrium and its association with Body Mass Index(BMI)

Methods: Histological uterine and ovarian samples of normal and neoplastic tissue from 35 patients aged 37-72 years were examined for the expression of leptin receptors with the method of RT - PCR.

Results : A BMI >30 was correlated with increased expression of leptin receptors. Both Ra and Rb receptors were expressed in normal and neoplastic tissues. A statistically significant difference in leptin receptors expression was detected between normal and neoplastic tissue, with expression being around 5-fold higher in neoplastic tissue.

Conclusion: Endometrial neoplasms and long leptin isoform receptor expression were associated with an increased BMI. The long isoform may have a role in endometrial carcinogenesis.

Key words: Leptin, receptor, cancer, endometrium, ovary

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Pinel J. Biopsychology , 6thed, chapter 12, Pearson eds,2006,USA, p309-311

2. Harris RB. Parabiosis between db/db and ob/ob or db/+ mice. *Endocrinology* 1999, 140:138-45.
3. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994, 372:425-432.
4. Messinis IE, Milingos SO. Leptin in human reproduction. *Human Reproduction Update* 1999, 5: 52-63.
5. Seeley RJ, Schwartz MW. The regulation of energy balance : peripheral hormonal signals and hypothalamic neuropeptides. *Curr Dir Psychol Sci* 1997, 6 :39-44
6. Ahima RS, Osei SY. Leptin signalling *Physiol Behav* 2004, 81:223-241
7. Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, et al. Cerebrospinal Fluid leptin levels. Relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nature Med* 1996, 2: 589-593
8. Campfield LA, Smith FJ, Gulsez Y, et al. Mouse ob protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 1995, 269: 546-550
9. Schwarz MW, Seeley RJ, Campfield LA, et al. Identification of hypothalamic targets of leptin action. *J Clin Invest* 1996, 98:1101-1106
10. Heymsfield SN, Greenberg AS, Fujioka K, et al. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults. *JAMA* 1999, 282 :1568-1575
11. Farooqi IS, Jebb SA, Langmark G, et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency . *N Engl J Med* 1999, 341:879-884
12. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1996: 269:540-543

13. Licinio J, Mantzoros C, Negrao AB et al. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nature Medicine* 1997, 3:575-579
14. Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML et al. Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *Journal of Clinical Investigation* 1996, 97:1344-1347
15. Matcovic V, Ilich JZ, Badenhop NE et al. Gain fat is inversely related to the nocturnal rise in serum leptin in young females. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82:1368-1372
16. Mantzoros CS, Ozata M. Negrao AB et al. Synchronicity of frequently, samples thyrotropin (TSH) and leptin concentrations in healthy adults and leptin-deficient subjects: evidence for possible partial TSH regulation by leptin in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001, 86:3284-3291
17. Licinio J, Negrao AB, Mantzoros CS et al. Synchronicity of frequently sampled, 24 hour concentrations of circulating leptin, luteinizing hormone and estradiol in healthy women. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 1998, 95: 2541-2546
18. Cumin P, Baum HP, Levens N. Leptin is cleared from the circulation primarily by the Kidney. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 1996: 20:1120-1126
19. Ψηλοπαναγιώτη Α . Νευροενδοκρινική ρύθμιση της πρόσληψης τροφής: μόρια και δίκτυα. *Μεταπτυχιακή εργασία Πάτρα* 2006, σελ 32-33
20. Marti A, Berraondo B, Martiinez JA. Leptin:physiological actions. *J Physiol Biochem* 1999, 55: 43-9.
21. Loffler S, Aust G, Kohler U, et al. Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries. *Mol Hum Reprod.* 2001 : 7: 1143-9

