

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ «ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗΣ ΣΕ ΤΕΛΕΙΟΜΗΝΑ ΚΑΙ
ΠΡΩΡΑ ΝΕΟΓΕΝΝΗΤΑ ΒΡΕΦΗ
ΣΑΚΧΑΡΟΔΙΑΒΗΤΙΚΩΝ ΜΗΤΕΡΩΝ – ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ
ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ**

ΒΑΙΑ ΡΑΡΡΑ
Α.Μ. 424504
Ε΄ ΚΥΚΛΟΣ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2006

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΣΚΟΥΡΟΛΙΑΚΟΥ ΜΑΡΙΑ
ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ «ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ»

ΜΕΛΗ
ΠΟΛΥΧΡΟΝΟΠΟΥΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ «ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ»

ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΑ
ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ «ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ»

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

1. Ο λιπώδης ιστός ως ενδοκρινής αδένας
2. Περιγραφή - Δομή – Υποδοχείς της αντιπνεεκτίνης
3. Βιολογικός Ρόλος
 - α. Μελέτες σε ζώα
 - β. Μελέτες σε ανθρώπους
4. Ρυθμιστές έκκρισης της αντιπνεεκτίνης στους ενήλικες
5. Αντιπνεεκτίνη στα νεογνά
 - α. Τόπος παραγωγής στα νεογνά
 - β. Ανυπαρξία φυλετικού διμορφισμού
 - γ. Υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με την παιδική ηλικία και τους ενήλικες
6. Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (ΣΔΚ)
7. Νεογνό Διαβητικής Μητέρας (ΝΔΜ)
8. Σκοπός της παρούσας διατριβής

B. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Σχεδιασμός Μελέτης
2. Υλικό
 - α. Πληθυσμός μελέτης- Κριτήρια αποκλεισμού
 - β. Λήψη αίματος - Επεξεργασία
 - γ. Υπολογισμός ανθρωπομετρικών παραμέτρων
 - δ. Μέτρηση Βιοχημικών Παραμέτρων
 - ε. Μέτρηση Μεταβολικών Ορμονών
 - i Αρχές Ραδιοανοσολογικής Μεθόδου
 - ii. Μέτρηση Επιπέδων Αντιπνεεκτίνης
 - Χαρακτηριστικά του RIA kit της αντιπνεεκτίνης
 - Περιγραφή πρωτοκόλλου μέτρησης της αντιπνεεκτίνης
 - ii. Μέτρηση επιπέδων γρελίνης
 - Χαρακτηριστικά του RIA kit της γρελίνης

στ. Ηθική έγκριση

Γ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 1. Περιγραφικά Στοιχεία**
- 2. Σύγκριση Μεταξύ Πρόωρων και Τελειόμηνων Νεογνών**
 - α. Ανθρωπομετρικές παράμετροι**
 - β. Βιοχημικές παράμετροι**
 - γ. Επίπεδα ορμονών**
- 3. Συσχέτιση Ορμόνης με το Φύλο**
- 4. Συσχέτιση Αντιπνεκτίνης με Ανθρωπομετρικές Παραμέτρους**
- 5. Συσχέτιση Αντιπνεκτίνης με Βιοχημικές Παραμέτρους**
- 6. Συσχέτιση Γρελίνης και Αντιπνεκτίνης**

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

- 1. Περιγραφικά Στοιχεία**
- 2. Σύγκριση Μεταξύ Πρόωρων και Τελειόμηνων Νεογνών**
 - α. Ανθρωπομετρικές Παράμετροι**
 - β. Βιοχημικές παράμετροι**
 - γ. Επίπεδα ορμόνης**
- 3. Συσχέτιση Ορμόνης με το Φύλο**
- 4. Συσχέτιση Αντιπνεκτίνης με Ανθρωπομετρικές Παραμέτρους**
- 5. Συσχέτιση Αντιπνεκτίνης με Βιοχημικές Παραμέτρους**
- 6. Συσχέτιση Αντιπνεκτίνης και Γρελίνης**
- 7. Τύπος τοκετού**

ΣΤ. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Οι κυριότερες δράσεις της αντιπονεκίνης στους ενήλικες είναι εν μέρει γνωστές. Οι έρευνες όμως για τις ορμόνες αυτές σε νεογνά και ειδικότερα σε βρέφη μητέρων με διαβήτη κύησης είναι ελάχιστες.

Σκοπός: Η μελέτη σχεδιάστηκε για να υπολογίσει τα επίπεδα της αντιπονεκίνης και τη συσχέτιση αυτών με ανθρωπομετρικές και ορισμένες βιοχημικές παραμέτρους των βρεφών καθώς και τη συσχέτιση μεταξύ γρελίνης και αντιπονεκίνης στην ιδιαίτερη αυτή πληθυσμιακή ομάδα.

Υλικό: Μελετήθηκαν 70 νεογνά που γεννήθηκαν στο μαιευτήριο «Ελενα Βενιζέλου» με κοινό τους χαρακτηριστικό ότι οι μητέρες τους έπασχαν από σακχαρώδη διαβήτη κύησης. Το σύνολο των βρεφών διαχωρίστηκε σε πρόωρα και τελειόμηνια.

Μέθοδος: Στα βρέφη έγινε αιμοληψία κατά τις 3 πρώτες μέρες της ζωής και οι ορμόνες μετρήθηκαν με ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA). Οι βιοχημικές παράμετροι υπολογίστηκαν με τις γνωστές μεθόδους που ισχύουν σήμερα.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά βάρους, μήκους, BMI και περιμέτρου κεφαλής όσον αφορά στις ανθρωπομετρικές παραμέτρους και στα επίπεδα γλυκόζης της πρώτης και δεύτερης μέρας μεταξύ των τελειόμηνων και των πρόωρων όσον αφορά στις βιοχημικές παραμέτρους.

Η αντιπονεκτίνη δεν φάνηκε να διαφέρει σε τιμές ανάμεσα στα πρόωρα και στα τελειόμηνια και δεν βρέθηκε φυλετικός διμορφισμός.

Η αντιπονεκτίνη σχετίστηκε αρνητικά με το BMI, το βάρος γέννησης και την περίμετρο κεφαλής στα πρόωρα. Θετική συσχέτιση παρατηρήθηκε με το βάρος, το μήκος και την περίμετρο κεφαλής στα τελειόμηνια. Από τις βιοχημικές παραμέτρους βρέθηκε να σχετίζεται αρνητικά με την ολική χοληστερόλη. Μεταξύ γρελίνης και αντιπονεκτίνης βρέθηκε ήπια μεν, στατιστικά σημαντική συσχέτιση δε.

Συμπεράσματα: Μερικά από τα συμπεράσματά μας συμφωνούν με τη βιβλιογραφία και μερικά αντιτίθενται. Είναι πολύ πιθανόν οι συσχετίσεις που βρέθηκαν, θετικές ή αρνητικές, να ερμηνεύουν μηχανισμούς άμυνας του νεογνού για την αντιμετώπιση μιας κατάστασης έντονου στρες όπως είναι ο τοκετός ή/και για την αντιμετώπιση της υπερινσουλιναϊμίας λόγω διαβήτη κύησης της μητέρας.

Σημαντική είναι η θετική συσχέτιση που βρέθηκε μεταξύ γρελίνης και αντιπονεκτίνης και δεν έχει ξαναμελετηθεί στη βιβλιογραφία για αυτή την ομάδα βρεφών.

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

1. Ο λιπώδης ιστός ως ενδοκρινής αδένας (7)

Ο λιπώδης ιστός είναι ένας πολύπλοκος, απαραίτητος και πολύ ενεργός αδένας(1). Η παλαιότερη άποψη ότι είναι ένα παθητικό όργανο αποθήκευσης ενέργειας δεν ισχύει πια. Το 1987 βρέθηκε η χρησιμότητά του στο μεταβολισμό των ορμονών του φύλου. Το 1994, μετά την ανακάλυψη της λεπτίνης, ο ενδοκρινής του ρόλος πλέον εδραιώθηκε. Γνωρίζουμε πια ότι εκκρίνει και εκφράζει πλήθος βιοδραστικών ορμονών, γνωστές ως λιποκίνες, η δράση των οποίων είναι αυτοκρινής, παρακρινής (δηλ. σε τοπικό επίπεδο) ή συστηματική – ενδοκρινής (βλ. πίνακα 1). Είναι πιθανό αυτές οι ορμόνες να συμμετέχουν στην παχυσαρκία(1).

Κυτοκίνες	Λεπτίνη, TNFα IL6
Άλλες ορμόνες του ανοσοποιητικού	MCP-1
Πρωτεΐνες ινολυτικού συστήματος	PAI-1, ιστικός παράγοντας
Πρωτεΐνες συμπληρώματος	Αδιψίνη, συμπληρωματικός παράγοντας B, ASP, αντιγονεκτίνη
Λιπίδια και πρωτεΐνες της μεταφοράς ή του μεταβολισμού των λιπιδίων	LPL, CETP, ApoE, NEFA
Ένζυμα μεταβολισμού των στεροειδών	Κυτόχρωμα P-450, αρωματάσες 17βHSD, 17βHSD1
Άλλες πρωτεΐνες	Ρεξιστίνη

Πίνακας 1. Παραδείγματα ορμονών που εκκρίνονται από το λιπώδη ιστό(7).

Εκτός από το να αποτελεί τόπο παραγωγής, εκφράζει πλήθος υποδοχέων και γι' αυτό βρίσκεται σε «επικοινωνία» με τα υπόλοιπα ενδοκρινικά συστήματα, συμπεριλαμβανομένου και του ΚΝΣ (βλ. πίνακα 2).

Υποδοχείς «παραδοσιακών» ορμονών	Ινσουλίνης, Γλυκαγόνης, GH, TSH, Γαστρίνης, Αγγειοτενσίνης II
Πυρηνικοί υποδοχείς ορμονών	Γλυκοκορτικοειδή, Βιτ. D, Θυρεοειδικές, Ανδρογόνα, Οιστρογόνα, Προγεστερόνη
Υποδοχείς κυτοκινών	Λεπτίνη, IL-6, TNFα
Υποδοχείς κατεχολαμινών	B1, β2, β3, α1, α2

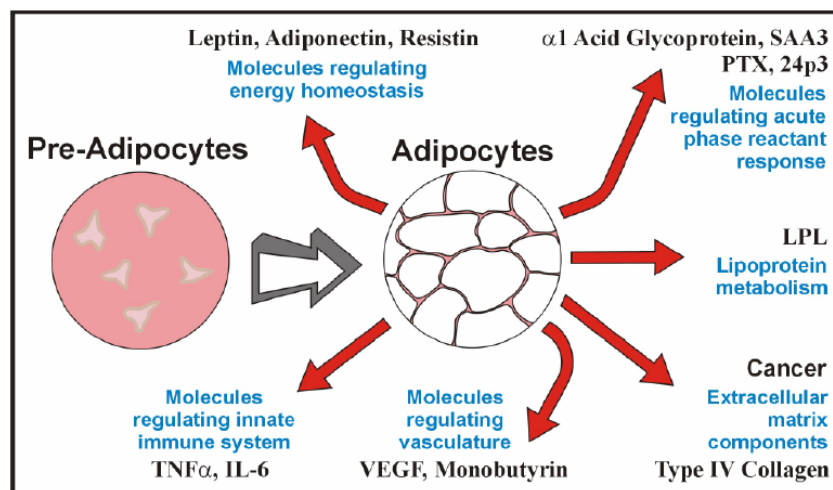
Πίνακας 2. Παραδείγματα υποδοχέων που εκφράζονται στο λιπώδη ιστό(7).

Το πολύπλοκο αυτό ενδοκρινικό δίκτυο που προκύπτει, επιτρέπει στο λιπώδη ιστό να συμμετέχει σε πλήθος βιολογικών διεργασιών όπως ο ενεργειακός μεταβολισμός, η νευροενδοκρινική λειτουργία και το ανοσοποιητικό σύστημα.

Η σημασία του ρόλου του λιπώδους ιστού αποδεικνύεται από τις επιπτώσεις που έχουν στο μεταβολισμό ακραίες καταστάσεις όπως η παχυσαρκία και η έλλειψη λιπώδους ιστού. Η παχυσαρκία, και ειδικά η κεντρική/κοιλιακή σχετίζεται με αντίσταση στην ινσουλίνη, με υπεργλυκαιμία, με δυσλιπιδαιμία, με υπέρταση, με προθρομβωτικές και προφλεγμονώδεις καταστάσεις, οι οποίες στο σύνολό τους απαρτίζουν το γνωστό ως μεταβολικό σύνδρομο. Αντιθέτως, η έλλειψη λιπώδους ιστού, σχετίζεται και αυτή με στοιχεία του μεταβολικού συνδρόμου τόσο σε ανθρώπους όσο και σε τρωκτικά.

Ο λιπώδης ιστός εκτός από λιποκύτταρα περιλαμβάνει συνδετικό ιστό, νευρικό ιστό, στρωματικά κύτταρα και κύτταρα του ανοσοποιητικού. Κάποιες ορμόνες, όπως η λεπτίνη και η αντιπονεκτίνη, εκκρίνονται από τα λιποκύτταρα και κάποιες άλλες από τα υπόλοιπα στοιχεία του που προαναφέρθηκαν. Όλα αυτά τα στοιχεία τον καθιστούν ενεργό ενδοκρινές όργανο.

Η καλύτερη δε κατανόηση της ενδοκρινούς λειτουργίας του λιπώδους ιστού μπορεί να βοηθήσει στην εύρεση θεραπειών για ασθένειες που σχετίζονται με το μεταβολισμό.



Εικόνα 1. Ο ρόλος των λιποκυττάρων στην ενεργειακή ομοιόσταση, στο ανοσοποιητικό και στον καρκίνο. Ο λιπώδης ιστός παίζει σημαντικό ρόλο στα προβλήματα που προκύπτουν από την παρατεταμένη υπεργλυκαιμία. Η υπεργλυκαιμία προκαλεί την παραγωγή παραγόντων οξείας φάσης στο λιπώδη ιστό (alpha 1 acid glycoprotein, SAA3, 24p3, PTX). Τα λιποκύτταρα παράγουν τον παράγοντα αύξησης του ενδοθηλίου (VEGF) ως αντίδραση στην ινσουλίνη και τις κατεχολαμίνες. Η 1-βουτυρυλ-γλυκερόλη είναι ένας νέος αγγειοδραστικός παράγοντας που εκκρίνεται από τα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα. Το κολлагόνο VI, μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη του εξωκυττάριου χώρου, έχει ανώτερο σημείο ρύθμισης στην περίπτωση ογκογένεσης(1).

2. Περιγραφή - Δομή - Υποδοχείς της αντιπονεκτίνης (7)

Η ορμόνη αυτή ανακαλύφθηκε και περιγράφηκε, με διαφορετικές ονομασίες, το 1995 από 4 ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες με 4 διαφορετικές μεθόδους. Εκφράζεται στα διαφοροποιημένα λιποκύτταρα και κυκλοφορεί σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα, οι οποίες μπορεί φτάνουν το 0.01% των συνολικών πρωτεϊνών πλάσματος(47). Η έκφραση της αντιπονεκτίνης είναι μεγαλύτερη στο υποδόριο παρά στο σπλαγχνικό λίπος.

Κωδικοποιείται από το γονίδιο ARM1 που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3q27. Είναι μία ορμόνη 244 αμινοξέων και βάρους 30-kDa(1).

Η δομή της περιλαμβάνει ένα N-τελικό άκρο, η δομή του οποίου μοιάζει με του κολλαγόνου, και είναι ένα C-τελικό άκρο σφαιρικής δομής με πολλές ομοιότητες στη δομή και στην αλληλουχία με τον παράγοντα C1q του συμπληρώματος(47).

Έκτος από τον παράγοντα C1q έχει ομόλογη ακολουθία με το κολλαγόνο VIII και X.

Τόσο η αντιπονεκτίνη όσο και ο παράγοντας C1q μοιάζουν κυρίως στην τρισδιάστατη απεικόνισή τους και διατηρούν όμοιες σε αμινοξέα περιοχές και γι αυτό κατατάσσονται στη μεγάλη οικογένεια των παραγόντων τύπου TNF(47).

Μετα-μεταφραστική τροποποίηση της ορμόνης με υδροξυλίωση και γλυκοξυλίωση παράγει πολλές ισομορφές της αρχικά σε τριμερή και κατόπιν σε ολιγομερή.

Οι ολιγομερείς μορφές της αντιπονεκτίνης σχηματίζονται από αλληλεπίδραση μεταξύ των περιοχών που προσομοιάζουν του κολλαγόνου. Από τη διάσπαση της ορμόνης προκύπτει η σφαιρική περιοχή της η οποία κυκλοφορεί σε μεγάλα επίπεδα στο αίμα και έχει βιολογική δράση(47).

Στο πλάσμα κυκλοφορεί με τη μορφή εξαμερούς σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους ή με τη μεγαλύτερη πολυμερισμένη μορφή μεγάλου μοριακού βάρους, η οποία είναι και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στην κυκλοφορία(1).

Οι υποδοχείς της είναι δύο: Adipo R1 & 2. Αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές οι οποίες διαφέρουν δομικά και λειτουργικά με τις πρωτεΐνες G-υποδοχείς.

Ο υποδοχέας Adipo R1 εκφράζεται κυρίως στους μύς και λειτουργεί ως υποδοχέας υψηλής συγγένειας με τη σφαιρική αντιπονεκτίνη και χαμηλής με την ολικού μήκους.

Ο υποδοχέας Adipo R2 εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ και λειτουργεί ως υποδοχέας μεσαίου βαθμού συγγένειας με την σφαιρική και την ολικού μήκους.

Πρόσφατα έχουν αναγνωριστεί οι T-καντχερίνες ως υποδοχείς της εξαμερούς και των μεγαλομοριακών τμημάτων της αντιπονεκτίνης. Μάλλον δρουν ως συν-υποδοχείς με τους 1 και 2 και έτσι μεταφέρεται το σήμα εντός του κυττάρου(47). Έτσι, η βιολογική δράση της αντιπονεκτίνης βασίζεται όχι μόνο στις κυκλοφορούσες συγκεντρώσεις των ισομορφών της αλλά και στην ιστο-εξαρτώμενη έκφραση των υποδοχέων της.

3. Βιολογικός Ρόλος

α. Μελέτες σε ζώα(1)

Έχουν γίνει μελέτες κυρίως σε τρωκτικά και πιθήκους, όπου βρέθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου της αντιπονεκτίνης σχετίζεται με την παχυσαρκία και την αντίσταση στην ινσουλίνη και μάλισταδείχθηκε ότι η έκφραση του γονιδίου της καταστάληκε στις περιπτώσεις αυτές. Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν στη υπόθεση της ύπαρξης μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης (negative feedback) από τον ίδιο το λιπώδη ιστό(1).

Οι ίδιοι υποδοχείς της ορμόνης έχουν βρεθεί και στην κυτταρική μεμβράνη των πειραματόζωων. Ο υποδοχέας 1 (adipoR1): υπάρχει αποκλειστικά στα μυϊκά κύτταρα και ο υποδοχέας 2 (adipoR2): κυρίως στα ηπατικά κύτταρα. Πειραματικά προκαλούμενη έκφραση ή καταστολή των 2 αυτών υποδοχέων έδειξε ότι μεσολαβούν στη λειτουργία της AMP κινάσης και του PPAR-γ καθώς και στην οξείδωση των λιπαρών οξέων και στην πρόσληψη γλυκόζης(1).

Οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τη σύνθεση της αντιπονεκτίνης δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως(1). Ποντίκια με έλλειψη αντιπονεκτίνης αναπτύσσουν πρόωρα δυσανεξία στη γλυκόζη, αύξηση των κυκλοφορούντων επιπέδων μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων, έντονο πολλαπλασιασμό των λειών μυϊκών ινών των αγγείων μετά από τραυματισμό. Αυτές οι ανεπιθύμητες μεταβολικές διεργασίες συνέβησαν χωρίς να υπάρξουν αλλαγές στο βάρος και στην πρόσληψη τροφής. Αντιθέτως, η υπερέκφραση της αντιπονεκτίνης στα ποντίκια σε βελτίωση των προηγούμενων παραμέτρων(7).

Ένα πρόγραμμα περιορισμού θερμίδων που έχει ως αποτέλεσμα την πτώση του BMI κατά 10 % οδηγεί σε αύξηση της αντιπονεκτίνης ορού. Σε πιθήκους Rhesus με ΣΔΠ, τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης μειώθηκαν πριν την έναρξη της υπεργλυκαιμίας.

Παράγοντες που μειώνουν την έκκρισή της είναι ο TNF- α , η ινσουλίνη (μειώνει το mRNA τη ορμόνης με δοσο- και χρόνο- εξαρτώμενο τρόπο), οι β -αδρενεργικοί αγωνιστές και τα γλυκοκορτικοειδή που μειώνουν την έκφραση του γονιδίου και άρα την έκκριση. Η γρελίνη αναστέλλει τη έκφραση του γονιδίου της αντιπονεκτίνης(13).

