ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ «ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«ΕΠΙΠΕΔΑ ΓΡΕΛΙΝΗΣ ΣΕ ΒΡΕΦΗ ΣΑΚΧΑΡΟΔΙΑΒΗΤΙΚΩΝ ΜΗΤΕΡΩΝ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΡΕΛΙΝΗΣ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ»

ΕΙΡΗΝΗ ΘΑΝΟΠΟΥΛΟΥ

Α.Μ. 423408

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ
ΣΚΟΥΡΟΛΙΑΚΟΥ ΜΑΡΙΑ
ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΕΛΗ
ΣΚΟΠΟΥΛΗ ΦΩΤΕΙΝΗ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΟΛΥΧΡΟΝΟΠΟΥΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ
ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ως Υπότροφος του Κοινωφελούς Ιδρύματος «Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης», με την ολοκλήρωση του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Ειδίκευσης στην Κλινική Διατροφή, επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο Ίδρυμα για την έμπρακτη υποστήριξή του.

Θερμές ευχαριστίες επίσης στους:
Αντώνη Γαλανό
Βάια Ραρρά
Αναστάσιο Τζεράχογλου
Κατερίνα Φωτίου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ **Σελ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ **4**

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ **5**

Α. Ι. ΓΡΕΛΙΝΗ 5

Α. Ι α. Περιγραφή 5

Α. Ι β. Λειτουργίες γρελίνης - καθοριστικοί παράγοντες έκκρισης 7

Α. Ι γ. Κλινική σημασία 11

Α. ΙΙ. ΓΡΕΛΙΝΗ ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΚΑΙ ΝΕΟΓΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟ ΖΩΗΣ 13

Α. ΙΙ α. Παραγωγή της γρελίνης κατά την ενδομήτριο περίοδο ζωής 13

Α. ΙΙ β. Η γρελίνη κατά τη νεογνική περίοδο ζωής 14

Α. ΙΙ γ. Βιολογικός ρόλος της γρελίνης στην εμβρυϊκή - νεογνική ηλικία 14

Α. ΙΙΙ. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ 18

Α. IV. ΝΕΟΓΝΟ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΜΗΤΕΡΑΣ 19

Α.V. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΓΡΕΛΙΝΗΣ ΣΤΟ ΝΕΟΓΝΟ ΔΙΑΒΗΤΙΚΗΣ ΜΗΤΕΡΑΣ 21

Β. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ **24**

Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ **25**

Γ. Ι. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 25

Γ. ΙΙ ΥΛΙΚΟ 25

Γ. ΙΙ α. Πληθυσμός μελέτης - Κριτήρια αποκλεισμού 25

Γ. ΙΙ β. Λήψη αίματος 26

Γ. ΙΙΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 26

Γ. ΙΙΙ α. Υπολογισμός ανθρωπομετρικών παραμέτρων 26

Γ. ΙΙΙ β. Μέτρηση βιοχημικών παραμέτρων 27

Γ. ΙΙΙ γ. Μέτρηση μεταβολικών ορμονών 27

i. Αρχές ραδιοανοσολογικής μεθόδου 27

ii. Επιλογή μεθόδου 28

iii. Μέτρηση επιπέδων γρελίνης 29

- Χαρακτηριστικά του RIA kit της γρελίνης 29
- Περιγραφή πρωτοκόλλου 29

iv. Μέτρηση επιπέδων αντιπονεκτίνης 31

Γ. ΙΙΙ δ. Στατιστική ανάλυση 31

Γ. IV. ΗΘΙΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ 32

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 33

Δ. Ι. ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ 33

Δ. ΙΙ. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΠΡΟΩΡΩΝ ΚΑΙ ΤΕΛΕΙΟΜΗΝΩΝ ΝΕΟΓΝΩΝ 34

Δ. ΙΙ α. Ανθρωπομετρία 34

Δ. ΙΙ β. Βιοχημικές παράμετροι 35

Δ. ΙΙ γ. Επίπεδα ορμονών 35

Δ. ΙΙΙ. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΦΥΛΟ 35

Δ. IV. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΡΕΛΙΝΗΣ ΜΕ ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ 36

Δ. V. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΡΕΛΙΝΗΣ ΜΕ ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ 36

Δ. VI. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΡΕΛΙΝΗΣ ΜΕ ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗ 37

Δ. VII. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΓΡΕΛΙΝΗΣ ΜΕΤΑΞΥ $1^{ΟΥ}$ ΚΑΙ $2^{ΟΥ}$ 48ΩΡΟΥ 40

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 41

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 52

Ζ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ 57

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι – ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ 57

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ - ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ RIA ΚΙΤ ΤΗΣ ΓΡΕΛΙΝΗΣ 58

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ - ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ RIA ΚΙΤ ΤΗΣ ΑΝΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗΣ 61

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η γρελίνη, ένα φυσικό εκκριταγόνο της αυξητικής ορμόνης, παρουσιάζει κατά κύριο λόγο ορεξιογόνο δράση, ρυθμίζει την ομοιόσταση της γλυκόζης και του λιπιδαιμικού προφίλ, καθώς και την ενδοκρινική και μεταβολική απάντηση σε διάφορες καταστάσεις της ενεργειακής ισορροπίας.

Στα νεογνά, η γρελίνη έχει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη και μορφογένεσή τους και προετοιμάζει τα τελειόμηνα έμβρυα για την επιτυχή τους προσαρμογή στην εξωμήτριο ζωή. Στα νεογνά διαβητικής μητέρας (ΝΔΜ) παρατηρούνται χαμηλά επίπεδα γρελίνης που αποδίδονται στην υπερινσουλιναιμία του ενδομήτριου περιβάλλοντος. Η υπογρελιναιμία των ΝΔΜ πιθανόν αποτελεί αντιρροπιστικό μηχανισμό, ώστε η όρεξή τους να είναι αμβλυμένη, να καταστέλλεται η υπερβολική πρόσληψη τροφής και να μειώνεται η αύξηση βάρους τους μεταγεννητικά.

Σκοπός - Μεθοδολογία: Σε συνολικά 70 πρόωρα και τελειόμηνα νεογνά διαβητικής μητέρας, τα οποία γεννήθηκαν στο Μαιευτήριο «Έλενα Βενιζέλου» κατά τη διάρκεια του 2005 μετρήθηκαν τα επίπεδα της ολικής γρελίνης με ραδιοανοσολογική μέθοδο. Τα δείγματα λήφθηκαν εντός του πρώτου ή κατά το δεύτερο 24ωρο ζωής των νεογνών.

Αποτελέσματα: Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των επιπέδων γρελίνης στα πρόωρα και τα τελειόμηνα, ούτε η ύπαρξη φυλετικού διμορφισμού. Δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική συσχέτιση με τις ανθρωπομετρικές και βιοχημικές παραμέτρους, εκτός από τη σημαντική θετική συσχέτιση με την ολική χοληστερόλη, αλλά μόνο στην ομάδα των πρόωρων ($p=0,070$). Παρατηρήθηκε σημαντική θετική συσχέτιση με την λιποκυτταροκίνη αντιπονεκτίνη, στα τελειόμηνα ($p=0,002$) και το σύνολο των νεογνών ($p=0,022$). Τα επίπεδα γρελίνης αυξάνονται την πρώιμη μεταγεννητική περίοδο σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($p =0,003$).

Συμπεράσματα: Η απουσία σημαντικών συσχετίσεων με τις ανθρωπομετρικές παραμέτρους και την γλυκόζη δεν καθορίζει έναν σαφή ρόλο της γρελίνης στην ενδομήτριο ζωή. Αντίστοιχα η συσχέτισή της με την χοληστερόλη συμφωνεί με την θεωρία ότι αποτελεί κυκλοφορούντα μεταφορέα της γρελίνης. Η θετική συσχέτισή της με την αντιπονεκτίνη πιθανόν αναδεικνύει ένα μέρος των διασυνδέσεων της ρύθμισης του μεταβολισμού περιγεννητικά. Τέλος, η έκκριση της ολικής γρελίνης αυξάνεται μετά τη δεύτερη ημέρα ζωής.

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Α. Ι. ΓΡΕΛΙΝΗ

Α. Ι α. Περιγραφή

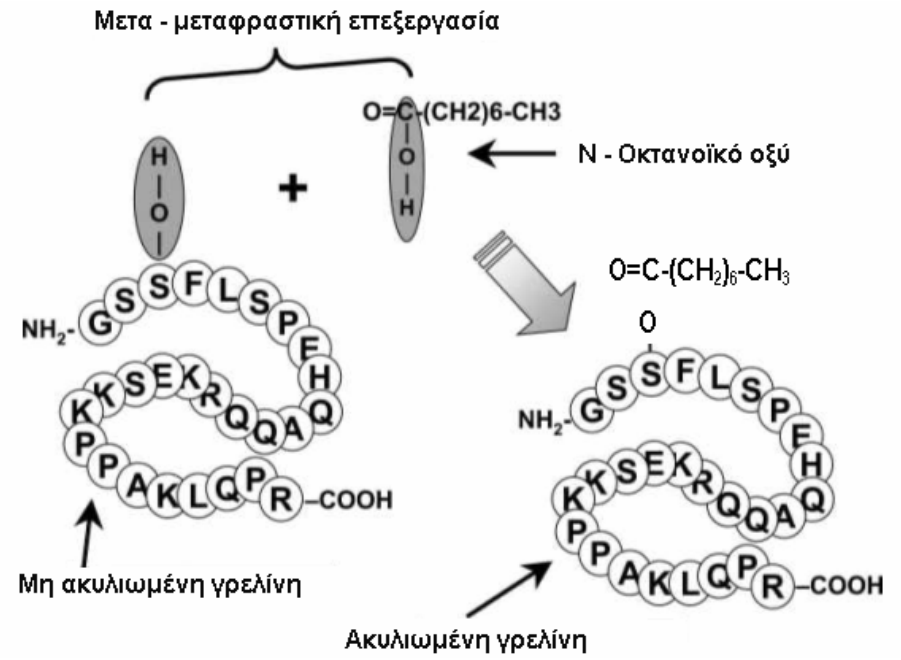
Η γρελίνη είναι μία πεπτιδική ορμόνη 28 αμινοξέων, η οποία ανακαλύφθηκε το 1999 από τους Kojima et al (1, 2, 3). Αρχικά φάνηκε ότι διεγείρει την έκλυση της αυξητικής ορμόνης (GH) από την πρόσθια υπόφυση (1,2,3), αργότερα όμως αποδείχθηκε ότι παίζει βασικό ρόλο στη μεταβολική ισορροπία και συμμετέχει στην νευροενδοκρινική και μεταβολική απάντηση στην πείνα (4).

Η γρελίνη συντίθεται αρχικώς ως πρε-προ-ορμόνη, η οποία με πρωτεολυτική επεξεργασία μετατρέπεται σε ένα πεπτίδιο 28 αμινοξέων (3,3 kDa) (5). Η σύνθεσή της λαμβάνει χώρα κυρίως στα εντεροενδοκρινικά τύπου Χ/Α κύτταρα του στομάχου και τα κατώτερα μέρη του γαστρεντερικού σωλήνα, ενώ μικρά ποσά παράγονται στον πλακούντα, τους νεφρούς, την υπόφυση, τον υποθάλαμο καθώς και στο πάγκρεας, στο οποίο τα κύτταρα της γρελίνης συνιστούν ξεχωριστό τύπο νησιδίων (1,3).

Είναι η πρώτη φυσική ορμόνη, στην οποία παρατηρήθηκε ότι πραγματοποιείται μία μετασυνθετική τροποποίηση, κατά την οποία η ομάδα υδροξυλίου μίας σερίνης της είναι ακυλιωμένη με ν-οκτανοϊκό οξύ (1,4,6). Η τροποποίηση αυτή είναι απαραίτητη για τη βιολογική δράση της **(εικόνα 1)**. Η μη ακυλιωμένη γρελίνη (μη ενεργός) επίσης παρούσα στον ορό σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από την ακυλιωμένη γρελίνη (ενεργό), φαίνεται να στερείται οποιασδήποτε ενδοκρινικής δράσης. Παρόλα αυτά, εμφανίζει ορισμένες μη ενδοκρινικές δράσεις, κυρίως καρδιαγγειακές και αντιπολλαπλασιαστικές, πιθανώς μέσω της σύνδεσής της σε διαφορετικούς υπότυπους του υποδοχέα των εκκριταγόνων της GH (GHS-R) (2,7).

Το γονίδιο της γρελίνης στον άνθρωπο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3 (θέση 3p25-26) και αποτελείται από 4 εξόνια και 3 ιντρόνια (8). Η τελική πρωτεΐνη κωδικοποιείται από τα εξόνια 1 και 2, οπότε η αντιγραφή του γονιδίου μπορεί να υποβληθεί σε εναλλακτικό μάτισμα (splicing), που οδηγεί στη παραγωγή δύο διαφορετικών ώριμων mRNAs και επομένως δύο διαφορετικών τελικών πεπτιδίων: τη γρελίνη και τη Des-Gln(14)-γρελίνη (9). Η Des-Gln14-γρελίνη είναι ομόλογη με την γρελίνη, εκτός από το ότι στερείται μιας

γλουταμίνης (πεπτίδιο 27 αμινοξέων) και παρουσιάζει τις ίδιες ορμονικές δράσεις με την γρελίνη (1, 9, 10).



Εικόνα 1. Η γρελίνη είναι το μόνο γνωστό φυσικό πεπτίδιο, στην οποία η ακυλίωση σε ένα από τα αμινοξέα της απαιτείται για την πλειονότητα των βιολογικών της δραστηριοτήτων. Υπό την επίδραση μίας μη γνωστής ακυλοτρανσφεράσης, οκτανυλιοποιείται η ομάδα υδροξυλίου της σερίνης στη θέση 3 στο μόριο της. Αυτή η μετά-μεταφραστική τροποποίηση της γρελίνης είναι απαραίτητη για την δράση της στον ενδοκρινικό άξονα, την ενεργειακή ισορροπία και την ομοιόσταση στη γλυκόζη.

Τα επίπεδα γρελίνης πλάσματος στους ανθρώπους κυμαίνονται στα 117 ± 37 nmol/ml (8). Η ενεργός γρελίνη δεν παρουσιάζει σταθερή αναλογία με την ολική γρελίνη, στους ενήλικες δε αυτός ο λόγος είναι 4:1 (8). Τα αποτελέσματα κατά τις μετρήσεις της είναι ετερογενή λόγω του τρόπου έκκρισής της κατά ώσεις και της δράσης της στην οξεία και τη χρόνια ρύθμιση της πρόσληψης τροφής και του μεταβολισμού (9,10).

Η έκκριση της γρελίνης παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις κατά τη διάρκεια της ημέρας, με τις υψηλότερες τιμές προ των γευμάτων (4,11). Στους ενήλικες, η γρελίνη διπλασιάζεται πριν από ένα γεύμα και μειώνεται στη βασική συγκέντρωση περίπου μία ώρα μετά τη λήψη του γεύματος (4,11). Παρά τις διακυμάνσεις των επιπέδων της κατά τη διάρκεια της ημέρας, η συνολική έκκριση της γρελίνης στο 24ωρο συσχετίζεται σημαντικά με τα επίπεδα γρελίνης που λαμβάνονται στη βασική κατάσταση, δηλαδή πριν από το

πρόγευμα (10, 12). Επίσης, η έκκριση της γρελίνης μειώνεται αυξανόμενης της ηλικίας και η μεγαλύτερη μείωση πραγματοποιείται κατά την παιδική ηλικία (13,14), ενώ παρουσιάζει φυλετικό διμορφισμό στους ενήλικες, κατά τον οποίον οι γυναίκες παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τους άνδρες (15,16).

Ο υποδοχέας της γρελίνης (GHS-R) ήταν γνωστός προτού ανακαλυφθεί το πεπτίδιο της (1,17,18). Το γεγονός αυτό αποτελεί ένα κλασικό παράδειγμα «αντίστροφης φαρμακολογίας», δηλαδή πριν ανακαλυφθεί η γρελίνη, είχαν προηγηθεί η σύνθεση των αναλόγων της και η ανακάλυψη του φυσικού υποδοχέα της (1,17,18). Οι GHS-R είναι παρόντες στην πρόσθια υπόφυση, τον υποθάλαμο, την καρδιά, και το λιπώδη ιστό (1,19).

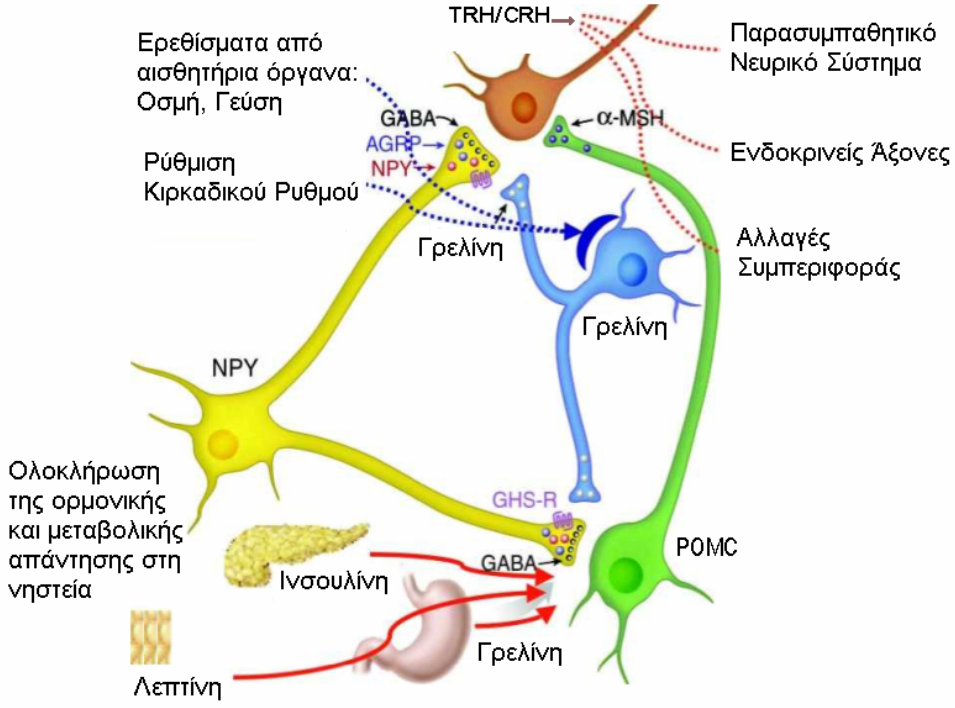
Α. Ι β. Λειτουργίες - Καθοριστικοί παράγοντες έκκρισης

Η ανακάλυψη της γρελίνης συνέβαλε σε σημαντικό βαθμό στην κατανόηση της ρύθμισης της έκκρισης της GH. Η γρελίνη ενεργοποιεί τους GHS-R στην υπόφυση και τους υποθαλαμικούς νευρώνες που περιέχουν την GHRH (ορμόνη απελευθερωτική της GH), με επακόλουθο την απελευθέρωση της GH (20,21).