22. Messinis IE, Milingos S, Zikopoulos K, et al. Leptin concentrations in the follicular phase of spontaneous cycles and cycles superovulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 1998, 13: 1150-1152
23. Messinis IE, Kariotis I, Milingos S, et al. Treatment of normal women with oestradiol plus progesterone prevents the decrease of leptin concentrations induced by ovariectomy. *Hum. Reprod* 2000, 15: 2383-2387
24. Messinis IE, Papageorgiou I, Milingos S, et al. Oestradiol plus progesterone treatment increases serum leptin concentrations in normal women. *Hum. Reprod* 2001, 16: 1827-1832
25. Tartaglia L. The leptin receptor. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272:6093-6096
26. Steiner RA. Lords and ladies leapin' on leptin. *Endocrinology* 1996, 137:4533-4535
27. Kamohara S, Burcelin R, Halaas JR, et al. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 1997, 389:374-377
28. Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet* 1998, 351:737-742
29. Woods AJ, Stock MJ. Leptin activation in hypothalamus. *Nature* 1996, 381:745
30. Wurtman RJ. What is leptin for, and does it act on the brain? *Nature Medicine* 1996, 2:492-493
31. Wolf G. Neuropeptides responding to leptin. *Nutrition Review* 1997, 55:85-88
32. Schwartz MW, Seeley RJ. Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. *New England Journal of Medicine* 1997, 336:1803-1811

33. Flier JS, Maratos-Flier E. Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* 1998, 92:437-440.

34. Ur E, Grossman A, Despres J-P. Obesity results as a consequence of glucocorticoid induced leptin resistance. *Hormone and Metabolic Research* 1996, 28:744-747

35. Lynn RB, Cao G-Y, Considine RV, Hyde TM, Caro JF. Autoradiographic localization of leptin binding in the choroids plexus ob/ob and db/db mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996, 219: 884-889

36. Golden PL, Maccagnan TJ, Pardridge WM. Human blood-brain- barrier leptin receptor. *Journal of Clinical Investigation* 1997, 99:14-18

37. Cumin P, Baum HP, Levens N. Leptin is cleared from the circulation primarily by the Kidney. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 1996, 20:1120-1126

38. Houseknecht KL, Mantzoros CS, Kuliawat R, et al. Evidence for leptin binding proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity. *Diabetes* 1996, 45:1638-1643

39. Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, et al. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes* 1996, 45:984-987

40. Liu YL, Emilsson V, Cawthorne MA. Leptin inhibits glycogen synthesis in the isolated soleus muscle of obese (ob/ob) mice. *FEBS Letters* 1997 : 411:351-355

41. Lammert A, Kiess W, Bottner A, et al. Soluble leptin receptor represents the main

leptin binding activity in human blood. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001, 283:982-988

42. Huang I, Wang Z, Li C. Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276:6343-6349

43. Landt M, Horowitz IF, Coppack SW, et al. Effect of short-term fasting on free and bound leptin concentrations in lean and obese women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001, 86:3768-3771

44. Licinio J, Mantzoros C, Negrao AB et al. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nature Medicine* 1997, 3:575-579

45. Bjorntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 1991, 14:1132-1143.

46. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995, 269:543-546

47. Mantzoros CS, Moschos SL. Leptin in search of role(s) in human physiology and pathophysiology. *Clinical Endocrinology* 1998, 49:551-567

48. Wauters M, Van Gaal L. Gender differences in leptin levels and physiology: a role for leptin in human reproduction. *The Journal of Gender Specific Medicine* 1999, 2:46-51

49. Brann DW, Wade MF, Dhandapani KM, et al. Leptin and reproduction. *Steroids* 2002, 67:95-104

50. Karlsson C, Lindell K, Svensson E et al. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82:4144-4148

51. Magni P, Vettor R, Pagano C et al. Expression of leptin receptor in immortalized gonadotropin-releasing hormone-secreting neurons. *Endocrinology* 1999, 140:1581-1585
52. Cunningham MJ, Clifton DK, Steiner RA. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biology of Reproduction* 1999, 60:216-222
53. Mercer JG, Hoggard N, Williams LM et al. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Letters* 1996, 387:113-116
54. Jureus A, Cunningham MJ, McClain ME, et al. Galanin-like peptide (GALP) is a target for regulation by leptin in the hypothalamus of the rat. *Endocrinology* 2000, 141:2703-2706
55. Parent AS, Lebrethon MC, Gerard A, et al. Leptin effects on pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from the adult rat hypothalamus and interaction with cocaine and amphetamine regulated transcript peptide and neuropeptide Y. *Regulatory Peptides* 2000, 92:17-24
56. Lebrethon MC, Vandersmissen E, Gerard A, et al. Cocaine and amphetamine-regulated-transcript peptide mediation of leptin stimulatory effect on the rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator in vitro. *Journal of Neuroendocrinology* 2000, 12:383-385
57. Murray JF, Mercer JG, Adan RA et al. The effect of leptin on luteinizing hormone release is exerted in the zona incerta and mediated by melanin-concentrating hormone. *Journal of Neuroendocrinology* 2000, 12:1133-1139
58. Spicer LJ, Francisco CC. The adipose obese gene product, leptin:evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. *Endocrinology* 1997; 138:3374-3379