Η αντιπονεκτίνη ρυθμίζει την παραγωγή NO στο ενδοθήλιο των αγγείων. Η ρύθμιση είναι άμεση στην παραγωγή NO στο ενδοθήλιο των αγγείων και ειδικά στη συνθάση του NO (eNOS) ρυθμίζοντας τη νεοαγγειογένεση και αυξάνοντας την αγγειακή ροή. Επίδραση στην συνθάση του NO έχει και η ινσουλίνη. Το γεγονός ότι η ινσουλίνη και η αντιπονεκτίνη ρυθμίζουν τη δράση της eNOS με παρόμοιο τρόπο δείχνει ότι οι θεραπείες που στοχεύουν στην αύξηση των επιπέδων αντιπονεκτίνης μπορεί να είναι ευεργετικές για τη θεραπεία της αντίστασης στην ινσουλίνη, στο ΣΔ και στην αθηροσκληρωτική διαδικασία(1).

Πληροφορίες για το ρόλο των θυρεοειδικών ορμονών στη ρύθμιση της έκφρασης της αντιπονεκτίνης δείχνουν αυξημένη αντιπονεκτίνη σε ποντίκια που είχαν εκτεθεί σε κρύο. Υποτέθηκε ότι η αντιπονεκτίνη μπορεί να ρυθμίζει τη θερμοκρασία σώματος και το βασικό μεταβολικό ρυθμό σε ανταπόκριση στην αλλαγή των περιβαλλοντικών συνθηκών. Κατέληξαν λοιπόν ότι η αντιπονεκτίνη παίζει ρόλο στη θερμογένεση. Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι η θυρεοειδική και αδρενεργική δραστηριότητα διαμορφώνει την έκφραση της αντιπονεκτίνης(1).

Η πιο σημαντική απόδειξη για το ρόλο της αντιπονεκτίνης στην ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης και αθηροσκλήρυνσης δείχθηκε σε ποντίκια με καταστροφή του γονιδίου της αντιπονεκτίνης. Τα ποντίκια αυτά είχαν καθυστερημένη κάθαρση των λιπαρών οξέων από το πλάσμα, χαμηλά επίπεδα του mRNA της πρωτεΐνης 1 για τη μεταφορά των λιπαρών οξέων στους μύες, υψηλά επίπεδα του mRNA του TNF- α στο λιπώδη ιστό και υψηλές συγκεντρώσεις του TNF- α στο πλάσμα(10).

Όπως και στους ανθρώπους, τα ενήλικα άρρενα ποντίκια έχουν χαμηλότερη αντιπονεκτίνη από τα θήλεα.

β. Μελέτες σε ανθρώπους (1)

Η αντιπονεκτίνη, η λεπτίνη, και η ρεζιστίνη είναι ορμόνες του λιπώδους ιστού που επηρεάζουν την ομοιόσταση, τη δράση της ινσουλίνης, και πιθανόν να εμπλέκονται στην αιμοποίηση και στην ανοσοποίηση. Η έκκριση της αντιπονεκτίνης σχετίζεται θετικά με το μέγεθος των λιποκυττάρων και αρνητικά με το BMI. Η

έκκρισή της από το κοιλιακό συγκριτικά με το υποδόριο λίπος είναι πολύ χαμηλότερη(1). Σε αντίθεση με ορμόνες της ίδιας ομάδας (των λιποκινών), όπως π.χ. λεπτίνη, TNF-α, IL-6, είναι μειωμένη στους παχύσαρκους αλλά και σε καταστάσεις που σχετίζονται με την παχυσαρκία όπως στον ΣΔ II και στην στεφανιαία νόσο. Επίσης, στους παχύσαρκους, είναι μειωμένη η μεταγραφή του γονιδίου της(6). Παρατηρήθηκε ότι η απώλεια βάρους προκάλεσε αύξηση της αντιπονεκτίνης σε παχύσαρκους γεγονός που δείχνει ότι μπορεί να υπάρχει μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης στην παραγωγή της από το λιπώδη ιστό(6).

Τα επίπεδα αντιπονεκτίνης στον ορό σχετίζονται αρνητικά με την ενδοκυττάρια αύξηση των λιπαρών οξέων στα μυϊκά κύτταρα λόγω του ότι η αντιπονεκτίνη προάγει την οξειδωση των λιπαρών οξέων και την πρόσληψη της γλυκόζης από το κύτταρο (39). Σχεδόν ίδια αποτελέσματα φάνηκαν και από άλλους ερευνητές(10) αφού βρήκαν αντίστροφη σχέση μεταξύ αντιπονεκτίνης πλάσματος και τριγλυκεριδίων ορού και μεταγευματικής γλυκόζης.

Η μεγάλου μοριακού βάρους μορφή της επηρεάζει τη γλυκονογένεση μέσω βελτίωσης της ινσουλινοευαισθησίας, και η χαμηλού μοριακού βάρους ρυθμίζει τη β-οξειδωση στα μυϊκά κύτταρα. Παλαιότερη μελέτη (15) έδειξε ότι ο λόγος και όχι οι απόλυτες τιμές των δύο αυτών μορφών της ορμόνης είναι σημαντικός για τον καθορισμό της ευαισθησίας στην ινσουλίνη.

Σε μελέτη που διενεργήθηκε σε ενήλικες φυσιολογικού βάρους(16)δείχθηκε ότι τα επίπεδα αντιπονεκτίνης του πλάσματος σχετίζονται αρνητικά με το BMI, τη συστολική και διαστολική ΑΠ, τη γλυκόζη νηστείας, την ινσουλίνη, την αντίσταση στην ινσουλίνη, την ολική και την LDL χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια και το ουρικό οξύ. Θετικά συσχετίστηκε με την HDL χοληστερόλη σε πάσχοντες ή μη διαβητικούς. Η υπο-αντιπονεκτιναιμία λοιπόν μπορεί να είναι συνδεδετικός κρίκος μεταξύ υπερινσουλιναιμίας - μεταβολικού συνδρόμου - καρδιαγγειακών παθήσεων.

Σε παρελθοντική μελέτη βρέθηκε ότι οι καυκάσιοι έχουν υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με τους ινδοασιάτες(16).

Σε αντίθεση με ό,τι παρατηρείται στα άτομα με ΣΔ II, οι τιμές πλάσματος είναι υψηλότερες στα άτομα με ΣΔ I σε σχέση με φυσιολογικούς υγιείς

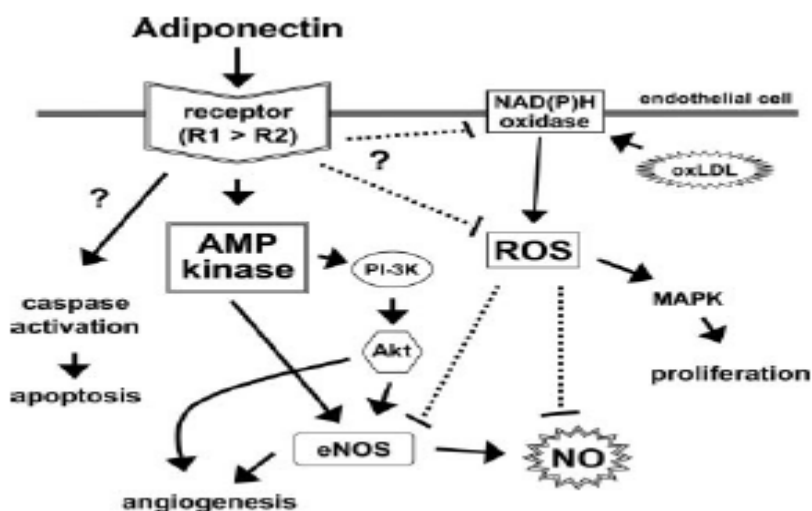
Οι τιμές αντιπονεκτίνης των ενηλίκων παρουσιάζουν φυλετικό διμορφισμό με υψηλότερες τιμές να παρατηρούνται στις γυναίκες (17).

Τα κυκλοφορούντα επίπεδα αντιπονεκτίνης βρέθηκε ότι ήταν χαμηλότερα κατά 5 φορές σε ασθενείς με σημαντική αντίσταση στην ινσουλίνη λόγω των

μεταλλάξεων του PPAR- γ το οποίο δείχνει ότι η αντιπονεκτίνη είναι δείκτης της *in vivo* δραστηριότητας του PPAR- γ (1). Αρκετοί πολυμορφισμοί στο γονίδιο της αντιπονεκτίνης έχουν συσχετιστεί με την παχυσαρκία και την αντίσταση στην ινσουλίνη (7). Απόδειξη της σχέσης αντιπονεκτίνης-ινσουλινοευαισθησίας αποτελεί το γεγονός ότι η χορήγηση μιας κατηγορίας αντιδιαβητικών φαρμάκων, των θειαζολιδινεδιονών αυξάνουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη και την αντιπονεκτίνη σε ανθρώπους και ζώα(2). Συνεχώς αυξανόμενες μελέτες δείχνουν ότι είναι σημαντικός ρυθμιστής της ινσουλινοευαισθησίας(6). Στους ανθρώπους έχει δειχθεί αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην αντίσταση και στην αντιπονεκτίνη. Επίσης αρκετές μελέτες δείχνουν ισχυρή σχέση της αντίστασης στην ινσουλίνη και του χρωμοσώματος 3q27, στο ίδιο δηλ. χρωμόσωμα που βρίσκεται το γονίδιο της αντιπονεκτίνης. Γενετικές παραλλαγές στο γονίδιο της αντιπονεκτίνης σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο για ΣΔΙΙ. Χορήγηση αντιπονεκτίνης σε παχύσαρκα ή κανονικά ποντίκια βελτίωσε την ανοχή τη γλυκόζη και την ινσουλινοευαισθησία.

Μηχανισμοί που εξηγούν την επίδρασή της στο μεταβολισμό, και ειδικότερα στην ινσουλινοευαισθησία, είναι: 1) στο ήπαρ ευοδώνει την ινσουλινοευαισθησία, μειώνει το φορτίο των μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων, αυξάνει την οξείδωση των λιπαρών οξέων και μειώνει την παραγωγή γλυκόζης από το ήπαρ, 2) στους μύς, ρυθμίζει τη χρησιμοποίηση της γλυκόζης και την οξείδωση των λιπαρών οξέων(7).

Στο αγγειακό τοίχωμα εμποδίζει την προσκόλληση των μονοκυττάρων μειώνοντας την έκφραση των μορίων προσκόλλησης, εμποδίζει τη μετατροπή των μακροφάγων σε αφρώδη κύτταρα και μειώνει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυικών ινών που συμβαίνει ως απάντηση σε αυξητικούς παράγοντες. Επίσης, αυξάνει την παραγωγή νιτρικού οξέως στα ενδοθηλιακά κύτταρα και ρυθμίζει την αγγειογένεση. Τα ανωτέρα φαινόμενα πραγματοποιούνται μέσω αυξημένης φωσφορυλίωσης του υποδοχέα της ινσουλίνης, μέσω ενεργοποίησης της κινάσης του AMP και μέσω ρύθμισης του πυρηνικού παράγοντα κB. Έτσι φαίνεται και η αντι-αθηρογόνος της δράση(7).



Σχήμα 1. Σχηματικά η επίδραση της αντιπονεκτίνης στο ενδοθήλιο(8)

Συμπερασματικά λοιπόν όσον αφορά στο βιολογικό ρόλο της αντιπονεκτίνης μπορούμε να πούμε ότι: 1. αυξάνει την ινσουλινοευαισθησία ρυθμίζοντας τη οξείδωση των λιπαρών οξέων, 2. μειώνει τα τριγλυκερίδια πλάσματος, 3. βελτιώνει το μεταβολισμό της γλυκόζης, 4. τα επίπεδα αντιπονεκτίνης σχετίζονται αντίστροφα με το βαθμό παχυσαρκίας, 5. έχει παρατηρηθεί αυξημένη αντιπονεκτίνη σε νευρογενή ανορεξία και ΣΔ I, 6. παρατηρείται μειωμένη αντιπονεκτίνη σε ινσουλινοαντίσταση (παχυσαρκία, ΣΔ II) και στεφανιαία νόσο(1).

Η δράση της αντιπονεκτίνης σχετίζεται με τα στεροειδή, τις θυρεοειδικές ορμόνες, τα γλυκοκορτικοειδή, το NO όπου το καθένα επηρεάζει ή επηρεάζεται από αυτήν.

Οι ιδιότητες της συνοπτικά όπως έχει αποδειχθεί από τη βιβλιογραφία είναι: αντι-διαβητικές ιδιότητες, αντι-αθηρογόνες, αντι-φλεγμονώδεις και έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την ινσουλινοευαισθησία(1).

Η ικανότητα της αντιπονεκτίνης να αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη σε συνδυασμό με τις αντι-αθηρωματικές και αντι-φλεγμονώδεις ιδιότητες καθιστούν αυτή τη νέα ορμόνη του λιπώδους ιστού ένα υποσχόμενο θεραπευτικό εργαλείο για το μέλλον με ενδεχόμενες εφαρμογές σε καταστάσεις που σχετίζονται με χαμηλά επίπεδα αντιπονεκτίνης(1).

Να σημειωθεί επίσης ότι τα επίπεδα αντιπονεκτίνης δεν επηρεάζονται από τη λήψη τροφής στους ενήλικες (6,40).

4. Ρυθμιστές έκκρισης της αντιπονεκτίνης στους ενήλικες

Η παραγωγή αντιπονεκτίνης παρακινείται κατά τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων και η έκκρισή της ρυθμίζεται από την ινσουλίνη(47). Σύμφωνα με κάποιους άλλους ερευνητές(10) η γονιδιακή ρύθμιση της αντιπονεκτίνης επηρεάζεται από ορμονικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως: α) μείωση της γονιδιακής έκφρασης από την παχυσαρκία, τα γλυκοκορτικοειδή, τους β-αδρενεργικούς αγωνιστές και τον TNF-α, β) αύξηση της γονιδιακής έκφρασης από την ισχύτητα, την έκθεση στο κρύο, την αδρεναλεκτομή και τον IGF-1 και γ) όσον αφορά την επίδραση της ινσουλίνης, τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αντιφατικά. Φαίνεται όμως ότι η ινσουλίνη είναι ισχυρός ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης της αντιπονεκτίνης και η ρύθμιση εξαρτάται από τις τιμές της ινσουλίνης και τη διάρκεια δράσης της. Οι έρευνες όμως που υποστηρίζουν αυτή τη θεωρία έχουν γίνει *in vivo*. Επίσης έχει βρεθεί ότι η κορτιζόλη αναστέλλει την έκκριση της ορμόνης *in vitro*(21).

Συνοπτικά στο σχήμα 2 φαίνονται οι δράσεις της αντιπονεκτίνης στους ενήλικες.

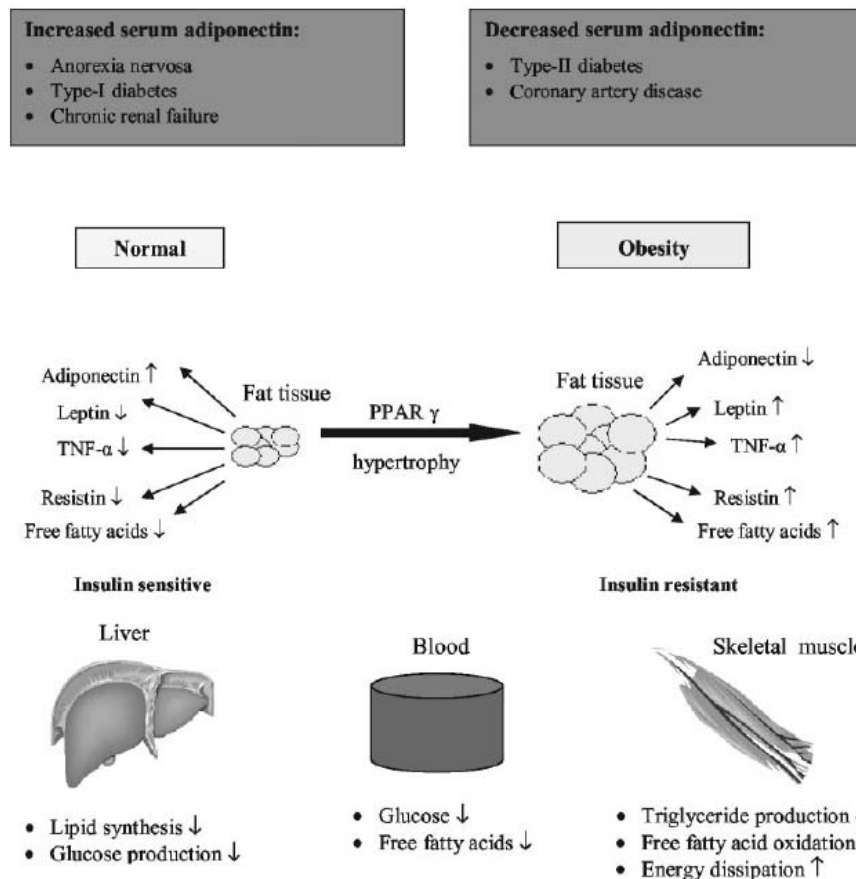


Fig. 3. Action of adiponectin on adipose tissue and peripheral organs (liver, blood, and skeletal muscle).

Σχήμα 2. Οι δράσεις της αντιπονεκτίνης στον υποθάλαμο και τα περιφερικά όργανα (πάγκρεας, ήπαρ, μυς)(47).

5. Αντιπονεκτίνη στα νεογνά (6)

Εκτός όμως από τη ρύθμιση του μεταβολισμού, οι ορμόνες που παράγονται από το λιπώδη ιστό φαίνεται να συμμετέχουν και στην ενδομήτρια ανάπτυξη και ειδικά η λεπτίνη. Δεν υπάρχουν προς το παρόν πληροφορίες για την επίδραση της αντιπονεκτίνης στην ενδομήτρια ανάπτυξη, ενώ υπάρχουν ενδείξεις για τη δράση της λεπτίνης. Το γεγονός ότι η λεπτίνη είναι υπαρκτή στο αίμα ομφαλίου λώρου και ότι τα επίπεδά της σχετίζονται θετικά με το βάρος των νεογνών, καθώς και η αυξημένη έκφραση της λεπτίνης και των υποδοχέων της στο πλακούντα και στο έμβρυο, δείχνουν ότι η λεπτίνη έχει ρόλο κλειδί στην ανάπτυξη του εμβρύου.

Στον ανθρώπινο ορό ενηλίκων οι τιμές της αντιπονεκτίνης είναι 0,5-30 $\mu\text{g/ml}$ δηλ. 100 περισσότερο από τη λεπτίνη και την ινσουλίνη(10). Μέση τιμή αντιπονεκτίνης

νεογνών $32,2\mu\text{g/ml} \pm 10,3 \mu\text{g/ml}$ (21) ή κατά άλλους ερευνητές $6-55,8 \mu\text{g/ml}$ (διάμεσος $22,4$)(22), σαφώς υψηλότερη των ενηλίκων.

Εκτός από το λευκό λιπώδη ιστό, τα νεογνά έχουν και φαιό, κύρια λειτουργίας το οποίου είναι η θερμογένεση, δηλ. η διατήρηση της ομοιόστασης. Το φαιό λίπος αυξάνει προς το τέλος της κύησης, ενώ ατροφεί κατά την παιδική ηλικία. Το φαιό λίπος εκφράζει κατά πολύ το γονίδιο της αντιπονεκτίνης. Η δε ρύθμιση της έκκρισης αντιπονεκτίνης του φαιού λίπους διαφέρει από του λευκού. Για παράδειγμα, η επίδραση της ινσουλίνης είναι ανασταλτική στα λευκά και διεγερτική για το φαιό λίπος ως προς την έκκριση της ορμόνης(26). Άλλος ένας παράγοντας ρύθμισης της έκκρισης αντιπονεκτίνης στα νεογνά έχει αναφερθεί ότι είναι η γρελίνη και ειδικά η υπερ-γρελιναιμία. Η κεντρική δράση γρελίνης είναι η ρύθμιση των υποθαλαμικών νευροπεπτιδίων και άρα της όρεξης. Βρέθηκε ότι η έκφραση της αντιπονεκτίνης στο φαιό λίπος ήταν διαταραγμένη μετά από χορήγηση γρελίνης. Η δράση ήταν οξεία και διήρκεσε για αρκετές ώρες(13).

α. Τόπος παραγωγής στα νεογνά

Τα νεογνά είναι ικανά να συνθέτουν αντιπονεκτίνη(4). Σε μελέτη πρόσφατα δεν βρέθηκε διαφορά στις τιμές της αντιπονεκτίνης από τη μέρα γέννησης ως και τη 4^η μεταγεννητική μέρα ($61,1 \pm 19,0$ vs $63,8 \pm 22,0 \mu\text{g/ml}$), γεγονός που υποδηλώνει ότι η αντιπονεκτίνη του εμβρύου παράγεται από το λιπώδη ιστό του και όχι από τον πλακούντα ή από τη μητέρα(6). Αλλιώς έπρεπε τα επίπεδα να μειώνονται. Επίσης, σε άλλη μελέτη βρέθηκε να μην υπάρχει συσχέτιση της τιμής της αντιπονεκτίνης και της ημέρας λήψης(21) γεγονός που δείχνει πως είναι ορμόνη σχετικά σταθερή μεταγεννητικά. Στο ίδιο καταλήγουν και οι Kotani Y et al (22), όπου παρατηρήθηκαν σταθερές τιμές της ορμόνης σε δείγμα αίματος ομφαλίου λώρου μεταξύ 3^{ης} και 7^{ης} μεταγεννητικής ημέρας.