Η μείωση της γρελίνης κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας αποδεικνύει ότι δεν έχει άμεση αυξητική δράση ως ορμόνη (22). Εντούτοις, λαμβάνοντας υπόψη την αρνητική σχέση της γρελίνης με τον IGF-1 (αυξητικός παράγοντας ομοιάζων με την ινσουλίνη) και τη θετική σχέση της με την IGFBP-1 (πρωτεΐνη σύνδεσης του IGF-1), αυτή η μείωση των επιπέδων της διευκολύνει τελικά την επιτάχυνση της αύξησης στην περίοδο της παιδικής ηλικίας (13,14).

Η γρελίνη δεν είναι μόνο ένας φυσικός διεγέρτης της έκκρισης της GH, αφού η έκκρισή της γίνεται κατά ώσεις και σχετίζεται πολύ περισσότερο με την λήψη γεύματος (23). Η ενδοφλέβια χορήγηση γρελίνης προκαλεί το αίσθημα της πείνας (21,24), αυξάνει την πρόσληψη τροφής στους ανθρώπους (22,25) και συμμετέχει στη ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης (11). Πιθανόν απεικονίζει την οξεία κατάσταση της ενεργειακής ισορροπίας στον οργανισμό, δηλαδή σε περιόδους στέρησης τροφής η γρελίνη δίνει σήμα στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), προκειμένου να αυξηθεί η πρόσληψη ενέργειας (26). Είναι η πρώτη ορμόνη που δίνει το σήμα για την έναρξη λήψης τροφής και η μόνη που εκκρίνεται από το στόμαχο (26). Η επίδραση είναι δοσο-εξαρτώμενη και πιο έντονη μετά από κεντρική, παρά από περιφερική χορήγηση (4).

Ο συνεχώς αυξανόμενος όγκος ερευνητικών ευρημάτων, αποκάλυψε μηχανισμούς διασύνδεσης για τη ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας στο ΚΝΣ, στους οποίους συμμετέχει η γρελίνη **(εικόνα 2).** Δύο μονοπάτια στον τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου είναι οι κυρίαρχοι μεσολαβητές της δράσης της γρελίνης (27). Το ένα περιλαμβάνει τους νευρώνες του νευροπεπτιδίου Y (NPY) (28) και το άλλο τους υποδοχείς της μελανοκορτίνης με τους αγωνιστές και ανταγωνιστές της, όπως το ανορεξιογόνο aMSH και το ορεξιογόνο AGRP (πρωτεΐνη που σχετίζεται με το πεπτίδιο agouti) (29). Η γρελίνη αυξάνει την έκκριση των NPY και AGRP (27,30). Το NPY που απελευθερώνεται, συνδέεται με τους υποθαλαμικούς υποδοχείς NPY-Y1 και NPY-Y5, με αποτέλεσμα την διέγερση του αισθήματος της πείνας (28). Ταυτόχρονα απελευθερώνεται το πεπτίδιο AGRP που ανταγωνίζεται τον υποδοχέα της μελανοκορτίνης-4, με αποτέλεσμα την καταστολή του ανορεξιογόνου aMSH (30). Φαίνεται ότι το NPY είναι σημαντικότερο για τις οξείες δράσεις της γρελίνης, ενώ το AGRP συμμετέχει τόσο στην οξεία όσο και την χρόνια δράση της γρελίνης στον υποθάλαμο (4,27,30).



Εικόνα 2. Η γρελίνη συμμετέχει ενεργά στο πολύπλοκο νευροενδοκρινικό δίκτυο που ρυθμίζει την ενεργειακή ισορροπία με τουλάχιστον δύο μηχανισμούς: 1) ως περιφερική ορμόνη που ξεκινώντας από τον στόμαχο ενημερώνει τον κεντρικό μηχανισμό ρύθμισης της ενεργειακής ισορροπίας ότι μειώνονται οι ενεργειακές αποθήκες και 2) ως υποθαλαμικό νευροπεπτίδιο που εκφράζεται σε ορισμένους πληθυσμούς νευρώνων στην περιοχή του υποθαλάμου.

Η ρύθμιση της έκκρισης της γρελίνης είναι κυρίως μεταβολική (4). Στους ανθρώπους η έκφραση του mRNA της γρελίνης επάγεται από την υπογλυκαιμία που προκαλείται από την ινσουλίνη και τη λεπτίνη (31). Η γρελίνη οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης είτε με αναστολή της ανασταλτικής επίδρασης της ινσουλίνης στη γλυκονεογένεση, είτε με άμεση διεγερτική επίδραση στη γλυκογονόλυση (4). Από την άλλη πλευρά, η έκκριση της γρελίνης καταστέλλεται εν μέρει, από τη λήψη γλυκόζης (32). Προφανώς υπάρχει ανασταλτική επίδραση της γλυκόζης και της θερμιδικής πρόσληψης στα κύτταρα της γρελίνης (32,33,34).

Σχετικά με την επίδραση της γρελίνης στην ινσουλίνη, φαίνεται ότι ασκεί τονική ανασταλτική δράση στην έκκριση της από τα β-κύτταρα (3). Έχει βρεθεί σαφής αρνητική σχέση μεταξύ γρελίνης και ινσουλίνης στην πλειονότητα των μελετών (3,10,35), όχι όμως σε όλες (4). Σε συνδυασμό με την παρατήρηση ότι η θεραπεία με γρελίνη προκαλεί υπεργλυκαιμία και ινσουλινοαντίσταση σε παχύσαρκους ασθενείς (36), φαίνεται ότι η γρελίνη επιδρά κυρίως στην έκκριση της ινσουλίνης και εμμέσως στο μεταβολισμό της γλυκόζης. Πιθανόν, η γρελίνη ολοκληρώνει την ορμονική και μεταβολική απάντηση στη νηστεία, συνδυάζοντας την αναστολή της έκκρισης ινσουλίνης και την ενεργοποίηση μηχανισμών που διατηρούν τα επίπεδα γλυκόζης εντός των φυσιολογικών ορίων (4).

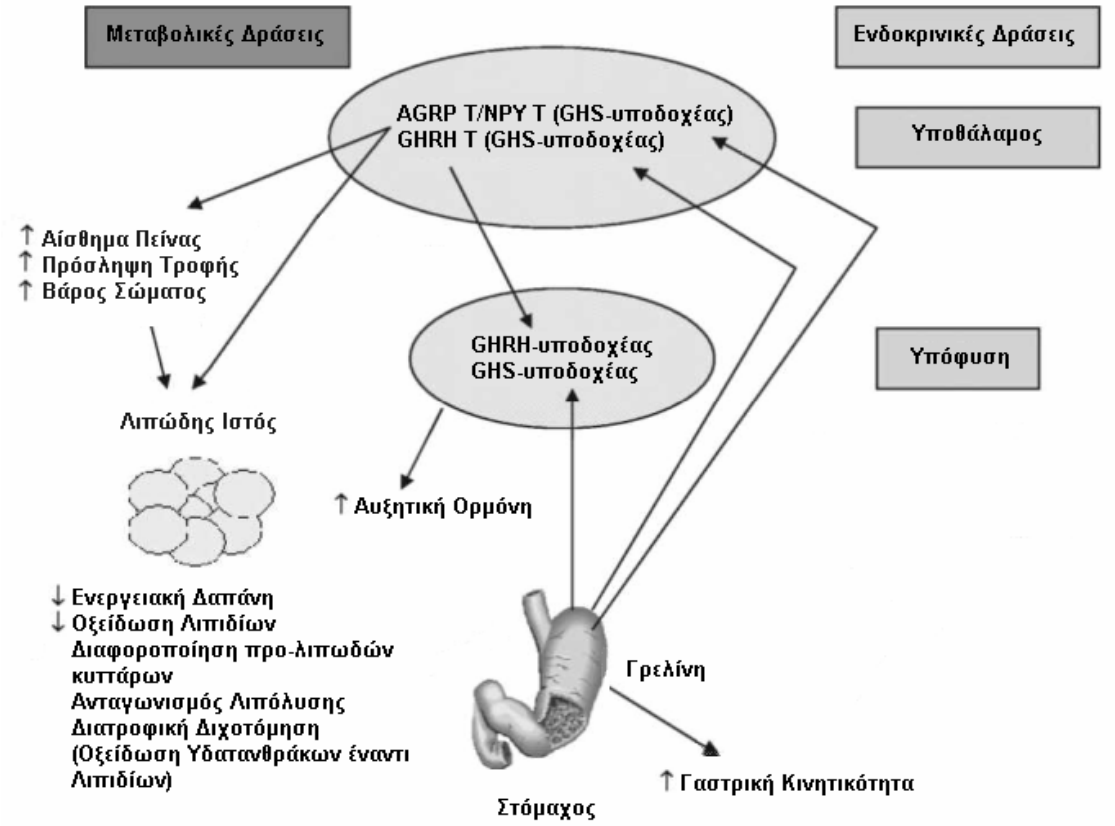
Η αρνητική επίδραση της υπερέκκρισης ινσουλίνης στα επίπεδα γρελίνης συμφωνεί με την αρνητική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων γρελίνης και BMI (37) καθώς και με τη βελτίωση της ινσουλινοαντίστασης με συνοδό μείωση του σωματικού βάρους που προκαλεί η χορήγηση ανταγωνιστών της γρελίνης (38). Η υπερινσουλιναιμία προκαλεί δηλαδή υπογρελιναιμία, όπως παρατηρήθηκε σε υγιείς εθελοντές κατά τη διάρκεια υπερινσουλιναιμικού - ευγλυκαιμικού clamp (34,35), ιδιαίτερα δε σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη (ΣΔ) τύπου 2 (36). Σημειώνεται όμως ότι η κατασταλτική δράση της υπερινσουλιναιμίας στα επίπεδα γρελίνης παρατηρείται μετά από παρατεταμένη χορήγηση ινσουλίνης (35) και όχι μετά από χορήγησή της με υποδόριες ενέσεις (39). Ως εκ τούτου, οι εμμένουσες χαμηλές συγκεντρώσεις της γρελίνης στα παιδιά που παρουσιάζουν ΣΔ τύπου 1 υπό συνεχή ινσουλινοθεραπεία, πιθανόν να αποτελούν αμυντικό μηχανισμό ενάντια στην υπεργλυκαιμία (πιθανόν μέσω της άμβλυνσης της πείνας) και ταυτόχρονα μηχανισμό καταστολής της τάσης για παθολογική αύξηση του σωματικού βάρους (40,41).

Η γρελίνη προκαλεί αύξηση του λιπώδους ιστού με διάφορους μηχανισμούς, εκτός από την διέγερση της πρόσληψης τροφής (42): προκαλεί μείωση της ενεργειακής δαπάνης, μείωση της κυτταρικής οξείδωσης των λιπιδίων (43), ενώ in vitro διεγείρει τη διαφοροποίηση των προ-λιπωδών κυττάρων και ανταγωνίζεται τη λιπόλυση (44). Επιπλέον με έμμεση θερμιδομετρία παρατηρήθηκε εντυπωσιακή αύξηση του αναπνευστικού πηλίκου μετά από χορήγηση γρελίνης, ανεξάρτητα από την αύξηση της λήψης τροφής (42). Αυτό το φαινόμενο χαρακτηρίζεται ως μετατόπιση από την καύση των λιπιδίων, στην οξείδωση των υδατανθράκων και έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως «διατροφική διχοτόμηση» (45).

Η κυκλοφορούσα γρελίνη επηρεάζεται από τη κατανομή του λίπους στο σώμα (44). Σε περιπτώσεις στις οποίες παρατηρείται τυπικά αρνητική ενεργειακή ισορροπία, όπως οι ολιγοθερμιδικές δίαιτες, η ανορεξία του καρκίνου και η νευρογενής ανορεξία οι συγκεντρώσεις της γρελίνης είναι αυξημένες (46). Αντίθετα, η συγκέντρωση της γρελίνης μειώνεται σε καταστάσεις που σχετίζονται με αυξημένη πρόσληψη θερμίδων (παχυσαρκία) (46). Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε η αντίσταση στην ινσουλίνη και η υπερινσουλιναιμία σχετίζονται αντιστρόφως με τη γρελίνη, αλλά στους παχύσαρκους μειώνουν λιγότερο τα επίπεδα γρελίνης, σε σχέση με τους φυσιολογικούς ενήλικες (47). Πιθανόν οι παρατηρήσεις αυτές σκιαγραφούν μέρος ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης, με τον οποίο ρυθμίζεται το βάρος σώματος στους ανθρώπους (48). Η συγκέντρωση της γρελίνης στην περίπτωση που πραγματοποιείται διαιτητική παρέμβαση στην παχυσαρκία και τη νευρογενή ανορεξία μεταβάλλεται προς την αντίθετη κατεύθυνση, πχ αυξάνεται στους παχύσαρκους που αρχίζουν να αδυνατίζουν. Επομένως η γρελίνη είναι ένας καλός δείκτης της θρεπτικής κατάστασης του ατόμου (49).

Παράλληλα, η διέγερση της γαστρικής κινητικότητας και η αύξηση της γαστρικής κένωσης που επάγονται από τη γρελίνη, μπορεί να οφείλονται σε τοπική - παρακρινική δράση της, στα πλαίσια της συνολικής επίδρασης της γρελίνης στο μεταβολισμό (4).

Οι δράσεις της γρελίνης συνοψίζονται στην **εικόνα 3**.



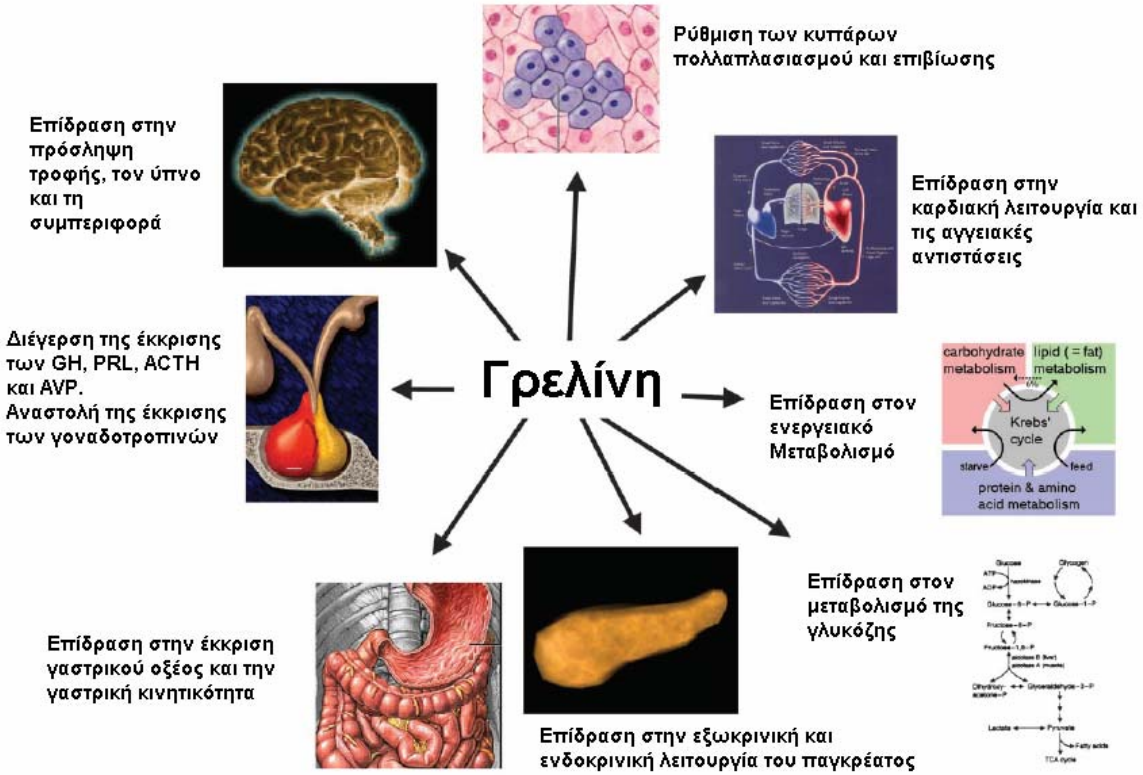
Εικόνα 3. Δράσεις της γρελίνης

Α. Ι γ. Κλινική σημασία (εικόνα 4)

Η γρελίνη έχει βιολογικώς συντηρηθεί πολύ καλά (4). Φαίνεται ότι αντιπροσωπεύει έναν κρίσιμο ενδοκρινικό κρίκο, που συνδέει τις φυσιολογικές διαδικασίες που ρυθμίζουν τη διατροφή, τη σύνθεση του σώματος και την αύξηση (4,50). Πιστεύεται ότι εξασφαλίζει τα απαραίτητα ποσά ενέργειας για την GH προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για τη διαδικασία της αύξησης και την αναδόμηση των ιστών (50).

Πιθανόν, η γρελίνη επικράτησε μέσω της εξελικτικής διαδικασίας επειδή προάγει την επιβίωση σε περιόδους μειωμένου θερμιδικού ανεφοδιασμού αφού αυξάνει την πρόσληψη τροφής (44), μειώνει την οξείδωση του λίπους (43) και καταστέλλει τη βασική θερμοκρασία του σώματος (4). Το γεγονός ότι η κυκλοφορούσα γρελίνη είναι σημαντικά αυξημένη σε παθολογικές καταστάσεις που παρουσιάζουν χαμηλό ποσοστό σωματικού λίπους όπως η καχεξία του καρκίνου (56) και η νευρογενής ανορεξία (35), υποδεικνύει την ύπαρξη συνδρόμου αντίστασης στη γρελίνη (56,35).

Η γρελίνη παρουσιάζει μία πλειάδα μη ενδοκρινικών λειτουργιών όπως καρδιοπροστατευτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντινεοπλασματικές (4). Επίσης χρησιμοποιείται ως διαγνωστικό και θεραπευτικό μέσο στην ανεπάρκεια της GH και λειτουργεί ως δείκτης παρακολούθησης νόσου σε νευροενδοκρινικούς όγκους (4). Τέλος, αποτελεί ελπιδοφόρο υποψήφια για τη αντιμετώπιση καταβολικών καταστάσεων, όπως η καχεξία και το AIDS (4,51) και για την αντιμετώπιση διατροφικών διαταραχών, όπως η νευρογενής ανορεξία και η παχυσαρκία (4,5,46).