59. Apter D. The role of leptin in female adolescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2003, 997:64-76.
60. Spicer LJ, Francisco CC. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovary thecal cell steroidogenesis. *Biology of Reproduction* 1998, 58:207-212
61. Brannian JD, Zhao Y, McElroy M. Leptin inhibits gonadotrophin- stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. *Human Reproduction* 1999, 14:1445-1448
62. Zachow RJ, Magoffm DA. Direct intraovary effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-1 on follicle-stimulating hormone dependent estradiol-17p production by rat ovary granulosa cells. *Endocrinology* 1991, 138:847-850
63. Ghizzoni L, Barreca A, Mastorakos G et al. Leptin inhibits steroid biosynthesis by human granulosa-lutein cells. *Hormone and Metabolic Research* 2001: 33:323-328
64. Kitawaki J, Kusuki I, Koshiha H, et al. Leptin directly stimulates aromatase activity in human luteinized granulosa cells. *Molecular Human Reproduction* 1999, 5:708-713
65. Caprio LM, Isidori AM, Carta AR et al. Expression of functional leptin receptors in rodent Ley dig cells. *Endocrinology* 1999, 140:4939-4947
66. Yu WH, Kimura M, Walczewska A, et al. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proceedings of the Natioal Academy of Science USA* 1997, 94:1023-1028

67. Yu WH, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Nitric oxide mediates leptin-induced luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH and leptin-induced LH release from the pituitary gland. *Endocrinology* 1997; 138:5055-5058

68. Messinis I.E, Milingos S, Zikopoulos K et al. Leptin concentrations in the follicular phase of spontaneous cycles and cycles superovulated with follicle stimulating hormone. *Human Reproduction* 1998, 13:1152-1156

69. Messinis IE, Milingos SD, Alexandras E, et al. Leptin concentrations in normal women following bilateral ovariectomy. *Human Reproduction* 1999, 14:913-918

70. Messinis IE, Kariotis I, Milingos SD, Kolios G, Seferiadis K. Treatment of normal women with oestradiol plus progesterone

71. Brann DW, De Sevilla L, Zamorano PL, et al. Regulation of leptin gene expression and secretion by steroid hormones. *Steroids* 1999, 64:659-663

72. Luukkaa V, Savontaus E, Rouru J et al. Effects of estrous cycle and steroid replacement on the expression of leptin and uncoupling proteins in adipose tissue in the rat. *Gynecological Endocrinology* 2001, 15:103-112

73. Shimizu RH, Shimomura Y, Nakanishi Y et al. Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects. *Journal of Endocrinology* 1997 : 154:285-292

74. Tanaka M, Nakaya S, Kumai T et al. Effects of estrogen on serum leptin levels and leptin mRNA expression in adipose tissue in rats. *Hormone Research* 2001, 56:98-104

75. Yoneda N, Saito S, Kimura M et al. The influence of ovariectomy on ob gene expression in rats. *Hormone and Metabolic Research* 1998, 30:263-265

76. Chu SC, Chou YC, Liu JY et al. Fluctuation of serum leptin concentration in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. *Life Science* 1999, 64:2299-2306

77. Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, et al. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women *Diabetes* 1998, 47:913-917