Βέβαια υπάρχει και βιβλιογραφία που υποστηρίζει το αντίθετο. Παρόλο που η αντιπονεκτίνη πιθανόν να προέρχεται από το λιπώδη ιστό του βρέφους, αυτό δεν φαίνεται από την έρευνα των Lindsay R et al (5) διότι δεν βρέθηκε συσχέτιση με δείκτες λιπώδους μάζας. Ως δείκτες λιπώδους μάζας κατά τους συγγραφείς ορίζονται το βάρος γέννησης, το πάχος των δερματικών πτυχών και η λεπτίνη. Είναι λοιπόν πιθανό η μετρούμενη αντιπονεκτίνη στον ομφάλιο λώρο να προέρχεται από τη μητέρα ή από άλλους ιστούς (όπως π.χ. η λεπτίνη προέρχεται και από τον

πλακούντα). Αυτοί όμως είναι έμμεσοι δείκτες καθώς δεν υπάρχει δυνατότητα άμεσου υπολογισμού λιπώδους ιστού στα νεογνά(5).

Η πηγή λοιπόν παραγωγής της αντιπονεκτίνης δεν είναι πλήρως επιβεβαιωμένη στα νεογνά. Τα περισσότερα δεδομένα δείχνουν ότι προέρχεται κυρίως από τους εμβρυϊκούς και όχι τους μητρικούς ιστούς(6). Εξήγηση: α) καμία συσχέτιση μεταξύ μητρικής και εμβρυϊκής στη γέννηση, β) υψηλότερη των νεογνών συγκριτικά με των μανάδων, άρα δεν είναι πιθανή η μεταφορά της ορμόνης από τη μητέρα στο πλακούντα, γ) η πιθανή παραγωγή της ορμόνης από άλλους ιστούς, όπως ο πλακούντας, απορρίπτεται γιατί οι τιμές της δεν πέφτουν 4 ημέρες μεταγεννητικά, όπου έχει αποχωριστεί η εμβryo-πλακουντική μονάδα (ενώ η λεπτίνη που παράγεται και εκκρίνεται από το πλακούντα μειώνεται δραματικά τη 4^η ημέρα).

β. Ανυπαρξία φυλετικού διμορφισμού

Παρόλο που υπάρχει φυλετικός διμορφισμός στους ενήλικες με τις γυναίκες να έχουν υψηλότερες τιμές συγκριτικά με τους άνδρες, στα νεογνά δεν έχει παρατηρηθεί κάτι αντίστοιχο, με πλήθος μελετών να το επιβεβαιώνουν (2,4,5,6,21,22,25,26). Εξήγηση του φαινομένου των ενηλίκων είναι ότι ίσως αντανακλά την επίδραση των ορμονών του φύλου, όπως είναι η ρύθμιση σε χαμηλότερο επίπεδο (downregulation) της αντιπονεκτίνης από τα ανδρογόνα(5), ή άλλων διαμεσολαβητών οι οποίοι όμως είναι ανενεργοί, αδύναμοι, ή απόντες στα νεογνά(2,6) λόγω ανωριμότητας του ορμονικού τους συστήματος(6).

γ. Υψηλότερα επίπεδα συγκριτικά με την παιδική ηλικία και τους ενήλικες

Τα επίπεδα αντιπονεκτίνης ήταν αρκετά υψηλότερα σε νεογνήτα που λήφθηκε αίμα από τον ομφάλιο λώρο συγκριτικά με παιδιά μεγαλύτερης ηλικίας ($28,7 \pm 17,9, 3 \pm 6,1 \mu\text{g/ml}$ αντίστοιχα, $p < 0,01$)(2). Το ίδιο αποτέλεσμα αυτό φαίνεται και από πλήθος άλλων μελετών (2,4,5,12, 22, 26,29). Μερική εξήγηση της παρατήρησης αυτής μπορεί να δοθεί από την υπόθεση ότι το ποσοστό λίπους είναι πολύ χαμηλότερο στα νεογνήτα (13%) συγκριτικά με τα παιδιά και τους ενήλικες (25-30%) άρα δεν λειτουργεί επαρκώς, είναι αδρανής ή απουσιάζει ο μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης που παρατηρείται στους ενήλικες (αλλά ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι άγνωστος)(6).

Στη μελέτη των Sivan et al (6) βρέθηκε ότι η αντιπονεκτίνη του βρέφους ($61,1 \pm 19,0 \mu\text{g/ml}$) ήταν κατά πολύ υψηλότερη της αντιπονεκτίνης της μητέρας στη γέννηση ($17,6 \pm 4,9 \mu\text{g/ml}$, $p < 0,001$ χωρίς να έχει βρεθεί και συσχέτιση μεταξύ αυτών των δύο τιμών (ομφαλίου vs μητέρας). Οι υψηλές τιμές αντιπονεκτίνης στα νεογνά γενικά συγκριτικά με τα παιδιά και τους ενήλικες που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες πρόσφατες μελέτες μπορεί να οφείλονται στην έλλειψη του μηχανισμού της αρνητικής ανατροφοδότησης στην παραγωγή της λόγω: α) έλλειψης υπερτροφίας λιπώδους ιστού νεογνού, β) χαμηλό ποσοστό σωματικού λίπους, γ) διαφορετική κατανομή λίπους (6).

Σε μια άλλη μελέτη (22) στο αίμα ομφαλίου λώρου φυσιολογικών νεογνών, οι τιμές αντιπονεκτίνης ήταν $6-55,8 \mu\text{g/ml}$ (διάμεσος $22,4$), πάλι δηλαδή υψηλότερες από των ενηλίκων.

Ο φυσιολογικός ρόλος της αντιπονεκτίνης στους ενήλικες είναι υπό διερεύνηση, καθώς πολλά ερωτήματα για το ρόλο της έχουν μείνει αναπάντητα, πόσο μάλλον για τα έμβρυα και τα νεογνά. Παρά ταύτα, η αντιπονεκτίνη ίσως έχει πρόσθετο ρόλο στην ενδομήτρια ανάπτυξη, όπως έχειδειχθεί ότι έχει π.χ. η λεπτίνη. Μένουν λοιπόν πολλά ερωτηματικά για τον τόπο παραγωγής, τη ρύθμιση, το φυσιολογικό ρόλο και τον υποτιθέμενο ρόλο της σε παθολογικές καταστάσεις των νεογνών(6).

6. Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (ΣΔΚ)

Ως σακχαρώδης διαβήτης κύησης χαρακτηρίζεται η διαταραχή στην ομοιόσταση της γλυκόζης, η οποία εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της κύησης. Η συχνότητα εμφάνισης του ΣΔΚ κυμαίνεται από $0,15-12,3\%$ και διαφέρει ανάλογα με τη φυλή, τη γεωγραφική κατανομή και τις συνήθειες διατροφής (20,30,41). Στο $0,2-0,3\%$ του συνόλου των κυήσεων η μητέρα πάσχει από προϋπάρχοντα ΣΔ, ενώ στο $1-5\%$ ο ΣΔ εμφανίζεται κατά την κύηση(41).

Η φυσιολογική εγκυμοσύνη χαρακτηρίζεται από προοδευτική αντίσταση στην ινσουλίνη, η οποία εμφανίζεται στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης και εξελίσσεται στο τρίτο τρίμηνο, σε επίπεδα αντίστοιχα του ΣΔ τύπου 2 (20,30).

Μετά από τον τοκετό η ινσουλινοαντίσταση εξαφανίζεται, καθώς οι ορμόνες του πλακούντα (προγεστερόνη, πλακουντιακό γαλακτογόνο και προλακτίνη) είναι από τους κύριους παράγοντες εμφάνισης ΣΔΚ (20,30,41). Έχει παρατηρηθεί επίσης μείωση της ευαισθησίας των ιστών στην ινσουλίνη κατά τη διάρκεια της κύησης, η οποία εντοπίζεται σε επίπεδο μετά τους υποδοχείς.

Επιπλέον, η πλειονότητα των γυναικών με ΣΔΚ φαίνεται να έχει δυσλειτουργία του β-κυττάρου του παγκρέατος, λόγω προϋπάρχουσας χρόνιας αντίστασης στην ινσουλίνη. Στις γυναίκες αυτές η ινσουλινοαντίσταση της εγκυμοσύνης προστίθεται στην ήδη χρόνια ινσουλινοαντίστασή τους (20,41).

Η διάγνωση του ΣΔΚ τίθεται μέχρι την 28^η εβδομάδα από τον ομαδικό προσυμπτωματικό έλεγχο όλων των εγκύων. Σε περίπτωση παθολογικού αποτελέσματος (>140 mg/dl) γίνεται επιβεβαίωση με καμπύλη γλυκόζης (20,30,41). Είναι σημαντικό να τεθεί η διάγνωση στην αρχή της κύησης ώστε να γίνει σωστή παρακολούθηση, λόγω του αυξημένου ποσοστού μητρικής και περιγεννητικής θνησιμότητας που συνοδεύει τον ΣΔΚ (20,30,42).

7. Νεογνό Διαβητικής Μητέρας (ΝΔΜ)



Εικόνα 2. Νεογνό διαβητικής μητέρας

Όταν ο François Rabelais, ιατρός του 16^{ου} αιώνα, έγραφε για το Γαργαντούα, ένα μωρό που γεννήθηκε μακροσωμικό και υπέρβαρο, περιέγραφε για πρώτη φορά το νεογνό διαβητικής μητέρας (ΝΔΜ)-εικόνα 2. Σήμερα υπολογίζεται

ότι 4 στα 1.000 νεογνά γεννιούνται από διαβητικές μητέρες και 6 στα 1.000 από μητέρες που έχουν διαβήτη της κύησης. Δηλαδή 1 στα 100 νεογνά έχει αναπτυχθεί σε παθολογικό ενδομήτριο περιβάλλον. Οι ενδομήτριες μεταβολικές διαταραχές έχουν σημαντική επίδραση στο έμβρυο και αργότερα στο νεογνό, γι' αυτό το ΝΔΜ παρουσιάζει αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα (43).

Οι κύριες αιτίες περιγεννητικής θνησιμότητας σε ΝΔΜ είναι οι συγγενείς ανωμαλίες, η προωρότητα και ο ενδομήτριος θάνατος. Οι επιπλοκές των ΝΔΜ που παρουσιάζονται κατά την περιγεννητική περίοδο συνοψίζονται στον πίνακα 3.

Μακροσωμία
Ενδομήτρια δυστροφία
Υπογλυκαιμία
Υπασβεστιαμία
Υπομαγνησιαμία
Περιγεννητική ασφυξία
Πολυερυθραιμία – Υπεργλοιότητα
Κακώσεις λόγω δυστοκίας
Υπερχολερυθριναιμία
Υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια

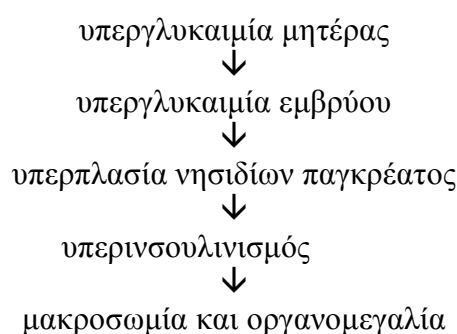
Πίνακας 3. Επιπλοκές ΝΔΜ

Τα ΝΔΜ είναι συνήθως LGA νεογνά (μεγάλα για την ηλικία κύησης) με βάρος γέννησης 4.000-5.000 gr (43). Το μεγάλο βάρος των νεογνών αυτών οφείλεται στην υπερινσουλιναίμία που αναπτύσσεται ενδομητρίως. Χαρακτηριστικά γνωρίσματα των ΝΔΜ είναι η αύξηση του υποδόριου λίπους τους, ιδιαίτερα στα κοιλιακά τοιχώματα, η αύξηση της μυϊκής τους μάζας και η παρουσία σπλαγχομεγαλίας, ή/ και δυσπλασίας διαφόρων οργάνων, κυρίως των πνευμόνων, του ήπατος και της καρδιάς(43). Ο εγκέφαλος είναι το μόνο όργανο με φυσιολογικό ρυθμό εμβρυϊκής ανάπτυξης, επειδή τα εγκεφαλικά κύτταρα προσλαμβάνουν γλυκόζη ανεξάρτητα από την ύπαρξη ινσουλίνης.

Ο παθογενετικός μηχανισμός του ΝΔΜ (σχήμα 3) ξεκινά από τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης της μητέρας που διέρχονται από τον πλακούντα και ερεθίζουν το πάγκρεας του εμβρύου προς παραγωγή ινσουλίνης σε αυξημένες ποσότητες. Η ινσουλίνη του εμβρύου, ως μεγαλομοριακή ουσία, δε διέρχεται από τον πλακούντα και παραμένει σε υψηλή στάθμη στην εμβρυϊκή κυκλοφορία και σε συνδυασμό με την υπεργλυκαιμία, διεγείρει την πρόσληψη αμινοξέων και τη σύνθεση πρωτεϊνών (43). Η ινσουλίνη ταυτόχρονα διεγείρει την παραγωγή του IGF-1, που έχει επίσης

αυξητική δράση ενδομητρίως (43,44). Επομένως, η ινσουλίνη αποτελεί τη βασική αναβολική ορμόνη στο έμβρυο και αυτό εξηγεί τη μακροσωμία και οργανομεγαλία που εμφανίζουν τα νεογνά με υπερινσουλινισμό. Το βάρος γέννησης συσχετίζεται με την ποσότητα του λειτουργικού παγκρεατικού ιστού, δηλαδή τα υπερινσουλιναιμικά νεογνά είναι μακροσωμικά (44).

Σχήμα 3. Παθογένεια ΝΔΜ



Στην περίπτωση όμως που το βάρος και η γλυκόζη της μητέρας ρυθμιστούν σχολαστικά εντός των φυσιολογικών ορίων, τα νεογνά γεννιούνται με βάρος κανονικό για την ηλικία κύησης (43).

8. Σκοπός της Παρούσας Διατριβής

Στην παρούσα ερευνητική διατριβή πραγματοποιήθηκε σύγκριση των κυκλοφορούντων επιπέδων ολικής αντιγονεκτίνης μεταξύ τελειόμηνων και προώρων νεογνών διαβητικής μητέρας και συσχέτιση των επιπέδων αντιγονεκτίνης με τις ανθρωπομετρικές παραμέτρους, το φύλο, τα επίπεδα γλυκόζης, το λιπιδαιμικό προφίλ (ολική χοληστερόλη, HDL, LDL τριγλυκερίδια, ολικά λιπίδια) και τη γρελίνη των νεογνών.

B. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Σχεδιασμός Μελέτης

Τα νεογνά διαβητικής μητέρας (ΝΔΜ) διαιρέθηκαν σε δύο ομάδες -στην ομάδα των προώρων (η= 21) και στην ομάδα των τελειόμηνων (η= 49). Στις ομάδες αυτές συγκρίναμε τα επίπεδα αντιπυρεκτικής πλάσματος και έγιναν οι ανάλογες συσχετίσεις με το φύλο, τις ανθρωπομετρικές και βιοχημικές παραμέτρους, καθώς και με την ορμόνη γρελίνη.

Στη συνέχεια χωρίσαμε τα νεογνά σε δύο ομάδες, ανάλογα με την ημέρα λήψης αίματος: στην ομάδα των νεογνών, των οποίων η λήψη αίματος έγινε εντός των πρώτων 24 ωρών (η=32) και στην ομάδα των νεογνών, των οποίων η λήψη αίματος έγινε μετά τις πρώτες 24 ώρες (η=32).

2. Υλικό

α. Πληθυσμός μελέτης- Κριτήρια αποκλεισμού

Συνολικά μελετήθηκαν 70 νεογνά, τα οποία γεννήθηκαν στο Μαιευτήριο «Έλενας Βενιζέλου» κατά τη διάρκεια του έτους 2005. Το κοινό χαρακτηριστικό τους είναι ότι οι μητέρες τους παρουσίασαν Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης (ΣΔΚ). Ο ΣΔΚ ορίζεται σε κάθε περίπτωση κύησης, κατά την οποία οι τιμές της συγκέντρωσης γλυκόζης πλάσματος φλεβικού αίματος νηστείας είναι $>99 \text{ mg/dl}$ (5.5 mmol/l) ή/και $>144 \text{ mg/dl}$ (8.0 mmol/l) δύο ώρες μετά από του στόματος λήψη 75 gr γλυκόζης (20). Τα νεογνά διακρίνονταν σε πρόωρα και τελειόμηνα ανάλογα με την ηλικία κύησής τους. Ως πρόωρα ορίζονται τα νεογνά που γεννήθηκαν, πριν τη συμπλήρωση της 37^{ης} εβδομάδας κύησης και ως τελειόμηνα τα νεογνά που γεννήθηκαν μεταξύ 37^{ης} και 42^{ης} εβδομάδας κύησης (32). Η ηλικία κύησης των νεογνών έχει υπολογιστεί με βάση την τελευταία έμμηνο ρύση της μητέρας, τα υπερηχογραφικά ευρήματα κατά την παρακολούθηση της εγκύου και με την εξέταση των νεογνών με τη μέθοδο Ballard (32).

Στη μελέτη δεν έχουν συμπεριληφθεί νεογνά με χρωμοσωμικές ανωμαλίες, δυσπλασίες διαφόρου βαθμού, περιγεννητική λοίμωξη, καθώς και νεογνά των οποίων οι μητέρες ελάμβαναν οποιαδήποτε φαρμακευτική αγωγή (εισπνεόμενα ή/και συστηματικά κορτικοειδή ή άλλη ορμονική θεραπεία), με εξαίρεση τη λήψη ινσουλίνης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Τα κριτήρια αποκλεισμού είναι

σχετικά αυστηρά έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ένας ομοιογενής πληθυσμός μελέτης και προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν απρόβλεπτοι συγχυτικοί παράγοντες, οι οποίοι πιθανόν να επηρεάσουν το κυκλοφορούντα επίπεδα των ορμονών.

β. Λήψη αίματος - Επεξεργασία

Τα δείγματα αίματος έχουν συλλεχθεί είτε κατά το πρώτο 24ωρο είτε κατά το δεύτερο 24ωρο ζωής των νεογνών. Όλες οι λήψεις αίματος σχεδιάστηκαν κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να ελαχιστοποιούνται οποιεσδήποτε περιττές ενοχλήσεις των νεογνών και ακολουθούσαν την καθημερινή πρακτική της κλινικής.

Το φλεβικό αίμα έχει συλλεχθεί σε φιαλίδια EDTA για τις μετρήσεις των επιπέδων αντιγονεκτικής πλάσματος, ενώ το βιοχημικό προφίλ ελήφθη σε φιαλίδιο Wasserman την ίδια μέρα. Τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν αμέσως σε πάγο και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο, όπου και φυγοκεντρήθηκαν στις 4.000 περιστροφές/min για 8min στους 4°C και ο ορός που προέκυψε αποθηκεύτηκε σε ειδικά φιαλίδια (aliquots) στους -20°C μέχρι την ανάλυση τους.

γ. Υπολογισμός ανθρωπομετρικών παραμέτρων

Στα νεογνά, οι πλέον καθιερωμένες και χρησιμοποιούμενες ανθρωπομετρικές παράμετροι είναι το βάρος γέννησης και ο BMI, οι οποίες είναι έμμεσοι δείκτες της αύξησης, της εναπόθεσης λιπώδους ιστού και της θρεπτικής κατάστασής τους. Το βάρος γέννησης και ο BMI συσχετίζονται με το ολικό λίπος σώματος, όπως προκύπτει από τη συνολική ηλεκτρική αγωγιμότητα σώματος, η οποία είναι μια ακριβής και αναπαραγώγιμη μέθοδος για την εκτίμηση του ολικού λίπους σώματος στα νεογνά (32). Επιπλέον, η μέτρηση βάρους σώματος είναι η ευκολότερη και η πιο αξιόπιστη μέθοδος μεταξύ του ανθρωπομετρικών παραμέτρων (45).

Αντιστοίχως, για την εκτίμηση της ενδομήτριου θρεπτικής κατάστασης και την πραγματοποίηση συσχετισμών, ο δείκτης Ponderal (PI) θεωρείται ο πλέον κατάλληλος ανθρωπομετρικός δείκτης, συγκριτικά με το βάρος γέννησης και τον BMI (46).

Στη μονάδα νεογνών, πραγματοποιήθηκε πλήρης αντικειμενική εξέταση όλων των νεογνών αμέσως μετά τη γέννηση τους και μέτρηση των ανθρωπομετρικών παραμέτρων τους. Οι ανθρωπομετρικές παράμετροι περιλάμβαναν το βάρος και το μήκος γέννησης και την περίμετρο κεφαλής. Το

βάρος γέννησης μετρήθηκε με βαθμολογημένη ψηφιακή ζυγαριά και το μήκος σώματος μετρήθηκε με ειδική μεζούρα τύπου Harpenden.

Επίσης, υπολογίστηκαν ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) ως το πηλίκο του βάρους (σε gr) προς το τετράγωνο του μήκους σε (cm^2) και ο δείκτης Ponderal ως το πηλίκο του βάρους (σε gr) προς το κύβο του μήκους σε (cm^3) x 100.

δ. Μέτρηση Βιοχημικών Παραμέτρων

Ο βιοχημικός έλεγχος περιλαμβάνει τη μέτρηση γλυκόζης την πρώτη και τη δεύτερη μέρα ζωής και πλήρες λιπιδαιμικό προφίλ, δηλαδή μέτρηση ολικής χοληστερόλης, HDL-χοληστερόλης, LDL-χοληστερόλης, τριγλυκερίδιων και ολικών λιπιδίων. Τα επίπεδα της γλυκόζης και του λιπιδαιμικού προφίλ μετρήθηκαν στο βιοχημικό εργαστήριο του νοσοκομείου «Έλενα Βενιζέλου» σε τυποποιημένο αναλυτή και με αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται από το συγκεκριμένο εργαστήριο. Δυστυχώς ο βιοχημικός έλεγχος δεν ήταν πλήρης σε όλα τα νεογνά.