Εικόνα 4. Κλινική σημασία γρελίνης

Α. ΙΙ ΓΡΕΛΙΝΗ ΣΤΗΝ ΕΜΒΡΥΪΚΗ ΚΑΙ ΝΕΟΓΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΔΟ ΖΩΗΣ

Α. ΙΙ α. Παραγωγή της γρελίνης κατά την ενδομήτρια περίοδο ζωής

Η γρελίνη κατά την ενδομήτρια περίοδο ζωής παράγεται τόσο από το μητρικό διαμέρισμα (τον πλακούντα), όσο και από τους αναπτυσσόμενους εμβρυϊκούς ιστούς. Η ανακάλυψη ότι το mRNA και το πεπτίδιο της γρελίνης εκφράζονται στον πλακούντα, τον ανέδειξε πηγή παραγωγής γρελίνης στην εμβρυϊκή κυκλοφορία (52). Η γρελίνη που προέρχεται από τον πλακούντα ρυθμίζει την μεταφορά ενέργειας από τη μητέρα στο έμβρυο (53). Η έκκρισή της από τον πλακούντα κορυφώνεται στο πρώτο ήμισυ της εγκυμοσύνης και είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμη το τελευταίο τρίμηνο της κύησης (52).

Κατά τη διάρκεια του τρίτου τριμήνου της κύησης αποδείχθηκε ότι η γρελίνη παράγεται κυρίως από διάφορους εμβρυϊκούς ιστούς και ότι η παραγωγή και έκκρισή της αυξάνει σταδιακά (54). Πράγματι, τα επίπεδα γρελίνης στα νεογέννητα είναι υψηλότερα από τα αντίστοιχα των μητέρων τους (55). Ανοσοϊστοχημικές μελέτες σε ιστούς ανθρώπινων εμβρύων απέδειξαν την ύπαρξη κύτταρων γρελίνης στο πάγκρεας (3), το στόμαχο (56) και τον πνεύμονα από την $10^{η}$ εβδομάδα της κύησης (57).

Σχετικά με το εμβρυϊκό πάγκρεας, αποδείχθηκε ότι αποτελεί πλούσια πηγή παραγωγής γρελίνης (3,58). Όντως, τα κύτταρα γρελίνης αποτελούν το 10% περίπου των νησιδίων του εμβρυϊκού παγκρέατος, ενώ στους ενήλικες τα κύτταρα γρελίνης αποτελούν μόνο το 1% των νησιδίων (3). Αντίστοιχα, ο εμβρυϊκός στόμαχος παράγει σημαντικές ποσότητες γρελίνης κυρίως κατά την όψιμη εγκυμοσύνη και μάλιστα ο αριθμός των κυττάρων γρελίνης του εμβρυϊκού στομάχου συσχετίζεται θετικά με την αύξηση του στομάχου ενδομητρίως (56).

Ο αναπτυσσόμενος πνεύμονας είναι μια άλλη κύρια πηγή παραγωγής γρελίνης. Τα ενδοκρινικά κύτταρα του βρογχικού δένδρου εκφράζουν έντονα τη γρελίνη και τον GHS-R (57). Η ύπαρξη GHS-R επιβεβαιώνει την παρουσία ενεργών αλληλεπιδράσεων μεταξύ γρελίνης και υποδοχέα, κατά τη φάση ανάπτυξης των εμβρυϊκών οργάνων (57).

Α. ΙΙ β. Η γρελίνη κατά τη νεογνική περίοδο ζωής

Τα δεδομένα για τη δράση της γρελίνης στη νεογνική περίοδο ζωής είναι διάσπαρτα. Τα επίπεδα ολικής γρελίνης κατά την περίοδο αυτή, παρουσιάζουν μεγάλη διακύμανση (εύρος: 450 - 2.043 ng/ml) (59,60), γεγονός που εν μέρει μπορεί να οφείλεται στις διαφορετικές μεθόδους ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται. Η ολική γρελίνη είναι παρούσα στο νεογνικό αίμα σε διπλάσια περίπου συγκέντρωση σε σχέση με τον φυσιολογικό ενήλικα (16,17).

Στα νεογνά, η συγκέντρωση γρελίνης στο αίμα τους είναι σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με αυτή του ομφάλιου λώρου (53). Η διαδοχική ανάλυση των επιπέδων γρελίνης ανά μέρα επιβεβαίωσε ότι τα επίπεδα της αυξάνονται σταδιακά και σε σημαντικό βαθμό κατά τη διάρκεια της πρώιμης νεογνικής περιόδου (53).

Έχει αποδειχθεί θετικός συσχετισμός ηλικίας κύησης με την ενεργό γρελίνη και την αναλογία ενεργός/ολική γρελίνη (A/T) (61). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να οφείλεται στην σταδιακή ωρίμανση του συστήματος ν-οκτανυλίωσης ή στη πρώιμη αποσύνθεση της ενεργούς γρελίνης (60). Η συγκέντρωση της ενεργούς γρελίνης στα νεογέννητα αποτελεί περίπου το 18% της ολικής κυκλοφορούσας γρελίνης (62), ποσοστό πολύ υψηλότερο συγκριτικά με το 6-8% που έχει υπολογιστεί σε ενήλικες (43). Το υψηλό αυτό ποσοστό μπορεί να είναι ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του νεογέννητου, πιθανόν οφειλόμενο στην απουσία γαστρικής διέγερσης ενδομητρίως. Προφανώς, με αυτόν τον τρόπο πραγματοποιούνται οι αναβολικές δράσεις της γρελίνης στο νεογέννητο, αφού η ενεργός γρελίνη είναι αυτή που συνδέεται σε τον GHS-R τύπου 1a (60).

Α. ΙΙ γ. Βιολογικός ρόλος της γρελίνης στην εμβρυϊκή - νεογνική ηλικία

Η γρελίνη έχει τροφικό και μορφογενετικό ρόλο, όπως φαίνεται από την πρώιμη παραγωγή της κατά την κύηση ($10^{η}$ εβδομάδα) και τη διαδεδομένη κατανομή των κυττάρων της στους εμβρυϊκούς ιστούς (3,59,61). Η δράση της εξαρτάται από την υποκατηγορία των υποδοχέων που εκφράζονται στον κάθε ιστό (3,59,61). Η γρελίνη προάγει τοπικώς την ανάπτυξη και ωρίμανση των κυττάρων και ίσως μέσω ορμονικής δράσης προάγει την ανάπτυξη ιστών σε απομακρυσμένες περιοχές (57). Ο μεταβολικός και ενδοκρινικός ρόλος της γρελίνης επιβεβαιώνεται από την συνεχώς αυξανόμενη έκφραση

των GHS- R1a στους ενδοκρινικούς ιστούς, όπως ο υποθάλαμος και η υπόφυση, ειδικά κατά την μεταγεννητική περίοδο ζωής (19).

Ο ιδιαίτερος τρόπος της έκκρισης της γρελίνης, που αυξάνεται μέχρι τη στιγμή της γέννησης πιθανόν να οφείλεται στο ότι απαιτείται για λόγους αύξησης (58). Αν και η γρελίνη είναι φυσικός προσδέτης των GHS-R και παρουσιάζει ισχυρή έκλυση της GH (1,24), στη βιβλιογραφία δεν έχει αναφερθεί σημαντική συσχέτιση μεταξύ γρελίνης και GH σε νεογνά, ούτε σαφής ρόλος της γρελίνης στο ρυθμιστικό σύστημα της GH κατά την περιγεννητική ζωή (15,58,60,62,63,64,65,66).

Από την άλλη πλευρά η γρελίνη συσχετίζεται αρνητικά με τον IGF-1, έναν από τους καθοριστικούς παράγοντες της αύξησης (67) και θετικά με τις πρωτεΐνες σύνδεσης του κατά την εμβρυϊκή (IGFBP-1) και μεταγεννητική (IGFBP-3) περίοδο ζωής (67). Οι συσχετίσεις αυτές επιβεβαιώνουν την ύπαρξη μηχανισμού μεταφοράς ενέργειας από τη μητέρα στο έμβρυο και την έλλειψη συμμετοχής της γρελίνης στον εμβρυϊκό άξονα GH/IGF-1 (56,63). Προφανώς δεν υπάρχει λειτουργική σύνδεση μεταξύ της γρελίνης και της σωματοτρόφου λειτουργίας (68).

Η γρελίνη κατέχει ενεργό φυσιολογικό ρόλο στη ρύθμιση της αύξησης και του μεταβολισμού μετά την 37^{η} εβδομάδα κύησης και προετοιμάζει τα τελειόμηνα έμβρυα για την επιτυχή προσαρμογή τους στην εξωμήτρια ζωή. Η γρελίνη διεγείρει το αίσθημα της όρεξης (26), προκαλεί εναπόθεση λίπους, μέσω διέγερσης της λιπογένεσης (42) και διατηρεί ένα επαρκές επίπεδο γλυκόζης αίματος (4) στην πλέον κρίσιμη περίοδο, όταν οι αποθήκες τροφής και ενέργειας από τη μητέρα διακόπτονται απότομα μετά από τη γέννηση (55,63).

Στα φυσιολογικά νεογνά η κυκλοφορούσα γρελίνη αυξάνεται προοδευτικά κατά τη μεταγεννητική περίοδο (24,69), ειδικά τις πέντε πρώτες μέρες της ζωής (69), προκειμένου να δοθεί ροπή προς θετική ενεργειακή ισορροπία (53). Η ύπαρξη μεταγεννητικά χαμηλών επιπέδων γρελίνης σε υγιή τελειόμηνα νεογνά, συσχετίζεται με αργή αύξηση του σωματικού τους βάρους, τους τρεις πρώτους μήνες ζωής (66). Η υπογρελιναιμία οδηγεί σε μειωμένο αίσθημα όρεξης, με αποτέλεσμα τη μειωμένη λήψη τροφής. Πρόκειται δηλαδή για αναβολική ορμόνη (53).

Επιπλέον, η γρελίνη συμμετέχει άμεσα στην περιφερική ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης και του μεταβολισμού της γλυκόζης που απαιτούνται για τη ρύθμιση του

μεταβολισμού (55,70). Παρατηρούνται υψηλές συγκεντρώσεις γρελίνης στα νεογνά πριν από τη λήψη οποιασδήποτε τροφής. Φαίνεται ότι η γρελίνη αποτελεί το σήμα που οδηγεί στην έναρξη της λήψης τροφής από το νεογέννητο. Ταυτόχρονα μέσω του μηχανισμού αυτού, το νεογνό προστατεύεται από την νεογνική υπογλυκαιμία (64).

Στην περιγεννητική περίοδο παρατηρείται ότι η σίτιση δεν ασκεί ανασταλτική επίδραση στα κυκλοφορούντα επίπεδα της γρελίνης (69), όπως συμβαίνει στους ενήλικες, στους οποίους η πρόσληψη τροφής εμποδίζει την πρωινή έκκριση γρελίνης (36,46). Αυτή η «αντίσταση» της γρελίνης στην πρόσληψη τροφής που παρατηρείται από τη γέννηση έως την παιδική ηλικία, έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της ορμόνης αυτής σε υψηλά επίπεδα, που συνεπάγεται τη μετατόπιση του μεταβολισμού προς την αναβολική κατεύθυνση. Παρόλα αυτά, παρατηρείται ότι η έκκριση γρελίνης στα νεογνά όπως και στα παιδιά, είναι ευαίσθητη στην ανασταλτική επίδραση που έχει η χορήγηση γλυκόζης, παρά την παρατηρούμενη αντίσταση στη πρόσληψη τροφής (17,46,68).

Είναι γνωστό όμως ότι οι πρώτες ημέρες της ζωής χαρακτηρίζονται από μια φυσιολογική μείωση του σωματικού βάρους που φθάνει στο ναδίρ την $4^{η}$ ημέρα ζωής (69). Αυτή η μείωση βάρους πιθανόν διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διέγερση της έκκρισης της γρελίνης και θα μπορούσε να συμμετέχει στην αντίσταση της γρελίνης στη σίτιση, όπως στη νευρογενή ανορεξία (46). Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις γρελίνης ομφάλιου λώρου στα νεογνά δεν συσχετίζονται με την επί τοις εκατό απώλεια βάρους έως και την $5^{η}$ ημέρα ζωής (53), ενώ έχει αποδειχθεί ότι την $5^{η}$ ημέρα ζωής, τα κυκλοφορούντα επίπεδα γρελίνης παρουσιάζουν αντίστροφη σχέση με τις ανθρωπομετρικές παραμέτρους (53,69). Από τα παραπάνω συνεπάγεται ότι οι μηχανισμοί δράσης της γρελίνης σταθεροποιούνται περίπου την πρώτη εβδομάδα της ζωής.

Σε συμφωνία με τον αναβολικό ρόλο της γρελίνης είναι και η διαπίστωση ότι σε SGA νεογνά (νεογνά μικρά για την ηλικία κύησης), κυκλοφορούν σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γρελίνης, σε σχέση με τα AGA νεογνά (φυσιολογικά για την ηλικία κύησης) (62,65,71). Οι υψηλές συγκεντρώσεις γρελίνης στα SGA νεογνά συσχετίζονται με την ταχύτερη αύξησή τους κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους ζωής (62). Στα νεογνά αυτά εκτός από την προγευματική αύξηση των επιπέδων της γρελίνης, παρατηρείται και μειωμένη καταστολή των επιπέδων αυτών κατά τον μεταγευματικό κορεσμό (71). Τα υψηλότερα μεταγευματικά επίπεδα γρελίνης στα SGA νεογνά οδηγούν σε διαρκή

ορεξιογόνο τάση, με τελικό αποτέλεσμα την μεταγεννητική αντισταθμιστική αύξηση βάρους (catch-up growth) που τα χαρακτηρίζει (71).

Η γρελίνη επιδρά θετικά στον κεντρικό μηχανισμό της όρεξης και έχει αποδειχθεί ότι έχει αντίθετη δράση από την λεπτίνη, η οποία καταστέλλει την όρεξη και διεγείρει την κατανάλωση ενέργειας (1). Ουσιαστικά οι δύο ορμόνες ολοκληρώνουν την ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ του αισθήματος της πείνας και του κορεσμού (14) και την ενεργειακή ομοιόσταση (1,14). Αρχικά παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα της λεπτίνης μειώνονται γρήγορα κατά την πρώιμη μεταγεννητική περίοδο (72), ενώ ταυτόχρονα τα επίπεδα της γρελίνης αυξάνονται προοδευτικά (56,79), γεγονός που θεωρήθηκε ότι θέτει το κέντρο της όρεξης σε συνεχή διέγερση με αποτέλεσμα το θετικό ενεργειακό ισοζύγιο (56).

Παρόλα αυτά στις περισσότερες μελέτες δεν αποδείχθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των δύο ορμονών ούτε στον ομφάλιο λώρο (15,58,62,63,73) ούτε στο νεογνικό αίμα (56,63). Δηλαδή παρά την εμφανή αλληλεπίδραση τους στο ΚΝΣ, δεν παρουσιάζουν τις ίδιες μεταβολικές δράσεις (58) και δεν συνδέονται με άμεση λειτουργική ανατροφοδότηση στη νεογνική ηλικία (74). Ίσως, επειδή το έμβρυο για την κάλυψη των ενεργειακών του αναγκών δεν προσλαμβάνει τροφή από το στόμα, ώστε να υπάρχει επαρκής διέγερση της έκκρισης γρελίνης από το στόμαχο, δεν παράγεται ικανή ποσότητα γρελίνης που να παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργειακή ισορροπία περιγεννητικά (60). Εκτός αυτού, έχει αποδειχθεί ότι η λεπτίνη είναι η πλέον σταθερή μεταβολική ορμόνη κατά την περιγεννητική περίοδο, κάτι που δεν ισχύει και για τη γρελίνη (72).

Η γρελίνη στα πρόωρα νεογνά, συμπεριφέρεται διαφορετικά από τις λιπο-κυτταροκίνες λεπτίνη και ρεσιστίνη (75), καθώς οι συγκεντρώσεις της κυκλοφορούσας ολικής γρελίνης δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τελειόμηνων και πρόωρων νεογνών και δεν φαίνεται να υπάρχει καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ γρελίνης και ηλικίας κύησης (16,54,60,65,73). Μάλιστα, παρατηρείται μεγάλη διασπορά των τιμών σε όλες τις ηλικίες κυήσεις (60).

Τέλος, σε έμβρυα με ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης παρατηρούνται υψηλά επίπεδα γρελίνης. Το φαινόμενο αυτό υποδεικνύει ότι η γρελίνη παίζει ρόλο στην προσαρμογή του εμβρύου σε δυσμενές ενδομήτριο περιβάλλον, είτε αποτελώντας «σήμα πείνας», είτε διεγείροντας τον υποθαλαμικό - υποφυσιακό - επινεφριδιακό άξονα, ώστε να αντεπεξέλθει το έμβρυο στο στρες (54).

Α. ΙΙΙ. Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (ΣΔΚ)

Ως σακχαρώδης διαβήτης κύησης χαρακτηρίζεται η διαταραχή στην ομοιόσταση της γλυκόζης, η οποία εμφανίζεται κατά την 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 (76,77,78). 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 (78).

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 (76,78). Μετά από τον τοκετό η ινσουλινοαντίσταση εξαφανίζεται, καθώς οι ορμόνες του πλακούντα (προγεστερόνη, πλακουντιακό γαλακτογόνο και προλακτίνη) είναι από τους κύριους παράγοντες εμφάνισης ΣΔΚ (76,77,78). Έχει παρατηρηθεί επίσης μείωση της ευαισθησίας των ιστών στην ινσουλίνη κατά την 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 (76,78).

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 (76,77,78). 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 (76,77).

Α. IV. Νεογνό Διαβητικής Μητέρας (ΝΔΜ)



Εικόνα 5. 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 5**. Σήμερα υπολογίζεται ότι 4 στα 1.000 νεογνά γεννιούνται από διαβητικές μητέρες και 6 στα 1.000 από μητέρες που έχουν ΣΔΚ. 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 (79).

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 1**.

Πίνακας 1. Επιπλοκές ΝΔΜ

Μακροσωμία
Ενδομήτρια δυστροφία
Υπογλυκαιμία
Υπασβεστιαιμία
Υπομαγνησιαιμία
Περιγεννητική ασφυξία
Πολυερυθραιμία – Υπεργλοιότητα
Κακώσεις λόγω δυστοκίας
Υπερχολερυθριναιμία
Υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια

Τα ΝΔΜ είναι συνήθως LGA νεογνά (μεγάλα για την ηλικία κύησης) με βάρος γέννησης 4.000-5.000 gr (79). Το μεγάλο βάρος των νεογνών αυτών οφείλεται στην υπερινσουλιναιμία 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 σπλαχνομεγαλίας, ή/και δυσπλασίας διαφόρων οργάνων, κυρίως των πνευμόνων, του ήπατος και της καρδιάς (79). 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 1)** 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 (79). Η ινσουλίνη ταυτόχρονα διεγείρει την παραγωγή του IGF-1, που έχει επίσης αυξητική δράση ενδομητρίως (53,67,79). 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 (67). 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 (76,77,79).