78. Castracane VD, Kraemer RR, Franken MA et al. Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity, and estrogen administration. *Fertility and Sterility* 1998, 70:472-477
79. Elbers JM, Asscheman H, Seidell JC et al. Reversal of the sex difference in serum leptin levels upon cross-sex hormone administration in transsexuals. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82:3267-3270
80. Casabiell X, Pineiro Y, Peino R et al. Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998, 83:2149-2155
81. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW et al. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes* 1996, 45:1455-1462
82. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch I et al. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996, 81:3424- 3427
83. Luukkaa V, Pesonen I, Huhtaniemi A et al. Inverse correlation between serum testosterone and leptin in men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998, 83:3243-3246
84. McConway MG, Johnson D, Kelly A et al. Differences in circulating concentrations of total, free and bound leptin relate to gender and body composition in adult humans. *Annual of Clinical Biochemistry* 2000, 37:717-723
85. Flier JS. Leptin expression and action: new experimental paradigms. *Proceedings of National Academy of Science USA* 1997, 94: 4242-4245
86. Mantzoros CS, Dunaif A, Flier JS. Leptin concentrations in the polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82:1687-1691
87. Wabitsch M, Jensen PB et al. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. *Diabetes* 1996, 45:1435- 1438.
88. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV et al. Acute and chronic effect of insulin on leptin production in humans. *Diabetes* 1996, 45:699-701
89. Mantzoros CS, Moschos S, Avramopoulos I et al. Leptin concentrations in relation to BMI and activation of the TNF α system in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82:3408-3413
90. Emilsson V, Liu Y-L, Cawthorne MA, et al. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 1991, 4:313-316

91. Kieffer TJ, Heller RS, Leech CA, et al. Suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K channels in pancreatic b-cells. *Diabetes* 1997, 46:1087-1093
92. Cohen B, Novich D, Rubinstein M. Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 1996, 274:1185-1188
93. Muller G, Ertl G, Gerl M, et al. Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272:10585-10593
94. Janik JE, Cutri BD, Considine RV et al. Interleukin 1 α increases serum leptin concentrations in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82:3084-3086
95. Larsson H, Elmstahl SH, Ahren B. Plasma leptin levels correlate to islet function independently of body fat in postmenopausal women. *Diabetes* 1996, 45:1580-1584
96. Papaspyrou-Rao S, Schneider SH, Petersen RN, et al. Dexamethasone increases leptin expression in humans in vivo, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82:1635-1637
97. Donahoo WT, Jensen DR, Yost TJ, et al. Isoproterenol and somatostatin decrease plasma leptin in humans: a novel mechanism regulating leptin secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82:4139-4143.
98. Mantzoros CS, Varvarigou A, Kaklamani VG, et al. Effect of birth weight and maternal smoking on cord blood leptin concentrations of full-term and preterm newborns. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82:2856-2861
99. Mantzoros CS, Rosen HR, Greenspan SL, et al. Short-term hyperthyroidism has no effect on leptin concentration in man. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997, 82:497-499
100. Al-Shoumer KAS, Anyaoku Y, Richmond W, et al. Elevated leptin concentrations in growth hormone-deficient hypopituitary adults. *Clinical Endocrinology* 1997, 47:153-159
101. Gill MS, Toogood AA, O'Neill PA. Relationship between growth hormone (GH) status, serum leptin and body composition in healthy and GH deficient elderly subjects. *Clinical Endocrinology* 1997, 47:161-167
102. Cairo E, Senaris R, Considine RV, et al. Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology* 1997, 138:2203-2206
103. Duond H, Presle N, Terlain B, et al. Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003, 48: 3118-29