Σε μελέτη των Pardo I et al (4), η ινσουλίνη δεν σχετίστηκε με την αντιπνεκίνη στα νεογνά και στους ενήλικες, η ινσουλίνη δεν έχει άμεση επίδραση στην αντιπνεκτίνη. Η έλλειψη συσχέτισης λοιπόν στα νεογνά και στους ενήλικες δείχνει ότι η ινσουλίνη έχει μικρή επίδραση στη αντιπνεκτίνη ενδομητρίως. Επίσης σε μία άλλη μελέτη (5) δεν σχετίστηκε η ινσουλίνη ομφάλιου λώρου με την αντιπνεκτίνη. Οι ενδείξεις αυτές μας απέτρεψαν να μελετήσουμε περαιτέρω τη συσχέτιση των δύο αυτών ορμονών.

ε. Μέτρηση Μεταβολικών Ορμονών

ι. Αρχές Ραδιοανοσολογικής Μεθόδου

Στη ραδιοανοσολογική μέθοδο, επωάζεται σημασμένος ανιχνευτής – αντιγόνο σταθερού τίτλου με συγκεκριμένη αραίωση αντιορού, τέτοια ώστε η συγκέντρωση των αντιγονικών θέσεων πρόσδεσης στο αντίσωμα να είναι περιορισμένη, π.χ. να μπορεί να προσδεθεί μόνο το 50% της συγκέντρωσης του ανιχνευτή από το αντίσωμα. Όταν προστεθεί μη σημασμένο αντιγόνο, τότε στο σύστημα θα υπάρξει ανταγωνισμός μεταξύ του σημασμένου ανιχνευτή και του μη σημασμένου αντιγόνου ως προς τον περιορισμένο και σταθερό αριθμό θέσεων σύνδεσης πάνω στο αντίσωμα. Επομένως, το ποσό του ανιχνευτή που θα έχει προσδεθεί στο αντίσωμα θα μειώνεται καθώς η συγκέντρωση του μη σημασμένου αντιγόνου θα αυξάνεται. Το ποσό αυτό μπορεί να μετρηθεί κατόπιν διαχωρισμού

του προσδεσμένου στο αντίσωμα από τον ελεύθερο ανιχνευτή, υπολογίζοντας το ένα από τα δύο ή και τα δύο κλάσματα.

Έπειτα δημιουργείται μια πρότυπη καμπύλη με αυξανόμενες δόσεις του καθορισμένου μη σημασμένου αντιγόνου και από αυτή την καμπύλη είναι δυνατόν να υπολογιστεί το ποσό του αντιγόνου σε άγνωστα δείγματα.

Επομένως οι βασικές προϋποθέσεις για να λειτουργήσει ένα σύστημα ραδιοανοσολογικής μεθόδου είναι: η ύπαρξη ενός συγκεκριμένου αντιορού για το αντιγόνο που πρόκειται να μετρηθεί, η διαθεσιμότητα ενός ραδιοσημασμένου αντιγόνου, μία μέθοδος διαχωρισμού, με την οποία μπορεί να διαχωριστεί ο ανιχνευτής που έχει συνδεθεί με το αντίσωμα από τον ελεύθερο ανιχνευτή και τέλος μία συσκευή μέτρησης της ραδιενέργειας.

ii. Μέτρηση Επιπέδων Αντιπανεκτίνης

- Χαρακτηριστικά του RIA kit της αντιπανεκτίνης

Η συγκέντρωση της αντιπανεκτίνης πλάσματος μετρήθηκε με το RIA kit Cat. # HADP-61 HK, Linco Research, Inc., St. Charles, Missouri, USA. Το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιεί αντιπανεκτίνη μουρίνης σημασμένη με ^{125}I και αντιορό αντιπανεκτίνης κονίκλου προκειμένου να καθοριστεί το επίπεδο της αντιπανεκτίνης στο πλάσμα με την τεχνική του διπλού πεγκυλιωμένου (PEG) αντισώματος.

Η προετοιμασία - ανασύσταση της αντιπανεκτίνης (adiponectin standard) πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη ανθρώπινη αντιπανεκτίνη.

Η ευαισθησία της μεθόδου, δηλαδή το χαμηλότερο επίπεδο που μπορεί να ανιχνευτεί η αντιπανεκτίνη είναι το 1ng/ml, όταν χρησιμοποιούμε 100μl από ένα δείγμα. Τα χαρακτηριστικά του RIA kit της αντιπανεκτίνης αναφέρονται αναλυτικά στο παράρτημα 1.

Η συγκεκριμένη μέθοδος μέτρησης της αντιπανεκτίνης είναι η πλέον αποδεκτή και χρησιμοποιούμενη στις ερευνητικές ομάδες (2,3,4,5,6,11,21,25,29) και ενδείκνυται για ερευνητικούς σκοπούς (18).

-Περιγραφή πρωτοκόλλου μέτρησης της αντιπανεκτίνης

Η όλη πειραματική διαδικασία διαρκεί δύο ημέρες. Αρχικά γίνεται η προετοιμασία- ανασύσταση της λυοφιλοποιημένης αντιπανεκτίνης (human adiponectin standard) και των δειγμάτων ποιότητας (human adiponectin quality control 1 και 2) και οι κατάλληλες αραιώσεις για την ετοιμασία των αντίστοιχων

σωληναρίων . Επίσης έγινε διάλυση 1: 500 του πλάσματος των δειγμάτων, πριν τη χρήση της αντιγονεκτίνης, όπως ανέφερε το πρωτόκολλο.

Την πρώτη μέρα πραγματοποιήσαμε τα εξής βήματα:

1. Έγχυση 300μl του ρυθμιστικού διαλύματος στα σωληνάρια NSB (non-specific binding) (σωλ. 3-4). Ακολούθησε έγχυση 200μl του ρυθμιστικού διαλύματος στα σωληνάρια αναφοράς (Bo) (σωλ. 5-6) και έγχυση 100μl του ρυθμιστικού διαλύματος σε όλα τα υπόλοιπα σωληνάρια.
2. Έγχυση 100 μl από το διάλυμα των human adiponectin standards και από τα διαλύματα των quality control 1 και 2 εις διπλούν στα αντίστοιχα σωληνάρια τους.
3. Έγχυση 100 μl από κάθε δείγμα εις διπλούν στα αντίστοιχα σωληνάρια τους.
4. Έγχυση 100 μl της ^{125}I – αντιγονεκτίνης σε όλα τα σωληνάρια.
5. Έγχυση 100 μl του αντισώματος της αντιγονεκτίνης σε όλα τα σωληνάρια, εκτός από τα σωληνάρια 1-2 (σωλ. ολικής μέτρησης) και τα σωληνάρια 3-4 (σωλ. NSB).
6. Έπειτα ακολούθησε ανάδευση, κάλυψη και επώαση κατά τη διάρκεια της νύχτας (24 ώρες) σε θερμοκρασία δωματίου (25°C).

Την δεύτερη μέρα πραγματοποιήσαμε:

7. Προσθήκη 10μl του φορέα σε όλα τα σωληνάρια, εκτός από τα σωληνάρια 1-2 (σωλ. ολικής μέτρησης).
8. προσθήκη 10 ml του αντιδραστηρίου κατακρήμνισης (διατήρηση στους 4°C), εκτός από τα σωληνάρια 1-2 (σωλ. ολικής μέτρησης).
9. Ακολούθησε ανάδευση και επώαση 20 λεπτών στους 4°C .
10. Φυγοκέντρωση στους 4°C , όλων των σωληναρίων (εκτός από τα σωλ. 1-2) για 20 λεπτά στις 3000 στροφές, ώστε να προκύψει μια λεπτή πελέτα.
11. Άμεση αφαίρεση του υπερκείμενου από όλα τα φυγοκεντρημένα δείγματα εκτός από τα σωληνάρια 1 και 2 και από τα χείλη των σωληναρίων.
12. Ακολούθησε μέτρηση όλων των σωληναρίων με μετρητή γ ακτινοβολίας για 1 λεπτό, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι υπολογισμοί των συγκεντρώσεων της αντιγονεκτίνης.

1. Πήραμε τον μέσο όρο των μετρήσεων από τα σωληνάρια 1-2 (TCT), τα σωληνάρια 3-4 (NSB σωληνάρια) και τα σωληνάρια 5-6 (Bo) και από όλα τα σωληνάρια ελέγχου και τα υπο εξέταση δείγματα στο τέλος της δοκιμασίας.

2. Ακολούθησε αφαίρεση του μέσου όρου των NSB μετρήσεων από κάθε μέσο όρο μέτρησης (εκτός από τις μετρήσεις των σωλ. 1 και 2).
3. Ακολούθως : υπολογίσαμε το ποσοστό της δέσμευσης του ανιχνευτή [M.O. συγκέντρωσης σωλ. 5 -6 (Bo)/ M.O. συγκέντρωσης σωλ. 1-2 (TCT)] χ 100.
4. Υπολογίσαμε το ποσοστό της ολικής δέσμευσης (%B/ Bo) για κάθε γνωστό (standard) και άγνωστο δείγμα. [% B/Bo= (δείγμα/ ολική δέσμευση) χ 100]
5. Καταρτίσαμε το ποσοστό %B/ Bo για κάθε γνωστό δείγμα στον άξονα ψ και τη γνωστή συγκέντρωση του γνωστού δείγματος στον άξονα χ , χρησιμοποιώντας λογαριθμικό χαρτί.
6. Κατασκευάσαμε την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, ενώνοντας τα σημεία με μία καμπύλη γραμμή (εικόνα 2 στο παράρτημα II).
7. προσδιορίσαμε το κλάσμα B/Bo στα άγνωστα δείγματα σε αντιπαραβολή με την καμπύλη αναφοράς.

Όλες οι μετρήσεις στα νεογνά πραγματοποιήθηκαν δύο φορές, για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

ii. Μέτρηση επιπέδων γρελίνης

- Χαρακτηριστικά του RIA kit της γρελίνης

Η συγκέντρωση της ολικής γρελίνης πλάσματος μετρήθηκε με το RIA kit Cat. # GHRT-89 HK, Linco Research, Inc., St. Charles, Missouri, USA. Το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιεί ένα αντίσωμα που είναι ειδικό για την ολική γρελίνη και δεν απαιτεί την παρουσία της ομάδας οκτανυλίου στη σερίνη 3. Επίσης χρησιμοποιεί σημασμένη με ^{125}I - γρελίνη και αντιορρό γρελίνης προκειμένου να καθοριστεί το επίπεδο της ολικής γρελίνης στο πλάσμα με την τεχνική του διπλού πεγκυλιωμένου (PEG) αντισώματος. (19).

Η ευαισθησία της μεθόδου, δηλαδή το χαμηλότερο επίπεδο που μπορεί να ανιχνευτεί η γρελίνη είναι τα 93ng/ml, όταν χρησιμοποιούμε 100μl από ένα δείγμα. Τα χαρακτηριστικά του RIA kit της γρελίνης αναφέρονται αναλυτικά στο παράρτημα 2.

στ. Ηθική έγκριση

Το πρωτόκολλο της μελέτης έχει εγκριθεί από το νοσοκομείο «Έλενα Βενιζέλου», είναι σύμφωνο με την ισχύουσα νομοθεσία και ακολουθεί τους κανόνες

της Διακήρυξης του Ελσίνκι (που αφορά στην ευθύνη και τις αρμοδιότητες των ερευνητών, την αρχειοθέτηση των δεδομένων καθώς και το απόρρητο δημοσίευσης αυτών).

Η έρευνα διεξήχθη μετά την αυστηρή προϋπόθεση της γονικής συγκατάθεσης και μετά από ενημέρωση τους για τον σκοπό της ερευνητικής αυτής μελέτης και πριν από την έναρξή της.

Γ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βάση το στατιστικό πρόγραμμα SPSS for Windows (release 11.5, SPSS, Inc., Chicago, IL). Το επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε στο 5% για όλες τις περιπτώσεις.

Υπολογίστηκε ο μέσος και η διάμεσος των κλινικών στοιχείων, των ανθρωπομετρικών παραμέτρων και των συγκεντρώσεων των ορμονών. Ακολούθησε χρήση της μεθόδου Mann-Whitney για τον έλεγχο της διαφοράς των διαμέσων των δύο ομάδων νεογνών (πρόωρα- τελειόμηνια).

Για τις συσχετίσεις των ορμονών γρελίνης και αντιγονεκτίνης με τις ανθρωπομετρικές και βιοχημικές παραμέτρους χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman, ενώ πραγματοποιήθηκε απλή παλινδρόμηση στις περιπτώσεις πιθανής εξάρτησης των ορμονών με ποιοτικές μεταβλητές.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Περιγραφικά Στοιχεία

Στους κάτωθι πίνακες φαίνονται συνοπτικά τα περιγραφικά στοιχεία των νεογνών ανάλογα με την ομάδα που ανήκουν (πρόωρα - τελειόμηνα). Έχουν καταγραφεί οι μέσες τιμές, οι διάμεσοι, οι σταθερές αποκλίσεις, οι μέγιστες και οι ελάχιστες τιμές καθώς και οι αριθμός των νεογνών που καταγράφηκαν τα εκάστοτε στοιχεία. Στον πίνακα 4 φαίνονται αναλυτικά τα στοιχεία αυτά.

Πίνακας 4. Περιγραφικά στοιχεία των **πρόωρων** ΝΔΜ

	Μέση τιμή	Διάμεσος	SD	Min	Max	N
Γρελίνη (ng/ml)	689,87	513,19	684,12	29,90	2904,90	N=21
Αντιπονεκτίνη (μg/ml)	21,813	21,834	7,052	9,220	33636,00	N=20
Ηλικία κύησης	35,19	36,00	1,40	32,00	36,00	N=21
Βάρος γέννησης (gr)	2497,24	2410,00	589,49	1640,00	3430,00	N=21
Ύψος γέννησης (cm)	46,79	47,00	5,12	31,00	54,00	N=21
Περίμετρος κεφαλής (cm)	32,31	33,00	1,89	28,00	36,00	N=21
Δείκτης BMI	1,14	1,11	0,24	0,78	2,01	N=21
Δείκτης PONDERAL	2,52	2,29	0,95	1,68	6,47	N=21
Γλυκόζη 1^{ης} ημέρας (mg/dl)	42,81	39,50	10,48	28,00	64,00	N=19
Γλυκόζη 2^{ης} ημέρας (mg/dl)	63,80	62,00	12,16	45,00	85,00	N=19
Χοληστερόλη (mg/dl)	95,18	88,00	27,77	51,00	133,00	N=11
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	91,13	75,50	46,12	49,00	185,00	N=8
HDL - χοληστερόλη (mg/dl)	37,90	34,50	13,87	22,00	68,00	N=10
LDL - χοληστερόλη (mg/dl)	42,90	46,00	19,50	13,00	76,00	N=10
Ολικά λιπίδια (mg/dl)	470,55	432,00	65,20	410,00	615,00	N=11

Πίνακας 5. Περιγραφικά στοιχεία των **τελειόμηνων** ΝΔΜ

	Μέση τιμή	Διάμεσος	SD	Min	Max	N
Γρελίνη (ng/ml)	414,25	380,70	235,82	31,32	1288,40	N=44
Αντιπονεκτίνη (μg/ml)	22,267	23,376	7,334	5,746	35,937	N=44
Ηλικία κύησης	38,27	38,00	1,08	37,00	41,00	N=49
Βάρος γέννησης (gr)	3.212,65	3.150,00	652,07	2.135,00	5.640,00	N=49
Ύψος γέννησης (cm)	50,88	51,00	3,14	44,00	57,00	N=49
Περίμετρος κεφαλής (cm)	34,26	34,00	1,57	31,00	39,00	N=49
Δείκτης BMI	1,23	1,22	0,15	0,93	1,80	N=49
Δείκτης PONDERAL	2,42	2,42	0,29	1,88	3,21	N=49
Γλυκόζη 1^{ης} ημέρας (mg/dl)	53,94	50,00	14,06	30,00	81,00	N=47
Γλυκόζη 2^{ης} ημέρας (mg/dl)	66,53	65,00	11,06	41,00	90,00	N=47
Χοληστερόλη (mg/dl)	83,63	77,00	26,31	45,00	141,00	N=19
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	69,11	65,50	33,47	15,00	144,00	N=18
HDL – χοληστερόλη (mg/dl)	30,83	31,00	9,27	16,00	49,00	N=18
LDL – χοληστερόλη (mg/dl)	42,06	33,00	22,25	16,00	93,00	N=17
Ολικά λιπίδια (mg/dl)	451,19	454,00	38,83	390,00	521,00	N=16

2. Σύγκριση Μεταξύ Πρόωρων και Τελειόμηνων Νεογνών

α. Ανθρωπομετρικές παράμετροι

	Πρόωρα	Τελειόμηνα	p-values
Βάρος γέννησης (gr)	2.410,00	3150,00	0,001
Μήκος γέννησης (cm)	47,00	51,00	0,001
Περίμετρος κεφαλής (cm)	33,00	34,00	0,001
BMI (g/cm2)	1,11	1,22	0,006
Δείκτης Ponderal (gr/cm3x 100)	2,29	2,42	0,438

Πίνακας 6.

Στα πρόωρα νεογνά, το βάρος και το μήκος γέννησης, η περίμετρος κεφαλής και το BMI παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές συγκριτικά με τις αντίστοιχες των τελειόμηνων και οι διαφορές αυτές είναι στατιστικά σημαντικές. Αντιθέτως, το ponderal index (PI) δεν βρέθηκε να διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων σε στατιστικά σημαντικό βαθμό.

β. Βιοχημικές παράμετροι

	Πρόωρα	Τελειόμηνα	p- values
Γλυκόζη d1 (mgr/ dl)	39,00	50,00	0,006
Γλυκόζη d2 (mgr/ dl)	62,00	65,00	0,004
Ολική χοληστερόλη (mg/dl)	88,00	77,00	0,196
HDL- χοληστερόλη (mg/dl)	34,50	31,00	0,221
LDL- χοληστερόλη (mg/dl)	46,00	33,00	0,802
Τριγλυκερίδια (mg/dl)	75,50	65,50	0,211
Ολικά λιπίδια (mg/dl)	432,00	454,00	0,537

Πίνακας 7.

Τα επίπεδα γλυκόζης κατά το πρώτο και το δεύτερο 24ωρο ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στα τελειόμηνα.

Όσον αφορά στο λιπιδαιμικό προφίλ, η ολική χοληστερόλη, η HDL και η LDL χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια είναι σε υψηλότερα επίπεδα στα πρόωρα νεογνά, χωρίς όμως να φτάνουν σε σημαντικό επίπεδο στατιστικά.

γ. Επίπεδα ορμόνης

	Πρόωρα	Τελειόμηνα	p-values
Αντιπονεκτίνη (μg/dl)	21,83	23,37	0,817

Πίνακας 8.

Στον πίνακα φαίνονται οι διάμεσες τιμές των δύο ορμονών μεταξύ των δύο ομάδων, χωρίς όμως να διαφέρουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό.

3. Συσχέτιση Ορμόνης με το Φύλο

	Άρρενα	Θήλεα	p-value
Αντιπονεκτίνη (μg/dl)	24,28	21,85	0,169

Πίνακας 9.

Η διάμεση συγκέντρωση της αντιπονεκτίνης δεν διέφερε σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μεταξύ των δύο φύλων, δεν παρατηρείται δηλαδή φυλετικός διμορφισμός σε αυτή την περίοδο της ζωής.

4. Συσχέτιση Αντιπονεκτίνης με Ανθρωπομετρικές Παραμέτρους

Αντιπονεκτίνη	Πρόωρα		Τελειόμηνα	
	Spearman's Rho	p-value	Spearman's Rho	p-value
Βάρος γέννησης	-0,514	0,020	0,279	0,067
Μήκος γέννησης	-0,388	0,091	0,291	0,050
Περίμετρος κεφαλής	-0,418	0,067	0,386	0,010
BMI	-0,446	0,049	0,127	0,410
Δείκτης Ponderal	-0,211	0,371	-0,061	0,692

Πίνακας 10.

Στην ομάδα των πρόωρων η αντιπονεκτίνη σχετίστηκε αρνητικά με όλες τις μετρούμενες ανθρωπομετρικές παραμέτρου αλλά σε στατιστικά σημαντικό βαθμό με το βάρος γέννησης και το BMI και σε οριακή σημαντικότητα με την περίμετρο κεφαλής.

Στην ομάδα των τελειόμηνων υπήρχε θετική συσχέτιση για τις ίδιες παραμέτρους εκτός του δείκτη Ponderal. Παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα με το μήκος γέννησης και την περίμετρο κεφαλής και οριακή στατιστική σημαντικότητα με το βάρος γέννησης.