Σχήμα 1. **Παθογένεια ΝΔΜ**

υπεργλυκαιμία μητέρας

↓

υπεργλυκαιμία εμβρύου

↓

υπερπλασία νησιδίων παγκρέατος

↓

υπερινσουλινισμός

↓

1. διέγερση παραγωγής του IGF-1→ αναβολική δράση → αύξηση του εμβρύου → μακροσωμία, σπλαγχνομεγαλία

2. δράση στο μεταβολισμό της γλυκόζης → νεογνική υπογλυκαιμία

Α. V. Ο ρόλος της γρελίνης στο νεογνό διαβητικής μητέρας

Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες μελέτες σε νεογνά έχουν επικεντρωθεί στην επίδραση της γρελίνης στην εμβρυϊκή και νεογνική ανάπτυξη. Παρόλα αυτά δεν έχει μελετηθεί συστηματικά σε νεογνά διαβητικών μητέρων, καθώς στη διεθνή βιβλιογραφία μόνο μία ερευνητική ομάδα έχει μελετήσει την επίδραση του ΣΔΚ στη γρελίνη των νεογνών (75). Στη μελέτη αυτή, τα ΝΔΜ και κυρίως τα νεογνά μητέρων με ΣΔ τύπου 1 παρουσίαζαν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις γρελίνης πλάσματος σε σχέση με τα φυσιολογικά νεογνά. Η καταστολή της γρελίνης μπορεί να αποτελεί αντισταθμιστικό μηχανισμό στα πλαίσια της αναβολικής επίδρασης του ενδομήτριου υπερινσουλινισμού. Η υπογρελιναιμία στα ΝΔΜ μπορεί να είναι πλεονεκτική, ώστε στη μεταγεννητική τους ζωή η όρεξή τους να είναι αμβλυμένη, προκειμένου να αποτραπεί η υπερβολική λήψη τροφής και επομένως να παρεμποδιστεί η υπερβολική μεταγεννητική αύξηση βάρους (75).

Τα παραπάνω έρχονται σε συμφωνία: α) με μελέτες που έδειξαν ότι η υπεργλυκαιμία και η υπερινσουλιναιμία μειώνουν τα επίπεδα γρελίνης (4,35,37), β) με μελέτη σε νεογνά ενός έτους, στην οποία παρατηρήθηκε ταχεία πτώση των επιπέδων γρελίνης κατά 20%, μετά από ενδοφλέβια χορήγηση γλυκόζης (71) και γ) με την παρατήρηση ότι χαμηλά επίπεδα γρελίνης, συσχετίζονται με καθυστερημένη πρόσληψη βάρους μεταγεννητικά σε AGA και SGA νεογνά, λόγω της μειωμένης όρεξης που

παρουσιάζουν, που έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη λήψη τροφής (62,66,71). Μέχρι σήμερα πάντως δεν έχει αποδειχθεί η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ ολικής γρελίνης και ινσουλίνης (15,58,62,63,73,75), ίσως επειδή η γρελίνη δεν έχει τις ίδιες μεταβολικές δράσεις στη νεογνική ηλικία συγκριτικά με τις άλλες περιόδους της ζωής (58).

Ο πιθανός μηχανισμός δράσης της γρελίνης σε ΝΔΜ φαίνεται στο **σχήμα 2**:

Σχήμα 2. Πιθανός μηχανισμός δράσης της γρελίνης σε ΝΔΜ

υπεργλυκαιμία μητέρας

↓

υπεργλυκαιμία εμβρύου

↓

υπερπλασία νησιδίων παγκρέατος

↓

υπερινσουλινισμός→διέγερση IGF-1→μακροσωμία /σπλαγχνομεγαλία

↓ ↓

υπογρελιναιμία (73) ⇆ υπερλεπτιναιμία (70)

↓

Το έμβρυο: χρησιμοποιεί κυρίως τη γλυκόζη, γιατί είναι το καύσιμο σε υπερπροσφορά

Η υπερινσουλιναιμία και η υπερλεπτιναιμία αναστέλλουν την έκκριση γρελίνης

Στο νεογέννητο:

Υπερινσουλινισμός χωρίς υπεργλυκαιμία (λόγω διακοπής τροφής από τη μητέρα)

↓ ↓ ↓

υπογρελιναιμία (73) ⇆ υπερλεπτιναιμία (70) νεογνική υπογλυκαιμία

↓ ↓

μετατόπιση προς αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο (73)

Δράσεις υπογρελιναιμίας στα ΝΔΜ στη μεταγεννητική ηλικία

1. Αντισταθμιστικός μηχανισμός διατήρησης επιπέδων γλυκόζης

Η υπογρελιναιμία επίσης ευνοεί την χρήση των λιπιδίων, λόγω της «διατροφικής διχοτόμησης» που τη χαρακτηρίζει (43,45).

2. Αντισταθμιστικός μηχανισμός κατά της υπερβολικής λήψης βάρους μεταγεννητικά

Η υπογρελιναιμία και η υπερλεπτιναιμία τις πρώτες μέρες της ζωής αποτελούν την αντιρροπιστική απάντηση στην ενδομήτρια έντονη αναβολική δράση της ινσουλίνης. Προκαλείται άμβλυνση της όρεξης, αποτροπή υπερβολικής λήψης τροφής και παρεμπόδιση περαιτέρω αύξησης βάρους (75).

3. Μετά την πρώτη εβδομάδα ζωής

Οι πρώτες μέρες της ζωής χαρακτηρίζονται από τη φυσιολογική μείωση του σωματικού βάρους, με αποτέλεσμα να διεγείρεται η έκκριση της γρελίνης, η οποία μετατοπίζει τον μεταβολισμό προς θετικό ενεργειακό ισοζύγιο, οπότε χρησιμοποιούνται οι ενεργειακές αποθήκες για αύξηση και ανάπτυξη και διεγείρεται η όρεξη ώστε να αυξηθεί η πρόσληψη θερμίδων (69).

Β. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

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

Επίσης μελετήθηκαν οι μεταβολές της συγκέντρωσης της γρελίνης την πρώιμη μεταγεννητική περίοδο.

Γ. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Γ. Ι. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

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

Στη συνέχεια, χωρίστηκαν 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).

Γ. ΙΙ. ΥΛΙΚΟ

Γ. ΙΙ α. Πληθυσμός μελέτης - Κριτήρια αποκλεισμού

Συνολικά μελετήθηκαν 70 νεογνά, τα οποία γεννήθηκαν στο Μαιευτήριο «Έλενα Βενιζέλου» κατά την 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 γλυκόζης φλεβικού αίματος νηστείας είναι >99mg/dl ή/και >144 mg/dl δύο ώρες μετά από λήψη 75 gr γλυκόζης (76,77).

Τα νεογνά διακρίνονταν σε πρόωρα και τελειόμηνα ανάλογα με την ηλικία κύησης 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 (79). 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 (79).

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, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν απρόβλεπτοι συγχυτικοί παράγοντες, οι οποίοι πιθανόν να επηρεάσουν το κυκλοφορούντα επίπεδα των ορμονών (75).

Γ. ΙΙ 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 να συμφωνούν με την καθημερινή πρακτική της κλινικής.

Το φλεβικό αίμα έχει συλλεχθεί σε φιαλίδια EDTA για τις μετρήσεις των επιπέδων γρελίνης 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 4000 περιστροφές/min για 8min στους 4^0C και ο ορός που προέκυψε αποθηκεύτηκε σε ειδικά φιαλίδια (aliquots) στους -20^0C μέχρι την ανάλυση τους.

Γ. ΙΙΙ. ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ. ΙΙΙ α. 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 (80). Επιπλέον, η μέτρηση βάρους σώματος είναι η ευκολότερη και η πιο αξιόπιστη μέθοδος μεταξύ του ανθρωπομετρικών παραμέτρων (65,80).

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 (15). Το ύψος και η περίμετρος

κεφαλής αντανακλούν κυρίως τον χρόνιο ενδομήτριο υποσιτισμό και την καθυστέρηση της ανάπτυξης του ΚΝΣ (79).

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 (79).

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.

Γ. ΙΙΙ β. 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.

Δεν θεωρήθηκε σκόπιμο να μετρηθούν οι συγκεντρώσεις ινσουλίνης, αφού στα νεογνά η γρελίνη συνδέεται κυρίως με τα επίπεδα γλυκόζης (71) και όχι με τα επίπεδα ινσουλίνης (15,58,62,63,73,75).

Γ. ΙΙΙ γ. Μέτρηση μεταβολικών ορμονών

i 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 υπάρχει 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 προσδεδεμένου 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 ραδιο-ανοσολογικής 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 (81).

ii Επιλογή μεθόδου

Στη μελέτη αυτή, όπως και σε άλλες μελέτες (62,69) που πραγματοποιήθηκαν σε νεογνά, μετρήσαμε τα επίπεδα της ολικής γρελίνης. Αυτός μπορεί να είναι ένας περιορισμός στην κατανόηση του ρόλου της γρελίνης στην αύξηση και το μεταβολισμό, αφού η ακυλιωμένη γρελίνη (ενεργός) συνδέεται με τον GHS-R και παρουσιάζει ενδοκρινική δραστηριότητα.

Οι λόγοι που επιλέχθηκε να μετρηθούν οι συγκεντρώσεις της γρελίνης και όχι της ενεργούς γρελίνης είναι: α) η σταθερότητα που παρουσιάζει στα δείγματα η ολική γρελίνη έναντι της ενεργούς (61), β) η ύπαρξη άριστου συσχετισμού μεταξύ των επιπέδων της ενεργούς και της ολικής γρελίνης (61) και γ) το γεγονός ότι η συγκέντρωση της ολικής γρελίνης θεωρείται η πλέον κατάλληλη για την αξιολόγηση της έκκρισης της γρελίνης και για την εκτίμηση των συσχετισμών της με διάφορες παραμέτρους (61,65).

Το RIA kit της εταιρείας που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη μας έχει δοκιμαστεί και είναι από αναλυτικής απόψεως αποδεκτό (82) και ενδείκνυνται μόνο για ερευνητικούς σκοπούς (81).

iii 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 αντιορό γρελίνης προκειμένου να καθοριστεί το επίπεδο της ολικής γρελίνης στο πλάσμα με την τεχνική του διπλού πεγκυλιωμένου (PEG) αντισώματος. (81).

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.

-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 πραγματοποιήθηκαν 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 100μl από το διάλυμα των total ghrelin standards και από τα διαλύματα των total ghrelin quality control 1 και 2 εις διπλούν στα αντίστοιχα σωληνάρια.
3. Έγχυση 100μl από κάθε δείγμα εις διπλούν στα αντίστοιχα σωληνάριά τους.
4. Έγχυση 100μl του αντισώματος της γρελίνης σε όλα τα σωληνάρια, εκτός από τα σωληνάρια 1-2 (σωλ. ολικής μέτρησης) και τα σωληνάρια 3-4 (σωλ. NSB).
5. Έπειτα ακολούθησε ανάδευση, κάλυψη και επώαση κατά τη διάρκεια της νύχτας (24 ώρες) στους 4^0C.

Την δεύτερη μέρα πραγματοποιήθηκαν τα εξής βήματα:

6. 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.
7. Ακολούθησε ανάδευση, κάλυψη των δειγμάτων και επώαση κατά τη διάρκεια της νύχτας (22- 24 ώρες) στους 4^0C.

Την τρίτη μέρα έγιναν τα εξής βήματα:

8. Προσθήκη 1,0 ml του αντιδραστηρίου κατακρήμνισης (διατήρηση στους 4^0C) σε όλα τα σωληνάρια εκτός των σωληναρίων 1 και 2.
9. Ανάδευση και επώαση για 20 λεπτά στους 4^0C.
10. Φυγοκέντρηση στους 4^0C, για 20 λεπτά στις 3000 στροφές, ώστε να προκύψει μια λεπτή πελέτα.
11. 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.

1. Ελήφθη ο μέσος όρος 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.
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 υπολογίστηκε το ποσοστό της δέσμευσης του ανιχνευτή

[Μ.Ο. συγκέντρωσης σωλ. 5 -6 (Bo)/ Μ.Ο. συγκέντρωσης σωλ. 1-2 (TCT)] x 100.

4. Υπολογίστηκε το ποσοστό της ολικής δέσμευσης (%B/Bo) για κάθε γνωστό (standard) και άγνωστο δείγμα. [% B/Bo= (δείγμα/ολική δέσμευση) x 100]
5. Καταρτίστηκε το ποσοστό %B/Bo για κάθε γνωστό δείγμα στον άξονα y και τη γνωστή συγκέντρωση του γνωστού δείγματος στον άξονα x, σε λογαριθμικό χαρτί.
6. Κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, ενώνοντας τα σημεία με μία καμπύλη γραμμή (εικόνα 2 στο παράρτημα ΙΙ).
7. Καθορίστηκε σε ng/ml η 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.

iv Μέτρηση επιπέδων αντιπονεκτίνης

Η συγκέντρωση της αντιπονεκτίνης πλάσματος μετρήθηκε με το RIA kit Cat. # HADP-61 HK, Linco Research, Inc., St. Charles, Missouri, USA. Το συγκεκριμένο kit χρησιμοποιεί αντιπονεκτίνη μουρίνης σημασμένη με ^{125} I και αντιορό αντιπονεκτίνης κόνικλου προκειμένου να καθοριστεί το επίπεδο της αντιπονεκτίνης στο πλάσμα με την τεχνική του διπλού πεγκυλιωμένου (PEG) αντισώματος (83).

Η προετοιμασία - ανασύσταση της αντιπονεκτίνης (adiponectin standard) πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας ανασυνδυασμένη ανθρώπινη αντιπονεκτίνη.

Η ευαισθησία της μεθόδου, δηλαδή το χαμηλότερο επίπεδο που μπορεί να ανιχνευτεί η αντιπονεκτίνη είναι το 1ng/ml, όταν χρησιμοποιούμε 100μl από ένα δείγμα (83). Τα χαρακτηριστικά του RIA kit της αντιπονεκτίνης αναφέρονται αναλυτικά στο παράρτημα 3.

Η συγκεκριμένη μέθοδος μέτρησης της αντιπονεκτίνης είναι η πλέον αποδεκτή και χρησιμοποιούμενη στις ερευνητικές ομάδες (84,85) και ενδείκνυται για ερευνητικούς σκοπούς (83).

Γ.ΙΙΙ δ. Στατιστική ανάλυση

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 - τελειόμηνα).

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

Γ. IV. 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 με την αυστηρή προϋπόθεση της γονικής συγκατάθεσης και μετά από ενημέρωση τους για τον σκοπό της ερευνητικής αυτής μελέτης, πριν από την έναρξη της.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ. Ι. Περιγραφικά στοιχεία

Στους **πίνακες 2** και **3** φαίνονται συνοπτικά τα περιγραφικά στοιχεία των νεογνών, ανάλογα με την ομάδα που ανήκουν (τελειόμηνα - πρόωρα). Έχουν καταγραφεί οι μέσες τιμές, οι διάμεσοι, οι σταθερές αποκλίσεις, οι μέγιστες και οι ελάχιστες τιμές καθώς και ο αριθμός των νεογνών, των οποίων τα στοιχεία καταγράφηκαν.

Πίνακας 2 - Περιγραφικά στοιχεία 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)	3212,65	3150,00	652,07	2135,00	5640,00	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

Πίνακας 3 - Περιγραφικά στοιχεία πρώρων 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

Δ. ΙΙ. Σύγκριση μεταξύ πρόωρων και τελειόμηνων νεογνών

Δ. ΙΙ α. Ανθρωπομετρία

Στα πρόωρα νεογνά, το βάρος και το μήκος γέννησης, η περίμετρος κεφαλής και ο δείκτης BMI παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές συγκριτικά με τις αντίστοιχες των τελειόμηνων και οι διαφορές αυτές είναι στατιστικά σημαντικές. Αντιθέτως, ο δείκτης ponderal (PI) δεν βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων (**πίνακας 4**).

Πίνακας 4 - Ανθρωπομετρικοί δείκτες ΝΔΜ

Ανθρωπομετρικοί δείκτες	Πρόωρα	Τελειόμηνα	p-values
Βάρος γέννησης (gr)	2410,00	3150,00	0,001
Ύψος γέννησης (cm)	47,00	51,00	0,001
Περίμετρος κεφαλής (cm)	33,00	34,00	0,001
BMI (g/cm^2)	1,11	1,22	0,006

Δείκτης Ponderal (g/cm^3 x 100)	2,29	2,42	0,438

Δ. ΙΙ β. Βιοχημικές παράμετροι

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 στατιστικά σημαντικό επίπεδο (**πίνακας 5**).

Πίνακας 5 - Βιοχημικές παράμετροι ΝΔΜ

Βιοχημικές παράμετροι	Πρόωρα	Τελειόμηνα	p-values
Γλυκόζη d1 (mg/dl)	39,00	50,00	0,006
Γλυκόζη d2 (mg/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

Δ. ΙΙ γ. Επίπεδα ορμονών

Στον **πίνακα 6** φαίνονται οι διάμεσοι των δύο ορμονών μεταξύ των δύο ομάδων, οι οποίες δεν διαφέρουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό.

Πίνακας 6 - Επίπεδα μεταβολικών ορμονών

Μεταβολικές Ορμόνες	Πρόωρα	Τελειόμηνα	p-values
Γρελίνη (ng/ml)	513,19	380,70	0,145
Αντιπονεκτίνη (μg/ml)	21,834	23,376	0,817

Δ. ΙΙΙ. Συσχέτιση επιπέδων ορμονών με το φύλο

Η διάμεση συγκέντρωση της γρελίνης και της αντιπονεκτίνης δεν διέφεραν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό μεταξύ των δύο φύλων, δεν παρατηρείται δηλαδή φυλετικός διμορφισμός σε αυτή την περίοδο της ζωής (**πίνακας 7**).

Πίνακας 7 – Συσχέτιση των ορμονών με το φύλο

Μεταβολικές Ορμόνες	Άρρενα	Θήλεα	p-values
Γρελίνη (ng/ml)	386,87	411,57	0,941
Αντιπονεκτίνη (μg/ml)	24281,50	21858,00	0,169

Δ. IV. Συσχέτιση γρελίνης με ανθρωπομετρικές παραμέτρους

Οι συσχετίσεις της γρελίνης με τις ανθρωπομετρικές παραμέτρους και τους ανθρωπομετρικούς δείκτες συνοψίζονται στον **πίνακα 8**. Η γρελίνη δεν συσχετίστηκε σημαντικά με καμία ανθρωπομετρική παράμετρο ή δείκτη.