104. Somasundar P, Riggs D, Jakson B, et al. Leptin stimulates esophageal adenocarcinoma growth by nonapoptotic mechanisms. *Am J Surg* 2003, 186: 575-8
105. Onuma M, Bub JD, Rummel TL, et al. Prostate cancer cell-adipocyte interaction: leptin mediates androgenindependent prostate cancer cell proliferation through c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem* 2003, 278: 42660-7
106. Stattin P, Palmqvist R, Soderberg S, et al. Plasma leptin and colorectal cancer risk: a prospective study in Northern Sweden. *Oncol Rep* 2003, 10: 2015-21
107. Chan TF, Su JH, Chung YF, et al. Decreased serum leptin levels in women with uterine leiomyomas. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2003, 82:173-6.
108. Lebrecht A, Ludwig A, Huber A, et al. Serum vascular endothelial growth factor and serum leptin in patients with cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2002, 85: 32-5
109. Abramov Y, Anteby SO, Fatum M, et al. The Kinetics of leptin in Meigs' syndrome. *Gynecol Oncol*. 2003, 83: 316-318
110. Calabro P, Yeh ET. Obesity, inflammation, and vascular disease: the role of the adipose tissue as an endocrine organ. *Subcell Biochem*. 2007, 42:63-91.
111. Petridou E, Papadiamantis Y, Markopoulos C, et al. Leptin and insulin growth factor I in relation to breast cancer (Greece). *Cancer Causes Control*. 2000, 11 :383-8.
112. Sharma D, Saxena NK, Vertino PM, et al. Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Endocrine-Related Cancer* 2006, 13 : 629-640
113. Petridou E, Belechri M, Dessypris N, Koukoulomatis P, Diakomanolis E, Spanos E, Trichopoulos D. Leptin and body mass index in relation to endometrial cancer risk. *Ann Nutr Metab*. 2002: 46:147-51.
114. Koda M, Sulkowska M, Wincewicz A, et al. Expression of leptin, leptin receptor, and hypoxia-inducible factor 1 alpha in human endometrial cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2007, 1095:90-8.
115. Guppy M. The hypoxic core: a possible answer to the cancer paradox. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002, 299:676
116. http://www.thegcf.org/pubs/CA125Levels_brochure.pdf. 24/5/08
117. Bast RC, Jr Feeney M, Lazarus H, et al. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest*. 1981, 68:1331 -1337.
118. Bast RC, Jr Klug TL, St John E, et al. A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med*. 1983, 309,883 -887

119. Bon GG, Kenemans P, Verstraeten R, et al. Serum tumor marker immunoassays in gynecologic oncology: establishment of reference values. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1996, 174,107 -114.
120. Numa F, Umayahara K, Suehiro Y, et al. New molecular tumor markers for endometrial cancer*Hum Cell.* 2001, 14(4):272-4.
121. Rose PG, Sommers RM, Reale FR, et al. Serial serum CA 125 measurements for evaluation of recurrence in patients with endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol.* 1994, 84(1):12-6
122. Price FV, Chambers SK, Carcangiu ML, et al. CA 125 may not reflect disease status in patients with uterine serous carcinoma. *Cancer.* 1998, 82(9):1720-5
123. Λωλης Δ. Γυναικολογία και μαιευτική , τομος Α, Εκδ Παρισιάνου, Αθήνα 1995
124. Moritani S, Ichihara S, Hasegawa M, et al. Serous papillary adenocarcinoma of the female genital organs and invasive micropapillary carcinoma of the breast. Are WT1, CA125, and GCDFP-15 useful in differential diagnosis? *Hum Pathol.* 2008, 39(5):666-71
125. Purdie DM, Bain CJ, Webb PM, et al. Body size and ovarian cancer: case-control study and systematic review (Australia). *Cancer Causes Control.* 2001, 12(9):855-63.
126. Renehan AG, Tyson M, Egger M, et al. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* 2008, 371(9612):569-78
127. Somasundar P, Yu AK, Vona-Davis L, et al. Differential effects of leptin on cancer in vitro.*J Surg Res.* 2003, 113(1):50-5.
128. Somasundar P, McFadden DW, Hileman SM, et al. Leptin is a growth factor in cancer.*J Surg Res.* 2004, 116(2):337-49
129. Yuan SS, Tsai KB, Chung YF, et al. Aberrant expression and possible involvement of the Ob receptor in endometrial cancer. *Gynecol. Oncol* 2004, 92:769-775
130. Fei H, Okano HJ, Li C, et al. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, 94(13):7001-5.

131. Carino C, Olawaiye AB, Cherfils S, et al. Leptin regulation of proangiogenic molecules in benign and cancerous endometrial cells. *Int J Cancer*. 2008, 123(12):2782-90.
132. Kitawaki J, Koshiba H, Ishihara H, et al. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000, 85(5):1946-50.