5. Συσχέτιση Αντιπονεκτίνης με Βιοχημικές Παραμέτρους

Αντιπονεκτίνη	Πρόωρα		Τελειόμνηνα	
	Spearman's Rho	p-value	Spearman's Rho	p-value
Γλυκόζη day 1	-0,480	0,060	-0,271	0,134
Γλυκόζη day 2	-0,152	0,575	0,132	0,486
Ολική χοληστερόλη	0,118	0,729	-0,515	0,029
HDL	-0,012	0,973	-0,197	0,464
LDL	0,309	0,385	-0,426	0,113
Τριγλυκερίδια	-0,405	0,320	-0,048	0,855
Ολικά λιπίδια	0,105	0,759	-0,213	0,447

Πίνακας 11.

Στα πρόωρα νεογνά υπήρξε τάση μέτριας αρνητικής συσχέτισης της αντιπονεκτίνης με τα επίπεδα γλυκόζης κατά την 1^η μέρα. Στα τελειόμνηνα σημαντική αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μόνο με την ολική χοληστερόλη.

6. Συσχέτιση Γρελίνης και Αντιπονεκτίνης

Στον πίνακα 12 φαίνεται η συσχέτιση γρελίνης-αντιπονεκτίνης στα πρόωρα ΝΔΜ που δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Στον πίνακα 13 φαίνεται η συσχέτιση της γρελίνης-αντιπονεκτίνης στα τελειόμνηνα ΝΔΜ, η οποία είναι στατιστικά σημαντική ($p=0,003$) και στην εικόνα 3 φαίνεται η αντίστοιχη γραφική παράσταση.

Τέλος στον πίνακα 14 φαίνεται η συσχέτιση της γρελίνης με την αντιπονεκτίνη στο σύνολο των νεογνών, η οποία είναι στατιστικά σημαντική ($p=0,022$) και στην εικόνα 4 φαίνεται η γραφική παράσταση της συσχέτισης.

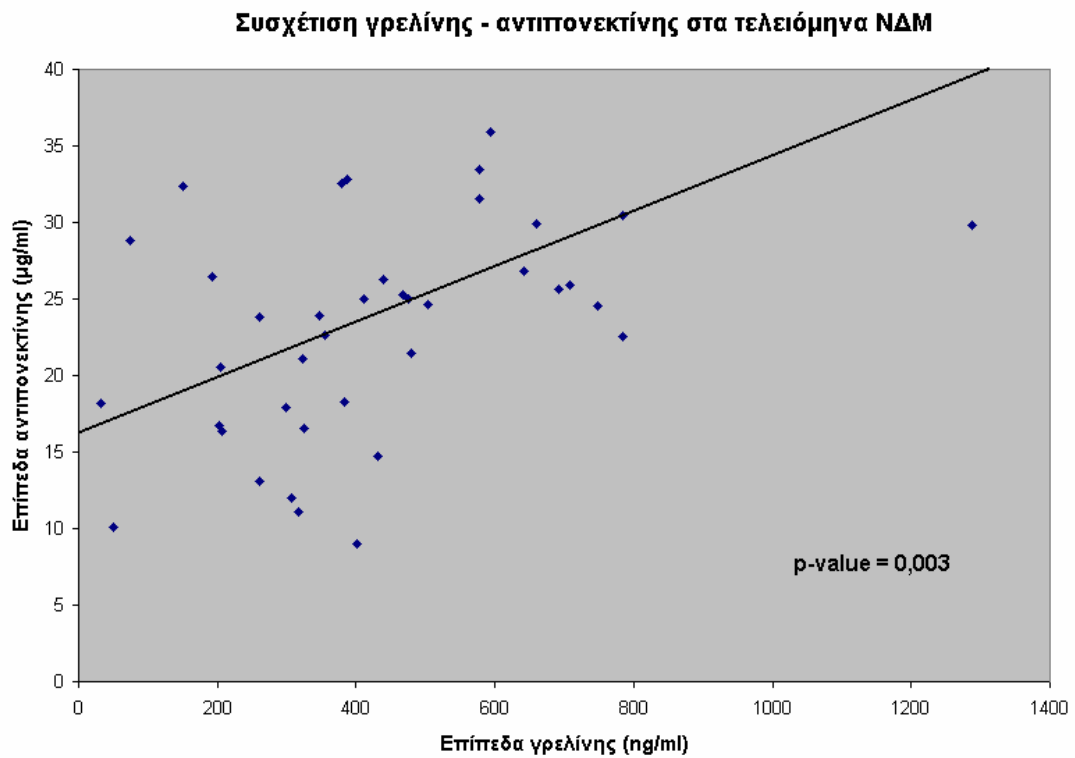
Πίνακας 12. ομάδα πρόωρων ΝΔΜ

Γρελίνη		
Αντιπονεκτίνη	Spearman's Rho	0,075
	p- value	0,752
	N	20

Πίνακας 13. Ομάδα Τελειόμνηνων ΝΔΜ

Γρελίνη		
Αντιπονεκτίνη	Spearman's Rho	0,448
	p- value	0,003

	N	41
--	---	----

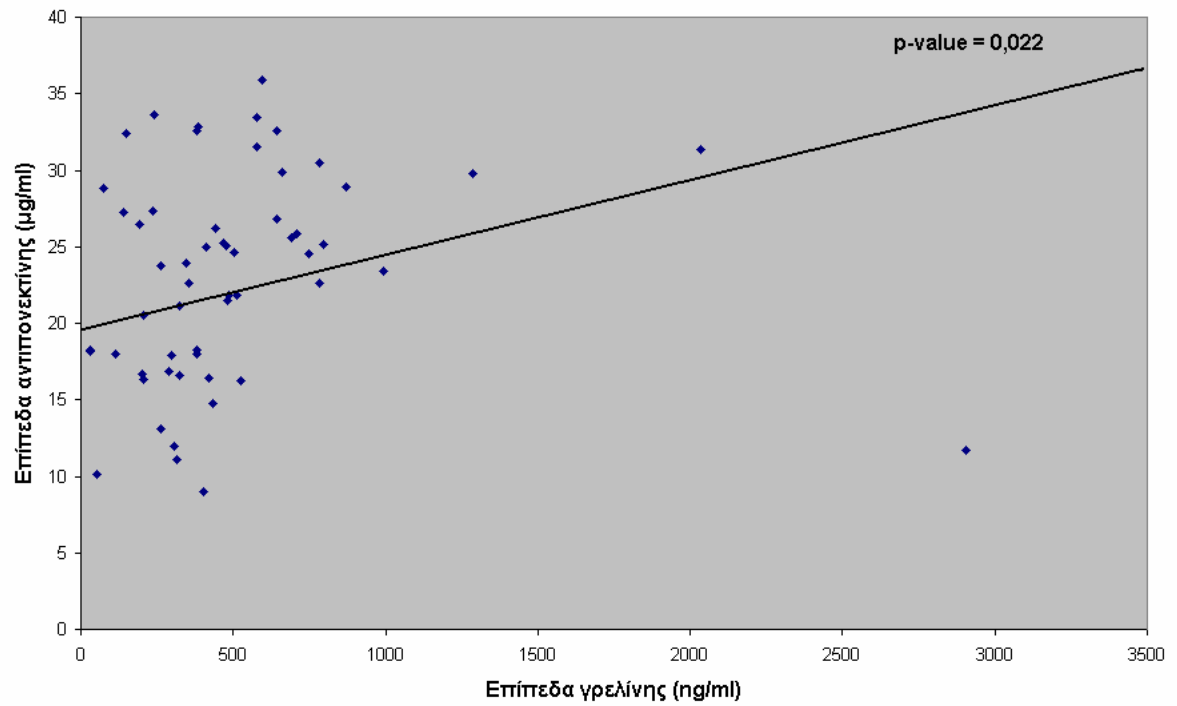


Εικόνα 3. Γραφική παράσταση της συσχέτισης των επιπέδων γρελίνης με τα επίπεδα αντιπυονεκτίνης στα τελειόμηνα ΝΔΜ.

Πίνακας 14 – ομάδα συνόλου ΝΔΜ

Γρελίνη		
Αντιπυονεκτίνη	Spearman's Rho	0,293
	p- value	0,022
	N	61

Συσχέτιση γρελίνης - αντιπυονεκτίνης στο σύνολο ΝΔΜ



Εικόνα 4. Γραφική παράσταση της συσχέτισης ολικής γρελίνης με την αντιπυονεκτίνη στο σύνολο των ΝΔΜ.

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Περιγραφικά Στοιχεία

Τα νεογνά του δείγματος που γεννήθηκαν **πρόωρα** ήταν 21. Σε ένα δείγμα αίματος, λόγω ακαταλληλότητας του δείγματος δεν μετρήθηκε η τιμή της αντιπυονεκτίνης. Στις τιμές της αντιπυονεκτίνης παρατηρείται μεγάλη διασπορά. Στοιχεία για πρόωρα νεογνά γενικά υπάρχουν λίγα στη βιβλιογραφία. Σε μία μελέτη των Kajantie E et al(26) όπου μελετήθηκαν και πρόωρα καταγράφηκαν τιμές με εύρος 0.08-31.4 $\mu\text{g/ml}$ εξίσου μεγάλο δηλαδή. Το εύρος που βρήκαμε εμείς ήταν 9.22-33.63 $\mu\text{g/ml}$ παρόμοιο με της μελέτης των Kajantie E et al(26) με λίγο μεγαλύτερη μόνο την κατώτατη τιμή.

Τα **τελειόμηννα** νεογνά ήταν συνολικά 49, εκ των οποίων τα 5 είχαν ακατάλληλο προς επεξεργασία δείγμα γι' αυτό και ο τελικός αριθμός ήταν 44. Και πάλι η διασπορά των τιμών της αντιπυονεκτίνης ήταν μεγάλη. Στα τελειόμηννα νεογνά όμως έχουν γίνει αρκετές μελέτες η πλειονότητα των οποίων με την ίδια μέθοδο με τη δική μας (RIA), οπότε οι ευρεθείσες τιμές από εμάς τιμές (22.2 ± 7.3 , εύρος 5.7-35.9 $\mu\text{g/ml}$) είναι συγκρίσιμες. Να επισημανθεί ότι οι κάτωθι μελέτες αναφέρονται σε παιδιά φυσιολογικών μητέρων. Οι Kamoda T et al (2) βρήκαν μέση τιμή αντιπυονεκτίνης τα 28.7 ± 17.0 $\mu\text{g/ml}$, οι Pardo I et al (4) 24.91 ± 0.58 $\mu\text{g/ml}$, οι Lindsay R et al (5) 21.8 ± 5.3 $\mu\text{g/ml}$, οι Sivan E et al (6) 61.1 ± 19 $\mu\text{g/ml}$, οι Corbetta S et al (12) 31.2 ± 14 $\mu\text{g/ml}$ (11.6-59.2), οι Kotani Y e al (22) τιμές εύρους 6-55.8 $\mu\text{g/ml}$ με διάμεση τιμή τα 22.4 $\mu\text{g/ml}$, οι Tsai PJ (25) 29.6 ± 6.0 $\mu\text{g/ml}$, οι Kajantie E et al(26) 5.5-54.8 $\mu\text{g/ml}$ και οι Μαντζώρος Χ συν. (21) 32.2 ± 10.3 $\mu\text{g/ml}$. Από τις αναφερόμενες μελέτες μόνο μία πραγματοποιήθηκε σε ελληνικό πληθυσμό όπως η δική μας, αυτή του κ. Μαντζώρου. Σε μια πρώτη εκτίμηση, οι δικές μας τιμές είναι χαμηλότερες από αυτές του κ. Μαντζώρου, αλλά η δεύτερη δεν περιλαμβάνει παιδιά μητέρων με ΣΔΚ. Σε παιδιά σακχαροδιαβητικών μητέρων έγιναν 2 μελέτες, με τις οποίες είναι και πιο συγκρίσιμα τα αποτελέσματά μας. Οι Lindsay R et al (5) μελέτησαν και παιδιά μητέρων με ΣΔΙ και βρήκαν τιμές αντιπυονεκτίνης 19.7 ± 6.1 $\mu\text{g/ml}$ και οι Kajantie E et al(26) βρήκαν μέση τιμή αντιπυονεκτίνης 18.7 $\mu\text{g/ml}$ (εύρους 4.4-42.4 $\mu\text{g/ml}$) σε παιδιά μητέρων με

ΣΔΚ, κάνοντας την παρατήρηση ότι τα επίπεδα αντιπονεκτίνης δεν διέφεραν μεταξύ παιδιών από μητέρες με ΣΔΙ και ΣΔΚ.

Η δική μας μέση τιμή ήταν ελαφρώς υψηλότερη από αυτές τις δύο, ίσως όμως είναι και πιο αντιπροσωπευτική καθώς το δείγμα μας συμπεριέλαβε μόνο παιδιά μητέρων με ΣΔΚ και όχι ΣΔΙ ή ανάμικτα. Οι Lindsay R et al (5) που μελέτησαν και παιδιά μητέρων με ΣΔΙ και βρήκαν τιμές αντιπονεκτίνης 19.7 ± 6.1 $\mu\text{g/ml}$ παρατήρησαν ότι τα παιδιά αυτά είχαν χαμηλότερη αντιπονεκτίνη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (υγιείς μητέρες) (21.8 ± 5.3 $\mu\text{g/ml}$) σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p=0.04$). Στα αγόρια διαβητικών μητέρων (ΣΔΙ) η αντιπονεκτίνη ήταν ακόμα χαμηλότερη και στα κορίτσια υπήρχε απλώς τάση), ενώ στην ομάδα ελέγχου ήταν το αντίθετο (υψηλότερη στα αγόρια - τάση). Πιθανή εξήγηση είναι ότι τα αγόρια είναι πιο αδύνατα και έχουν σαφώς περισσότερα ανδρογόνα απ' ότι τα κορίτσια και τα ανδρογόνα πιστεύεται ότι μειώνουν την αντιπονεκτίνη στο οποίο και οφείλεται πιθανόν εν μέρει και ο φυλετικός διμορφισμός των ενηλίκων(5).

Σχετικά με τη γλυκόζη των πρόωρων και των τελειόμηνων, η μέση τιμή των τελειόμηνων είναι ψηλότερη συγκριτικά με των πρόωρων. Οι τιμές αυτές γλυκόζης αφορούν στο μέσο όρο μετρήσεων γλυκόζης των νεογνών οι οποίες πραγματοποιήθηκαν διάφορες ώρες της ημέρας σε χρονικό διάστημα 2 ημερών. Είναι γνωστό ότι τα φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης και άρα της υπογλυκαιμίας διαφέρουν στα πρόωρα και στα τελειόμηννα, με τα πρώτα να έχουν ανώριμους μηχανισμούς αντιμετώπισης τυχόν υπογλυκαιμίας. Λόγω της μεγάλης σημασίας της γλυκόζης στην κατηγορία αυτή των νεογνών μελετήσαμε τα επίπεδα γλυκόζης ανά 24ωρο και τα αποτελέσματα θα σχολιαστούν παρακάτω.

Υπερ-αντιπονεκτιναιμία παρατηρήθηκε και στα διαβητικά νεογνά. Στους ενήλικες έχουν αναφερθεί ότι η μέση τιμή αντιπονεκτίνης είναι μικρότερη από 10 $\mu\text{g/ml}$ με εύρος 1-20 (6). Οι τιμές που βρήκαμε τόσο στα πρόωρα όσο και στα τελειόμηννα είναι τουλάχιστον διπλάσιες, γεγονός που επιβεβαιώνει την αναφερόμενη υπερ-αντιπονεκτιναιμία των νεογνών που έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές (2,4,5,12,22,25,26). Βέβαια οι προηγούμενοι αναφέρθηκαν σε νεογνά φυσιολογικών μητέρων ή τουλάχιστον μητέρων που δεν έπασχαν από διαβήτη κύησης. Το φαινόμενο της υπερ-αντιπονεκτιναιμίας γενικά αλλά και ειδικά στα παιδιά σακχαροδιαβητικών μανάδων λοιπόν είναι επιβεβαιωμένο και από τη δική μας μελέτη γιατί οι τιμές της ορμόνης είναι υψηλότερες από τις αναφερόμενες τιμές των ενηλίκων και γιατί είναι παραπλήσιες φυσιολογικών νεογνών που έχει αποδειχθεί ότι

έχουν υπερ-αντιπνεκτιναιμία. Πιθανή εξήγηση έχει δοθεί στην υπερ-αντιπνεκτιναιμία των παιδιών που γεννήθηκαν από μητέρες χωρίς παθολογία. Η νεογνική υπεραντιπνεκτιναιμία μπορεί να σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή αυτής από το λευκό ή/και το φαιό λιπώδη ιστό). Πιστεύεται ότι στους ενήλικες λειτουργούν μηχανισμοί καταστολής που για κάποιο λόγο αδρανοποιούνται στη νεογνική ηλικία. Υποθέτουμε ότι κάποιοι ενδοκρινείς, παρακρινείς, αυτοκρινείς παράγοντες που καταστέλλουν την παραγωγή αντιπνεκτίνης μπορεί να απουσιάζουν από τα νεογνά(4).

Οι μηχανισμοί ρύθμισης των επιπέδων της αντιπνεκτίνης στο πλάσμα του νεογνού μητέρας χωρίς ΣΔΚ είναι αδιευκρίνιστοι. Η ορμόνη φαίνεται να παράγεται και να εκκρίνεται αποκλειστικά από τα λιποκύτταρα και η αύξηση αυτών οδηγεί σε ρύθμιση της ορμόνης σε χαμηλότερα επίπεδα (down regulation), ενώ η μείωση αυτών οδηγεί σε αύξηση. Φαίνεται λοιπόν να υπάρχει μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης στους ενήλικες, ο οποίος όμως είναι αδρανής στα νεογνά (εξ' ου και η υπεραντιπνεκτιναιμία τους). Εξήγηση της έλλειψης αυτού του μηχανισμού στα νεογνά: Α) 13% λίπος στα νεογνά, 25-30% στους ενήλικες, δηλ. πολύ μικρότερο ποσοστό λίπους και αφού δεν υπάρχει πολύ λίπος, δεν υπάρχει αρνητικό feedback. Στους ανορεκτικούς ενήλικες βρέθηκε αυξημένη αντιπνεκτίνη, μάλλον επειδή και αυτοί έχουν χαμηλό ποσοστό λίπους, άρα χαμηλό αρνητικό feedback και πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση της αντιπνεκτίνης είναι μειωμένη σε υπερτροφικά λιποκύτταρα.. Β) Στις ίδιες μελέτες φάνηκε να υπάρχει μεγαλύτερη συσχέτιση της έκφρασης της αντιπνεκτίνης με το μέγεθος των λιποκυττάρων παρά με την ολική λιπώδη μάζα ή το βάρος σώματος, παρόλο που αυτός ο μηχανισμός ρύθμισης της αντιπνεκτίνης σε χαμηλότερα επίπεδα (down regulation) από τα μεγαλύτερα λιποκύτταρα δεν έχει διαλευκανθεί. Άρα ένας επιπλέον παράγοντας που συμβάλλει στην υπεραντιπνεκτιναιμία των νεογνών είναι η έλλειψη υπερτροφίας των λιποκυττάρων. Στα νεογνά η ιστολογική διερεύνηση των λιποκυττάρων τους έδειξε ότι έχουν δύο είδη: 1) τα μικρά χωρίς λίπος και 2) τα μεγάλα με λίπος με μικρότερη όμως διάμετρο συγκριτικά με των ενηλίκων και η υπεραντιπνεκτιναιμία των νεογνών μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη αρνητικής ανατροφοδότησης (negative feedback) από τα μεγάλα λιποκύτταρα. Τα αντιδιαβητικά φάρμακα όπως οι γλιταζόνες αυξάνουν την ινσουλινοευαισθησία αυξάνοντας τον αριθμό των μικρών λιποκυττάρων. Η αντιπνεκτίνη και η ύπαρξη μικρών λιποκυττάρων αυξάνουν την ινσουλινοευαισθησία και εφόσον τα νεογνά έχουν και τις δύο αυτές παραμέτρους

αυξημένες, ίσως γι' αυτό να έχουν και τόσο μεγάλη ινσουλινοευαισθησία, βέβαια η υπόθεση αυτή δεν έχει διευκρινιστεί/επιβεβαιωθεί όπως έχει γίνει για τον τρόπο δράσης της αντιπονεκτίνης στους ενήλικες(6).

Τα νεογνά, όπως είναι γνωστό διαθέτουν εκτός από «λευκό» και μεγάλο ποσοστό «φαιού» λίπους. Προσφάτως βρέθηκε ότι το γονίδιο της αντιπονεκτίνης εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο φαιό λιπώδη ιστό σε ποντίκια και με διαφορετική ορμονική ρύθμιση από το λευκό λίπος(6). Χρειάζονται όμως περαιτέρω έρευνα, και ειδικά σε ανθρώπους, για να διαπιστωθεί αν η υπεραντιπονεκτιναιμία των νεογνών οφείλεται στο αρκετό φαιό λίπος που διαθέτουν.

Εφόσον έχειδειχθεί στο παρελθόν ότι η υπερ-αντιπονεκτιναιμία των νεογνών συγκριτικά με τους ενήλικες έχει ευεργετικό ρόλο στα παιδιά φυσιολογικών μητέρων αυξάνοντας την ευαισθησία στην ινσουλίνη και άρα την είσοδο της γλυκόζης στο κύτταρο, είναι αναμενόμενο και τα παιδιά μητέρων με ΣΔΚ να έχουν και αυτά υπερ-αντιπονεκτιναιμία. Τα νεογνά αυτά λόγω της υπεργλυκαιμίας του ενδομήτριου περιβάλλοντος κάνουν αντιδραστικό υπερινσουλινισμό από το δικό τους πάγκρεας και άρα η αυξημένη ινσουλινοευαισθησία λόγω της αντιπονεκτίνης αντισταθμίζει τον υπερινσουλινισμό κάνοντας πιο «δραστική» την ινσουλίνη τους με σκοπό την αντιμετώπιση της υπεργλυκαιμίας.