Πίνακας 8 - Συσχέτιση γρελίνης με ανθρωπομετρικές παραμέτρους

ΓΡΕΛΙΝΗ	Πρόωρα		Τελειόμηνα	
	Spearman's Rho	p-value	Spearman's Rho	p-value
Ανθρωπομετρία				
Βάρος γέννησης	-0,104	0,654	-0,008	0,958
Ύψος γέννησης	0,014	0,952	0,037	0,810
Περίμετρος κεφαλής	-0,288	0,205	0,169	0,271
Δείκτης BMI	-0,068	0,771	-0,011	0,945
Δείκτης Ponderal	-0,059	0,799	-0,018	0,906

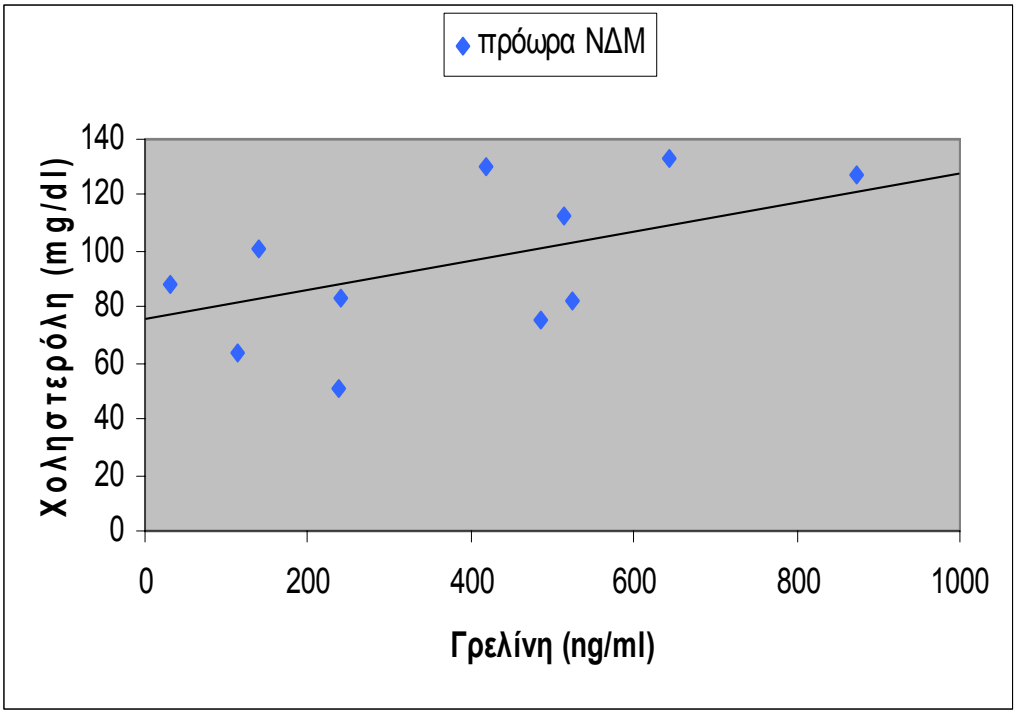
Δ. V. Συσχέτιση γρελίνης με βιοχημικές παραμέτρους

Οι συσχετίσεις της γρελίνης με τις βιοχημικές παραμέτρους συνοψίζονται στον **πίνακα 9**. Στα πρόωρα ΝΔΜ παρατηρείται οριακά στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την ολική χοληστερόλη (p= 0,07), και μη σημαντική θετική συσχέτιση με την HDL και την LDL χοληστερόλη. Στην **εικόνα 6** φαίνεται η γραφική παράσταση της συσχέτισης της γρελίνης με την ολική χοληστερόλη .

Στα τελειόμηνα, παρατηρείται αντιστροφή των αντίστοιχων συσχετίσεων, δηλαδή αρνητική συσχέτιση της γρελίνης με την ολική, την HDL και την LDL χοληστερόλη, που όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Πίνακας 9 - Συσχέτιση γρελίνης με βιοχημικές παραμέτρους

ΓΡΕΛΙΝΗ	Πρόωρα		Τελειόμηνα	
	Spearman's Rho	**p-value**	**Spearman's Rho**	**p-value**
Βιοχημικές παράμετροι				
Γλυκόζη 1ης μέρας	-0,038	0,884	-0,233	0,208
Γλυκόζη 2ης μέρας	-0,010	0,969	-0,176	0,362
Χοληστερόλη	0,565	0,070	-0,234	0,350
HDL - χοληστερόλη	0,427	0,219	-0,097	0,711
LDL - χοληστερόλη	0,498	0,143	-0,158	0,560
Τριγλυκερίδια	0,311	0,453	0,300	0,242
Ολικά λιπίδια	0,272	0,419	0,302	0,256



Εικόνα 6. Γραφική παράσταση της συσχέτισης της γρελίνης με την ολική χοληστερόλη στα πρόωρα ΝΔΜ

Δ. VI. Συσχέτιση γρελίνης με αντιπονεκτίνη

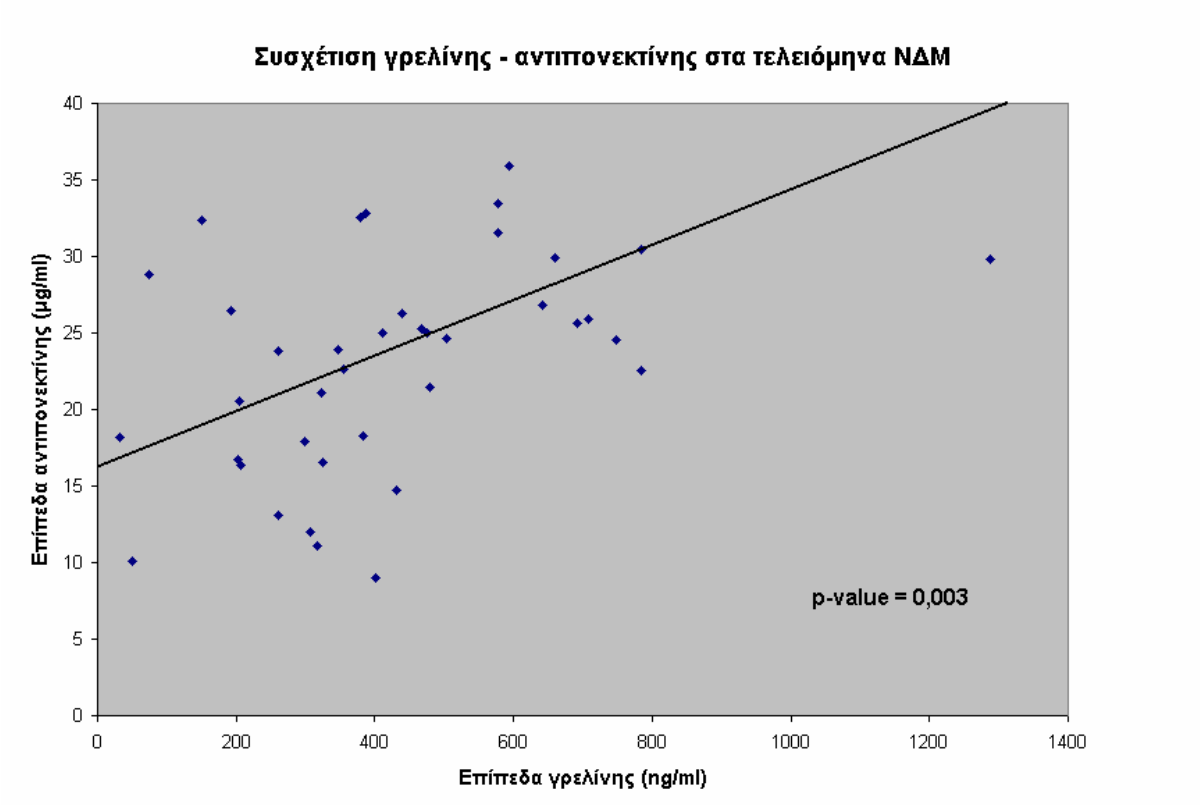
Στον **πίνακα 10** φαίνεται η συσχέτιση της γρελίνης με την αντιπονεκτίνη στα τελειόμηνα ΝΔΜ, η οποία είναι στατιστικά σημαντική (p=0,003) και στην **εικόνα 7** φαίνεται η αντίστοιχη γραφική παράσταση.

Στον **πίνακα 11** φαίνεται η συσχέτιση γρελίνης αντιπονεκτίνης στα πρόωρα ΝΔΜ που δεν είναι στατιστικά σημαντική.

Τέλος στον **πίνακα 12** φαίνεται η συσχέτιση της γρελίνης με την αντιπονεκτίνη στο σύνολο των νεογνών, η οποία είναι στατιστικά σημαντική (p=0,022) και στην **εικόνα 8** φαίνεται η γραφική παράσταση της συσχέτισης.

Πίνακας 10 – Συσχέτιση γρελίνης – αντιπονεκτίνης στην ομάδα των τελειόμηνων ΝΔΜ

		Γρελίνη
Αντιπονεκτίνη	Spearman's Rho	0,448
	p-value	0,003
	N	41



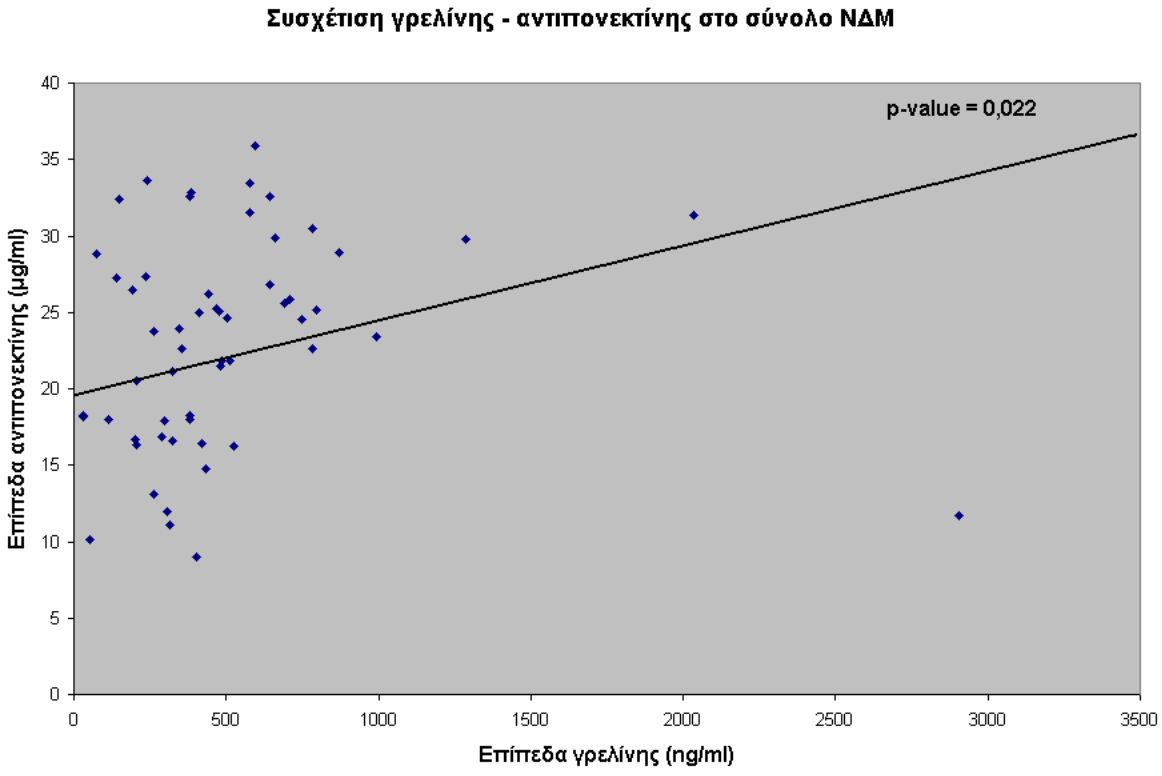
Εικόνα 7. Γραφική παράσταση της συσχέτισης ολικής γρελίνης με την ολική χοληστερόλη στα πρόωρα ΝΔΜ

Πίνακας 11 – Συσχέτιση γρελίνης – αντιπονεκτίνης στην ομάδα πρόωρων ΝΔΜ

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

Πίνακας 12 – Συσχέτιση γρελίνης – αντιπονεκτίνης στο σύνολο των ΝΔΜ

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



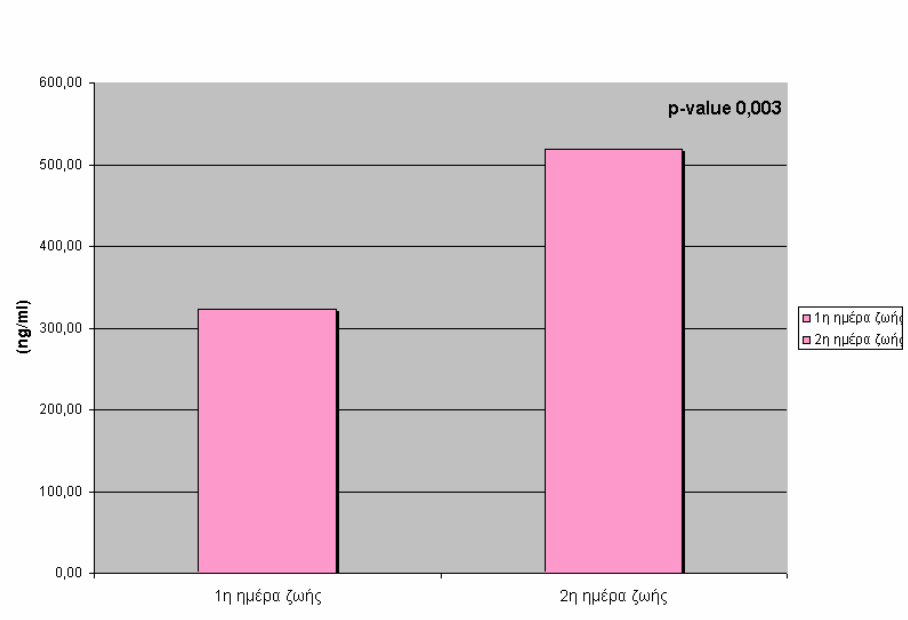
Εικόνα 8. Γραφική παράσταση της συσχέτισης ολικής γρελίνης με την αντιπονεκτίνη στα τελειόμηνα ΝΔΜ

Δ. VII. Σύγκριση επιπέδων γρελίνης μεταξύ πρώτου και δεύτερου 24ώρου

Στον **πίνακα 13** φαίνονται οι διάμεσοι των συγκεντρώσεων της γρελίνης το πρώτο και το δεύτερο 24ωρο ζωής, όταν τα νεογνά χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με την ημέρα λήψης του αίματος. Παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης της γρελίνης το δεύτερο 24ωρο σε σχέση με το πρώτο, που είναι στατιστικά σημαντική και απεικονίζεται γραφικά στην **εικόνα 9**. Να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη σύγκριση δεν περιλήφθησαν δύο ακραίες τιμές της γρελίνης.

Πίνακας 13 – Επίπεδα γρελίνης την 1η και 2η ημέρα ζωής

Επίπεδα γρελίνης	Διάμεσος	Minimum	Maximum	p-value
1η μέρα ζωής (ng/ml)	323,31	31,32	784,87	**0.003**
2η μέρα ζωής (ng/ml)	518,51	29,90	1297,00	



Εικόνα 9. Σύγκριση των επιπέδων γρελίνης μεταξύ 1ης και 2ης ημέρας ζωής των ΝΔΜ

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την ερευνητική αυτή διατριβή έγινε προσπάθεια να μελετηθεί ο ρόλος που έχει η γρελίνη στα νεογνά διαβητικής μητέρας, μία ιδιαίτερη ομάδα νεογνών, στην οποία δεν έχει μελετηθεί η δράση της, παρά μόνο από μία ερευνητική ομάδα (75). Επίσης μελετήθηκαν οι συσχετίσεις της γρελίνης με ανθρωπομετρικές και βιοχημικές παραμέτρους, καθώς και με την ορμόνη αντιπονεκτίνη.

Η συγκεκριμένη μελέτη απαρτίζεται από 49 τελειόμηνα και 21 πρόωρα ΝΔΜ. Η γρελίνη μετρήθηκε στο σύνολο των πρόωρων νεογνών, αλλά μόνο στα 44 από τα τελειόμηνα καθώς τα 5 από αυτά είχαν ακατάλληλα προς επεξεργασία δείγματα. Επίσης, λόγω μη κατάλληλων δειγμάτων η αντιπονεκτίνη δεν μετρήθηκε σε 1 πρόωρο και 5 τελειόμηνα νεογνά, ενώ ο βιοχημικός έλεγχος δεν ήταν πλήρης σε όλα τα νεογνά.

Όπως είναι αναμενόμενο, κατά την στατιστική ανάλυση οι ανθρωπομετρικοί δείκτες στα πρόωρα νεογνά παρουσιάζουν χαμηλότερες τιμές συγκριτικά με τις αντίστοιχες των τελειόμηνων. Τα πρόωρα νεογνά υπολείπονται σαφώς σε ανάπτυξη συγκριτικά με τα τελειόμηνα (86). Αντιθέτως, ο δείκτης ponderal (PI), ο οποίος αντικατοπτρίζει την ενδομήτρια διατροφική κατάσταση του βρέφους δεν βρέθηκε να διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Το γεγονός αυτό πιθανόν οφείλεται στο ότι τα περισσότερα νεογνά που μελετήσαμε ήταν AGA, καθώς και στο ότι οι μητέρες τους είχαν καλή ρύθμιση του ΣΔΚ τους, όπως προκύπτει από το μαιευτικό τους ιστορικό.

Τα επίπεδα γλυκόζης κατά το πρώτο και το δεύτερο 24ωρο ήταν σημαντικά υψηλότερα στα τελειόμηνα, γεγονός που οφείλεται στην ανωριμότητα των μεταβολικών μηχανισμών των προώρων να αντιμετωπίσουν διάφορες διαταραχές της ομοιόστασης (79).

Το γεγονός αυτό σκιαγραφείται χαρακτηριστικά στον ορισμό της υπογλυκαιμίας των νεογνών. Σύμφωνα με τους Avroy και Fanaroff, υπογλυκαιμία θεωρείται κάθε τιμή γλυκόζης κάτω από δύο σταθερές αποκλίσεις (SD) από τις φυσιολογικές τιμές (87) και συγκεκριμένα για τα τελειόμηνα νεογνά ως υπογλυκαιμία ορίζεται κάθε τιμή γλυκόζης αίματος <30 mg/dl για τις πρώτες 72 ώρες ζωής (87) και για τα πρόωρα νεογνά με βάρος γέννησης <2.500gr κάθε τιμή γλυκόζης αίματος <25mg/dl (87). Με βάση τον ορισμό αυτό, τόσο οι μέσοι όσο

και οι διάμεσοι των επιπέδων γλυκόζης ήταν εντός φυσιολογικών ορίων στα νεογνά και των δύο ομάδων.

Όμως υπήρχε ένας αρκετά σημαντικός αριθμός τελειόμηνων και κυρίως πρόωρων ΝΔΜ που παρουσίασαν υπογλυκαιμία κατά το $1^{ο}$ και $2^{ο}$ 24ωρο. Ως γνωστόν, τα τελειόμηνα ΝΔΜ λόγω του υπερινσουλινισμού, έχουν αυξημένη πιθανότητα να παρουσιάσουν υπογλυκαιμία μεταγεννητικά, σε σχέση με τα φυσιολογικά τελειόμηνα νεογνά. Η πιθανότητα αυτή αυξάνεται στην περίπτωση των πρόωρων ΝΔΜ λόγω των σημαντικά χαμηλότερων εφεδρειών και της ανωριμότητας των μηχανισμών αντιμετώπισης της ενδεχόμενης υπογλυκαιμίας. Γι΄ αυτό τα πρόωρα ΝΔΜ της μελέτης αυτής είχαν χαμηλότερο μέσο όρο τιμών γλυκόζης την $1^{η}$ και τη $2^{η}$ μέρα ζωής και παρουσίαζαν συχνότερα από τα τελειόμηνα ΝΔΜ επεισόδια υπογλυκαιμίας.

Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε σε μερικά από τα νεογνά, πλήρης έλεγχος του λιπιδαιμικού προφίλ. Ο λόγος που μελετήθηκε η χοληστερόλη παρόλο που δεν σχετίζεται άμεσα με το μεταβολισμό, είναι το ότι είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη νέων κυτταρικών μεμβρανών και ιστών, ειδικά στα πρόωρα νεογνά (79).

Από την στατιστική ανάλυση φαίνεται ότι οι διάμεσοι της ολικής, της HDL και της LDL-χοληστερόλης, αλλά και των τριγλυκεριδίων είναι υψηλότερες στα πρόωρα συγκριτικά με τα τελειόμηνα, χωρίς όμως να διαφέρουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Επίσης παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση στις τιμές όλων των παραμέτρων του λιπιδαιμικού προφίλ. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι στα νεογνά η λήψη αίματος δεν πραγματοποιήθηκε μετά από νηστεία 12 ωρών, όπως συστήνεται στους ενήλικες, αφού σιτίζονται ανά δίωρο στη μονάδα. Σημειώνεται όμως ότι οι μετρήσεις των βιοχημικών αυτών παραμέτρων πραγματοποιήθηκαν σε μικρό ποσοστό του δείγματος, γι' αυτό θεωρούμε ότι τα αποτελέσματα των συγκρίσεων αυτών είναι ενδεικτικά και προφανώς χρειάζεται να επιβεβαιωθούν με μετρήσεις σε μεγαλύτερο δείγμα μελλοντικά.

Στον **πίνακα 5** φαίνονται οι διάμεσες τιμές των δύο ορμονών μεταξύ των τελειόμηνων και των προώρων ΝΔΜ, οι οποίες δεν διαφέρουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό. Αξιοσημείωτη είναι όμως η μεγάλη διασπορά των επιπέδων γρελίνης στην ομάδα των προώρων νεογνών, όπως φαίνεται από τους περιγραφικούς πίνακες.

Στην πλειονότητα των μελετών, οι συγκεντρώσεις της κυκλοφορούσας ολικής γρελίνης δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τελειόμηνων και πρόωρων νεογνών και δεν

φαίνεται να υπάρχει καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ ολικής γρελίνης και ηλικίας κύησης, τόσο στον ομφάλιο λώρο (15,52,58,63), όσο και σε νεογνικό αίμα (71). Μάλιστα, παρατηρείται μεγάλη διασπορά των τιμών σε όλες τις ηλικίες κύησης (58). Κατά συνέπεια, όπως αποδείχθηκε και από τη δική μας πειραματική εργασία η συγκέντρωση της ολικής γρελίνης δεν εμφανίζει διακυμάνσεις με την ηλικία κύησης και η έκκρισή της τείνει να είναι σχετικά σταθερή με την ηλικία κύησης (71). Σημειώνεται πάντως ότι στις δύο μελέτες που βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ ολικής γρελίνης και ηλικίας κύησης, είτε οι ομάδες των νεογνών δεν ήταν ομοιογενείς (60), είτε δεν μελετήθηκε επαρκής αριθμός νεογνών, με ευρύ φάσμα ηλικιών κύησης (53).

Η μεγάλη διακύμανση των επιπέδων γρελίνης μπορεί να οφείλεται στο σχετικά μικρό δείγμα (n=21), καθώς στο ότι μερικά από αυτά ήταν SGA νεογνά (n=4), στα οποία παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα ολικής γρελίνης (58,77).

Στο δείγμα, τα θήλεα νεογνά είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις γρελίνης σε σχέση με τα άρρενα, που όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικό. Διαπιστώνεται δηλαδή έλλειψη φυλετικού διμορφισμού στο σύνολο των νεογνών, γεγονός που συμφωνεί με την βιβλιογραφία.

Στις περισσότερες μελέτες κατά την ανασκόπηση, φαίνεται ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις της ολικής γρελίνης ομφαλίου λώρου μεταξύ των αρρένων και θηλέων εμβρύων και νεογνών (15,16,51,52,53,57), ακόμη και σε μελέτες στις οποίες μελετήθηκαν πολύ διαφορετικές ομάδες, όπως πρόωρα και τελειόμηνα, SGA, AGA και LGA νεογνά καθώς και ΝΔΜ (62,63,65). Επίσης δεν έχει αποδειχθεί καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ γρελίνης και φύλου και σε δείγματα νεογνικού αίματος (53), όπως επίσης δεν έχει βρεθεί καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ γρελίνης και οποιασδήποτε άλλης παραμέτρου, σε κανένα από τα δύο φύλα (73).

Παρόλα αυτά, υπάρχουν μελέτες που έδειξαν συσχέτιση της γρελίνης με το φύλο. Σε μία μελέτη παρατηρήθηκε φυλετικός διμορφισμός στη συσχέτιση της γρελίνης με την λεπτίνη, την GH και τις ανθρωπομετρικές παραμέτρους, γεγονός που αποδόθηκε όμως στο συγχυτικό ρόλο των στεροειδών των γονάδων (62), ενώ σε άλλη μελέτη διαπιστώθηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα γρελίνης στα θήλεα σε σχέση με τα άρρενα νεογνά, γεγονός που αποδόθηκε στην ύπαρξη αυξημένης εναπόθεσης λίπους στην περιοχή του υποπλατίου μυός των θηλέων νεογνών (73).

Οι συγκεντρώσεις της γρελίνης παρουσιάζουν αξιοσημείωτη ποικιλομορφία για τα αντίστοιχα βάρη σώματος γέννησης των νεογνών, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο ότι η έκκριση της γρελίνης προκαλεί μόνο μικρής διάρκειας αλλαγές στη συμπεριφορά σίτισης - λήψης τροφής (64).

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν έχει καταλήξει απόλυτα όσον αφορά στη σχέση μεταξύ γρελίνης και ανθρωπομετρικών παραμέτρων στη γέννηση, δεδομένου ότι ορισμένες μελέτες κατέδειξαν σημαντικές συσχετίσεις (73), ενώ άλλες δεν μπόρεσαν να δείξουν κάτι αντίστοιχο (15,56,60) ή βρήκαν συσχετίσεις μόνο μεταξύ των τελειόμηνων (15,54,61,63,64,73).

Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε τελειόμηνα, διαπιστώνεται αρνητική συσχέτιση μεταξύ γρελίνης και βάρους γέννησης (53,62,63), z-σκορ βάρους γέννησης (60), BMI (51,62,63) και δείκτη ponderal (PI) (15). Η ερμηνεία που δόθηκε για την αντίστροφη αυτή σχέση μεταξύ γρελίνης και ανθρωπομετρικών δεικτών είναι ότι η γρελίνη κατέχει ενεργό φυσιολογικό ρόλο στη ρύθμιση της ομοιόστασης της ενέργειας και του μεταβολισμού, μετά την $37^{η}$ εβδομάδα κύησης. Αυτό το φαινόμενο πιθανόν να είναι ευεργετικό στα τελειόμηνα έμβρυα, προκειμένου να έχουν επιτυχή προσαρμογή στην εξωμήτρια ζωή, στην πλέον κρίσιμη περίοδο, κατά την οποία οι αποθήκες τροφής και ενέργειας από τη μητέρα διακόπτονται απότομα μετά τον τοκετό (50,60,70). Άλλη εξήγηση της αντίστροφης αυτής συσχέτισης είναι ότι η συγκέντρωση της γρελίνης στο έμβρυο ρυθμίζεται από την μητρο-εμβρυϊκή μεταφορά ενέργειας, που είναι μεγαλύτερη στα τελειόμηνα (59).

Σε συμφωνία με αρκετές μελέτες (15,56,60) δεν αποδείχθηκε η ύπαρξη σημαντικής συσχέτισης μεταξύ γρελίνης και ανθρωπομετρικών παραμέτρων και δεικτών, παρόλο που διαπιστώθηκε αρνητική συσχέτιση με όλες τις παραμέτρους, πλην του ύψους γέννησης και της περιμέτρου κεφαλής στα τελειόμηνα. Το ύψος και η περίμετρος κεφαλής όμως αντανακλούν τον χρόνιο υποσιτισμό και την καθυστέρηση της ανάπτυξης του ΚΝΣ και επηρεάζονται σε μέτριου έως μεγάλου βαθμού καθυστέρηση της ενδομήτριας ανάπτυξης και δυστροφία του εμβρύου (79). Τα νεογνά αυτής της μελέτης όμως ήταν στην πλειονότητά τους AGA και δεν εμφάνιζαν παθολογικά ευρήματα κατά τη φυσική εξέταση ή δυσπλασίες. Σημειώνεται πάντως, ότι οι συσχετισμοί μεταξύ κυκλοφορούσας γρελίνης

και ανθρωπομετρικών παραμέτρων έχουν αναφερθεί από μελέτες, οι οποίες ασχολήθηκαν με σχετικά μικρές ή ανομοιογενείς ομάδες (56,60,73).

Δεν έχουν ακόμη αποκρυπτογραφηθεί οι μηχανισμοί με τους οποίους τα επίπεδα γρελίνης αντανακλούν το βάρος σώματος. Μεταξύ των υποψηφίων ρυθμιστών που σχετίζονται με το βάρος σώματος είναι διάφορες βιοχημικές παράμετροι, όπως η γλυκόζη, τα λιπίδια και οι λιποπρωτεΐνες, των οποίων οι τιμές πιθανόν να συσχετίζονται με τα επίπεδα της γρελίνης (85).

Ως γνωστόν η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας για το ανθρώπινο έμβρυο, αλλά αμέσως μετά τη γέννηση, παρατηρείται απότομη αλλαγή στην προσφορά θρεπτικών ουσιών, κατά την οποία τα λιπίδια συμμετέχουν κατά 60% στην προσφορά ενέργειας στο νεογέννητο (87). Η εμβρυϊκή αύξηση δεν ακολουθεί γραμμική μορφή καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και το λίπος αυξάνεται σε όγκο κυρίως το τελευταίο τρίμηνο της κύησης (87). Γι' αυτό η αδυναμία της αύξησης του λιπώδους ιστού κατά τη διάρκεια της κύησης αυξάνει τη νεογνική νοσηρότητα (87,88).

Στη βιβλιογραφία οι απόψεις σχετικά με τη συσχέτιση των τιμών γλυκόζης και γρελίνης διίστανται. Αφενός υπάρχουν μελέτες στις οποίες παρατηρήθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ γρελίνης ομφάλιου λώρου και γλυκόζης (15,60), ανεξάρτητα από τις συγκεντρώσεις ινσουλίνης. Η συσχέτιση αυτή πιστεύεται ότι υποδεικνύει την παρουσία ρύθμισης στην έκκριση της γρελίνης από την γλυκόζη ήδη από την ενδομήτριο ζωή, καθώς και ότι οι ακραίες παραλλαγές στο μητρικό μεταβολισμό της γλυκόζης έχουν επιπτώσεις στο μεταβολισμό της εμβρυϊκής γρελίνης (60).

Αντίστοιχα, σε SGA νεογνά ενός έτους και σε παχύσαρκα παιδιά, η έκκριση της γρελίνης παρουσιάζει ευαισθησία στην ανασταλτική δράση της γλυκόζης, που χορηγείται από το στόμα, παρά την αντίσταση σε αντίστοιχης ποσότητας χορήγηση γεύματος - γάλακτος (69,70). Η παρατηρηθείσα «αντίσταση» στη γρελίνη στις παθολογικές αυτές καταστάσεις μπορεί να είναι ένας αντισταθμιστικός μηχανισμός, προκειμένου είτε να διατηρηθεί μία συνεχής αναβολική ροπή (τα SGA νεογνά υπολείπονται σε ανάπτυξη), είτε να διατηρείται αμβλυμένο το αίσθημα της όρεξης και να μειωθεί η περαιτέρω πρόσληψη βάρους (στα παχύσαρκα παιδιά).

Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν μελέτες, στις οποίες δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων γλυκόζης και γρελίνης ομφάλιου λώρου σε φυσιολογικά

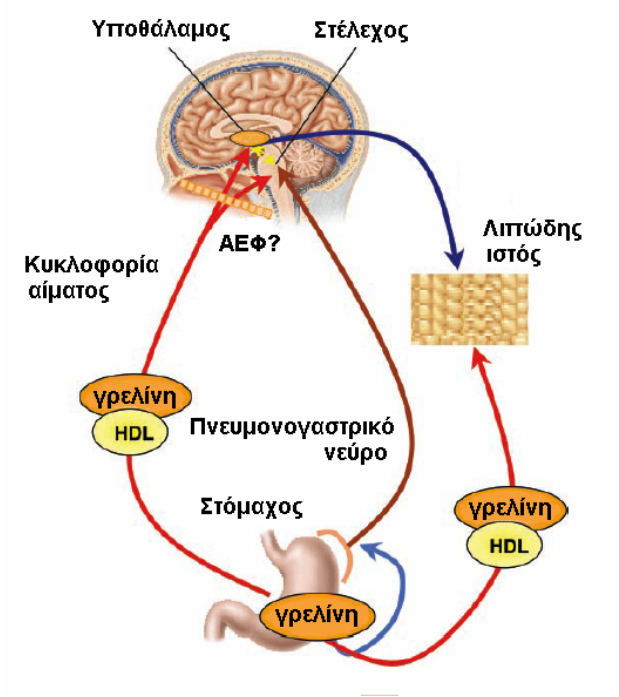
τελειόμηνα και πρόωρα νεογνά, άρρενα και θήλεα (53,71), όπως επίσης και σε νεογνά διαβητικής μητέρας (73).

Τα αποτελέσματα της δικής μας μελέτης στα τελειόμηνα και τα πρόωρα νεογνά δείχνουν ότι υπάρχει αρνητική αλλά μη σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων γρελίνης και γλυκόζης, που συμφωνούν με την πλειονότητα των μελετών στη βιβλιογραφία (53,71), καθώς και με τη μόνη ερευνητική εργασία που μέτρησε τα επίπεδα γρελίνης σε ΝΔΜ (73). Πιθανή εξήγηση του φαινομένου είναι ότι τα περισσότερα από τα ΝΔΜ που μελετήσαμε ήταν AGA καθώς και ότι οι μητέρες τους ρύθμιζαν καλά τον ΣΔΚ τους, δηλαδή είχαν επίπεδα γλυκόζης εντός των φυσιολογικών ορίων. Στο μαιευτικό ιστορικό δεν καταγράφηκε σε καμία από τις μητέρες επεισόδιο κετονουρίας, ή μη ρυθμιζόμενος ΣΔΚ με δίαιτα ή ινσουλίνη.

Μέχρι σήμερα, δεν έχει πραγματοποιηθεί μελέτη, η οποία να συσχετίζει τη γρελίνη με το λιπιδαιμικό προφίλ, κατά την ενδομήτρια και νεογνική ηλικία. Το γεγονός αυτό μας οδήγησε στη μέτρηση του λιπιδαιμικού προφίλ σε ορισμένα από τα ΝΔΜ. Η χοληστερόλη εκ πρώτης όψεως δεν φαίνεται πιθανό ότι συνδέεται με την γρελίνη. Είναι γνωστό όμως ότι τα νεογνά, μεταγεννητικά βρίσκονται σε θετική ενεργειακή ισορροπία (αυξημένα επίπεδα γρελίνης συνεπάγονται συνεχώς αυξανόμενη ορεξιογόνο ροπή) και χρησιμοποιούν τη χοληστερόλη κυρίως για λόγους αύξησης δηλαδή για την κατασκευή νέων κυτταρικών μεμβρανών και ιστών (77).

Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες in vitro έχουν δείξει ότι η ολική γρελίνη συνδέεται με ορισμένα κλάσματα της HDL-χοληστερόλης (89). Ενδεχομένως η αλληλεπίδραση μεταξύ της γρελίνης και της HDL-χοληστερόλης να αποτελεί την σύνδεση μεταξύ του αισθήματος της πείνας και του μεταβολισμού των λιπιδίων στα πλαίσια ενός γενικότερου μηχανισμού απάντησης του οργανισμού στη νηστεία (4,86,89). Επίσης παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση της γρελίνης με την παροξονάση, μια εστεράση του πλάσματος που διασπά τα οξειδωμένα λιπίδια σε LDL-λιποπρωτεΐνες (89) (**εικόνα 10**).

Δεν έχει ξεκαθαριστεί πάντως ποια μορφή της γρελίνης (ολική ή ενεργός) και σε ποια αναλογία συνδέεται με την HDL, ούτε εάν η αναλογία αυτή μεταβάλλεται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις (89).



Εικόνα 10. Η πιθανή σχέση της γρελίνης με την HDL χοληστερόλη. Η γρελίνη κατά την κυκλοφορία της συνδέεται με την HDL και με άλλες πρωτεΐνες, όπως η αλβουμίνη. Επίσης απεικονίζονται τα μονοπάτια με τα οποία η γρελίνη μπορεί να επηρεάσει την χρόνια ενεργειακή ισορροπία.