Η πηγή παραγωγής της αντιπονεκτίνης δεν θεωρείται πλήρως γνωστή. Τα δεδομένα της μελέτης των Sivan et al(6) δείχνουν ότι προέρχεται κυρίως από τους εμβρυϊκούς και όχι από τους μητρικούς ιστούς. Τα ευρήματα που τεκμηριώνουν αυτή τη θεωρία είναι: α) δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ μητρικής και εμβρυϊκής τιμής αντιπονεκτίνης στη γέννηση, β) ήταν υψηλότερη η αντιπονεκτίνη των νεογνών συγκριτικά με αυτή των μητέρων, άρα δεν είναι πιθανή η μεταφορά της ορμόνης από τη μητέρα στο πλακούντα αλλιώς θα ήταν παρόμοιες οι τιμές τους, γ) η πιθανή παραγωγή της ορμόνης από άλλους ιστούς, όπως ο πλακούντας, απορρίπτεται γιατί οι τιμές της δεν πέφτουν 4 ημέρες μεταγεννητικά, όπου έχει αποχωριστεί η εμβρυο-πλακουντική μονάδα (ενώ η λεπτίνη που παράγεται και εκκρίνεται από το πλακούντα μειώνεται δραματικά τη 4^η ημέρα).

2. Σύγκριση Μεταξύ Πρόωρων και Τελειόμηνων Νεογνών

α. Ανθρωπομετρικές Παράμετροι

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στα αποτελέσματα, στα πρόωρα νεογνά οι ανθρωπομετρικοί δείκτες παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές συγκριτικά με τις αντίστοιχες των τελειόμηνων. Ειδικότερα το βάρος και το μήκος γέννησης και η περίμετρος κεφαλής ήταν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό χαμηλότερες στα πρόωρα. Εφόσον το βάρος και το μήκος διαφέρουν, επόμενο είναι να διαφέρει και το BMI αφού είναι δείκτης με παραμέτρους το βάρος και το μήκος. Οι παρατηρήσεις αυτές είναι αναμενόμενες, γιατί τα πρόωρα νεογνά υπολείπονται σαφώς σε ανάπτυξη συγκριτικά με τα τελειόμηνα γι' αυτό και το βάρος και το μήκος ήταν μικρότερα. Η περίμετρος κεφαλής αντικατοπτρίζει το βαθμό ανάπτυξης του εγκεφάλου και ειδικότερα των μη-νευρικών (νευρογλοιακών) κυττάρων. Στον εμβρυϊκό εγκέφαλο, τα πρώτα που αναπτύσσονται είναι τα νευρικά κύτταρα και με την πρόοδο των εβδομάδων τα νευρογλοιακά, η ανάπτυξη των οποίων σε αριθμό και μέγεθος συνεχίζει και μεταγεννητικά τα πρώτα χρόνια της ζωής (27). Τα πρόωρα έχουν μικρότερο ποσοστό νευρογλοίας σε σχέση με τα τελειόμηνα γι' αυτό και μικρότερη περίμετρο κεφαλής.

Για την εκτίμηση της ενδομήτρου θρεπτικής κατάστασης και την πραγματοποίηση συσχετισμών, ο δείκτης Ponderal (PI) θεωρείται ο πλέον κατάλληλος ανθρωπομετρικός δείκτης, συγκριτικά με το βάρος γέννησης και τον BMI (15,28) ο οποίος δεν βρέθηκε να διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι τα περισσότερα νεογνά ήταν AGA, δηλ ήταν σε καλή διατροφική ενδομήτρια κατάσταση κατά τη γέννηση επειδή πιθανόν οι μητέρες τους ήταν καλά ρυθμισμένες είτε με δίαιτα είτε με ινσουλίνη. Διότι αν ήταν αρρυθμιστες τα βρέφη θα έπρεπε να ήταν LGA.

β. Βιοχημικές παράμετροι

Αντίστοιχα, τα επίπεδα γλυκόζης κατά το πρώτο και το δεύτερο 24ωρο ήταν σημαντικά υψηλότερα στα τελειόμηνα. Τα τελειόμηνα νεογνά διαβητικής μητέρας λόγω του υπερινσουλινισμού, έχουν αυξημένη πιθανότητα σε σχέση με φυσιολογικά νεογνά να αναπτύξουν υπογλυκαιμία μεταγεννητικά. Η υπογλυκαιμία που εμφανίζουν τις πρώτες ώρες μετά τη γέννηση οφείλεται σε υπερινσουλιναιμία του νεογέννητου, που είναι αποτέλεσμα της συνεχούς υπεργλυκαιμίας κατά την εμβρυϊκή περίοδο λόγω αυξημένης προσφοράς γλυκόζης από τη μητέρα(14).

Η πιθανότητα αυτή αυξάνεται στην περίπτωση των πρόωρων νεογνών διαβητικής μητέρας λόγω των σημαντικά χαμηλότερων εφεδρειών και την ανωριμότητα των μηχανισμών αντιμετώπισης της ενδεχόμενης υπογλυκαιμίας. Γι' αυτό και τα πρόωρα έχουν χαμηλότερο μέσο όρο τιμών γλυκόζης την 1^η και τη 2^η μέρα μεταγεννητικά.

Και στις δύο ομάδες τόσο οι μέσοι όσο και οι διάμεσοι των επιπέδων γλυκόζης ήταν εντός των φυσιολογικών ορίων. Η υπογλυκαιμία ορίζεται κάθε φορά από τους εκάστοτε ερευνητές. Σύμφωνα με τους Avroy και Fanaroff (31) υπογλυκαιμία θεωρείται κάθε τιμή γλυκόζης κάτω από δύο σταθερές αποκλίσεις από τις φυσιολογικές τιμές. Για τα τελειόμηνα η υπογλυκαιμία ορίζεται η τιμή γλυκόζης αίματος <30mg/dl (31,14) για τις πρώτες 72 ώρες ζωής και για τα πρόωρα βάρους < 2.500gr τιμή γλυκόζης αίματος <25mg/dl (31). Πράγματι υπήρχε ένας μικρός αριθμός τελειόμηνων, κυρίως όμως πρόωρων, που παρουσίασαν υπογλυκαιμία κατά το 1^ο και 2^ο 24ωρο.

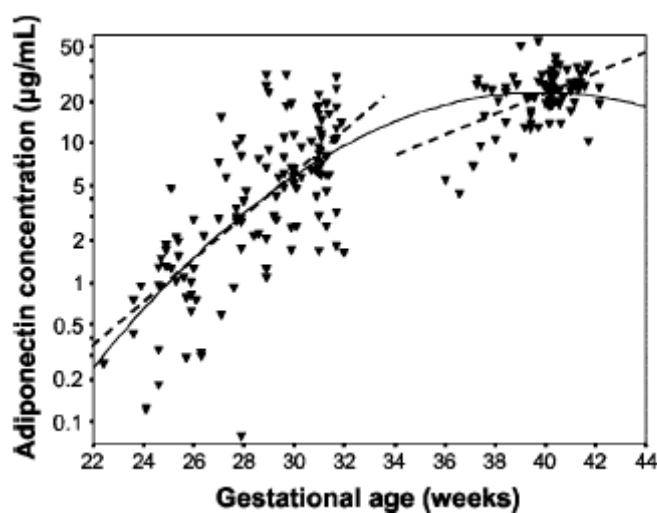
Όσον αφορά στο λιπιδαιμικό προφίλ, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των προώρων και των τελειόμηνων νεογνών. Ο λόγος όμως που συμπεριλήφθηκε στις μετρήσεις η χοληστερόλη παρόλο που δεν σχετίζεται με το μεταβολισμό, είναι ότι είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη νέων κυτταρικών μεμβρανών και ιστών, ειδικά στα πρόωρα(32). Οι διάμεσες τιμές της ολικής χοληστερόλης, της HDL, της LDL και των TG είναι υψηλότερες στα πρόωρα χωρίς όμως να διαφέρουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό στις 2 ομάδες. Να σημειωθεί όμως ότι σε μικρό ποσοστό του δείγματος της κάθε ομάδας είχαν γίνει βιοχημικές αναλύσεις για τα λιπίδια, γι' αυτό και τα αποτελέσματα της συγκρίσεις είναι ενδεικτικά και χρειάζεται να επιβεβαιωθούν με μεγαλύτερο αριθμό δείγματος.

γ. Επίπεδα ορμόνης

Δεν βρέθηκε να διαφέρουν τα επίπεδα αντιπνεκτίνης στις δύο ομάδες νεογνών σε στατιστικά σημαντικό βαθμό.

Η παραδοχή αρνητικής συσχέτισης αντιπνεκτίνης-ποσοστού λίπους των ενήλικων ίσως οφείλεται σε μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης που γίνεται στην αντιπνεκτίνη από τον ίδιο τον λιπώδη ιστό που την παράγει. Επειδή το ποσοστό λίπους αυξάνεται όσο προχωράει η εγκυμοσύνη, τα πρόωρα που γεννιούνται από 22 έως 32 εβδομάδες είναι καλό «μοντέλο» για να επιβεβαιωθεί αυτή η υπόθεση(26).

Στη μελέτη των Kajantie E et al(26) βρέθηκε ότι η αντιπονεκτίνη αύξανε με την ηλικία κύησης. Η μέση τιμή της στα πρόωρα ήταν 3.7μg/ml (0.08-31.4), στα φυσιολογικά τελειόμηνα 23.7 μg/ml (5.5-54.8) και στα τελειόμηνα ΝΔΜ ήταν 18.7 μg/ml (4.4-42.4). Μάλιστα, οι μέσες τιμές αντιπονεκτίνης δεν διάφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μεταξύ των φυσιολογικών νεογνών και των νεογνών μητέρων με ΣΔΚ ($p=0.02$). Στα πρόωρα, 1 εβδομάδα κύησης παραπάνω ισοδυναμούσε με 43% αύξηση της αντιπονεκτίνης. Στα τελειόμηνα (φυσιολογικά-ΝΔΜ), 1 εβδομάδα παραπάνω ισοδυναμούσε με 21% αύξηση. Αν συνδυαστούν οι ευθείες των δύο ομάδων προκύπτει η εικόνα 5.



Εικόνα 5. Σχέση τιμών αντιπονεκτίνης με την ηλικία κύησης(26)

Το κύριο εύρημα αυτής της μελέτης(26) είναι η εντυπωσιακή αύξηση της αντιπονεκτίνης με την ηλικία κύησης. Η συγκέντρωση στα τελειόμηνα είναι 2-3 φορές υψηλότερη από των ενηλίκων και 20 φορές από νεογνό 24 εβδομάδων.

Στη δική μας μελέτη δεν βρέθηκε διαφορά μεταξύ πρόωρων και τελειόμηνων (δηλ. αποτέλεσμα αντίθετο από αυτό των Kajantie E et al(26)). Η δική μας μελέτη όμως διέφερε στο ότι: α. τα πρόωρα νεογνά προέρχονταν αποκλειστικά από μητέρες με ΣΔΚ, ενώ στον Kajantie E et al από τα 122 πρόωρα μόνο τα 10 ήταν ΝΔΜ, άρα πολύ μικρό δείγμα, β. από τα 26 τελειόμηνα ΝΔΜ, τα 21 ήταν από μητέρες με ΣΔΚ και τα 5 από μητέρες με ΣΔΙ, άρα δείγμα ανομοιογενές. Τα νεογνά της μελέτης μας ήταν λιγότερα αριθμητικά ($N=21$) άλλα αμιγώς πρόωρα ΝΔΜ και περισσότερα αμιγώς τελειόμηνα ΝΔΜ ($N=49$).

Ενδεικτικά παρατίθενται τα χαρακτηριστικά των νεογνών των Kajantie E et al(26) γιατί είναι η μόνη έρευνα στη βιβλιογραφία που έχει πολλά κοινά χαρακτηριστικά με τη δική μας.

	Preterm	Term healthy	Term diabetic
N	122	49	26
Male/female	65/57	24/25	13/13
Cesarean section	65	7	8
Preeclampsia	22	0	0
Impaired umbilical artery flow	24	0	0
Gestational diabetes	10	0	21
Type 1 diabetes	3	0	5
Gestational age (wk)	28.7 (2.5) [22.4–32.0]	40.1 (1.2) [36.0–42.1]	39.4 (1.6) [36.6–41.7]
Birth weight (g)	1195 (410) [455–2010]	3478 (475) [2140–4400]	3707 (543) [2430–4630]
Birth weight (SDS)	−0.93 (1.38) [−4.9–+3.0]	−0.3 (1.0) [−2.0–+2.0]	0.3 (1.0) [−1.9–+2.1]
Length at birth (cm)	37.6 (4.0) [27.0–45.0]	50.2 (1.9) [45.0–54.0]	50.5 (2.0) [45.5–54.0]
Ponderal index at birth (kg/m ³)	22.3 (2.5) [16.2–29.6]	27.4 (2.1) [23.2–33.5]	28.6 (2.3) [23.7–32.8]
Mother's length (cm)	164.9 (6.2) [145–178]	166.5 (6.2) [155–181]	165.0 (6.2) [153–174]
Mother's BMI before pregnancy (kg/m ²)	23.8 (4.7) [17.0–44.1]	23.1 (3.2) [18.9–31.6]	25.0 (4.6) [17.8–34.7]
Adiponectin concentration (μg/ml) ^c	3.7 [0.080–31.4]	23.7 [5.5–54.8]	18.7 [4.4–42.4]

Πίνακας 15. Τα αποτελέσματα της μελέτης των Kajantie E et al(26)

Και σε άλλες μελέτες (2,4,5,12,22,25) επίσης βρέθηκε θετική συσχέτιση με την ηλικία κύησης. Όμως και αυτά τα νεογνά δεν ήταν ΝΔΜ αλλά φυσιολογικά και σε μερικές ήταν μόνο τελειόμηνα και η ανάλυση περιορίστηκε στους τελευταίους μήνες της κύησης.

Σε μία μόνο μελέτη η συσχέτιση μεταξύ αντιπονεκτίνης και ηλικίας κύησης ήταν ανύπαρκτη και μάλιστα η μελέτη αυτή διενεργήθηκε από το νοσοκομείο παιδών «Αγ. Σοφία»(21). Και εκεί όμως ήταν όλα τελειόμηνα.

3. Συσχέτιση Ορμόνης με το Φύλο

Στη μελέτη μας δεν βρέθηκε φυλετικός διμορφισμός, αποτέλεσμα που συνάδει με τα ευρήματα άλλων μελετών (4,5,6,21,22,25,26). Στους ενήλικες είναι γεγονός η παρουσία φυλετικού διμορφισμού με τις γυναίκες να έχουν υψηλότερες τιμές από τους άνδρες (2,5,6). Όπως έχει προταθεί και από άλλους ερευνητές, στα νεογνά λείπει ή είναι αδρανής ο μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης από τον ίδιο το λιπώδη ιστό και τα ανδρογόνα (2,4).

4. Συσχέτιση Αντιπονεκτίνης με Ανθρωπομετρικές Παραμέτρους

Στα **πρόωρα** ΝΔΜ βρέθηκε αρνητική συσχέτιση με όλες τις μετρούμενες ανθρωπομετρικές παραμέτρους. Στατιστικά σημαντική ήταν η συσχέτιση με το βάρος γέννησης ($r=-0.514$, $p=0.02$) και με το BMI ($r=-0.446$, $p=0.05$), ενώ για την περίμετρο κεφαλής υπήρχε μόνο τάση ($r=-0.418$, $p=0.06$).

Το βάρος γέννησης είναι δείκτης του ποσοστού λίπους του νεογέννητου(2). Θα περίμενε κανείς στα πρόωρα να ήταν θετική η συσχέτιση αντιπονεκτίνης-βάρους διότι στα πρόωρα η λιπώδης μάζα είναι λίγη και δεν υπάρχει ή υπολειτουργεί ο μηχανισμός αρνητικής ανατροφοδότησης που έχει προταθεί για τους ενήλικες(29).

Στη βιβλιογραφία μία μόνο μελέτη έχει μελετήσει τη συσχέτιση της αντιπονεκτίνης με το βάρος γέννησης στα πρόωρα. Το βάρος γέννησης σχετίστηκε θετικά με την αντιπονεκτίνη, στα οποία αύξηση βάρους κατά 100gr αύξανε την αντιπονεκτίνη κατά 26%(26). Η δική μας συσχέτιση βρέθηκε αντίθετη, αλλά το δείγμα μας ήταν αμιγώς νεογνά ΝΔΜ. Βέβαια το δείγμα της άλλης έρευνας ήταν 5πλάσιο από το δικό μας, γι' αυτό απαιτείται επανάληψη με μεγαλύτερο δείγμα που να περιλαμβάνει μόνο ΝΔΜ για να διαπιστωθεί ποια συσχέτιση είναι πιο αληθής. Ίσως τα ευρήματά μας αντικατοπτρίζουν την ύπαρξη κάποιου άλλου μηχανισμού που αναχαιτίζει την έκκριση αντιπονεκτίνης από το λιπώδη ιστό των πρόωρων ο οποίος διαφέρει από αυτόν των ενηλίκων, δηλ κάτι άλλο που υπάρχει μόνο στα πρόωρα ΝΔΜ σε υψηλό ποσοστό ανταγωνίζεται την αντιπονεκτίνη.

Δεν υπάρχει μέχρι σήμερα βιβλιογραφία που να συσχετίζει το BMI των πρόωρων με την αντιπονεκτίνη. Στους ενήλικες θεωρείται δεδομένη η αρνητική συσχέτιση αντιπονεκτίνης-BMI. Η εξήγηση όμως που δόθηκε για τους ενήλικες δεν ισχύει για τα πρόωρα ΝΔΜ. Πιθανόν το μεγάλο ποσοστό φαιού λιπώδους ιστού των νεογνών να είναι ένας «κρίκος της αλυσίδας». Επίσης, το BMI συνίσταται από βάρος και μήκος εξ ορισμού, οπότε η σχέση του με την αντιπονεκτίνη επηρεάζεται από τις δύο αυτές παραμέτρους τελικά.

Η τάση αρνητικής συσχέτισης αντιπονεκτίνης-περιμέτρου κεφαλής μπορεί να εξηγείται από τα γεγονότα ότι τα πρόωρα δεν έχουν μεγάλη περίμετρο, έχουν όμως υψηλά επίπεδα αντιπονεκτίνης και τελικά η σχέση τους είναι αντίστροφη.

Στα **τελειόμηνα** ΝΔΜ αντιστράφηκαν οι συσχετίσεις και θετική, στατιστικά σημαντική συσχέτιση βρέθηκε με το μήκος γέννησης ($r=0.291$, $p=0.05$) και την περίμετρο κεφαλής ($r=0.386$, $p=0.01$) ενώ το βάρος γέννησης είχε απλώς τάση συσχέτισης ($r=0.28$, $p=0.06$). Μόνο ο δείκτης Ponderal εξακολούθησε να έχει αρνητική σχέση με την αντιπονεκτίνη.

Και όσον αφορά στο μήκος οι απόψεις των ερευνητών διίστανται. Κάποιοι βρήκαν θετική(4,21,25) και κάποιοι αρνητική συσχέτιση(2,22). Με τη πρόοδο της κύησης αυξάνεται τόσο το μήκος(32) όσο και η αντιπονεκτίνη(4,5,12,21,26), έχουν

δηλαδή παράλληλες πορείες, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στη μεταξύ τους συσχέτιση.

Παρόμοια ίσως εξήγηση μπορεί να δοθεί και για την περίμετρο κεφαλής. Τα ΝΔΜ βρίσκονται σε υπεργλυκαιμικό ενδομήτριο περιβάλλον, έχουν δηλ υπερπροσφορά τροφής, γι' αυτό και σε αρρύθμιστες μητέρες με ΣΔΚ τα νεογνά αυτά γεννιούνται LGA. Η περίμετρος κεφαλής είναι δείκτης που επηρεάζεται σε καταστάσεις χρόνιου υποσιτισμού(32), άρα στα ΝΔΜ δεν περιμένουμε τιμές περιμέτρου κάτω των φυσιολογικών αποκλίσεων και γι' αυτό ίσως η σχέση της με την αντιπνεκτίνη είναι θετική. Στη μελέτη των Kamoda T et al(2) βρέθηκε επίσης θετική συσχέτιση αντιπνεκτίνης-περιμέτρου κεφαλής στα τελειόμηνα, αποτέλεσμα σύμφωνο με το δικό μας.

Η πλειονότητα των ερευνών της βιβλιογραφίας έγινε σε τελειόμηνα φυσιολογικά νεογνά. Σε κάποιες από αυτές δε βρέθηκε καθόλου συσχέτιση με το βάρος (5,12) ενώ στις περισσότερες ήταν θετική(2,4,6,22,25). Η πτυχή αυτή δεν είναι πλήρως διαλευκασμένη.

Μία πιθανή εξήγηση της θετικής ευρεθείσας συσχέτισης αντιπνεκτίνης-βάρους γέννησης(2) είναι: α. η έλλειψη υπερτροφίας λίπους, β. το χαμηλό ποσοστό λίπους των νεογνών συγκριτικά με τους ενήλικες και άρα η έλλειψη μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης, και γ. η διαφορετική κατανομή λίπους (φαιό>λευκό) και το φαιό λίπος εκφράζει περισσότερο την αντιπνεκτίνη.