Έχει καταγραφεί μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ γρελίνης και HDL-χοληστερόλης σε υγιείς ενήλικες που συμφωνεί με την θεωρία ότι η HDL-χοληστερόλη αποτελεί έναν από τους κυκλοφορούντες μεταφορείς της γρελίνης (88,92). Επίσης έχει παρατηρηθεί αρνητική συσχέτιση της γρελίνης με την ολική και την LDL-χοληστερόλη (86,91,92).

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας δείχνουν οριακά στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση με την ολική χοληστερόλη (p= 0,07), καθώς επίσης και μία τάση θετικής γραμμικής συσχέτισης με την HDL και LDL-χοληστερόλη, αλλά μόνο στα πρόωρα. Αντιθέτως στα τελειόμηνα παρατηρούμε αρνητική συσχέτιση των επιπέδων γρελίνης με την ολική, την HDL και την LDL-χοληστερόλη που δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

Πιθανόν το σχετικά μικρό μέγεθος του υπό μελέτη δείγματος (τελειόμηνα ΝΔΜ n= 17 και πρόωρα ΝΔΜ n=10) καθώς και η ευρεία διακύμανση των τιμών της ολικής, της HDL και της LDL χοληστερόλης, που οφείλεται στη λήψη αίματος χωρίς να έχει προηγηθεί η απαιτούμενη νηστεία των 12 ωρών, μπορεί να έχουν συμβάλλει στις παρατηρούμενες μη στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις. Με βάση τα παραπάνω δεν προκύπτουν σαφή συμπεράσματα. Γι' αυτό απαιτούνται περαιτέρω μελέτες σε μεγαλύτερο δείγμα ΝΔΜ καθώς

και σε δείγμα φυσιολογικών νεογνών, προκειμένου να διαλευκανθεί η σχέση μεταξύ της γρελίνης και του μεταβολισμού των λιπιδίων και των λιποπρωτεϊνών.

Επίσης, με τη στατιστική ανάλυση δεν βρέθηκε σημαντική συσχέτιση της γρελίνης με τα τριγλυκερίδια και τα λιπίδια ούτε στα τελειόμηνα, ούτε στα πρόωρα ΝΔΜ. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τις παρατηρήσεις μελετών που έγιναν σε ενήλικες, οι οποίες έδειξαν ότι τα τριγλυκερίδια και τα ολικά λιπίδια δεν συμμετέχουν στη ρύθμιση των επιπέδων γρελίνης (86,91,92).

Η αντιπονεκτίνη εκφράζεται και εκκρίνεται εξ ολοκλήρου από το λιπώδη ιστό και συμβάλλει στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων (93,94,95). Η αντιπονεκτίνη μειώνεται με την αύξηση της εναπόθεσης λιπώδους ιστού και την ινσουλινοαντίσταση στα παιδιά και στους ενήλικες. Ουσιαστικά υπάρχει θετική συσχέτιση αντιπονεκτίνης με την ινσουλινοευαισθησία (93,95).

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 αντιπονεκτίνη στα νεογνά.

Ως γνωστόν τα νεογνά εκτός από το λευκό λιπώδη ιστό έχουν και φαιό, κύρια λειτουργία του οποίου είναι η θερμογένεση, δηλαδή η διατήρηση ομοιόστασης. Το φαιό λίπος αυξάνει προς το τέλος της κύησης, ενώ ατροφεί κατά την παιδική ηλικία (96, 97).

Το ΝΔΜ χαρακτηρίζεται από υπερινσουλιναιμία λόγω του ενδομήτριου υπεργλυκαιμικού περιβάλλοντος. Η υπερινσουλιναιμία αυτή προκαλεί μείωση των επιπέδων της γρελίνης (73) και διατηρεί την έκκριση της αντιπονεκτίνης στο φαιό λιπώδη ιστό (97). Όλα αυτά συμβαίνουν κατά την ενδομήτριο ζωή του ΝΔΜ. Φαίνεται ότι η αντιπονεκτίνη αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη (93,94,95,97). Οι χαμηλές συγκεντρώσεις της γρελίνης αποτελούν αμυντικό μηχανισμό ενάντια στην υπεργλυκαιμία, όπως συμβαίνει στους ενήλικες μετά τη λήψη γεύματος (67). Οπότε αυτές οι αλλαγές δεικνύουν ένα μέρος των αντισταθμιστικών μηχανισμών που αναπτύσσει το έμβρυο ενδομητρίως, για τη διαχείριση της υπεργλυκαιμίας και τη διατήρηση των κυκλοφορούντων επίπεδων γλυκόζης εντός φυσιολογικών ορίων ώστε να αντεπεξέλθει στο παθολογικό ενδομήτριο περιβάλλον. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η αναμενόμενη συσχέτιση γρελίνης- αντιπονεκτίνης θα είναι αρνητική.

Μεταγεννητικά αίρεται η αιτία του υπερινσουλινισμού, αφού στο εξωμήτριο περιβάλλον δεν υπάρχει υπεργλυκαιμία, λόγω ΣΔΚ. Άρα υφίεται η καταστολή του υπερινσουλινισμού στην έκκριση της γρελίνης. Μεταγεννητικά λοιπόν παρατηρείται αύξηση των επιπέδων γρελίνης, συγκριτικά με την ενδομήτρια ζωή. Αυτό αποδεικνύεται και από τη συγκεκριμένη μελέτη στην οποία τα επίπεδα γρελίνης του 2^{ου} 24ώρου ζωής ήταν υψηλότερα από το 1^{ο} 24ωρο (p= 0,003). Η δε αντιπονεκτίνη θεωρείται σταθερή ορμόνη μεταγεννητικά (97,98,99). Εφόσον η γρελίνη αυξάνεται και η αντιπονεκτίνη σταθεροποιείται, η αρνητική τους σχέση μεταγεννητικά είναι αναμενόμενο να γίνει θετική. Γι' αυτό ίσως και εμείς βρήκαμε μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο ορμονών στα τελειόμηνα ΝΔΜ (r=0,448, p=0,003).

Τα προ-λιποκύτταρα διαφοροποιούνται σε μικρά λιποκύτταρα ενδομητρίως τα οποία είναι και τα περισσότερα στη γέννηση (100). Η αύξηση του λιπώδους ιστού συμβαίνει κατά τους 2 τελευταίους μήνες της εμβρυϊκής ζωής και είναι ανάλογη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού των λιποκυττάρων (101). Συνεπώς ο λιπώδης ιστός των προώρων αφενός υπολείπεται σε ανάπτυξη συγκριτικά με τον λιπώδη ιστό των τελειόμηνων ενώ ταυτόχρονα οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν το μεταβολισμό δεν έχουν ωριμάσει (101). 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 έκκρισης και δράσης τους. Επομένως μπορεί να μην υπάρχει βιολογικός – φυσιολογικός μηχανισμός που να περιλαμβάνει αυτές τις δύο ορμόνες και τα ευρήματα της μελέτης αυτής 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 (91).

Από μελέτες σε ενήλικες συμπεραίνεται ότι οι δύο ορμόνες έχουν διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς και δεν έχουν καμία συσχέτιση μεταξύ τους (90,91,92). Επίσης στους ενήλικες πιθανολογείται ότι η λεπτίνη καταστέλλει τόσο τα επίπεδα της γρελίνης, όσο και της αντιπονεκτίνης (102), καθώς είναι γνωστό ότι τα ΝΔΜ χαρακτηρίζονται από υπερλεπτιναιμία (70).

Στην συγκεκριμένη μελέτη χωρίστηκαν τα δείγματα των νεογνών ανάλογα με την ημέρα λήψης τους σε δύο ομάδες: στην ομάδα, στην οποία η λήψη αίματος πραγματοποιήθηκε εντός του πρώτου 24ώρου ζωής και στην ομάδα, στην οποία η λήψη αίματος έγινε εντός του δεύτερου 24ώρου. Έγινε προσπάθεια να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο η έκκριση της γρελίνης μεταβάλλεται τις πρώτες ημέρες της ζωής. Στη βιβλιογραφία μόνο σε δύο ερευνητικές ομάδες έχει μελετηθεί η μεταβολή της έκκρισης της γρελίνης.

Στη μία μελέτη αποδείχθηκε ότι η συγκέντρωση της γρελίνης αυξάνεται σημαντικά κατά την πρώιμη μεταγεννητική περίοδο, κατά τη σύγκριση δειγμάτων ομφάλιου λώρου και δειγμάτων που ελήφθησαν μεταξύ της τρίτης ως έβδομης ημέρας ζωής, από τελειόμηνα AGA νεογνά (51).

Στην δεύτερη μελέτη φάνηκε ότι σε πρόωρα AGA νεογνά παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της ολικής γρελίνης από τη γέννηση (δείγμα ομφάλιου λώρου) ως την τέταρτη ημέρα ζωής (67).

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι υπάρχει σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της γρελίνης τις δύο πρώτες ημέρες της ζωής. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν πλήρως με τη μελέτη του τρόπου έκκρισης της γρελίνης σε AGA τελειόμηνα (51) και AGA πρόωρα νεογνά (67). Είναι πάντως απαραίτητο να αναφερθεί ότι στις προηγούμενες μελέτες τα δείγματα γρελίνης ομφάλιου λώρου και της $4^{ης}$ ημέρας λήφθηκαν από τα ίδια τα νεογνά, ενώ στη συγκεκριμένη μελέτη τα δείγματα των δύο ομάδων προέρχονταν από διαφορετικά νεογνά, τα οποία όμως είχαν κοινό χαρακτηριστικό ότι οι μητέρες τους παρουσίαζαν ΣΔΚ.

Σε μία αρχική μελέτη είχε φανεί ότι τα επίπεδα γρελίνης ομφάλιου λώρου στα νεογνά που γεννήθηκαν με καισαρική τομή ήταν χαμηλότερα από τα επίπεδα γρελίνης των νεογνών που γεννήθηκαν με φυσιολογικό τοκετό (61). Τελικά, μεταγενέστερη μελέτη των ίδιων

ερευνητών, με μεγαλύτερο πληθυσμό νεογνών, συμπεριλαμβανομένων και πρόωρων (53), όπως και πολλές άλλες μελέτες απέδειξαν ότι ο τρόπος τοκετού δεν έχει καμία επίδραση στα επίπεδα γρελίνης (63,71). Στην παρούσα ερευνητική μελέτη δεν πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση της συσχέτισης του τύπου του τοκετού με τα επίπεδα γρελίνης καθώς στο δείγμα, το 90% των νεογνών γεννήθηκαν με καισαρικές τομές, οπότε δεν θα ήταν δυνατό να προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα.

Συμπερασματικά η ερευνητική αυτή μελέτη παρέχει προκαταρκτικά στοιχεία σχετικά με την δράση της γρελίνης και την αλληλεπίδρασή της με άλλες μακρομοριακές ουσίες και μεταβολικές ορμόνες στην ενδομήτρια και πρώιμη μεταγεννητική ζωή. Σε συμφωνία με την πλειονότητα των ερευνητικών εργασιών στη βιβλιογραφία, δεν παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση των επιπέδων γρελίνης με την ηλικία κύησης, ούτε ύπαρξη φυλετικού διμορφισμού.

Επίσης δεν αποδείχθηκε καμία σημαντική συσχέτιση με τις ανθρωπομετρικές παραμέτρους, τόσο στα τελειόμηνα όσο και στα πρόωρα ΝΔΜ. Από τις βιοχημικές παραμέτρους παρατηρήθηκε οριακή σημαντική θετική συσχέτιση με την ολική χοληστερόλη, μόνο στην ομάδα των πρόωρων (p=0,070), αλλά απαιτούνται περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό νεογνών.

Παρατηρήθηκε σημαντική θετική συσχέτιση με την λιποκυτταροκίνη αντιπονεκτίνη, στα τελειόμηνα (p=0,002) και το σύνολο των νεογνών (p=0,022), γεγονός που αντικατοπτρίζει τη σχέση μεταξύ των δύο ορμονών καθώς και την επίδραση του ενδομήτριου υπερινσουλιναιμικού περιβάλλοντος του ΝΔΜ στη σχέση αυτή.

Τέλος, αποδείχθηκε ότι τα επίπεδα γρελίνης αυξάνονται τις δύο πρώτες μέρες ζωής στα ΝΔΜ σε στατιστικά σημαντικό βαθμό (p =0,003), όπως έχει φανεί σε δύο προηγούμενες μελέτες σε πρόωρα και τελειόμηνα φυσιολογικά AGA νεογνά (51,67).

Είναι βέβαιο ότι απαιτούνται περαιτέρω έρευνες προκειμένου να σκιαγραφηθεί ο μεταβολικός ρόλος της γρελίνης κατά την περιγεννητική περίοδο της ζωής (15,56,66,68,69). Φαίνεται πάντως ότι τα επίπεδα γρελίνης ομφάλιου λώρου σχετίζονται με την αύξηση του βάρους στην νεογνική ηλικία. Επίσης πιθανόν σχετίζονται με την κληρονομούμενη κατάσταση που φέρει κάθε νεογνό για τη γρελίνη, η οποία συνδέεται με το μελλοντικό του διατροφικό προφίλ (64).

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature 1999;402:656-660.
2. Date Y, Kojima M, Hosoda H et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. Endocrinology 2000;141:4255-4261.
3. Wierup N, Svensson H, Mudler H, Sundler F. The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. Regul Pept 2002;107:63-69.
4. Van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. Endocr Rev 2004;25:426-57.
5. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: Review of pathobiochemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin and resistin. Clin. Chemistry 2004;50:1511-25.
6. Hosoda H, Kojima M, Mitzushima T, Shimizu S, Kangawa K. Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by posttranslational processing. J Biol Chem 2003;278:67-70.
7. Cassoni P, Papotti M, Ghe C et al. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. J Clin Endocr Metab 2001;86:1738-45.
8. Wajnrajch MP, Ten IS, Gertner JM, Leibel RL: Genomic organization of human ghrelin gene. J Endocr Genet, 2000; 1: 231-233.
9. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K: Purification and characterization of rat des-Gln14-ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. J Biol Chem, 2000; 29: 1995-2000.
10. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. Biochem Biophys Res Commun 2000;279:909-913.
11. De Ambrogi M, Volpe S, Tamanini C. Ghrelin: central and peripheral effects of a novel peptydil hormone. Med. Sci. Monit, 2003;9:217-224.
12. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. Diabetes 2001; 50:1714-19.
13. Whatmore AJ, Hall CM, Jones J, Westwood M, Clayton PE. Ghrelin concentrations in healthy children and adolescents. Clin Endocrinol 2003;59:649-54.
14. 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.
15. Bellone S, Rapa A, Vivenza D et al. Circulating ghrelin levels as function of gender, pubertal status and adiposity in childhood. J Endocrinol Invest 2002; 25:RC13-RC15.
16. Barkan AL, Dimaraki EV, Jessup SK, Symons KV, Ermolenko M, Jaffe CA. Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. J Clin Endocr Metab2003; 88:2180-2184.
17. Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB. Ghrelin-a hormone with multiple functions. Front Neuroendocrinol 2004; 25:27-68
18. Howard AD, Feighner SD, Cully DF et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. Science 1996; 273:974-977.
19. Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD et al. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. Endocr Rev 1997;18:621-645.

20. Petersenn S. Structure and regulation of the growth hormone secretagogue receptor. Minerva Endocrinol 2002;27:243-56.
21. Casanueva FF, Dieguez C. Ghrelin: the link connecting growth with metabolism and energy homeostasis. Rev Endocrinol Metab Disord 2002;3:326-38.
22. Tolle V, Bassant MH, Zizzari P et al. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep- wake patterns in rats. Endocrinology 2002;143:1353-1361.
23. Arvat E, Di Vito L, Broglio F et al. Preliminary evidence that ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans. J Endocrinol Invest 2000;23:493-495.
24. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA et al.. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:5992 .
25. Gualillo O, Lago F, Gomez-Reino J, Casanueva FF, Dieguez C. Ghrelin, a widespread hormone: insights into molecular and cellular regulation of its expression and metabolism of action. FEBS Lett 2003;552:105-9.
26. Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K et al. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. Diabetes 2001;50:227-232
27. Marks DL, Cone RD. Central melanocortins and the regulation of weight during acute and chronic disease. Recent Prog Horm Res 2001;56:359-375.
28. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. Diabetes 2001;50:2438-43.
29. Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M. et al. Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. Biochem Biophys Res Commun 2001;281:1220-1225.
30. Broglio F, Gottero C, Prodam F et al. Ghrelin secretion is inhibited by glucose load and insulin-induced hypoglycaemia but unaffected by glucagon and arginine in humans. Clin Endocrinol 2004;61:503-9.
31. McCowen KC, Maykel JA, Bistrian BR, Ling PR. Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. J Endocrinol 2002;175:R7-11.
32. Nakagawa E, Nagaya N, Okumura H et al. Hyperglycaemia suppresses the secretion of ghrelin, a novel growth-hormone-releasing peptide: responses to the intravenous and oral administration of glucose. Clin Sci 2002;103:325-8.
33. Saad MF, Bernaba B, Hwu CM et al. Insulin regulates plasma ghrelin concentration. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:3997-4000.
34. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Frayo RS, Cummings DE. Plasma ghrelin concentrations are decreased in insulin-resistant obese adults relative to equally obese insulin-sensitive controls. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:1630-5.
35. Katsuki A, Urakawa H, Gabazza EC et al Circulating levels of active ghrelin is associated with abdominal adiposity, hyperinsulinemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. Eur J Endocrinol. 2004;151(5):573-7.
36. Asakawa A, Inui A, Kaga T et al. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. Gut. 2003;52(7):918-21
37. Caixas A, Bashore C, Nash W, Pi-Sunyer F, Laferrere B. Insulin, unlike food intake, does not suppress ghrelin in human subjects. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:1902.
38. Shiiya 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;87:240-4
39. Celi F, Bini V, Papi F et al. Circulating acylated and total ghrelin and galanin in children with insulin-treated type 1 diabetes: relationship to insulin therapy, metabolic control