Σύμφωνα με κάποιους άλλους ερευνητές δεν υπάρχει καθόλου συσχέτιση(5) υπονοώντας ότι οι τιμές ομφαλίου μπορεί να επηρεάζονται από την ινσουλίνη, την προΐνσουλίνη, τη λεπτίνη, τα γλυκοκορτικοειδή, την κοιλιακή κατανομή λίπους, τα επίπεδα αντιπνεκτίνης της μητέρας.

Μία δεύτερη εξήγηση της θετικής συσχέτισης της αντιπνεκτίνης με το βάρος γέννησης στα φυσιολογικά τελειόμηνα δόθηκε από κάποιους άλλους συγγραφείς(6) εφόσον το εύρημα τους ήταν στατιστικά σημαντικό ($r=0,4$, $p<0,01$): α) ο λιπώδης ιστός των νεογνών αποτελείται κυρίως από μικρά λιποκύτταρα, τα οποία όμως δεν έχουν παράγοντες που αναστέλλουν τη παραγωγή αντιπνεκτίνης, β) τα νεογνά έχουν κυρίως υποδόριο και όχι κοιλιακό λίπος. Στους ενήλικες με κοιλιακό λίπος δείχθηκε ότι η αντιπνεκτίνη σχετίζεται με το BMI, δηλ. τα άτομα με πολύ κοιλιακό (και όχι τόσο πολύ υποδόριο) λίπος έχουν μειωμένη αντιπνεκτίνη. Τα νεογνά έχουν δηλ. διαφορετική κατανομή λίπους συγκριτικά με τους ενήλικες και ίσως γι' αυτό η σχέση

μεταξύ αντιπονεκτίνης και βάρους γέννησης που βρέθηκε είναι αντίθετη με αυτή των ενηλίκων.

Στη δική μας μελέτη βρέθηκε μόνο τάση θετικής συσχέτισης χωρίς αυτή να φτάνει σε στατιστικά σημαντικό επίπεδο, αποτέλεσμα σύμφωνο με τους περισσότερους ερευνητές. Οι Kajantie E et al(26) στα τελειόμνηνα των οποίων συμπεριλήφθηκαν και ΝΔΜ, βρήκαν ότι αύξηση του βάρους κατά 100gr αύξανε την αντιπονεκτίνη κατά 3,5%. Μάλλον χρειάζεται μεγαλύτερο δείγμα ΝΔΜ για να επιβεβαιωθεί το είδος της συσχέτισης αν και φαίνεται ότι τείνει να είναι θετική για τα ΝΔΜ όπως βρέθηκε από τη δική μας και των Kajantie E et al.

Όσον αφορά στο Ponderal index, την οποία συσχέτιση βρήκαμε αρνητική, στη μελέτη των Μαντζώρος Χ(21) ενώ αρχικά τη συσχέτιση μεταξύ του δείκτη αυτού και της αντιπονεκτίνης ήταν αρνητική ($p=0.001$) όταν ξαναπραγματοποιήθηκε ανάλυση με απαλοιφή πιθανόν συγχυτικών παραγόντων (ηλικία κύησης, παράγοντες μητέρας) δεν επιβεβαιώθηκε. Όπως αναφέρουν οι συγγραφείς στη συζήτηση της δημοσίευσής τους, παρελθοντικές μελέτες ανέφεραν είτε θετική είτε αρνητική συσχέτιση χωρίς όμως να έχουν λάβει υπ' όψιν τους συγχυτικούς παράγοντες. Άρα και σε εμάς ίσως κάποιοι συγχυτικοί παράγοντες επηρεάζουν τα αποτελέσματά μας για το Ponderal index ή είναι πιο αξιόπιστη επειδή το δείγμα μας περιλαμβάνει μόνο ΝΔΜ.

5. Συσχέτιση Αντιπονεκτίνης με Βιοχημικές Παραμέτρους

Στα αποτελέσματά μας δείχθηκε ότι στα **πρόωρα** η γλυκόζη κατά την 1^η και 2^η μέρα ζωής είχε αρνητική συσχέτιση με την αντιπονεκτίνη χωρίς να είναι όμως στατιστικά σημαντική. Ειδικότερα κατά την 1^η μέρα ήταν τάση ήπιας αρνητικής συσχέτισης ($p=0.06$) αποτέλεσμα που μπορεί πιθανόν αν αποδοθεί στο ότι τα πρόωρα είναι πιο επιρρεπή στην υπογλυκαιμία για αυτό και ο μέσος όρος γλυκόζης τους είναι μικρότερος από τα τελειόμνηνα όπως αποδείξαμε. Δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια συσχέτιση της ορμόνης με τα λιπίδια στα πρόωρα.

Στα **τελειόμνηνα** ΝΔΜ δεν δείχθηκε κάποια συσχέτιση πλην της ήπιας αρνητικής συσχέτισης αντιπονεκτίνης-ολικής χοληστερόλης($r=-0.515$, $p=0.029$). Η αντιπονεκτίνη ως γνωστόν αυξάνεται με το πέρασμα των εβδομάδων. Η χοληστερόλη στα νεογνά χρησιμεύει ως δομικό υλικό για τη δημιουργία νέων μεμβρανών και άρα κυττάρων. Προτεινόμενος μηχανισμός δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία που να συνδέει τις δύο αυτές παραμέτρους, δηλ την αντιπονεκτίνη και την ολική χοληστερόλη γιατί δεν έγιναν έρευνες στην ομάδα των ΝΔΜ που να στοχεύουν στο λιπιδαιμικό προφίλ.

Χρειάζεται λοιπόν περαιτέρω έρευνα με μεγαλύτερο δείγμα για να διαπιστωθεί η πραγματική τους σχέση.

6. Συσχέτιση Αντιπυονεκτίνης και Γρελίνης

Η γρελίνη είναι μία ορμόνη με ορεξιογόνο και λιπογόνο δράση που στρέφει το μεταβολισμό προς θετικό ενεργειακό ισοζύγιο. Δρα ως περιφερική ορμόνη που εκκρίνεται από τον στόμαχο και ως υποθαλαμικό νευροπεπτίδιο που εμπλέκεται στη ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας(47).

Υποθέτουμε ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο ορμονών, καθώς και οι δύο συσχετίζονται με τις ανθρωπομετρικές παραμέτρους και με την ινσουλινοαντίσταση. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει στη βιβλιογραφία άρθρο, το οποίο να συσχετίζει τη γρελίνη με την αντιπυονεκτίνη στα νεογνά.

Ως γνωστόν τα νεογνά εκτός από το λευκό λιπώδη ιστό έχουν και φαιό, κύρια λειτουργίας το οποίου είναι η θερμογένεση, δηλ. η διατήρηση ομοιόστασης. Το φαιό λίπος αυξάνει προς το τέλος της κύησης, ενώ ατροφεί κατά την παιδική ηλικία (33,26).

Το ΝΔΜ χαρακτηρίζεται από υπερινσουλιναμία λόγω του ενδομήτριου υπεργλυκαιμικού περιβάλλοντος. Η υπερινσουλιναμία αυτή προκαλεί μείωση των επιπέδων της γρελίνης(49) και διατηρεί της έκκρισης της αντιπυονεκτίνης στο φαιό λιπώδη ιστό(26). Όλα αυτά συμβαίνουν κατά την ενδομήτριο ζωή του ΝΔΜ. Φαίνεται ότι η αντιπυονεκτίνη αυξάνει την ευαισθησία στην ινсуλίνη(01-03, 06-08,10-12,21,22,47). Οι χαμηλές συγκεντρώσεις της γρελίνης αποτελούν αμυντικό μηχανισμό ενάντια στην υπεργλυκαιμία, όπως συμβαίνει στους ενήλικες μετά τη λήψη γεύματος(48). Οπότε αυτές οι αλλαγές δεικνύει ένα μέρος των αντισταθμιστικών μηχανισμών που αναπτύσσονται το έμβρυο ενδομητρίως, για τη διαχείριση της υπεργλυκαιμίας και τη διατήρηση των κυκλοφορούντων επιπέδων γλυκόζης εντός φυσιολογικών ορίων και να αντεπεξέλθει στο παθολογικό ενδομήτριο περιβάλλον (σχήμα ενδομήτρια). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η αναμενόμενη συσχέτιση γρελίνης- αντιπυονεκτίνης θα είναι αρνητική.

Μεταγεννητικά αίρεται η αιτία του υπερινσουλινισμού, αφού στο εξωμήτριο περιβάλλον δεν υπάρχει υπεργλυκαιμία, λόγω ΣΔΚ. Άρα υφίσταται η καταστολή του υπερινσουλινισμού στην έκκριση της γρελίνης. Μεταγεννητικά λοιπόν παρατηρείται αύξηση των επιπέδων γρελίνης, συγκριτικά με την ενδομήτριο ζωή. Αυτό αποδεικνύεται και από τη μελέτη μας στην οποία τα επίπεδα γρελίνης 2^{ου} 24 ώρου

ζωής ήταν υψηλότερα από το 1^ο 24 ωρο ($p=0,003$). Η δε αντιπνεκτίνη θεωρείται σταθερή ορμόνη μεταγεννητικά(06,22,26). Εφόσον η γρελίνη αυξάνεται και η αντιπνεκτίνη σταθεροποιείται η αρνητική τους σχέση είναι αναμενόμενο να θετικοποιηθεί. Γι' αυτό ίσως και εμείς βρήκαμε μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο ορμονών στα τελειόμηνα ΝΔΜ ($r=0,448$, $p=0,003$).

Το βάρος και η σύσταση σώματος του βρέφους αλλάζει δραματικά κατά το 3^ο τρίμηνο κύησης. Το βάρος τετραπλασιάζεται και δημιουργείται/αποθηκεύεται το 90% του λιπώδους ιστού. Το ολικό ποσοστό λίπους στη γέννηση σχετίζεται θετικά με το βάρος και αντανakλά την ενδομήτριο ανάπτυξη (25). Τα προ-λιποκύτταρα διαφοροποιούνται σε μικρά λιποκύτταρα ενδομητρίως τα οποία είναι και τα περισσότερα στη γέννηση(34). Η αύξηση του λιπώδους ιστού συμβαίνει κατά τους 2 τελευταίους μήνες της εμβρυϊκής ζωής και είναι ανάλογη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των λιποκυττάρων(35). Συνεπώς ο λιπώδης ιστός των προώρων είναι αφενός υπολείπεται σε ανάπτυξη συγκριτικά με το τελειόμηνο και δεν έχουν ωριμάσει οι μηχανισμοί που διέπουν τη ρύθμιση του μεταβολισμού(35). Τα παραπάνω μπορούν πιθανόν να εξηγήσουν τη μη σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δύο ορμονών στα πρόωρα ΝΔΜ του δείγματός μας ($r=0,075$, $p=0,752$). Το γεγονός ότι προέκυψε αυτή η μη στατιστική σχέση στα πρόωρα νεογνά μπορεί να οφείλεται και στο ότι η ομάδα των προώρων ΝΔΜ είναι σχετικά ανομοιογενής (περιλαμβάνει 4 νεογνά που είναι SGA), όπως διαπιστώθηκε και από τη μεγάλη διακύμανση των επιπέδων της γρελίνης που παρατηρήθηκε.

Όταν μελετήσαμε τη συσχέτιση των δύο ορμονών στο σύνολο των ΝΔΜ του δείγματός μας παρατηρήσαμε ήπια θετική συσχέτιση ($r=0,293$, $p=0,022$). Θεωρούμε ότι αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα τελειόμηνα ΝΔΜ ήταν διπλάσια ($n=44$) συγκριτικά με τα πρόωρα($n=20$) .

Να σημειωθεί πάντως ότι οι δύο ορμόνες παράγονται από διαφορετικούς ιστούς, έχουν διαφορετικούς μηχανισμούς ρύθμισης της έκκρισής και δράσης τους. Επομένως μπορεί να μην υπάρχει βιολογικός – φυσιολογικός μηχανισμός που να περιλαμβάνει αυτές τις δύο ορμόνες και τα ευρήματα της μελέτης μας να είναι απλώς ένα στατιστικό αποτέλεσμα, στα πλαίσια της κοινής κατεύθυνσης που παρουσιάζουν στις διάφορες μεταβολές της ενεργειακής ισορροπίας, καθώς και οι δύο σχετίζονται με καταστάσεις υπερινσουλινισμού(36).

Από μελέτες σε ενήλικες συμπεραίνεται ότι οι δύο ορμόνες έχουν διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς και δεν έχουν καμία συσχέτιση μεταξύ

τους (37). Επίσης στους ενήλικες πιθανολογείται ότι η λεπτίνη καταστέλλει τόσο τα επίπεδα της γρελίνης, όσο και της αντιπονεκτίνης(38).

7. Τύπος τοκετού

Στην εργασία μας δεν υπολογίσαμε τη συσχέτιση της αντιπονεκτίνης με τον τύπο τοκετού για δύο λόγους: 1. το 98% των νεογνών μας γεννήθηκε με καισαρική τομή, οπότε δεν είχαμε αριθμό φυσιολογικών τοκετών για να κάνουμε συγκρίσεις και 2. έχει δειχθεί από τη βιβλιογραφία ότι τα επίπεδα αντιπονεκτίνης δεν σχετίζονται με το τύπο τοκετού(5,26).

ΣΤ. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Κάποια από τα αποτελέσματα της έρευνάς μας συμφώνησαν με τη βιβλιογραφία και άλλα διαφώνησαν. Τα πλεονεκτήματα της είναι ότι έγινε σε ελληνικό πληθυσμό (στο παρελθόν είχε γίνει μόνο άλλη μία) και ότι το δείγμα είχε αποκλειστικά ΝΔΜ τόσο πρόωρα όσο και τελειόμηνα. Δεν συμπεριέλαβε δηλ φυσιολογικά παιδιά που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα. Μειονεκτήματα είναι το σχετικά μικρό δείγμα των νεογνών και ειδικά των πρόωρων. Επίσης, μειονέκτημα ήταν και το μικρό δείγμα νεογνών που συμμετείχαν στο βιοχημικό έλεγχο των λιπιδίων.

Το ΝΔΜ χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη παθολογία η οποία αντανακλάται στην ενδομήτρια ανάπτυξή του. Φαίνεται λοιπόν ότι η προσαρμογή του εμβρύου σε ένα δυσμενές ενδομήτριο περιβάλλον προάγει τον προγραμματισμό διαταραγμένων μεταβολικών μονοπατιών, οδηγώντας σε μόνιμες αλλαγές του μεταβολισμού, οι οποίες καταγράφονται ως παράδοξες συσχετίσεις.

Απαιτείται περαιτέρω έρευνα με μεγαλύτερο δείγμα, στοχευμένη στην επίδραση των παθοφυσιολογικών διεργασιών στην αντιπονεκτίνη και προσπάθεια απαλοιφής συγχυτικών παραγόντων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Nedvídková J, Smitka K, Kopský V, Hainer V. Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiological Research* 2005; 54:133-140.
2. Kamoda T, Saitoh H, Saito M, Sugiura M, Matsui A. Serum adiponectin concentrations in newborn infants in early postnatal life. *Pediatric Research* 2004; 56(5):690-693.
3. Cianfarani S, Martinez C, Maiorana A, Scirè G, Spadoni GL, Boemi S. Adiponectin levels are reduced in children born small for gestational age and are inversely related to postnatal catch-up growth. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89(3):1346-1351.
4. Pardo I, Geloneze B, Tambascia M, Barros-Filho A. Hyperadiponectinemia in newborns: relationship with leptin levels and birth weight. *Obesity Research* 2004; 12(3):521-524.
5. Lindsay R, Walker J, Haver P, Hamilton B, Calder A, Johnstone F. Adiponectin is present in cord blood but is unrelated to birth weight. *Diabetes Care* 2003; 26(8):2244-2249.
6. Sivan E, Mazaki-Tovi S, Pariente C, Efraty Y, Schiff E, Hemi R, Kanety H. Adiponectin in human cord blood: relation to fetal birth weight and gender. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003; 88(12):5656-5660.
7. Kershaw E, Flier J. Adipose tissue as an endocrine organ. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89(6):548-2556.
8. Goldstein B, Scalia R. Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89(6):2563-2568.
9. Combs T, Berg A, Rajala M, Klebanov S, Iyengar P, Jimene-Chillaron J, Patti E, Klein S, Weinstein R, Scherer P. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 2003; 52:268-276.
10. Haluzík M, Pařízková J, Haluzík MM. Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications. *Physiological Research* 2004; 53:123-129.

11. Iñiguez G, Soto N, Avila A, Salazar T, Ong K, Dunger D, Merico V. Adiponectin levels in the first two years of life in a prospective cohort: relations with weight gain, leptin levels and insulin sensitivity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89(11):5500-5503.
12. Corbetta S, Bulfamante G, Cortelazzi D, Baresi V, Cetin I, Mantovan G, Bondioni S, Beck-Peccoz P, Spada A. Adiponectin expression in human fetal tissues during mid- and late gestation. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005; 90(4):2397-2402.
13. Ott V, Fasshauer M, Dalski A, Meier B, Prwitz N, Klein H, Tschöp M, Klein J. Direct peripheral effects of ghrelin include suppression of adiponectin expression. *Horm Metab Res* 2002; 34:640-64.
14. Παπαδάτος Κ, Λιακάκος Δ, Σινανιώτης Κ, Σπυρίδης Π, Μαθιουδάκης Ι, Μυριοκεφαλιάκης Ν. Επίτομη Παιδιατρική. Εκδόσεις Λίτσας.
15. Pajvani UB et al. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidine-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 2004; 279:12152-162.
16. Valsamakis G, Chetty R, McTernan PG, Al-Daghri NM, Barnett AH, Kumar S. Fasting serum adiponectin concentrations is reduced in Indo-Asian subjects and is related to HDL cholesterol. *Diabetes Obes Metab* 2003; 5:131-135.
17. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995; 270:26746-49.
18. Leaflet of Human Adiponectin RIA kit.
19. Leaflet of Ghrelin (Total) RIA kit.
20. Παπαντωνίου ΝΕ. Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης. Επίτομη Μαιευτική και Γυναικολογία. Εκδόσεις Παρισίανου, 2000; 173-179.
21. Mantzoros C, Petridou E, Alexe DM, Skalkidou A, Dessypris N, Papathoma E, Salvanos H, Shetty G, Gavila A, Kedikglou S, Chrousos G, Trichopoulos D. Serum adiponectin concentrations in relation to maternal and perinatal characteristics in newborns. *European Journal of Endocrinology* 2004; 151:741-746.
22. Kotani Y, Yokota I, Seiko Kitamra, Matsuda J, Naito E, Kuroda Y. Plasma adiponectin levels in newborns are higher than those in adults and positively correlated with birth weight. *Clinical Endocrinology* 2004; 61:418-423.

23. Retnakaran R, Hanley A, Raif N, Connelly P, Sermer M, Zinman B. Reduced adiponectin concentrations in women with gestational diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(3):799-800.
24. Growth velocity during the first postnatal week of life s not related to adiponectin or leptin-Letter to the editor. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 2004; 18:395.
25. Po-Jung Tsai, Chun-Hsien Yu, Shih-Penn Hsu, Yu-Hsiang Lee, Chuen-Hua Chiou, Yu-Wen Hsu, Su-chen Ho, Chun-Hong Chu. Cord plasma concentrations of adiponectin and leptin in healthy term neonates: positive correlation with birth weight and neonatal adiposity. *Clinical Endocrinology* 2004; 61:88-93.
26. Kajantie E, Hytinen T, Hovi P, Andersson S. Cord Plasma Adiponectin: A 20-fold rise between 24 weeks gestation and term. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89(8):4031-4036.
27. Snell RS. Κλινική Νευροανατομική, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 1995; σελ. 77-87, 605-608
28. Soriano-Guillén, L, Barrios V, Chowen, JA, Sanchez I, Vila S Quero J, Argente J. Ghrelin levels from fetal life through early adulthood. relationship with endocrine and metabolic and anthropometric measures. *Journal of Pediatrics* 2004; 144:30-35.
29. Mazaki-Tovi S, Kanety H, Pariente C, Hemi R, Schiff E, Sivan E. Cord blood adiponectinin large-for-gestational age newborns. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2005; 193:1238-42.
30. Κρεατσάς Γ. Σακχαρώδης Διαβητης Κύησης. Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική. Εκδόσεις Πασχαλίδη, 1998; 236-244.
31. Avroy –Fanaroff. Neonatal and Perinatal Medicine. 6th Edition.
32. Κώσταλος Χ. Νεογνολογία Τόμος Α΄, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 1996.
33. Stevens A, Lowe J. Histology. Mosby Editions. 1993.
34. Boulton TJ, Dunlop M, Court JM. The growth and development of fat cells in infancy. *Pediatric Res* 1978; 12:908-911.
35. Enzi G, Zanardo V, Caetta F et al. Intrauterine growth and adipose tissue development. *Am J Clin Nutr* 1981; 34:1785-90.
36. Choi KM, Lee J, Lee KW et al. The associations between plasma adiponectin, ghrelin levels and cardiovascular risk factors. *Eur J Endocr* 2004; 150:715-718.
37. Vendrell J, Broch M, Vilarassa N et al. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obesity Res* 2004; 12(6):962-671, 65.