and pubertal development . Clin Endocrinology 2005;63, 139-145
40. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. Nature 2000;407:908-13
41. Marzullo P, Verti B, Savia G, et al. The relationship between active ghrelin levels and human obesity involves alterations in resting energy expenditure. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:936-9.
42. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. Cell 2001;104:531-543.
43. Friedman MI. Fuel partitioning and food intake. Am J Clin Nutr 1998;67:513-518.
44. Soriano-Guillen L, Barrios V, Campos-Barros A, Argente J. Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. J Pediatr 2004;144:30-5.
45. Greenman Y, Golani N, Gilad S, Yaron M, Limor R, Stern N. Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. Clin Endocrinol (Oxf). 2004;60(3):382-8.
46. Horvath TL, Diano S, Sotonyi P, Heiman M, Tschop M. Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance—a hypothalamic perspective. Endocrinology 2001;142:4163-69.
47. Zigman JM, Elmquist JK. Minireview: from anorexia to obesity-the yin and yang of body weight control. Endocrinology 2003; 144:3749-56.
48. Heiman ML, Tschop M. Ghrelin provides the calories that growth hormone requires for growth and repair. Topic Endocrinol Suppl 20012:39-40.
49. Ido W, Seigal S, Hannah K et al. Adiponectin, Ghrelin, and Leptin in Cancer Cachexia in Breast and Colon Cancer Patients Cancer 2006; 106:966-73.
50. Gualillo O, Caminos J, Blanco M et al. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. Endocrinology 2001;142 788-794.
51. Kitamura S, Yokota I, Hosoda H et al. Ghrelin concentration in cord and neonatal blood: relation to fetal growth and energy balance. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:5473-7.
52. Cortelazzi D, Cappiello V, Morpurgo PS et al. Circulating levels of ghrelin in human fetuses. Eur J Endocrinol 2003;149:111-6.
53. Bellone S, Rapa A, Vivenza D et al. Circulating ghrelin levels in the newborn are positively associated with gestational age. Clin Endocrinol 2004;60:613-7.
54. Hayashida T, Nakahara K, Mondal MS et al. Ghrelin in neonatal rats: distribution in stomach and its possible role. J Endocrinol 2002;173:239-45.
55. Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti, M. Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. J of Histoch and Cytoch 2002;50,1013-21.
56. Wienrup N, Sundler F. Circulating levels of ghrelin in human fetuses. European J of Endocrinology 2004;150:405.
57. Chanoine JP, Yeung LP, Wong AC. Umbilical cord ghrelin concentrations in Asian and Caucasian neonates. Horm Res 2003;60:116-20.
58. Pirazolli P, Lanari M, Zucchini S et al. Active and total concentrations in the newborn. J Ped Endocr& Metab 2005; 379-384.
59. Yokota I, Kitamura S, Hosoda H, Kotani Y, Kangawa K. Concentration of the n-octanoylated active form of ghrelin in fetal and neonatal circulation. Endoc Journal2005; 52, 271-276.
60. Farquhar J, Heiman M, Wong AC, Wach R, Chessex P, Chanoine JP. Elevated umbilical cord ghrelin concentrations in small for gestational age neonates. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:4324-7.
61. Bellone S, Rapa A, Vivenza D et al. Circulating ghrelin levels in newborns are not associated to gender, body weight and hormonal parameters but depend on the type of delivery. J Endocrinol Invest2003;26(4):RC9-11.
62. Chanoine JP, Yeung LP, Wong AC, Birmingham CL. Immunoreactive ghrelin in human cord blood: relation to anthropometry, leptin, and growth hormone. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2002;35:282-6
63. 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 Endocrinology2004; 180, 267-271.
64. 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
65. Ogilvy-Stuart AL, Hands SJ, Adcock J et al. Insulin, Insulin-like growth factor I (IGF-1), IGF-bindin protein-1, growth hormone and feeding in the newborn. J Clin Endocrinology 1998; 83:3550-3557
66. Ghigo E, Broglio F, Arvat E, Maccario M, Papotti M, Muccioli G Ghrelin: more than a natural GH secretagogue and/or an orexigenic factor. Clin Endocr(Oxf).2005 ;62(1):1-17.
67. Bellone S, Baldelli R, Radetti G et al. Ghrelin secretion in preterm neonates progressively increases and is refractory to the inhibitory effect of food intake. J Clin Endocrin Metab 2006;57:11-17.
68. Inui A. Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. Nat Rev Neurosci. 2001;2(8):551-60.
69. Iniguez G, Ong K, Pena V, Avila A, Dunger D, Mericq V. Fasting and post-glucose ghrelin levels in sga infants: relationships with size and weight gain at one year of age. J of Clin Endocr & Metab 2002;87(12):5830-5833.
70. Ng PC, Lam CWK, Lee CH et al. Leptin and metabolic hormones in infants of diabetic mothers Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 2000;83;193-197.
71. Ng PC, Lee CH, Lam CWK, Chan IHS, Wong E, Fok TF. Ghrelin in preterm and term newborns: relation to anthropometry, leptin and insulin. Clin Endocrinology2005; 63:217-222.
72. Chan JL, Bullen J, Lee JH, Yiannakouris N, Mantzoros CS Ghrelin levels are not regulated by recombinant leptin administration and/or three days of fasting in healthy subjectsJ Clin Endocrinol Metab. 2004 ;89(1):335-43.
73. 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.
74. Παπαντωνίου ΝΕ. Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης. Επίτομη Μαιευτική και Γυναικολογία. Εκδόσεις Παρισίανου,2000;173-179.
75. Κρεατσάς Γ. Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης. Σύγχρονη Γυναικολογία και Μαιευτική-Εκδόσεις Πασχαλίδη,1998;236-244.
76. Buchanan AT, Xiang AH. Gestational diabetes mellitus. Journal of Clinical Investigation 2005;115:485-491.
77. Κώσταλος Χ. Νεογνολογία Τομός Α΄, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας , 1996;
78. deBruin NC, van Velthoven KAM, Stijnen T, Juttmann RE, Degenhart HJ, Visser HKA Body fat and fat-free mass in infants: new and classic anthropometric indexes and prediction equations compared with total-body electrical conductivity. Am J Clin Nutr1995;61:1195-05.
79. Leaflet of Ghrelin (Total) RIA kit
80. Henrique MG, Pereira Marlice AS, Marques Isadora B et al. Evaluation of the Comparability of Commercial Ghrelin Assays. Clin Chemistry 2004;50: 457-458.
81. Leaflet of Human Adiponectin RIA kit
82. Sivan E, Mazaki-Tovi S, Pariente C et al. Adiponectin in human cord blood: relation to fetal birth weight and gender. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2003; 88(12):5656-5660.
83. Iñiguez G, Soto N, Avila A et al Adiponectin levels in the first two years of life in a prospective cohort: relations with weight gain, leptin levels and insulin sensitivity. Journal of Clin Endocr & Metab 2004; 89(11):5500-5503.
84. Kramer MS, Platt RW, Wen SW et al. A new and improved population-based Canadian reference for birth weight for gestational age. Pediatrics.2001 ;108(2):E35
85. Neonatal and perinatal Medicine, Avroy –Fanaroff, 6th Edition

86. Purnell JQ, Weigle DS, Breen P, Cummings DE Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol, but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans J Clin Endocr Metab. 2003;88:5747-52
87. Putet G, Senterre J, Rigo J, Salle B. Energy balance and composition of body weight. Biol Neonate. 1987;52 Suppl 1:17-24.
88. Ng PC, Lam CWK, Lee CH et al. Leptin and metabolic hormones in preterm newborns. Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed. 2000;83;198-202.
89. Beaumont NJ, Skinner VO, Tan TM et al. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonaseJ Biol Chem. 2003 14;278(11):8877-80
90. Libe et al. Ghrelin and adiponectin in Cushing's disease.Clin Endocr.2003;62:30-36
91. Choi KM, Lee J, Lee KW The associations between plasma adiponectin, ghrelin levels and cardiovascular risk factorsEur J Endocrinol. 2004 May;150(5):715-8
92. Oh KW, Lee WY, Rhee EJ et al. The relationship between serum resistin, leptin, adiponectin, ghrelin levels and bone mineral density in middle-aged men. Clin Endocrinol (Oxf). 2005;63(2):131-8
93. Nedvídková J, Smitka K, Kopský V, Hainer V. Adiponectin, an adipocyte-derived protein. Physiological Researh 2005; 54:133-140.
94. Cianfarani S, Martinez C, Maiorana A et al.. 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.
95. Kershaw E, Flier J. Adipose tissue as an endocrine organ. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2004; 89(6):548-2556.
96. Stevens A, Lowe J,Histology, Mosby Editions,1993
97. Eero Kajantie, Timo Hytinantti, Petteri Hovi, Sture Andersson. Cord Plasma Adiponectin: A 20-fold rise between 24 weeks gestation and term. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 2004; 89(8):4031-4036.
98. 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.
99. 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.
100. Boulton TJ, Dunlop M, Court JM. The growth and development of fat cells in infancy. Pediatric Res 1978;12:908-911
101. Enzi G, Zanardo V, Caetta F et al. Intrauterine growth and adipose tissue development. Am J Clin Nutr 1981;34:1785-90
102. Ueno et al. Leptin inhibits ghrelin and adiponectin. Endocrinology 2004;145(9):4176-4184

Ζ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι - ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΙΣ

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 < $10^{η}$ 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 $10^{ης}$ και $90^{ης}$ εκατοστιαίας θέσης για την ηλικία τους
13. LGA (large for gestational age) – νεογνά μεγάλα για την ηλικία κύησης, δηλαδή με βάρος γέννησης > $90^{η}$ εκατοστιαία θέση για την ηλικία τους
14. ΣΔΚ – σακχαρώδης διαβήτης κύησης
15. ΝΔΜ – νεογνό διαβητικής μητέρας
16. HDL (high density lipoproteins) – λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας
17. LDL (low density lipoproteins) – λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας
18. z-σκορ βάρους γέννησης - [(βάρος γέννησης – μέσος όρος του πληθυσμού)/ SD τυπική απόκλιση του πληθυσμού]

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ - Χαρακτηριστικά του RIA kit της γρελινης

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 (εκφρασμένες 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 ραδιοανοσολογικής 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 (intra - assay precision) και από την διακύμανση που παρουσιάζονται μεταξύ των μετρήσεων σε διαφορετικά δείγματα (inter - assay precision).

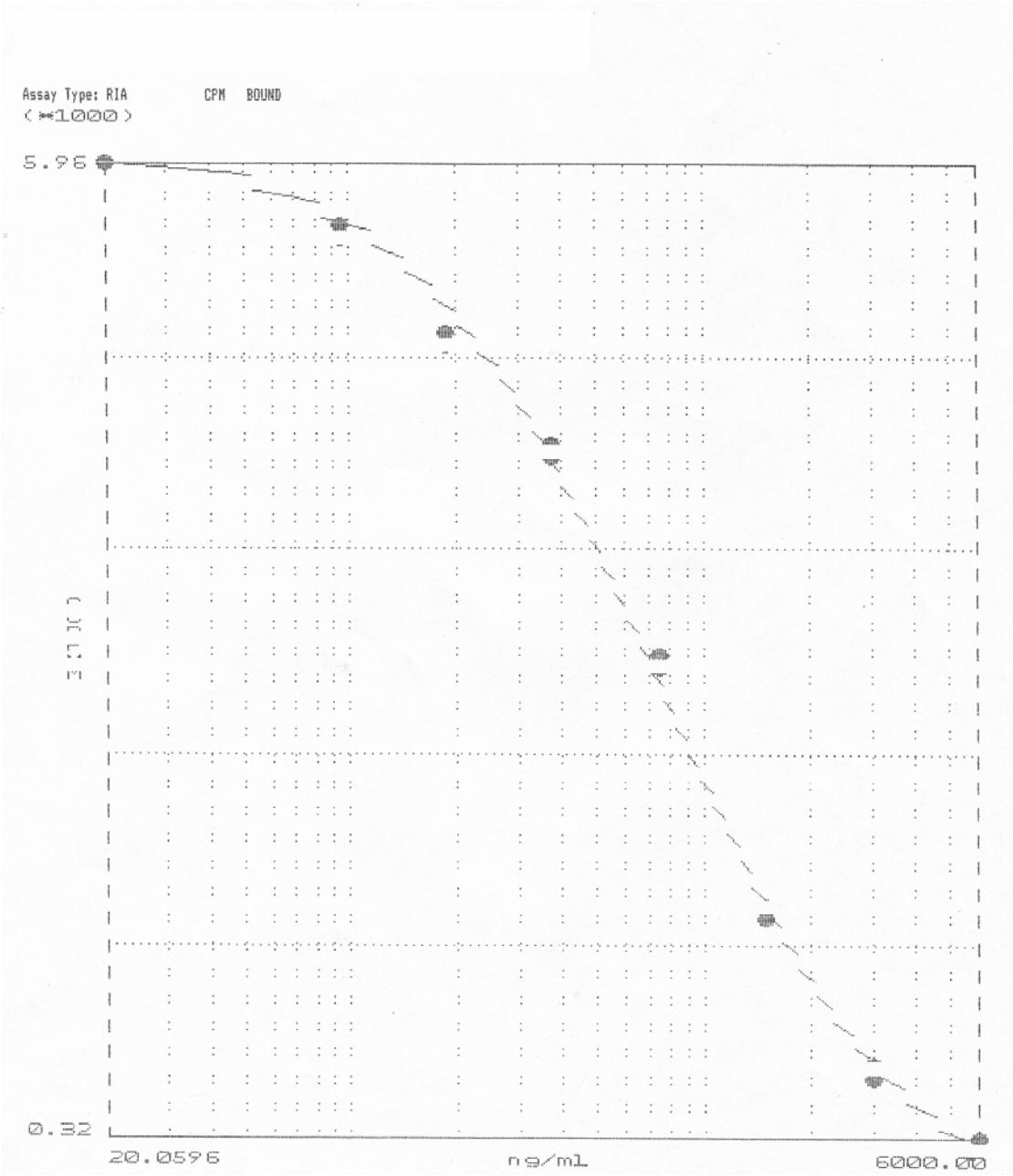
Α/Α δείγματος	Μέση τιμή ng/ml	Intra-assay precision (%CV)	Inter-assay precision (%CV)
1	1000	10,0	14,7
2	1500	3,3	17,8
3	2000	7,9	16,0
4	3000	4,4	16,7

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



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ - Χαρακτηριστικά του RIA kit της αντιπονεκτίνης και περιγραφή της διαδικασίας μέτρησής της

Πίνακας 1 – Αντιδραστήρια που περιλαμβάνει το RIA kit

Ρυθμιστικό διάλυμα 10Χ
Αντιορός κόνικλου
^{125} I – Αντιπονεκτίνη
30% όρος φυσιολογικού κόνικλου - φορέας
Λυοφιλοποιημένη κεκαρμένη ανασυνδυασμένη αντιπονεκτίνη
Λυοφιλοποιημένα κεκαρμένα δείγματα ελέγχου ποιότητας ανασυνδυασμένης αντιπονεκτίνης (control 1-2)
Αντιδραστήριο κατακρήμνισης

Πίνακας 2 – Παράμετροι επίδοσης (εκφρασμένες 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: αντιπονεκτίνη επίμυος = 400% και ανθρώπινη C1q πρωτεΐνη < 0,01%.

Πίνακας 4 – Ακρίβεια του RIA kit

Η ακρίβεια μίας ραδιοανοσολογικής 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).

Α/Α δείγματος	Μέση τιμή μg/ml	Intra-assay	Inter-assay

		precision (%CV)	precision (%CV)
1	1,5	3,59	9,25
2	3,0	6,21	6,90
3	7,5	1,78	9,25

Περιγραφή πρωτοκόλλου μέτρησης της αντιπονεκτίνης

Η όλη πειραματική διαδικασία διαρκεί δύο ημέρες. Αρχικά πραγματοποιείται η προετοιμασία- ανασύσταση της λυοφιλοποιημένης αντιπονεκτίνης (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 αντιπονεκτίνης, όπως ανέφερε το πρωτόκολλο.

Την πρώτη μέρα πραγματοποιήθηκαν 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 100μl από το διάλυμα των human adiponectin standards και από τα διαλύματα των quality control 1 και 2 εις διπλούν στα αντίστοιχα σωληνάριά τους.
3. Έγχυση 100μl από κάθε δείγμα εις διπλούν στα αντίστοιχα σωληνάριά τους.
4. Έγχυση 100μl της ^{125}I – αντιπονεκτίνης σε όλα τα σωληνάρια.
5. Έγχυση 100μl του αντισώματος της αντιπονεκτίνης 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 (25^0C).

Την δεύτερη μέρα πραγματοποιήθηκαν:

7. Προσθήκη 10μl του φορέα σε όλα τα σωληνάρια, εκτός από τα σωληνάρια 1-2 (σωλ. ολικής μέτρησης).
8. Προσθήκη 10ml του αντιδραστηρίου κατακρήμνισης (διατήρηση στους 4^0C), εκτός από τα σωληνάρια 1-2 (σωλ. ολικής μέτρησης).
9. Ακολούθησε ανάδευση και επώαση 20 λεπτών στους 4^0C.

10. Φυγοκέντρηση στους 4^0C, 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 υπερκειμένου 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 αντιπονεκτίνης.

13. Ελήφθη ο μέσος όρος 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.
14. Ακολούθησε αφαίρεση του μέσου όρου των NSB μετρήσεων από κάθε μέσο όρο μέτρησης (εκτός από τις μετρήσεις των σωλ. 1 και 2).
15. Ακολούθως : υπολογίστηκε το ποσοστό της δέσμευσης του ανιχνευτή
16. [Μ.Ο. συγκέντρωσης σωλ. 5 -6 (Bo)/ Μ.Ο. συγκέντρωσης σωλ. 1-2 (TCT)] x 100.
17. Υπολογίστηκε το ποσοστό της ολικής δέσμευσης (%B/ Bo) για κάθε γνωστό (standard) και άγνωστο δείγμα [% B/Bo= (δείγμα/ ολική δέσμευση) x 100].
18. Καταρτίστηκε το ποσοστό %B/Bo για κάθε γνωστό δείγμα στον άξονα y και τη γνωστή συγκέντρωση του γνωστού δείγματος στον άξονα x, σε λογαριθμικό χαρτί.
19. Κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη αναφοράς, ενώνοντας τα σημεία με μία καμπύλη γραμμή (**εικόνα 2** στο παράρτημα ΙΙΙ).
20. Προσδιορίστηκε 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.

Εικόνα 1 - Σχηματική παράσταση του πρωτοκόλλου μέτρησης της αντιπονεκτίνης

Assay Procedure Flow Chart

	Day One					Day Two			
	Step 1	Step 2-3	Step 4	Step 5	Step 6	Step 7	Step 8	Step 9	Step 10-12
Tube #	Add Assay Buffer	Add Standard / Sample	Add ^{125}I-Adiponectin Tracer	Add Adiponectin Antibody	Vortex, Cover, and Incubate 20-24 hrs at RT	Add Rabbit Carrier	Add Precipitating Reagent	Vortex, and Incubate 20 min. at 4°C	Centrifuge for 20 min., Decant, and Count pellets
1,2	----	----	100 µl	----		----	----		
3,4	300 µl	----	100 µl	----		10 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 αντιπονεκτίνης