38. Ueno et al. Leptin inhibits ghrelin and adiponectin. *Endocrinology* 2004; 145(9):4176-4184.
39. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002; 8:1288-1295.
40. Hotta K, Funahashi T, Arino V, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M. Plasma concentrations of a novel, adipose specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:1595-99.
41. Buchanan AT, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation* 2005; 115:485-491.
42. Ray JG, Vermeulen MJ, Shapiro JL, Kenshole AB. Maternal and neonatal outcomes in pregestational and gestational diabetes mellitus, and the influence of maternal obesity and weight gain: the DEPOSIT study. *Q J Med* 2001; 94:347-356.
43. James RJ, Drewett RF, Cheetham TD Low cord ghrelin levels in term infants are associated with slow weight gain over the first 3 months of life. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:3847-50.
44. Ogilvy-Stuart AL, Hands SJ, Adcock J et al. Insulin, Insulin-like growth factor I (IGF-1), IGF-binding protein-1, growth hormone and feeding in the newborn. *J Clin Endocrinology* 1998; 83:3550-3557.
45. Önal EE, Cinaz P, Atalay Y, et al. Umbilical cord ghrelin concentrations in small- and appropriate-for-gestational age newborn infants: relationship to anthropometric markers. *Journal of Endocrinology* 2004; 180, 267-271.
46. Soriano-Guillén L, Barrios V, Chowen JA et al. Ghrelin levels from fetal life through early adulthood. relationship with endocrine and metabolic and anthropometric measures. *Journal of Pediatrics* 2004; 144:30-35.
47. Meier U, Gressner A. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin and resistin. *Clinical Chemistry* 2004; 50(9):1511-25.
48. Shiia T, Nakazato M, Mizuta M et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:240-244.
49. Ng PC, Lee CH, Lam CWK, Wong E, Chan HIS, Fok TF. Plasma ghrelin and resistin concentrations are suppressed in infants of insulin-dependent diabetic

mothers. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2004; 89:5563-5568.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1. Χαρακτηριστικά του RIA kit της αντιπνεκτίνης

Πίνακας 1. Αντιδραστήρια που περιλαμβάνει το RIA kit

Ρυθμιστικό διάλυμα 10X
Αντιορρός κόνυκλου
¹²⁵ I – Αντιπνεκτίνη
30% όρος φυσιολογικού κόνυκλου - φορέας
Λυοφιλοποιημένη κεκαρμένη ανασυνδυασμένη αντιπνεκτίνη
Λυοφιλοποιημένα κεκαρμένα δείγματα ελέγχου ποιότητας ανασυνδυασμένης αντιπνεκτίνης (control 1-2)
Αντιδραστήριο κατακρήμνισης

Πίνακας 2. Παράμετροι επίδοσης (εκφρασμένοι σε μέση τιμή ± SD)

ED ₈₀ = 3,8 ± 0,9 ng/ml
ED ₅₀ = 21,0 ± 5,7 ng/ml
ED ₂₀ = 128,0 ± 48,6 ng/ml

Πίνακας 3. Ειδικότητα του RIA kit.

Η ειδικότητα μίας μεθόδου είναι η ικανότητά της να μετράει επιλεκτικά την ένωση που εξετάζεται, παρουσία άλλων ενώσεων στο ίδιο δείγμα. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο ισχύουν: αντιπνεκτίνη επίμυος = 400% και ανθρώπινη C1q πρωτεΐνη < 0,01%.

Πίνακας 4. Ακρίβεια του RIA kit.

Η ακρίβεια μιας μεθόδου διακρίνεται από την διακύμανση που παρουσιάζει μεταξύ των μετρήσεων στο ίδιο δείγμα (intra - assay precision) και από την διακύμανση που παρουσιάζονται μεταξύ των μετρήσεων σε διαφορετικά δείγματα (inter - assay precision).

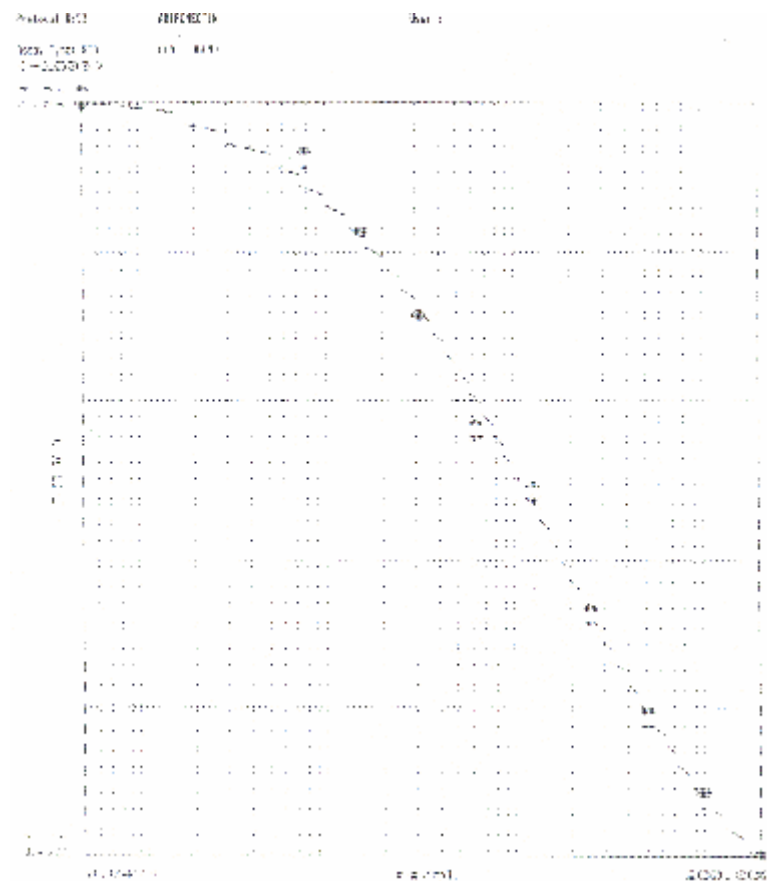
A/A δείγματος	Μέση τιμή µg/ml	Intra-assay precision (%CV)	Inter-assay precision (%CV)
1	1,5	3,59	9,25
2	3,0	6,21	6,90
3	7,5	1,78	9,25

Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση του πρωτοκόλλου μέτρησης της αντιπανεκτίνης.

Assay Procedure Flow Chart

Tube #	Day One					Day Two			
	Step 1 Add Assay Buffer	Step 2-3 Add Standard / Sample	Step 4 Add ¹²⁵ I-Adiponectin Tracer	Step 5 Add Adiponectin Antibody	Step 6	Step 7 Add Rabbit Carrier	Step 8 Add Precipitating Reagent	Step 9	Step 10-12
1,2	---	---	100 µl	---	Vortex, Cover, and Incubate 20-24 hrs at RT	---	---	Vortex, and Incubate 20 min. at 4°C	Centrifuge for 20 min., Decant, and Count pellets
3,4	300 µl	---	100 µl	---		20 µl	1.0 ml		
5,6	200 µl	---	100 µl	100 µl		10 µl	1.0 ml		
7,8	100 µl	100 µl of 0.78 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1.0 ml		
9,10	100 µl	100 µl of 1.56 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1.0 ml		
11,12	100 µl	100 µl of 3.125 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1.0 ml		
13,14	100 µl	100 µl of 6.25 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1.0 ml		
15,16	100 µl	100 µl of 12.5 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1.0 ml		
17,18	100 µl	100 µl of 25 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1.0 ml		
19,20	100 µl	100 µl of 50 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1.0 ml		
21,22	100 µl	100 µl of 100 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1.0 ml		
23, 24	100 µl	100 µl of 200 ng/ml	100 µl	100 µl		10 µl	1.0 ml		
25, 26	100 µl	100 µl of QC-1	100 µl	100 µl		10 µl	1.0 ml		
27, 28	100 µl	100 µl of QC-2	100 µl	100 µl		10 µl	1.0 ml		
29, n	100 µl	100 µl of unknown	100 µl	100 µl		10 µl	1.0 ml		

Εικόνα 2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς της αντιγονεκτικής



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2. Χαρακτηριστικά του RIA kit της γρελίνης

Πίνακας 1. Αντιδραστήρια που περιλαμβάνει το RIA kit

Ρυθμιστικό διάλυμα ολικής γρελίνης
Αντίσωμα ολικής γρελίνης
¹²⁵ I – Γρελίνη
Διάλυμα ενυδάτωσης ολικής γρελίνης
Λυοφιλοποιημένη ολική γρελίνη
Λυοφιλοποιημένα δείγματα ελέγχου ποιότητας ολικής γρελίνης (control 1-2)
Αντιδραστήριο κατακρήμνισης

Πίνακας 2. Παράμετροι επίδοσης (εκφρασμένοι σε μέση τιμή ± SD)

ED ₈₀ = 346 ± 37 ng/ml
ED ₅₀ = 774 ± 40 ng/ml
ED ₂₀ = 1727 ± 34 ng/ml

Πίνακας 3. Ειδικότητα του RIA kit

Η ειδικότητα μίας μεθόδου είναι η ικανότητά της να μετράει επιλεκτικά την ένωση που εξετάζεται, παρουσία άλλων ενώσεων στο ίδιο δείγμα.

Ανθρώπινη γρελίνη	100%
Γρελίνη επίμυος	100%
Γρελίνη κυνός	100%
Γρελίνη 14- 28	100%
Des- Octonyl γρελίνη	100%
Γρελίνη 1-10	*
Πεπτίδιο σχετιζόμενο με τη μοτιλίνη	*
Γλυκαγόνη	*
Glp-1 (7-36)	*
Ανθρώπινη λεπτίνη	*
Ανθρώπινη ινσουλίνη	*

* μη ανιχνεύσιμα

Πίνακας 4. Ακρίβεια του RIA kit

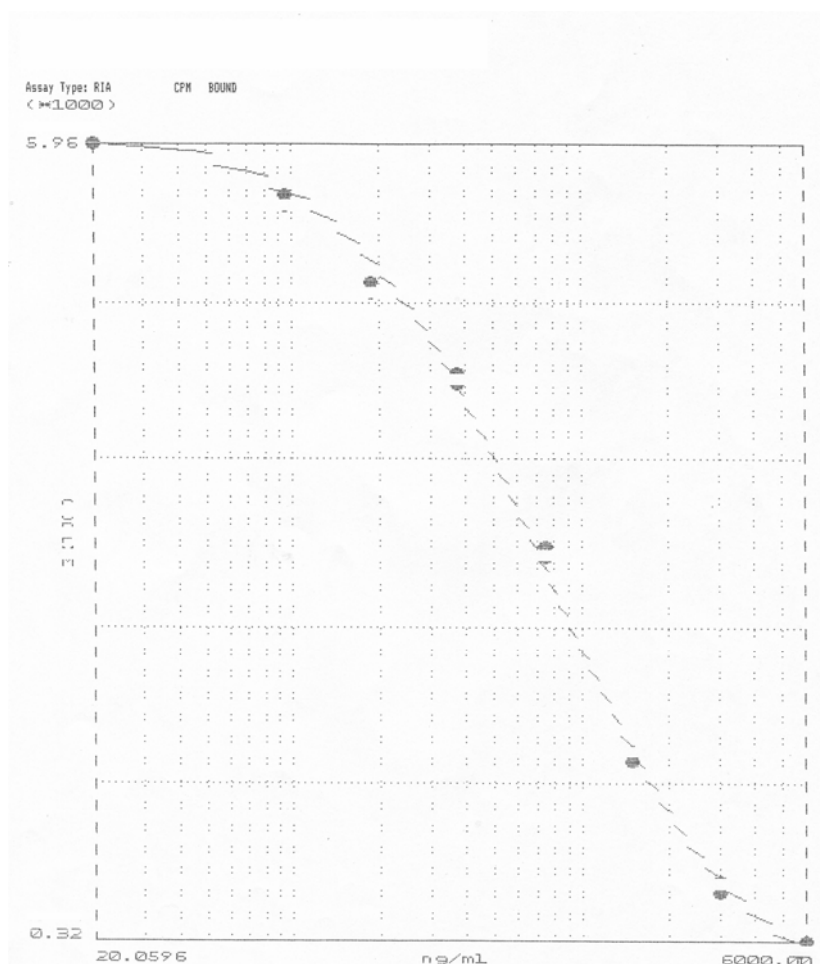
Η ακρίβεια μιας μεθόδου διακρίνεται από την διακύμανση που παρουσιάζει μεταξύ των μετρήσεων στο ίδιο δείγμα (within assay variation) και από την διακύμανση που παρουσιάζονται μεταξύ των μετρήσεων σε διαφορετικά δείγματα (between assay variation).

A/A δείγματος	Μέση τιμή ng/ml	within %CV	between%CV
1	1000	10,0	14,7
2	1500	3,3	17,8
3	2000	7,9	16,0
4	3000	4,4	16,7

Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση του πρωτοκόλλου μέτρησης της γρελίνης

Assay Procedure Flow Chart								
Day One					Day Two		Day Three	
Set-up	Step 1	Step 2&3	Step 4	Step 5	Step 6	Step 7	Step 8	Step 9 - 11
Tube Number	Add Assay Buffer	Add Standard/QC Sample	Add Ghrelin Antibody	Vortex, Cover, and Incubate 20-24 hrs at 4°C	Add I-125 Ghrelin Tracer	Vortex, Cover and Incubate 22-24 hrs at 4°C	Add Precipitating Reagent	Incubate 20 min. at 4°C, Centrifuge at 4°C for 20 min Decant and Count
1,2	-	-	-		100 µl		-	
3,4	300 µl	-	-		100 µl		1.0 ml	
5,6	200 µl	-	100 µl		100 µl		1.0 ml	
7,8	100 µl	100 µl of Tube 6	100 µl		100 µl		1.0 ml	
9,10	100 µl	100 µl of Tube 5	100 µl		100 µl		1.0 ml	
11,12	100 µl	100 µl of Tube 4	100 µl		100 µl		1.0 ml	
13,14	100 µl	100 µl of Tube 3	100 µl		100 µl		1.0 ml	
15,16	100 µl	100 µl of Tube 2	100 µl		100 µl		1.0 ml	
17,18	100 µl	100 µl of Tube 1	100 µl		100 µl		1.0 ml	
19,20	100 µl	100 µl of Reconstituted Standard	100 µl		100 µl		1.0 ml	
21,22	100 µl	100 µl of QC 1	100 µl		100 µl		1.0 ml	
23,24	100 µl	100 µl of QC 2	100 µl		100 µl		1.0 ml	
25,26	100 µl	100 µl of unknown	100 µl		100 µl		1.0 ml	

Εικόνα 2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς της ολικής γρελίνης



-Περιγραφή πρωτοκόλλου μέτρησης της γρελίνης

Η όλη πειραματική διαδικασία διαρκεί τρεις ημέρες. Αρχικά γίνεται η προετοιμασία- ανασύσταση της ολικής γρελίνης (total ghrelin standard) και των δειγμάτων ποιότητας (total ghrelin quality control 1 και 2) και οι κατάλληλες αραιώσεις για την ετοιμασία των σωληναρίων ολικής μέτρησης (σωλ. 1-2), των NSB σωληναρίων (σωλ. 3-4) και των σωληναρίων Bo (σωλ.5-6).

Την πρώτη μέρα πραγματοποιήσαμε τα εξής βήματα:

13. Έγχυση 300μl του ρυθμιστικού διαλύματος στα σωληνάρια NSB (non-specific binding) (σωλ. 3-4). Ακολούθησε έγχυση 200μl του ρυθμιστικού

διαλύματος στα σωληνάρια αναφοράς (Bo) (σολ. 5-6) και έγχυση 100μl του ρυθμιστικού διαλύματος σε όλα τα υπόλοιπα σωληνάρια.

14. Έγχυση 100 μl από το διάλυμα των total ghrelin standards και από τα διαλύματα των total ghrelin quality control 1 και 2 εις διπλούν στα αντίστοιχα σωληνάρια.
15. Έγχυση 100 μl από κάθε δείγμα εις διπλούν στα αντίστοιχα σωληνάρια τους.
16. Έγχυση 100 μl του αντισώματος της γρελίνης σε όλα τα σωληνάρια, εκτός από τα σωληνάρια 1-2 (σολ. ολικής μέτρησης) και τα σωληνάρια 3-4 (σολ. NSB).
17. Έπειτα ακολούθησε ανάδευση, κάλυψη και επώαση κατά τη διάρκεια της νύχτας (24 ώρες) στους 4⁰C.

Την δεύτερη μέρα πραγματοποιήσαμε:

18. Ενυδάτωση του ανιχνευτή ¹²⁵ I-Γρελίνης με 13,5 ml του διαλύματος ενυδάτωσης και μετά έγχυση από το διάλυμα που προέκυψε 100μl σε όλα τα σωληνάρια.
19. Ακολούθησε ανάδευση, κάλυψη των δειγμάτων και επώαση κατά τη διάρκεια της νύχτας (22- 24 ώρες) στους 4⁰C.

Την τρίτη μέρα έγιναν τα εξής βήματα:

20. Προσθήκη 1,0 ml του αντιδραστηρίου κατακρήμνισης (διατήρηση στους 4⁰C) σε όλα τα σωληνάρια εκτός των σωληναρίων 1 και 2.
21. Ανάδευση και επώαση για 20 λεπτά στους 4⁰C.
22. Φυγοκέντρωση στους 4⁰C, για 20 λεπτά στις 3000 στροφές, ώστε να προκύψει μια λεπτή πελέτα.
23. Άμεση αφαίρεση του υπερκειμένου από όλα τα φυγοκεντρημένα δείγματα εκτός από τα σωληνάρια 1 και 2 και από τα χείλη των σωληναρίων. Ακολούθησε μέτρηση της πελέτας με μετρητή γ ακτινοβολίας, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι υπολογισμοί των συγκεντρώσεων της γρελίνης.

8. Πήραμε τον μέσο όρο των μετρήσεων από τα σωληνάρια 1-2 (TCT), τα σωληνάρια 3-4 (NSB σωληνάρια) και τα σωληνάρια 5-6 (Bo) και από όλα τα σωληνάρια ελέγχου και τα υπό εξέταση δείγματα στο τέλος της δοκιμασίας.

9. Ακολουθήσε αφαίρεση του μέσου όρου των NSB μετρήσεων από κάθε μέσο όρο μέτρησης (εκτός από τις μετρήσεις των σωλ. 1 και 2).
10. Ακολουθώς : υπολογίσαμε το ποσοστό της δέσμευσης του ανιχνευτή
[M.O. συγκέντρωσης σωλ. 5 -6 (Bo)/ M.O. συγκέντρωσης σωλ. 1-2 (TCT)] χ 100.

11. Υπολογίσαμε το ποσοστό της ολικής δέσμευσης (%B/ Bo) για κάθε γνωστό (standard) και άγνωστο δείγμα. [% B/Bo= (δείγμα/ ολική δέσμευση) χ 100]
12. Καταρτίσαμε το ποσοστό %B/ Bo για κάθε γνωστό δείγμα στον άξονα ψ και τη γνωστή συγκέντρωση του γνωστού δείγματος στον άξονα χ , χρησιμοποιώντας λογαριθμικό χαρτί.
13. Κατασκευάσαμε την πρότυπη καμπύλη αναφοράς, ενώνοντας τα σημεία με μία καμπύλη γραμμή (εικόνα 2 στο παράρτημα II).
14. Καθορίσαμε σε ng/ml τη συγκέντρωση της γρελίνης στα άγνωστα δείγματα και τους ελέγχους σε αντιπαραβολή με την καμπύλη αναφοράς.

Όλες οι μετρήσεις στα νεογνά πραγματοποιήθηκαν δύο φορές, για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

1. GH (growth hormone)- Αυξητική ορμόνη
2. GHS-R (growth hormone secretagogue receptor) - Υποδοχέας των εκκριταγόνων της GH
3. GHRH (growth hormone releasing hormone) - Ορμόνη απελευθερωτική της GH
4. IGF-1 (insulin-like growth factor- 1) - Αυξητικός παράγοντας ομοιάζων με την ινσουλίνη
5. IGFBP-1 (insulin-like growth factor binding protein-1) - Πρωτεΐνη σύνδεσης του IGF-1
6. ΚΝΣ - Κεντρικό νευρικό σύστημα
7. NPY - Νευροπεπτίδιο Υ
8. AGRP (agouti - related protein) – πρωτεΐνη που σχετίζεται με το πεπτίδιο agouti
9. BMI (body mass index) – δείκτης μάζας σώματος
10. ΣΔ – σακχαρώδης διαβήτης
11. SGA (small for gestational age) νεογνά - νεογνά μικρά για την ηλικία κύησης, δηλαδή με βάρος γέννησης $< 10^{\text{η}}$ εκατοστιαία θέση για την ηλικία τους
12. AGA (appropriate for gestational age) νεογνά - νεογνά φυσιολογικά για την ηλικία κύησης, δηλαδή με βάρος γέννησης μεταξύ της $10^{\text{η}}$ και $90^{\text{ης}}$ εκατοστιαίας θέσης για την ηλικία τους
13. ΣΔΚ – σακχαρώδης διαβήτης κύησης
14. ΝΔΜ – νεογνό διαβητικής μητέρας
15. LGA (large for gestational age) – νεογνά μεγάλα για την ηλικία κύησης, δηλαδή με βάρος γέννησης $> 90^{\text{η}}$ εκατοστιαία θέση για την ηλικία τους